



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107253995 A

(43)申请公布日 2017. 10. 17

(21)申请号 201710675794.5

C12N 15/70(2006.01)

(22)申请日 2017.08.09

C12N 1/21(2006.01)

(71)申请人 芜湖英特菲尔生物制品产业研究院有限公司

A61P 31/12(2006.01)

A61P 37/04(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

地址 241000 安徽省芜湖市经济技术开发区衡山路汽车电子孵化中心B0401-B0402

(72)发明人 王明丽 汪良青 王利利 夏兵兵 梅志强 何志远 鲍可兵 刘家炉

(74)专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 任晨晨

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

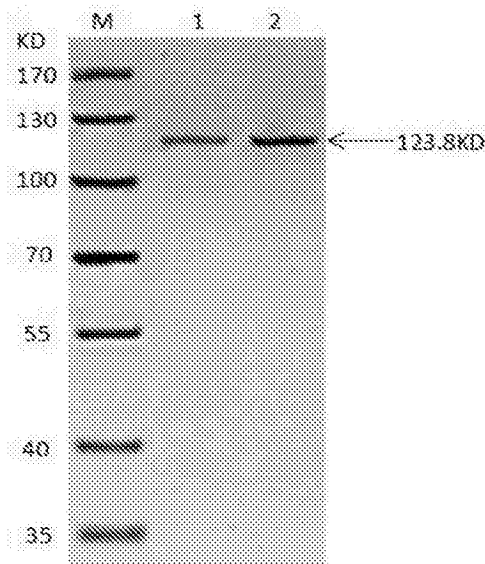
权利要求书1页 说明书15页
序列表10页 附图4页

(54)发明名称

一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白及其制备方法,所述融合蛋白由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 经柔性linker连接而形成,融合蛋白与冻干保护剂混配后经冷冻干燥即可得到重组牛长效干扰素。所述重组牛长效干扰素可显著提高牛干扰素的半衰期,较普通牛干扰素的半衰期提高18倍以上,并具有广谱抗病毒作用并能提高牛自身的免疫应答。



1. 一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白, 其特征在于: 所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQUENCE LISTING 400<1>所示。

2. 一种编码如权利要求1所述的融合蛋白的基因, 其特征在于, 所述基因的核苷酸序列如SEQUENCE LISTING 400<2>所示, 记为基因组1; 或如SEQUENCE LISTING 400<3>所示, 记为基因组2。

3. 含有如权利要求2所述基因的表达载体。

4. 含有如权利要求2所述基因的基因工程菌。

5. 一种重组牛长效干扰素, 其特征在于, 所述重组牛长效干扰素由权利要求1所述的融合蛋白与冻干保护剂混配之后, 经冷冻干燥而成。

6. 根据权利要求1所述的融合蛋白的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法包括以下步骤: 将权利要求3所述的表达载体导入到大肠杆菌宿主细胞中, 获得基因工程菌, 基因工程菌经IPTG诱导表达后得到所述融合蛋白的粗品, 经纯化后即可得到融合蛋白。

7. 根据权利要求6所述的制备方法, 其特征在于, 所述基因工程菌为pET-32a/rA1b-IFN γ -IFN α , 其制备方法为:

(1) 设计引物, 通过反转录得到或人工分别合成带有柔性linker序列的牛白蛋白、牛干扰素 γ 、牛干扰素 α 的目的基因; 通过柔性linker将牛白蛋白、牛干扰素 γ 、牛干扰素 α 的目的基因连接起来, 连接后的目的基因的核苷酸序列如SEQUENCE LISTING 400<2>所示或如SEQUENCE LISTING 400<3>所示;

(2) 将连接后的目的基因连接到pET-32a质粒上获得表达载体;

(3) 将表达载体导入到大肠杆菌宿主细胞中, 即可得到基因工程菌pET-32a/rA1b-IFN γ -IFN α 。

8. 根据权利要求6或7所述的制备方法, 其特征在于, 所述大肠杆菌宿主细胞为BL21 (DE3) 感受态细胞或带有pGro7质粒的BL21 (DE3) 感受态细胞。

9. 根据权利要求6或7所述的制备方法, 其特征在于, 所述纯化的方法为: 融合蛋白的粗品先后经亲和层析、阴离子交换层析和分子筛层析纯化。

10. 根据权利要求5所述的重组牛长效干扰素的应用, 其特征在于, 所述重组牛长效干扰素的半衰期长达72小时以上, 具有广谱抗病毒作用并能提高牛自身的免疫应答。

一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物基因工程技术领域,具体涉及由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白及其制备方法。

背景技术

[0002] 牛是我国重要的畜牧种类之一,随着集约化和规模化养殖的不断发展,牛病毒性传染性疾病的发病率逐年提高。许多牛的传染性疾病在国内大型规模化牧场长期流行,因疾病传染快,发病率高、死亡率高严重制约着我国牛养殖业的健康发展;更为严重的是一些人畜共患传染病如牛的布鲁氏菌病、结核病等直接威胁人类的生命健康。

[0003] 目前对牛传染性疾病的预防和治疗途径主要是通过疫苗接种和使用抗生素。大部分抗生素类药物以及传统的口服抗病毒药物,由于药物残留问题,给健康带来负面影响;而传统的疫苗,由于它的高特异性以及副作用,无法抵抗病毒变异和新型病毒不断出现给猪养殖业带来的巨大危害。干扰素以其广谱的抗病毒活性和广泛的免疫调节能力决定了其具有巨大的临床应用潜力,可以用来预防和治疗牛病毒性细菌性传染性疾病。

[0004] IFN是一类病毒感染诱导机体产生具有广谱抗病毒、抗肿瘤和具有免疫调节作用的蛋白质,1957年Issacs和Lindeman首先发现,它是一类多功能的细胞因子,与细胞受体结合后,可诱导机体产生多种特异性蛋白质和酶类,主要通过抑制病毒基因转录和降解病毒RNA来抑制病毒的生长繁殖以及发挥抗肿瘤等的活性。现已知, α 型IFN在体内可有选择性地作用于病毒等感染细胞,通过抑制受染细胞内的病毒蛋白质的生物合成,发挥广谱和高效抗病毒作用。但对正常宿主细胞无作用或作用微弱。IFN- α 主要生物学活性为具有抑制病毒复制、抗寄生虫、抑制多种细胞增殖、刺激免疫细胞的杀伤活性。

[0005] γ 型IFN是由激活的T细胞和NK细胞产生,具有较强抗病毒和免疫调节功能。大量研究表明,干扰素 γ 除了具有广谱抗病毒功能外,对免疫系统也起着关键的调节作用,所以IFN- γ 又称为免疫调节干扰素。虽然各种类型的干扰素均能够介导细胞对病毒感染的反应,但干扰素 γ 的免疫调节活性在协调免疫反应和确定机体长期的抗病毒状态中发挥更为重要的作用,因此干扰素 γ 具有极为重要的临床应用价值。

[0006] 血清白蛋白是血浆的重要成分,正常情况下不易透过肾小球,体内分布极广而且没有酶学和免疫学活性,是理想的药物载体。白蛋白融合技术有以下优点:白蛋白与目标蛋白在细胞内经蛋白翻译系统通过肽键链接,不需额外的体外处理;白蛋白的表达水平较高,与其融合后可以提高目的蛋白的表达水平;白蛋白是一个稳定的“惰性蛋白”,与其融合后可以提高目的蛋白的稳定性;白蛋白融合蛋白具有较长的药物半衰期,将小分子蛋白药物与白蛋白融合可望提高在血液中的半衰期。目前,多种蛋白与白蛋白融合后在实验动物体内半衰期的延长得到了证实。

[0007] 天然干扰素及人工重组干扰素目前普遍存在半衰期短的局限,半衰期一般为2-4个小时。半衰期短给治疗带来了极大的不便,治疗次数的增加,相应的时间成本及经济成本

随之增加,而机体的耐受极限也有可能被突破导致不良反应的产生。半衰期短的主要原因有两个:干扰素的分子量过小在体内代谢过快,干扰素尤其是重组干扰素亲和力较差被免疫系统清除。

[0008] 而市面上常见的长效干扰素以聚乙二醇融合干扰素为代表,仅在分子量的层面上部分解决了干扰素分子量小而导致半衰期短的问题,同时聚乙二醇融合干扰素成本非常高,不利于临床上应用。

发明内容

[0009] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白及其制备方法,并由此融合蛋白与冻干保护剂混配之后,经冷冻干燥制备得到一种重组牛长效干扰素,所述重组牛长效干扰素可显著提高牛干扰素的半衰期,较普通牛干扰素的半衰期提高18倍以上,并具有广谱抗病毒作用并能提高牛自身的免疫应答。

[0010] 本发明采取的技术方案为:

[0011] 一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白,所述融合蛋白的氨基酸序列列表如SEQUENCE LISTING 400<1>所示。

[0012] 本发明还提供了编码上述融合蛋白的基因,所述基因的核苷酸序列列表如SEQUENCE LISTING 400<2>所示,记为基因组1;或如SEQUENCE LISTING 400<3>所示,记为基因组2。

[0013] 所述基因组1和所述基因组2均可编码所述融合蛋白。基因组2是对基因组1的核苷酸序列进行优化之后的结果,通常密码子适应指数CAI=1.0时被认为该基因在该表达系统中为最优的高效表达状态,CAI值越低表明在宿主中表达水平越低。基因中GC含量最理想分布范围为30~70%,在任何区域内超过该范围均会影响翻译和转录效率。利用软件检测发现牛白蛋白、牛IFN- γ 、牛IFN- α 原始基因的密码子在大肠杆菌中密码子适应指数(CAI)分别为0.22、0.24、0.25,GC百分比为42.9%、39.8%、58.2%;而通过对牛白蛋白、牛IFN- γ 、牛IFN- α 基因优化后得到各基因在大肠杆菌中密码子适应指数(CAI)为0.99、1.0、0.97,GC百分比49.9%、44.8%、54.6%。通过基因优化显著降低了低密码子的使用率,避免了稀有密码子对蛋白表达的影响,改善了基因的GC含量,提高了转录翻译效率。

[0014] 本发明还提供了含有基因组1或基因组2的表达载体。

[0015] 进一步地,所述表达载体为含有基因组1或基因组2的pET-32a大肠杆菌表达载体。

[0016] 本发明还提供了含有基因组1或基因组2的基因工程菌。

[0017] 进一步地,所述基因工程菌为pET-32a/rA1b-IFN γ -IFN α 。

[0018] 含有基因组1或基因组2的宿主细胞也属于本发明的保护范围,进一步地,所述宿主细胞为大肠杆菌宿主细胞,更进一步地,所述大肠杆菌宿主细胞为BL21 (DE3)感受态细胞或带有pGro7质粒的BL21 (DE3)感受态细胞。

[0019] 本发明还提供了一种重组牛长效干扰素,所述重组牛长效干扰素由所述的融合蛋白与冻干保护剂混配之后,经冷冻干燥而成。

[0020] 所述冻干保护剂为甘油、甘露醇和蔗糖,用10mmol/L PBS为缓冲液,三者的终浓度为甘油100mL/L、甘露醇0.12g/mL和蔗糖0.025g/mL。

[0021] 本发明还公开了所述融合蛋白的制备方法,所述制备方法包括以下步骤:将含有基因组1或基因组2的表达载体导入到大肠杆菌宿主细胞中,获得基因工程菌,基因工程菌

经IPTG诱导表达后得到所述融合蛋白的粗品,经纯化后即可得到融合蛋白。

[0022] 所述表达载体为含有基因组1或基因组2的pET-32a大肠杆菌表达载体;

[0023] 所述基因工程菌为pET-32a/rA1b-IFN γ -IFN α ,其制备方法为:

[0024] (1) 设计引物,通过反转录得到或人工分别合成带有柔性linker序列的牛白蛋白、牛干扰素 γ 、牛干扰素 α 的目的基因;通过柔性linker将牛白蛋白、牛干扰素 γ 、牛干扰素 α 的目的基因连接起来,连接后的目的基因的核苷酸序列列表如SEQUENCE LISTING 400<2>所示或如SEQUENCE LISTING 400<3>所示;

[0025] (2) 将连接后的目的基因连接到pET-32a质粒上获得表达载体;

[0026] (3) 将表达载体导入到大肠杆菌宿主细胞中,即可得到基因工程菌pET-32a/rA1b-IFN γ -IFN α 。

[0027] 所述大肠杆菌宿主细胞为BL21 (DE3) 感受态细胞或带有pGro7质粒的BL21 (DE3) 感受态细胞。

[0028] 所述纯化的方法为:融合蛋白的粗品先后经亲和层析、阴离子交换层析和分子筛层析纯化。

[0029] 所述带有pGro7质粒的BL21 (DE3) 感受态细胞购自上海近岸科技有限公司/欣百诺生物,货号为V205。

[0030] 所述基因组1的获取方法为:

[0031] a. 引物设计

[0032] 牛白蛋白(A1b)的引物序列为:

[0033] 上游A1b-F1:CCGGAATTCATGAAGTGGGTGACTT,带有EcoRI酶切位点;

[0034] 下游A1b-R1:

[0035] ACCACCACCAGAACCACCACCACCGGCTAAGGCTGTTTG,带有柔性linker;

[0036] 牛干扰素 γ (IFN- γ)的引物序列为:

[0037] 上游IFN- γ -F1:

[0038] GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTATGAAATATAACAAGCTATTT,带有柔性linker;

[0039] 下游IFN- γ -R1:

[0040] ACCACCACCAGAACCACCACCACCGTTGATGCTCTCCG,带有柔性linker;

[0041] 牛干扰素 α (IFN- α)的引物序列为:

[0042] 上游IFN- α -F1:

[0043] GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTTGCCACCTGCCTC,带有柔性linker;

[0044] 下游IFN- α -R1:CCCTCGAGGTCCTTTCTCCTGAAAC,带有XhoI酶切位点;

[0045] b. 从牛肝脏中提取RNA,通过反转录获得牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的目的基因,三者的基因序列分别如SEQUENCE LISTING 400<4>、SEQUENCE LISTING 400<5>所示和SEQUENCE LISTING 400<6>所示;

[0046] 分别以牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的目的基因为模板,并分别利用牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的上下游引物进行PCR扩增,分别得到连接有柔性linker的牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 基因。

[0047] PCR反应体系及条件为:在25 μ L的总反应体系中,模板RNA 1.5 μ L,上下游引物各0.5 μ L,反转录酶2.5 μ L,dNTP Mix为10 μ L,加RNase Free水至25 μ L;所述RT-PCR反应的反应

条件为:50℃反转录30min,95℃预变性4min,进入循环;95℃变性45s,58℃退火45s,72℃延伸1kb/min,循环35次,最后72℃延伸10min。

[0048] c.利用柔性linker连接牛A1b和牛IFN- γ 目的基因得到rA1b-IFN γ 基因

[0049] 连接的PCR反应体系及反应条件为:在25 μ L的总反应体系中,连接有柔性linker的A1b基因模板DNA 1 μ L,连接有柔性linker的IFN- γ 模板DNA 1 μ L,A1b上游引物0.5 μ L,IFN- γ 下游引物0.5 μ L,Taq DNA聚合酶2.5 μ L,dNTP Mix为10 μ L,加RNase Free水至25 μ L;连接PCR反应条件为:95℃预变性4min,进入循环:94℃变性45s;58℃退火45s,72℃延伸1kb/min,共35个循环;最后72℃延伸10min。

[0050] d.利用柔性linker连接rA1b-IFN γ 基因和牛IFN- α 目的基因得到rA1b-IFN γ -IFN α 基因

[0051] 连接的PCR反应体系及反应条件为:在25 μ L的总反应体系中,rA1b-IFN γ 基因模板DNA 1 μ L,连接有柔性linker的IFN- α 模板DNA 1 μ L,A1b上游引物0.5 μ L,IFN- α 下游引物0.5 μ L,Taq DNA聚合酶2.5 μ L,dNTP Mix为10 μ L,加RNase Free水至25 μ L;连接PCR反应条件为:95℃预变性4min,进入循环:94℃变性45s;58℃退火45s,72℃延伸1kb/min,共35个循环;最后72℃延伸10min。

[0052] 基因组2是对基因组1进行优化之后,人工合成的基因,所述基因组2的获取方法为:

[0053] a.引物设计

[0054] 牛白蛋白(A1b)的引物序列为:

[0055] 上游A1b-F2:CGGGATCCATGAAATGGGTTACCTT,带有BamHI酶切位点;

[0056] 下游A1b-R2:

[0057] ACCACCACCAGAACCACCACCACCAGCCAGAGCGGTC,带有柔性linker;

[0058] 牛干扰素 γ (IFN- γ)的引物序列为:

[0059] 上游IFN- γ -F2:

[0060] GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTATGAAATACACCTCTTAC,带有柔性linker;

[0061] 下游IFN- γ -R2:

[0062] ACCACCACCAGAACCACCACCACCGGTAGAACGACGACG,带有柔性linker;

[0063] 牛干扰素 α (IFN- α):

[0064] 上游IFN- α -F2:

[0065] GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTTGCCACCTGCCG,带有柔性linker;

[0066] 下游IFN- α -R2:

[0067] CCCTCGAGGTCTTTACGACGGAAA,带有XhoI酶切位点。

[0068] b.所述牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的目的基因,三者的基因序列分别如SEQUENCE LISTING 400<7>、SEQUENCE LISTING 400<8>和SEQUENCE LISTING 400<9>所示;

[0069] 分别以牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的目的基因为模板,并分别利用牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的上下游引物进行PCR扩增,分别得到连接有柔性linker的牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 基因。

[0070] PCR反应体系及条件为:在25 μ L的总反应体系中,基因组DNA 1.0 μ L,上下游引物各0.5 μ L,Taq DNA聚合酶2.5 μ L,dNTP Mix为10 μ L,加RNase Free水至25 μ L;所述RT-PCR反应的

反应条件为:95℃预变性4min,进入循环;95℃变性45s,60℃退火45s,72℃延伸1kb/min,循环35次,最后72℃延伸10min。

[0071] c.利用柔性linker连接牛Alb和牛IFN- γ 目的基因得到rAlb-IFN γ 基因

[0072] 连接的PCR反应体系及反应条件为:在25 μ L的总反应体系中,连接有柔性linker的Alb基因模板DNA 1 μ L,连接有柔性linker的IFN- γ 模板DNA 1 μ L,Alb上游引物0.5 μ L,IFN- γ 下游引物0.5 μ L,Taq DNA聚合酶2.5 μ L,dNTP Mix为10 μ L,加RNase Free水至25 μ L;连接PCR反应条件为:95℃预变性4min,进入循环:94℃变性45s;60℃退火45s,72℃延伸1kb/min,共35个循环;最后72℃延伸10min。

[0073] d.利用柔性linker连接rAlb-IFN γ 基因和牛IFN- α 目的基因得到rAlb-IFN γ -IFN- α 基因

[0074] 连接的PCR反应体系及反应条件为:在25 μ L的总反应体系中,rAlb-IFN γ 基因模板DNA 1 μ L,IFN- α 模板DNA 1 μ L,连接有柔性linker的Alb上游引物0.5 μ L,IFN- α 下游引物0.5 μ L,Taq DNA聚合酶2.5 μ L,dNTP Mix为10 μ L,加RNase Free水至25 μ L;连接PCR反应条件为:95℃预变性4min,进入循环:94℃变性45s;60℃退火45s,72℃延伸1kb/min,共35个循环;最后72℃延伸10min。

[0075] 本发明还提供了所述重组牛长效干扰素的应用,其半衰期长达72小时以上,具有广谱抗病毒作用并能提高牛自身的免疫应答。

[0076] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0077] 1.通过柔性linker将牛Alb、牛IFN- γ 和牛IFN- α 基因实现融合表达,提高了干扰素半衰期,与普通干扰素相比,提高了18倍以上;

[0078] 2.通过对牛Alb、牛IFN- γ 和牛IFN- α 基因进行优化,提高了牛Alb、牛IFN- γ 和牛IFN- α 融合蛋白的表达量。

[0079] 3.以重组大肠杆菌pET-32a/rAlb-IFN γ -IFN α 作为表达菌株,通过引入分子伴侣pGro7质粒,在蛋白表达时产生包涵体较少,形成大量可溶性蛋白,避免了包涵体变性和复性的过程,大大缩短了融合蛋白表达的时间;

[0080] 4.本发明公开的由牛Alb、牛IFN- γ 和牛IFN- α 组成的融合蛋白不仅具有IFN- α 的广谱抗病毒作用,同时显著提高了牛自身的免疫应答。

附图说明

[0081] 图1为实施例1中的牛白蛋白基因、牛干扰素 α 基因与牛干扰素 γ 基因RT-PCR扩增的结果;泳道M:DNA Marker DL2000;泳道1:牛干扰素 α 基因RT-PCR扩增产物;泳道2:牛干扰素 γ 基因RT-PCR扩增产物;泳道3:牛白蛋白基因RT-PCR扩增产物;

[0082] 图2为实施例1中的牛Alb、IFN- γ 和IFN- α 的目的基因连接之后的PCR扩增的结果;泳道M:DNA Marker DL10000;泳道1:牛白蛋白基因、牛干扰素 γ 基因与牛干扰素 α 基因连接扩增产物;

[0083] 图3为实施例1中的阳性克隆质粒的PCR扩增及双酶切鉴定结果;泳道M:DNA Marker DL10000;泳道1:重组质粒双酶切结果;泳道2:质粒PCR结果;

[0084] 图4为实施例1中的重组蛋白的SDS-PAGE电泳检查结果;泳道M:蛋白Marker;泳道1:重组菌诱导后的菌体破碎后上清;泳道2:重组菌诱导后的菌体破碎后沉淀;泳道3:空载

对照；

[0085] 图5为实施例1得到的融合蛋白的Western Blot鉴定结果；泳道M：蛋白Marker；泳道1：重组菌诱导破碎后上清；泳道2：为重组菌诱导破碎后沉淀；

[0086] 图6为实施例5中由实施例1中的融合蛋白制得的重组牛长效干扰素 α 对VSV致细胞病变的抑制作用；1为VSV病毒对照孔；2为HEp-2细胞对照孔；A3-12为梯度稀释(从右向左)的人干扰素标准品处理孔；B3-12为梯度稀释(从右向左)的重组牛长效干扰素 α 处理孔；

[0087] 图7为实施例8中由实施例1中的融合蛋白制得的重组牛长效干扰素 α 肌肉注射血药浓度-时间变化曲线。

具体实施方式

[0088] 实施例1

[0089] 一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 与牛干扰素 α 组成的融合蛋白，其制备方法如下：

[0090] 1. 牛白蛋白(A1b)、牛干扰素 γ (IFN- γ)与牛干扰素 α (IFN- α)目的基因的获取与扩增

[0091] 引物设计：

[0092] 根据Genbank中已报道的目的基因序列设计合成引物见表1，在牛白蛋白的上游引物和下游引物中分别引入EcoRI酶切位点和Linker序列，在牛干扰素 γ 的上游引物和下游引物中分别引入Linker序列，在牛干扰素 α 的上游引物和下游引物中分别引入Linker序列和XhoI酶切位点。

[0093] 表1 PCR扩增引物

引物名称	引物序列	酶切位点
上游 Alb-F1	CCGGAATTCATGAAGTGGGTGACTT	划横线处为 EcoRI 酶切位点
下游 Alb-R1	ACCACCACCAGAACCACCACCACC GGCTAAGGCTGTTTG	划横线处为柔性 linker
上游 IFN- γ -F1	GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT ATGAAATATACAAGCTATTT	划横线处为柔性 linker
下游 IFN- γ -R1	ACCACCACCAGAACCACCACCACC CGTTGATGCTCTCCG	划横线处为柔性 linker
上游 IFN- α -F1	GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT TGCCACCTGCCTC	划横线处为柔性 linker
下游 IFN- α -R1	CCCTCGAGGTCCTTTCTCCTGAAAC	划横线处为 XhoI 酶切位点

[0094] RT-PCR获取目的基因：

[0095] 从牛肝脏组织中提取RNA，通过反转录获得牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的目的基因，三者的基因序列分别如SEQUENCE LISTING 400<4>、SEQUENCE LISTING 400<5>和SEQUENCE LISTING 400<6>所示；

[0096] RT-PCR反应体系(25 μ L)见表2

[0098] 表2 RT-PCR反应体系

[0099]

RNase Free水	10 μ L
dNTP Mix	10 μ L
反转录酶	2.5 μ L
上、下游引物	各0.5 μ L
基因组RNA	1.5 μ L

[0100] 反应参数为:50 $^{\circ}$ C反转录30min,95 $^{\circ}$ C预变性4min,进入循环:95 $^{\circ}$ C变性45s;58 $^{\circ}$ C退火45s,72 $^{\circ}$ C延伸1kb/min,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0101] RT-PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳在1850bp、560bp和530bp左右出现特异条带,其结果如图1所示,说明分别制备得到了分别连接有柔性linker序列的牛Alb、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的目的基因。

[0102] 2.目的基因的连接

[0103] 将目的基因均稀释到10ug/mL,利用重叠PCR连接各段目的基因,25 μ L反应体系如表3、表4所示:

[0104] 表3 rAlb-IFN γ PCR反应体系

[0105]	RNase Free 水	9.5 μ L
	dNTP Mix	10.0 μ L
	Taq DNA 聚合酶	2.5 μ L
	Alb 上游引物、IFN- γ 下游引物	各 0.5 μ L
	连接有柔性 linker 的 Alb、连接有	各 1.0 μ L

[0106]	柔性 linker 的 IFN- γ 模板基因	
--------	--------------------------------	--

[0107] 表4 rAlb-IFN γ -IFN α PCR反应体系

[0108]	RNase Free 水	9.5 μ L
	dNTP Mix	10 μ L
	Taq DNA 聚合酶	2.5 μ L
	Alb 上游引物、IFN- α 下游引物	各 0.5 μ L
	rAlb-IFN- γ 、连接有柔性 linker 的 IFN- α 模板基因	各 1.0 μ L

[0109] 反应参数为:95 $^{\circ}$ C预变性4min,进入循环:94 $^{\circ}$ C变性45s;58 $^{\circ}$ C退火45s,72 $^{\circ}$ C延伸1kb/min,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10min。

[0110] PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳在2880bp左右出现特异条带,其结果如图2所示,图2中出现了rAlb-IFN γ 和IFN- α 扩增产物条带,这是因为在rAlb-IFN γ 和IFN- α 基因连接的过程中,出现了非特异反应。得到的目的基因的核苷酸序列如SEQUENCE LISTING 400(2)所示。

[0111] 3. 表达载体构建

[0112] 选择连接后的目的基因经测序无误后,PCR胶回收产物与pET-32a质粒均使用EcoRI和XhoI限制性内切酶进行双酶切和回收,按表5中的20 μ L体系做双酶切:

[0113] 表5双酶切体系

[0114]	通用 buffer	2 μ L
	限制性内切酶 (一对)	1 μ L+1 μ L
	载体或回收片段	2 μ L

[0115]	RNase Free 水	14 μ L
--------	--------------	------------

[0116] 将连接后的目的基因与pET-32a质粒的酶切回收产物按表6中的体系进行连接,4 $^{\circ}$ C过夜连接:

[0117] 表6酶连体系

[0118]

目的片段DNA	10 μ L
表达载体	3 μ L
buffer	2 μ L
连接酶	1 μ L
RNase Free水	4 μ L

[0119] 转化连接产物至大肠杆菌BL21 (DE3)感受态细胞中,将感受态细胞涂布于含氨苄青霉素的LB培养基平板过夜培养;挑取LB平板上的单菌落进行目的基因PCR鉴定,阳性克隆菌质粒经EcoRI和XhoI双酶切鉴定,鉴定为阳性者表示工程菌构建成功,PCR扩增和双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳在2880bp处检测出单一条带,其结果如图3所示,说明成功得到了pET-32a/rAlb-IFN γ -IFN α 工程菌。

[0120] 4. 重组蛋白的表达

[0121] 挑取工程菌于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中37 $^{\circ}$ C摇床复苏1h,在LB培养基(含氨苄青霉素100 μ g/ml)中放大培养4h (OD=1.0),加入终浓度为100 μ g/ml的IPTG,32 $^{\circ}$ C诱导表达5h;收集菌体,经SDS-PAGE电泳检测,其结果如图4所示,从图中可以看出,重组菌诱导5h后的菌体破碎后上清和沉淀在123.8KD左右处可见优势表达条带,说明在沉淀和上清中均成功表达了融合蛋白。

[0122] 加入质量体积比1:1的PBS重悬沉淀;-20 $^{\circ}$ C于室温反复冻融沉淀3次;4 $^{\circ}$ C超声裂解细菌沉淀,工作10s,间隔3S,超声6min,整个过程重复3~4次;4 $^{\circ}$ C,12000r/min离心15min,分别取上清、沉淀,得到粗制融合蛋白。

[0123] 5. 融合蛋白纯化

[0124] 5.1 His亲和层析

[0125] 粗制融合蛋白用0.22 μ m孔径的滤膜过滤后,上样通过连接在AKTA explorer 100蛋白纯化系统上,用Binding Buffer I (PBS)平衡好的His亲和层析柱,用PBS缓冲液洗去未结合的蛋白,直到A280nm稳定,再用Elution buffer I (50mM三羟甲基氨基甲烷,20~500mM咪唑,PH8.0)洗脱,收集rAlb-IFN γ -IFN α 蛋白峰。

[0126] 5.2 DEAE阴离子交换层析

[0127] 将经过His亲和层析纯化后收集的蛋白置换到Binding Buffer II (50mM三羟甲基氨基甲烷,PH6.5)中后,上样通过用Binding Buffer II平衡好的DEAE阴离子交换层析柱,再用Binding Buffer II过柱至A280nm值稳定后,用Elution Buffer II (50mM三羟甲基氨基甲烷,1M NaCl,PH6.5)线性梯度洗脱,收集rAlb-IFN γ -IFN α 蛋白峰。

[0128] 5.3分子筛层析

[0129] 将离子交换层析收集到的样品浓缩后上样通过用Binding Buffer III (50mM Na₂HP0₄,0.15M NaCl,PH7.4)平衡好Superdex 200分子筛层析柱,用Binding Buffer III洗脱,收集rAlb-IFN γ -IFN α 蛋白峰。

[0130] 5.4样品鉴定

[0131] 测定rAlb-IFN γ -IFN α 效价及比活性,比活性 $\geq 10^7$ IU/mg,蛋白合格;无菌分装,-80 $^{\circ}$ C保存。即可得到由牛白蛋白、牛干扰素 γ 与牛干扰素 α 组成的融合蛋白,其氨基酸序列如SEQUENCE LISTING 400<1>所示。

[0132] 实施例2

[0133] 一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 与牛干扰素 α 组成的融合蛋白,其他同实施例1,只是将其中的大肠杆菌BL21 (DE3)感受态细胞替换为了带有pGro7质粒的BL21 (DE3)感受态细胞。其融合蛋白的SDS-PAGE电泳结果同实施例1对照,上清液中123.8KD左右处优势表达条带较粗,说明引入分子伴侣pGro7后,目的蛋白在上清液中的表达更好,得到的融合蛋白量更高。大肠杆菌表达的蛋白大部分存在于包涵体中;通过在表达菌株中引入分子伴侣,协同表达蛋白正确折叠,达到蛋白可溶性表达。

[0134] 所述带有pGro7质粒的BL21 (DE3)感受态细胞购自上海近岸科技有限公司/欣百诺生物,货号V205。

[0135] 实施例3

[0136] 一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 与牛干扰素 α 组成的融合蛋白,其制备方法如下:

[0137] 1.牛白蛋白 (Alb)、牛干扰素 γ (IFN- γ)与牛干扰素 α (IFN- α)目的基因的获取与扩增

[0138] 对实施例1中的牛Alb、牛IFN- γ 和牛IFN- α 进行优化,人工合成牛Alb、牛IFN- γ 和牛IFN- α 目的基因,优化后,三者的核苷酸序列分别如SEQUENCE LISTING 400<7>、SEQUENCE LISTING 400<8>和SEQUENCE LISTING 400<9>所示。

[0139] 1.1密码子优化

[0140] 遗传密码子有64种,但是绝大多数生物倾向于利用这些密码子中的一部分。那些被最频繁利用的称为最佳密码子 (optimal codons),那些不被经常利用的称为稀有或利用率低的密码子 (rare or low-usage codons)。实际上,常用做蛋白表达或生产的每种生物 (包括大肠杆菌,酵母,哺乳动物细胞,植物细胞和昆虫细胞)都表现出某种程度的密码子利用的差异或偏爱。大肠杆菌、酵母和果蝇中对含最佳密码子的基因的表达效率明显高于含

低利用率的密码子的基因的表达效率。因此,在异源表达系统中,密码子的偏爱性很大程度上影响了重组蛋白的表达。利用偏爱密码子 (preferred codons) 并避免利用稀有的密码子进行基因合成,这种基因的重新设计叫密码子优化。因此,本实施例中对牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 基因密码子进行优化。

[0141] 1.2密码子优化后结果分析

[0142] 通常密码子适应指数 (CAI) = 1.0时被认为该基因在该表达系统中的最优的高效表达状态,CAI值越低表明在宿主中表达水平越低。基因中GC含量最理想分布范围为30~70%,在任何区域内超过该范围均会影响翻译和转录效率。利用软件检测发现牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 原始基因的密码子在大肠杆菌中密码子适应指数 (CAI) 分别为0.22、0.24、0.25,GC百分比为42.9%、39.8%、58.2%;而通过对牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 基因优化后得到重组基因在大肠杆菌中密码子适应指数 (CAI) 分别为0.99、1.0、0.97,GC百分比49.9%、44.8%、54.6%。通过基因优化显著降低了低密码子的使用率,避免了稀有密码子对蛋白表达的影响,改善了基因的GC含量,提高了转录翻译效率。

[0143] 1.3引物设计:

[0144] 表7 PCR扩增引物

引物名称	引物序列	
[0145] 上游 A1b-F2	<u>CGGGATCCATGAAATGGGTTACCTT</u>	划横线处为 BamHI 酶切位点
下游 A1b-R2	<u>ACCACCACCAGAACCACCACCACC</u> AGCCAGAGCGGTC	划横线处为柔性 linker
上游 IFN- γ -F2	<u>GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT</u> ATGAAATACACCTCTTAC	划横线处为柔性 linker
[0146] 下游 IFN- γ -R2	<u>ACCACCACCAGAACCACCACCACC</u> GGTAGAAGCACGACG	划横线处为柔性 linker
上游 IFN- α -F2	<u>GGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT</u> TGCCACCTGCCG	划横线处为柔性 linker
下游 IFN- α -R2	<u>CCCTCGAGGTCTTTACGACGGAAA</u>	划横线处为 XhoI 酶切位点

[0147] 将优化后的牛A1b、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的基因组DNA分别稀释至0.05mg/mL。利用PCR扩增获得目的基因,25 μ L反应体系如表8所示:

[0148] 表8 PCR反应体系

	RNase Free 水	10.5 μ L
	dNTP Mix	10.0 μ L
[0149]	Taq DNA 聚合酶	2.5 μ L
	上、下游引物	各 0.5 μ L
	基因组 DNA	1.0 μ L

[0150] 反应参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性4min,进入循环:95 $^{\circ}$ C 变性45s;60 $^{\circ}$ C 退火45s,72 $^{\circ}$ C 延伸1kb/min,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C 延伸10min。

[0151] 牛Alb、牛IFN- γ 与牛IFN- α 的PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分别在1850bp、560bp和530bp左右出现特异条带,说明制备得到了优化后的分别连接有柔性linker的牛Alb、牛IFN- γ 和牛IFN- α 的目的基因。

[0152] 2. 目的基因的连接

[0153] 将目的基因均稀释到10ug/mL,利用重叠PCR连接各段目的基因,25 μ L反应体系如表9、表10所示:

[0154] 表9 rAlb-IFN γ PCR反应体系

	RNase Free 水	9.5 μ L
	dNTP Mix	10.0 μ L
	Taq DNA 聚合酶	2.5 μ L
[0155]	Alb 上游引物、IFN- γ 下游引物	各 0.5 μ L
	连接有柔性 linker 的 Alb、连接有柔性 linker 的 IFN- γ 模板基因	各 1.0 μ L

[0156] 表10 rAlb-IFN γ -IFN- α PCR反应体系

	RNase Free 水	9.5 μ L
	dNTP Mix	10 μ L
	Taq DNA 聚合酶	2.5 μ L
[0157]	Alb 上游引物、IFN- α 下游引物	各 0.5 μ L
	rAlb-IFN γ 、连接有柔性 linker 的 IFN- α 模板基因	各 1.0 μ L

[0158] 反应参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性4min,进入循环:94 $^{\circ}$ C 变性45s;60 $^{\circ}$ C 退火45s,72 $^{\circ}$ C 延伸1kb/min,共35个循环;最后72 $^{\circ}$ C 延伸10min。

[0159] PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳在2880bp左右出现特异条带,说明成功得到了连

接后的rAlb-IFN γ -IFN α 基因。得到的目的基因的核苷酸序列如SEQUENCE LISTING 400 (3)所示。

[0160] 3. 表达载体构建

[0161] 选择连接后的目的基因经测序后无误的PCR的胶回收产物与pET-32a质粒均使用BamHI、XhoI限制性内切酶进行双酶切和回收,按表11中的20 μ L体系做双酶切:

[0162] 表11双酶切体系

[0163]

通用buffer	2 μ L
限制性内切酶(一对)	1 μ L+1 μ L
载体或回收片段	2 μ L
RNase Free水	14 μ L

[0164] 将连接后的目的基因与pET-32a质粒的酶切回收产物按表12中的体系进行连接,4 $^{\circ}$ C过夜连接:

[0165] 表12

[0166]

目的片段DNA	10 μ L
表达载体	3 μ L
buffer	2 μ L
连接酶	1 μ L
RNase Free水	4 μ L

[0167] 转化连接产物至大肠杆菌BL21 (DE3)感受态细胞中,将感受态涂布于含氨苄青霉素的LB平板中过夜培养;取LB平板上生长的菌落经PCR鉴定目的基因,阳性克隆菌质粒经BamHI、XhoI双酶切鉴定,鉴定为阳性者表示表达载体构建成功,PCR扩增和双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳在2880bp左右处出现单一条带,说明含有rAlb-IFN γ -IFN α 融合基因工程菌pET-32a/rAlb-IFN γ -IFN α 构建成功。

[0168] 4. 重组蛋白的表达

[0169] 挑取工程菌于含100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中37 $^{\circ}$ C摇床复苏1h,在LB培养基(含氨苄青霉素100 μ g/ml)中放大培养4h(OD=1.0),加入终浓度为100 μ g/ml的IPTG,32 $^{\circ}$ C诱导表达5h;收集菌体,经SDS-PAGE电泳检测,重组菌诱导5h后的菌体破碎后上清和沉淀在123.8KD左右处可见优势表达条带,说明在上清和沉淀中均得到了重组蛋白。

[0170] 加入质量体积比1:1的PBS重悬沉淀;-20 $^{\circ}$ C于室温反复冻融沉淀3次;4 $^{\circ}$ C超声裂解细菌沉淀,工作10s,间隔3S,超声6min,整个过程重复3~4次;4 $^{\circ}$ C,12000r/min离心15min,分别取上清、沉淀,得到粗制融合蛋白。

[0171] 5. 融合蛋白纯化

[0172] 5.1 His亲和层析

[0173] 粗制融合蛋白用0.22 μ m孔径的滤膜过滤后,上样通过连接在AKTA explorer 100蛋白纯化系统上,用Binding Buffer I (PBS)平衡好的His亲和层析柱,用PBS缓冲液洗去未结合的蛋白,直到A280nm稳定,再用Elution buffer I (50mM三羟甲基氨基甲烷,20~500mM咪唑,PH8.0)洗脱,收集rAlb-IFN γ -IFN α 蛋白峰。

[0174] 5.2 DEAE阴离子交换层析

[0175] 将经过His亲和层析纯化后收集的蛋白置换到Binding Buffer II (50mM三羟甲基氨基甲烷,PH6.5)中后,上样通过用Binding Buffer II平衡好的DEAE阴离子交换层析柱,再用Binding Buffer II过柱至A280nm值稳定后,用Elution Buffer II (50mM三羟甲基氨基甲烷,1M NaCl,PH6.5)线性梯度洗脱,收集rAlb-IFN γ -IFN α 蛋白峰。

[0176] 5.3分子筛层析

[0177] 将离子交换层析收集到的样品浓缩后上样通过用Binding Buffer III (50mMNa₂HP0₄,0.15M NaCl,PH7.4)平衡好Superdex 200分子筛层析柱,用Binding Buffer III洗脱,收集rAlb-IFN γ -IFN α 蛋白峰。

[0178] 5.4样品鉴定

[0179] 测定rAlb-IFN γ -IFN α 效价及比活性,比活性 $\geq 10^7$ IU/mg,蛋白为合格;无菌分装,-80 $^{\circ}$ C保存。即可得到由牛白蛋白、牛干扰素 γ 与牛干扰素 α 组成的融合蛋白,其氨基酸序列如SEQUENCE LISTING 400<1>所示。

[0180] 实施例4

[0181] 一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白,其他同实施例3,只是将其中的大肠杆菌BL21 (DE3)感受态细胞替换为了带有pGro7质粒的BL21 (DE3)感受态细胞。其融合蛋白的SDS-PAGE电泳结果同实施例3对照,上清液中123.8KD左右处优势表达条带较粗,说明引入分子伴侣pGro7后,目的蛋白在上清液中的表达更好,得到的融合蛋白量更高。大肠杆菌表达的蛋白大部分存在于包涵体中;通过在表达菌株中引入分子伴侣,协同表达蛋白正确折叠,达到蛋白可溶性表达。

[0182] 所述带有pGro7质粒的BL21 (DE3)感受态细胞购自上海近岸科技有限公司/欣百诺生物,货号V205。

[0183] 实施例5

[0184] 一种重组牛长效干扰素 α ,由实施例1、2、3、4中的融合蛋白分别与冻干保护剂混配之后,经冷冻干燥而成。所述冻干保护剂为甘油、甘露醇和蔗糖,用10mmol/L PBS为缓冲液,三者的终浓度为甘油100mL/L、甘露醇0.12g/mL和蔗糖0.025g/mL。

[0185] 实施例6

[0186] 实施例1~4得到由牛白蛋白、牛干扰素 γ 与牛干扰素 α 组成的融合蛋白的鉴定

[0187] 6.1蛋白含量的定量检测

[0188] 用Lowry法,以中国食品药品生物制品检定院的标准蛋白作标准测定,测定实施例1~4得到的融合蛋白浓度均大于1.1mg/ml。

[0189] 6.2 SDS-PAGE电泳检测

[0190] 与空菌相比,融合蛋白在123.8KD左右有一条浓染的新增蛋白条带,如图4所示。

[0191] 6.3 Western Blot结果

[0192] 分别检测实施例1~4中融合蛋白,以abcam公司鼠抗牛 α 干扰素(1:5000稀释)为一抗,以山羊抗小鼠IgG-HRP为二抗(1:10000稀释)。重组牛长效干扰素样品能与抗牛干扰素 α 单克隆抗体发生特异性反应,123.8KD左右处出现特异性条带,如图5所示。

[0193] 实施例7

[0194] 实施例5中的四份重组牛长效干扰素 α 冻干剂的效价检测

[0195] 按照微量细胞病变抑制法,用培养基将Hep-2细胞配成 5×10^5 细胞/ml细胞悬浮液,每孔接种0.1ml移入96孔细胞培养板。37℃、5%CO₂培养24h,加入不同剂量的重组牛长效干扰素 α ,24h后吸弃,再分别接种100 TCID₅₀ VSV病毒。

[0196] 试验结果

[0197] 结果表明获得的重组牛长效干扰素 α 对VSV引起HEp-2细胞的病变具有明显的抑制作用。未经处理的细胞接种病毒后均出现细胞变圆、脱落、崩解等病变。而获得的重组牛长效干扰素处理后的细胞接种病毒后,在倒置显微镜下连续观察,细胞形态正常,未出现任何病变,测得效价 $\geq 10^7$ IU/ml,如图6所示。

[0198] 实施例8

[0199] 实施例5中的分别由实施例1~4的融合蛋白得到的四份重组牛长效干扰素 α 冻干剂(分别记为A、B、C、D)在牛体内的半衰期的测定

[0200] 细胞病变抑制法测定rAlb-IFN γ -IFN α 的血药浓度与时间关系

[0201] 取六只体重大致相同的牛(雌雄各半),颈部皮下注射2mg/ml重组牛长效干扰素 α 冻干剂2ml,分别在1h、2h、4h、8h、16h、26h、44h、79h静脉采血,血样4℃凝固,3500rpm低温离心10min分离血清,各时点每只牛血样于-20℃保存待测。采用细胞病变抑制法测定血清样品中rAlb-IFN γ -IFN α 的浓度,用DAS药动学软件进行曲线拟合并计算参数。参数计算结果见表13。

[0202] 表13重组牛长效干扰素 α 肌肉注射后血清中主要动力学参数

参数	值			
	A	B	C	D
[0203] 消除半衰期 $T_{(1/2\beta)}$	72±1.6h	73±1.9h	73±2.0h	73±2.5h
达峰时间 T_{MAX}	5.3±0.6h	5.2±0.6h	5.5±0.5h	5.4±0.4h
达峰浓度 C_{MAX} ($\times 10^4$ IU/L)	24.2±1.2	24.8±1.9	24.8±1.6	25.1±1.0

[0204] 结果表明重组牛长效干扰素 α 有较长的半衰期。经测定半衰期能达到72h左右,较普通干扰素提高约18倍。

[0205] 实施例9

[0206] 实施例5中的四份重组牛长效干扰素 α 冻干剂对牛细胞免疫应答影响的测定

[0207] 取六只体重大致相同的肉牛分为两组,记为实验组和对照组;实验组颈部皮下注射2mg/ml重组牛长效干扰素 α 冻干剂2ml,对照组颈部皮下注射2ml的PBS,取注射4周后牛外周血,之后每周取一次血,使用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞,淋巴细胞经过无血清RPMI 1640培养基洗2次后,用完全培养基重悬、调整细胞浓度为 2×10^6 个/ml,24孔细胞培养板每孔加入1ml淋巴细胞,37℃、5%CO₂培养72h,收集淋巴细胞培养上清。ELISA检测培养上清中IL-2、IL-4含量,按试剂盒说明书进行,检测结果如表14所示:

[0208] 表14 ELISA检测各组牛细胞免疫应答水平

细胞因子 含量	试验组平均值 (pg/ml)				对照组平均值 (pg/ml)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
[0209] IL-2	33.5	32.8	33.8	34.3	6.6	6.3	6.7	6.6
IL-4	33.5	34.2	33.8	32.9	8.5	8.6	8.2	8.2

[0210] 结果表明注射重组牛长效干扰素 α 后,能够显著提高牛外周血中细胞因子IL-2、IL-4的含量,增强了细胞免疫应答水平,显著提高免疫力水平。

[0211] 上述参照实施例对一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白及其制备方法进行的详细描述,是说明性的而不是限定性的,可按照所限定范围列举出若干个实施例,因此在不脱离本发明总体构思下的变化和修改,应属本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 芜湖英特菲尔生物制品产业研究院有限公司

<120> 一种由牛白蛋白、牛干扰素 γ 和牛干扰素 α 组成的融合蛋白及其制备方法

<130> 1

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 959

<212> PRT

<213> 牛白蛋白-干扰素 γ -干扰素 α 融合蛋白

<400> 1

```

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Leu Leu Phe Ser Ser Ala
1           5           10           15
Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Thr His Lys Ser Glu Ile Ala
           20           25           30
His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu His Phe Lys Gly Leu Val Leu
           35           40           45
Ile Ala Phe Ser Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Asp Glu His Val
           50           55           60
Lys Leu Val Asn Glu Leu Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
65           70           75           80
Glu Ser His Ala Gly Cys Glu Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
           85           90           95
Glu Leu Cys Lys Val Ala Ser Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Asp Met Ala
           100          105          110
Asp Cys Cys Glu Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Ser
           115          120          125
His Lys Asp Asp Ser Pro Asp Leu Pro Lys Leu Lys Pro Asp Pro Asn
           130          135          140
Thr Leu Cys Asp Glu Phe Lys Ala Asp Glu Lys Lys Phe Trp Gly Lys
145          150          155          160
Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu
           165          170          175
Leu Leu Tyr Tyr Ala Asn Lys Tyr Asn Gly Val Phe Gln Glu Cys Cys
           180          185          190
Gln Ala Glu Asp Lys Gly Ala Cys Leu Leu Pro Lys Ile Glu Thr Met
           195          200          205
Arg Glu Lys Val Leu Ala Ser Ser Ala Arg Gln Arg Leu Arg Cys Ala

```

210	215	220
Ser Ile Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Leu Lys Ala Trp Ser Val Ala		
225	230	235
Arg Leu Ser Gln Lys Phe Pro Lys Ala Glu Phe Val Glu Val Thr Lys		240
	245	250
Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Lys Glu Cys Cys His Gly Asp		255
	260	265
Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys		270
	275	280
Asp Asn Gln Asp Thr Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Asp Lys		285
	290	300
Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Lys Asp Ala		305
	310	315
Ile Pro Glu Asn Leu Pro Pro Leu Thr Ala Asp Phe Ala Glu Asp Lys		320
	325	330
Asp Val Cys Lys Asn Tyr Gln Glu Ala Lys Asp Ala Phe Leu Gly Ser		335
	340	345
Phe Leu Tyr Glu Tyr Ser Arg Arg His Pro Glu Tyr Ala Val Ser Val		350
	355	360
Leu Leu Arg Leu Ala Lys Glu Tyr Glu Ala Thr Leu Glu Glu Cys Cys		365
	370	375
Ala Lys Asp Asp Pro His Ala Cys Tyr Ser Thr Val Phe Asp Lys Leu		380
	385	390
Lys His Leu Val Asp Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Asp		395
	405	410
Gln Phe Glu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Phe Gln Asn Ala Leu Ile Val		415
	420	425
Arg Tyr Thr Arg Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu		430
	435	440
Val Ser Arg Ser Leu Gly Lys Val Gly Thr Arg Cys Cys Thr Lys Pro		445
	450	455
Glu Ser Glu Arg Met Pro Cys Thr Glu Asp Tyr Leu Ser Leu Ile Leu		460
	465	470
Asn Arg Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Glu Lys Val		475
	485	490
Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser		495
	500	505
Ala Leu Thr Pro Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Ala Phe Asp Glu Lys		510
	515	520
		525

Leu Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Pro Asp Thr Glu Lys
 530 535 540
 Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Leu Lys His Lys Pro
 545 550 555 560
 Lys Ala Thr Glu Glu Gln Leu Lys Thr Val Met Glu Asn Phe Val Ala
 565 570 575
 Phe Val Asp Lys Cys Cys Ala Ala Asp Asp Lys Glu Ala Cys Phe Ala
 580 585 590
 Val Glu Gly Pro Lys Leu Val Val Ser Thr Gln Thr Ala Leu Ala Gly
 595 600 605
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Phe
 610 615 620
 Leu Ala Leu Leu Leu Cys Gly Leu Leu Gly Phe Ser Gly Ser Tyr Gly
 625 630 635 640
 Gln Gly Gln Phe Phe Arg Glu Ile Glu Asn Leu Lys Glu Tyr Phe Asn
 645 650 655
 Ala Ser Ser Pro Asp Val Ala Lys Gly Gly Pro Leu Phe Ser Glu Ile
 660 665 670
 Leu Lys Asn Trp Lys Asp Glu Ser Asp Lys Lys Ile Ile Gln Ser Gln
 675 680 685
 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Glu Asn Leu Lys Asp Asn Gln
 690 695 700
 Val Ile Gln Arg Ser Met Asp Ile Ile Lys Gln Asp Met Phe Gln Lys
 705 710 715 720
 Phe Leu Asn Gly Ser Ser Glu Lys Leu Glu Asp Phe Lys Lys Leu Ile
 725 730 735
 Gln Ile Pro Val Asp Asp Leu Gln Ile Gln Arg Lys Ala Ile Asn Glu
 740 745 750
 Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser Pro Lys Ser Asn Leu Arg Lys
 755 760 765
 Arg Lys Arg Ser Gln Asn Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Thr Gly
 770 775 780
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Cys His Leu Pro His Thr His
 785 790 795 800
 Ser Leu Ala Asn Arg Arg Val Leu Met Leu Leu Gly Gln Leu Arg Arg
 805 810 815
 Val Ser Pro Ser Ser Cys Leu Gln Asp Arg Asn Asp Phe Ala Phe Pro
 820 825 830
 Gln Glu Ala Leu Gly Gly Ser Gln Leu Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser

835	840	845
Val Leu His Glu Val Thr Gln His Thr Phe Gln Leu Phe Ser Thr Glu		
850	855	860
Gly Ser Ala Thr Thr Trp Asp Glu Ser Leu Leu Asp Lys Leu Arg Ala		
865	870	875
Ala Leu Asp Gln Gln Leu Thr Asp Leu Gln Ala Cys Leu Arg Gln Glu		
885	890	895
Glu Glu Leu Gln Gly Ala Pro Leu Leu Lys Glu Asp Ser Ser Leu Ala		
900	905	910
Val Arg Lys Tyr Phe His Arg Leu Thr Leu Tyr Leu Gln Glu Lys Lys		
915	920	925
His Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Gln Val Met Arg Ala		
930	935	940
Phe Ser Ser Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Phe Arg Arg Lys Asp		
945	950	955

<210> 2

<211> 2877

<212> DNA

<213> 基因组1

<400> 2

```

atgaagtggg tgacttttat ttctcttctc cttctettca gctctgetta ttccaggggt 60
gtgtttcgtc gagatacaca caagagtgag attgctcadc ggtttaaaga tttgggagaa 120
gaacatttta aaggcctggt actgattgcc tttctcagt atctccagca gtgtccattt 180
gatgagcatg taaaattagt gaacgaacta actgagtttg caaaacatg tgttgctgat 240
gagtcccatg cgggctgtga aaagtcactt cacactctct ttggagatga attgtgtaaa 300
gttgcatccc ttcgtgaaac ctatggtgac atggctgact gctgtgagaa acaagagcct 360
gaaagaaatg aatgcttctt gagccacaaa gatgatagcc cagacctccc taaattgaaa 420
ccagacccca atactttgtg tgatgagttt aaggcagatg aaaagaagtt ttggggaaaa 480
tacctatacg aaattgctag aagacatccc tacttttatg caccagaact ctttactat 540
gctaataaat ataatggagt tttcaagaa tgctgccaag ctgaagataa aggtgcctgc 600
ctgctaccaa agattgaaac tatgagagaa aaggtagtag cttcatctgc cagacagaga 660
ctcaggtgtg ccagtattca aaaatttgga gaaagagctt taaaagcatg gtcagtagct 720
cgcctgagcc agaaatttcc caaggetgag tttgtagaag ttaccaagct agtgacagat 780
ctcacaanaag tccacaagga atgetgcat ggtgacctac ttgaatgcgc agatgacagg 840
gcagatcttg ccaagtacat atgtgataat caagatacaa tctccagtaa actgaaggaa 900
tgctgtgata agcctttgtt ggaaaaatcc cactgeattg ctgaggtaga aaaagatgcc 960
atacctgaaa acctgcccc attaaactget gactttgctg aagataagga tgtttgcaaa 1020
aactatcagg aagcaaaaaga tgcttctctg ggctcgtttt tgtatgaata ttcaagaagg 1080
catcctgaat atgctgtctc agtgetattg agacttgcca aggaatatga agccacactg 1140

```

gaggaatgct gtgccaaga tgatccacat gcatgctatt ccacagtgtt tgacaaactt 1200
 aagcatcttg tggatgagcc tcagaattta atcaaacaaa actgtgacca attcgaaaaa 1260
 cttggagagt atggattcca aaatgcgctc atagttegtt acaccaggaa agtaccceaa 1320
 gtgtcaactc caactctcgt ggaggtttca agaagcctag gaaaagtggg tacttagtgt 1380
 tgtacaaagc cggaatcaga aagaatgccc tgtactgaag actatctgag cttgatcctg 1440
 aaccggttgt gcgtgctgca tgagaagaca ccagtgagtg aaaaagtac caagtgtgc 1500
 acagagtcat tggatgaacag acggccatgt ttctctgctc tgacacctga tgaacatat 1560
 gtacccaaaag cctttgatga gaaattgtt accttccatg cagatatatg cacacttccc 1620
 gatactgaga aacaaatcaa gaaacaaact gcactgttg agctgttgaa acacaagccc 1680
 aaggcaacag aggaacaact gaaaaccgtc atggagaatt ttgtggcttt tgtagacaag 1740
 tgctgtgcag ctgatgacaa agaagcctgc tttgctgtgg agggttccaaa acttgttgtt 1800
 tcaactcaaa cagccttagc cgggtggtgg ggttctggtg gtggtggttc tatgaaatat 1860
 acaagctatt tcttagcttt actgetctgt gggttttgg gttttctgg ttcttatggc 1920
 caggccaat ttttagaga aatagaaaac ttaaaggagt atttaatgc aagtagccca 1980
 gatgtagcta aggtggggcc tcttcttca gaaatttga agaattgaa agatgaaagt 2040
 gacaaaaaaaa ttattcagag ccaaattgtc tcttctact tcaaactctt tgaaaacctc 2100
 aaagataacc aggtcattca aaggagcatg gatatcatca agcaagacat gtttcagaag 2160
 ttcttgaatg gcagctctga gaaactggag gacttcaaaa agctgattca aattccggtg 2220
 gatgatctgc agatccagcg caaagccata aatgaactca tcaaagtgat gaatgacctg 2280
 tcacaaaaat ctaacctcag aaagcggaa agaaagtcaga atctcttctg aggccggaga 2340
 gcatcaacgg gtggtggtg ttctggtggt ggtggttctt gccacctgcc tcacaccac 2400
 agcctggcca acaggagggt cctgatgctc ctgggacaac tgaggagggt ctccccttc 2460
 tctgcctgc aggacagaaa tgacttcgca ttccccagg aggcgctggg tggcagccag 2520
 ttgcagaagg ctcaagccat ctctgtgctc cacgaggtga ccagcacac cttccagctt 2580
 ttcagcacag agggctcggc cactactggt gatgagagcc tcttgacaa gctccgcgt 2640
 gcaactggatc agcagctcac tgacctgcaa gcctgtctga ggcaggagga ggagctgcaa 2700
 ggagctcccc tgctcaagga ggactccagc ctggctgtga ggaaatactt ccacagactc 2760
 actctctatc tgcaagagaa gaaacacagc cttgtgctt gggaggttgt cagagcacia 2820
 gtcatgagag ccttctcttc ctcaacaac ttgcaggaga gtttcaggag aaaggac 2877

<210> 3

<211> 2877

<212> DNA

<213> 基因组2

<400> 3

atgaaatggg ttacctcat ctctctgctg ctgetgttct cttctgctta ctctcgtggt 60
 gttttccgtc gtgacacca caaatctgaa atcgetcacc gtttcaaaga cctgggtgaa 120
 gaacacttca aaggctctgt tctgatcget ttctctcagt acctgcagca gtgcccgttc 180
 gacgaacacg ttaaactggt taacgaactg accgaattcg ctaaacctg cgttctgac 240
 gaatctcacg ctggttgcga aaaatctctg cacacctgt tcggtgacga actgtgcaaa 300

gttgcttctc tgcgtgaaac ctacggtgac atggetgact gctgcgaaaa acaggaaccg 360
 gaacgtaacg aatgcttcct gtctcaciaa gacgactctc cggacctgcc gaaactgaaa 420
 ccggaccgga acaccctgtg cgacgaattc aaagctgacg aaaaaaatt ctggggtaaa 480
 tacctgtacg aaatcgctcg tcgtcacccg tactttctacg ctccggaact gctgtactac 540
 gctaacaaat acaacggtgt tttccaggaa tgctgccagg ctgaagacia aggtgcttgc 600
 ctgctgccga aaatcgaaac catgctgaa aaagttctgg cttcttctgc tcgtcagcgt 660
 ctgctgttgcg cttctatcca gaaattcggg gaacgtgctc tgaaagcttg gtctgttgcg 720
 cgtctgtctc agaaattccc gaaagctgaa ttcggtgaag ttaccaaact ggttaccgac 780
 ctgaccaaaag ttcacaaaaga atgctgccac ggtgacctgc tggaatgcgc tgaccacctg 840
 gctgacctgg ctaaatacat ctgcgaciaa caggacacca tctcttctaa actgaaagaa 900
 tgctgcgaca aaccgtgctg ggaaaaatct cactgcatcg ctgaagttga aaaagacgct 960
 atcccggaaa acctgccgcc gctgacctg gacttcgctg aagaciaaga cgtttgcaaa 1020
 aactaccagg aagctaaaaga cgttttctc ggtagcttcc tgtacgaata ctctcgtcgt 1080
 caccggaat acgctgttct tgttctgctg cgtctggcta aagaatacga agctaccctg 1140
 gaagaatgct gcgctaaaaga cgacctgcac gcttctact ctaccgtttt cgacaaactg 1200
 aaacacctgg ttgacgaacc gcagaacctg atcaaacaga actgcgacca gttcgaaaaa 1260
 ctgggtgaat acggtttcca gaacgctctg atcgttctgt acacctgtaa agttccgcag 1320
 gtttctacce cgacctggt tgaagtttct cgttctctgg gtaaagttgg taccggttgc 1380
 tgcacaaaac cggaaatctga acgtatgccg tgcaccgaag actacctgctc tetgatctg 1440
 aaccgtctgt gcgttctgca cgaaaaaacc ccggttctg aaaaagttac caaatgctgc 1500
 accgaatctc tggtaaccg tcgtccgtgc ttctctctc tgacctcgga cgaaacctac 1560
 gttccgaaag ctttcgacga aaaactgtc accttcacg ctgacatctg caccctgccg 1620
 gacaccgaaa aacagatcaa aaaacagacc gctctggtg aactgctgaa acaciaaccg 1680
 aaagctaccg aagaacagct gaaaacctg atggaaaact tcggttctt cgttgaciaa 1740
 tgctgcgctg ctgacgacia agaagcttgc ttcgctgtg aaggtccgaa actggttgtt 1800
 tctaccaga ccgctctggc tgggtggtg gttctggtg gtggtggtc tatgaaatac 1860
 acctcttact tctggtctc gctgctgtc ggtctgctg gtttctctg ttcttacggt 1920
 cagggtcagt tcttccgta aatcgaaaac ctgaaagaat acttcaacgc ttcttctccg 1980
 gacgttgcta aagggtgctc gctgttctc gaaatctga aaaactggaa agacgaatct 2040
 gacaaaaaaa tcatccagtc tcagatcgtt ttttctact tcaaactgtt cgaaaacctg 2100
 aaagaciaacc aggttatcca gcgttctatg gacatcata aacaggacat gttccagaaa 2160
 ttctgaaacg gtttctctga aaaactggaa gacttcaaaa aactgatcca gatcccggtt 2220
 gacgacctgc agatccagcg taaagctatc aacgaactga tcaaagttat gaacgacctg 2280
 tctccgaaat ctaacctgcg taaacgtaaa cgttctcaga acctgttccg tggctcgtcgt 2340
 gcttctaccg gtggtggtg ttctggtggt ggtggttctt gccacctgcc gcacaccac 2400
 tctctggcta accgtcgtgt tctgatgctg ctgggtcagt tacgtcgtgt aagccctct 2460
 tcttgctgc aggacctgaa cgacttcgct ttcccgcagg aagctctggg tggttctcag 2520
 ctgcagaaag ctcaggetat ctctgttctg cacgaagtta cccagcacac cttccagctg 2580
 ttctctaccg aaggttctgc taccacctg gacgaatctc tgctggacia actgcgtgct 2640

gctctggacc agcagctgac cgacctgcag gcttgccctgc gtcaggaaga agaactgcag 2700
 ggtgctccgc tgctgaaaga agactcttct ctggctgttc gtaaatactt ccaccgtctg 2760
 accctgtacc tgcaggaaaa aaaacactct ccgtgcgctt gggaagttgt tcgtgctcag 2820
 gttatgcgtg ctttctcttc ttctaccaac ctgcaggaat ctttccgtcg taaagac 2877

<210> 4

<211> 1821

<212> DNA

<213> 牛白蛋白

<400> 4

atgaagtggg tgacttttat ttctcttctc cttctcttea gctctgctta ttccaggggt 60
 gtgtttcgtc gagatacaca caagagtgag attgctcadc ggtttaaaga tttgggagaa 120
 gaacatttta aaggcctggg actgattgcc tttctcagc atctccagca gtgtccattt 180
 gatgagcatg taaaattagt gaacgaacta actgagtttg caaaaacatg tgttgctgat 240
 gagtcccatg ccggtgtgta aaagtcaact cacactctct ttggagatga attgtgtaaa 300
 gttgcatccc ttcgtgaaac ctatggtgac atggetgact gctgtgagaa acaagagcct 360
 gaaagaaatg aatgcttctt gagccacaaa gatgatagcc cagacctccc taaattgaaa 420
 ccagacccca atactttgtg tgatgagttt aaggcagatg aaaagaagtt ttggggaaaa 480
 tacctatacg aaattgctag aagacatccc tacttttatg caccagaact cttttactat 540
 gctaataaat ataattggagt tttcaagaa tgctgcccaag ctgaagataa aggtgctgc 600
 ctgctaccaa agattgaaac tatgagagaa aaggctactag cttcatctgc cagacagaga 660
 ctcaggtgtg ccagtattca aaaatttggg gaaagagctt taaaagcatg gtcagtagct 720
 cgctgagcc agaaatttcc caaggctgag tttgtagaag ttaccaagct agtgacagat 780
 ctacacaaaag tccacaagga atgctgccat ggtgacctac ttgaatgcgc agatgacagg 840
 gcagatcttg ccaagtacat atgtgataat caagatacaa tctccagtaa actgaaggaa 900
 tgctgtgata agcctttgtt ggaaaaatcc cactgcattg ctgaggtaga aaaagatgcc 960
 atacctgaaa acctgcccc attaactgct gactttgctg aagataagga tgtttgcaaa 1020
 aactatcagg aagcaaaaaga tgccttctct ggctcgtttt tgtatgaata ttcaagaagg 1080
 catcctgaat atgctgtctc agtgctattg agacttgcca aggaatatga agccacactg 1140
 gaggaatgct gtgccaaaaga tgatccacat gcattgctatt ccacagtgtt tgacaaactt 1200
 aagcatcttg tggatgagcc tcagaattta atcaaacaaa actgtgacca attcgaaaaa 1260
 cttggagagt atggattcca aaatgcgctc atagttcgtt acaccaggaa agtaccceaa 1320
 gtgtcaactc caactctcgt ggaggtttca agaagcctag gaaaagtggg tactaggtgt 1380
 tgtacaaaagc cggaatcaga aagaatgccc tgtactgaag actatctgag cttgatcctg 1440
 aaccggttg gcgtgctgca tgagaagaca ccagtgagtg aaaaagtcac caagtgtgc 1500
 acagagtcat tggatgaacag acggccatgt ttctctgctc tgacacctga tgaacatat 1560
 gtacccaaaag cctttgatga gaaattgttc accttccatg cagatatatg cacacttccc 1620
 gatactgaga aacaaatcaa gaaacaaact gcaattgttg agctgttgaa acacaagccc 1680
 aaggcaacag aggaacaact gaaaaccgtc atggagaatt ttgtggcttt tgtagacaag 1740
 tgctgtgcag ctgatgacaa agaagcctgc tttgctgtgg aggttccaaa acttgttgtt 1800

tcaactcaaa cagccttagc c 1821

<210> 5

<211> 498

<212> DNA

<213> 牛IFN- γ

<400> 5

atgaaatata caagctatth cttagcttta ctgctctgtg ggcttttggg tttttctggt 60
 tcttatggcc agggccaatt ttttagagaa atagaaaact taaaggagta ttttaatgca 120
 agtagcccag atgtagctaa ggggtggcct ctcttctcag aaatthtgaa gaattggaaa 180
 gatgaaagtg acaaaaaaat tattcagagc caaattgtct cettctactt caaactcttt 240
 gaaaacctca aagataacca ggtcattcaa aggagcatgg atatcatcaa gcaagacatg 300
 tttcagaagt tcttgaatgg cagctctgag aaactggagg acttcaaaaa gctgattcaa 360
 attccggtgg atgatctgca gatccagcgc aaagccataa atgaactcat caaagtgatg 420
 aatgacctgt caccaaaaac taacctcaga aagcggaga gaagtcagaa tctctttcga 480
 ggccggagag catcaacg 498

<210> 6

<211> 498

<212> DNA

<213> 牛IFN- α

<400> 6

tgccacctgc ctacaccca cagcctggcc aacaggaggg tctgatget cctgggacaa 60
 ctgaggaggg tctcccctc ctctgcctg caggacagaa atgacttegc attccccag 120
 gaggcgctgg gtggcagcca gttgcagaag gctcaagcca tctctgtgct ccacgaggtg 180
 acccagcaca cctccagct tttcagcaca gagggetcgg ccactacgtg ggatgagagc 240
 ctcttgaca agctccgcgc tgcactggat cagcagctca ctgacctgca agcctgtctg 300
 aggcaggagg aggagctgca aggagctccc ctgctcaagg aggactccag cctggctgtg 360
 aggaaatact tccacagact cactctctat ctgcaagaga agaaacacag cccttgtgcc 420
 tgggaggttg tcagagcaca agtcatgaga gccttctctt cctcaacaaa cttgcaggag 480
 agtttcagga gaaaggac 498

<210> 7

<211> 1821

<212> DNA

<213> 牛白蛋白

<400> 7

atgaaatggg ttacctcat ctctctgtg ctgetgttct cttctgetta ctctcgtggt 60
 gttttccgtc gtgacacca caaatctgaa atcgetcacc gtttcaaaga cctgggtgaa 120
 gaacacttca aaggctctgt tctgatcget ttctctcagt acctgcagca gtgcccgttc 180
 gacgaacacg ttaaactggt taacgaactg accgaattcg ctaaacctg cgttgctgac 240
 gaatctcacg ctggttgcga aaaatctctg cacacctgt tcggtgacga actgtgcaaa 300

gttgcttctc tgcgtgaaac ctacggtgac atggetgact gctgcgaaaa acaggaaccg 360
 gaacgtaacg aatgcttctc gtctcaciaa gacgactctc cggacctgcc gaaactgaaa 420
 ccggaccgga acaccctgtg cgacgaattc aaagctgacg aaaaaaatt ctggggtaaa 480
 tacctgtacg aaatcgctcg tcgtcacccg tacttctacg ctccggaact gctgtactac 540
 gctaacaaat acaacggtgt tttccaggaa tgctgccagg ctgaagacia aggtgcttgc 600
 ctgctgccga aaatcgaaac catgctgaa aaagttctgg cttcttctgc tcgtcagcgt 660
 ctgctgttgcg cttctatcca gaaattcggg gaacgtgctc tgaaagcttg gtctgttgcg 720
 cgtctgtctc agaaattccc gaaagctgaa ttcgttgaag ttaccaaact ggttaccgac 780
 ctgaccaaaag ttcacaaaaga atgctgccac ggtgacctgc tggaatgcgc tgaccacctg 840
 gctgacctgg ctaaatacat ctgcgaciaa caggacacca tctcttctaa actgaaagaa 900
 tgctgcgaca aaccgctgct ggaaaaatct cactgcatcg ctgaagttga aaaagacgct 960
 atccccgaaa acctgccgcc gctgacctg gacttcgctg aagaciaaga cgtttgcaaa 1020
 aactaccagg aagctaaaaga cgettttctc ggtagcttcc tgtacgaata ctctcgtcgt 1080
 cacccggaat acgctgttct tgttctgctg cgtctggcta aagaatacga agctaccctg 1140
 gaagaatgct gcgctaaaaga cgaccgcac gcttctact ctaccgtttt cgacaaactg 1200
 aaacacctgg ttgacgaacc gcagaacctg atcaaacaga actgcgacca gttcgaaaaa 1260
 ctgggtgaat acggtttcca gaacgctctg atcgttctgt acaccgtaa agttccgcag 1320
 gtttctacce cgaccctggt tgaagtttct cgttctctgg gtaaagttgg taccggttgc 1380
 tgcacaaaac cggaatctga acgtatgccg tgcaccgaag actacctgct tetgatctg 1440
 aaccgtctgt gcgttctgca cgaaaaaacc ccggttctg aaaaagttac caaatgctgc 1500
 accgaatctc tggtaaccg tcgtccgtgc ttctctctc tgaccccgga cgaaacctac 1560
 gttccgaaag ctttcgacga aaaactgttc accttcacg ctgacatctg caccctgccg 1620
 gacaccgaaa aacagatcaa aaaacagacc gctctggttg aactgctgaa acaciaaccg 1680
 aaagctaccg aagaacagct gaaaaccgtt atggaaaact tcgttgcttt cgttgaciaa 1740
 tgctgcgctg ctgacgacia agaagcttgc ttcgctgttg aaggctcgaa actggttgtt 1800
 tctaccaga ccgctctggc t 1821

<210> 8

<211> 498

<212> DNA

<213> 牛IFN- γ

<400> 8

atgaaataca cctcttactt cctggetctg ctgctgtgcg gtctgctggg tttctctggt 60
 tcttacggctc agggctcagtt cttccgtgaa atcgaaaacc tgaaagaata cttcaacgct 120
 tcttctccgg acgttgctaa aggtggctccg ctgttctctg aatcctgaa aaactggaaa 180
 gacgaatctg acaaaaaaat catccagtct cagatcgttt ctttctactt caaactgttc 240
 gaaaacctga aagaciaacca ggttatccag cgttctatgg acatcatcaa acaggacatg 300
 ttccagaaat tctgaacgg ttcttctgaa aaactggaag acttcaaaaa actgatccag 360
 atcccggttg acgacctgca gatccagcgt aaagctatca acgaactgat caaagttatg 420
 aacgacctgt ctccgaaatc taacctgcgt aaacgtaaac gttctcagaa cctgttccgt 480

ggtcgctcgtg cttctacc 498

<210> 9

<211> 498

<212> DNA

<213> 牛IFN- α

<400> 9

tgccacctgc cgcacacca ctctctgget aaccgctcgtg ttctgatgct gctgggtcag 60

ttacgctcgtg taagcccgtc ttcttgectg caggaccgta acgacttcgc tttcccgcag 120

gaagctctgg gtggttctca gctgcagaaa gctcaggeta tctctgttct gcacgaagtt 180

accagcaca cttccagct gttctctacc gaaggttctg ctaccacctg ggacgaatct 240

ctgctggaca aactgcgtgc tgetctggac cagcagctga cggacctgca ggcttgectg 300

cgtcaggaag aagaactgca ggggtgetccg ctgctgaaag aagactette tctggctggt 360

cgtaaatact tccaccgtct gacctgtac ctgcaggaaa aaaaacactc tccgtgcgct 420

tgggaagttg ttcgtgetca ggttatgect getttctett cttctaccaa cctgcaggaa 480

tctttccgtc gtaaagac 498

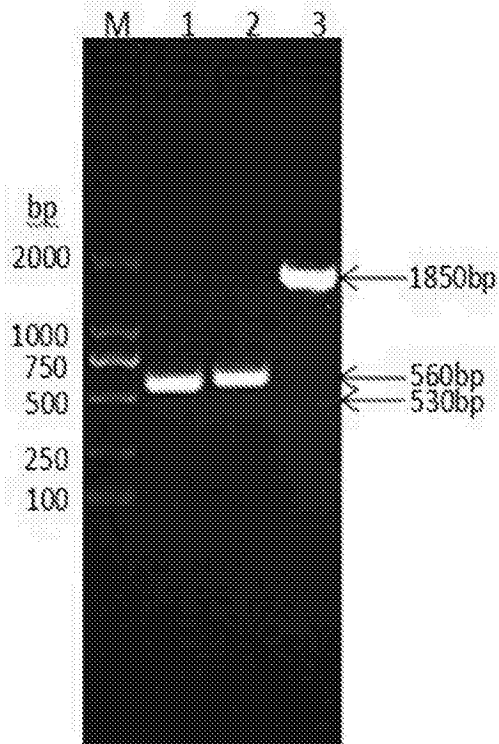


图1

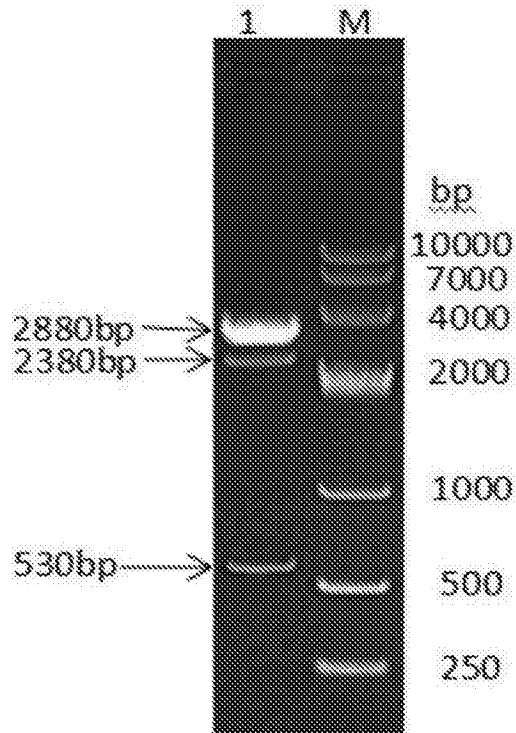


图2

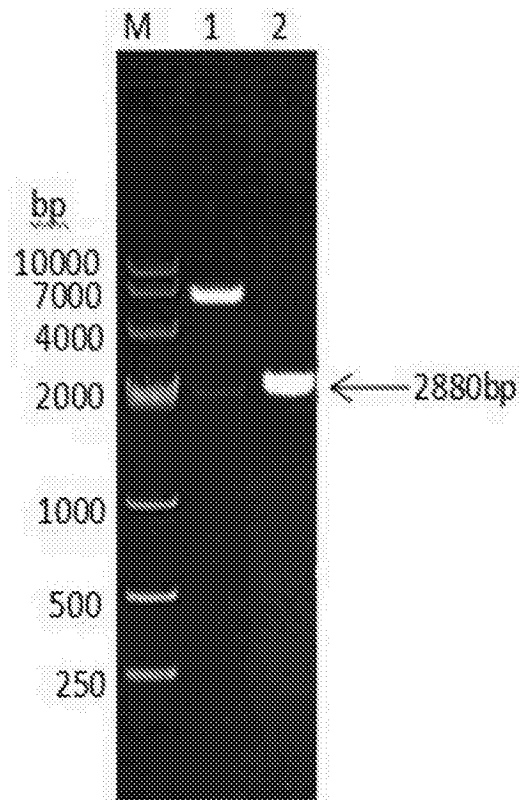


图3

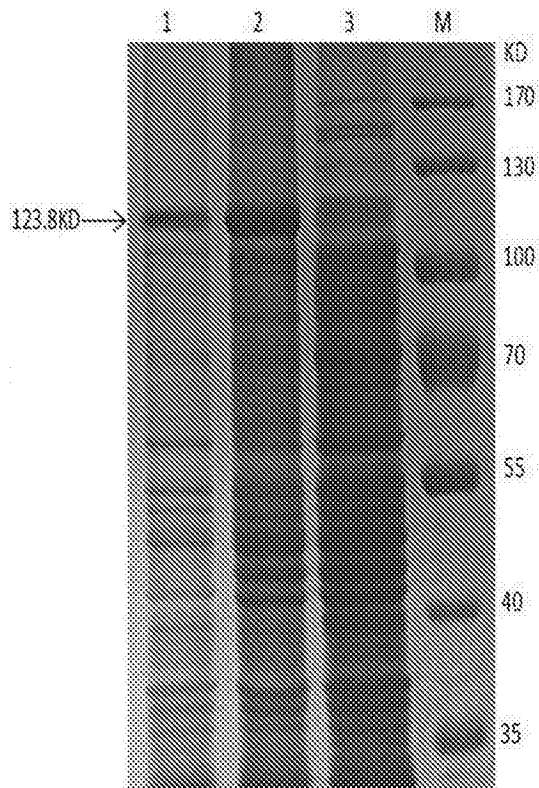


图4

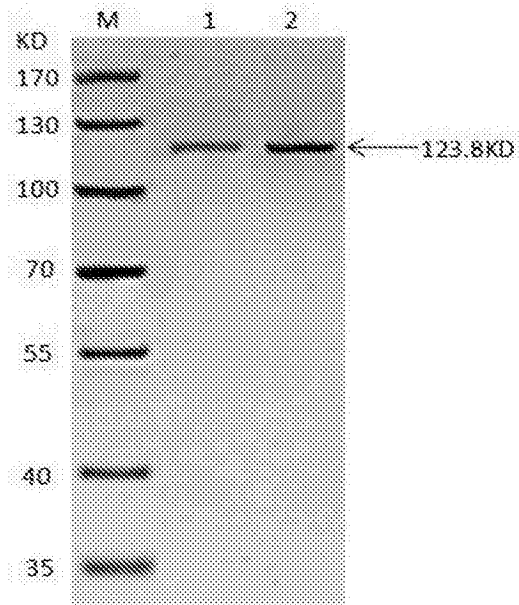


图5

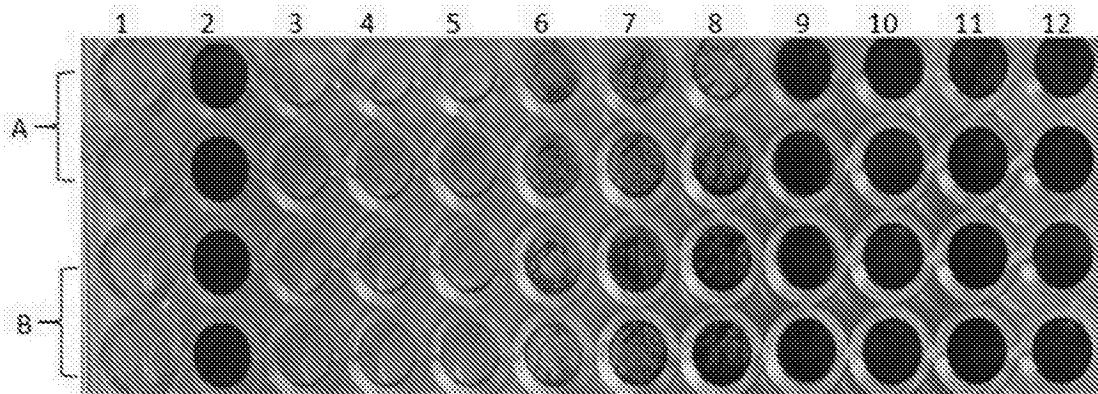


图6

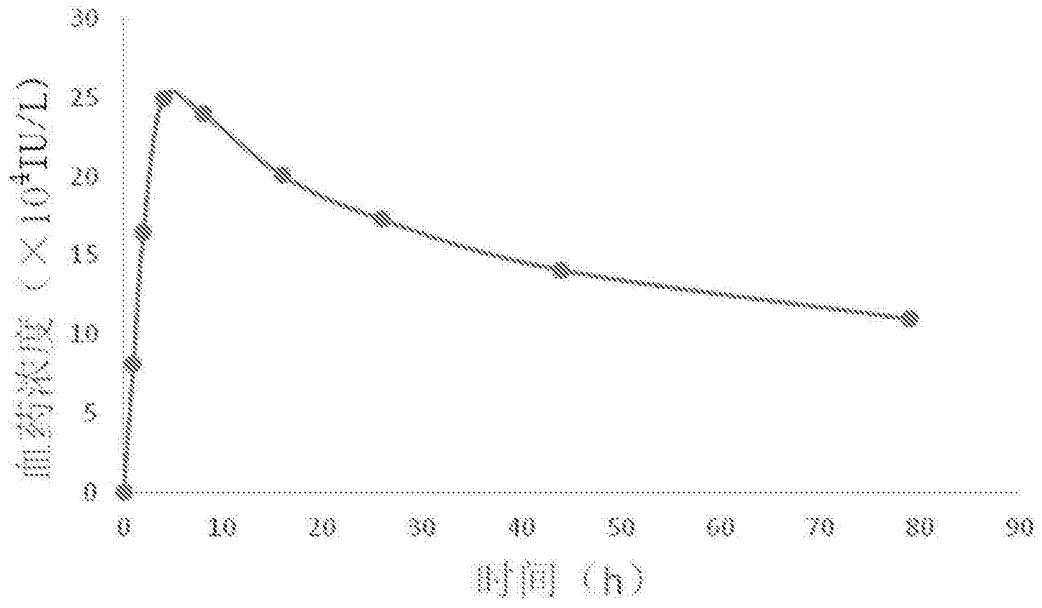


图7