



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107446046 A

(43)申请公布日 2017.12.08

(21)申请号 201710536853.0

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2017.07.05

(83)生物保藏信息

CGMCC No.13819 2017.04.06

(71)申请人 无锡傲锐东源生物科技有限公司

地址 214092 江苏省无锡市滨湖区马山梅梁路168号

(72)发明人 何时无 马东晖 扈晓敏 魏海涛

陈才伟 褚伯阳 王广力 李佳

柳孟姣 闫文广

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C12N 5/20(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图5页

(54)发明名称

抗CD20蛋白单克隆抗体及其用途

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,公开了一种杂交瘤细胞株(保藏编号为CGMCC No.13819),以及由此杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体UMAB58。本发明还涉及单克隆抗体UMAB58在制备用于检测CD20蛋白的免疫检测工具中的应用,含单克隆抗体UMAB58的免疫组化试剂盒,以及单克隆抗体UMAB58在制备用于标记肿瘤的试剂盒中的应用。本发明所述单克隆抗体可与CD20蛋白特异性结合,而与细胞内其他蛋白无交叉反应,显著提高了CD20蛋白免疫检测的特异性、准确性和可靠性。

1. 一种特异性结合CD20蛋白的单克隆抗体UMAB58,由保藏编号为CGMCC No.13819的杂交瘤细胞株产生。
2. 一种杂交瘤细胞株,其保藏编号为CGMCC No.13819。
3. 如权利要求1所述的单克隆抗体在制备用于检测CD20免疫检测工具中的应用。
4. 根据权利要求3所述的应用,所述免疫检测工具为试剂盒、芯片或试纸。
5. 一种免疫组化检测试剂盒,包括权利要求1所述的单克隆抗体。
6. 如权利要求1所述的单克隆抗体在制备用于标记组织细胞的试剂盒中的应用。
7. 根据权利要求6所述的应用,所述组织细胞为B淋巴瘤、扁桃体、脾脏。

抗CD20蛋白单克隆抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及可特异结合CD20蛋白的单克隆抗体UMAB58、产生所述单克隆抗体的细胞株及应用该抗体用于诊断的方法和用途。

背景技术

[0002] CD20又名MS4A1,是非糖基化的III型膜蛋白,属于MS4A四次跨膜蛋白超家族成员。主要表达在前B细胞、静息B细胞、成熟B细胞及B淋巴瘤细胞,并在浆细胞分化过程中丧失。CD20的胞内区域是丝氨酸/苏氨酸富含区并含有多个磷酸化共有序列,在活化的B细胞及恶性B肿瘤细胞中CD20被高度磷酸化。CD20与脂筏结构相关,作为钙离子通道,参与调节B细胞的活化和存活。

[0003] CD20作为成熟B细胞及大多数B恶性肿瘤细胞的表面标志物,在接触抗体后CD20不会被内化或脱落从而使抗体在细胞表面长时间存在。目前临床上常用免疫组织化学(IHC)病理实验检测肿瘤细胞中蛋白的表达状况,然而IHC实验的核心为特异性结合蛋白的单克隆抗体,其性能的优劣决定着整个检测的灵敏度和特异性。因此,研制出一种结合特异性较高的针对CD20蛋白的单克隆抗体对IHC检测CD20表达水平具有重要的意义。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种结合特异性较高的CD20蛋白的单克隆抗体,及其在制备用于检测CD20蛋白的免疫检测工具中的应用。

[0005] 本发明提供了一种杂交瘤细胞株,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称为CGMCC),保藏日期为2017年4月6日,保藏编号为CGMCC No.13819。

[0006] 本发明还提供了一种特异性结合CD20蛋白的单克隆抗体UMAB58,由上述杂交瘤细胞株产生。

[0007] 本发明所述单克隆抗体的制备方法如下:

[0008] (1) 重组表达载体的构建:根据CD20ORF核苷酸序列(CD20ORF核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,894bp;CD20氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示)

[0009] 设计引物PCR扩增CD20ORF第1bp位到第894bp位序列,基因两侧分别引入限制性内切酶位点SgfI和MluI,插入表达载体pCMV6-Entry,构建CD20氨基酸序列第1位到第297位的重组表达质粒pCMV6-rCD20;上游扩增引物序列,SEQ ID NO.3: CACGCGATCGCATGACAACACCCAGAAATTCA下游扩增引物序列SEQ ID NO.4: ACCGACGCGTAGGAGAGCTGTCATTTTCTATT

[0010] (2) CD20重组蛋白的表达与纯化:将CD20重组表达质粒转化HEK293T细胞,裂解离心获得上清,DDK亲和层析柱纯化,获得纯化的CD20重组蛋白;

[0011] (3) 单克隆抗体的筛选与制备:采用上述纯化的CD20重组蛋白免疫Balb/c小鼠,取小鼠脾脏细胞与SP2/0细胞进行融合,有限稀释法获得单克隆,ELISA法筛选阳性杂交瘤细胞,获得能分泌抗CD20特异性抗体的杂交瘤细胞株,命名为UMAB58,亚型鉴定为IgG1;通过

无血清培养基制备抗体,通过亲和层析柱纯化获得CD20单克隆抗体UMAB58。分别通过Western Blot、免疫组化实验验证该单克隆抗体的灵敏度和特异性。

[0012] 进一步采用OriGene高密度蛋白芯片对上述单克隆抗体的特异性进行验证: OriGene高密度蛋白芯片上包含10,000个HEK293T细胞蛋白过表达裂解物,每种蛋白裂解液在芯片上具有两个拷贝的重复。蛋白裂解液被印迹在硝酸纤维素膜上。每一种蛋白裂解液的定位可以通过Excel文件进行准确定位。蛋白芯片上蛋白分为40个亚矩阵,每个亚矩阵上有一些参照,通过参照,可以定量每个芯片点上蛋白的含量,监控每次免疫反应数据的重复性,以及定位阳性信号的方向。

[0013] 本发明将所述单克隆抗体UMAB58与上述芯片杂交并确定阳性信号位点,结果显示本发明所述单克隆抗体UMAB58特异性结合CD20蛋白,而与其他蛋白无交叉反应。

[0014] 本发明还提供了单克隆抗体UMAB58在制备用于检测CD20蛋白的免疫检测工具中的应用。

[0015] 具体地,所述免疫检测工具为试剂盒、芯片或试纸。

[0016] 在具体的实施例中,本发明提供了一种免疫组化检测试剂盒,包括上述单克隆抗体UMAB58,可检测组织细胞中CD20的表达状况。

[0017] 本发明还提供了上述单克隆抗体在制备用于标记肿瘤的试剂盒中的应用。其中所述肿瘤具体是指肿瘤细胞的增殖与CD20的表达密切相关的肿瘤,包括但不限于B淋巴瘤。

[0018] 与现有技术相比,本发明提供了一种杂交瘤细胞株(保藏编号为CGMCC No.13819),以及由此杂交瘤细胞株产生的单克隆抗体UMAB58。本发明还提供了单克隆抗体UMAB58在制备用于检测CD20蛋白的免疫检测工具中的应用,含单克隆抗体UMAB58的免疫组化试剂盒,以及单克隆抗体UMAB58在制备用于标记肿瘤的试剂盒中的应用。本发明所述单克隆抗体可与CD20蛋白特异性结合,而与细胞内其他蛋白无交叉反应,显著提高了CD20蛋白免疫检测的特异性、准确性和可靠性,真实反映肿瘤浸润淋巴细胞内CD20蛋白表达水平,可应用于淋巴瘤等肿瘤免疫微环境的检测。

[0019] 保藏信息

[0020] 用于保藏的杂交瘤细胞株UMAB58的分类命名为:鼠抗人白细胞分化抗原20 (CD20) 单克隆杂交瘤细胞株;

[0021] 保藏单位全称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;

[0022] 保藏单位简称:CGMCC;

[0023] 保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所;

[0024] 保藏日期:2017年4月6日;

[0025] 保藏编号:CGMCC No.13819。

附图说明

[0026] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0027] 图1示实施例1克隆位点设计如图,其中底纹部分为ORF区;

[0028] 图2示实施例2重组CD20蛋白Western blot检测结果图,以anti-DDK检测重组CD20蛋白在HEK293T细胞中的表达,其中左侧泳道为转染空载体的HEK293T细胞裂解液为抗原的

检测结果、右侧泳道为转染pCMV6-rCD20质粒的HEK293T细胞裂解液抗原的检测结果；

[0029] 图3示实施例2重组CD20蛋白SDS-PAGE结果图，用抗DDK亲和层析柱纯化重组CD20蛋白，纯化后的蛋白通过SDS-PAGE胶电泳、考马斯亮蓝染色；

[0030] 图4示实施例3以单克隆抗体UMAB58识别10种不同的人组织裂解液中内源CD20蛋白的Western blot检测结果图。从左到右依次为1：睾丸，2：网膜，3：子宫，4：乳腺，5：脑，6：肝，7：卵巢，8：甲状腺，9：结肠，10：脾。

[0031] 图5示实施例4福尔马林固定、石蜡包埋的人扁桃体免疫组化结果图（一抗为CD20单克隆抗体UMAB58）；

[0032] 图6示实施例4福尔马林固定、石蜡包埋的人淋巴瘤免疫组化结果图（一抗为CD20单克隆抗体UMAB58）；

[0033] 图7示实施例4福尔马林固定、石蜡包埋的人脾脏免疫组化结果图（一抗为CD20单克隆抗体UMAB58）；

[0034] 图8示实施例5人外周血白血病T细胞免疫荧光染色结果图（左上角为鬼笔环肽phalloidin标记的微丝，右上角一抗为CD20单克隆抗体UMAB58，左下角为DAPI核染，右下角为重叠图）；

[0035] 图9示实施例6OriGene蛋白芯片鉴定结果图（一抗为CD20单抗UMAB58，1:100；二抗为DyLight649-conjugated AffiniPure Fragment Goat-anti-Mouse IgG，1:400）。

具体实施方式

[0036] 下面将结合本发明实施例，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0037] 实施例1、CD20重组表达质粒的构建

[0038] 以从美国傲锐东源生物科技有限公司获得的质粒RC201242（含CD20ORF 894bp）为模板，设计两条引物并分别引入酶切位点SgfI和MluI，克隆入表达载体pCMV6-Entry，建立CD20重组表达质粒。克隆位点设计如图1所示。

[0039] 实施例2、CD20重组蛋白的表达与纯化

[0040] 1、转染HEK293T细胞：HEK293T细胞以1:3传至培养皿中继续培养；取7.5mLDMEM（无血清及抗生素）至50mL管中，加入300 μ LPEI MegaTran1.0混匀；加入75 μ g CD20重组表达质粒DNA至混匀液中，混匀并静置30分钟；分别取515 μ L至各培养皿中于37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养。转染24小时后，每皿细胞添加25 μ L2M丁酸钠至终浓度5mM。

[0041] 2、裂解细胞：转染48小时后，进行细胞裂解。吸去培养基，加入1mLPBS进行漂洗，吸去PBS。加入1mL裂解缓冲液，使用前加入蛋白酶抑制剂PI和PMSF。置于冰盒中在摇床上振荡，收集所有培养皿中得裂解液，4 $^{\circ}$ C离心，收集上清。取少量上清采用WB鉴定重组CD20的表达，结果图2。

[0042] 3、DDK亲和层析柱纯化：以0.45 μ M，33mm PVDF膜滤器过滤离心后的裂解液上清并转入15mL管，加入混合好的Beads 1mL，封口后放入360度混匀器中，于4 $^{\circ}$ C结合2小时；取出15mL管，将裂解液倒入BIO-RAD层析柱中，并接住穿透液，滴尽后穿透液取样WB检测；以裂解

缓冲液冲洗柱料1-2次,滴尽后再用TBST冲洗Beads 3次,滴尽后用0.1M Glycine pH3.5洗脱,第一次200 μ L,滴尽不收集,第二、三次各500 μ L,第四次250 μ L,收集至一个1.5mL离心管中,并迅速加入NaH₂PO₄ (pH=11.0)中和至pH7.0左右,每管加入甘油至终浓度为10%, Tween-80至终浓度为0.1%。纯化后的重组CD20蛋白用SDS-PAGE鉴定,见图3。

[0043] 由图2结果可见,转染pCMV6-rCD20质粒的HEK293T细胞裂解液中WB检测后在30-40kD处有明显的特异条带,与多肽的理论分子量33kD基本相符。表明细胞中重组CD20蛋白特异表达。

[0044] 由图3结果可见,纯化的蛋白在PAGE胶30-40kD处有明显的特异条带,与多肽的理论分子量33kD基本相符。表明已获得了纯度较好的CD20重组蛋白。

[0045] 实施例3、CD20单克隆抗体的制备与筛选

[0046] 根据标准方法用重组产生的纯化的CD20蛋白片段对Balb/c小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)进行免疫。具体方法如下:

[0047] 1、动物免疫:经过纯化的CD20抗原以完全弗氏佐剂乳化,采用皮下或腹腔注射方法免疫6-8周龄Balb/c小鼠,免疫剂量为30 μ g/只,间隔两周后进行第二次免疫,以不完全弗氏佐剂乳化,免疫剂量为30 μ g/只。免疫两次后取尾血以ELISA法梯度稀释测定血清效价;根据结果确定是否加强免疫,选取抗体效价最高的小鼠进行细胞融合。

[0048] 2、细胞融合:骨髓瘤细胞采用Balb/c来源的sp2/0,融合时处于对数生长期;取已免疫小鼠脾脏,制成淋巴细胞单细胞悬液;小鼠脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞以1:5-1:10混合,滴加37 $^{\circ}$ C的50%PEG (PH 8.0) 1mL,加入不完全培养基及其余终止液,离心弃上清后加入HAT培养基悬浮混匀,MC定容到50mL,分装到3.5cm培养皿中,放于湿盒中,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂恒温培养箱中进行培养。

[0049] 3、筛选和克隆:融合7-10天内挑选细胞克隆,使用CD20纯化重组蛋白进行ELISA测试。标记细胞株号。对阳性孔细胞进行有限稀释,每次有限稀释后5-6天测定ELISA值,挑取OD280阳性值较高的单克隆孔进行有限稀释,直至ELISA测定96孔板全板结果为阳性。挑取阳性值高的单克隆定株。其对应融合板细胞株为UMAB58。

[0050] 4、腹水单抗的制备与纯化:10-12周龄的雄性Balb/c小鼠腹腔注射0.5ml降植烷,一周后每只小鼠用1mL注射器腹腔注射经PBS洗涤重悬的单克隆细胞悬液,细胞用量为5 \times 10⁶/只,每株抗体打2只小鼠。待小鼠腹水积聚后收集腹水,离心取上清,亲和层析法进行腹水纯化,根据抗体亚型选择相应柱料,细胞株UMAB58产生的单抗为IgG1,采用protein G进行纯化。纯化后的单抗浓度测定、WB检测、分装、冻存在-20 $^{\circ}$ C。其中WB检测结果见图4。

[0051] 由图4结果可见,泳道9和泳道10在分子量约35kD处有特异的条带,表明单克隆抗体UMAB58能特异地Western blot检测完整的CD20蛋白。

[0052] 实施例4、单克隆抗体UMAB58为一抗的免疫组化检测

[0053] (1)、实验方法:

[0054] 1、取福尔马林固定的人扁桃体组织,人淋巴瘤组织与人脾脏组织进行石蜡包埋,使用Finesse组织切片机进行切片,组织厚度为6 μ m。

[0055] 2、脱蜡与水化:分析纯二甲苯3 \times 10min,无水乙醇3 \times 10min,95%乙醇5min,85%乙醇5min,75%乙醇5min,去离子水浸泡3min \times 3次。

[0056] 3、加入抗原修复液(0.01M, pH6.0枸橼酸钠缓冲液)高压锅高压热修复3min,待高

压锅温度降至约90℃时,打开高压锅,取出标本,然后自然冷却至室温。去离子水浸泡3min×3次。

[0057] 4、使用3%过氧化氢灭活组织内源性过氧化物酶,室温静置10min。去离子水浸泡5min×3次。

[0058] 5、加上封闭液(PBS+5%脱脂奶粉+5%正常山羊血清),37℃孵育60min。

[0059] 6、去除封闭液,勿冲洗,加入CD20单抗(UMAB58),稀释比:1:100,使用封闭液进行稀释。置于湿盒中,37℃孵育60min。PBST(0.1%Tween-20)洗涤2次,每次洗涤5min。PBST(0.02%Tween-20)洗涤1次,每次洗涤5min。

[0060] 7、滴加Polink-试剂盒2(Catlog No.D37-15)试剂1,37℃孵育10-20分钟。使用PBS洗涤3次,每次5min。滴加Polink-2试剂盒(Catlog No.D37-15)试剂2,37℃孵育10-20分钟,使用PBS洗涤3次,每次5min。

[0061] 8、应用DAB溶液(中杉金桥ZLI-9019)显色,显色3~10min。蒸馏水洗涤。

[0062] 9、苏木精复染细胞核2min,蒸馏水漂洗,1%盐酸分化。蒸馏水漂洗3次,室温静置1min。

[0063] 10、脱水和透明:75%乙醇5min,100%乙醇5min x 3次,85%乙醇5min,95%乙醇5min,100%乙醇3×5min;二甲苯3×5min,中性树胶封片。

[0064] 11、镜检,见图5-7。

[0065] (2)、实验结果:

[0066] 由图5-7结果可见,在人扁桃体组织,人淋巴瘤组织与人脾脏组织中可见到特异性膜染色。结果与CD20在细胞内的定位及组织表达特异性一致,表明单克隆抗体UMAB58可用于免疫组织化学检测CD20蛋白的水平。

[0067] 实施例5、单克隆抗体UMAB58为一抗的免疫荧光检测

[0068] (1)、实验方法:

[0069] 1、细胞铺版:取体外培养的人外周血白血病T细胞平铺到24孔板中,放置培养箱培养24小时。

[0070] 2、去除培养基,用预热的PBS洗涤一次,制作细胞单层培养物。

[0071] 3、固定:4%的多聚甲醛(PBS配制)室温固定10分钟。

[0072] 4、去除固定液,PBS洗涤3次。若不立刻使用,浸泡在NaN₃/PBS中保存于4℃。

[0073] 5、穿透:室温下用0.1%Triton-X-100(PBS配制)穿透打孔5分钟,PBS洗涤3次。

[0074] 6、加上封闭液(PBS+2%BSA),37℃孵育60分钟。

[0075] 7、加入CD20单抗(UMAB58),稀释比:1:100,使用封闭液进行稀释,37℃孵育60分钟。PBS洗涤3次。

[0076] 8、加入Alexa Fluor®-488AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG(H+L),稀释比:1:500,使用封闭液进行稀释,室温避光孵育60分钟。PBS洗涤3次。

[0077] 9、加入Alexa Fluor®594-Phalloidin(鬼笔环肽)标记微丝。

[0078] 10、DAPI(HH3342)复染细胞核3分钟,镜检。

[0079] 结果如图8所示,在人外周血白血病T细胞表面可见到特异性膜染色,表明单克隆抗体UMAB58可用于免疫荧光检测CD20蛋白的水平。

[0080] 实施例6、单克隆抗体UMAB58的特异性检测

[0081] OriGene高密度蛋白芯片上包含10,000个HEK293T细胞蛋白过表达裂解物,每种蛋白裂解液在芯片上具有两个拷贝的重复。蛋白裂解液被印迹在硝酸纤维素膜上。每一种蛋白裂解液的定位可以通过Excel文件进行准确定位。蛋白芯片上蛋白分为40个亚矩阵,每个亚矩阵上有一些参照,通过参照,可以定量每个芯片点上蛋白的含量,监控每次免疫反应数据的重复性,以及定位阳性信号的方向。以下为使用OriGene蛋白(OriGene Cat PA100001)芯片进行UMAB58抗体鉴定实验的实验方法:

[0082] 1、将一张蛋白芯片放在50mL离心管中,使用40mL去离子水浸润芯片,置于摇床上,室温混合30分钟。弃掉去离子水,使用10mLPBST平衡芯片。室温处理10分钟。

[0083] 2、向50mL离心管中加入40mL5%脱脂牛奶(用PBST进行稀释)置于摇床上,室温封闭30分钟。

[0084] 3、使用封闭液(5%脱脂牛奶)稀释一抗UMAB58,稀释比列为1:100。

[0085] 4、将洁净的封口膜粘贴到实验台上,滴加250-300 μ L一抗在封口膜上。

[0086] 5、将蛋白芯片从封闭液中抽出,将蛋白芯片NC膜的一面朝下,从芯片的一边接触抗体,慢慢滑下,依靠液体表面张力,抗体将慢慢浸润芯片NC膜,直至整张NC膜浸润在一抗溶液中。整个操作过程避免产生气泡。将芯片移到4 $^{\circ}$ C环境下,静置,一抗孵育过夜。在芯片上加盖培养皿盖,其上黏附一张湿纸巾,以防止长时间孵育导致抗体蒸发。

[0087] 6、第二天将芯片移至50mL离心管中,使用PBST漂洗芯片两次,去除多余的抗体。使用40mL PBST(0.1%Tween-20)洗涤芯片,置于摇床上混合均匀,洗涤三次,每次洗涤5min。

[0088] 7、使用封闭液(5%脱脂牛奶)稀释二抗DyLight649-conjugated AffiniPure Fragment Goat-anti-Mouse IgG,稀释比例为1:400。

[0089] 8、按照上述步骤4,步骤5进行二抗孵育操作。室温孵育1小时。在芯片上方用铝箔纸遮盖,以防止发生信号漂白。

[0090] 9、按照上述步骤6,使用PBST洗涤芯片。

[0091] 10、使用去离子水冲洗芯片,以去除残余的盐分和变性剂。

[0092] 11、室温干燥芯片,确保芯片完全干燥。

[0093] 12、使用芯片扫描仪读取荧光信号。

[0094] 13、根据BSA-Cy3以及BSA-Cy5确定芯片方向以及阳性信号的位点。

[0095] 14、根据阳性信号位点找出对应蛋白裂解液ID,根据裂解液数据库信息,查找到对应蛋白名称,NCBI录入号(accession number),蛋白ID,蛋白大小等信息。

[0096] 结果如图9所示,单抗UMAB58在OriGene蛋白芯片上能特异地识别CD20蛋白,表明单抗UMAB58的特异性较好。

SEQUENCE LISTING

<110>无锡傲锐东源生物科技有限公司

<120>抗CD20蛋白单克隆抗体及其用途

<210> 1

<211>894

<212> DNA

<213>人工序列

<400> 1

1 ATGACAACAC CCAGAAATTC AGTAAATGGG ACTTTCCTGG CAGAGCCAAT GAAAGGCCCT
 61 ATTGCTATGC AATCTGGTCC AAAACCACTC TTCAGGAGGA TGTCTTCACT GGTGGGCCCC
 121 ACGCAAAGCT TCTTCATGAG GGAATCTAAG ACTTTGGGGG CTGTCCAGAT TATGAATGGG
 181 CTCTTCCACA TTGCCCTGGG GGGTCTTCTG ATGATCCCAG CAGGGATCTA TGCACCCATC
 241 TGTGTGACTG TGTGGTACCC TCTCTGGGGA GGCATTATGT ATATTATTTT CGGATCACTC
 301 CTGGCAGCAA CGGAGAAAAA CTCCAGGAAG TGTTTGGTCA AAGGAAAAAT GATAATGAAT
 361 TCATTGAGCC TCTTTGCTGC CATTCTGGA ATGATTCTTT CAATCATGGA CATACTTAAT
 421 ATAAAAATTT CCCATTTTTT AAAAATGGAG AGTCTGAATT TTATTAGAGC TCACACACCA
 481 TATATTAACA TATACAACCTG TGAACCAGCT AATCCCTCTG AGAAAACTC CCCATCTACC
 541 CAATACTGTT ACAGCATACA ATCTCTGTTC TTGGGCATTT TGTCAGTGAT GCTGATCTTT
 601 GCCTTCTTCC AGGAACTTGT AATAGCTGGC ATCGTTGAGA ATGAATGGAA AAGAACGTGC
 661 TCCAGACCCA AATCTAACAT AGTTCTCCTG TCAGCAGAAG AAAAAAAGA ACAGACTATT
 721 GAAATAAAAAG AAGAAGTGGT TGGGCTAACT GAAACATCTT CCCAACCAAA GAATGAAGAA
 781 GACATTGAAA TTATTCCAAT CCAAGAAGAG GAAGAAGAAG AAACAGAGAC GAACTTCCA
 841 GAACCTCCCC AAGATCAGGA ATCCTCACCA ATAGAAAATG ACAGCTCTCC TAA

//

<210> 2

<211>297

<212> PRT

<213>人工序列

<400> 2

ORIGIN

1 MTPRNSVNG TFP AEPMKGP IAMQSGPKPL FRRMSSLVGP TQSFFMRESK TLGAVQIMNG
 61 LFHIALGGLL MIPAGIYAPI CVTVWYPLWG GIMYIISGSL LAATEKNSRK CLVKGKMIMN
 121 SLSLFAAISG MILSIMDILN IKISHFLKME SLNFIRAHTP YINIYNCEPA NPSEKNSPST
 181 QYCYSIQSLF LGILSVMLIF AFFQELVIAG IVENEWKRTC SRPKSNIVLL SAEKKEQTI
 241 EIKKEVVGLT ETSSQPKNEE DIEIPIQEE EEEETETNFP EPPQDQESSP IENDSSP

//

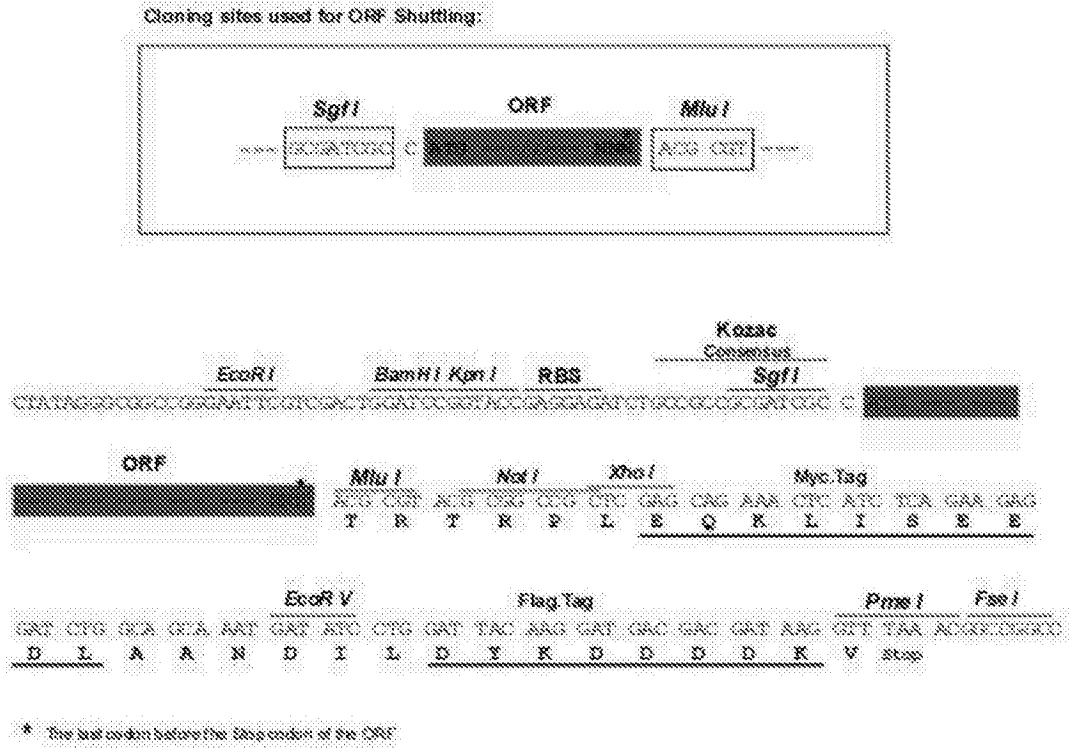


图1

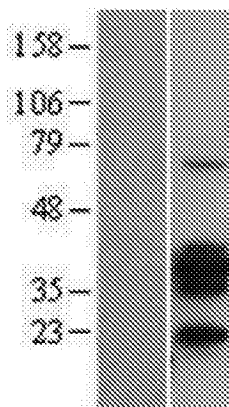


图2

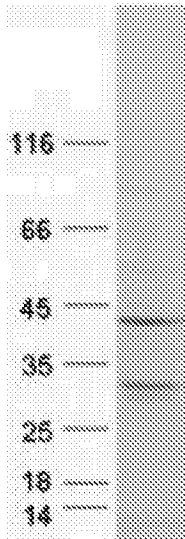


图3

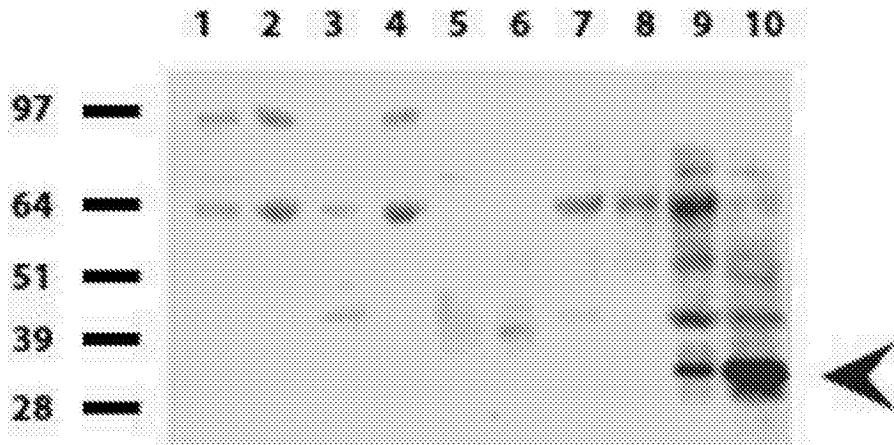


图4

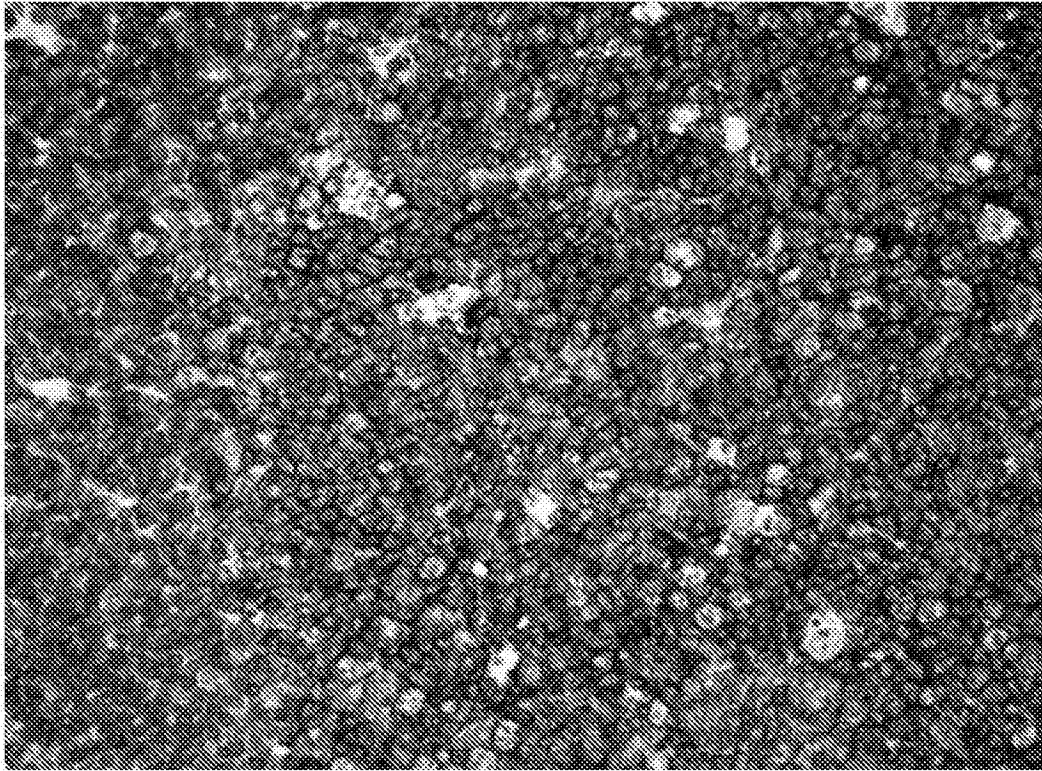


图5

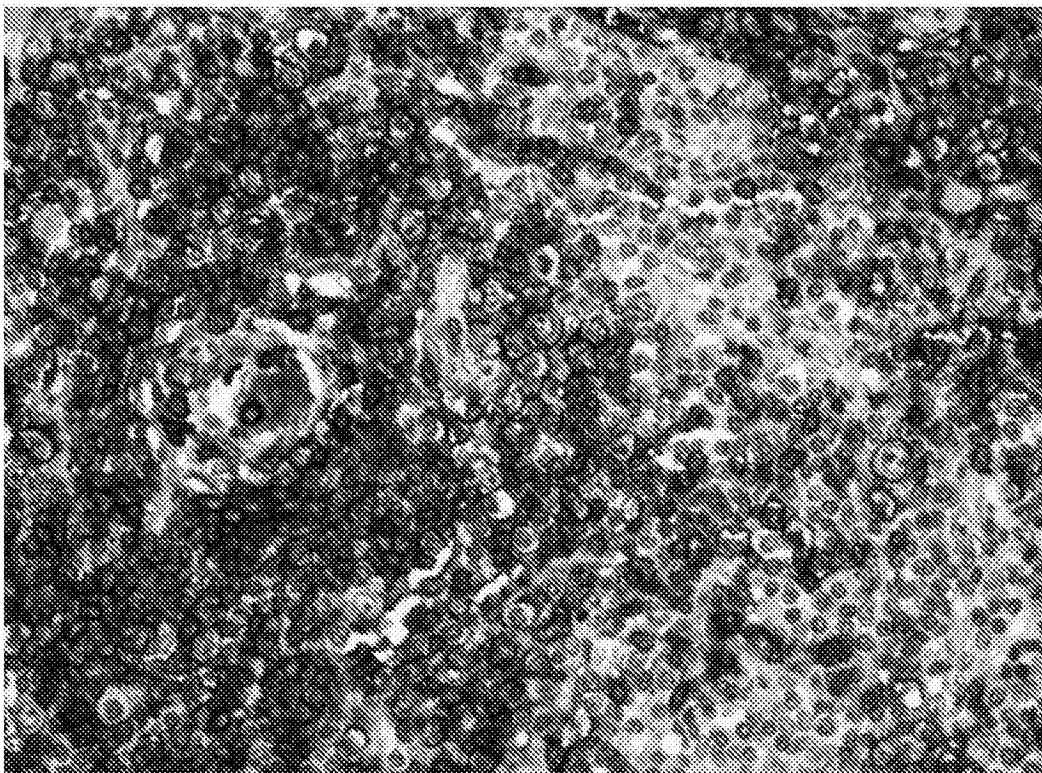


图6

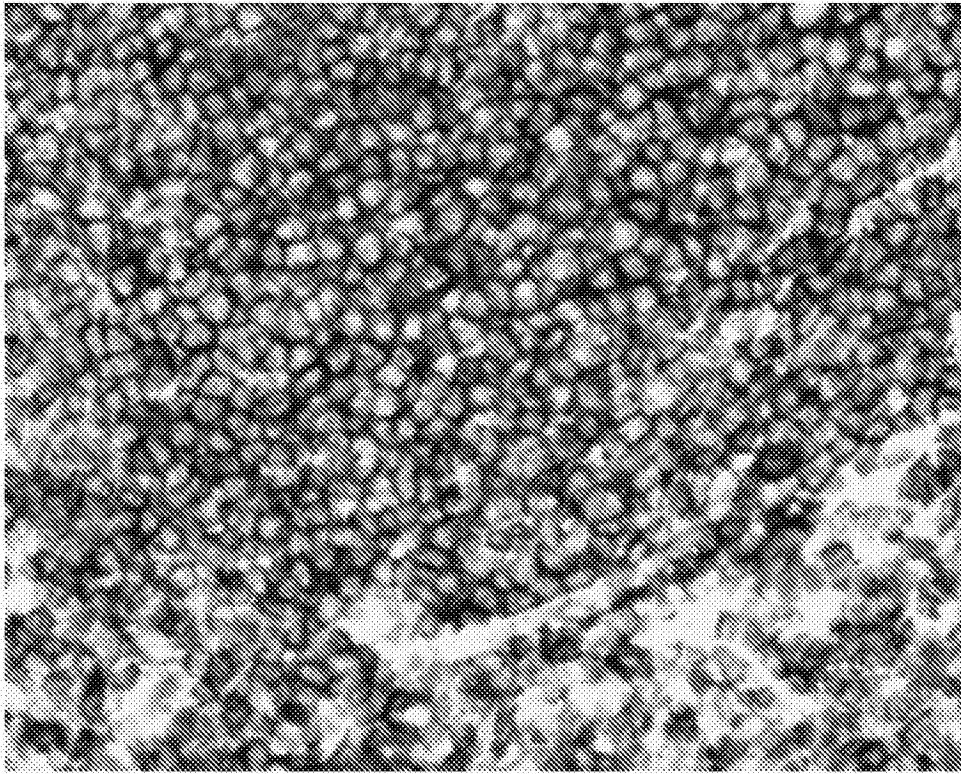


图7

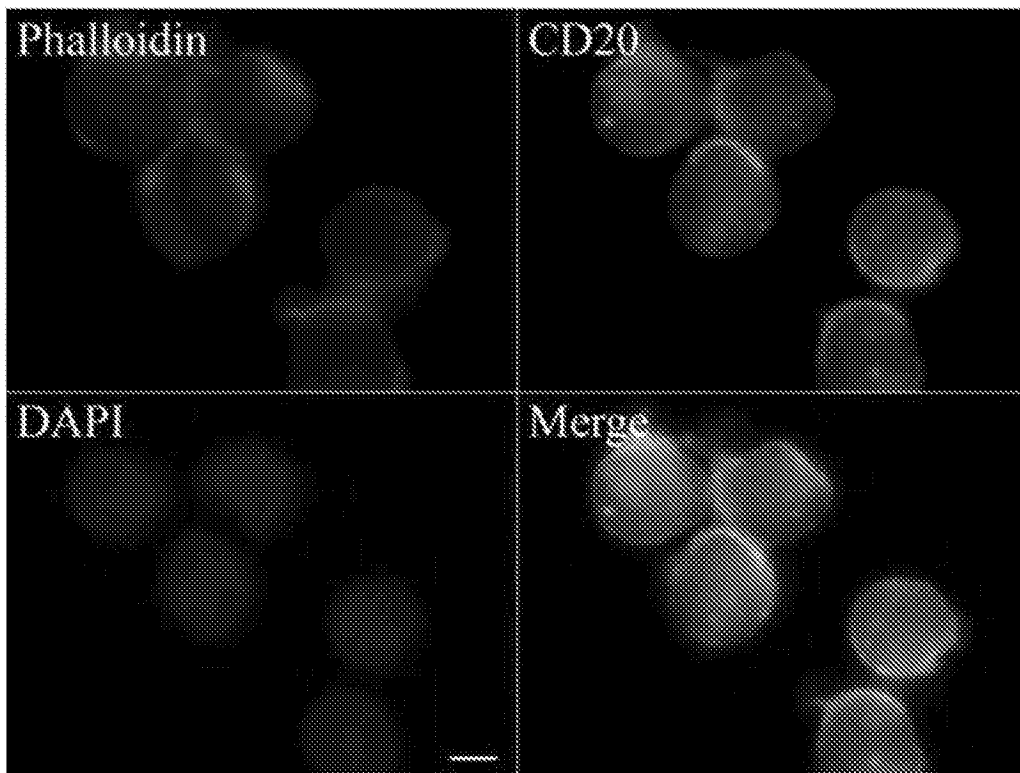


图8

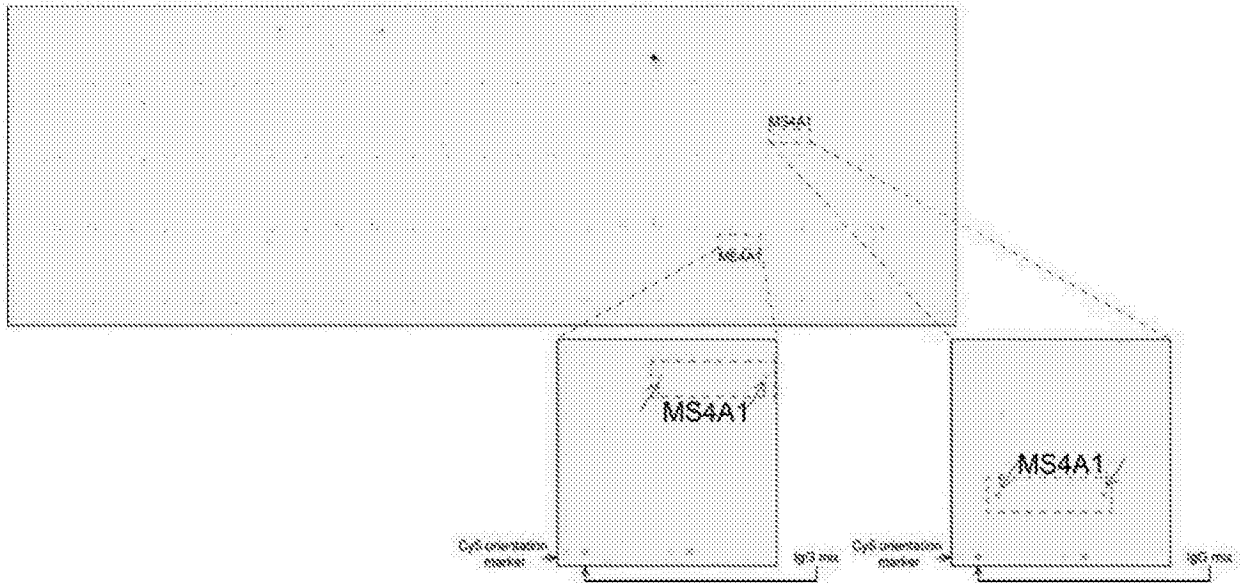


图9