



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103864927 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201410095996. 9

(56) 对比文件

(22) 申请日 2014. 03. 14

CN 101967465 A, 2011. 02. 09,

(73) 专利权人 东南大学

审查员 吴永庆

地址 210096 江苏省南京市四牌楼 2 号

(72) 发明人 万亚坤 孙燕燕 李光辉 母亚雯

(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 16/10(2006. 01)

C12N 15/13(2006. 01)

C12N 15/63(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

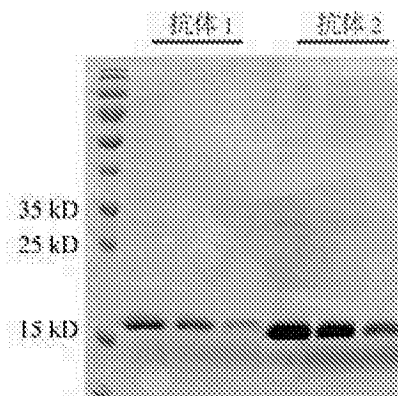
序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

视黄醇结合蛋白 (RBP) 单域抗体编码序列及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种视黄醇结合蛋白 (RBP) 的单域抗体的 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, 本发明还公开了两种视黄醇结合蛋白 (RBP) 单域抗体, 还公开了两种 DNA 分子, 它编码本发明所述的视黄醇结合蛋白 (RBP) 的单域抗体的 VHH 链或本发明所述的视黄醇结合蛋白 (RBP) 单域抗体, 还公开了一种宿主细胞, 它可以表达视黄醇结合蛋白 (RBP) 的单域抗体。通过本发明所公布的单域抗体基因序列及宿主细胞, 该单域抗体能够在大肠杆菌内高效表达, 应用于视黄醇结合蛋白 (RBP) 检测试剂的研发。



1. 一种视黄醇结合蛋白 (RBP) 的单域抗体的 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。
2. 一种视黄醇结合蛋白 (RBP)单域抗体, 其特征在于, 它针对视黄醇结合蛋白 (RBP) 表位的单域抗体, 包括具有 SEQ ID NO :15 或SEQ ID NO :16 所示氨基酸序列的 VHH 链。
3. 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所述的视黄醇结合蛋白 (RBP) 的单域抗体的 VHH 链。
4. 根据权利要求3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 或 SEQ ID NO :18。
5. 一种表达载体, 其特征在于, 它含 SEQ ID NO :17 或 SEQ ID NO :18 所示的核苷酸序列。

视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体编码序列及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学或生物制药技术领域,涉及针对于视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体。

背景技术

[0002] 视黄醇结合蛋白是血液中维生素的转运蛋白,由肝脏合成、广泛分布于血液、脑脊液、尿液及其他体液中。测定视黄醇结合蛋白能早期发现肾小管的功能损害,并能灵敏反映肾近曲小管的损害程度,还可作为肝功能早期损害和监护治疗的指标。

[0003] 对于RBP的测定,现广泛采用ELISA法;此法简便快速,而这种检测方法是基于将视黄醇结合蛋白(RBP)免疫绵羊获得的抗体来实现的。但是这种传统意义上的抗体稳定性差、灵敏度低、生产成本高,所有因素均限制了对于视黄醇结合蛋白(RBP)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那样互相沾粘,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(单域抗体);与此同时单域抗体化学性质也更加灵活,稳定性好,可溶性高,表达容易且利用微生物即可大量地获得,容易偶联其他分子,因此应用单域抗体为研发视黄醇结合蛋白(RBP)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针对视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体,同时提供该单域抗体的编码序列及该单域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,提供了一种视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体,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的氨基酸序列中任意一种: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的氨基酸序列中任意一种:

[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,所述的视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体的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,一种视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体,它针对视黄醇结合蛋白(RBP)表位的单域抗体,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

视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体的VHH链,或本发明所述的视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体。

[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视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体用于检测视黄醇结合蛋白(RBP)的用途。

[0016] 有益效果:与现有技术相比,本发明的优点如下:本发明将血液中提取的视黄醇结合蛋白(RBP)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视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体基因库,试验中将视黄醇结合蛋白(RBP)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单域抗体基因库(骆驼重链抗体噬菌体展示基因库),从而获得了针对视黄醇结合蛋白(RBP)特异性的单域抗体基因,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单域抗体株。

附图说明

[0017] 图1是单域抗体的基因电泳图;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是构建单域抗体的噬菌体展示文库时,文库库容测定图。

[0019] 图3是对于所构建的视黄醇结合蛋白(RBP)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是在所构建的视黄醇结合蛋白(RBP)单域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%。

[0020] 图4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是单域抗体,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。

[0021] 图5是表达的视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体,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、3是250毫摩尔咪唑洗脱液所洗脱下来的单域抗体。

[0022] 图6为视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体检测特异性分析的模式图。

[0023] 图7为视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体检测特异性分析的模式图。

具体实施方式

[0024] 本发明首先将人血液中提取的视黄醇结合蛋白(RBP)免疫一只新疆单峰驼,经过5次免疫之后提取该单峰驼外周血淋巴细胞并构建了视黄醇结合蛋白(RBP)特异的单域重链抗体文库。将视黄醇结合蛋白(RBP)偶联在NUNC酶标板上,展示蛋白质的正确空间结构,使得视黄醇结合蛋白(RBP)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

筛选视黄醇结合蛋白(RBP)免疫性的单域抗体基因库(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单域抗体株。

[0025] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。

[0026] 实施例1:针对于视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体文库的构建:

[0027] (1)由人血液中提取的视黄醇结合蛋白(RBP)(购自南京汇标生物科技有限公司),用于免疫所用的视黄醇结合蛋白(RBP)的浓度为500 μ g/mL,每次免疫将0.5mg脂蛋白A1与弗氏佐剂等体积混合,免疫一只新疆单峰驼(句容圣龙家畜养殖厂),每周一次,共免疫5次,除第一次使用完全的弗氏佐剂(购自sigma),剩余几次全部使用弗式不全佐剂(购自sigma),免疫过程中刺激B细胞表达抗原特异性的单域抗体。(2)5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 IIIFIRSTSTRANDSUPERMIX试剂盒说明书,将提取的RNA反转录成cDNA。用巢式PCR扩增重链抗体的可变区片段:

[0028] 第一轮PCR:

[0029] 上游引物GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGGC

[0030] 下游:GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC

[0031] 扩增重链抗体引导肽和抗体CH₂之间的片段,54 $^{\circ}$ C退火,25个循环;结果如图1显示该片段的大小约为700bp,即从左到右的DNA条带分别是:第一为DNA的分子Marker,第二单域抗体基因电泳带约为700bp。

[0032] 第二轮PCR:

[0033] 以第一轮PCR产物作模板,

[0034] 上游引物:GATGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGRGGAGG

[0035] 下游引物:GGACTAGTGC GGCCGCTGGAGACGGTGACCTGGGT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 $^{\circ}$ C退火,17个循环,回收目的片段,结果如图1显示,该片段的大小约为500bp,即从左到右的DNA条带分别是:第一为DNA分子Marker,第二单域抗体基因电泳带约为500bp。(4)使用限制性的内切酶(购自NEB)Pst I及Not I酶切20 μ g pComb3噬菌体展示载体(Biovector供应)及10 μ gVHH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,构建视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体噬菌体展示文库并测定库容,库容的大小为 2.5×10^8 ,结果如图2显示。与此同时,通过菌落PCR检测引物使用第二轮PCR引物,T_m55 $^{\circ}$ C。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90%以上。

[0036] 实施例2:针对视黄醇结合蛋白(RBP)的单域抗体筛选过程:

[0037] (1)将溶解在PBS中的100 μ g/mL的视黄醇结合蛋白(RBP)包被在NUNC酶标板上,4 $^{\circ}$ C放置过夜,同时设立负对照。(2)第二天两个孔中分别加入200 μ L1%牛奶,室温封闭2小时。(3)2小时后,加入100 μ L噬菌体(8×10^{11} tfu免疫骆驼单域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)将与视黄醇结合蛋白(RBP)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2轮。结果如图4显示:在不断地筛选的过程中,阳性的克隆将不断地被富集,从而达到了利用噬菌体展示

技术筛选抗体库中视黄醇结合蛋白(RBP)特异抗体的目的。

[0038] 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:

[0039] 该实验的原理模式图如图5所示,具体检测如下:

[0040] (1)从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 μ g/mL的氨苄青霉素的TB培养基(1LTB培养基中含有2.3g磷酸二氢钾,12.52g磷酸氢二钾,12g蛋白胨,24g酵母提取物,4mL甘油)中,生长至对数期后,加终浓度1mmol的IPTG,28 $^{\circ}$ 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。(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 μ g/mL的LB液体中以便提取质粒并进行测序。

[0041] 根据序列比对软件Vector NTI及IMGT分析软件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。

[0042] 实施例4:单域抗体在宿主菌大肠杆菌中表达、纯化:

[0043] (1)将前面测序分析所获得两种单域抗体亚克隆至表达性的载体PET32a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 μ g/mL氨苄青霉素的LB固体培养基的板上,37 $^{\circ}$ C过夜。(2)挑选单个菌落接种在15mL含有氨苄青霉素的LB培养液中,37 $^{\circ}$ C摇床培养过夜。(3)接种1mL的过夜菌种至330mL LB培养基中,37 $^{\circ}$ C摇床培养,培养到OD值达到0.6-1时,加入IPTG,28 $^{\circ}$ 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(50mmol)用于洗去杂带,高浓度咪唑洗脱液(250mmol,500mmol)最终可制备纯度达90%以上的蛋白。图6所示从左到右的条带分别是:第一为标准蛋白分子,第二、第三250mmol咪唑的洗脱液洗脱的蛋白样品;结果显示,单域抗体经过该纯化后,其纯度可达到95%以上。

[0044] 实施例5:视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体检测特异性分析:

[0045] (1)将视黄醇结合蛋白(RBP)前白蛋白包被在酶标板上,同时做空白孔对照,各包被两个孔,将载脂蛋白单域抗体及对照抗体前白蛋白单域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。(2)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。(3)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。(4)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。结果显示视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体能特异性的识别载脂蛋白。模式图见图7,结果如下:

	包被抗原	包被载脂蛋白	包被前白蛋白	空白对照
[0046]	加入抗体			
	加入载脂蛋白单域抗体 1	3.5	0.2	0.5
	加入载脂蛋白单域抗体 2	2.4	0.5	0.3
	加入前白蛋白单域抗体	0.6	0.3	0.4

[0047] 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> 视黄醇结合蛋白(RBP)单域抗体编码序列及其应用

<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 Pro Val Gln Ala Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
 20 25

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

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

<210> 3

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 3

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Val

1 5 10 15
 Ala Lys Asn Thr Leu Asp Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu 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 Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser
 20 25

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Glu Val Ala
 1 5 10 15
 Thr

<210> 7

<211> 38

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn

1 5 10 15
 Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp
 20 25 30
 Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 35

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Arg 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

Lys Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser Cys
 1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 10

Ala Met Phe Thr Gly Thr Gly Ser Thr
 1 5

<210> 11

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 11

Ala Val Asp Leu Leu Pro Arg Ser Thr Arg Cys Leu Asp Tyr Gly Leu
 1 5 10 15

Arg Thr Tyr Asn Tyr
 20

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 12

Gly His Ser Tyr Ser Arg Lys Cys

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 13

Thr Phe Tyr Thr Gly Asp Gly Arg Thr

1 5

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 14

Ala Ala Asp Arg Arg Val Asn Cys Asp Leu Leu Gln Ser Thr Phe Tyr

1 5 10 15

Asn Tyr

<210> 15

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Pro Val Gln Ala Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Lys Tyr Pro Tyr Ser Gly Ser

20 25 30

Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val

35 40 45

Ala Ala Met Phe Thr Gly Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asn Val Ala Lys Asn Thr Leu Asp
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Val Asp Leu Leu Pro Arg Ser Thr Arg Cys Leu Asp Tyr Gly Leu
 100 105 110
 Arg Thr Tyr Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 16

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Thr Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly His Ser Tyr Ser Arg Lys
 20 25 30
 Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Glu Val
 35 40 45
 Ala Thr Phe Tyr Thr Gly Asp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ala Asp Arg Arg Val Asn Cys Asp Leu Leu Gln Ser Thr Phe Tyr
 100 105 110
 Asn Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 17

<211> 384

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

cagggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga ccggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
 tctgtgcag tctctaaata ccctacagt ggcagctgca tgggctggtt ccgccagct 120

ccaggaagg agcgcgaggg ggtcgcagct atgttcaactg gtactggtag cacatactat	180
gccgactccg tgaagggccg attcaccate tccaaaacg tegccaagaa caccctggat	240
ctccaaatga acagcctgaa acctgaggac actgcatgt actactgtgc ggtagatctt	300
ttgccccgct cgacccgatg cctagactat gggttgcgga cgtataacta ctggggccag	360
gggacccagg tcaccgtctc ctca	384

<210> 18

<211> 375

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

caggtgcagc tgcaggagtc tggaggagge tcggtgcaga ctggagggtc tctgagactc	60
tctgtgtag tttctggaca cagctacagt aggaagtgea tgggctggtt ccgccaggct	120
ccaggaagg agcgcgagga agtcgcaact tttatactg gtgacggtag gacatactat	180
gccgactccg tgaagggccg attcaccate tccaagaca acgccaagaa cacgctgtat	240
ctccaaatga acagcctgaa acctgaggac actggcatgt acttctgcgc ggcagatcgg	300
cgtgttaact gcgatctcct tcaaagcaact tttataact accgggggca ggggacccag	360
gtcaccgtct cctca	375

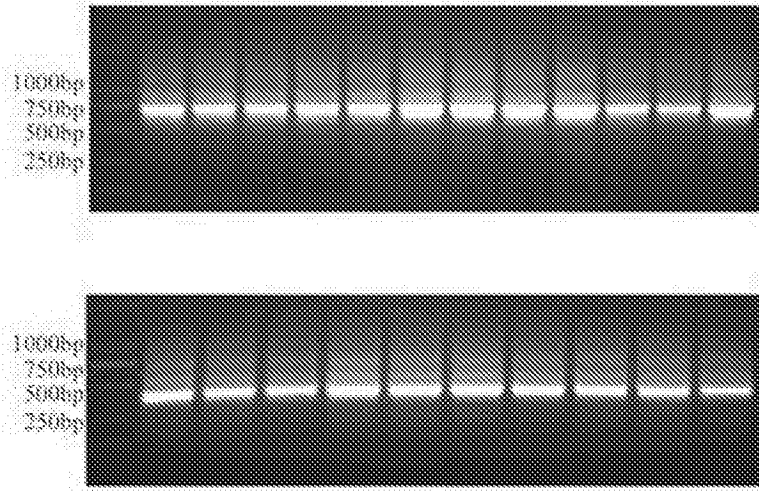


图1

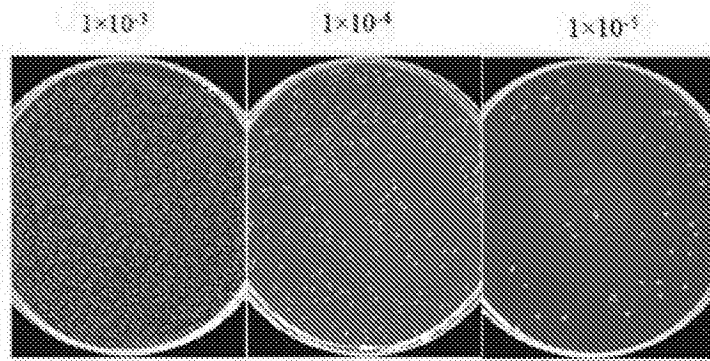


图2

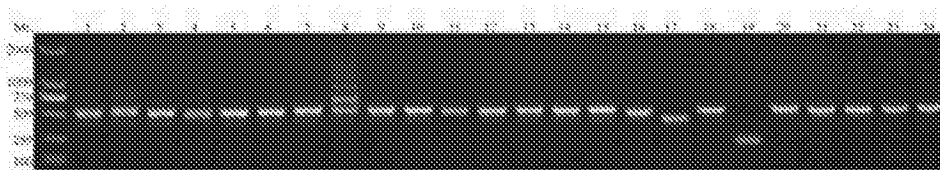


图3

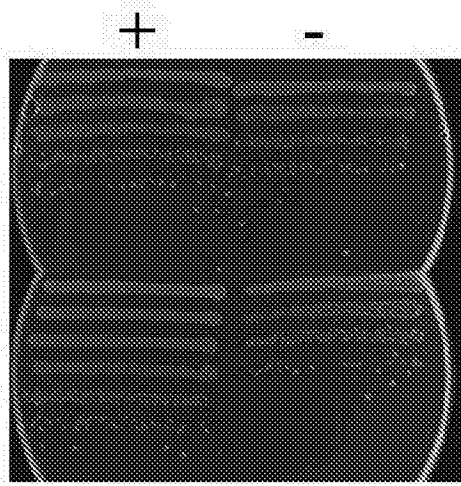


图4

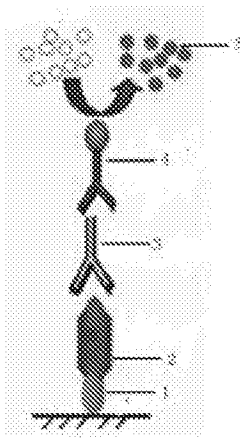


图5

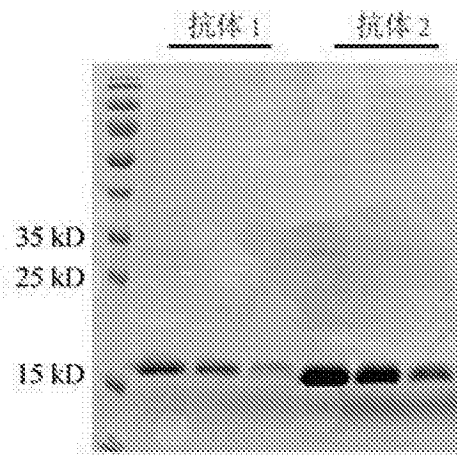


图6

视黄醇结合蛋白 (RBP)	前白蛋白	对照	加入视黄醇结合蛋白 (RBP) 单域抗体
视黄醇结合蛋白 (RBP)	前白蛋白	对照	加入前白蛋白单域抗体

图7