



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103421115 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 04

(21) 申请号 201310392116. X

(22) 申请日 2013. 09. 02

(71) 申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼 2 号

(72) 发明人 万亚坤 孙燕燕 王平艳

(74) 专利代理机构 江苏永衡昭辉律师事务所

32250

代理人 王斌

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

C12R 1/19(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

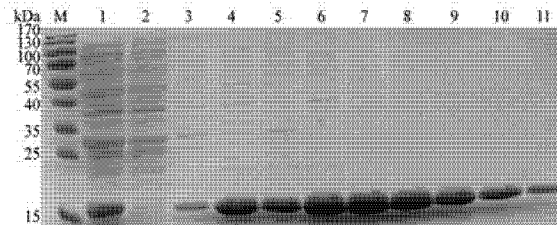
序列表9页 附图2页

(54) 发明名称

一种 CD38 纳米抗体及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种 CD38 的纳米抗体的 VHH 链,包括框架区 FR 和互补决定区 CDR,公开了框架区 FR 选自下组的 FR 的氨基酸序列和互补决定区 CDR 氨基酸序列,本发明还公开了一种 CD38 纳米抗体,还公开了一种 DNA 分子,它编码本发明所述的 CD38 的纳米抗体的 VHH 链或本发明所述的 CD38 纳米抗体,还公开了一种宿主细胞,它可以表达 CD38 的纳米抗体。还公开了该 CD38 纳米抗体用于检测 CD38 的用途。通过本发明所公布的纳米抗体基因序列及宿主细胞,该纳米抗体能够在大肠杆菌内高效表达,应用于 CD38 检测试剂的研发。



1. 一种 CD38 的纳米抗体的 VHH 链,包括框架区 FR 和互补决定区 CDR,其特征在于,所述框架区 FR 选自下组的 FR 的氨基酸序列:

SEQ ID NO :1 所示的 FR1, SEQ ID NO :2 所示的 FR2, SEQ ID NO :3 所示的 FR3, SEQ ID NO :4 所示的 FR4;

或 SEQ ID NO :5 所示的 FR1, SEQ ID NO :6 所示的 FR2, SEQ ID NO :7 所示的 FR3, SEQ ID NO :8 所示的 FR4;

所述互补决定区 CDR 选自下组的 CDR 的氨基酸序列:

SEQ ID NO :9 所示的 CDR1, SEQ ID NO :10 所示的 CDR2, SEQ ID NO :11 所示的 CDR3;

或 SEQ ID NO :12 所示的 CDR1, SEQ ID NO :13 所示的 CDR2, SEQ ID NO :14 所示的 CDR3。

2. 根据权利要求 1 所述的 CD38 的纳米抗体的 VHH 链,其特征在于,它具有 SEQ ID NO :15 或 SEQ ID NO :16 所示的氨基酸序列。

3. 一种 CD38 纳米抗体,其特征在于,它针对 CD38 表位的纳米抗体,包括具有 SEQ ID NO :15 或 SEQ ID NO :16 所示氨基酸序列的 VHH 链。

4. 一种 DNA 分子,其特征在于,它编码选自下组的蛋白质:权利要求 1 或 2 所述的 CD38 的纳米抗体的 VHH 链,或权利要求 3 所述的 CD38 纳米抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的 DNA 分子,其特征在于,它具有选自下组的 DNA 序列:

SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18。

6. 一种表达载体,其特征在于,它含 SEQ ID NO :17 和 SEQ ID NO :18 所示的核苷酸序列。

7. 一种宿主细胞,其特征在于,它可以表达 CD38 的纳米抗体。

8. 权利要求 3 所述的 CD38 纳米抗体用于检测 CD38 的用途。

## 一种 CD38 纳米抗体及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医学或生物制药技术领域,涉及一种针对于 CD38 的纳米抗体。

### 背景技术

[0002] 人 CD38 分子是在 20 世纪 80 年代早期由 Reinnerz 等用单克隆抗体的方法鉴定出来的,定名为 T10,最初被认为是一种活化抗原,主要用于白细胞分类及表型鉴定。CD38 分子表达与分布相当广泛,主要表达在不成熟的造血细胞和活化的淋巴样细胞,在骨骼肌、心肌、气道平滑肌和子宫平滑肌 CD38 分子也有表达。尤其是在淋巴细胞中表达的特点,表明它可能在细胞的某个成熟阶段参与细胞生长与分化的调节,所以在慢性淋巴细胞白血血病中 CD38 分子有独立的预测价值。同时 CD38 分子可以作为反映类风湿性关节炎病情活动的有效指标,CD38 分子在 CD8+ 细胞上的表达可以作为残留病毒复制的指标。CD38 分子自身免疫反应性糖尿病的诊断指标,并可用于艾滋病及巨细胞病毒的检测及系统性红斑狼疮的病情监测。

[0003] 目前市场上用于检测 CD38 的试剂盒主要是“白细胞分化抗原 CD38 检测试剂盒”(流式细胞仪法-FITC)的工作原理主要通过 FITC 荧光素标记的抗 CD38 单克隆抗体来实现的,但是这种传统意义上的抗体稳定性差、灵敏度低、生产成本低,所有因素均限制了对 CD38 的检测。1993 年比利时科学家首次在 Nature 报道:在骆驼血液中的抗体,有一半没有轻链,而且更让人惊喜的是,这些缺失轻链的“重链抗体”能像正常抗体一样与抗原等靶标紧密结合,另外不像 scFv 那样互相粘连,甚至聚集成块。这种抗体只包含一个重链可变区和两个常规的 CH2 与 CH3 区,更重要的是单独克隆并表达出来的 VHH 区具有很好的结构稳定性与抗原结合活性,分子量只是普通抗体的 1/10,所以 VHH 也称 Nanobody (纳米抗体);与此同时纳米抗体化学性质也更加灵活,稳定性好,可溶性高,表达容易且容易获得,容易偶联其他分子,因此应用纳米抗体技术研发 CD38 检测试剂具有广阔的前景。

### 发明内容

[0004] 发明目的:本发明所要解决的技术问题是提供一种针对 CD38 表位的纳米抗体,同时提供该纳米抗体的编码序列及该纳米抗体在制备检测的应用。

[0005] 技术方案:为实现上述目的,本发明的第一方面,提供了一种 CD38 的纳米抗体的 VHH 链,包括框架区 FR 和互补决定区 CDR,所述框架区 FR 选自下组的 FR 的氨基酸序列:SEQ ID NO:1 所示的 FR1,SEQ ID NO:2 所示的 FR2,SEQ ID NO:3 所示的 FR3,SEQ ID NO:4 所示的 FR4;或 SEQ ID NO:5 所示的 FR1,SEQ ID NO:6 所示的 FR2,SEQ ID NO:7 所示的 FR3,SEQ ID NO:8 所示的 FR4;

[0006] 所述互补决定区 CDR 选自下组的 CDR 的氨基酸序列:

[0007] SEQ ID NO:9 所示的 CDR1,SEQ ID NO:10 所示的 CDR2,SEQ ID NO:11 所示的 CDR3;或 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1,SEQ ID NO:13 所示的 CDR2,SEQ ID NO:14 所示的 CDR3;

[0008] 优选地,所述的 CD38 的纳米抗体的 VHH 链,它具有 SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:

16 所示的氨基酸序列。

[0009] 本发明第二方面,一种 CD38 纳米抗体,它针对 CD38 表位的纳米抗体,包括两条具有 SEQ ID NO:15 和 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列的 VHH 链。

[0010] 本发明第三方面,提供了一种 DNA 分子,它编码选自下组的蛋白质:本发明所述的 CD38 的纳米抗体的 VHH 链,或本发明所述的 CD38 纳米抗体。

[0011] 优选地,所述的 DNA 分子,其特征在于,它具有选自下组的 DNA 序列:SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18

[0012] 本发明的第四方面,提供了一种表达载体,它含 SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:18

[0013] 所示的核苷酸序列。

[0014] 本发明的第五方面,提供了一种宿主细胞,其特征在于,它含有权利要求 6 所述的表达载体。

[0015] 本发明的第六方面,提供了本发明所述的 CD38 纳米抗体用于检测 CD38 的用途。

[0016] 有益效果:与现有技术相比,本发明的优点如下:本发明将 CD38 抗原胞外段多肽人工合成,并随之免疫新疆双峰驼,随后利用该骆驼外周血淋巴细胞建立了针对于 CD38 的纳米抗体基因库,试验中将 CD38 多肽偶联在酶标板上,以此形式的抗原利用噬菌体展示技术筛选免疫性的纳米抗体基因库(骆驼重链抗体噬菌体展示基因库),从而获得了针对 CD38 特异性的纳米抗体基因,将此基因转至大肠杆菌中,从而建立了能在大肠杆菌中高效表达的纳米抗体株。

#### 附图说明

[0017] 图 1 是纳米抗体的基因电泳图;其中泳道 1 是 DNA 分子标准,泳道 2 是 PCR 扩增重链抗体可变区片段

[0018] 图 2 是对于所构建的 CD38 特异性的单域抗体文库进行的菌落 PCR 电泳图;其中泳道 1 是 DNA 分子标准,泳道 2-25 是在所构建的 CD38 纳米抗体文库中随机的挑取克隆,通过菌落 PCR 检测文库的插入率,计算结果表明文库插入率至 100%。

[0019] 图 3 是用噬菌体的酶联免疫方法(ELISA)筛选特异性单个阳性克隆的模式图;其中 1 是将载脂蛋白偶联在酶标板上,2 是纳米抗体,3 是鼠抗 HA 抗体,4 是山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记的抗体,5 是碱性磷酸酶显色液;

[0020] 图 4 是表达的 CD38 纳米抗体,经镍柱树脂凝胶亲和层析纯化后的 SDS-PAGE 的电泳图;其中泳道 1 是蛋白分子标准,泳道 2 是破菌后蛋白总的粗提液样品,泳道 3 是总的蛋白粗提液过镍柱后的样品,泳道 4 是含 50 毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱的样品,泳道 5 是含 100 毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱的样品,6-7 是 250 毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱的样品,8-11 是 500 毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱的样品;

[0021] 图 5 CD38 纳米抗体检测特异性分析结果。

#### 具体实施方式

[0022] 本发明首先将人工合成的 CD38 多肽免疫一只新疆双峰驼,经过 4 次免疫之后提取该双峰驼外周血淋巴细胞并构建了 CD38 特异的单域重链抗体文库。将 CD38 偶联在 NUNC 酶标板上,展示蛋白质的正确空间结构,使得 CD38 的抗原表位得以暴露出来,以此形式的

抗原利用噬菌体展示技术筛选 CD38 免疫性的纳米抗体基因库(骆驼重链抗体噬菌体展示基因库),而获得了能在大肠杆菌中高效表达的纳米抗体株。

[0023] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0024] 实施例 1:针对于 CD38 的纳米抗体文库的构建:

[0025] (1) 将人工合成的 CD38 多肽,由南京金斯瑞公司合成,其序列为 GenBank:BAA18966.1,浓度为 500 微克每毫升,每次免疫将 20mgCD38 与弗氏佐剂等体积混合,免疫一只新疆双峰驼(句容圣龙家畜养殖厂),每周一次,共免疫 4 次,除第一次使用完全的弗氏佐剂,剩余几次全部使用弗式不全佐剂,免疫过程中刺激 B 细胞表达抗原特异性的纳米抗体。(2) 4 次免疫结束后,提取骆驼外周血淋巴细胞 100ml 并提取总 RNA,参照 QIAGEN 公司提供的 RNA 提取试剂盒。(3) 按照 Super-Script III FIRST STRANDSUPERMIX 试剂盒说明书,将提取的 RNA 反转录成 cDNA 并利用套式 PCR 扩增 VHH 链,第一轮 PCR:

[0026] 上游引物 GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC

[0027] 下游:GGTACGTGCTGTTGAAGTCTCC

[0028] 扩增重链抗体引导肽和抗体 CH2 之间的片段,54℃退火,25 个循环;

[0029] 第二轮 PCR:

[0030] 以第一轮 PCR 产物作模板,

[0031] 上游引物:GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

[0032] 下游引物:GGACTAGTGCAGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT 扩增重链抗体 FR1 区和长、短铰链区之间的片段(长片段和短片段),60 退火,17 个循环,回收目的片段,结果如图 1 显示,从左到右的 DNA 条带分别是:第一为 100bp 的分子 Marker,第二纳米抗体基因电泳带约为 500bp。(4) 使用限制性的内切酶(购自 NEB) PstI 及 NotI 酶切 20 μg pComb3 噬菌体展示载体(Biovector 供应)及 10 μg VHH,并用 T4DNA 连接酶(购自 TaKaRa 公司)连接两个片段。(5) 将连接产物电转化至电转感受态细胞 TG1(北京神州红叶科技有限公司)中,构建 CD38 的纳米抗体噬菌体展示文库并测定库容,库容的大小为  $1.5 \times 10^8$ ;与此同时,通过菌落 PCR 检测所建文库的插入率检测结果插入率约 100%,图 3 显示菌落 PCR 结果。文库构建完成后,为检测文库的插入率,我们随机的选取 24 颗克隆做菌落 PCR。结果显示:即我们的插入率已达到 100%。

[0033] 实施例 2:针对 CD38 的纳米抗体筛选过程:

[0034] (1)将溶解在 100 毫摩 pH8.2NaHCO<sub>3</sub> 中的 CD38200 微克偶联在 NUNC 酶标板上,4℃放置过夜,同时设立负对照。(2) 第二天两个孔中分别加入 100 微升 0.1% 酪蛋白,室温封闭 2 小时。(3) 2 小时后,加入 100 μl 噬菌体( $8 \times 10^{11}$ tfu 免疫骆驼纳米抗体噬菌展示基因库),在室温下作用 1 小时。(4) 用 PBST(PBS 中含有 0.05% 吐温 20)洗 5 遍,以洗掉不结合的噬菌体。(5) 用三乙基胺(100mM)将与 CD38 特异性结合的噬菌体解离下,并感染处于对数期生长的大肠杆菌 TG1,产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选,相同筛选过程重复 3-4 轮。在不断地筛选的过程中,阳性的克隆将不断的被富集,从而达到了利用噬菌体展示技术筛选抗体库中 CD38 特异抗体的目的。该实验的原理模式图如图 4 所示。

[0035] 实施例 3:用噬菌体的酶联免疫方法(ELISA)筛选特异性单个阳性克隆:

[0036] (1)从上述 3-4 轮筛选后含有噬菌体的细胞培养皿中,挑选 96 个单个菌落并接种于含有 100 微克每毫升的氨苄青霉素的 TB 培养基(1 升 TB 培养基中含有 2.3 克磷酸二氢

钾, 12.52 克磷酸氢二钾, 12 克蛋白胨, 24 克酵母提取物, 4 毫升甘油) 中, 生长至对数期后, 加终浓度 1 毫摩尔的 IPTG, 28°C 培养过夜。(2) 利用渗透法获得粗提抗体, 并将抗体转移到经抗原包被的 ELISA 板中, 在室温下放置 1 小时。(3) 用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入一 mouse anti-HA tag antibody(抗鼠抗 HA 抗体, 购自北京康为世纪生物科技有限公司), 在室温下放置 1 小时。(4) 用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入 anti-mouse alkaline phosphatase conjugate (山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记抗体, 购自艾美捷科技有限公司), 在室温下放置 1 小时。(5) 用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入碱性磷酸酶显色液, 于 ELISA 仪上, 在 405nm 波长, 读取吸收值。(6) 当样品孔 OD 值大于对照孔 OD 值 3 倍以上时, 判为阳性克隆孔。(7) 将阳性克隆孔的菌转摇在含有 100 微克每毫升的 LB 液体中以便提取质粒并进行测序。

[0037] 根据序列比对软件 VectorNTI 分析各个克隆株的基因序列, 把 CDR1, CDR2, CDR3 序列相同的株视为同一克隆株, 而其序列不同的株视为不同克隆株, 最终共有 2 株不同的抗体。其抗体的 VHH 链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :16 所示。

[0038] 实施例 4 : 纳米抗体在宿主菌大肠杆菌中表达、纯化 :

[0039] (1) 将前面测序分析所获得两种纳米抗体亚克隆至表达性的载体 PET32b 中, 并将测序鉴定正确的重组质粒转化到表达型宿主菌 DE3 中, 其涂布在含有 100 微克每毫升氨苄青霉素的 LB 固体培养基的板上, 37°C 过夜, (2) 挑选单个菌落接种在 15 毫升含有氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37°C 摇床培养过夜, (3) 接种 1ml 的过夜菌种至 330ml LB 培养基中, 37°C 摇床培养, 培养到 OD 值达到 0.6-1 时, 加入 IPTG, 28°C 摇床培养过夜, (4) 第二天, 离心收菌, (5) 将菌体破碎以获得抗体粗提液, (6) 经镍柱离子亲和层析纯化抗体蛋白, 为获得高纯度的抗体, 采用咪唑梯度洗脱法, 低浓度咪唑洗脱液 (50 毫摩尔, 100 毫摩尔) 用于洗去杂带, 高浓度咪唑洗脱液 (250 毫摩尔, 500 毫摩尔) 最终可制备纯度达 90% 以上的蛋白。图 5 所示从左到右的条带分别是 : 第一为标准蛋白分子, 第二为破菌后蛋白总的粗提液样品, 第三为总的蛋白粗提液过镍柱后的样品, 第四为含有 50 毫摩咪唑的洗脱液洗脱的样品, 第五为含有 100 毫摩咪唑的洗脱液洗脱的样品, 第六, 七为含有 250 毫摩咪唑的洗脱液洗脱样品, 第八、九、十为含有 500 毫摩咪唑的洗脱液洗脱样品 ; 结果显示, 纳米抗体经过该纯化后, 其纯度可达到 95% 以上。

[0040] 实施例 5 CD38 纳米抗体检测特异性分析

[0041] 将 CD38, 前白蛋白碳酸盐透析后包被在酶标板上, 同时做空白孔对照, 各包被两个孔, 将 CD38 纳米抗体及对照抗体前白蛋白纳米抗体分别转移到经抗原包被的 ELISA 板中, 在室温下放置 1 小时。(3) 用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入一抗 mouse anti-HA tag antibody (抗鼠抗 HA 抗体, 购自北京康为世纪生物科技有限公司), 在室温下放置 1 小时。(4) 用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入二抗 anti-mouse alkaline phosphatase conjugate (山羊抗小鼠碱性磷酸酶标记抗体, 购自艾美捷科技有限公司), 在室温下放置 1 小时。(5) 用 PBST 洗去未结合的抗体, 加入碱性磷酸酶显色液, 于 ELISA 仪上, 在 405nm 波长, 读取吸收值。结果显示 CD38 纳米抗体能特异性的识别 CD38。模式图见图 5, 结果如下 :

[0042]

包被抗体 OD405 加入抗体	包被 CD38	包被前白蛋白	空白对照
加入 CD38 纳米抗体 1	3.215	0.302	0.254
加入 CD38 纳米抗体 2	3.345	0.254	0.285
加入前白蛋白纳米抗体	0.212	3.145	0.231

[0043] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,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。

## SEQUENCE LISTING

<110> 东南大学

<120> 一种 CD38 纳米抗体、其编码序列及应用

<130>

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly  
1                   5                   10                   15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
                  20                   25

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Leu Gly Gln Glu Arg Glu Gly Val Ala  
1                   5                   10                   15



Ala

<210> 3  
 <211> 38  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 3

Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly  
 1                   5                   10                   15

Asp Lys Asn Val Ala Tyr Leu Glu Met His Asn Leu Arg Pro Asp Asp  
                   20                   25                   30

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                   35

<210> 4  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 4

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 1                   5                   10

<210> 5  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly  
 1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
                   20                    25

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Leu Gly Gln Glu Arg Glu Gly Val Ala  
 1                    5                    10                    15

Ala

<210> 7

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly  
 1                    5                    10                    15

Asp Lys Asn Val Ala Tyr Leu Glu Met His Asn Leu Arg Pro Asp Asp  
                   20                    25                    30

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
35

<210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 8

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
1 5 10

<210> 9  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 9

Glu Tyr Asn Phe Ser Thr Phe Cys  
1 5

<210> 10  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<400> 10

Ile Ser Thr Asn Pro Leu Pro Thr  
1 5

<210> 11



<213> 人工序列

<400> 14

Ala Ala His Arg Val Cys Arg Val Leu Cys Ser Gln Arg Asn Tyr Val  
 1                    5                    10                    15

Tyr

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly  
 1                    5                    10                    15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Asn Phe Ser Thr Phe  
                   20                    25                    30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Leu Gly Gln Glu Arg Glu Gly Val  
                   35                    40                    45

Ala Ala Ile Ser Thr Asn Pro Leu Pro Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                    55                    60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Asp Lys Asn Val Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

Leu Glu Met His Asn Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Asp Arg Leu Cys Gly Ala Leu Cys Ser Gln Thr Gln Phe Asp  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 16

<211> 124

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Tyr Thr Ser Cys Thr Ser  
 20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Leu Gly Gln Glu Arg Glu Gly Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Lys Ile Gly Leu Ala Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Asp Lys Asn Val Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Glu Met His Asn Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala His Arg Val Cys Arg Val Leu Cys Ser Gln Arg Asn Tyr Val  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 17

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tgggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60

tcctgtgcag cctctgaata caacttcagt accttctgca tgggctgggt cgcaccaggt 120

ctcgggcagg agcgcgaggg ggtcgctgct atttccacga atcctctgcc cacagcctat 180

gccgactcag tgaagggccg attcaccatc tctcgagacg gcgacaagaa cgtggcgtat 240

ctggaaatgc acaacctgag acctgacgac actgccatgt actactgtgc ggcagaccga 300

ctgtgcggtg cgttgtgctc acagacgcag ttcgactact ggggccaggg gaccaggtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 18

<211> 372

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

---

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagge tgggtgcagg ctggagggtc tctgagactc	60
tcctgtgcag cctctgaata cacctcctgt acctcctgca tgggctgggtt ccgccaggct	120
ctcgggcagg agcgcgaggg ggtegetget atttccaaga ttggtctggc gactgcctat	180
gccgactcag tgaagggccg attcaccate tctcgagacg gcgacaagaa cgtggcgtat	240
ctggaatgc acaacctgag acctgacgac actgccatgt actactgtgc ggcacaccga	300
gtgtgcccg tgttgctc acagaggaac tacgtctact ggggccagg gaccaggtc	360
accgtctcct ca	372



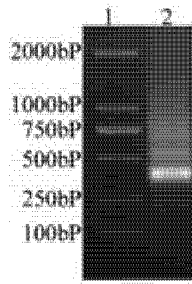


图 1

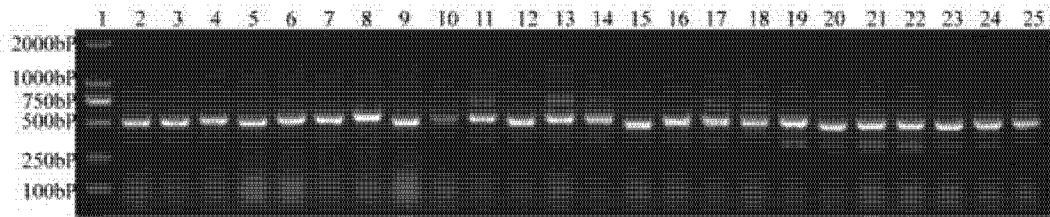


图 2

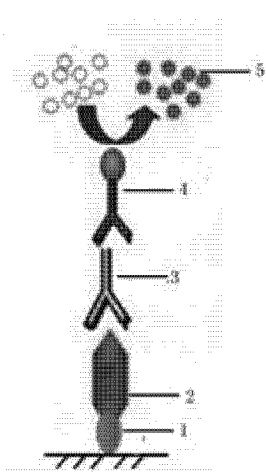


图 3

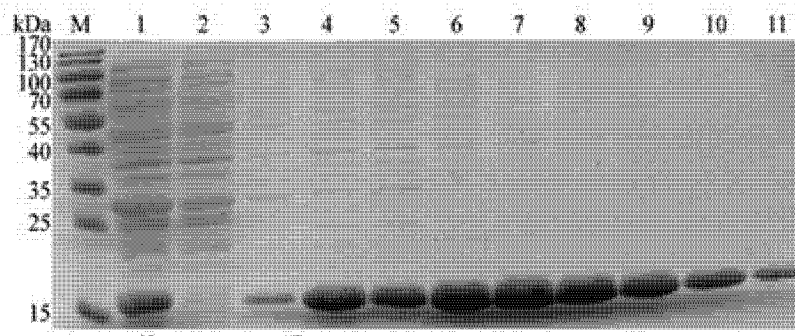


图 4

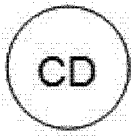

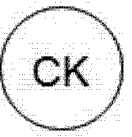

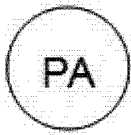
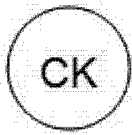
			加入前白蛋
			加 入

图 5