



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105801691 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(21)申请号 201610189099.3

(22)申请日 2016.03.29

(71)申请人 上海市普陀区中心医院

地址 200333 上海市普陀区兰溪路164号

(72)发明人 康向东 吴蓉 孔倩倩 相芬芬

詹月萍 许建 蒋洁敏 乐红红

郝文斌

(74)专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

代理人 竺路玲

(51) Int. Cl.

C07K 16/08(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

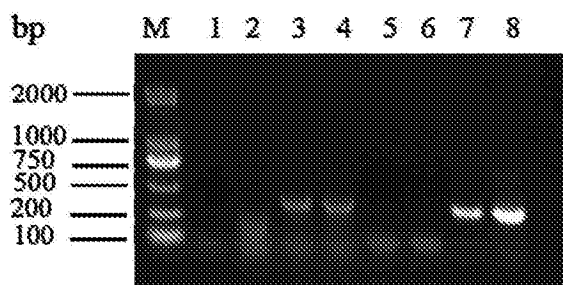
序列表3页 附图2页

## (54)发明名称

一种HPV16 E7 单克隆抗体及其制备方法和应用

## (57)摘要

本发明公开了一种HPV16E7单克隆抗体及其制备方法和应用,本发明从临床标本中克隆得到正确的HPV16E7基因序列,该基因经正确插入pET28a(+)原核表达质粒后,在IPTG诱导下在BL21(DE3)大肠杆菌中以可溶性蛋白形式有效地表达了HPV16E7融合蛋白,并用该蛋白免疫BALB/C小鼠成功制备HPV16E7单克隆抗体,该抗体可以识别原核以及真核表达HPV16E7抗原,对于HPV16E7抗原检测具有相当高的应用价值,为该蛋白以及相关疾病的研究、HPV16抗原检测方法的建立提供了基础。



1. 一种HPV16 E7单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤,

步骤一,HPV16E7基因扩增

利用HPV16阳性分泌物为模板进行PCR扩增,上游引物序列如SEQ NO.1所示,下游引物序列如SEQ NO.2所示;

步骤二,获得HPV16E7重组蛋白

利用回收步骤一获得的PCR产物进行HPV16E7表达载体构建及诱导表达,并进行HPV16E7重组蛋白的纯化;

步骤三,免疫

采用的抗原为所述步骤二中得到的纯化后的HPV16E7重组蛋白;

步骤四,细胞融合,得到杂交瘤细胞;

步骤五,对所述步骤四得到的杂交瘤细胞进行阳性克隆的筛选,得到特异性HPV16 E7单克隆抗体杂交瘤细胞;

步骤六,利用步骤五所得的特异性HPV16 E7单克隆抗体杂交瘤细胞制得HPV16 E7单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤一中PCR扩增的反应体系为:  $10\times$ PCR buffer 2 $\mu$ l,浓度为25mmol/L的MgCl<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ l,dNTP 0.4 $\mu$ l,上下游引物各0.5 $\mu$ l,模板DNA 1 $\mu$ l,Taq酶0.2 $\mu$ l,去离子水13.9 $\mu$ l;PCR扩增的反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变5min,94 $^{\circ}$ C,45s $\rightarrow$ 56 $^{\circ}$ C,45s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C,45s,30个循环,72 $^{\circ}$ C延伸7min。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤二中具体操作为:将回收得到的步骤一的PCR产物,连接至载体pMD18-T中,转化至感受态大肠杆菌JM109,筛选阳性克隆,测序正确后将质粒pMD18-T/18E6、pET28a(+)载体用BamH I、Xho I双酶切,16 $^{\circ}$ C连接过夜,并将重组质粒转化至感受态大肠杆菌BL21(DE3);0.1g/L卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆,用终浓度为1mM IPTG 30 $^{\circ}$ C 200rpm振荡培养8h诱导重组蛋白表达;然后使用SDS-PAGE分析重组菌可表达HPV16E7蛋白,选取高效表达重组肽段的工程菌株扩大培养,加IPTG诱导目的蛋白的表达,收集菌体,超声破碎后4 $^{\circ}$ C 12 000g,离心20min收集上清;纯化超声裂解上清中的重组蛋白,用含有150mmol/L咪唑的洗脱液洗脱,4 $^{\circ}$ C平衡缓冲液透析除去咪唑,最终获得纯化的HPV16E7重组蛋白。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述步骤三中的免疫为用纯化后的HPV16E7抗原免疫8周龄BALB/C小鼠,免疫方式为皮下多点注射,免疫剂量0.05mg/只,免疫间隔时间为2周,首次免疫加完全福氏完全佐剂,其后三次加福氏不完全佐剂进行免疫,最后用抗原水剂作冲击免疫。

5. 一种根据权利要求1-4任意一项所述的制备方法制备得到的HPV16 E7单克隆抗体。

6. 根据权利要求5所述的HPV16 E7单克隆抗体,其特征在于,所述HPV16 E7单克隆抗体的重链CDR1序列如SEQ NO.3所示;所述HPV16 E7单克隆抗体的重链CDR2序列如SEQ NO.4所示;所述HPV16 E7单克隆抗体的重链CDR3序列如SEQ NO.5所示;所述HPV16 E7单克隆抗体的轻链CDR1序列如SEQ NO.6所示;所述HPV16 E7单克隆抗体的轻链CDR2序列如SEQ NO.7所示;所述HPV16 E7单克隆抗体的轻链CDR3序列如SEQ NO.8所示。

7. 根据权利要求5或6所述的HPV16 E7单克隆抗体,其特征在于,所述HPV16 E7单克隆抗体的重链序列如SEQ NO.9所示;所述HPV16 E7单克隆抗体的轻链序列如SEQ NO.10所示。

8. 如权利要求5-7任意一项所述的HPV16 E7单克隆抗体在制备治疗宫颈癌药物中的应用。

9. 一种检测HPV16 E7的试剂盒,其特征不在于包括如权利要求5-7任意一项所述的HPV16 E7单克隆抗体。

## 一种HPV16E7单克隆抗体及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及单克隆抗体制备领域,尤其涉及一种HPV16E7单克隆抗体及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 人类乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)属于乳多空病毒科的乳头瘤空泡病毒,是球形DNA病毒,能引起人体皮肤黏膜的鳞状上皮增殖,是目前为已确认的致癌病毒。在我国妇女宫颈癌组织中HPV感染率大于95%,其中HPV 16是乳头瘤病毒中致病性最强、与宫颈癌发病关系最密切的型别。据国际癌症研究中心(IARC)统计,宫颈癌标本中,HPV16型感染占51.0%。HPV16感染相关的临床诊断主要依靠PCR为主的分子生物学方法,该方法具有设备、人员以及空间条件要求高、监测结果假阳性率高等缺点,在小型医院实施困难。研究表明HPV16E7在宫颈癌诊断中具有较高价值,HPV16E7是目前已经确立的与细胞转化密切相关的病毒癌基因,HPV16E7抗原的检测因其方法简单易行对于宫颈癌筛查及预防具有重要意义,因此制备一种特异性高的抗HPV16E7抗体对于HPV检测及宫颈癌预防意义重大。

### 发明内容

[0003] 本发明为解决现有技术中的上述问题,提供一种制备高特异性HPV16E7单克隆抗体的方法及其相关应用。

[0004] 本发明第一个方面提供了一种HPV16E7单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤,

[0005] 包括以下步骤,

[0006] 步骤一,HPV16E7基因扩增

[0007] 利用HPV16阳性分泌物为模板进行PCR扩增,上游引物序列如SEQ NO.1所示,下游引物序列如SEQ NO.2所示;

[0008] 步骤二,获得HPV16E7重组蛋白

[0009] 利用回收步骤一获得的PCR产物进行HPV16E7表达载体构建及诱导表达,并进行HPV16E7重组蛋白的纯化;

[0010] 步骤三,免疫

[0011] 采用的抗原为所述步骤二中得到的纯化后的HPV16E7重组蛋白;

[0012] 步骤四,细胞融合,得到杂交瘤细胞;

[0013] 步骤五,对所述步骤四得到的杂交瘤细胞进行阳性克隆的筛选,得到特异性HPV16E7单克隆抗体杂交瘤细胞;

[0014] 步骤六,利用步骤五所得的特异性HPV16E7单克隆抗体杂交瘤细胞制得HPV16E7单克隆抗体。

[0015] 为了进一步优化上述技术方案,本发明所采取的技术措施还包括:

[0016] 优选地,述步骤一中PCR扩增的反应体系为:10×PCR buffer 2μl,浓度为25mmol/L的MgCl<sub>2</sub> 1.5μl,dNTP 0.4μl,上下游引物各0.5μl,模板DNA 1μl,Taq酶0.2μl,去离子水

13.9 $\mu$ l;PCR扩增的反应条件为:94 $^{\circ}$ C预变5min,94 $^{\circ}$ C,45s $\rightarrow$ 56 $^{\circ}$ C,45s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C,45s,30个循环,72 $^{\circ}$ C延伸7min。

[0017] 优选地,上述步骤二中具体操作为:将回收得到的步骤一的PCR产物,连接至载体pMD18-T中,转化至感受态大肠杆菌JM109,筛选阳性克隆,测序正确后将质粒pMD18-T/18E6、pET28a(+)载体用BamH I、Xho I双酶切,16 $^{\circ}$ C连接过夜,并将重组质粒转化至感受态大肠杆菌BL21(DE3);0.1g/L卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆,用终浓度为1mM IPTG 30 $^{\circ}$ C 200rpm振荡培养8h诱导重组蛋白表达;然后使用SDS-PAGE分析重组菌可表达HPV16E7蛋白,选取高效表达重组肽段的工程菌株扩大培养,加IPTG诱导目的蛋白的表达,收集菌体,超声破碎后4 $^{\circ}$ C 12 000g,离心20min收集上清;纯化超声裂解上清中的重组蛋白,用含有150mmol/L咪唑的洗脱液洗脱,4 $^{\circ}$ C平衡缓冲液透析除去咪唑,最终获得纯化的HPV16E7重组蛋白。

[0018] 优选地,上述步骤三中的免疫为用纯化后的HPV16E7抗原免疫8周龄BALB/C小鼠,免疫方式为皮下多点注射,免疫剂量0.05mg/只,免疫间隔时间为2周,首次免疫加完全福氏完全佐剂,其后三次加福氏不完全佐剂进行免疫,最后用抗原水剂作冲击免疫。

[0019] 优选地,细胞融合及杂交瘤细胞筛选冲击免疫3d后,取小鼠脾细胞与SP 2/0细胞融合,用HAT选择培养基于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。10d后,以HPV16E7为抗原包被的酶标板(10ng/孔),间接ELISA法检测培养上清筛选阳性克隆,筛选到的阳性克隆继续进行有限稀释,直至所有孔均HPV16E7抗体阳性。

[0020] 进一步地,本发明中小鼠腹水的制备操作为:取12周龄BALB/C小鼠5只。腹腔注射石蜡油。一周后将扩大培养后的阳性克隆以 $1 \times 10^6$ /只注入小鼠腹腔,经过一周,观察小鼠腹水产生情况,当小鼠腹腔产腹水后无菌抽取腹水,10 000g离心5min取上清。

[0021] 进一步地,本发明单克隆抗体纯化过程为:取小鼠腹水2ml,逐滴加入2倍体积PBS,并用上样缓冲液(20mM PB缓冲液)透析过夜。透析后腹水10 000g离心10min取上清,经0.45 $\mu$ m滤膜过滤后以1.0ml/min的速度经过平衡再生后的Protien G亲和层析柱纯化,抗体用PH2.7的甘氨酸-HCL缓冲液洗脱,每1ml抗体加入100ul 1M,PH 9.0,甘氨酸-HCL缓冲液进行中和。

[0022] 本发明第二个方面提供了一种根据上述的制备方法制备得到的HPV16E7单克隆抗体。

[0023] 优选地,HPV16E7单克隆抗体的重链CDR1序列如SEQ NO.3所示;所述HPV16E7单克隆抗体的重链CDR2序列如SEQ NO.4所示;所述HPV16E7单克隆抗体的重链CDR3序列如SEQ NO.5所示;所述HPV16E7单克隆抗体的轻链CDR1序列如SEQ NO.6所示;所述HPV16E7单克隆抗体的轻链CDR2序列如SEQ NO.7所示;所述HPV16E7单克隆抗体的轻链CDR3序列如SEQ NO.8所示。

[0024] 优选地,上述HPV16E7单克隆抗体的重链序列如SEQ NO.9所示;所述HPV16E7单克隆抗体的轻链序列如SEQ NO.10所示。

[0025] 第三个方面,本发明还提供上述的HPV16E7单克隆抗体在制备治疗宫颈癌药物中的应用。

[0026] 最后一方面,本发明还提供一种检测HPV16E7的试剂盒,包括上述的HPV16E7单克隆抗体。

[0027] 本发明采用上述技术方案,与现有技术相比,具有如下技术效果:

[0028] 本发明从临床标本中克隆得到正确的HPV16E7基因序列,该基因经正确插入pET28a(+)原核表达质粒后,在IPTG诱导下在BL21(DE3)大肠杆菌中以可溶性蛋白形式有效地表达了HPV16E7融合蛋白,该蛋白带有His标签,经His金属亲和层析柱纯化后得到高纯度HPV16E7蛋白。并用该蛋白免疫BALB/C小鼠成功制备抗HPV16E7抗体,该抗体经Western blot证实能够与HPV16E7特异性结合,对于HPV16E7抗原检测具有相当高的应用价值;本发明成功表达了HPV16E7抗原同时,制备了抗HPV16E7的单克隆抗体,可以特异性识别HPV16E7抗原,为研究该蛋白相关疾病的研究以及HPV16抗原检测方法的建立提供了重要的基础。

### 附图说明

[0029] 图1 HPV16E7基因扩增结果鉴定图;

[0030] 图2重组菌表达HPV16E7蛋白鉴定分析图;

[0031] 图3纯化HPV16E7抗体鉴定图;

[0032] 图4抗HPV16E7抗体阳性细胞株重链、轻链PCR扩增鉴定结果图;

[0033] 图5抗HPV16E7抗体与真核、原核表达HPV16E7的反应性实验结果图;

[0034] 图6免疫组化鉴定抗HPV16E7抗体与各型HPV感染患者宫颈脱落细胞反应性的结果。

### 具体实施方式

[0035] 本发明提供了一种HPV16E7单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤,

[0036] 步骤一,HPV16E7基因扩增

[0037] 利用HPV16阳性分泌物为模板进行PCR扩增,上游引物序列如SEQ NO.1所示,下游引物序列如SEQ NO.2所示;

[0038] 步骤二,获得HPV16E7重组蛋白

[0039] 利用回收步骤一获得的PCR产物进行HPV16E7表达载体构建及诱导表达,并进行HPV16E7重组蛋白的纯化;

[0040] 步骤三,免疫

[0041] 采用的抗原为所述步骤二中得到的纯化后的HPV16E7重组蛋白;

[0042] 步骤四,细胞融合,得到杂交瘤细胞;

[0043] 步骤五,对所述步骤四得到的杂交瘤细胞进行阳性克隆的筛选,得到特异性HPV16E7单克隆抗体杂交瘤细胞;

[0044] 步骤六,利用步骤五所得的特异性HPV16E7单克隆抗体杂交瘤细胞制得HPV16E7单克隆抗体。

[0045] 下面通过具体实施例对本发明进行详细和具体的介绍,以使更好的理解本发明,但是下述实施例并不限制本发明范围。

[0046] 实施例一HPV16E7抗原的制备

[0047] 首先,进行HPV16E7引物设计与合成,根据NCBI发布的HPV16E7基因序列,设计一对特异性引物。上游引物(SEQ NO.1):5'-CGCGGATCCATGCATGGAGATACACCTACATTG'(划线部分为BamH I酶切位点);下游引物(SEQ NO.2):5'-CCGCTCGAGCTATTATGGTTTCTGAGAACAGATG-3'

(划线部分为Xho I酶切位点)。

[0048] 然后,进行HPV16E7基因扩增,以HPV16阳性分泌物为模板进行PCR扩增。反应体系如下:10×PCR buffer 2μl,MgCL<sub>2</sub>(25mmol/L)1.5ul,dNTP 0.4μl,上下游引物各0.5μl,模板DNA 1μl,Taq酶0.2μl,去离子水13.9μl;反应条件:94℃预变5min,94℃,45s→56℃,45s→72℃,45s,30个循环,72℃延伸7min,结果如附图1所示(注:M:marker;1:阴性标本;2:HPV16阳性标本)。

[0049] 接着进行HPV16E7表达载体构建及诱导表达,PCR产物用琼脂糖凝胶(10g/L)电泳进行鉴定。回收PCR产物,连接至载体pMD18-T中,转化至感受态大肠杆菌JM109,筛选阳性克隆,测序正确后将质粒pMD18-T/18E6、pET28a(+)载体用BamH I、Xho I双酶切,16℃连接过夜,并将重组质粒转化至感受态大肠杆菌BL21(DE3)。0.1g/L卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆,用终浓度为1mM IPTG 30℃200rpm振荡培养8h诱导重组蛋白表达。最后SDS-PAGE(浓缩胶50g/L,分离胶120g/L)分析重组菌可表达HPV16E7蛋白,如图2所示(注:M:marker;1:BL21/pET8a;2-3:BL21/pET8a/HPV16E7)。

[0050] 最后进行重组蛋白的纯化,选取高效表达重组肽段的工程菌株扩大培养,加IPTG诱导目的蛋白的表达,收集菌体,超声破碎后4℃12 000g,离心20min收集上清。按照TALON金属亲和层析柱说明书纯化超声裂解上清中的重组蛋白,用含有150mmol/L咪唑的洗脱液洗脱,4℃平衡缓冲液透析除去咪唑,并按照BCA蛋白定量检测试剂盒说明书进行蛋白质定量。

[0051] 实施例二 抗HPV16E7单克隆抗体的制备

[0052] 1)小鼠免疫利用实施例一中纯化后的HPV16E7抗原免疫8周龄Ba1b/C小鼠。免疫方式为皮下多点注射,免疫剂量0.05mg/只,免疫间隔时间为2周。首次免疫加完全福氏完全佐剂,其后三次加福氏不完全佐剂进行免疫,最后用抗原水剂作冲击免疫。

[0053] 2)细胞融合及杂交瘤细胞筛选冲击免疫3d后,取小鼠脾细胞与SP 2/0细胞融合,用HAT选择培养基于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。10d后,以HPV16E7为抗原包被的酶标板(10ng/孔),间接ELISA法检测培养上清筛选阳性克隆,筛选到的阳性克隆继续进行有限稀释,直至所有孔均HPV16E7抗体阳性。

[0054] 3)腹水制备取12周龄Ba1b/C小鼠5只,腹腔注射石蜡油。一周后将扩大培养后的阳性克隆以1×10<sup>6</sup>/只注入小鼠腹腔,观察小鼠腹水产生情况,当小鼠腹腔产腹水后无菌抽取腹水,10000g离心5min取上清。

[0055] 4)单克隆抗体纯化取腹水2ml,逐滴加入2倍体积PBS,并用上样缓冲液(20mM PB缓冲液)透析过夜。透析后腹水10000g离心10min取上清,经0.45μm滤膜过滤后以1.0ml/min的速度经过平衡再生后的Protien G亲和层析柱纯化,抗体用PH2.7的甘氨酸-HCL缓冲液洗脱,每1ml抗体加入100ul 1M,Ph9.0,甘氨酸-HCL缓冲液进行中和,得到纯化的HPV16E7单克隆抗体。

[0056] 实施例三 抗HPV16E7单克隆抗体结构检测

[0057] SDS-PAGE检测

[0058] 取实施例二中小鼠腹水5ul(加入4倍体积PBS稀释)以及纯化后抗体20ul,加入5×上样缓冲液5ul,沸水浴5min后进行SDS-PAGE电泳分离,最后加入考马斯亮蓝。纯化后抗体可见两条条带,分别位于55KDa(为抗体重链)、27KDa(为抗体轻链),如图3所示(注:M:

marker;1:腹水;2-3:抗HPV16E7抗体纯化后)。

[0059] PCR扩增检测

[0060] 使用实施例二中阳性细胞株进行扩大培养后Trizol法提取RNA,逆转录后得到全基因组CDNA。设计引物对抗体重链、轻链分别进行PCR扩增。引物序列如表1。反应体系如下:10×PCR buffer 2μl,MgCL<sub>2</sub>(25mmol/L)1.5ul,dNTP 0.4μl,上下游引物各0.5μl,模板DNA 1μl,Taq酶0.2μl,去离子水13.9μl;反应条件:94℃预变5min,94℃,60s→58℃,60s→72℃,60s,30个循环,72℃延伸7min。PCR产物用琼脂糖凝胶(10g/L)电泳进行鉴定,结果如附图4所示(注:M:marker;1-4:抗体重链;5-8:抗体轻链)。回收PCR产物,连接至载体pMD18-T中,转化至感受态大肠杆菌JM109,筛选阳性克隆,交由公司测序。经比对,PCR产物分别为抗体重链、轻链。

[0061] 表1单克隆抗体基因测序引物表

引物名称	引物序列
重链-F	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTC
[0062] 重链-R	GAGGAGACGGTGACCAGGGTG
轻链-F	GATGTTGTGATGACTCAGTC
轻链-R	TACGTTTGATCTCCACCTTGGTC

[0063] 实施例四 抗HPV16E7单克隆抗体功能鉴定

[0064] Weastern-blot检测

[0065] 将Siha、Hela细胞以及诱导后BL21/pET28a/HPV16E7菌体进行SDS-PAGE电泳,用湿转印法将蛋白质转印至硝酸纤维膜上,50g/L脱脂奶粉封闭37℃1h,加入杂交瘤细胞株培养上清,4℃湿盒孵育过夜,用TBST(含有0.5%吐温-20的TBS)洗膜3次,每次5min,然后加入1:2 000稀释的羊抗鼠IgG-HRP,37℃孵育1h,洗膜3次,ECL显色。结果显示该单克隆抗体可与Siha细胞以及诱导后BL21/pET28a/HPV16E7菌体特异性结合,如附图5所示(1:BL21/pET8a/HPV16E7;2:BL21/pET8a;3:Siha细胞;4:Hela细胞)。

[0066] 免疫组化

[0067] 将Siha、Hela细胞爬片、各型HPV感染患者宫颈脱落细胞进行细胞涂片后,用4%多聚甲醛进行固定,50g/L脱脂奶粉37℃封闭1h,杂交瘤细胞株培养上清,37℃孵育1h,PBS洗三次,每次5min,然后加入1:1 000稀释的羊抗鼠IgG-HRP,37℃孵1h,最后PBS清洗三次后DAB显色,苏木素染核。结果表明HPV16E7蛋白在HPV16阳性患者宫颈细胞以及Siha细胞中表达,在其他细胞中不表达,如附图6所示(注:A:HPV16阳性患者;B:HPV55、58阳性患者C:HPV58阳性患者D:HPV18阳性患者;E:HPV51阳性患者F:18、52、81阳性患者)。证明本发明制备的单抗可与HPV16特异性反应,可用于HPV16感染诊断。

[0068] 通过上述实施例可知,本发明从临床标本中克隆得到正确的HPV16E7基因序列,该基因经正确插入pET28a(+)原核表达质粒后,在IPTG诱导下在BL21(DE3)大肠杆菌中以可溶性蛋白形式有效地表达了HPV16E7融合蛋白,该蛋白带有His标签,经His金属亲和层析柱纯化后得到高纯度HPV16E7蛋白。并用该蛋白免疫BALB/C小鼠成功制备抗HPV16E7抗体,该抗体经Western blot证实能够与HPV16E7特异性结合,对于HPV16E7抗原检测具有相当高的应



用价值;本发明成功表达了HPV16E7抗原同时,制备了抗HPV16E7的单克隆抗体,可以特异性识别HPV16E7抗原,为研究该蛋白相关疾病的研究以及HPV16抗原检测方法的建立提供了重要的基础。

[0069] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述,但其只是作为范例,本发明并不限于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言,任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此,在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改,都应涵盖在本发明的范围内。

<110> 上海市普陀区中心医院  
 <120> 一种 HPV16 E7 单克隆抗体及其制备方法和应用  
 <160> 10

<210> 1  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> PCR 扩增引物

<400> 1  
 cgcggatcca tgcattgaga tacacctaca ttg 33

<210> 2  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0001] <220>  
 <223> PCR 扩增引物

<400> 2  
 ccgctcgagc tattatgggt tctgagaaca gatg 34

<210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 3  
 Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp  
 1 5

<210> 4  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<400> 4  
 Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr

1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 5

Ala	Ser	Gly	Ile	Thr	Ala	Asn	Tyr
1				5			

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 6

Lys	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Tyr
1				5					10

[0002]

<210> 7

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 7

Leu	Val	Ser
1		

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Gln	His	Ile	Arg	Glu	Lcu
1				5	

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 9

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

[0003] &lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 10

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

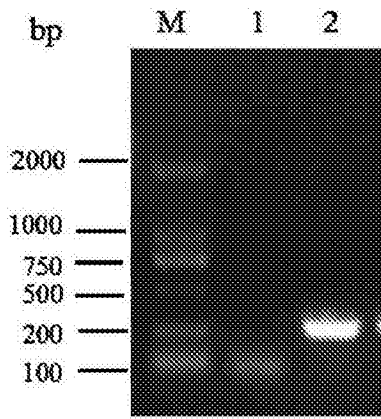


图1

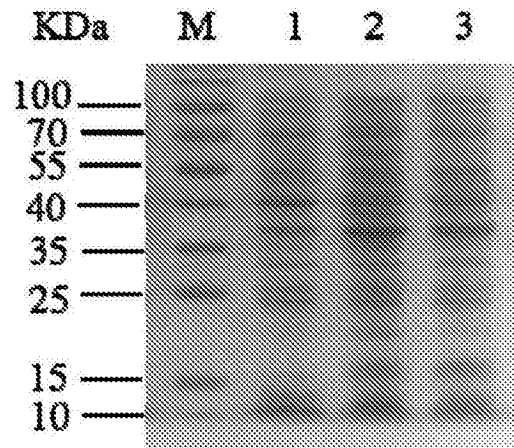


图2

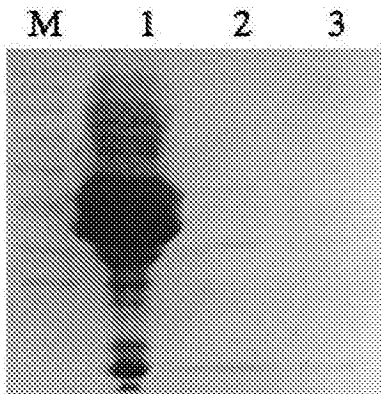


图3

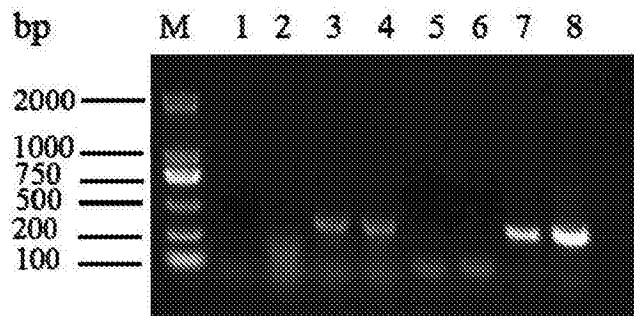


图4

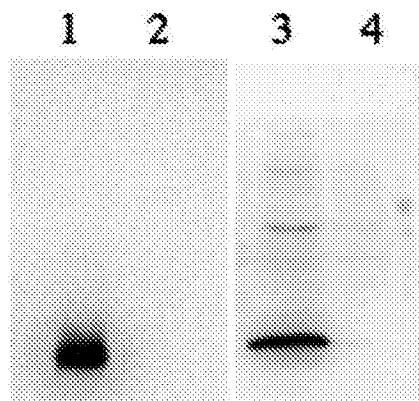


图5

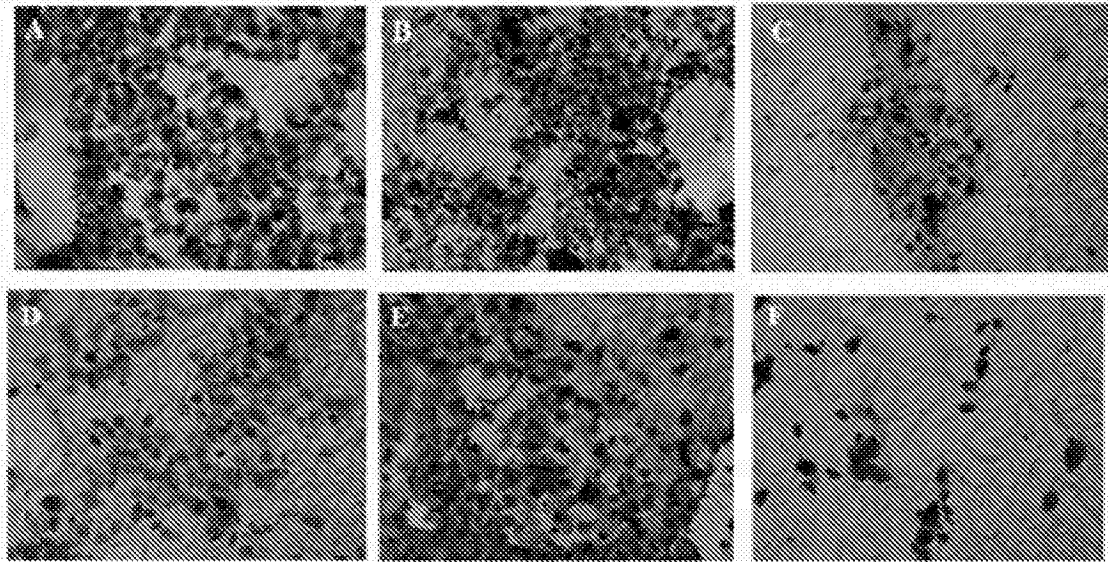


图6