



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113717279 A

(43) 申请公布日 2021.11.30

(21) 申请号 202110858661.8

(22) 申请日 2021.07.28

(71) 申请人 武汉爱博泰克生物科技有限公司
地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开发区高新二路388号武汉光谷国际生物医药企业加速器1.1期7栋4层01室(自贸区武汉片区)

(72) 发明人 陈亮 张云 程瑶 李博 吴知才

(74) 专利代理机构 武汉蓝宝石专利代理事务所(特殊普通合伙) 42242

代理人 朱才永

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

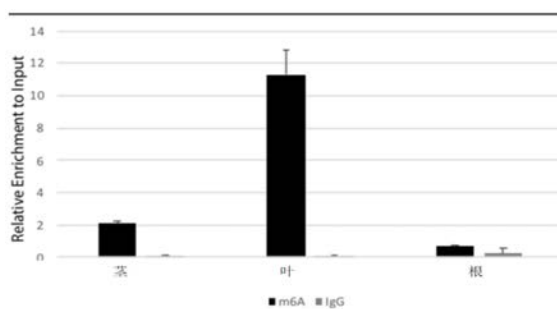
权利要求书1页 说明书5页
序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法

(57) 摘要

本发明提供了m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法,其重链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.1所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.2所示,重链CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.3所示;其轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.4所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.5所示,CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.6所示。本发明提供的m⁶A重组兔单克隆抗体对m⁶A修饰的RNA有很好的富集能力,且在DNA损伤修复活体细胞模型中,检测m⁶A修饰的RNA有很好的灵敏度。



1. m⁶A重组兔单克隆抗体,其特征在于,其重链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.1所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.2所示,重链CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.3所示;其轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.4所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.5所示,CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.6所示。
2. 根据权利要求1所述的m⁶A重组兔单克隆抗体,其特征在于,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ.NO.7所示,其轻链可变区的氨基酸序列如SEQ.NO.8所示。
3. 根据权利要求1所述的m⁶A重组兔单克隆抗体,其特征在于,所述兔单克隆抗体的重链恒定区亚型为IgG型,所述轻链恒定区的亚型为κ型。
4. 编码权利要求1~3任一项所述的m⁶A重组兔单克隆抗体的核苷酸。
5. 根据权利要求4所述的核苷酸,其特征在于,编码重链可变区的核苷酸其序列如SEQ.NO.9所示或是与之互补的序列,编码轻链可变区的核苷酸其序列如SEQ.NO.10所示或是与之互补的序列。
6. 一种表达载体,其特征在于,包括编码权利要求1~3任一项所述的m⁶A重组单克隆抗体的核苷酸。
7. 转化或转染权利要求6所述的表达载体的宿主细胞。
8. 权利要求1~3任一项所述的m⁶A重组兔单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括:制备权利要求6所述的表达载体、培养权利要求7所述的宿主细胞及m⁶A重组兔单克隆抗体的表达。
9. 根据权利要求8所述的m⁶A重组兔单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述表达载体的制备方法包括:将m⁶A分子与载体蛋白进行偶联,制备免疫原蛋白;然后将所述免疫原蛋白注入兔的体内中进行免疫,获得免疫增强的兔的B细胞,经过培养筛选后,从阳性克隆B细胞中提取所述m⁶A重组兔单克隆抗体的RNA,再依次经过反转录及扩增,得到编码重链氨基酸的核苷酸与编码轻链氨基酸的核苷酸,将编码重链的核苷酸与编码轻链的核苷酸连接至载体质粒中后,得到所述表达载体。
10. 权利要求1所述的m⁶A重组兔单克隆抗体在制备检测RNA m⁶A甲基化修饰的产品中的应用或在制备检测DNA紫外线损伤的产品中的应用。

m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,具体涉及m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法。

背景技术

[0002] N6-甲基腺嘌呤(m⁶A)是目前发现的真核生物mRNA上含量最多的化学修饰,同时也广泛存在于多种细菌和RNA病毒中。在动物或植物体内,m⁶A可以被一系列甲基转移酶、去甲基酶和结合蛋白进行修饰、去修饰和识别。m⁶A可以通过影响RNA加工代谢从而调控多种生物学功能。相关研究还发现,RNA m⁶A修饰在UV诱导的DNA损伤反应中的重要作用,RNA的m⁶A修饰主要是指导细胞快速准确的将Pol κ 募集到损伤位点并且加速DNA的损伤修复从而促使细胞存活。因此,有关RNA的m⁶A修饰对于相关疾病机理研究、筛查以及药物研发等领域具有重要的参考因素。

[0003] 目前的检测RNA的m⁶A修饰所采用的方法为m⁶A高通量检测技术与基于抗体特异性检测的技术。两者的共同点在于,为避免细胞中大量rRNA与tRNA的干扰,必须将m⁶A修饰的RNA富集出来。而采取特异性抗体富集便是常用的方法,但是,目前所用的m⁶A抗体依旧存在灵敏度不强的缺陷,难以进行IF实验;同时,在大量干扰RNA的存在下将m⁶A修饰的RNA进行富集非常困难。

发明内容

[0004] 为解决上述技术问题,本发明提供了m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法。

[0005] 具体技术方案如下:

[0006] m⁶A重组兔单克隆抗体,其不同之处在于,

[0007] 其重链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.1所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.2所示,重链CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.3所示;

[0008] 其轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.4所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.5所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.6所示。

[0009] 进一步,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ.NO.7所示,其轻链可变区的氨基酸序列如SEQ.NO.8所示。

[0010] 进一步,重链氨基酸序列如SEQ.NO.17所示,轻链氨基酸序列如SEQ.NO.18所示。

[0011] 进一步,所述兔单克隆抗体的重链恒定区亚型为IgG型,所述轻链恒定区的亚型为 κ 型。

[0012] 编码上述m⁶A重组兔单克隆抗体的核苷酸。

[0013] 进一步,编码重链可变区的核苷酸其序列如SEQ.NO.9所示或是与之互补的序列,编码轻链可变区的核苷酸其序列如SEQ.NO.10所示或是与之互补的序列。

[0014] 进一步,编码重链的核苷酸其序列如SEQ.NO.11所示或是与之互补的序列,编码轻链的核苷酸其序列如SEQ.NO.12所示或是与之互补的序列。

[0015] 一种表达载体,其不同不处在于,包括编码权利上述m⁶A重组单克隆抗体的核苷

酸。

[0016] 转化或转染上述表达载体的宿主细胞。

[0017] 上述 m^6A 重组兔单克隆抗体的制备方法,其不同之处在于,包括:制备上述表达载体、培养上述宿主细胞及 m^6A 兔单克隆抗体的重组表达。

[0018] 上述 m^6A 重组兔单克隆抗体的制备方法,其不同之处在于,所述表达载体的制备方法包括:将 m^6A 分子与载体蛋白进行偶联,制备免疫原蛋白;然后将所述免疫原蛋白注入兔的体内中进行免疫,获得免疫增强的兔的B细胞,经过培养筛选后,从阳性克隆B细胞中提取所述 m^6A 重组兔单克隆抗体的RNA,再依次经过反转录及扩增,得到编码重链氨基酸的核苷酸与编码轻链氨基酸的核苷酸,将编码重链的核苷酸与编码轻链的核苷酸连接至载体质粒中后,得到所述表达载体。

[0019] 进一步,扩增编码重链的核苷酸的引物对如SEQ.NO.13~SEQ.NO.14所示,扩增编码轻链的核苷酸的引物对为如SEQ.NO.15~SEQ.NO.16所示。

[0020] 在制备检测RNA m^6A 甲基化修饰的产品中的应用或在制备检测DNA紫外线损伤的产品中的应用。

[0021] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0022] (1) 本发明提供的 m^6A 重组兔单克隆抗体对 m^6A 修饰的RNA有很好的富集能力,且对于检测DNA紫外损伤有很好的灵敏度。

[0023] (2) 本发明提供的 m^6A 重组兔单克隆抗体的制备方法,先制备出表达载体,在进行转染或转化获得宿主细胞,最后再经过重组表达得到抗体,相较于传统的先获得杂交瘤细胞,再进行腹水制备得到抗体,本方法采用重组表达载体制备抗体,优势在于不需要牺牲大量的动物,重组抗体表达载体保存稳定性更高,且很容易放大生产,制备出大量抗体。

[0024] (3) 采用兔作为免疫动物,由于兔的脾脏大,基因多样性高,在小分子的抗原呈递上有独特优势,为后续进行阳性克隆筛选时,更容易筛选出更优的阳性克隆;采用单个B细胞培养后再筛选,提高了筛选效率,且成本更低,操作更加简便。

附图说明

[0025] 图1为实施例2的ELASA检测结果;

[0026] 图2为实施例2的DB实验结果;

[0027] 图3为实施例4抗体富集实验的q-PCR检测结果;

[0028] 图4为实施例5抗体对紫外损伤DNA细胞样本中的IF检测结果;

[0029] 图5为对比例1抗体对紫外损伤DNA细胞样本中的IF检测结果。

具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明,以使本领域的技术人员更加清楚地理解本发明。

[0031] 以下各实施例,仅用于说明本发明,但不止用来限制本发明的范围。基于本发明中的具体实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的情况下,所获得的其他所有实施例,都属于本发明的保护范围。

[0032] 在本发明实施例中,若无特殊说明,所有原料组分均为本领域技术人员熟知的市

售产品;在本发明实施例中,若未具体指明,所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0033] 实施例1

[0034] 本发明提供一种由 m^6A 半抗原合成抗原的方法,具体操作步骤如下:

[0035] 1、称量 m^6A 小分子40mg,加入一个50ml的试管中,然后逐滴加入0.1M $NaIO_4$ 溶液,直至5ml,边加边摇,室温反应30分钟。再加1ml乙二醇中和过量的 $NaIO_4$,室温反应5min。

[0036] 2、取浓度6.15mg/ml的KLH载体蛋白(Merck,货号:374805)10ml,加入一支新的50ml试管中,用2M的 K_2CO_3 溶液调pH值至pH 9.0~9.5之间。

[0037] 3、然后将步骤2中的载体蛋白缓慢加入步骤1的溶液中,反应45min。期间用5%的 K_2CO_3 溶液调pH值,使pH维持在9~9.5之间。

[0038] 4、称量37.5mg $NaBH_4$ 溶于2.5ml水中,逐滴加入步骤3中的反应液中,边加边摇,然后室温反应18小时。

[0039] 5、将10% (v/v) 的甲酸溶液逐滴加入步骤4的反应液中,边加边摇,调pH值至6.0-6.5,室温反应1小时。

[0040] 6、用 NH_4OH 或 $NaOH$ 溶液将步骤5产物调pH值至8.5,然后在4℃透析用0.05M的Tris-HCl (pH8.0) 透析36h,即获取所需完全抗原。

[0041] 实施例2

[0042] 本实施例提供利用实施例1合成的抗原免疫动物及阳性克隆筛选的方法,具体步骤如下:

[0043] 1、对兔子背部和腹部多点注射(首免每只兔子750ug抗原,之后每只兔子350ug抗原),每隔2周进行重复免疫,重复3次,本实施例所用兔子为新西兰大白兔,首次免疫用完全佐剂(Sigma,货号:F5881),之后的免疫用不完全佐剂(北京博奥龙,货号:KX0210047Q-10)。

[0044] 2、免疫结束后1周,取兔血清进行ELISA进行多抗检测,合成如下引物:

[0045] M6A-1: m^6A -CUGGUAACGAAUGGCUG-Biotin

[0046] M6A-2:A-CUGGUAACGAAUGGCUG-Biotin

[0047] M6A-3:AAAAAAAAAAAAA-Biotin

[0048] M6A-1引物是正对照,含有 m^6A 修饰的RNA,另外两条是负对照。用链霉亲和素铺板,然后孵育这三条引物,进行ELISA验证实验,选取四只特异性强的兔子抗血清,分别标记为AB1、AB2、AB3及AB4,ELISA结果如图1所示,可见4只兔子均能特异性识别 m^6A 修饰的引物。

[0049] 用200ug免疫原就皮下多点注射,加强免疫一次,然后提取四只兔子的血清抗体,抗血清编号为105(与AB1对应)、106(与AB2对应)、107(与AB3对应)、108(与AB4对应)与市售 m^6A 抗体进行DB实验,结果如图2所示,结果显示,本实施例的多抗效价明显优于市售 m^6A (购于SYSY公司)抗体。特别是编号107血清对应的兔子,效价最高,后续用该兔子进行单抗制备。

[0050] 3、三天后取脾脏牺牲兔子,分离脾脏中的淋巴细胞,用FITC标记的 m^6A 对B淋巴细胞进行荧光标记,用流式细胞仪富集这类细胞,然后将细胞分选到96孔板中,一孔一个细胞。

[0051] 4、对细胞进行培养,10~14天后取细胞上清进行ELISA验证。筛选出抗体效价高,特异性好的孔作为阳性孔。

[0052] 实施例3

[0053] 本实施例提供将实施例2筛选的B细胞进行抗体表达及纯化的方法,具体操作步骤如下:

[0054] 1、阳性克隆的细胞收集裂解后,采用常规方法提取RNA并反转录成cDNA。采用PCR方法,重链扩增引物如SEQ.NO.13~SEQ.NO.14所示。

[0055] 轻链扩增引物如SEQ.NO.15~SEQ.NO.16所示。

[0056] SEQ.NO.15中,Y是C或者T;SEQ.NO.16,R为G或者A)。PCR反应体系为:95°C2min,然后按下列条件进行25个循环反应,95°C1min,56°C1min,72°C0.5min;最后95°C10min。

[0057] 天然配对的兔单克隆抗体重轻链基因(VH和VL)从对应阳性克隆的cDNA中被扩增出来,并经测序确定序列,重链可变区的基因序列如SEQ.NO.9所示,对应的氨基酸序列如SEQ.NO.7所示;轻链可变区的基因序列如SEQ.NO.10所示,对应的氨基酸序列如SEQ.NO.8所示;编码重链的基因序列如SEQ.NO.11所示,对应的氨基酸序列如SEQ.NO.17所示;编码轻链的基因序列如SEQ.NO.12所示,对应的氨基酸序列如SEQ.NO.18所示。

[0058] 2、将抗体重链和轻链的基因分别用同源重组的方式连接至到pcDNA3.1载体(购自invitrogen)中,无内毒素质粒提取后共转染CHO(武汉大学细胞典藏中心)细胞,转染72-96小时后,离心除去细胞,收集细胞上清。

[0059] 3、用Protein A亲和凝胶树脂对细胞表达的上清进行纯化,即为所得抗体。

[0060] 实施例4

[0061] 将实施例3制备的抗体进行植物^m6A修饰的RNA的富集能力检测,其操作步骤如下:

[0062] (1)取相同重量的拟南芥根、茎、叶,用剪刀剪碎后,加液氮速冻后碾磨均匀后,用常规Trizol法提取RNA,然后用化学法将RNA片段化,片段大小约100nt。

[0063] (2)将步骤(1)中片段化的RNA与实施例3制备的抗体进行孵育,富集^m6A修饰的RNA,IgG抗体富集后的RNA作为对照。富集后的^m6A修饰的RNA进行富集效果评估实验,检测结果如图3所示,结果显示,相较于IgG抗体,本发明制备的单克隆抗体对于^m6A修饰的RNA有更优的富集能力。

[0064] 实施例5

[0065] 本实施例提供实施例3制备的对紫外损伤DNA细胞样本的检测,其具体操作如下:

[0066] 细胞系:U2OS(武汉大学细胞典藏中心)

[0067] 1、状态好的U2OS细胞铺24孔板,加BrdU(终浓度10uM/L),培养24-48小时。

[0068] 2、吸出培养基,在超净台打开盖子,打开紫外线照射细胞30秒,再把原来的培养基加上,37°C下培养0、1、2、3、6、8、10、12分钟。

[0069] 3、吸取去掉培养基,固定细胞。后续步骤同常规IF(其中^m6A抗体浓度1mg/ml,抗体稀释倍数1:1500)实验操作一样,测试结果如图4所示,4a为培养0min的^m6A修饰的RNA的情况,4b为培养1min的^m6A修饰的RNA的情况,4c为培养2min的^m6A修饰的RNA的情况,4d为培养3min的^m6A修饰的RNA的情况,4e为培养6min的^m6A修饰的RNA的情况,4f为培养8min的^m6A修饰的RNA的情况,4g为培养10min的^m6A修饰的RNA的情况,4h为培养12min的^m6A修饰的RNA的情况,结果显示,紫外照射后,^m6A修饰的RNA含量增加,随着修复时间的延长,^m6A修饰的含量逐渐下降,而本发明的抗体很好的反应了^m6A修饰的RNA在DNA损伤修复过程中的调控作用。

[0070] 对比例1

[0071] 在实施例2中的步骤(4)中,除筛选出制备实施例3的阳性克隆细胞外,还筛选出了一组阳性克隆细胞。

[0072] 按实施例3的方法制备出另外一组单克隆抗体,制备方法中涉及的引物按常规方法进行设计。最终获得的抗体的重链CDR1序列、CDR2序列、CDR3序列,轻链CDR1序列、CDR2序列、CDR3序列如表1所示。

[0073] 表1对比例1抗体序列

		重链			轻链		
		CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
[0074]	抗体序列	GFSFS	IDAGS	AREVIA	QSVY	AAS	LGGYD
		SY Y	FGAT	GVINY L DL	SNNL		DAADYF A

[0075] 将上述抗体按实施例5操作,抗体浓度1mg/ml,进行1:1000稀释,进行紫外损伤DNA细胞样本的IF检测,检测结果如图5所示,5a为培养0min的m⁶A修饰的RNA的情况,5b为培养1min的m⁶A修饰的RNA的情况,5c为培养2min的m⁶A修饰的RNA的情况,5d为培养3min的m⁶A修饰的RNA的情况,5e为培养6min的m⁶A修饰的RNA的情况,5f为培养8min的m⁶A修饰的RNA的情况,5g为培养10min的m⁶A修饰的RNA的情况,5h为培养12min的m⁶A修饰的RNA的情况。可以看出,本发明单克隆抗体其抗体效价优于对比例1效价,均可以进行IF实验。

[0076] 在此有必要指出的是,以上实施例仅限于对本发明的技术方案做进一步的阐述和说明,并不是对本发明的技术方案的进一步的限制,本发明的方法仅为较佳的实施方案,并非用于限定本发明的保护范围。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

Gly Val Ser

1

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

Met Gly Gly Tyr Asp Cys Arg Tyr Ser Asp Cys Phe Val

1 5 10

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Thr Pro

1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu His Ser His Cys

20 25 30

Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly

35 40 45

Ile Ile Trp Ser Gly Thr Pro Ile Tyr Tyr Pro Ser Thr Tyr Tyr Ala

50 55 60

Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val

65 70 75 80

Asp Leu Glu Ile Pro Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe

85 90 95

Cys Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Asn Ser Asp Leu Asp Leu Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Tyr Glu Tyr

20 25 30

Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Val Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val
 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys Met Gly Gly Tyr Asp Cys
 85 90 95
 Arg Tyr Ser Asp Cys Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val
 100 105 110

Lys

<210> 9

<211> 360

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtctcgctg ggacaccct gacactcacc 60
 tgcacagcct ctggattctc cctccatagc cactgtatga actggttccg ccaggctcca 120
 gggaagggtt tggaatggat cggaatcatc tggagtggta cgcccatata ttatccgagc 180
 acatattacg cgaggtgggc gaaaggtcga ttcaccatct ccaaacctc gaccacggtg 240
 gatctggaaa tcccagtcg gacaaccgag gacacggcca cgtatttctg tgctaaatat 300
 cctggttgta atagtgactt ggatctctgg ggccagggca ccctggtcac cgtctcctcg 360

<210> 10

<211> 339

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

gcctatgata tgaccagac tccatcctcc gtgtctgccg ctgtgggagg cacagtcacc 60
 atcagttgtc agtccagtaa gactctttat gactacaatt ggttatcctg gtatcagcag 120
 aaaccagggc agcctcccaa gctctcctc tatggtgtat cactctggc atctggggtc 180
 ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcgacgtg 240
 cagtgtgacg atgcttccac ttattattgt atggcggtt atgattgtcg ttatagtgat 300
 tgttttgttt tcggcggagg gaccgaggtg gtggtcaaa 339

<210> 11

<211> 1329

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 11

cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtctcgctg ggacaccct gacactcacc 60

tgcacagcct ctggattctc cctccatagc cactgtatga actggttccg ccaggctcca 120
 gggaaaggct tggaatggat cggaatcatc tggagtggta cgcccatata ttatccgagc 180
 acatattacg cgaggtgggc gaaaggctga ttcacatct ccaaacctc gaccacggtg 240
 gatctggaaa tccccagtcc gacaaccgag gacacggcca cgtatttctg tgctaaatat 300
 cctggttgta atagtgactt ggatctctgg ggccagggca ccctggtcac cgtctcctcg 360
 gggcaacctc aggctccatc agtcttcca ctggccccct gctgcgggga cacaccagc 420
 tccacgggtga ccctgggctg cctgggtcaaa ggctacctc cggagccagt gaccgtgacc 480
 tggaaactcg gcaccctcac caatggggta cgcaccttc cgtccgtccg gcagtctca 540
 ggctctact cgctgagcag cgtgggtgagc gtgacctca gcagccagcc cgtcacctgc 600
 aacgtggccc acccagccac caacacaaa gtggacaaga ccgttgcgcc ctgcacatgc 660
 agcaagccca tgtgcccacc cctgaactc ccggggggac cgtctgtctt catcttcccc 720
 ccaaaacca aggacacct catgatctca cgcaccccc aggtcacatg cgtggtggtg 780
 gacgtgagcc aggatgacc cgaggtgcag ttcacatgt acataaaca cgagcaggtg 840
 cgcaccgccc ggccgcccgt acgggagcag cagttcaaca gcacgatccg cgtggtcagc 900
 accctcccca tcgcgacca ggactggctg aggggcaagg agttcaagt caaagtccac 960
 aacaaggcac tcccggcccc catcgagaaa accatctca aagccagagg gcagcccctg 1020
 gagccgaagg tctacacat gggccctccc cgggaggagc tgagcagcag gtcggtcagc 1080
 ctgacctgca tgatcaacgg cttctaccct tccgacatct cgggtggagt ggagaagaac 1140
 gggaaaggcag aggacaacta caagaccag ccgaccgtgc tggacagcga cggctcctac 1200
 ttctctaca gcaagctctc agtgcccagc agtgagtggc agcggggcga cgtcttcacc 1260
 tgctccgtga tgcacgaggc cttgcacaac cactacacgc agaagtccat ctcccgtctt 1320
 ccgggtaaa 1329

<210> 12

<211> 651

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

gcctatgata tgaccagac tccatcctcc gtgtctgcc ctgtgggagg cacagtcacc 60
 atcagttgtc agtccagtaa gactctttat gactacaatt ggttatcctg gtatcagcag 120
 aaaccagggc agcctcccaa gctctcctc tatggtgtat cactctggc atctggggtc 180
 ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcacat cagcgacgtg 240
 cagtgtgacg atgcttccac ttattattgt atggcggtt atgattgtcg ttatagtgat 300
 tgttttgttt tcggcggagg gaccgaggtg gtggctaaag gtgatccagt tgcacctact 360
 gtccctcatc tcccaccagc tgetgatcag gtggcaactg gaacagtcac catcgtgtgt 420
 gtggcgaata aatactttcc cgatgtcacc gtcacctggg aggtggatgg caccaccaa 480
 acaactggca tcgagaacag taaaacacc cagaattctg cagattgtac ctacaacctc 540
 agcagcactc tgacactgac cagcacacag tacaacagcc acaaagagta cacctgcaag 600
 gtgaccagc gcacgacctc agtcgtccag agcttcaata ggggtgactg t 651

<210> 13

<211> 37
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 13
 aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc 37
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 14
 ccattggtga ggggtccccga g 21
 <210> 15
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 15
 aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc 34
 <210> 16
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 16
 cagagtrctg ctgaggttgt aggtac 26
 <210> 17
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 17
 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu His Ser His Cys
 20 25 30
 Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Ile Ile Trp Ser Gly Thr Pro Ile Tyr Tyr Pro Ser Thr Tyr Tyr Ala
 50 55 60
 Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val
 65 70 75 80
 Asp Leu Glu Ile Pro Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe

	85	90	95
Cys Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Asn Ser Asp Leu Asp Leu Trp Gly Gln			
	100	105	110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val			
	115	120	125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr			
	130	135	140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr			
145	150	155	160
Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val			
	165	170	175
Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr			
	180	185	190
Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn			
	195	200	205
Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Met			
	210	215	220
Cys Pro Pro Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
225	230	235	240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
	245	250	255
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr			
	260	265	270
Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg			
	275	280	285
Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile			
	290	295	300
Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His			
305	310	315	320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg			
	325	330	335
Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu			
	340	345	350
Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe			
	355	360	365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu			
	370	375	380
Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr			
385	390	395	400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly
 405 410 415
 Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430
 Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 18
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 18
 Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Tyr Glu Tyr
 20 25 30
 Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Val Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val
 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys Met Gly Gly Tyr Asp Cys
 85 90 95
 Arg Tyr Ser Asp Cys Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val
 100 105 110
 Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala
 115 120 125
 Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys
 130 135 140
 Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln
 145 150 155 160
 Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys
 165 170 175
 Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn
 180 185 190
 Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val
 195 200 205
 Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
 210 215

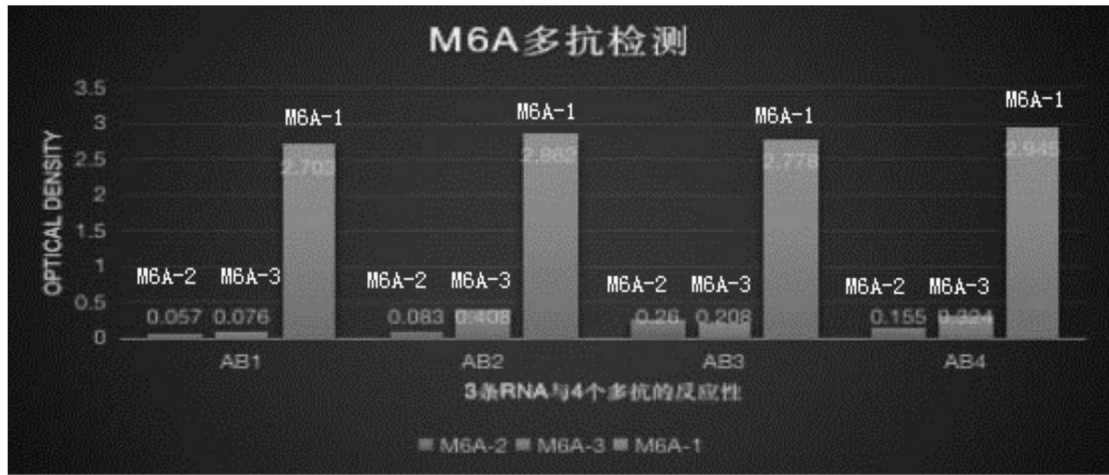


图1

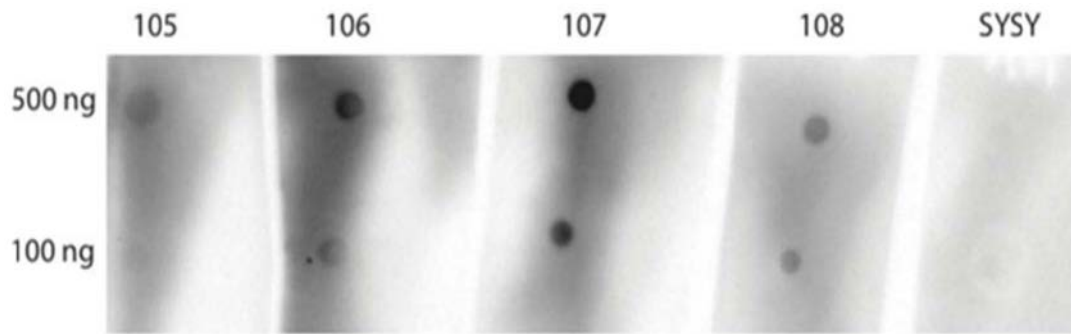


图2

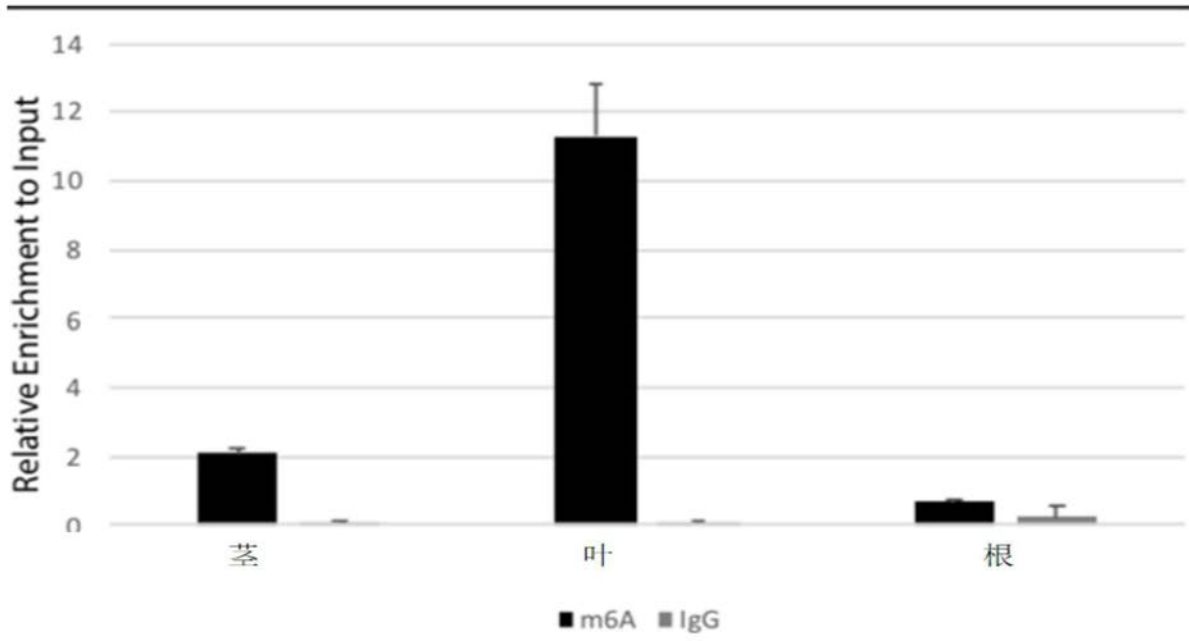


图3

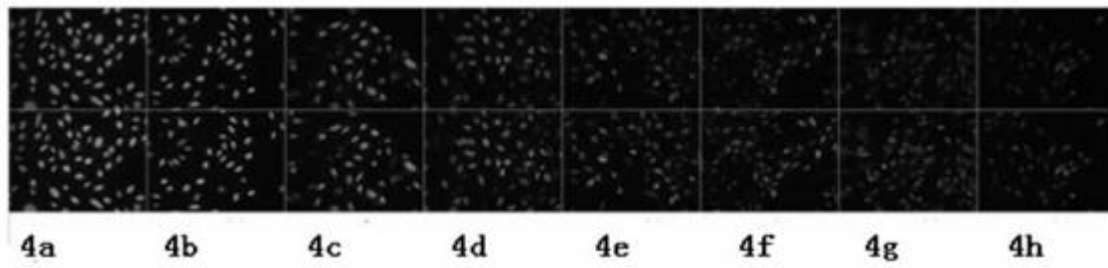


图4

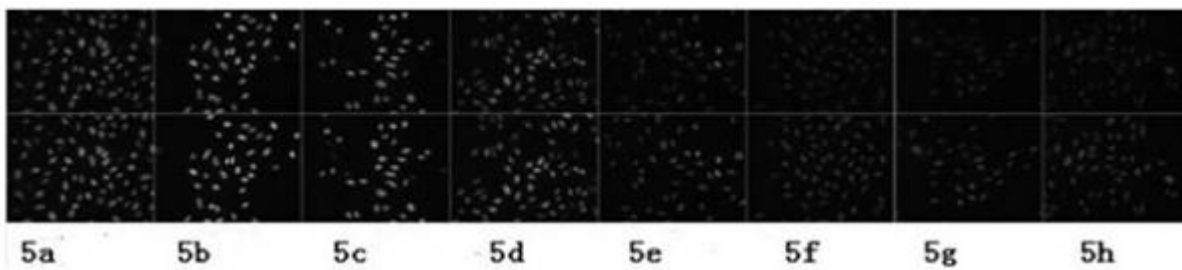


图5