



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112852870 B

(45) 授权公告日 2022. 03. 04

(21) 申请号 202110040024.X

C12N 15/62 (2006.01)

(22) 申请日 2021.01.13

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112852870 A

审查员 门思琦

(43) 申请公布日 2021.05.28

(73) 专利权人 北京鼎成肽源生物技术有限公司

地址 102200 北京市昌平区双营西路86号

院4号楼1至5层1单元101

专利权人 焦顺昌

(72) 发明人 焦顺昌 张嵘 张艳玲 袁翰

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 吕纪涛

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

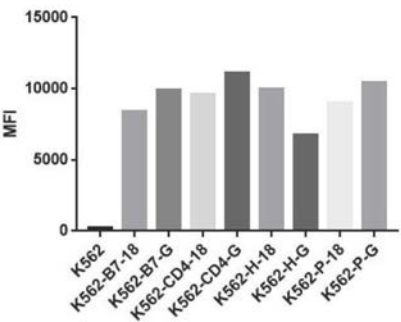
序列表9页 附图3页

(54) 发明名称

IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用、细胞及制备方法

(57) 摘要

本发明提供了IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用、细胞及制备方法,涉及疫苗制备技术领域。本发明将IL-18基因融合H2Kk基因后具有增强细胞免疫的作用。



1. 一种K562细胞的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:
  - 1) 将跨膜表达RBD基因插入到质粒中,得到PB-S-RBD-NGFR质粒;  
所述跨膜表达RBD基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示;
  - 2) 将IL-18基因融合H2Kk基因克隆到步骤1)得到的PB-S-RBD-NGFR质粒中,得到含融合基因质粒;
  - 3) 将所述步骤2)得到的含融合基因质粒电转化到K562细胞中,得到增强细胞免疫的K562细胞。
2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1)质粒包括PB-713质粒。
3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述跨膜表达RBD基因通过Bsu36I和BmgBI双酶切插入到质粒中。
4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤3)电转化的条件包括:电压560mV,电击时间30ms。
5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤3)含融合基因质粒的质量与K562细胞的数量比为 $7\mu\text{g}:1\times 10^7$ 个。
6. 一种增强细胞免疫的K562细胞,其特征在于,采用权利要求1~5任一项所述制备方法制备得到。
7. 根据权利要求6所述的增强细胞免疫的K562细胞,其特征在于,所述IL-18基因融合H2Kk基因后的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。
8. 权利要求6或7所述的增强细胞免疫的K562细胞在制备增强细胞免疫的疫苗中的应用。

## IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用、细胞及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及疫苗制备技术领域,尤其涉及IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用、细胞及制备方法。

### 背景技术

[0002] 新型冠状病毒(2019-nCoV,SARS-CoV-2)是一种 $\beta$ 属的冠状病毒,现有多种疫苗策略可以诱导出针对新型冠状病毒的免疫保护。如通过重组表达的新冠病毒亚单位疫苗、病毒灭活疫苗或者细胞疫苗等。免疫保护主要是通过疫苗诱导出抗体或细胞免疫来清除新冠病毒病原体。在疫苗刺激下,一部分T细胞会分化为具有长期记忆性的记忆T细胞(在小鼠体内,这种细胞高表达CD44分子)。这种记忆T细胞再次遇到抗原之后会产生大量的效应细胞(Effector T)和效应记忆型T细胞(Effective Memory T Cell,Tem)细胞,从而起到长期对新冠病毒的免疫保护作用。但是现有技术中还未有关于IL-18基因融合H2Kk基因具有增强细胞免疫的相关报道。

### 发明内容

[0003] 有鉴于此,本发明的目的在于提供IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用、细胞及制备方法,本发明将IL-18基因融合H2Kk基因后具有增强细胞免疫的作用。

[0004] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0005] 本发明提供了IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用。

[0006] 优选的,所述IL-18基因融合H2Kk基因后的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0007] 本发明还提供了一种增强细胞免疫的K562细胞,将上述技术方案所述的IL-18基因融合H2Kk基因转化到K562细胞中,得到增强细胞免疫的K562细胞。

[0008] 本发明还提供了一种上述技术方案所述的K562细胞的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 将跨膜表达RBD基因插入到质粒中,得到PB-S-RBD-NGFR质粒;

[0010] 所述跨膜表达RBD基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示;

[0011] 2) 将所述IL-18基因融合H2Kk基因克隆到步骤1)得到的PB-S-RBD-NGFR质粒中,得到含融合基因质粒;

[0012] 3) 将所述步骤2)得到的含融合基因质粒电转化到K562细胞中,得到增强细胞免疫的K562细胞。

[0013] 优选的,所述步骤1)质粒包括PB-713质粒。

[0014] 优选的,所述跨膜表达RBD基因通过Bsu36I和BmgBI双酶切插入到质粒中。

[0015] 优选的,所述步骤3)电转化的条件包括:电压560mV,电击时间30ms。

[0016] 优选的,所述步骤3)含融合基因质粒的质量与K562细胞的数量比为 $7\mu\text{g}:1\times 10^7$ 个。

[0017] 本发明还提供了上述技术方案所述的增强细胞免疫的K562细胞在制备增强细胞免疫的疫苗中的应用。

[0018] 本发明提供了IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用、细胞及制备方法,IL-18是一种具有多向和多层次免疫调节功能的细胞因子,参与诱导免疫细胞活性的激活,从而介导细胞免疫,本发明将IL-18基因融合H2Kk基因后,使IL18表达在K562细胞膜表面,加强IL18对免疫细胞的刺激,具有增强细胞免疫的作用。

[0019] 本发明实施例的结果显示:共表达IL18因子和H2Kk跨膜结构,可增强S蛋白RBD在小鼠体内细胞免疫(记忆T细胞)反应。

## 附图说明

[0020] 图1为流式细胞术检测RBD蛋白的表达结果;

[0021] 图2为因子IL-18/GM-CSF与Flag的融合表达检测结果;

[0022] 图3为四种结构K562细胞免疫小鼠后抗体滴度检测结果;

[0023] 图4为四种结构的K562细胞免疫小鼠后各型T细胞比例结果;

[0024] 图5为用于构建细胞疫苗的穿梭质粒结构示意图,其中,质粒含双阅读框,MSCV启动子用于表达增强免疫记忆作用的细胞因子,而EF1启动子用于跨膜表达新冠病毒刺突蛋白的受体结合区域(S-RBD),跨膜表达S-RBD主要通过NGFR蛋白片段介导。

## 具体实施方式

[0025] 本发明提供了IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用。在本发明中,所述IL-18基因融合H2Kk基因后的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0026] 本发明还提供了一种增强细胞免疫的K562细胞,将上述技术方案所述的IL-18基因融合H2Kk基因转化到K562细胞中,得到增强细胞免疫的K562细胞。

[0027] 本发明还提供了一种上述技术方案所述的K562细胞的制备方法,包括以下步骤:

[0028] 1) 将跨膜表达RBD基因插入到质粒中,得到PB-S-RBD-NGFR质粒;

[0029] 所述跨膜表达RBD基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示;

[0030] 2) 将所述IL-18基因融合H2Kk基因克隆到步骤1)得到的PB-S-RBD-NGFR质粒中,得到含融合基因质粒;

[0031] 3) 将所述步骤2)得到的含融合基因质粒电转化到K562细胞中,得到增强细胞免疫的K562细胞。

[0032] 本发明将跨膜表达RBD基因插入到质粒中,得到PB-S-RBD-NGFR质粒;所述跨膜表达RBD基因的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示,具体如下:

[0033] CCTGAGGCCGCCATCCACGCCGGTTGAGTCGCGTTCTGCCGCCCTCCCGCCT  
GTGGTGCCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTCTAGGTAAGTTTAAAGCTCAGGTCCG  
AGACCGGGCCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGGAGCCTACCTAGACTCAGCCGGCT  
CTCCACGCTTTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTGTTTCGTTTTCT  
GTTCTGCGCCGTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCCTACGCTAGACGCCACC  
GAATTCATGGGGGCGAGGTGCCACCGGCCGCGCCATGGACGGGGCCGCGCCTGCTGCTGT  
TGCTGCTTCTGGGGGTGTCCCTTGGAGGTGCCGTGACAGAGTGCAGCCCACAGAGAGC  
ATTGTGAGATTCCCCAACATCACCAACCTGTGCCCTTTGGGGAGGTGTTCAATGCCACAA  
GATTTGCCTCTGTGTATGCCTGGAACAGAAAGAGAATCAGCAACTGTGTGGCTGACTACTC  
TGTGCTCTATAATTCTGCTAGCTTCAGCACCTTCAAGTGCTATGGGGTGAGCCCCACCAAG  
CTGAATGACCTGTGCTTCACCAATGTGTATGCTGACAGCTTTGTGATCAGAGGGGATGAG  
GTGAGACAGATTGCCCTGGGCAGACTGGCAAGATTGCTGACTACAACCTACAAGCTGCCT  
GATGACTTCACTGGCTGTGTGATTGCCTGGAACAGCAACAACCTGGACAGCAAGGTGGGG  
GGCAACTACAACCTACCTCTATAGACTGTTAGAAAGAGCAACCTGAAGCCCTTTGAGAGAG  
ACATCAGCACAGAGATCTACCAAGCTGGCAGCACCCCTGCAATGGGGTGGAGGGCTTC  
AACTGCTACTTCCCCCTGCAGAGCTATGGCTTTCAGCCCACCAATGGGGTGGGCTATCAG  
CCCTACAGAGTGGTGGTGTGCTGAGCTTTGAGCTGCTGCATGCCCTGCCACAGTGTGTGG  
CCCCAAGAAGAGCACCAACCTGGTGAAGAACAAGTGTGTGAACCTTACTACAAGGATGA  
TGATGACAAGACGCGTAAGGAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACACACACAGCGGTGA  
GTGCTGCAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCAGCCTTGTGGAGCCAACCA  
GACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCCGACGTGGTGAGCGCGAC  
CGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGGCTCCAGAGCATGTGCGGCGCCGTG  
CGTGAGGCGGACGACGCGCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGAC  
GACTGGGCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCTC  
CTGCCAGGACAAGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGCCCCGACGGCACGTATTCCGA  
CGAGGCCAACACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCG  
CCAGCTCCGCGAGTGCACACGCTGGGCGGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCG  
TTGGATTACCGGTCCACACCCCCAGAGGGCTCGGACAGCACAGCCCCCAGCACCCA  
GGAGCCTGAGGCACCTCCAGAACAAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGGTGTGGT  
GACCACAGTGATGGGCAGCTCCCAGCCCGTGGTGACCCGAGGCACACCGACAACCT  
CATCCCTGTCTATTGCTCCATCCTGGCTGCTGTGGTTGTGGGCCTTGTGGCCTACATA  
GCCTTCAAGAGGCTCGAGGAGGGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTG。

其中,加粗部分为酶切后补足的EF1启动子序列,斜体部分为编码NGFR信号肽的核苷酸序列,斜体加下划线部分为编码S-RBD的核苷酸序列,粗斜体部分为使蛋白能跨膜表达的NGFR跨膜结构域,下划线部分为T2A序列,小写碱基部分为Bsu36I酶切位点,加框部分为BmgBI酶切位点。

[0034] 在本发明中,所述质粒优选包括PB-713质粒,本发明对所述PB-713质粒的来源没有特殊限定,采用常规市售即可,如购买于SBI公司。在本发明中,所述跨膜表达RBD基因优选通过Bsu36I和BmgBI双酶切插入到质粒中,本发明对双酶切到质粒中的方法没有特殊限定,本领域技术人员依据常规方法即可。

[0035] 本发明将所述IL-18基因融合H2Kk基因克隆到步骤1)得到的PB-S-RBD-NGFR质粒中,得到含融合基因质粒。本发明优选通过5'NheI和3'BamHI酶切位点将IL-18基因融合H2Kk基因克隆至PB-S-RBD-NGFR质粒中,本发明对克隆的其他操作没有特殊限定,本领域技术人员依据常规操作即可。

[0036] 本发明将得到的含融合基因质粒电转化到K562细胞中,得到增强细胞免疫的K562细胞。本发明对所述K562细胞的来源没有特殊限定,采用市售产品即可。在本发明中,所述电转化的条件优选包括:电压560mV,电击时间30ms。在本发明中,所述含融合基因质粒的质量与K562细胞的数量比优选为 $7\mu\text{g}:1\times 10^7$ 个。在本发明中,所述电转化后再优选经过嘌呤霉素筛选后,得到增强细胞免疫的K562细胞,本发明对使用嘌呤霉素筛选的方法没有特殊限定,本领域技术人员依据常规操作筛选皆可。

[0037] 本发明还提供了上述技术方案所述的增强细胞免疫的K562细胞在制备增强细胞免疫的疫苗中的应用。本发明对将增强细胞免疫的K562细胞制备成疫苗的方法没有特殊限定,采用常规将细胞制备成疫苗的方法即可。在本发明中,所述疫苗制备方法优选包括:按需取所述增强细胞免疫的K562细胞,400g,5min离心弃去培养基,加入生理盐水洗涤,400g,5min离心弃尽生理盐水,加入新生理盐水重悬细胞至对应体积。

[0038] 为了进一步说明本发明,下面结合实例对本发明进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0039] 实施例1

[0040] 载体的构建:

[0041] 第一步:跨膜表达RBD结构的装入

[0042] 通过上游Bsu36I和下游BmgBI双酶切位点,将跨膜表达RBD基因(SEQ ID No.2)整合进入PB-713质粒(购自SBI公司)。新质粒命名为PB-S-RBD-NGFR质粒。

[0043] 第二步:将鼠IL-18或GM-CSF基因分别与四种跨膜蛋白基因融合后克隆入第一步完成的质粒。

[0044] 1、获取氨基酸序列信息

[0045] 1) 由于部分氨基酸拥有多个密码子,不同种属间存在密码子偏好,所以采用蛋白的氨基酸序列,在基因合成时进行人的密码子优化,使得蛋白在K562细胞中更有效的表达,在Uniprot数据库上获得鼠目的蛋白IL-18、GM-CSF的氨基酸序列:

[0046] IL-18的氨基酸序列如SEQ ID No.3所示;

[0047] GM-CSF的氨基酸序列如SEQ ID No.4所示。

[0048] 2) 在Uniprot数据库上获得鼠来源的跨膜结构CD4、H2Kk、B7-H1、PDGFR的氨基酸序列,获得其信号肽和跨膜区的氨基酸序列:

[0049] CD4-SP的氨基酸序列如SEQ ID No.5所示;CD4-TM的氨基酸序列如SEQ ID No.6所示;H-2Kk-SP的氨基酸序列图SEQ ID No.7所示;H-2Kk-TM的氨基酸序列如SEQ ID No.8所示;PDGFR-SP的氨基酸序列如SEQ ID No.9所示;PDGFR-TM的氨基酸序列如SEQ ID No.10所示;B7-H1-SP的氨基酸序列如SEQ ID No.11所示;B7-H1-TM的氨基酸序列如SEQ ID No.12所示。

[0050] 密码子优化后的对应核酸序列:

[0051] CD4-SP的核苷酸序列如SEQ ID No.20所示;CD4-TM的核苷酸序列如SEQ ID No.21所示;H-2Kk-SP的核苷酸序列如SEQ ID No.22所示;H-2Kk-TM的核苷酸序列如SEQ ID No.23所示;PDGFR-SP的核苷酸序列如SEQ ID No.24所示;PDGFR-TM的核苷酸序列如SEQ ID No.25所示;B7-H1-SP的核苷酸序列如SEQ ID No.26所示;B7-H1-TM的核苷酸序列如SEQ ID No.27所示;Flag的核苷酸序列如SEQ ID No.28所示;IL-18的核苷酸序列如SEQ ID No.29所示;GM-CSF的核苷酸序列如SEQ ID No.30所示。

[0052] 3) 将序列信息按照表1进行组合,并委托金唯智进行快速基因合成,将基因通过5'NheI和3'BamHI酶切位点克隆至第一步完成的载体PB-S-RBD-NGFR,构建成同时拥有S-RBD-NGFR以及增强免疫记忆作用的细胞因子结构的质粒(即穿梭质粒)。

[0053] 表1载体信息

|        |                              |      |       |      |             |      |       |       |
|--------|------------------------------|------|-------|------|-------------|------|-------|-------|
| [0054] |                              |      | SP    |      |             |      | TM    |       |
|        | 1.PB-CD4-FLAG-IL-18-Hygro    | NheI | CD4   | SalI | FLAG-IL-18  | XhoI | CD4   | BamHI |
| [0055] | 2.PB-CD4-FLAG-GM-CSF-Hygro   | NheI |       | SalI | FLAG-GM-CSF | XhoI |       | BamHI |
|        | 3.PB-H-2Kk-FLAG-IL-18-Hygro  | NheI | H-2Kk | SalI | FLAG-IL-18  | XhoI | H-2Kk | BamHI |
|        | 4.PB-H-2Kk-FLAG-GM-CSF-Hygro | NheI |       | SalI | FLAG-GM-CSF | XhoI |       | BamHI |
|        | 5.PB-PDGFR-FLAG-IL-18-Hygro  | NheI | PDGFR | SalI | FLAG-IL-18  | XhoI | PDGFR | BamHI |
|        | 6.PB-PDGFR-FLAG-GM-CSF-Hygro | NheI |       | SalI | FLAG-GM-CSF | XhoI |       | BamHI |
|        | 7.PB-B7-H1-FLAG-IL-18-Hygro  | NheI | B7-H1 | SalI | FLAG-IL-18  | XhoI | B7-H1 | BamHI |
|        | 8.PB-B7-H1-FLAG-GM-CSF-Hygro | NheI |       | SalI | FLAG-GM-CSF | XhoI |       | BamHI |

[0056] 基因合成(由苏州金唯智生物技术有限公司完成)的最终DNA基因序列如下:

[0057] CD4-FLAG-IL-18的核苷酸序列如SEQ ID No.13所示;

[0058] CD4-FLAG-GM-CSF的核苷酸序列如SEQ ID No.14所示;

[0059] H-2Kk-FLAG-IL-18的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示;

[0060] H-2Kk-FLAG-GM-CSF的核苷酸序列如SEQ ID No.15所示;

[0061] PDGFR-FLAG-IL-18的核苷酸序列如SEQ ID No.16所示;

[0062] PDGFR-FLAG-GM-CSF的核苷酸序列如SEQ ID No.17所示;

[0063] B7-H1-FLAG-IL-18的核苷酸序列如SEQ ID No.18所示;

[0064] B7-H1-FLAG-GM-CSF的核苷酸序列如SEQ ID No.19所示。

[0065] 实施例2

[0066] 一、通过四种结构分别跨膜表达IL-18与GM-CSF的细胞验证(K562-B7-18、K562-B7-G、K562-CD4-18、K562-CD4-G、K562-H-18、K562-H-G、K562-P-18、K562-P-G)的K562细胞系。

[0067] 1、K562细胞培养:在IMDM(BI,01-058-1ACS)培养基培养,补加10%FBS(gibco,11099-141),于细胞培养箱37℃,5%CO<sub>2</sub>培养,每36h更换培养基,调整细胞密度至 $5 \times 10^5$ 个/ml。

[0068] 2、电转方法构建稳定表达8种结构(K562-B7-18、K562-B7-G、K562-CD4-18、K562-CD4-G、K562-H-18、K562-H-G、K562-P-18、K562-P-G)的K562细胞系。其中K562-H-18、K562-H-G、K562-P-18、K562-P-G依次简写为K-H-18、K-H-G、K-P-18以及K-P-G。分别取8份 $1 \times 10^7$ 个K562细胞400g离心5min,尽量去除上清,每组各重悬于120μl电转液(Celetrix试剂盒,12-0104)中,分别加入对应质粒7μg,每组均加入2.8μgSuper PB(购自SBI公司),混匀,加至120μl电击管(Celetrix试剂盒,12-0104)中,电转仪(Celetrix,CTX-1500A)电转条件为电压560mV,电击时间30ms。电转后细胞立即转入20ml IMDM培养基中(包含10%FBS)培养48h后换液继续培养。

[0069] 3、嘌呤霉素药物筛选:电转细胞培养48h后,向细胞内加入嘌呤霉素5μg/ml进行药物筛选,之后培养方法为每48h更换培养基,调整细胞密度至 $5 \times 10^5$ 个/ml,重新加入嘌呤霉素5μg/ml培养。

[0070] 4、流式细胞术检测药物筛选后8种细胞RBD蛋白的表达:取筛选后的8种细胞各 $1 \times 10^6$ 个细胞,600g,3min离心去培养基得细胞沉淀,重悬于50μl PBS(Hyclone SH30256.01)中,分别加入Anti-protein S抗体(博奥龙,BF03082-1P)1μg/样,室温孵育40min,每管中各

加入1ml的PBS清洗一遍细胞,600g,3min离心,弃去上清,目的是去除未结合抗体,细胞沉淀重悬于50ul PBS中,每管中各加入1ul PE anti-human IgG FC抗体(Biolegend公司),室温避光孵育20min,PBS洗一次,通过BD LSRFortessa流式分析仪检测结果见图1。

[0071] 结果如图1所示,纵坐标MFI为流式分析仪检测到样品PE荧光的平均荧光强度,具体数据见表2。在流式染色时,一抗Anti-protein S抗体可以识别8种细胞表面的RBD蛋白,二抗PE anti-human IgG FC带有PE荧光,并且可以识别已经与RBD结合的一抗Anti-protein S抗体,由此可以认为PE荧光间接标记了细胞表面的RBD蛋白。图1中K562组为没有转染过的野生型细胞,无RBD蛋白的表达,作为阴性对照,由图1可见,8种结构质粒构建的细胞系均有RBD蛋白的表达,且表达量良好,证明8种结构均可良好的表达目的蛋白RBD,并成功的构建了稳定表达8种结构的K562细胞系。

[0072] 表2流式检测RBD表达结果

| 细胞名称 | K562 | K562-B7-18 | K562-B7-G | K5662-CD4-18 | K562-CD4-G | K562-H-18 | K562-H-G | K562-P-18 | K562-P-G |
|------|------|------------|-----------|--------------|------------|-----------|----------|-----------|----------|
| MFI  | 240  | 8410       | 9899      | 9634         | 11112      | 9983      | 6779     | 8972      | 10457    |

[0074] 二、Westem-Blot法检测8种结构中IL-18/GM-CSF与Flag融合表达情况。

[0075] 1、蛋白样品制备。取细胞培养液于15mL离心管中,400g离心5min,弃上清,加入1mL PBS重悬,400g离心5min,离心洗涤两次;取1.5mL的EP管,加入100×Phosphatase Inhibitor (TargetMol公司)蛋白抑制剂和Pierce™ RIPA Buffer蛋白裂解液 (Thermo scientmc公司),充分混匀后备用;200μL上述混合液重悬细胞沉淀,冰浴孵育15min,4℃预冷离心机,12000rpm离心15min,取上清备用。

[0076] 2、BCA法测样品蛋白浓度。使用Thermo scientific公司的BCA蛋白定量试剂盒,按照说明书,准备标准曲线样品,制定标准曲线,根据说明书要求进行检测并计算各样品浓度。

[0077] 3、SDS-PAGE电泳。根据各样品浓度,按照20μg/孔制备电泳样品,蛋白样品中加入5×Lane Marker Loading Buffer (CWBIO公司)混匀,金属浴 (MiuLab) 105℃,10min,12000rpm离心1min;

[0078] 取样,加入Tris-MOPS胶孔中(胶浓度为12%,12孔,金斯瑞公司),电泳仪 (Bio-Rad公司)电压设置为80V,电泳约90-120min。

[0079] 4、将SDS-PAGE胶中蛋白转印至PVDF膜。将PVDF膜 (Immobilon公司)置于无水甲醇浸泡30s-1min进行活化,之后置于1×eBlot L1 PVDF膜平衡液 (金斯瑞公司)中浸泡进行平衡备用;将胶与PVDF膜叠加在一起,中间不可有气泡,设置转膜仪参数,24V,11min,进行转印。

[0080] 5、抗体孵育。转印结束后,将PVDF膜取出,置于封闭液 (PBS,5%脱脂奶粉)中,室温摇床封闭2h,以降低后续抗体的非特异性结合;用封闭液按1:1000的比例分别稀释抗体 (SIGMA公司的鼠单抗Monoclonal ANTI-FLAG®M2,Clone M2 produced in mouse, affinity isolated antibody),混匀后备用;将PVDF膜分别置于上述对应的一抗稀释液中,4℃冰箱摇床孵育过夜;次日将膜放入TBST中,于摇床上洗膜,洗去未结合及非特异结合抗体,5min×5次;用封闭液按1:10000的比例分别稀释鼠二抗 (HRP-山羊抗小鼠IgG,博奥龙公司)混匀,将PVDF膜分别置于上述二抗稀释液中,室温摇床孵育1h;将膜放入TBST进行洗膜,3min×4次。



[0081] 6、显色。配制显色液(现配现用,博奥龙公司),按照化学发光液I:化学发光液II=1:1的比例配制,用超纯水进行1:1稀释;将PVDF膜置于显色液中,立即在凝胶成像分析系统(Bio-Rad公司)成像拍照,观察并分析结果,结果见图2。

[0082] 如图2所示,与第二泳道未转染的野生型K562细胞相比,8种结构的K562细胞均显示了RBD-Flag的融合蛋白条带,且通过参照第一泳道的蛋白Marker标定的各分子量蛋白的位置,RBD-Flag分子量大小与预期一致;同时8种结构的K562细胞中K-H-18、K-H-G、K-P-18以及K-P-G存在共表达因子IL-18-Flag或GM-CSF-Flag的融合蛋白条带,且分子量大小与预期一致,证明K-H-18、K-H-G、K-P-18以及K-P-G四种结构的K562细胞系可成功同时表达目的蛋白RBD和因子IL18/GM-CSF,而其余四种跨膜结构(包括K562-B7-18、K562-B7-G、K562-CD4-18、K562-CD4-G)与细胞因子融合表达效果不理想,中止进一步的动物验证。选取K-H-18、K-H-G、K-P-18以及K-P-G四种结构的K562细胞进行小鼠体内免疫实验。

[0083] 三、RBD共表达细胞因子K562细胞免疫小鼠后的抗体滴度检测。

[0084] 1、四种结构的K562细胞(K-H-18、K-H-G、K-P-18、K-P-G)免疫小鼠。阴性对照组注射细胞为未转染任何质粒的野生型K562细胞,未优化结构组注射细胞为K562-RBD,即转染了实施例一中第一步所获PB-S-RBD-NGFR质粒的细胞;24只BALB/c小鼠,随机分为6组,每组4只。如下表3:

[0085] 表3小鼠免疫分组

| 组别      | 注射细胞          | 只数 |
|---------|---------------|----|
| 阴性对照    | K562(control) | 4  |
| 未优化结构对照 | K562-RBD      | 4  |
| 实验组     | K562-H-G      | 4  |
|         | K562-H-18     | 4  |
|         | K562-P-18     | 4  |
|         | K562-P-G      | 4  |

[0087] 免疫疫苗制备方法:按照所需注射小鼠数目,取上述注射细胞各 $1 \times 10^8$ 个,400g,5min离心弃去培养基,加入20ml生理盐水重悬,400g,5min离心弃尽生理盐水,加入新生理盐水重悬细胞至2.5ml,置于冰上待用。

[0088] 免疫方法:每只小鼠皮下多点注射 $2 \times 10^7$ 个细胞(0.5ml体积),首次注射后第14天加强免疫皮下多点注射 $2 \times 10^7$ 个细胞(0.5ml体积),二次免疫两天后眼球取血及脾脏进行血清及细胞表型检测。

[0089] 2、外周血分离血清。将采集的外周血先放37℃培养箱温浴1h,然后3000rpm离心20min,离心结束后将上层血清转移到标记好的1.5ml离心管,然后进行ELISA检测。

[0090] 3、ELISA包被。将S-RBD蛋白(北京博奥龙免疫技术有限公司)按照1 $\mu$ g/ml的浓度包被3块ELISA板,50 $\mu$ l/孔,4℃过夜包被。

[0091] 4、ELISA封闭。先用TBST配置60ml的5%脱脂牛奶。然后用PBST将包被结束的ELISA板清洗4次,300 $\mu$ l/孔,每次间隔1min。最后将配置好的5%脱脂牛奶按照200 $\mu$ l/孔的剂量加

入到ELISA板中,37℃培养箱孵育1h。

[0092] 5、ELISA上样。先将24管血清分别按照1:100、1:1000、1:10000、1:100000稀释四个浓度梯度,每个浓度梯度设置3个复孔。最后将稀释好的血清按照100μl/孔的体积加入到封闭好的ELISA板中,37℃培养箱孵育2-3h。

[0093] 6、ELISA二抗结合:先将Goa Anti-Mouse IgG-HRP抗体(北京博奥龙免疫技术有限公司)按照1:5000的比例用PBS稀释30ml。然后用PBST将包被结束的ELISA板清洗4次,300μl/孔,每次间隔1min。最后将稀释好的Goa Anti-Mouse IgG-HRP抗体按照100μl/孔的体积加入到ELISA板中,室温孵育40min。

[0094] 7、ELISA显色:先用PBST将包被结束的ELISA板清洗4次,300μl/孔,每次间隔1min。然后每孔加入50μl TMB显色液(Biolengend公司)避光显色5min后再加入50μl终止液。酶标仪检测波长为450nm时的OD值,结果见图3与表4。

[0095] 表4 ELSA抗体滴度检测结果

[0096]

|     | K562  | K562-RBD | K-P-G | K-P-18 | K-H-G | K-H-18 |
|-----|-------|----------|-------|--------|-------|--------|
| 平均值 | 328   | 145944   | 41635 | 54861  | 56193 | 73206  |
| 标准差 | 70.93 | 32483    | 10932 | 14863  | 7635  | 17360  |

[0097] 如图3所示,与野生型K562对照组相比,无共表达因子的K-RBD-NGFR细胞与带有共表达因子的四种结构的K562细胞,免疫小鼠后,均可使小鼠产生针对S-RBD的抗体,且抗体滴度水平相当。证明同时表达因子IL18或GM-CSF亦可使小鼠对K562细胞表达的RBD产生免疫反应。

[0098] 四、检测不同跨膜因子共表达结构细胞株免疫小鼠的细胞免疫反应。

[0099] 1、脾细胞制取。脾脏来源为第三部分中表1的动物实验获得,70μm细胞筛网(Falcon,352350)置于50ml离心管上,离心管插于冰上,将脾脏放在筛网上,少量预冷PBS湿润筛网,用注射器活塞底部多次按压脾脏至破裂并通过筛网,PBS冲洗筛网上脾脏细胞,400g,5min离心收集通过筛网的细胞,准备流式检测。

[0100] 2、流式检测。取各小鼠脾脏细胞1e6个,重悬于100μl PBS中,加入T细胞相关表面标记物流式抗体各5μl,室温避光孵育20min,加入1ml PBS,翻转混匀,600g 3min离心,弃去上清,加入300μl PBS重悬细胞,通过BD LSRFortessa流式分析仪检测,结果见图4与表5。

[0101] 表5流式检测各T细胞分型占比结果

[0102]

|                            |     | K562-H-G | K562-H-18 | K562-P-G | K562-P-18 | K562-RBD | Control |
|----------------------------|-----|----------|-----------|----------|-----------|----------|---------|
| Tcm(CD44hi CD62Lhi)        | 平均值 | 22.8     | 29.55     | 32.38    | 35.58     | 30.2     | 33.43   |
|                            | 标准差 | 13.14    | 12.35     | 4.483    | 2.347     | 1.433    | 4.371   |
| Tem(CD44hi CD62Llo)        | 平均值 | 18.78    | 24.08     | 18.03    | 20.45     | 16.88    | 15.38   |
|                            | 标准差 | 4.864    | 2.885     | 0.8421   | 4         | 2.827    | 0.4573  |
| Naive T( CD62Lhi CD44lo)   | 平均值 | 43.15    | 27.6      | 41.4     | 35.53     | 46.75    | 40.15   |
|                            | 标准差 | 10.36    | 5.212     | 4.165    | 1.884     | 1.947    | 3.493   |
| Effector T(CD44lo CD62Llo) | 平均值 | 12.03    | 14.57     | 4.883    | 5.268     | 2.955    | 7.355   |
|                            | 标准差 | 11.39    | 12.74     | 0.9492   | 0.4205    | 0.8939   | 6.346   |

[0103] 如图4所示,流式结果的各表型T细胞占比以柱状图表示结果显示,纵坐标表示在CD4阳性的T细胞中各型T细胞的占比;二次免疫后K562-H-18的效应T细胞(Effector T)与效应性记忆性T细胞(Tem)占比优于其他组(图4中红星标记);但K562-H-18的中枢记忆性T细胞(Tcm)占比与其他组相比并无明显优势,考虑到中枢记忆性T细胞的特点是,再次接触抗原时可迅速分化为能够分泌淋巴因子的效应T细胞,所以认为是此两组的中枢记忆性T细胞在第14天二次免疫时受到抗原刺激,迅速分化为效应T细胞,导致第16天检测时效应T细胞占比优于其他组,使得Tcm占比无明显优势。综上所述,K562-H-18,即应用共表达IL18因子H2Kk跨膜结构,可增强S蛋白RBD在小鼠体内细胞免疫(记忆T细胞)反应。

[0104] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,并非对本发明作任何形式上的限制。应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

|        |            |                                         |                                                  |
|--------|------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------|
| [0001] | 序列表        |                                         |                                                  |
| [0002] | <110>      | 北京鼎成肽源生物技术有限公司                          |                                                  |
| [0003] |            | 焦顺昌                                     |                                                  |
| [0004] | <120>      | IL-18基因融合H2Kk基因在制备增强细胞免疫的细胞中的应用、细胞及制备方法 |                                                  |
| [0005] | <160>      | 30                                      |                                                  |
| [0006] | <170>      | SIP0SequenceListing 1.0                 |                                                  |
| [0007] | <210>      | 1                                       |                                                  |
| [0008] | <211>      | 639                                     |                                                  |
| [0009] | <212>      | DNA                                     |                                                  |
| [0010] | <213>      | 人工序列(Artificial Sequence)               |                                                  |
| [0011] | <400>      | 1                                       |                                                  |
| [0012] | atggcccctt | gcatgctgct                              | cctgctcctg gccgctgccc tggcccctac acagacaaga 60   |
| [0013] | gccgtcgacg | actacaagga                              | cgatgacgac aagaacttcg gcagactgca ctgcaccacc 120  |
| [0014] | gccgtgatca | gaaacatcaa                              | cgaccaagtg ctgttcgtgg acaagagaca gcctgtgttc 180  |
| [0015] | gaggacatga | ccgacatcga                              | tcagagcgcc tccgagcctc agacaagact gatcatctac 240  |
| [0016] | atgtacaagg | acagcgaggt                              | gagaggcctg gccgtgaccc tgagcgtgaa ggacagcaag 300  |
| [0017] | atgagcacc  | tgagctgcaa                              | gaacaagatc atcagcttcg aggagatgga cctcctgag 360   |
| [0018] | aacatcgacg | acattcagag                              | cgacctgac ttttttcaga agagagtgcc tggccacaac 420   |
| [0019] | aagatggagt | tcgagagcag                              | cctgtacgag ggccacttcc tggcctgtca gaaggaggac 480  |
| [0020] | gacgccttca | agctgaccc                               | gaagaaaaag gacgagaacg gcgacaagag cgtgatgttc 540  |
| [0021] | acctgacca  | acctgcatca                              | gagcctcgag gtgatcatcg ccgtgctggt ggtgctgggc 600  |
| [0022] | gccgccatcg | tgaccggcgc                              | cgtggtggcc ttcgtgatg 639                         |
| [0023] | <210>      | 2                                       |                                                  |
| [0024] | <211>      | 1841                                    |                                                  |
| [0025] | <212>      | DNA                                     |                                                  |
| [0026] | <213>      | 人工序列(Artificial Sequence)               |                                                  |
| [0027] | <400>      | 2                                       |                                                  |
| [0028] | cctgaggccg | ccatccacgc                              | cggttgagtc gcgttctgcc gcctcccgcc tgtggtgcct 60   |
| [0029] | cctgaactgc | gtccgccgtc                              | taggtaagtt taaagctcag gtcgagaccg ggcctttgtc 120  |
| [0030] | cggcgctccc | ttggagccta                              | cctagactca gccggtcttc cagcctttgc ctgacctgc 180   |
| [0031] | ttgtcaact  | ctacgtcttt                              | gtttcgtttt ctgttctgcg ccgttacaga tccaagctgt 240  |
| [0032] | gaccggcgcc | tacgctagac                              | gccaccgaat tcatgggggc aggtgccacc ggccgcgcca 300  |
| [0033] | tggacgggcc | gcgcctgctg                              | ctgttgctgc ttctgggggt gtcccttgga ggtgccgtcg 360  |
| [0034] | acagagtgca | gccacagag                               | agcattgtga gattcccaa catcaccaac ctgtgcccct 420   |
| [0035] | ttggggaggt | gttcaatgcc                              | acaagatttg cctctgtgta tgcttgaac agaaagagaa 480   |
| [0036] | tcagcaactg | tgtggctgac                              | tactctgtgc tctataatc tgctagcttc agcaccttca 540   |
| [0037] | agtgtatg   | ggtgagcccc                              | accaagctga atgacctgtg cttcaccaat gtgtatgctg 600  |
| [0038] | acagctttgt | gatcagaggg                              | gatgaggtga gacagattgc ccctgggcag actggcaaga 660  |
| [0039] | ttgtgacta  | caactacaag                              | ctgcctgatg acttcaactgg ctgtgtgatt gcctggaaca 720 |
| [0040] | gcaacaacct | ggacagcaag                              | gtggggggca actacaacta cctctataga ctgttcagaa 780  |
| [0041] | agagcaacct | gaagcccttt                              | gagagagaca tcagcacaga gatctacaa gctggcagca 840   |

|        |                                                                   |                           |
|--------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| [0042] | ccccctgcaa tggggtggag ggcttcaact gctacttccc cctgcagagc tatggctttc | 900                       |
| [0043] | agcccaccaa tggggtgggc tatcagccct acagagtggg ggtgctgagc tttagactgc | 960                       |
| [0044] | tgcattgccc tgccacagtg tgtggcccca agaagagcac caacctgggt aagaacaagt | 1020                      |
| [0045] | gtgtgaactt tgactacaag gatgatgatg acaagacgcg taaggaggca tgccccacag | 1080                      |
| [0046] | gcctgtacac acacagcggg gagtgtctga aagcctgcaa cctgggagag ggtgtggccc | 1140                      |
| [0047] | agccttgtgg agccaaccag accgtgtgtg agccctgcct ggacagcgtg acgttctccg | 1200                      |
| [0048] | acgtggtgag cgcgaccgag ccgtgcaagc cgtgcaccga gtgcgtgggg ctccagagca | 1260                      |
| [0049] | tgctcgcgcc gtgcgtggag gccgacgacg ccgtgtgccg ctgcgcctac ggctactacc | 1320                      |
| [0050] | aggatgagac gactgggcgc tgcgaggcgt gccgcgtgtg cgaggcgggc tcgggcctcg | 1380                      |
| [0051] | tgttctcctg ccaggacaag cagaacaccg tgtgagagga gtgccccgac ggcacgtatt | 1440                      |
| [0052] | ccgacgaggc caaccacgtg gacccgtgcc tgccctgcac cgtgtgcgag gacaccgagc | 1500                      |
| [0053] | gccagctccg cgagtgcaca cgctgggccc acgccgagtg cgaggagatc cctggccgtt | 1560                      |
| [0054] | ggattacacg gtccacaccc ccagagggtc cggacagcac agccccagc acccaggagc  | 1620                      |
| [0055] | ctgaggcacc tccagaacaa gacctcatag ccagcacggt ggcaggtgtg gtgaccacag | 1680                      |
| [0056] | tgatgggcag ctcccagccc gtggtgaccc gaggcaccac cgacaacctc atccctgtct | 1740                      |
| [0057] | attgetccat cctggtgtgt gtggttgtgg gccttgtggc ctacatagcc ttcaagaggc | 1800                      |
| [0058] | tcgaggaggg cagaggaagt cttctaacat gcggtgacgt g                     | 1841                      |
| [0059] | <210>                                                             | 3                         |
| [0060] | <211>                                                             | 157                       |
| [0061] | <212>                                                             | PRT                       |
| [0062] | <213>                                                             | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0063] | <400>                                                             | 3                         |
| [0064] | Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn   |                           |
| [0065] | 1 5 10 15                                                         |                           |
| [0066] | Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met   |                           |
| [0067] | 20 25 30                                                          |                           |
| [0068] | Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile   |                           |
| [0069] | 35 40 45                                                          |                           |
| [0070] | Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser   |                           |
| [0071] | 50 55 60                                                          |                           |
| [0072] | Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile   |                           |
| [0073] | 65 70 75 80                                                       |                           |
| [0074] | Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser   |                           |
| [0075] | 85 90 95                                                          |                           |
| [0076] | Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu   |                           |
| [0077] | 100 105 110                                                       |                           |
| [0078] | Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu   |                           |
| [0079] | 115 120 125                                                       |                           |
| [0080] | Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp   |                           |
| [0081] | 130 135 140                                                       |                           |
| [0082] | Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser               |                           |
| [0083] | 145 150 155                                                       |                           |

|        |                                                                 |                           |
|--------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|
| [0084] | <210>                                                           | 4                         |
| [0085] | <211>                                                           | 124                       |
| [0086] | <212>                                                           | PRT                       |
| [0087] | <213>                                                           | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0088] | <400>                                                           | 4                         |
| [0089] | Ala Pro Thr Arg Ser Pro Ile Thr Val Thr Arg Pro Trp Lys His Val |                           |
| [0090] | 1                                                               | 5 10 15                   |
| [0091] | Glu Ala Ile Lys Glu Ala Leu Asn Leu Leu Asp Asp Met Pro Val Thr |                           |
| [0092] | 20                                                              | 25 30                     |
| [0093] | Leu Asn Glu Glu Val Glu Val Val Ser Asn Glu Phe Ser Phe Lys Lys |                           |
| [0094] | 35                                                              | 40 45                     |
| [0095] | Leu Thr Cys Val Gln Thr Arg Leu Lys Ile Phe Glu Gln Gly Leu Arg |                           |
| [0096] | 50                                                              | 55 60                     |
| [0097] | Gly Asn Phe Thr Lys Leu Lys Gly Ala Leu Asn Met Thr Ala Ser Tyr |                           |
| [0098] | 65                                                              | 70 75 80                  |
| [0099] | Tyr Gln Thr Tyr Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Asp Cys Glu Thr Gln |                           |
| [0100] | 85                                                              | 90 95                     |
| [0101] | Val Thr Thr Tyr Ala Asp Phe Ile Asp Ser Leu Lys Thr Phe Leu Thr |                           |
| [0102] | 100                                                             | 105 110                   |
| [0103] | Asp Ile Pro Phe Glu Cys Lys Lys Pro Gly Gln Lys                 |                           |
| [0104] | 115                                                             | 120                       |
| [0105] | <210>                                                           | 5                         |
| [0106] | <211>                                                           | 26                        |
| [0107] | <212>                                                           | PRT                       |
| [0108] | <213>                                                           | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0109] | <400>                                                           | 5                         |
| [0110] | Met Cys Arg Ala Ile Ser Leu Arg Arg Leu Leu Leu Leu Leu Gln     |                           |
| [0111] | 1                                                               | 5 10 15                   |
| [0112] | Leu Ser Gln Leu Leu Ala Val Thr Gln Gly                         |                           |
| [0113] | 20                                                              | 25                        |
| [0114] | <210>                                                           | 6                         |
| [0115] | <211>                                                           | 23                        |
| [0116] | <212>                                                           | PRT                       |
| [0117] | <213>                                                           | 人工序列(Artificial Sequence) |
| [0118] | <400>                                                           | 6                         |
| [0119] | Val Phe Leu Ala Cys Val Leu Gly Gly Ser Phe Gly Phe Leu Gly Phe |                           |
| [0120] | 1                                                               | 5 10 15                   |
| [0121] | Leu Gly Leu Cys Ile Leu Cys                                     |                           |
| [0122] | 20                                                              |                           |
| [0123] | <210>                                                           | 7                         |
| [0124] | <211>                                                           | 21                        |
| [0125] | <212>                                                           | PRT                       |

|        |                                                                 |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
|--------|-----------------------------------------------------------------|----------------------------|--|--|----|----|--|--|----|----|--|--|--|--|--|
| [0126] | <213>                                                           | 人工序列 (Artificial Sequence) |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0127] | <400>                                                           | 7                          |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0128] | Met Ala Pro Cys Met Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Pro |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0129] | 1                                                               | 5                          |  |  |    | 10 |  |  |    | 15 |  |  |  |  |  |
| [0130] | Thr Gln Thr Arg Ala                                             |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0131] | 20                                                              |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0132] | <210>                                                           | 8                          |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0133] | <211>                                                           | 23                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0134] | <212>                                                           | PRT                        |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0135] | <213>                                                           | 人工序列 (Artificial Sequence) |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0136] | <400>                                                           | 8                          |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0137] | Val Ile Ile Ala Val Leu Val Val Leu Gly Ala Ala Ile Val Thr Gly |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0138] | 1                                                               | 5                          |  |  |    | 10 |  |  |    | 15 |  |  |  |  |  |
| [0139] | Ala Val Val Ala Phe Val Met                                     |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0140] | 20                                                              |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0141] | <210>                                                           | 9                          |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0142] | <211>                                                           | 31                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0143] | <212>                                                           | PRT                        |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0144] | <213>                                                           | 人工序列 (Artificial Sequence) |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0145] | <400>                                                           | 9                          |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0146] | Met Gly Leu Pro Gly Val Ile Pro Ala Leu Val Leu Arg Gly Gln Leu |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0147] | 1                                                               | 5                          |  |  |    | 10 |  |  |    | 15 |  |  |  |  |  |
| [0148] | Leu Leu Ser Val Leu Trp Leu Leu Gly Pro Gln Thr Ser Arg Gly     |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0149] | 20                                                              |                            |  |  | 25 |    |  |  | 30 |    |  |  |  |  |  |
| [0150] | <210>                                                           | 10                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0151] | <211>                                                           | 21                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0152] | <212>                                                           | PRT                        |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0153] | <213>                                                           | 人工序列 (Artificial Sequence) |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0154] | <400>                                                           | 10                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0155] | Val Val Ile Ser Ala Ile Leu Ala Leu Val Val Leu Thr Val Ile Ser |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0156] | 1                                                               | 5                          |  |  |    | 10 |  |  |    | 15 |  |  |  |  |  |
| [0157] | Leu Ile Ile Leu Ile                                             |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0158] | 20                                                              |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0159] | <210>                                                           | 11                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0160] | <211>                                                           | 18                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0161] | <212>                                                           | PRT                        |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0162] | <213>                                                           | 人工序列 (Artificial Sequence) |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0163] | <400>                                                           | 11                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0164] | Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0165] | 1                                                               | 5                          |  |  |    | 10 |  |  |    | 15 |  |  |  |  |  |
| [0166] | ArgAla                                                          |                            |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |
| [0167] | <210>                                                           | 12                         |  |  |    |    |  |  |    |    |  |  |  |  |  |

|        |       |                                                                   |       |
|--------|-------|-------------------------------------------------------------------|-------|
| [0168] | <211> | 21                                                                |       |
| [0169] | <212> | PRT                                                               |       |
| [0170] | <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                         |       |
| [0171] | <400> | 12                                                                |       |
| [0172] |       | Trp Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr   |       |
| [0173] | 1     | 5                                                                 | 10 15 |
| [0174] |       | Val Leu Leu Phe Leu                                               |       |
| [0175] |       | 20                                                                |       |
| [0176] | <210> | 13                                                                |       |
| [0177] | <211> | 654                                                               |       |
| [0178] | <212> | DNA                                                               |       |
| [0179] | <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                         |       |
| [0180] | <400> | 13                                                                |       |
| [0181] |       | atgtgcagag ccatcagcct gagaagactg ctctgctcc tgctgcagct gagccaactg  | 60    |
| [0182] |       | ctggccgtga cccaaggcgt cgacgactac aaggacgatg acgacaagaa cttcggcaga | 120   |
| [0183] |       | ctgcactgca ccaccgccgt gatcagaaac atcaacgacc aagtgtgtt cgtggacaag  | 180   |
| [0184] |       | agacagcctg tgttcgagga catgaccgac atcgatcaga gcgcctccga gcctcagaca | 240   |
| [0185] |       | agactgatca tctacatgta caaggacagc gaggtgagag gcctggccgt gaccctgagc | 300   |
| [0186] |       | gtgaaggaca gcaagatgag caccctgagc tgcaagaaca agatcatcag cttcgaggag | 360   |
| [0187] |       | atggaccctc ctgagaacat cgacgacatt cagagcgacc tgatcttctt tcagaagaga | 420   |
| [0188] |       | gtgcctggcc acaacaagat ggagttcgag agcagcctgt acgagggcca cttcctggcc | 480   |
| [0189] |       | tgtcagaagg aggacgacgc cttcaagctg atcctgaaga aaaaggacga gaacggcgac | 540   |
| [0190] |       | aagagcgtga tgttcaccct gaccaacctg catcagagcc tcgaggtgtt cctggcctgc | 600   |
| [0191] |       | gtgctgggcg gcagcttcgg ctttctgggc ttcttgggccc tgtgcatcct gtgc      | 654   |
| [0192] | <210> | 14                                                                |       |
| [0193] | <211> | 555                                                               |       |
| [0194] | <212> | DNA                                                               |       |
| [0195] | <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                         |       |
| [0196] | <400> | 14                                                                |       |
| [0197] |       | atgtgcagag ccatcagcct gagaagactg ctctgctcc tgctgcagct gagccaactg  | 60    |
| [0198] |       | ctggccgtga cccaaggcgt cgacgactac aaggacgatg acgacaaggc ccctacaaga | 120   |
| [0199] |       | agccctatca ccgtgacaag accttggaag cacgtggagg ccatcaagga ggccctgaac | 180   |
| [0200] |       | ctgctggacg acatgcctgt gaccctgaac gaagaggtgg aggtggtgag caacgagttc | 240   |
| [0201] |       | agcttcaaga agctgacctg cgtgcagaca agactgaaga tcttcgagca aggctgaga  | 300   |
| [0202] |       | ggcaacttca ccaagctgaa gggcgccctg aacatgaccg cctcctacta tcagacctac | 360   |
| [0203] |       | tgccctccta cccctgagac cgactgcgag acccaagtga ccacctacgc cgacttcac  | 420   |
| [0204] |       | gacagcctga agaccttct gaccgacatc ctttctgagt gcaagaagcc tggacagaag  | 480   |
| [0205] |       | ctcgaggtgt tectggcctg cgtgctgggc ggcagcttcg gctttctggg cttcctgggc | 540   |
| [0206] |       | ctgtgcatcc tgtgc                                                  | 555   |
| [0207] | <210> | 15                                                                |       |
| [0208] | <211> | 540                                                               |       |
| [0209] | <212> | DNA                                                               |       |



|        |                                                                    |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------|-----|
| [0210] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                    |     |
| [0211] | <400> 15                                                           |     |
| [0212] | atggccctt gcatgctgt cctgctcctg gccgctgccc tggccctac acagacaaga     | 60  |
| [0213] | gccgtcgacg actacaagga cgatgacgac aaggccccta caagaagccc tatcaccgtg  | 120 |
| [0214] | acaagacctt ggaagcacgt ggaggccatc aaggaggccc tgaacctgct ggacgacatg  | 180 |
| [0215] | cctgtgaccc tgaacgaaga ggtggaggtg gtgagcaacg agttcagctt caagaagctg  | 240 |
| [0216] | acctgcgtgc agacaagact gaagatcttc gagcaaggcc tgagaggcaa cttaccaag   | 300 |
| [0217] | ctgaaggcg ccctgaacat gaccgcctcc tactatcaga cctactgccc tctaccct     | 360 |
| [0218] | gagaccgact gcgagacca agtgaccacc tacgccgact tcatcgacag cctgaagacc   | 420 |
| [0219] | ttcctgaccg acatcccttt cgagtgcgaag aagcctggac agaagctcga ggtgatc    | 480 |
| [0220] | gccgtgctgg tgggtctggg cgccgccatc gtgaccggcg ccgtggtggc cttcgtgatg  | 540 |
| [0221] | <210> 16                                                           |     |
| [0222] | <211> 663                                                          |     |
| [0223] | <212> DNA                                                          |     |
| [0224] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                    |     |
| [0225] | <400> 16                                                           |     |
| [0226] | atgggcctgc ctggcgtgat ccctgccctg gtgctgagag gacagctgct cctgagcgtg  | 60  |
| [0227] | ctgtggctgc tgggccctca gacaagcaga gccgtcgacg actacaagga cgatgacgac  | 120 |
| [0228] | aagaacttcg gcagactgca ctgcaccacc gccgtgatca gaaacatcaa cgaccaagt   | 180 |
| [0229] | ctgttcgtgg acaagagaca gcctgtgttc gaggacatga ccgacatcga tcagagcgcc  | 240 |
| [0230] | tccgagctc agacaagact gatcatctac atgtacaagg acagcgaggt gagaggcctg   | 300 |
| [0231] | gccgtgaccc tgagcgtgaa ggacagcaag atgagcacc tgagctgcaa gaacaagatc   | 360 |
| [0232] | atcagcttcg aggagatgga ccctcctgag aacatcgacg acattcagag cgacctgatc  | 420 |
| [0233] | ttctttcaga agagagtgcc tggccacaac aagatggagt tcgagagcag cctgtacgag  | 480 |
| [0234] | ggccacttcc tggcctgtca gaaggaggac gacgccttca agctgatcct gaagaaaaag  | 540 |
| [0235] | gacgagaacg gcgacaagag cgtgatgttc accctgacca acctgcatca gacgctcgag  | 600 |
| [0236] | gtggtgatca gcgccatcct ggccctggtg gtgctgaccg tgatcagcct gatcatcctg  | 660 |
| [0237] | atc                                                                | 663 |
| [0238] | <210> 17                                                           |     |
| [0239] | <211> 564                                                          |     |
| [0240] | <212> DNA                                                          |     |
| [0241] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                    |     |
| [0242] | <400> 17                                                           |     |
| [0243] | atgggcctgc ctggcgtgat ccctgccctg gtgctgagag gacagctgct cctgagcgtg  | 60  |
| [0244] | ctgtggctgc tgggccctca gacaagcaga gccgtcgacg actacaagga cgatgacgac  | 120 |
| [0245] | aaggccccta caagaagccc tatcaccgtg acaagacctt ggaagcacgt ggaggccatc  | 180 |
| [0246] | aaggaggccc tgaacctgct ggacgacatg cctgtgaccc tgaacgaaga ggtggaggtg  | 240 |
| [0247] | gtgagcaacg agttcagctt caagaagctg acctgcgtgc agacaagact gaagatcttc  | 300 |
| [0248] | gagcaaggcc tgagaggcaa cttaccaag ctgaaggcg ccctgaacat gaccgcctcc    | 360 |
| [0249] | tactatcaga cctactgccc tctaccct gagaccgact gcgagacca agtgaccacc     | 420 |
| [0250] | tacgccgact tcatcgacag cctgaagacc ttcctgaccg acatcccttt cgagtgcgaag | 480 |
| [0251] | aagcctggac agaagctcga ggtggtgatc agcgcctcc tggccctggt ggtgctgacc   | 540 |

|        |                                                                   |     |
|--------|-------------------------------------------------------------------|-----|
| [0252] | gtgatcagcc tgatcatcct gatc                                        | 564 |
| [0253] | <210> 18                                                          |     |
| [0254] | <211> 624                                                         |     |
| [0255] | <212> DNA                                                         |     |
| [0256] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |     |
| [0257] | <400> 18                                                          |     |
| [0258] | atgagaatct tcgccggcat catcttcacc gcctgctgcc acctgctgag agccgtcgac | 60  |
| [0259] | gactacaagg acgatgacga caagaacttc ggcagactgc actgcaccac cgccgtgatc | 120 |
| [0260] | agaaacatca acgaccaagt gctgttcgtg gacaagagac agcctgtgtt cgaggacatg | 180 |
| [0261] | accgacatcg atcagagcgc ctccgagcct cagacaagac tgatcatcta catgtacaag | 240 |
| [0262] | gacagcgagg tgagaggcct ggccgtgacc ctgagcgtga aggacagcaa gatgagcacc | 300 |
| [0263] | ctgagctgca agaacaagat catcagcttc gaggagatgg accctcctga gaacatcgac | 360 |
| [0264] | gacattcaga gcgacctgat cttctttcag aagagagtgc ctggccacaa caagatggag | 420 |
| [0265] | ttcgagagca gcctgtacga gggccacttc ctggcctgtc agaaggagga cgacgccttc | 480 |
| [0266] | aagctgatcc tgaagaaaaa ggacgagaac ggcgacaaga gcgtgatgtt caccctgacc | 540 |
| [0267] | aacctgcac agagcctcga gtgggtgctg ctgggcagca tcctcctgtt cctgatcgtg  | 600 |
| [0268] | gtgagcaccg tgctgctgtt tctg                                        | 624 |
| [0269] | <210> 19                                                          |     |
| [0270] | <211> 525                                                         |     |
| [0271] | <212> DNA                                                         |     |
| [0272] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |     |
| [0273] | <400> 19                                                          |     |
| [0274] | atgagaatct tcgccggcat catcttcacc gcctgctgcc acctgctgag agccgtcgac | 60  |
| [0275] | gactacaagg acgatgacga caaggcccct acaagaagcc ctatcacctg gacaagacct | 120 |
| [0276] | tggaagcacg tggaggccat caaggaggcc ctgaacctgc tggacgacat gcctgtgacc | 180 |
| [0277] | ctgaacgaag aggtggaggt ggtgagcaac gagttcagct tcaagaagct gacctgcgtg | 240 |
| [0278] | cagacaagac tgaagatctt cgagcaaggc ctgagaggca acttcaccaa gctgaagggc | 300 |
| [0279] | gccctgaaca tgaccgcctc ctactatcag acctactgcc ctcctacccc tgagaccgac | 360 |
| [0280] | tgcgagaccc aagtgaccac ctacgccgac ttcatcgaca gcctgaagac ctctctgacc | 420 |
| [0281] | gacatccctt tcgagtgcaa gaagcctgga cagaagctcg agtgggtgct gctgggcagc | 480 |
| [0282] | atcctcctgt tcctgatcgt ggtgagcacc gtgctgctgt ttctg                 | 525 |
| [0283] | <210> 20                                                          |     |
| [0284] | <211> 78                                                          |     |
| [0285] | <212> DNA                                                         |     |
| [0286] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |     |
| [0287] | <400> 20                                                          |     |
| [0288] | atgtgcagag ccatcagcct gagaagactg ctctgctcc tgctgcagct gagccaactg  | 60  |
| [0289] | ctggccgtga cccaaggc                                               | 78  |
| [0290] | <210> 21                                                          |     |
| [0291] | <211> 69                                                          |     |
| [0292] | <212> DNA                                                         |     |
| [0293] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |     |

|        |                                                                   |    |
|--------|-------------------------------------------------------------------|----|
| [0294] | <400> 21                                                          |    |
| [0295] | gtgttccttg cctgcgtgct gggcggcagc ttcggctttc tgggcttcct gggcctgtgc | 60 |
| [0296] | atcctgtgc                                                         | 69 |
| [0297] | <210> 22                                                          |    |
| [0298] | <211> 63                                                          |    |
| [0299] | <212> DNA                                                         |    |
| [0300] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |    |
| [0301] | <400> 22                                                          |    |
| [0302] | atggccctt gcattgctgct cctgctcctg gccgctgccc tggccctac acagacaaga  | 60 |
| [0303] | gcc                                                               | 63 |
| [0304] | <210> 23                                                          |    |
| [0305] | <211> 69                                                          |    |
| [0306] | <212> DNA                                                         |    |
| [0307] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |    |
| [0308] | <400> 23                                                          |    |
| [0309] | gtgatcatcg ccgtgctggt ggtgctgggc gccgccatcg tgaccggcgc cgtggtggcc | 60 |
| [0310] | ttcgtgatg                                                         | 69 |
| [0311] | <210> 24                                                          |    |
| [0312] | <211> 93                                                          |    |
| [0313] | <212> DNA                                                         |    |
| [0314] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |    |
| [0315] | <400> 24                                                          |    |
| [0316] | atgggcctgc ctggcgtgat ccctgccctg gtgctgagag gacagctgct cctgagcgtg | 60 |
| [0317] | ctgtggctgc tgggccctca gacaagcaga ggc                              | 93 |
| [0318] | <210> 25                                                          |    |
| [0319] | <211> 63                                                          |    |
| [0320] | <212> DNA                                                         |    |
| [0321] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |    |
| [0322] | <400> 25                                                          |    |
| [0323] | gtggtgatca gcgccatcct gccctgggtg gtgctgaccg tgatcagcct gatcatcctg | 60 |
| [0324] | atc                                                               | 63 |
| [0325] | <210> 26                                                          |    |
| [0326] | <211> 54                                                          |    |
| [0327] | <212> DNA                                                         |    |
| [0328] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |    |
| [0329] | <400> 26                                                          |    |
| [0330] | atgagaatct tcgccggcat catcttcacc gcctgctgcc acctgctgag agcc       | 54 |
| [0331] | <210> 27                                                          |    |
| [0332] | <211> 63                                                          |    |
| [0333] | <212> DNA                                                         |    |
| [0334] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                   |    |
| [0335] | <400> 27                                                          |    |

|        |                                                                    |     |
|--------|--------------------------------------------------------------------|-----|
| [0336] | tgggtgctgc tgggcagcat cctcctgttc ctgatcgtgg tgagcaccgt gctgctgttt  | 60  |
| [0337] | ctg                                                                | 63  |
| [0338] | <210> 28                                                           |     |
| [0339] | <211> 24                                                           |     |
| [0340] | <212> DNA                                                          |     |
| [0341] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                    |     |
| [0342] | <400> 28                                                           |     |
| [0343] | gactacaagg acgatgacga caag                                         | 24  |
| [0344] | <210> 29                                                           |     |
| [0345] | <211> 471                                                          |     |
| [0346] | <212> DNA                                                          |     |
| [0347] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                    |     |
| [0348] | <400> 29                                                           |     |
| [0349] | aacttcggca gactgcactg caccaccgcc gtgatcagaa acatcaacga ccaagtgtctg | 60  |
| [0350] | ttcgtggaca agagacagcc tgtgttcgag gacatgaccg acatcgatca gagcgccctcc | 120 |
| [0351] | gagcctcaga caagactgat catctacatg tacaaggaca gcgaggtgag aggccctggcc | 180 |
| [0352] | gtgaccctga gcgtgaagga cagcaagatg agcaccctga gctgcaagaa caagatcatc  | 240 |
| [0353] | agcttcgagg agatggaccc tcctgagaac atcgacgaca ttcagagcga cctgatcttc  | 300 |
| [0354] | tttcagaaga gagtgccttg ccacaacaag atggagtctg agagcagcct gtacgagggc  | 360 |
| [0355] | cacttcctgg cctgtcagaa ggaggacgac gccttcaagc tgatcctgaa gaaaaaggac  | 420 |
| [0356] | gagaacggcg acaagagcgt gatgttcacc ctgaccaacc tgcacagag c            | 471 |
| [0357] | <210> 30                                                           |     |
| [0358] | <211> 372                                                          |     |
| [0359] | <212> DNA                                                          |     |
| [0360] | <213> 人工序列(Artificial Sequence)                                    |     |
| [0361] | <400> 30                                                           |     |
| [0362] | gccctacaa gaagccctat caccgtgaca agaccttga agcacgtgga ggccatcaag    | 60  |
| [0363] | gaggccctga acctgtgga cgacatgcct gtgaccctga acgaagaggt ggaggtggtg   | 120 |
| [0364] | agcaacgagt tcagcttcaa gaagctgacc tgcgtgcaga caagactgaa gatcttcgag  | 180 |
| [0365] | caaggcctga gaggcaactt caccaagctg aaggcgccc tgaacatgac cgcctcctac   | 240 |
| [0366] | tatcagacct actgccctcc taccctgag accgactgcg agacccaagt gaccacctac   | 300 |
| [0367] | gccgacttca tcgacagcct gaagaccttc ctgaccgaca tccctttcga gtgcaagaag  | 360 |
| [0368] | cctggacaga ag                                                      | 372 |

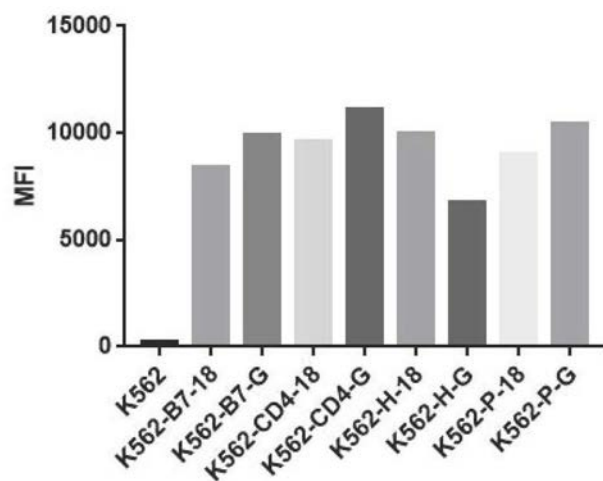


图1

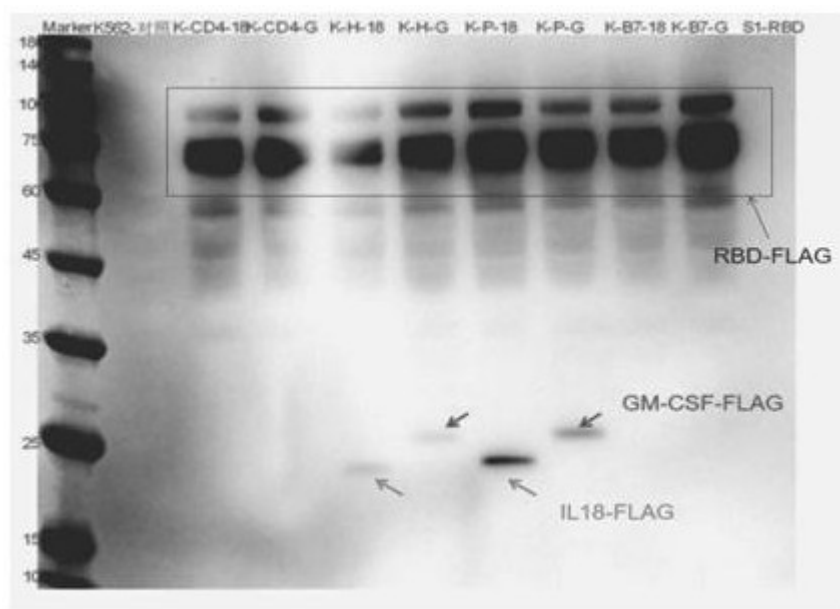


图2

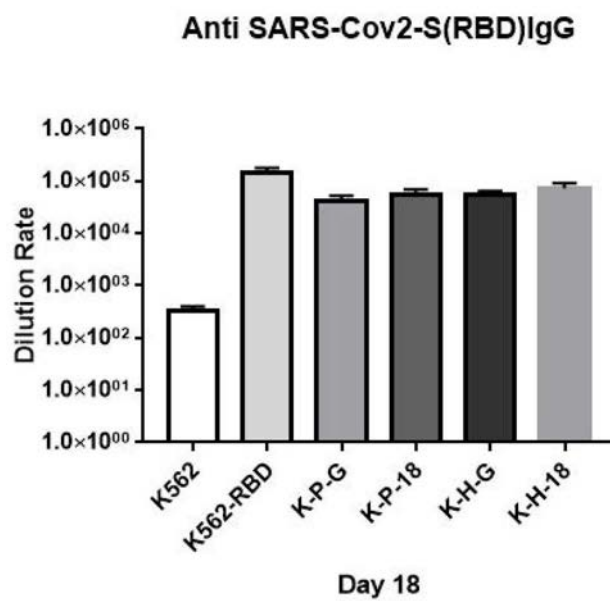


图3

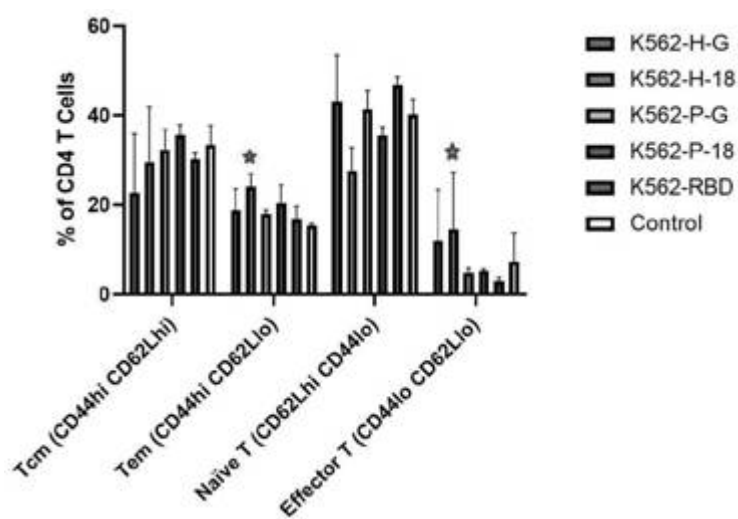


图4

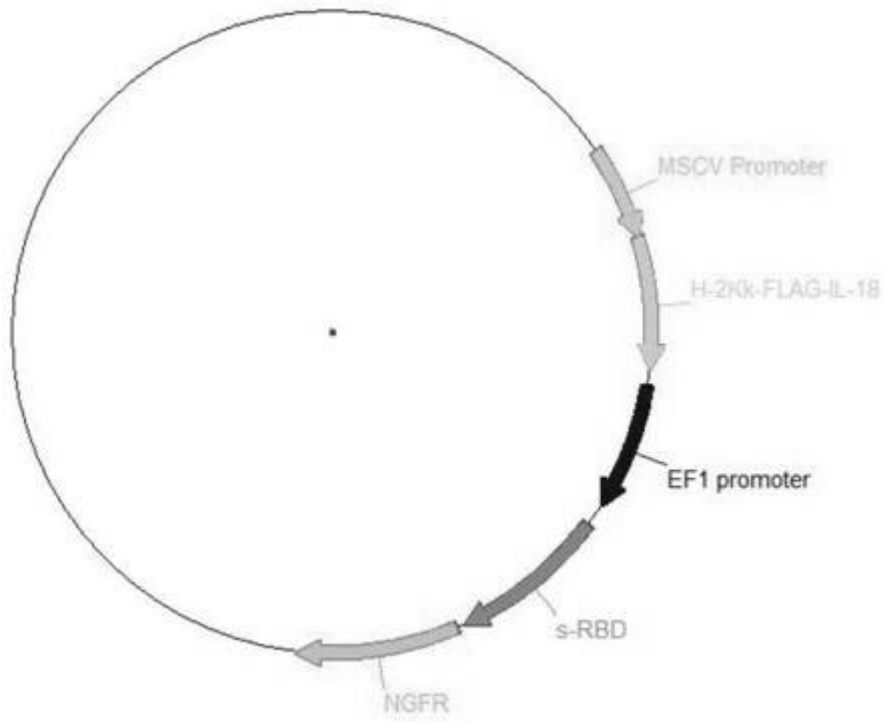


图5