



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111057154 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 06

(21) 申请号 201911333414.5

C07K 16/24 (2006.01)

(22) 申请日 2019.12.23

C12N 15/85 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111057154 A

(56) 对比文件

US 2016207996 A1, 2016.07.21

(43) 申请公布日 2020.04.24

审查员 戴易兴

(73) 专利权人 南京融捷康生物科技有限公司

地址 211800 江苏省南京市江北新区新锦

湖路3-1号中丹生态生命科学产业园

一期A座2005-2007室

(72) 发明人 苏志鹏 孟巾果 姚尧 周耿

(74) 专利代理机构 南京冠誉至恒知识产权代理

有限公司 32426

专利代理师 郭晓敏

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

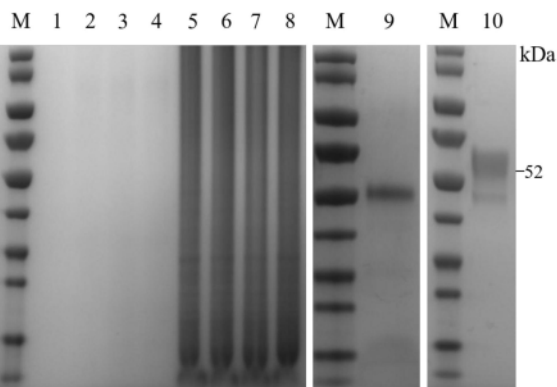
序列表12页 附图2页

(54) 发明名称

基于驼源Fc片段的免疫原的制备及应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术或免疫学技术领域,涉及基于驼源Fc片段的免疫原的制备及应用,所述的免疫原由目的蛋白与驼源Fc片段融合而成,所述的驼源Fc片段如SEQ ID NO:17-22中的任意一条所示,编码基因序列分别如SEQ ID NO:23-28所示。本发明公开了将目的基因与驼源免疫球蛋白Fc片段编码序列融合构建,表达、纯化后作为免疫原来免疫驼源动物的方法,通过本发明所公布的驼源免疫球蛋白Fc片段基因序列、表达载体及宿主细胞,目的基因片段可以高效表达,并应用于驼源动物免疫。驼源Fc融合蛋白既保证了抗原的表达量和稳定性,也保证了抗原的免疫原性,为单域抗体的开发提供了很大的便利。



1. 一种基于驼源Fc片段的免疫原,所述的免疫原由目的蛋白与驼源Fc片段融合而成,其特征在于,所述的驼源Fc片段如SEQ ID NO:17-22中的任意一条所示;所述目的蛋白为人源IL-13蛋白。

2. 根据权利要求1所述的一种基于驼源Fc片段的免疫原,其特征在于,所述驼源Fc片段的编码序列分别如SEQ ID NO:23-28中的任意一条所示。

3. 基于驼源Fc片段的免疫原的表达载体,其特征在于,所述的表达载体包括5' -多克隆位点(MCS) -连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列-6个组氨酸(6×His)编码序列-3' 的序列;所述连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列如SEQ ID NO: 23-28中的任意一条所示;人源IL-13蛋白的编码序列插入驼源Fc蛋白表达载体的多克隆位点。

4. 权利要求3所述的基于驼源Fc片段的免疫原的表达载体的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 驼源Fc蛋白编码序列的获得;

2) 构建驼源Fc蛋白表达载体;

3) 将人源IL-13蛋白的编码序列插入驼源Fc蛋白表达载体的多克隆位点;

步骤1) 具体为:分离内蒙古阿拉善双峰驼外周血中的PBMCs;提取总RNA,通过逆转录试剂盒将总RNA进行反转录成cDNA;通过基因特异性引物SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 10对反转录后的cDNA进行PCR反应,得到5种PCR产物;

步骤2) 具体为:通过引物SEQ ID NO: 11、16,SEQ ID NO: 12、16,SEQ ID NO: 13、16,SEQ ID NO: 14、16,SEQ ID NO: 15、16分别对步骤1)得到的5种PCR产物进行PCR扩增,得到如SEQ ID NO:23-28所示的6种DNA序列,然后通过合适的酶切位点将6种DNA序列酶切;将结构为5' -多克隆位点(MCS) -连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列-6个组氨酸(6×His)编码序列-3' 的酶切产物克隆到载体中。

5. 权利要求1或2所述的基于驼源Fc片段的免疫原的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 采用权利要求4的方法构建基于驼源Fc片段的免疫原的表达载体;

2) 将表达载体转染真核细胞,以实现人源IL-13蛋白与驼源Fc蛋白构成的融合蛋白的表达。

6. 驼源Fc片段在制备免疫原中的应用,其特征在于,所述的免疫原由人源IL-13蛋白与驼源Fc片段融合而成,所述的驼源Fc片段如SEQ ID NO:17-22中的任意一条所示;所述的免疫原用于免疫骆驼。

7. 权利要求1或2所述的基于驼源Fc片段的免疫原在制备针对人源IL-13蛋白的单域抗体中的应用。

基于驼源Fc片段的免疫原的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术或免疫学技术领域,涉及基于驼源Fc片段的免疫原的制备及应用。

背景技术

[0002] 抗体(Antibody, Ab)即免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)是血液和组织液中的一类糖蛋白,由B细胞接收抗原刺激后增殖分化生成的浆细胞产生,主要存在与血清等体液中,能与相应抗原特异性地结合,是介导体液免疫的重要效应分子。抗体除了因其作为重要效应分子介导特异性体液免疫应答外,抗体在疾病的防治特别是感染性疾病的防治方面扮演者重要角色,Behring创立血清疗法因此获得医学与生理学诺贝尔奖。此后,以多克隆、单克隆及基因工程抗体技术人工制备的抗体逐步应用于临床。仅2011年抗药药物就以480亿美元的销售额领跑全球药品市场,占整个生物制药市场的34.4%。至2017年,美国FDA和欧盟EMA批准的治疗性抗体药物有76个,主要用于肿瘤、自身免疫病等疾病的治疗。

[0003] 抗体作为可以特异性识别某一个目的蛋白(抗原)的分子,是通过该蛋白作为免疫原,免疫动物后又通过免疫学、细胞生物学以及基因工程手段获得的。抗体分子的分子量一般为150kDa左右,两条相同的重链和两条相同的轻链构成了抗体分子的多级结构。抗体分子在体外通过木瓜蛋白酶或者胃蛋白酶的水解作用下可以变成Fab片段和Fc片段,Fab片段具有抗原识别能力,Fc片段游离出来。在体内,完整的IgG分子上的Fc片段还可以介导抗体依赖的细胞毒作用,进而杀伤靶标细胞。

[0004] 在后续的研究当中,研究者发现,将IgG的Fc片段亚克隆出来,与目的基因进行融合、表达,与未融合之前,可以提高目的基因的表达量、纯化后的溶解度以及蛋白储存时的稳定性,并且由于Fc片段上有半胱氨酸的存在,两个Fc片段可以生成二硫键,所以在体外重组表达Fc融合蛋白时,一般会获得融合蛋白的二聚体形式,通过突变或者不突变Fc片段相应位置的半胱氨酸或者改变其他位置氨基酸电荷的情况,可以改变体外重组Fc融合蛋白的单体或者二聚体形式,这为研究者对目的蛋白的研究提供了非常便利的工具。Fc融合蛋白的优点固然重要,但其也有缺点,即Fc融合蛋白在作为免疫原去免疫动物时,会给研究者带来不小的困扰。单体Fc片段的大小在25kDa,对于异体动物其免疫原性很强,所以在Fc融合蛋白作为免疫原免疫动物后,研究者进行抗体筛选和鉴定时会获得大量针对Fc蛋白的抗体,而针对目的蛋白的抗体却了了无几,难以获得。而这些免疫原选择Fc融合表达的原因往往是:1.单独表达目的蛋白很困难,产量低、储存不稳定,2.目的蛋白自身免疫原性太弱,单独免疫动物不足以引发其体液免疫反应。所以在抗体开发过程中,对于单独制备难度较大的免疫原,找到一个更好的生产方法是亟待解决的问题。

[0005] 在抗体开发过程当中,抗原的免疫的宿主最常用的是小鼠,小鼠的使用成本更低,结合噬菌体展示技术,其抗体开发的周期也可以控制到很短,对于小鼠免疫,由于动物重量很小,所以免疫原用量非常小,所以小鼠来源的抗体开发对于免疫原的制备总量要求不高,并且可以通过注射原核表达产物包涵体的形式实现。近十年来,驼源的单域抗体在抗体药

物开发中愈发受到追捧,而驼源动物由于重量大,所需的免疫原量自然会更多,并且由于驼源动物的使用成本更高,且驼源动物体内更易产生针对构象表位的抗体,所以注射包涵体形式的免疫原给驼源动物就不是一个明智之选,所以免疫原的质和量对于驼源动物的免疫就成为非常重要的一个因素。所以,研究者又把目光投向了Fc融合蛋白。

发明内容

[0006] 为了克服上述缺陷,本发明的目的是提供一种基于驼源Fc片段的免疫原的制备及应用,针对目的蛋白无法表达或免疫原性不够的问题,选择目的蛋白与驼源Fc融合并免疫骆驼,但是免疫后骆驼会产生非常多的针对人源Fc而不是A蛋白的抗体。

[0007] Fc融合蛋白的缺点是制约优选抗体获得的重要因素,本发明则选用驼源Fc融合目的蛋白,然后再用该融合蛋白免疫同属同种动物,这样既保证了抗原的表达量和稳定性,也保证了抗原的免疫原性,并且在抗体筛选过程中不会产生针对Fc蛋白的抗体。为单域抗体的开发提供了很大的便利。单域抗体作为单克隆抗体的一类,其比传统单抗的亲和力普遍更高,稳定性更好,并且它也具备传统单抗的优点。因此,本发明就是利用上述优势,获得针对一些抗原难以获得的靶标,注射驼源动物,最终获得针对靶标蛋白的抗体。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:一种基于驼源Fc片段的免疫原,所述的免疫原由目的蛋白与驼源Fc片段融合而成,所述的驼源Fc片段如SEQ ID NO:17-22中的任意一条所示。

[0009] 具体地,所述驼源Fc片段的编码序列分别如SEQ ID NO:23-28中的任意一条所示。这里的驼源Fc片段包括驼源Fc和连接区序列。

[0010] 本发明还提供基于驼源Fc片段的免疫原的表达载体,所述的表达载体包括5'-多克隆位点(MCS)-连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列-6个组氨酸(6×His)编码序列-3'的序列;所述连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列如SEQ ID NO:23-28中的任意一条所示。这里的驼源Fc编码序列仅为Fc序列,不包括连接区序列。

[0011] 优选的,目的蛋白的编码序列插入驼源Fc蛋白表达载体的多克隆位点。

[0012] 本发明的另一个目的是提供基于驼源Fc片段的免疫原的表达载体的构建方法,包括以下步骤:

[0013] 1) 驼源Fc蛋白编码序列的获得;

[0014] 2) 构建驼源Fc蛋白表达载体;

[0015] 3) 将目的蛋白的编码序列插入驼源Fc蛋白表达载体的多克隆位点;

[0016] 步骤1) 具体为:分离内蒙古阿拉善双峰驼外周血中的PBMCs;提取总RNA,通过逆转录试剂盒将总RNA进行反转录成cDNA;通过基因特异性引物SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:10对反转录后的cDNA进行PCR反应,得到5种PCR产物;

[0017] 步骤2) 具体为:通过引物SEQ ID NO:11、16,SEQ ID NO:12、16,SEQ ID NO:13、16,SEQ ID NO:14、16,SEQ ID NO:15、16分别对步骤1)得到的5种PCR产物进行PCR扩增,得到如SEQ ID NO:23-28所示的6种DNA序列,然后通过合适的酶切位点将6种DNA序列酶切;将结构为【5'-多克隆位点(MCS)-连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列-6个组氨酸(6×His)编码序列-3'】的酶切产物克隆到载体中。

[0018] 本发明的又一个目的是提供基于驼源Fc片段的免疫原的制备方法,包括如下步

骤:

[0019] 1)采用前述的方法构建基于驼源Fc片段的免疫原的表达载体;

[0020] 2)将表达载体转染真核细胞,以实现目的蛋白与驼源Fc蛋白构成的融合蛋白的表达。

[0021] 本发明还公开驼源Fc片段在制备免疫原中的应用,所述的免疫原由目的蛋白与驼源Fc片段融合而成,所述的驼源Fc片段如SEQ ID NO:17-22中的任意一条所示。所述的免疫原用于免疫骆驼。

[0022] 驼源Fc片段在构建免疫原表达载体中的应用,所述的表达载体包括5'-多克隆位点(MCS)-连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列-6个组氨酸(6×His)编码序列-3'的序列;所述连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列如SEQ ID NO:23-28中的任意一条所示。

[0023] 本发明还提供前述的基于驼源Fc片段的免疫原在制备针对目的蛋白的单域抗体中的应用。

[0024] 驼源Fc序列来自于内蒙古阿拉善双峰骆驼;上述SEQ ID NO:17-22中的所有序列,可以替换为与该序列具有“至少80%同源性”的序列或仅一个或少数几个氨基酸替换的序列;优选为“至少85%同源性”,更优选为“至少90%同源性”,更优选为“至少95%同源性”,最优选为“至少98%同源性”。

[0025] 驼源Fc序列的编码序列如SEQ ID NO:23-28中的任意一条所示。所述的驼源Fc序列,其结构为linker-CH2-CH3。

[0026] 本发明的另一个目的为提供核苷酸分子,该核苷酸分子编码前述的驼源Fc片段,其核苷酸序列为SEQ ID NO:23-28中的任意一条所示。本发明的又一个目的是提供一种宿主细胞,其可以表达出前述驼源Fc蛋白或驼源Fc融合蛋白,或其包含前述的表达载体。

[0027] 相对于现有技术,本发明的有益效果是:驼源Fc融合蛋白既保证了抗原的表达量和稳定性,也保证了抗原的免疫原性,并且在抗体筛选过程中不会产生针对驼源Fc蛋白的抗体。为单域抗体的开发提供了很大的便利。

[0028] 本发明公开了将目的基因(例如人源IL-13,也可以为其它无法或难以实现真核表达的基因)与驼源免疫球蛋白Fc片段编码序列融合构建,表达、纯化后作为免疫原用来免疫驼源动物的方法,所述的驼源免疫球蛋白Fc片段具有SEQ ID NO:17-22所示的氨基酸序列,其编码基因序列分别如SEQ ID NO:23-28所示,通过本发明所公布的驼源免疫球蛋白Fc片段基因序列、表达载体及宿主细胞,目的基因片段可以高效表达,并应用于驼源动物免疫。

附图说明

[0029] 图1-2是可以融合驼源Fc蛋白序列的表达载体示意图;

[0030] 图3是目的蛋白融合驼源Fc蛋白前后表达产物纯化后SDS-PAGE鉴定图,M:蛋白质标准分子量,

[0031] 泳道1-8均为非Fc融合蛋白(即IL-13的阴性对照质粒表达后产物)纯化或者细胞裂解上清检测;其中1、2、5、6来自实施例4,1、2是实施例4中阴性对照质粒转染悬浮293F细胞后的上清纯化后SDS-PAGE结果,5、6是实施例4中阴性对照质粒转染悬浮293F细胞后的上清收集后所剩细胞沉淀裂解后上清SDS-PAGE分析结果;其中3、4、7、8来自实施例5,3、4是实

实施例5中阴性对照质粒转染ExpiCHO-STM细胞后的上清纯化后SDS-PAGE结果,7、8是实施例5中阴性对照质粒转染ExpiCHO-STM细胞后的上清收集后所剩细胞沉淀裂解后上清SDS-PAGE分析结果;9、10均为IL-13-驼源Fc融合蛋白采用实施例6的方法纯化后SDS-PAGE分析结果,其中9来自于实施例5中的上清(其由实施例3抽提的质粒转染ExpiCHO-STM细胞而得到),10来自于实施例4中的上清(其由实施例3抽提的质粒转染悬浮293F细胞而得到);

[0032] 图4是对所构建的针对IL13-CbFc的单域抗体文库进行生物淘选的具体结果,其中P/N=生物淘选中阳性孔洗脱下的噬菌体感染TG1细菌后生长的单克隆细菌数/阴性孔洗脱下的噬菌体感染TG1细菌后生长的单克隆细菌数,该参数在富集发生后会逐渐增大;I/E=生物淘选中每轮加入阳性孔的噬菌体总量/生物淘选中每轮从阳性孔洗脱出的噬菌体总量,该参数在富集发生后会逐渐趋近于1。

具体实施方式

[0033] 下面结合实施例对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0034] 本发明采用购自Thermo Fisher公司的pcDNA3.4为模板构建了含有驼源Fc编码序列的载体RJK-V4-CH,并在该载体的基础上构建了针对多个目的蛋白的驼源Fc融合蛋白,将这些重组载体转染293F细胞,表达并纯化驼源Fc融合蛋白,将SDS-PAGE分析纯度为90%以上的融合蛋白免疫内蒙古阿拉善双峰驼,经过7次免疫之后提取该双峰驼外周血淋巴细胞并建立针对单个融合蛋白的单域抗体文库。然后,利用噬菌体展示技术筛选针对目的蛋白的单域抗体,最终针对目标蛋白噬菌体文库得到了明显的富集,并获得了特异性针对目标蛋白的纳米抗体。

[0035] 将筛选获得的单域抗体在大肠杆菌中表达后通过镍离子偶联的琼脂糖进行纯化,将纯化后的纳米抗体进行分析。

[0036] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0037] 实施例1:驼源Fc蛋白编码序列的获得:

[0038] (1)随机挑选3-4只内蒙古阿拉善双峰驼,通过颈静脉采集外周血5mL;

[0039] (2)将采集的外周血通过淋巴细胞分离液分离其中的PBMCs;

[0040] (3)将获得PBMCs提取总RNA,然后通过逆转录试剂盒将总RNA进行反转录成cDNA;

[0041] (4)通过基因特异性引物SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:10对反转录后的cDNA进行PCR反应;

[0042] (5)将SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5-SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7-SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9-SEQ ID NO:10五对引物的PCR产物分别进行琼脂糖凝胶电泳分析。其中,SEQ ID NO.1、2分别命名为FC-IgG2c-FP、FC-IgG2c-RP,用于初步扩增出FC-IgG2c片段;SEQ ID NO.3、4分别命名为FC-IgG1a-FP、FC-IgG1a-RP,用于初步扩增出FC-IgG1a片段;SEQ ID NO.5、6分别命名为FC-IgG2a-FP、FC-IgG2a-RP,用于初步扩增出FC-IgG2a片段;SEQ ID NO.7、8分别命名为FC-IgG γ 1a-FP、FC-IgG γ 1a-RP,用于初步扩增出FC-IgG γ 1a片段;SEQ ID NO.9、10分别命名为FC-IgG1b-FP、FC-IgG1b-RP,用于初步扩增出FC-IgG1b片段;

[0043] 实施例2:驼源Fc蛋白表达载体的构建:

[0044] (1) 本专利中涉及的载体均是在pcDNA3.4的基础上改造的,该载体可以在Thermo Fisher网站购买;

[0045] (2) 选取pcDNA3.4上唯一的限制性酶切位点XbaI和AgeI;

[0046] (3) 并在驼源Fc蛋白编码序列的5'端引入多克隆位点,便于后期载体改造及融合蛋白序列的亚克隆;

[0047] (4) 在步骤(3)所述的多克隆位点后面引入连接区(Linker)的编码序列,linker的蛋白质序列为GGGGSGGGGSGGGGS;

[0048] (5) 将驼源Fc蛋白编码序列的3'端融合6个组氨酸的编码序列;

[0049] (6) 通过引物SEQ ID NO:11、16(以SEQ ID NO:1-2所得的PCR产物为模板,扩增得到FC-IgG2c编码序列、CfR编码序列),SEQ ID NO:12、16(以SEQ ID NO:3-4所得的PCR产物为模板,扩增得到FC-IgG1a编码序列),SEQ ID NO:13、16(以SEQ ID NO:5-6所得的PCR产物为模板,扩增得到FC-IgG2a编码序列),SEQ ID NO:14、16(以SEQ ID NO:7-8所得的PCR产物为模板,扩增得到FC-IgG γ 1a编码序列),SEQ ID NO:15、16(以SEQ ID NO:9-10所得的PCR产物为模板,扩增得到FC-IgG1b编码序列),分别对实施例1中的5种PCR产物进行PCR扩增,通过电泳进行分析条带;其中,通过引物SEQ ID NO:11、16对实施例1中SEQ ID NO:1-2所得的PCR产物扩增,得到序列不同的两种产物,包括FC-IgG2c编码序列(SEQ ID NO.23)、CfR编码序列(SEQ ID NO.28)。其中SEQ ID NO:11-16命名依次为FP-2c、FP-1a、FP-2a、FP- γ 1a、FP-1b、RP。

[0050] (7) 将纯化后的DNA产物连接到T载体中,进行测序,测序结果显示共有如SEQ ID NO:23-28所示的6种序列,然后通过酶切位点XbaI和AgeI将6条DNA序列酶切;同时,对pcDNA3.4进行XbaI和AgeI双酶切;

[0051] (8) 将步骤(7)中结构为【5'-多克隆位点(MCS)-连接区(linker)编码序列-驼源Fc编码序列-6个组氨酸(6 \times His)编码序列-3'】的酶切产物以连接的方式克隆到载体pcDNA3.4中;

[0052] (9) 最终构建获得RJK-V4-CH1、RJK-V4-CH2、RJK-V4-CH3、RJK-V4-CH4、RJK-V4-CH5、RJK-V4-CH6(分别对应FC-IgG2c、FC-IgG1a、FC-IgG2a、FC-IgG γ 1a、FC-IgG1b、CfR)重组载体,该载体的多克隆位点、连接区、和Fc片段的相对位置示意图如图1-2所示。其中CfR是Camelus ferus Fc region的缩写。

[0053] 表1引物、驼源Fc片段氨基酸序列和编码序列

分类	序列编号	序列详情	序列名称
[0054] 引物序列	SEQ ID NO:1	GCGCACCACCCGAAGACCC	FC-IgG2c-FP
	SEQ ID NO:2	TTACCCGAAGACTGGGTGATG	FC-IgG2c-RP

[0055]

SEQ ID NO :3	GCCTCCACCAAGGCCCATCGG	FC-IgG1 a-FP
SEQ ID NO :4	TTTACCCGAAGACTGGGTGATGG	FC-IgG1 a-RP
SEQ ID NO :5	GAACCCAAGATACCCCAACCAC	FC-IgG2 a-FP
SEQ ID NO :6	TTTACCCGAAGACTGGGTGATGG	FC-IgG2 a-RP
SEQ ID NO :7	GCCCCTGAGCTCCCGGGAG	FC-IgGγ 1a-FP
SEQ ID NO :8	TTTACCCGAAGACTGGGTGATG	FC-IgGγ 1a-RP
SEQ ID NO :9	GTCTCCACCAAGGCCCATCGGTC	FC-IgG1 b-FP
SEQ ID NO :10	TTTACCCGAAGACTGGGTGATGG	FC-IgG1 b-RP
SEQ ID NO :11	GAGAGAATTCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCGCA CCACCCGAAG	FP-2c
SEQ ID NO :12	GAGAGAATTCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCCTC CACCAAGGCC	FP-1a
SEQ ID NO :13	GAGAGAATTCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGAACC CAAGATACCC	FP-2a
SEQ ID NO :14	GAGAGAATTCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGCCCC TGAGTCCCGGG	FP-γ1a
SEQ ID NO :15	GAGAGAATTCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGTCTC CACCAAGGCC	FP-1b

[0056]

	SEQ ID NO :16	TCTCACCGGTTTAATGGTGATGGTGATGATGTTTACCCGAAGACTG	RP
lin ker -CH 2-C H3 氨基酸序列	SEQ ID NO :17	GGGGSGGGGSGGGGSAHHPEDPSSQCPKCPAPPELLGGPTVFIFPPKPKDVLSISGRPEVTCVV VDVGKEDPEVNFNWDYIDGVEVRTANTKPKKEEQFNSTYRVVSVLTIHQDQDWTGKEFKCKVN NKALPAPIERTISKAKGQTREPQVYTLAPHREELAKDTSVTCLVKGFYPPDINVEWQRNRQ VESEGAYATLPLQLDNDGTYFLYSKLSVGKNTWQRGETFTCVVMHEALHNHYTQKSITQSS GK	IgG2c-F _c
	SEQ ID NO :18	GGGGSGGGGSGGGGSAHHPEDPSSQCPKCPAPPELLGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRPEVTCVV VDVGKEDPEVNFNWDYIDGVEVRTANTKPKKEEQFNSTYRVVSVLTIHQDQDWTGKEFKCKVN NKALPAPIERTISKAKGQTREPQVYTLAPHREELAKDTSVTCLVKGFYPPDINVEWQRNRQ PESEGAYATLPLQLDNDGTYFLYSKLSVGKNTWQRGETFTCVVMHEALHNHYTQKSITQSS GK	IgG1a-F _c
	SEQ ID NO :19	GGGGSGGGGSGGGGSAHHPEDPSSQCPKCPAPPELLGGPSVVFIFPPKPKDVLSISGRPEVTCVV VDVGQEDPEVSNFYIDGVEVRTANTKPKKEEQFNSTYRVVSVLTIHQDQDWTGKELKCKVN NKALPAPIERTISKAKGQTREPQVYTLAPHREELAKDTSVTCLVKGFYPPDINVEWQRNRQ ESEGAYATLPLQLDNDGTYFLYSKLSVGKNTWQRGETFTCVVMHEALHNHSTQKSITQSSG K	IgG2a-F _c
	SEQ ID NO :20	GGGGSGGGGSGGGGSAHHPEDPSSQCPKCPAPPELLGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRPEVTCVV VDVGQEDPEVNFNWDYIDGVEVRTANTKPKKEEQFNSTYRVVSVLTIHQDQDWTGKEFKCKVN NKALPAPIERTISKAKGQTREPQVYTLAPHREELAKDTSVTCLVKGFYPPDINVEWQRNRQ PESEGAYATLPLQLDNDGTYFLYSKLSVGKNTWQRGETFTCVVMHEALHNHYTQKSITQSSG K	IgGγ1a-F _c
	SEQ ID NO :21	GGGGSGGGGSGGGGSAHHPEDPSSQCPKCPAPPELLGGPSVVFVFPKPKDVLSISGRPEVTCVV VDVGKEDPEVNFNWDYIDGVEVRTANTKPKKEEQFNSTYRVVSVLTIHQDQDWTGKEFKCKVN NKALPAPIERTISKAKGQTREPQVYTLAPHREELAKDTSVTCLVKGFYPPDINVEWQRNRQ PESEGDYATLPLQLDNDGTYFLYSKLSVGKNTWQQGETFTCVVMHEALHNHYTQKSITQSS GK	IgG1b-F _c
	SEQ ID NO :22	GGGGSGGGGSGGGGSAHHPEDPSSQCPKCPAPPELLGGPTVFIFPPKPKDVLSITLTPKVTCCV VDVGKEDPEIEFSWSVGDKEVHTAETKPKKEEQFNSTYRVVSVLTIHQDQDWTGEEFKCKVNN KALPAPIERTISKAKGQTREPQVYTLAPHREELAKDTSVTCLVKGFYPPDINVEWQRNGQPE SEGAYATLPLQDNDGTYFLYSKLSVGKNTWQQGETFTCVVMHEALHNHSTQKSITQSSGK	CfR-Fc
lin ker -CH 2-C H3 核苷酸序列	SEQ ID NO :23	GGAGGTGGAGGTTTCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGCGCACCACCCGA AGACCCAGTCCCAGTGTCCCAATGCCAGCCCTGAGCTCCTTGAGGGGCCACGGT CTTTCATCTCCCGGAAACCAAGGACGTCCTCTCCATTCTGGGAGGCCGAGGTCAC GTGCGTTGTGGTGGACGTGGGTAAGGAAGACCCCGAGGTCAATTTCAACTGGTACATTG ATGGCGTTGAGGTGCGAACGGCCAACAGCAAGCCAAAGGAGGAACAGTTCAACAGCAC GTACCGCGTGGTCAAGCTCCTGACCATCCAGCACCAGGACTGGCTGACGGGAAGGAGT TCAAGTGC AAGGTCAACAACAAGCTCTCCCGGCCCATCGAGAGGACCATCTCCAAG GCCAAAGGCAGACCCGGGAGCCGAGGTGTACACCCTGGCCCCACACCGGGAAGAGC TGGCCAAGGACACCGTGAGCGTAACCTGCCTGGTCAAAGGCTTACCCACCTGACATC AACGTTGAGTGGCAGAGGAACCGACAGGTAGAGTCAGAGGGCGCCTACGCCACCACGCT GCCCAGCTGGACAACGACGGGACCTACTCTCTACAGCAAGCTCTCGGTGGGAAAGA ACACGTGGCAGCGGGGAGAAACCTCACCTGTGTGGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAATCCATCACCCAGTCTTCGGGTA	IgG2c-F _c

[0057]

<p>SEQ ID NO :24</p>	<p>GGAGGTGGAGGTTTCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGCGCACCACCCCGA AGACCCAGCTCCCAGTGTCCCAAATGCCAGCCCTGAGCTCCCGGGAGGGCCCTCCGT CTTCGTCTTCCCCCGAAACCCAAGGACGTCTCTCCATTCTGGGAGGCCGAGGTAC GTGCGTTGTGGTGGACGTGGGTAAGGAAGACCCCGAGGTCAATTTCAACTGGTACATTG ATGGCGTTGAGGTGCGAACGGCCAACACGAAGCCAAAGGAGGAACAGTTCAACAGCAC GTACCCGCTGGTCAGCGTCTGACCATCCAGCACCAGGACTGGCTGACGGGGAAGGAGT TCAAGTGC AAGGTCAACAACAAAGCTCTCCCGCCCCATCGAGAGGACCATCTCCAAG GCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAAGGTGTACACCCTGGCCCCACACCGGGAAGAGC TGGCCAAGGACACCGTGAGCGTAACTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCACCTGACATC AACGTTGAGTGGCAGAGGAACCGACAGCCAGAGTCAGAGGGCGCCTACGCCACCACGCT GCCCCAGCTGGACAACGACGGGACCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCGGTGGGAAAGA ACACGTGGCAGCGGGGAGAAACCTTACCTGTGTGGTGTGACAGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAATCCATCACCCAGTCTTCGGGTAAA</p>	<p>IgG1a-F_c</p>
<p>SEQ ID NO :25</p>	<p>GGAGGTGGAGGTTTCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGCGCACCACCCCGA AGACCCAGCTCCCAGTGTCCCAAATGCCAGCCCTGAGCTCCTGGGAGGGCCCTCTGT CTTCATCTTCCCCCGAAACCCAAGGACGTCTCTCCATTCTGGGAGGCCGAGGTAC ATGTGTTGTGGTGGACGTGGGCCAGGAAGACCCCGAGGTCAAGTTCAACTGGTACATTG ATGGCGTTGAGGTGCGAACGGCCAACACGAAGCCAAAGGAGGAACAGTTCAACAGCAC GTACCCGCTGGTCAGCGTCTGACCATCCAGCACCAGGACTGGCTGACGGGGAAGGAGT TAAAATGCAAGGTCAACAACAAAGCTCTCCCGCCCCATCGAGAGGACCATCTCCAAG GCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAAGGTGTACACCCTGGCCCCACACCGGGAAGAGC TGGCCAAGGACACCGTGAGCATAACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCTGACATC AACGTTGAGTGGCAGAGGAACGGGCGGCCGAGTCAAGAGGGCGCCTACGCCACCACGC TGCCCCAGCTGGACAATGACGGGACCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCGGTGGGAAAG AACACGTGGCAGCGGGGAGAAACCTTACCTGTGTGGTGTGACAGAGGCCCTGCACAAC CCACTCCACCCAGAAATCCATCACCCAGTCTTCGGGTAAA</p>	<p>IgG2a-F_c</p>
<p>SEQ ID NO :26</p>	<p>GGAGGTGGAGGTTTCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGCGCACCACCCCGA AGACCCAGCTCCCAGTGTCCCAAATGCCAGCCCTGAGCTCCCGGGAGGGCCCTCCGT CTTCGTCTTCCCCCGAAACCCAAGGACGTCTCTCCATTCTGGGAGGCCGAGGTAC ATGTGTTGTGGTGGACGTGGGCCAGGAAGACCCCGAGGTCAATTTCAACTGGTACATTG ATGGCGTTGAGGTGCGAACGGCCAACACGAAGCCAAAGGAGGAACAGTTCAACAGCAC GTACCCGCTGGTCAGCGTCTGACCATCCAGCACCAGGACTGGCTGACGGGGAAGGAGT TCAAGTGC AAGGTCAACAACAAAGCTCTCCCGCCCCATCGAGAGGACCATCTCCAAG GCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAAGGTGTACACCCTGGCCCCACACCGGGAAGAGC TGGCCAAGGACACCGTGAGCGTAACTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCTGACATC AACATTGAGTGGCAGAGGAACCGACAGCCAGAGTCAGAGGGCGCCTACGCCACCACGCT GCCCCAGCTGGACAACGACGGGACCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCGGTGGGAAAGA ACACGTGGCAGAGGGGAGAAACCTTACCTGTGTGGTGTGACAGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAATCCATCACCCAGTCTTCGGGTAAA</p>	<p>IgGγ1a-F_c</p>
<p>SEQ ID NO :27</p>	<p>GGAGGTGGAGGTTTCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGCGCACCACCCCGA AGACCCAGCTCCCAGTGTCCCAAATGCCAGAGCCTGAGCTCCCGGGAGGGCCCTCCG TCTTCGTCTTCCCCCGAAAACCCAAGGACGTCTCTCCATTCTGGGAGGCCGAGGTCA CGTGCGTTGTGGTGGACGTGGGTAAGGAAGACCCCGAGGTCAATTTCAACTGGTACATT GATGGCGTTGAGGTGCGAACGGCCAACACGGAGCCAAAGGAGGAACAGTTCAACAGCA CGTACCCGCTGGTCAGCGTCTGACCATCCAGCACCAGGACTGGCTGACGGGGAAGGAG TTCAAGTGC AAGGTCAACAACAAAGCTCTCCAGCCCCATCGAGAGGACCATCTCCAA GGCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAAGGTGTACACCCTGGCCCCACACCGGGAAGAG CTGGCCAAGGACACCGTGAGCGTAACTGCCTAGTCAAAGGCTTCTACCCAGCTGACAT CAACGTTGAGTGGCAGAGGAATGGGCAGCCGAGTCAGAGGGCGACTACGCCACCACG CTGCCCCAGCTGGACAACGACGGGACCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCGGTGGGAAA GAACACGTGGCAGCAGGGGAGAAACCTTACCTGTGTGGTGTGACAGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAAAAATCCATCACCCAGTCTTCGGGTAAA</p>	<p>IgG1b-F_c</p>

[0058]	SEQ ID NO :28	<pre> GGAGGTGGAGGTTTCAGGTGGAGGTGGATCTGGTGGAGGTGGATCTGCGCACCACCCCGA AGACCCAGCTCCCAGTGTCCCAAATGCCAGCCCTGAGCTCCTGGAGGGCCACGGT CTTCATCTTCCCCCGAAACCCAAGGACGTCTCTCCATCACCCCTAACACCTAAGGTCAC GTGCGTTGTGGTGGACGTGGGTAAGGAAGACCCTGAGATAGAGTTCAGCTGGTCCGTGG GTGACAAAGAGGTACACACGGCTGAGACAAAGCCAAAGGAGGAACAGTTCAACAGCAC GTACCGCGTGGTCAGCATCTGACAATCAAGCACCAGGACTGGCTGACGGGGGAGGAGT TCAAGTGC AAGGTCAACAACAAAGCTCTCCCGCCCCATCGAGAGGACCATCTCCAAG GCCAAAGGGCAGACCCGGGAGCCGCAAGGTGTACACCTGGCCCCACACCGGGAAGAGC TGGCCAAGGACACCGTGAGCGTAACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCACCTGACATC AACGTTGAGTGGCAGAGGAACGGGACGCCGGAGTCAGAGGGCGCCTACGCCACCACGC TGCCCCAGCAGGACAACGACGGGACCTACTTCTCTACAGCAAGCTCTCGGTGGGAAAG AACACGTGGCAGCAGGGAGAAACCTTACCTGTGTGGTGTGCACGAGGGCCCTGCACAA CCACTCCACCCAGAAATCCATCACCCAGTCTTCGGGTAAA </pre>	Cfr-Fc
--------	---------------	---	--------

[0059] 实施例3:目的蛋白与驼源Fc融合表达载体的构建(以RJK-V4-CH1为例):

[0060] 本实施例的目的是为了在构建好的RJK-V4-CH1载体的基础上,加上目的蛋白的表达序列,使目的蛋白与驼源Fc融合表达。

[0061] (1) 选取目的蛋白的表达序列,例如IL-13(NCBI,NM_002188.2),在重组载体多克隆位点和蛋白编码序列上选择XbaI和EcoRI两个酶切位点;

[0062] (2) 以购买(购自哈佛大学医学院,货号:HsCD00346103,链接<https://plasmid.med.harvard.edu/PLASMID/GetCloneDetail.do?cloneid=346103&species=>)的IL-13蛋白的编码序列为模板,进行特异性引物PCR的扩增;上游引物:5'-gcTCTAGAGGATCGAACCTTATGCATCCGCTCCTC-3'(SEQ ID NO.29),下游引物:5'-gagaGAATTCCACCACCACCGTTGAAGTGTCCCTC-3'(SEQ ID NO.30)。

[0063] (3) 将扩增出的IL-13编码序列和RJK-V4-CH1载体分别进行限制性内切酶切;

[0064] (4) 将酶切后的产物通过T4连接酶连接;

[0065] (5) 将连接产物转化大肠杆菌DH5 α ,扩增,提取质粒,酶切鉴定;

[0066] (6) 将鉴定后条带大小正确的重组载体测序;

[0067] (7) 将测序正确的重组载体大量抽提备用。

[0068] 实施例4:IL-13-驼源Fc融合蛋白在悬浮293F细胞中的表达

[0069] 重组融合蛋白表达实验流程(以500ml摇瓶为例):

[0070] (1) 转染前3天以 2.5×10^5 /ml细胞传代和扩大培养293F细胞,计算出的所需的细胞体积转移至装有新鲜的已预热的120ml(终体积)的OPM-293 CD05 Medium培养基的500ml摇瓶中。使细胞浓度达到约 2×10^6 - 3×10^6 活细胞/ml;

[0071] (2) 转染当天,测定细胞密度和活细胞百分比。转染之前细胞密度应达到约 2×10^6 - 3×10^6 活细胞/ml。

[0072] (3) 用预热的OPM-293 CD05 Medium将细胞稀释至 1×10^6 个活细胞/ml。计算出所需的细胞体积转移至装有新鲜的已预热的100ml(终体积)的培养基的500ml摇瓶中;

[0073] (4) 用4ml Opti-MEM培养基稀释PEI(1mg/ml)试剂,回荡或吹打混匀;用4ml Opt-MEM培养基稀释实施例3中获得的大量抽提后的质粒DNA,回荡混匀,并用0.22um的滤头过滤。室温孵育5min。此外,以含有目的蛋白编码基因且不含有驼源Fc片段的编码序列的质粒(即IL-13编码序列直接克隆入pcDNA3.4载体中,构成非驼源Fc融合的IL13重组载体)作为阴性对照质粒,阴性对照质粒也转染悬浮293F细胞;非驼源Fc融合的IL13重组载体在构建时IL13编码序列的3'端引入了6 \times His标签,方便后续纯化,非驼源Fc融合的IL13通过Ni-

NTA树脂亲和层析后进行SDS-PAGE检测(图3)；

[0074] (5) 将稀释的PEI试剂加入稀释的DNA中,颠倒混匀。将PEI/质粒DNA复合物室温孵育15-20分钟,然后轻轻加入制备的细胞悬液中,加入过程中轻轻回振荡摇瓶；

[0075] (6) 将细胞在37℃、5%CO₂、120rpm震荡培养；

[0076] (7) 转染后第24h、72h添加5ml OPM-CHO PFF05补料；

[0077] (8) 在转染后约7天(细胞活率低于70%)收集上清。

[0078] 实施例5:IL-13-驼源Fc融合蛋白在ExpiCHO-S™细胞中的表达

[0079] 转染前3天以 2.5×10^5 /ml细胞传代和扩大培养ExpiCHO-S™细胞,计算出的所需的细胞体积转移至装有新鲜的已预热的120ml(终体积)的ExpiCHO™表达培养基的500ml摇瓶中;使细胞浓度达到约 4×10^6 - 6×10^6 活细胞/mL；

[0080] (1) 在转染前一天,将ExpiCHO-S™细胞稀释浓度至 3.5×10^6 活细胞/mL,使细胞过夜培养；

[0081] (2) 转染当天,测定细胞密度和活细胞百分比。转染之前细胞密度应达到约 7×10^6 - 10×10^6 活细胞/mL；

[0082] (3) 用预热至37℃新鲜的ExpiCHO™表达培养基将细胞稀释至 6×10^6 个活细胞/mL。计算出的所需的细胞体积转移至装有新鲜的已预热的100ml(终体积)的ExpiCHO™表达培养基的500ml摇瓶中；

[0083] (4) 使轻轻颠倒混匀ExpiFectamine™CHO试剂,用3.7ml OptiPRO™培养基稀释ExpiFectamine™CHO试剂,回振荡或混匀；

[0084] (5) 用冷藏的4ml OptiPRO™培养基稀释实施例3中获得的大量抽提后的质粒DNA,回振荡混匀;此外,以含有目的蛋白编码基因且不含有驼源Fc片段的编码序列的质粒(即IL-13编码序列直接克隆入pcDNA3.4载体中,构成非驼源Fc融合的IL13重组载体)作为阴性对照质粒,阴性对照质粒也转染ExpiCHO-S™细胞;非驼源Fc融合的IL13重组载体在构建时IL13编码序列的3'端引入了6×His标签,方便后续纯化,非驼源Fc融合的IL13通过Ni-NTA树脂亲和层析后进行SDS-PAGE检测(图3)；

[0085] (6) 将ExpiFectamine CHO/质粒DNA复合物室温孵育1-5分钟,然后轻轻加入制备的细胞悬液中,加入过程中轻轻回振荡摇瓶；

[0086] (7) 将细胞在37℃、8%CO₂、加湿的空气中震荡培养；

[0087] (8) 转染后第1天(18-22小时后)添加600ul ExpiFectamine™CHO Enhancer和24ml ExpiCHO feed。

[0088] (9) 在转染后约8天(细胞活率低于70%)收集上清。

[0089] 实施例6:驼源Fc重组蛋白的纯化

[0090] (1) 将实施例4、5中获得蛋白表达上清用0.45μm的一次性滤头过滤除掉不可溶杂质；

[0091] (2) 将上述滤液使用蛋白纯化仪进行亲和层析纯化,利用驼源Fc与Protein A结合的能力,使用偶联Protein A的琼脂糖填料进行纯化；

[0092] (3) 将滤液通过1mL/分钟的流速流穿Protein A预装柱,该步骤中滤液中的目标蛋白会与填料结合；

[0093] (4) 通过低盐和高盐缓冲液将柱上结合的杂质蛋白洗涤；

[0094] (5) 用低pH缓冲液将柱上结合的目标蛋白进行洗脱；

[0095] (6) 将洗脱液迅速加入pH9.0的Tris-HCl溶液，进行中和；

[0096] (7) 将上述中和后的蛋白溶液透析后，进行SDS-PAGE分析(图3)，确定蛋白纯度在95%以上，且浓度在0.5mg/mL以上后，低温保存备用。从图3可知，在不含驼源Fc片段的情况下，人源IL-13无法在真核细胞中表达；而IL-13-驼源Fc融合蛋白则可在真核细胞中成功表达。

[0097] 实施例7: 针对IL-13-驼源Fc融合蛋白的单域抗体文库的构建

[0098] (1) 将1mg实施例6制得的驼源Fc重组蛋白与弗氏佐剂等体积混合，免疫一只内蒙古阿拉善双峰驼，每周一次，共连续免疫7次，免疫过程中刺激B细胞表达特异性的纳米抗体；(2) 免疫结束后，提取骆驼外周血淋巴细胞100ml并提取总RNA；(3) 合成cDNA并利用套式PCR扩增VHH；(4) 利用限制性内切酶PstI及NotI酶切20ug pMECS噬菌体展示载体及10ug VHH并连接两种片段；(5) 将连接产物转化至电转感受态细胞TG1中，构建IL-13-驼源Fc融合蛋白噬菌体展示文库并测定库容，文库库容的大小约为 2×10^8 ；同时，通过菌落PCR检测所建文库中目的片段的正确插入率，图1显示菌落PCR结果，随机的选取24颗克隆做菌落PCR，结果显示插入率达到95.8%。

[0099] 实施例8: 针对IL-13-驼源Fc融合蛋白的单域抗体筛选过程

[0100] (1) 取200uL重组TG1细胞至 $2 \times$ TY培养基中培养，期间加入40uL辅助噬菌体VCSM13侵染TG1细胞，并培养过夜以扩增噬菌体，次日利用PEG/NaCl沉淀噬菌体，离心收集扩增噬菌体；(2) 将稀释在100mM pH 8.3的 NaHCO_3 中的中性亲和素蛋白500ug偶联在酶标板上，4℃放置过夜，同时设立阴性对照孔；(3) 第二天加入100uL生物素标记的IL-13-驼源Fc融合蛋白，室温孵育2小时，阴性对照孔加入100uLPBS；(4) 2小时后，加入100uL的3%的BSA，室温封闭2h；(5) 封闭结束后，加入100uL扩增后噬菌体文库(大约 2×10^{11} 个噬菌体颗粒)，室温作用1h；(6) 作用1小时后，用PBS+0.05%Tween-20洗5遍，以洗掉未结合的噬菌体；(7) 用终浓度为25mg/ml的胰蛋白酶将与IL-13-驼源Fc融合蛋白特异性结合的噬菌体解离下，并感染处于对数生长期的大肠杆菌TG1细胞，37℃培养1h，产生并收集噬菌体用于下一轮的筛选，相同筛选过程重复3轮，逐步实现富集，结果如图4所示。

[0101] 实施例9: 用噬菌体展示的方法筛选针对IL-13蛋白的特异性阳性克隆

[0102] (1) 根据上述单域抗体筛选方法对IL-13-驼源Fc融合蛋白进行3轮筛选，筛选结束后，针对IL-13-驼源Fc融合蛋白的噬菌体富集因子达到10以上，从筛选获得的阳性克隆中挑选100个单菌落分别接种于含100ug/mL氨苄青霉素的TB培养基的96深孔板中，并设置空白对照，37℃培养至对数期后，加入终浓度为1mM的IPTG，28℃培养过夜；(2) 利用渗透涨破法获得粗提抗体；将中性亲和素蛋白稀释至100mM pH 8.3的 NaHCO_3 中并将100ug中性亲和素蛋白在酶标板中4℃包被过夜，次日向酶标板内加入100ug V5-Biotin蛋白；(3) 将上述步骤中获得的抗体粗提液取100uL转移至加入抗原的ELISA板上，室温孵育1h；(4) 用PBST洗去未结合的抗体，加入100uL经1:2000稀释后的Mouse anti-HA tag antibody(鼠抗HA抗体，Thermo Fisher)，在室温孵育1h；(5) 用PBST洗去未结合的抗体，加入100uL经1:20000稀释后的Anti-Rabbit HRP conjugate(山羊抗兔辣根过氧化物酶标记抗体，购自于Thermo Fisher)，在室温孵育1h；(6) 用PBST洗去未结合的抗体，加入辣根过氧化物酶显色液，28℃下反应15min后，于酶标仪上405波长处，读取吸收值；(7) 当样品孔OD值大于对照孔5倍以上

时,判定为阳性克隆孔;(8)将阳性克隆孔的菌转摇在含有100ug/u1氨苄青霉素的LB培养基中以便提取质粒并进行测序。

[0103] 实施例10:IL-13蛋白的特异性单域抗体在宿主菌大肠杆菌中的纯化及表达

[0104] (1)将上述测序分析所获得不同克隆株的质粒(pMECS-VHH)分别电转化到大肠杆菌WK6中,并将其涂布在LB+amp+glucose即含有氨苄青霉素和葡萄糖的培养平板上,37℃培养过夜;(2)挑选单个菌落接种在5ml含有氨苄青霉素的LB培养液中,37℃摇床培养过夜;(3)接种1mL的过夜培养菌种至330mL TB培养液中,37℃摇床培养,培养到OD_{600nm}值达到0.6-0.9时,加入1M IPTG,28℃摇床培养过夜;(4)离心,收集大肠杆菌,利用渗透胀破法,获得抗体粗提液;(5)通过镍柱亲和层析法纯化出抗体,纯化后的单域抗体。

[0105] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 南京融捷康生物科技有限公司
- [0003] <120> 基于驼源Fc片段的免疫原的制备及应用
- [0004] <130> GY-03-2019-004
- [0005] <141> 2019-12-20
- [0006] <160> 30
- [0007] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0008] <210> 1
- [0009] <211> 20
- [0010] <212> DNA
- [0011] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0012] <400> 1
- [0013] ggcaccacc ccgaagacc 20
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 21
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0018] <400> 2
- [0019] ttaccgaag actgggtgat g 21
- [0020] <210> 3
- [0021] <211> 22
- [0022] <212> DNA
- [0023] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0024] <400> 3
- [0025] gcctcacca aggcccatc gg 22
- [0026] <210> 4
- [0027] <211> 23
- [0028] <212> DNA
- [0029] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0030] <400> 4
- [0031] ttaccgaag gactgggtga tgg 23
- [0032] <210> 5
- [0033] <211> 22
- [0034] <212> DNA
- [0035] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0036] <400> 5
- [0037] gaaccaaga taccacaacc ac 22
- [0038] <210> 6

- [0039] <211> 23
[0040] <212> DNA
[0041] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0042] <400> 6
[0043] tttacccgaa gactgggtga tgg 23
[0044] <210> 7
[0045] <211> 19
[0046] <212> DNA
[0047] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0048] <400> 7
[0049] gcccctgagc tcccgggag 19
[0050] <210> 8
[0051] <211> 22
[0052] <212> DNA
[0053] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0054] <400> 8
[0055] tttacccgaa gactgggtga tg 22
[0056] <210> 9
[0057] <211> 24
[0058] <212> DNA
[0059] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0060] <400> 9
[0061] gtctccacca aggccccatc ggtc 24
[0062] <210> 10
[0063] <211> 23
[0064] <212> DNA
[0065] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0066] <400> 10
[0067] tttacccgaa gactgggtga tgg 23
[0068] <210> 11
[0069] <211> 71
[0070] <212> DNA
[0071] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0072] <400> 11
[0073] gagagaattc ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct ggtggtggtg gttctgcgca 60
[0074] ccaccccgaa g 71
[0075] <210> 12
[0076] <211> 71
[0077] <212> DNA

- [0078] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0079] <400> 12
 [0080] gagagaattc ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct ggtggtggtg gttctgcctc 60
 [0081] caccaaggcc c 71
 [0082] <210> 13
 [0083] <211> 71
 [0084] <212> DNA
 [0085] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0086] <400> 13
 [0087] gagagaattc ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct ggtggtggtg gttctgaacc 60
 [0088] caagataccc c 71
 [0089] <210> 14
 [0090] <211> 72
 [0091] <212> DNA
 [0092] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0093] <400> 14
 [0094] gagagaattc ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct ggtggtggtg gttctgcccc 60
 [0095] tgagctcccc gg 72
 [0096] <210> 15
 [0097] <211> 72
 [0098] <212> DNA
 [0099] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0100] <400> 15
 [0101] gagagaattc ggtggtggtg gttctggtgg tgggtggttct ggtggtggtg gttctgtctc 60
 [0102] caccaaggcc cc 72
 [0103] <210> 16
 [0104] <211> 46
 [0105] <212> DNA
 [0106] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0107] <400> 16
 [0108] tctcaccggt ttaatggtga tggatgatgat gtttaccgga agactg 46
 [0109] <210> 17
 [0110] <211> 249
 [0111] <212> PRT
 [0112] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0113] <400> 17
 [0114] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala
 [0115] 1 5 10 15
 [0116] His His Pro Glu Asp Pro Ser Ser Gln Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro

[0156]	35	40	45												
[0157]	Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val														
[0158]	50	55	60												
[0159]	Asp Val Gly Lys Glu Asp Pro Glu Val Asn Phe Asn Trp Tyr Ile Asp														
[0160]	65	70	75	80											
[0161]	Gly Val Glu Val Arg Thr Ala Asn Thr Lys Pro Lys Glu Glu Gln Phe														
[0162]		85	90	95											
[0163]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Ile Gln His Gln Asp														
[0164]		100	105	110											
[0165]	Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu														
[0166]		115	120	125											
[0167]	Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg														
[0168]		130	135	140											
[0169]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ala Pro His Arg Glu Glu Leu Ala Lys														
[0170]	145	150	155	160											
[0171]	Asp Thr Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp														
[0172]		165	170	175											
[0173]	Ile Asn Val Glu Trp Gln Arg Asn Arg Gln Pro Glu Ser Glu Gly Ala														
[0174]		180	185	190											
[0175]	Tyr Ala Thr Thr Leu Pro Gln Leu Asp Asn Asp Gly Thr Tyr Phe Leu														
[0176]		195	200	205											
[0177]	Tyr Ser Lys Leu Ser Val Gly Lys Asn Thr Trp Gln Arg Gly Glu Thr														
[0178]		210	215	220											
[0179]	Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln														
[0180]	225	230	235	240											
[0181]	Lys Ser Ile Thr Gln Ser Ser Gly Lys														
[0182]		245													
[0183]	<210> 19														
[0184]	<211> 249														
[0185]	<212> PRT														
[0186]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)														
[0187]	<400> 19														
[0188]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala														
[0189]	1	5	10	15											
[0190]	His His Pro Glu Asp Pro Ser Ser Gln Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro														
[0191]		20	25	30											
[0192]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys														
[0193]		35	40	45											
[0194]	Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val														

[0195]	50	55	60
[0196]	Asp Val Gly Gln Glu Asp Pro Glu Val Ser Phe Asn Trp Tyr Ile Asp		
[0197]	65	70	75
[0198]	Gly Val Glu Val Arg Thr Ala Asn Thr Lys Pro Lys Glu Glu Gln Phe		
[0199]	85	90	95
[0200]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Ile Gln His Gln Asp		
[0201]	100	105	110
[0202]	Trp Leu Thr Gly Lys Glu Leu Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu		
[0203]	115	120	125
[0204]	Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg		
[0205]	130	135	140
[0206]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ala Pro His Arg Glu Glu Leu Ala Lys		
[0207]	145	150	155
[0208]	Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ala Asp		
[0209]	165	170	175
[0210]	Ile Asn Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly Arg Pro Glu Ser Glu Gly Ala		
[0211]	180	185	190
[0212]	Tyr Ala Thr Thr Leu Pro Gln Leu Asp Asn Asp Gly Thr Tyr Phe Leu		
[0213]	195	200	205
[0214]	Tyr Ser Lys Leu Ser Val Gly Lys Asn Thr Trp Gln Arg Gly Glu Thr		
[0215]	210	215	220
[0216]	Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Ser Thr Gln		
[0217]	225	230	235
[0218]	Lys Ser Ile Thr Gln Ser Ser Gly Lys		
[0219]	245		
[0220]	<210> 20		
[0221]	<211> 249		
[0222]	<212> PRT		
[0223]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0224]	<400> 20		
[0225]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala		
[0226]	1	5	10
[0227]	His His Pro Glu Asp Pro Ser Ser Gln Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro		
[0228]	20	25	30
[0229]	Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
[0230]	35	40	45
[0231]	Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[0232]	50	55	60
[0233]	Asp Val Gly Gln Glu Asp Pro Glu Val Asn Phe Asn Trp Tyr Ile Asp		

[0234]	65	70	75	80
[0235]	Gly Val Glu Val Arg Thr Ala Asn Thr Lys Pro Lys Glu Glu Gln Phe			
[0236]		85	90	95
[0237]	Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Ile Gln His Gln Asp			
[0238]		100	105	110
[0239]	Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu			
[0240]		115	120	125
[0241]	Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg			
[0242]		130	135	140
[0243]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ala Pro His Arg Glu Glu Leu Ala Lys			
[0244]	145	150	155	160
[0245]	Asp Thr Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ala Asp			
[0246]		165	170	175
[0247]	Ile Asn Ile Glu Trp Gln Arg Asn Arg Gln Pro Glu Ser Glu Gly Ala			
[0248]		180	185	190
[0249]	Tyr Ala Thr Thr Leu Pro Gln Leu Asp Asn Asp Gly Thr Tyr Phe Leu			
[0250]		195	200	205
[0251]	Tyr Ser Lys Leu Ser Val Gly Lys Asn Thr Trp Gln Arg Gly Glu Thr			
[0252]		210	215	220
[0253]	Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
[0254]	225	230	235	240
[0255]	Lys Ser Ile Thr Gln Ser Ser Gly Lys			
[0256]		245		
[0257]	<210> 21			
[0258]	<211> 249			
[0259]	<212> PRT			
[0260]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0261]	<400> 21			
[0262]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala			
[0263]	1	5	10	15
[0264]	His His Pro Glu Asp Pro Ser Ser Gln Cys Pro Lys Cys Pro Glu Pro			
[0265]		20	25	30
[0266]	Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Val Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
[0267]		35	40	45
[0268]	Asp Val Leu Ser Ile Ser Gly Arg Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
[0269]		50	55	60
[0270]	Asp Val Gly Lys Glu Asp Pro Glu Val Asn Phe Asn Trp Tyr Ile Asp			
[0271]	65	70	75	80
[0272]	Gly Val Glu Val Arg Thr Ala Asn Thr Glu Pro Lys Glu Glu Gln Phe			

[0312]	100	105	110
[0313]	Trp Leu Thr Gly Glu Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu		
[0314]	115	120	125
[0315]	Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg		
[0316]	130	135	140
[0317]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Ala Pro His Arg Glu Glu Leu Ala Lys		
[0318]	145	150	155
[0319]	Asp Thr Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp		
[0320]	165	170	175
[0321]	Ile Asn Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Ser Glu Gly Ala		
[0322]	180	185	190
[0323]	Tyr Ala Thr Thr Leu Pro Gln Gln Asp Asn Asp Gly Thr Tyr Phe Leu		
[0324]	195	200	205
[0325]	Tyr Ser Lys Leu Ser Val Gly Lys Asn Thr Trp Gln Gln Gly Glu Thr		
[0326]	210	215	220
[0327]	Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Ser Thr Gln		
[0328]	225	230	235
[0329]	Lys Ser Ile Thr Gln Ser Ser Gly Lys		
[0330]	245		
[0331]	<210> 23		
[0332]	<211> 747		
[0333]	<212> DNA		
[0334]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0335]	<400> 23		
[0336]	ggaggtggag gttcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgcgca ccaccccgaa 60		
[0337]	gaccccgact cccagtgctc caaatgccca gccctgagc tccttggagg gcccacggtc 120		
[0338]	ttcatcttc ccccgaacc caaggacgtc ctctccattt ctgggaggcc cgaggtcagc 180		
[0339]	tgcgttggtg tggacgtggg taaggaagac cccgaggtca atttcaactg gtacattgat 240		
[0340]	ggcgttgagg tgcgaacggc caacacgaag ccaaaggagg aacagttcaa cagcacgtac 300		
[0341]	cgcgtgggtca gcgctctgac catccagcac caggactggc tgacggggaa ggagttcaag 360		
[0342]	tgcaaggtca acaacaaagc tctcccggcc cccatcgaga ggaccatctc caaggccaaa 420		
[0343]	gggcagacct gggagccgca ggtgtacacc ctggccccac accgggaaga gctggccaag 480		
[0344]	gacaccgtga gcgtaacctg cctgggtcaaa ggcttctacc cacctgacat caacgttgag 540		
[0345]	tggcagagga accgacaggt agagtcagag ggcgcctacg ccaccacgtc gcccagctg 600		
[0346]	gacaacgacg ggacctactt cctctacagc aagctctcgg tgggaaagaa cacgtggcag 660		
[0347]	cggggagaaa ccttcacctg tgtggtgatg cagaggccc tgcacaacca ctacaccag 720		
[0348]	aatccatca cccagtcttc gggtaaa 747		
[0349]	<210> 24		
[0350]	<211> 747		

- [0351] <212> DNA
- [0352] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0353] <400> 24
- [0354] ggaggtggag gttcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgcgca ccaccccgaa 60
- [0355] gaccccagct cccagtgctc caaatgccca gccctgagc tcccgggagg gccctccgtc 120
- [0356] ttcgtcttcc ccccgaacc caaggacgtc ctctccattt ctgggaggcc cgaggtcacg 180
- [0357] tgcgttgtgg tggacgtggg taaggaagac cccgaggtca atttcaactg gtacattgat 240
- [0358] ggcgttgagg tgcgaacggc caacacgaag ccaaaggagg aacagttcaa cagcacgtac 300
- [0359] cgcgtggtca gcgtcctgac catccagcac caggactggc tgacggggaa ggagttcaag 360
- [0360] tgcaaggtca acaacaaagc tctcccggcc cccatcgaga ggaccatctc caaggccaaa 420
- [0361] gggcagaccc gggagccgca ggtgtacacc ctggccccac accgggaaga gctggccaag 480
- [0362] gacaccgtga gcgtaacctg cctgggtcaaa ggcttctacc cacctgacat caacgttgag 540
- [0363] tggcagagga accgacagcc agagtcagag ggcgcctacg ccaccacgtc gccccagctg 600
- [0364] gacaacgacg ggacctactt cctctacagc aagctctcgg tgggaaagaa cacgtggcag 660
- [0365] cggggagaaa ccttcacctg tgtggtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag 720
- [0366] aaatccatca cccagtcttc gggtaaa 747
- [0367] <210> 25
- [0368] <211> 747
- [0369] <212> DNA
- [0370] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0371] <400> 25
- [0372] ggaggtggag gttcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgcgca ccaccccgaa 60
- [0373] gaccccagct cccagtgctc caaatgccca gccctgagc tcttgggagg gccctctgtc 120
- [0374] ttcatcttcc ccccgaacc caaggacgtc ctctccattt ctgggaggcc cgaggtcaca 180
- [0375] tgtgttgtgg tggacgtggg ccaggaagac cccgaggtca gtttcaactg gtacattgat 240
- [0376] ggcgttgagg tgcgaacggc caacacgaag ccaaaggagg aacagttcaa cagcacgtac 300
- [0377] cgcgtggtca gcgtcctgac catccagcac caggactggc tgacggggaa ggagttaaaa 360
- [0378] tgcaaggtca acaacaaagc tctcccggcc cccatcgaga ggaccatctc caaggccaaa 420
- [0379] gggcagaccc gggagccgca ggtgtacacc ctggccccac accgggaaga gctggccaag 480
- [0380] gacaccgtga gcataacctg cctgggtcaaa ggcttctacc cagctgacat caacgttgag 540
- [0381] tggcagagga acgggcggcc ggagtcagag ggcgcctacg ccaccacgtc gccccagctg 600
- [0382] gacaatgacg ggacctactt cctctacagc aagctctcgg tgggaaagaa cacgtggcag 660
- [0383] cggggagaaa ccttcacctg tgtggtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctccaccag 720
- [0384] aaatccatca cccagtcttc gggtaaa 747
- [0385] <210> 26
- [0386] <211> 747
- [0387] <212> DNA
- [0388] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0389] <400> 26

[0390] ggaggtggag gttcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgcgca ccacccgaa 60
 [0391] gaccccagct cccagtgtcc caaatgcccc gccctgagc tcccgggagg gccctccgtc 120
 [0392] ttcgtcttcc ccccgaacc caaggacgtc ctctccattt ctgggaggcc cgaggtcaca 180
 [0393] tgtgttggg tggacgtggg ccaggaagac cccgaggtca atttcaactg gtacattgat 240
 [0394] ggcgttgagg tgcgaacggc caacacgaag ccaaaggagg aacagttcaa cagcacgtac 300
 [0395] cgcgtgggtca gcgtcctgac catccagcac caggactggc tgacggggaa ggagttcaag 360
 [0396] tgcaaggtca acaacaaagc tctcccggcc cccatcgaga ggaccatctc caaggccaaa 420
 [0397] gggcagacct gggagccgca ggtgtacacc ctggccccac accgggaaga gctggccaag 480
 [0398] gacaccgtga gcgtaacctg cctggtcaaa ggcttctacc cagctgacat caacattgag 540
 [0399] tggcagagga accgacagcc agagtcagag ggcgcctacg ccaccacgct gccccagctg 600
 [0400] gacaacgacg ggacctactt cctctacagc aagctctcgg tgggaaagaa cacgtggcag 660
 [0401] aggggagaaa ccttcacctg tgtggtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctacaccag 720
 [0402] aaatccatca cccagtcttc gggtaaa 747
 [0403] <210> 27
 [0404] <211> 747
 [0405] <212> DNA
 [0406] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0407] <400> 27
 [0408] ggaggtggag gttcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgcgca ccacccgaa 60
 [0409] gaccccagct cccagtgtcc caaatgcccc gagcctgagc tcccgggagg gccctccgtc 120
 [0410] ttcgtcttcc ccccgaacc caaggacgtc ctctccattt ctgggaggcc cgaggtcacg 180
 [0411] tgcgttggg tggacgtggg taaggaagac cccgaggtca atttcaactg gtacattgat 240
 [0412] ggcgttgagg tgcgaacggc caacacggag ccaaaggagg aacagttcaa cagcacgtac 300
 [0413] cgcgtgggtca gcgtcctgac catccagcac caggactggc tgacggggaa ggagttcaag 360
 [0414] tgcaaggtca acaacaaagc tctcccagcc cccatcgaga ggaccatctc caaggccaaa 420
 [0415] gggcagacct gggagccgca ggtgtacacc ctggccccac accgggaaga gctggccaag 480
 [0416] gacaccgtga gcgtaacctg cctagtcaaa ggcttctacc cagctgacat caacgttgag 540
 [0417] tggcagagga atgggcagcc ggagtcagag ggcgactacg ccaccacgct gccccagctg 600
 [0418] gacaacgacg ggacctactt cctctacagc aagctctcgg tgggaaagaa cacgtggcag 660
 [0419] cagggagaaa ccttcacctg tgtggtgatg catgaggccc tgcacaacca ctacaccaa 720
 [0420] aaatccatca cccagtcttc gggtaaa 747
 [0421] <210> 28
 [0422] <211> 747
 [0423] <212> DNA
 [0424] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0425] <400> 28
 [0426] ggaggtggag gttcaggtgg aggtggatct ggtggaggtg gatctgcgca ccacccgaa 60
 [0427] gaccccagct cccagtgtcc caaatgcccc gccctgagc tccctggagg gccacggtc 120
 [0428] ttcattctcc ccccgaacc caaggacgtc ctctccatca ccctaacacc taaggtcacg 180

[0429]	tgcgttgtgg tggacgtggg taaggaagac cctgagatag agttcagctg gtccgtgggt	240
[0430]	gacaaagagg tacacacggc tgagacaaag ccaaaggagg aacagttcaa cagcacgtac	300
[0431]	cgcgtggtca gcatcctgac aatcaagcac caggactggc tgacggggga ggagttcaag	360
[0432]	tgcaaggtca acaacaaagc tctcccggcc cccatcgaga ggaccatctc caaggccaaa	420
[0433]	gggcagacct gggagccgca ggtgtacacc ctggccccac accgggaaga gctggccaag	480
[0434]	gacaccgtga gcgtaacctg cctggtcaaa ggcttctacc cacctgacat caacgttgag	540
[0435]	tggcagagga acgggcagcc ggagtcagag ggcgcctacg ccaccacgct gccccagcag	600
[0436]	gacaacgacg ggacctactt cctctacagc aagctctcgg tgggaaagaa cacgtggcag	660
[0437]	caggagaaaa ccttcacctg tgtggtgatg cacgaggccc tgcacaacca ctccaccag	720
[0438]	aatccatca cccagtcttc gggtaaa	747
[0439]	<210>	29
[0440]	<211>	36
[0441]	<212>	DNA
[0442]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0443]	<400>	29
[0444]	gctctagagg atcgaacct tatgcatccg ctctc	36
[0445]	<210>	30
[0446]	<211>	35
[0447]	<212>	DNA
[0448]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0449]	<400>	30
[0450]	gagagaattc caccaccacc gttgaactgt ccctc	35

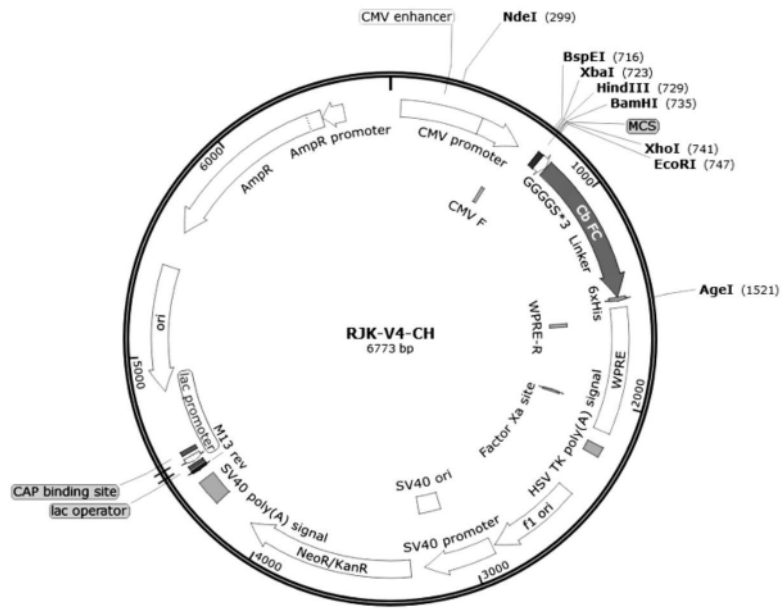


图1

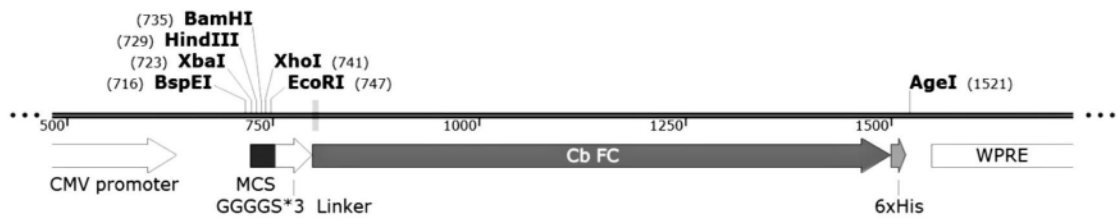


图2

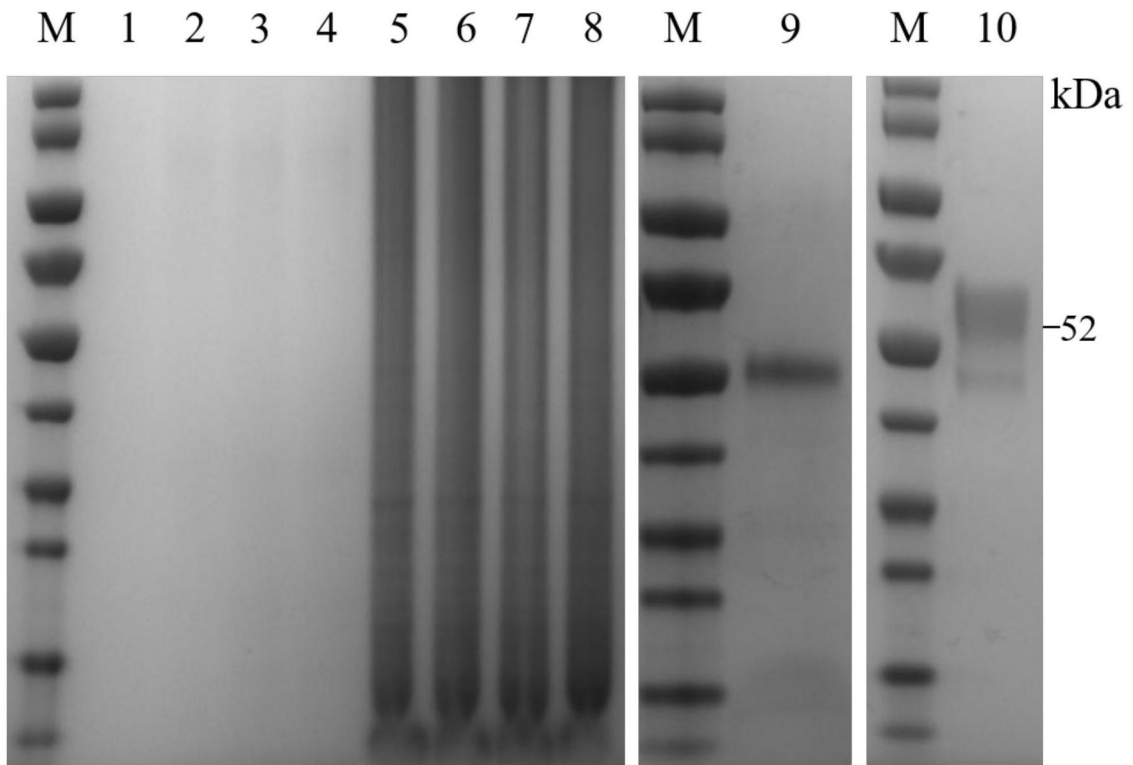


图3

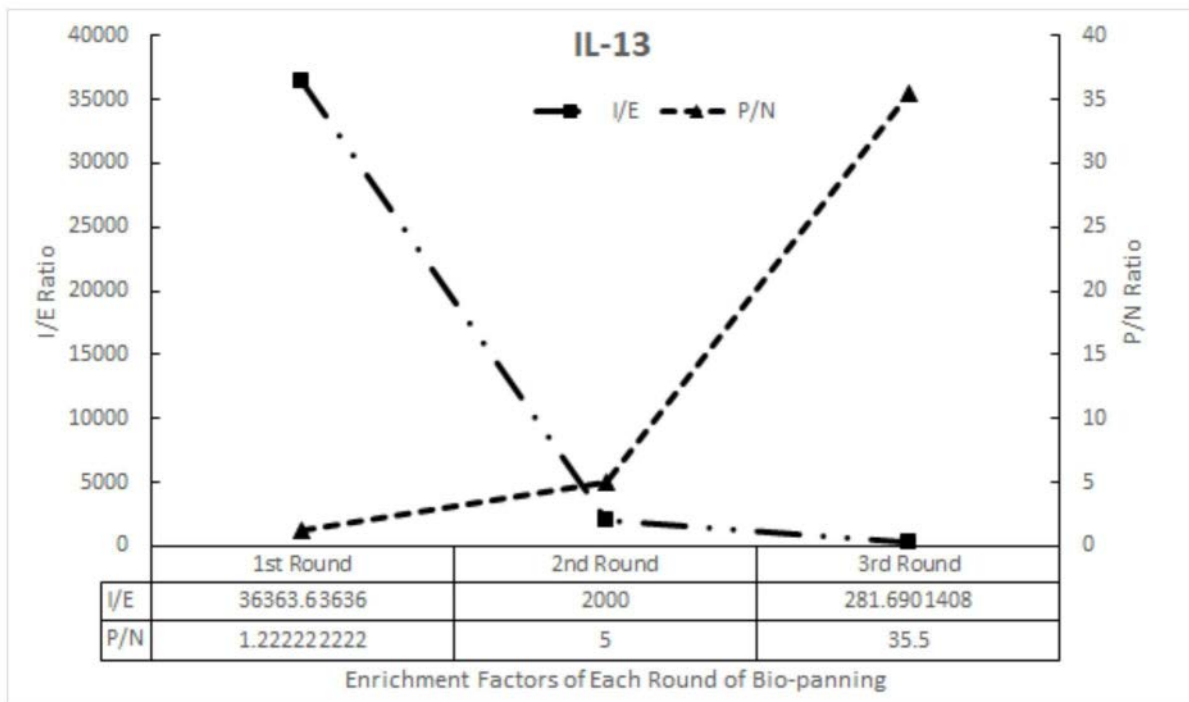


图4