



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111363043 B

(45) 授权公告日 2021.07.23

(21) 申请号 202010273739.5

(22) 申请日 2020.04.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111363043 A

(43) 申请公布日 2020.07.03

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.17491 2019.04.03

(73) 专利权人 福州迈新生物技术开发有限公司
地址 350108 福建省福州市闽侯县科技东
路3号福州高新区海西高新技术产业
园创新园12号楼

(72) 发明人 陈惠玲 杨清海 陈昌星 高惠然
俞丽娜 王小亚

(74) 专利代理机构 福州市景弘专利代理事务所
(普通合伙) 35219

代理人 方圆 林祥翔

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 101848731 A, 2010.09.29
US 2014100359 A1, 2014.04.10
WO 2012175874 A1, 2012.12.27
CN 107446046 A, 2017.12.08

审查员 段珊

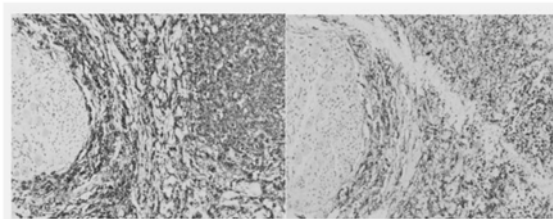
权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

抗CD20蛋白单克隆抗体、细胞系及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及生物检测领域,提供了一种抗CD20蛋白单克隆抗体,其重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。发明人还提供了抗CD20蛋白单克隆抗体的制备方法,选取人CD20氨基酸SEQ ID NO.1序列,在其氨基端添加了一个半胱氨酸后,与KLH偶联,作为免疫原。发明人还提供了一株分泌抗CD20蛋白的杂交瘤细胞系,所述细胞系为小鼠杂交瘤细胞系Abm58020-32A8-PU,保藏号为:CGMCC NO.17491。抗CD20蛋白单克隆抗体,具有高特异性、敏感性,可以特异性识别表达CD20蛋白的细胞,适用于免疫学检测,特别是免疫组化检测。



1. 一种抗CD20蛋白单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体重链和轻链可变区氨基酸序列分别是SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列所编码。
3. 根据权利要求1所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体特异性识别CD20蛋白。
4. 根据权利要求3所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体特异性识别CD20蛋白中SEQ ID NO.1所示的蛋白片段。
5. 一种抗CD20蛋白单克隆抗体,由保藏号为CGMCC NO.17491的杂交瘤细胞系产生。
6. 根据权利要求1所述的单克隆抗体,其特征在于,所述抗CD20蛋白为小鼠IgG_{2b}亚型单克隆抗体。
7. 一株分泌抗CD20蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞系,所述细胞系为小鼠杂交瘤细胞系AbM58020-32A8-PU,所述细胞系保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为:CGMCC NO.17491。
8. 权利要求1-6任一所述的抗CD20蛋白单克隆抗体在制备CD20蛋白免疫检测试剂中的用途。
9. 根据权利要求8所述的用途,其特征在于,所述免疫检测包括免疫组织化学法,免疫印迹法和酶联免疫法。

抗CD20蛋白单克隆抗体、细胞系及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测领域,特别涉及抗CD20蛋白单克隆抗体、细胞系及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] CD20为最为特异的B细胞标记,目前应用甚为广泛的CD20单抗如美罗华之所以能对B细胞淋巴瘤有疗效,就是通过和CD20靶点结合起作用的。但需要注意的是CD20只在B细胞发育的中间阶段表达,幼稚的B细胞和终末分化的浆细胞均为阴性,它表达于细胞的胞膜。阳性区域主要是在淋巴滤泡,滤泡外的区域也可有少许阳性细胞。

[0003] CD20在大多数B细胞白血病/淋巴瘤中表达,早期前体B淋巴母细胞白血病/淋巴瘤可能呈阴性,慢性淋巴细胞白血病/小细胞淋巴瘤可能呈弱染色。浆细胞肿瘤通常CD20阴性,而在T细胞淋巴瘤CD20几乎都是阴性。因此,CD20对B细胞淋巴瘤和急慢性淋巴细胞白血病等有较好的细胞特异性,因此在恶性淋巴瘤尤其是T和B细胞淋巴瘤的分类上,CD20是最常用的B细胞标记物。

发明内容

[0004] 发明人提供了一种抗CD20蛋白单克隆抗体,所述单克隆抗体重链和轻链可变区的氨基酸序列分别是SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。

[0005] 进一步地,所述单克隆抗体重链和轻链可变区氨基酸序列分别是SEQ ID NO.4和SEQ ID NO.5所示的核苷酸序列所编码。

[0006] 进一步地,所述单克隆抗体特异性识别CD20蛋白。

[0007] 进一步地,所述单克隆抗体特异性识别中SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

[0008] 进一步地,所述单克隆抗体由保藏号为CGMCC NO.17491的杂交瘤细胞系产生。所述细胞株为小鼠杂交瘤细胞系AbM58020-32A8-PU,分类命名为:小鼠杂交瘤细胞系,该细胞系已于2019年04月3日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,地址为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。

[0009] 进一步地,所述抗CD20蛋白为小鼠IgG_{2b}亚型单克隆抗体。

[0010] 发明人还提供了一种抗CD20蛋白单克隆抗体的制备方法,选取CD20蛋白中SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列,在其氨基端添加了一个半胱氨酸后,与载体蛋白KLH进行偶联作为免疫原。

[0011] 发明人还提供了一株分泌抗CD20蛋白的杂交瘤细胞系,所述细胞株为小鼠杂交瘤细胞系AbM58020-32A8-PU,所述细胞系保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为:CGMCC NO.17491。

[0012] 发明人还提供上述任一所述的抗CD20蛋白单克隆抗体,在CD20蛋白免疫检测中的用途。

[0013] 进一步地,所述免疫检测包括免疫组织化学法,免疫印迹法和酶联免疫法。

[0014] 区别于现有技术,上述技术方案依据CD20蛋白与DNA结合的结构、抗原性、组成氨基酸的亲疏水性以及二级结构,选择具有区别于其他类似蛋白、长度适宜且具有特殊抗原性的氨基酸序列EPPQDQESSPIENDSSP (SEQ ID No.1),区域作为抗原肽,在其氨基端添加了一个半胱氨酸后,偶联KLH,作为免疫源(KLH-CD20)。对小鼠进行免疫,经细胞融合、筛选和亚克隆,获得高效分泌抗CD20蛋白单克隆抗体的单克隆细胞系AbM58020-32A8-PU,以及由该细胞系所分泌的抗CD20蛋白单克隆抗体。本方案得到的抗体具有高特异性、敏感性,可以特异性识别表达CD20蛋白的细胞,适用于免疫学检测,特别是免疫组化检测。

附图说明

[0015] 图1为AbM58020-32A8-PU杂交瘤分泌抗体的免疫印迹检测结果。

[0016] 图2为B细胞淋巴瘤1免疫组化染色结果图(左为AbM58020-32A8-PU的CD20,右为市售CD20)。

[0017] 图3为B细胞淋巴瘤2免疫组化染色结果图(左为AbM58020-32A8-PU的CD20,右为市售CD20)。

[0018] 图4为扁桃体组织免疫组化染色结果图(左为AbM58020-32A8-PU的CD20,右为市售CD20)。

[0019] 图5为阑尾组织免疫组化染色结果图(左为AbM58020-32A8-PU的CD20,右为市售CD20)。

具体实施方式

[0020] 实施例1免疫原的制备

[0021] 一、抗原多肽选择

[0022] 依据Uniprot中登录号为P11836的蛋白质序列进行序列和二级结构分析,全长为297个氨基酸长度的CD20蛋白是MS4A家族蛋白的一部分,该家族蛋白预计跨越质膜四次,其C和N端均位于细胞内,其分子量约为33kDa左右。依据通过在线服务器<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>预测的蛋白的二级结构(secondary structure)和表面可及性(Surface Accessibility)参数,并通过对其抗原性指数(Jameson BA, Wolf H. The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput Appl Biosci.* 1988, 4(1):181-6.)的分析结果,选择靠近C末端的氨基酸序列EPPQDQESSPIENDSSP作为抗原进行化学合成,为便于偶联,在该多肽的氨基端添加了一个半胱氨酸(CEPPQDQESSPIENDSSP)用于提供巯基偶联。

[0023] 二、多肽的偶联及纯化

[0024] 选择Thermo Scientific的马来酰胺活化的匙孔瓣血蓝蛋白试剂盒,按照试剂盒提供的流程操作。对于待偶联的多肽,首先以Ellman试剂检测多肽中自由巯基:在96孔板中加入100 μ L Ellman试剂储备液,再加入10 μ L多肽溶液,用Nano Drop分光光度计在 $\lambda=412\text{nm}$ 下测其紫外吸收值,如果OD值 >0.15 做下一步;OD值 <0.15 并 >0.05 补加多肽,直至达到要求;OD值 <0.05 返回多肽合成步骤重新质控。开始偶联时,在每个mcKLH包装中加入200 μ L去离子水,配制成10mg/mL的KLH溶液,在500 μ L的Imject EDC偶联缓冲液中溶解2mg半抗原,将500 μ L多肽溶液加入到200 μ L的载体蛋白溶液中,将1mL去离子水加入到一个包装的EDC (10mg)

中,缓慢振摇至完全溶解,取50 μ L加入到mcKLH多肽溶液中,反应2小时后,经脱盐柱处理除去未偶联的交联剂和盐类,得到免疫原CD20-KLH

[0025] 实施例2 AbM58020-32A8-PU杂交瘤细胞系的建立

[0026] 一、免疫

[0027] 将实施例1中CD20-KLH(3.0mg/m)用弗氏完全佐剂(Sigma公司,F5881)乳化,免疫ICR小鼠,腹部皮下注射每只小鼠6点,剂量为60 μ g/只。每14天加强免疫一次,抗原使用弗氏非完全佐剂(Sigma公司,F5506)乳化,剂量为30 μ g/只。第4次加强免疫后7天以间接ELISA(波长450nm)检测小鼠血清中抗免疫原的多抗效价,(用“CD20-BSA”包被,2 μ g/ml,4 $^{\circ}$ C包被过夜;2%牛奶,37 $^{\circ}$ C封闭2h;血清从200倍开始2倍梯度稀释,空白对照(blank)为PBS,阴性对照(negative)为阴性血清200倍稀释)。效价最高的小鼠以尾静脉注射冲击免疫,抗原用生理盐水混匀,剂量为50 μ g/只。

[0028] 二、细胞融合:

[0029] 无菌制备免疫达标的小鼠脾细胞悬液,与小鼠骨髓瘤细胞sp2/0(ATCCNumberCRL-8287)以5:1比例混合,离心1500rpm,5min。弃上清后离心管放入37 $^{\circ}$ C水浴中,在1分钟内缓慢加入1ml的PEG1500(Roche公司),并搅动细胞。在温水中静置1min后,加入10ml无血清的IMDM(Sigma公司),混匀,离心1000rpm,5min。弃上清后,加入10ml血清(PAA公司)小心的将细胞吹打起来,并加入5ml混合10xHAT(Sigma公司)的胸腺细胞,混匀。再加入25ml含有2.1%硝基纤维素(Sigma公司)的半固体培养基充分混匀,然后均匀的倒入20个细胞培养皿中。将细胞培养皿放入到湿盒中,放入37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养。

[0030] 三、克隆化及ELISA筛选阳性杂交瘤细胞:

[0031] 融合后11天,克隆细胞团大小密度适中,在解剖镜下,吸取圆、实、大的克隆团(10板 \times 93个)打入事先准备好培养基的96孔培养板中,放入37 $^{\circ}$ C 5%CO₂培养箱中培养。

[0032] 3天后,细胞量大约占底面积2/3,取100 μ L上清用“CD20-BSA”进行ELISA筛选。阳性克隆完全换液,加入200 μ L含饲养细胞和1%HT(Sigma公司)的完全培养基。两天后进行第二次ELISA筛选,阳性克隆转入事先准备好培养基(含饲养细胞和HT)的24孔板培养。五天后取100 μ L上清进行第三次ELISA筛选,阳性克隆逐次转入6孔板和细胞培养瓶扩大培养并冻存。筛选出分泌特定单克隆抗体的杂交瘤细胞株AbM58020-32A8-PU。将此细胞株转入T-75培养瓶中扩增至对数生长期保种或进行后续实验。

[0033] 实施例3腹水诱生法制备单克隆抗体

[0034] 一、腹水制备

[0035] 对数生长期细胞用无血清培养基洗涤并悬起,计数5 \times 10⁵个/ml。悬浮的细胞腹腔注射事先用石蜡油致敏的小鼠。7天后开始收集腹水。取出的腹水于4 $^{\circ}$ C离心4000rpm,10min。小心吸出中间的腹水收集于离心管中,4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C保存。

[0036] 二、单克隆抗体的纯化

[0037] 用HiTrap rProtein A FF(GE公司)亲和层析法按说明书从腹水中纯化抗体。SDS-PAGE胶鉴定纯度,Bradford法测定浓度。纯化的抗体保存于-20 $^{\circ}$ C。

[0038] 实施例4单克隆抗体特性鉴定

[0039] 一、亚型鉴定

[0040] 用100mM PBS(pH7.4)稀释包被羊抗鼠IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)至

0.5 μ g/ml,每孔加100 μ l,4 $^{\circ}$ C,过夜。倾空液体,用含0.05%Tween的PBS(PBS-T)洗3次,每孔加入200 μ l封闭液(含2%BSA和3%蔗糖的PBS),37 $^{\circ}$ C孵育1h。倾空液体,用PBS-T清洗3次。每孔加入0.1ml杂交瘤上清,37 $^{\circ}$ C孵育1h。倾空液体用PBS-T清洗3次。用封闭液1:1000稀释HRP标记的羊抗鼠(κ , λ)抗体或1:2000稀释HRP标记的羊抗鼠(IgM,IgG1,IgG2a,IgG2b,IgG3,IgA)抗体(Southern Biotech公司)0.1ml每孔分别加入适当的孔中,37 $^{\circ}$ C孵育1h。倾空液体,用PBS-T清洗3次。每孔加50 μ L含0.15%ABTS(Southern Biotech公司)和0.03% H_2O_2 的柠檬酸缓冲液(PH4.0)进行显色反应,10-20min内测定405nm波长下的OD值。结果显示,本发明单克隆抗体为IgG_{2b}型鼠源单克隆抗体。

[0041] 二、亲和常数测定

[0042] 包被CD20多肽,包被浓度为2 μ g/ml,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C包被过夜,PBS-T洗3次。每孔加200 μ l封闭液37 $^{\circ}$ C封闭2h,PBS-T洗3次。实施例4中纯化的单克隆抗体,从1:200开始2倍梯度稀释,最后1孔留空白对照,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBS-T洗3次。HRP标记的羊抗鼠二抗1:20000稀释,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBS-T洗3次。每孔加入100 μ l含0.1%TMB(Sigma公司)和0.03% H_2O_2 的柠檬酸-磷酸缓冲液显色10min,加50 μ L 0.5M硫酸溶液终止反应。用酶标仪测定波长450nm的吸光值。画出OD值对应抗体稀释倍数的曲线,找出 $\geq 1/2$ “平台OD值”对应的稀释倍数A。利用下列公式计算出亲和常数为 3.07×10^{10} 。

$$[0043] \quad \text{亲和常数} \approx \frac{150000 \times A}{\text{抗体原始浓度}}$$

[0044] 三、单抗反应特异性和应用效果

[0045] 选择CD20多肽,用免疫印迹的方法检测本发明单克隆抗体的识别特异性,免疫印迹实验过程如下:每种蛋白上样约5-10ng,进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳。按常规方法在Bio-Rad电转移系统中将凝胶蛋白带转移到PVDF膜上(Millipore公司)。将膜置于含5%脱脂奶粉的TBS-T封闭液中4 $^{\circ}$ C过夜。加入单克隆抗体CD20(1:1000稀释)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。用TBS-T洗膜后,加入1:5000稀释的羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),室温孵育1小时。再次TBST洗膜,加入ECL超敏显色液(北京普利莱基因技术有限公司),以ChemiDoc MP多色荧光成像系统(Bio-Rad)进行化学发光图像数据的采集,结果可见图1AbM58020-32A8-PU杂交瘤分泌抗体的免疫印迹检测结果。

[0046] 实施例5组织芯片染色和鉴定

[0047] 一、芯片制备过程

[0048] 对各样本先进行HE切片染色,以确定肿瘤部位。对肿瘤靶位点画圈,预备打孔。制作空白受体蜡块时,将塑料架置于模具上,将融化的石蜡(熔点在55~58 $^{\circ}$ C)倒入模具,冷却至室温后将模具放入-20 $^{\circ}$ C冰箱6min,将蜡块从模具中取出。在组织样品机上选择1mm直径的样品针在受体蜡块上打孔,孔深3~4mm,用另一直径1mm的打孔针在蜡块的标记部位打孔采集组织芯,其长度比受体蜡块的孔深浅0.1mm左右。将采集到的组织芯直接插入或用镊子小心夹取插入受体蜡块的空孔内。如此反复直至完成全部样品点的制备。最后用载玻片将所有组织芯按平,使组织芯片蜡块平坦光滑。将制成的组织芯片蜡块再放入蜡块制作模具,放入60 $^{\circ}$ C烤箱内15min,使组织芯与受体蜡块的蜡融为一体,然后轻轻从烤箱中取出模具,让半融状态的石蜡在室温条件下冷却约30min,再放入-20 $^{\circ}$ C冰箱冷冻6min后将组织芯片蜡块从模具中取出,切片或放入4 $^{\circ}$ C冰箱内保存备用。修片后进行连续切片,厚度定为3 μ m,将

连续切片漂在凉水中,让其自然展开,再将分开的切片转移到45℃的温水中展片30秒,用经多聚赖氨酸处理过的载玻片裱贴切片,将制成的组织芯片放入65℃烤箱内烤片2小时,取出室温冷却,放入-4℃冰箱保存。

[0049] 二、IHC染色及分析

[0050] 常规二甲苯脱蜡3次,每次6分钟,100%、100%、95%、95%、85%梯度乙醇中水化,每次3分钟,最后自来水冲洗。进行抗原修复,然后将切片放入湿盒中,PBS冲洗3×3分钟。滴加3% H_2O_2 孵育10分钟,PBS冲洗3×3分钟。甩去PBS,滴加过氧化物酶阻断剂室温孵育10分钟。甩干切片,滴加适当比例稀释的一抗(首次稀释根据抗体浓度来设计抗体的稀释比例)室温(25℃)孵育1小时,PBS冲洗3×3分钟,滴加二抗室温孵育30分钟,PBS冲洗3×3分钟,甩去PBS,用新鲜配置的DAB显色液显色3-10分钟。苏木素复染20秒,PBS返蓝。按照85%(3分钟)、95%(3分钟)、95%(3分钟)、100%(3分钟)、100%(3分钟)的酒精梯度依次脱水,最后两次二甲苯透明10分钟,中性树胶封片。

[0051] 免疫组化染色结果分为:阳性和阴性。阳性表达必须在细胞和组织特定的抗原部位才能视为阳性。在组织染色分布清晰及细胞定位准确的情况下,染色结果根据染色强度的差异进行进一步划分,具体如下:

[0052] 1、样本为弱阳性;标记为“+”;

[0053] 2、样本为中度阳性;标记为“++”;

[0054] 3、样本为高度阳性;标记为“+++”。

[0055] 4、样本为阴性,标记为“-”。

[0056] 三、样本检测结果:

[0057] 用本技术方案制备的抗CD20蛋白单克隆抗体和市售抗CD20蛋白单克隆抗体(鼠单抗L26)在53例B细胞淋巴瘤、49例T细胞淋巴瘤上进行同步检测,结果如下表所示。

组织类型	N	CD20					CD20 (L26) 鼠单抗				
		-	+	++	+++	阳性率%	-	+	++	+++	阳性率%
B 细胞淋巴瘤	53	1	8	29	15	98.11	2	11	30	10	96.23
T 细胞淋巴瘤	49	49	0	0	0	0	49	0	0	0	0

[0059] 结果显示:AbM58020-32A8-PU细胞株所分泌的抗CD20蛋白单克隆抗体的染色定位准确,染色清晰且无非特异性染色,背景干净。在B细胞淋巴瘤的检测中,阳性率高于市售的CD20(L26),且阳性强度也明显高于市售抗体,说明本发明所制备的抗CD20蛋白单克隆抗体的敏感度和亲和力高于市售抗体。

[0060] 图2为B细胞淋巴瘤1免疫组化染色结果图(左为AbM58020-32A8-PU的CD20,右为市售CD20)。其中,AbM58020-32A8-PU的CD20的染色强度(+++)高于市售CD20(++)的染色强度。

[0061] 图3为B细胞淋巴瘤2免疫组化染色结果图(左为AbM58020-32A8-PU的CD20,右为市售CD20)。其中,AbM58020-32A8-PU的CD20的染色结果为弱阳性(+),市售CD20的染色结果为阴性(-)。

[0062] 而在阴性组织T细胞淋巴瘤的检测中,本抗体检测结果和市售抗体一致。在30种正常组织芯片上进行同步检测,样本阳性和阴性结果一致,说明本抗体在正常组织的特异性

同市售抗体相当。

[0063] 30种正常组织包括：大脑、心脏、小脑、食管、肾上腺、胃、卵巢、小肠、胰腺、结直肠、甲状旁腺、肝脏、垂体、唾液腺、睾丸、肾、甲状腺、前列腺、乳腺、子宫、脾、膀胱、扁桃体、骨骼肌、胸腺(幼儿)、皮肤、骨髓、外周神经、肺、间皮细胞。

[0064] 图4：为扁桃体组织免疫组化染色结果图(左为AbM58020-32A8-PU的CD20，右为市售CD20)。其中，AbM58020-32A8-PU的CD20的染色强度和染色细胞数明显高于市售CD20的染色强度和染色细胞数。

[0065] 图5：为阑尾组织免疫组化染色结果图(左为AbM58020-32A8-PU的CD20，右为市售CD20)。其中，AbM58020-32A8-PU的CD20的染色强度明显高于市售CD20的染色强度。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 福州迈新生物技术开发有限公司
- [0003] <120> 抗CD20蛋白单克隆抗体、细胞系及其制备方法和应用
- [0004] <130> 2020
- [0005] <160> 5
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 17
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 智人(Homo sapiens)
- [0011] <400> 1
- [0012] Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser
- [0013] 1 5 10 15
- [0014] Pro
- [0015] <210> 2
- [0016] <211> 113
- [0017] <212> PRT
- [0018] <213> 人工序列(Artificial)
- [0019] <400> 2
- [0020] Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Gly Ala
- [0021] 1 5 10 15
- [0022] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asn Thr Phe Thr Asp Tyr
- [0023] 20 25 30
- [0024] Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ser His Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
- [0025] 35 40 45
- [0026] Gly Arg Phe Ile Pro Ser Thr Ala Lys Thr Asn Tyr Asn His Lys Phe
- [0027] 50 55 60
- [0028] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Leu Asp Thr Ser Leu Ser Thr Ala Tyr
- [0029] 65 70 75 80
- [0030] Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0031] 85 90 95
- [0032] Arg Ser Asp Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
- [0033] 100 105 110
- [0034] Ala
- [0035] <210> 3
- [0036] <211> 112
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> 人工序列(Artificial)

[0039] <400> 3
 [0040] Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Ser Ile Thr Ile Gly
 [0041] 1 5 10 15
 [0042] Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 [0043] 20 25 30
 [0044] Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 [0045] 35 40 45
 [0046] Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Ile Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 [0047] 50 55 60
 [0048] Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 [0049] 65 70 75 80
 [0050] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
 [0051] 85 90 95
 [0052] Thr His Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0053] 100 105 110
 [0054] <210> 4
 [0055] <211> 339
 [0056] <212> DNA
 [0057] <213> 人工序列(Artificial)
 [0058] <400> 4
 [0059] gaggtgaagc tgcaggagtc aggacctagc ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatt 60
 [0060] tcctgtaagg cttccggaaa cacattcact gactattaca tgaattgggt gaggcagagt 120
 [0061] catggacaga gccttgagtg gattggacgt tttattccta gtactgctaa aactaactac 180
 [0062] aaccacaaat tcaaggacaa ggccacactg aactggaca catccctcag cacagcctat 240
 [0063] atgcagctca acagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtcg gagtgatttt 300
 [0064] gctttctggg gccaaaggac tctggtcact gtctctgca 339
 [0065] <210> 5
 [0066] <211> 336
 [0067] <212> DNA
 [0068] <213> 人工序列(Artificial)
 [0069] <400> 5
 [0070] gatatcttga tgacceaatc tccactctct ttgtcaatta ccattggaca accagcctct 60
 [0071] atctcttgta agtcaagtca gagcctctta tatagtaatg gaaaaaccta tttgaactgg 120
 [0072] ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactc atatagtgtc taaactggac 180
 [0073] tccggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaaaatc 240
 [0074] agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg ggcaaggtag acattatcct 300
 [0075] ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

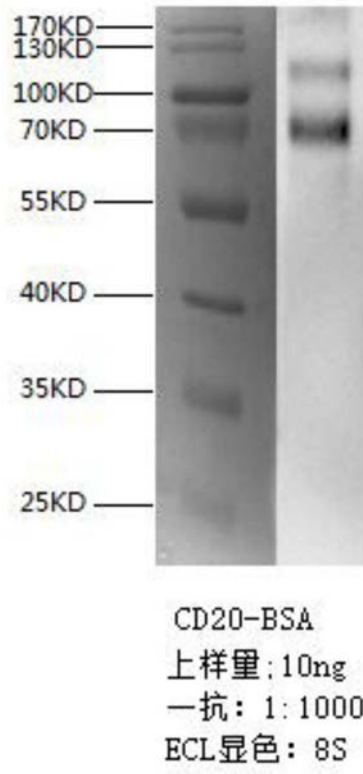


图1

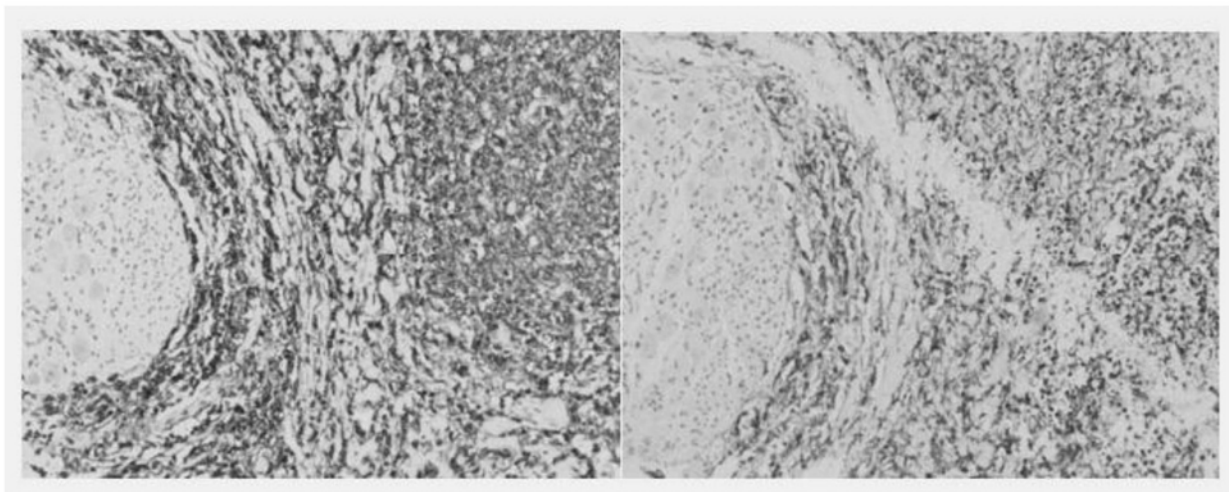


图2

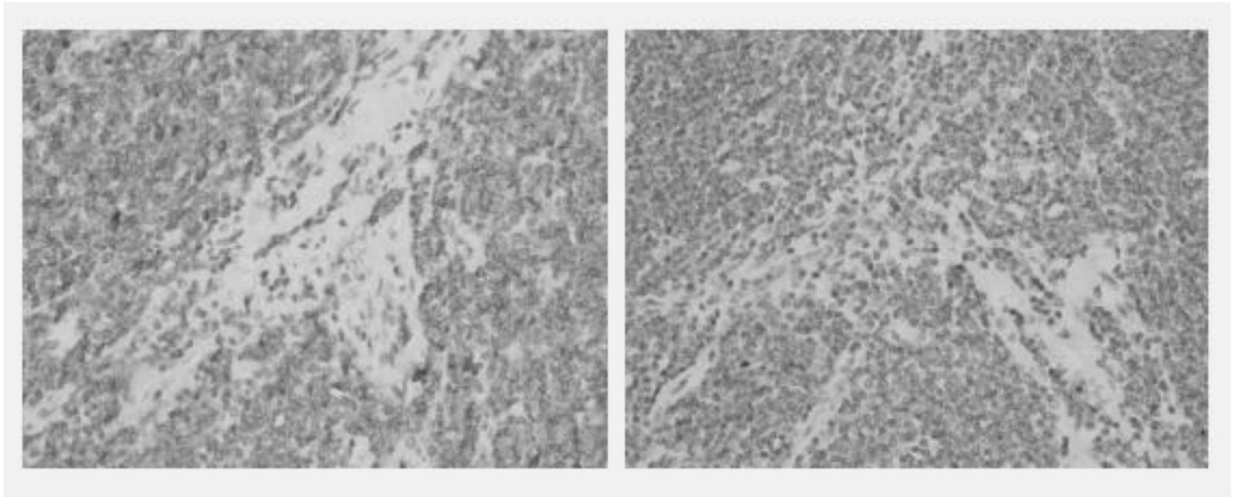


图3

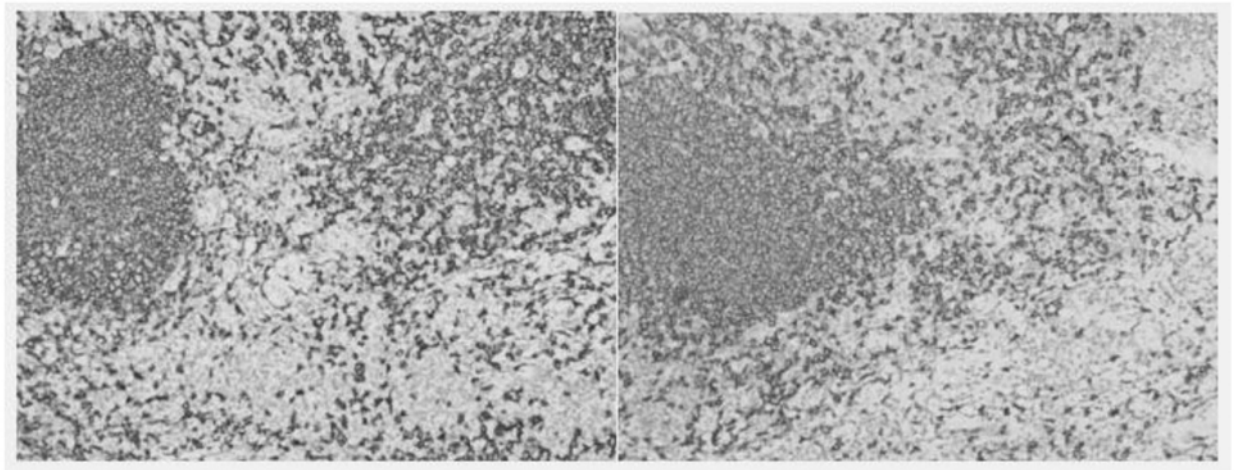


图4

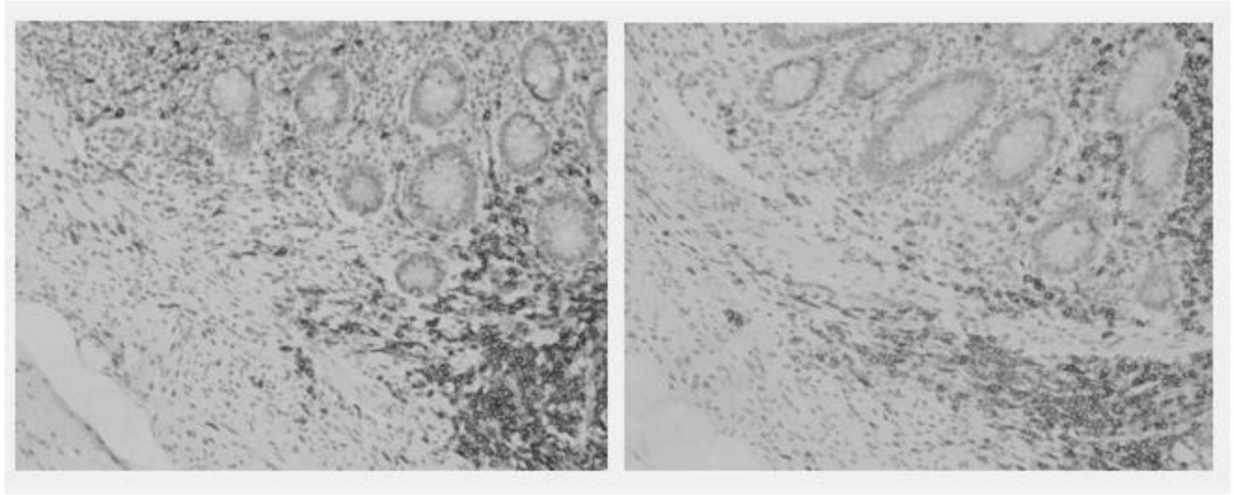


图5