



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112725284 A

(43) 申请公布日 2021.04.30

(21) 申请号 202110113588.1

C12N 5/0783 (2010.01)

(22) 申请日 2021.01.27

(71) 申请人 河南省华隆生物技术有限公司

地址 453000 河南省新乡市新飞大道1789号高新区火炬园

(72) 发明人 赵礼军 熊建民

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司 11332

代理人 巩克栋

(51) Int. Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

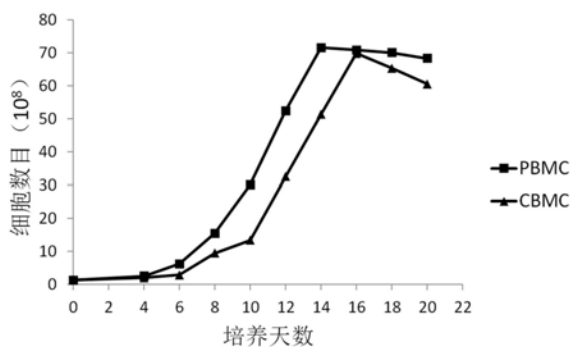
权利要求书2页 说明书11页  
序列表9页 附图3页

(54) 发明名称

一种NK滋养层细胞及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种NK滋养层细胞及其应用,所述NK滋养层细胞表达细胞因子组合物,所述细胞因子组合物包括CD86、CD19、IL-21、CD137L和CD64;所述CD86包括SEQ ID No.1所示的氨基酸序列。本发明还提供了一种重组载体、一种重组慢病毒、所述NK滋养层细胞的制备方法和一种NK细胞培养基。通过构建重组载体,包装得到重组慢病毒后,再导入宿主细胞的基因组内,制备得到的NK滋养层细胞可以持续分泌刺激NK细胞增殖与分化的相关蛋白,实现了NK细胞的高效率、低成本扩增,制备方法简单高效,具有广阔的应用前景。



1. 一种NK滋养层细胞,其特征在于,所述NK滋养层细胞表达细胞因子组合物,所述细胞因子组合物包括CD86、CD19、IL-21、CD137L和CD64;

所述CD86包括SEQ ID No.1所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的NK滋养层细胞,其特征在于,所述CD19包括SEQ ID No.2所示的氨基酸序列;

优选地,所述IL-21通过与CD8 $\alpha$ 跨膜区融合形成IL-21-CD8 $\alpha$ 表达在所述NK滋养层细胞表面;

优选地,所述IL-21-CD8 $\alpha$ 包括SEQ ID No.3所示的氨基酸序列;

优选地,所述CD137L包括SEQ ID No.4所示的氨基酸序列;

优选地,所述CD64包括SEQ ID No.5所示的氨基酸序列。

3. 一种重组载体,其特征在于,所述重组载体用于制备权利要求1或2所述的NK滋养层细胞;

优选地,所述重组载体包括CD86编码序列、CD19编码序列、IL-21-CD8 $\alpha$ 编码序列、CD137L编码序列或CD64编码序列中的任意一种或至少两种组合。

4. 根据权利要求3所述的重组载体,其特征在于,所述CD86编码序列包括SEQ ID No.6所示的核酸序列;

优选地,所述CD19编码序列包括SEQ ID No.7所示的核酸序列;

优选地,所述IL-21-CD8 $\alpha$ 编码序列包括SEQ ID No.8所示的核酸序列;

优选地,所述CD137L编码序列包括SEQ ID No.9所示的核酸序列;

优选地,所述CD64编码序列包括SEQ ID No.10所示的核酸序列;

优选地,所述重组载体为包括CD86编码序列、CD19编码序列、IL-21-CD8 $\alpha$ 编码序列、CD137L编码序列或CD64编码序列中的任意一种或至少两种的组合物pUC57载体。

5. 一种重组慢病毒,其特征在于,所述重组慢病毒包括权利要求3或4所述的重组载体。

6. 根据权利要求5所述的重组慢病毒,其特征在于,所述重组慢病毒由权利要求3或4所述的重组载体和辅助质粒共同导入哺乳动物细胞后包装得到;

优选地,所述哺乳动物细胞包括293T细胞。

7. 一种权利要求1或2所述的NK滋养层细胞的制备方法,其特征在于,所述NK滋养层细胞的制备方法包括:

构建权利要求3或4所述的重组载体,与辅助质粒共同导入哺乳动物细胞,得到权利要求5或6所述的重组慢病毒;

将所得重组慢病毒感染宿主细胞,经嘌呤霉素筛选、单克隆筛选和磁珠阳性分选,得到所述NK滋养层细胞。

8. 一种NK细胞培养基,其特征在于,所述NK细胞培养基包括权利要求1或2所述的NK滋养层细胞。

9. 根据权利要求8所述的NK细胞培养基,其特征在于,所述NK细胞培养基还包括基础培养液、血清、血浆或抗生素中的任意一种或至少两种的组合;

优选地,所述抗生素包括硫酸庆大霉素。

10. 权利要求1或2所述的NK滋养层细胞、权利要求3或4所述的重组载体、权利要求5或6所述的重组慢病毒或权利要求8或9所述的NK细胞培养基中的任意一种或至少两种的组合

在培养NK细胞中的应用。

## 一种NK滋养层细胞及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于NK细胞培养技术领域,尤其涉及一种NK滋养层细胞及其应用。

### 背景技术

[0002] 自然杀伤细胞(Natural killer cell,NK细胞)来源于骨髓淋巴样干细胞,广泛存在于淋巴器官和外周组织中,在正常外周血中占淋巴细胞总数的5%~10%,脾脏中占1%~2%,淋巴结和骨髓中也有NK细胞的存在。NK细胞是机体防御感染和防止细胞恶性转化的重要免疫细胞,参与抗肿瘤、抗病毒感染和免疫调节等重要的生理过程。

[0003] 目前,NK细胞在肿瘤治疗中的价值逐步得到了重视,但NK细胞的获取较为困难限制了其在免疫治疗方面的发展。CN107267454A公开了一种脐血NK细胞的体外扩增方法及其试剂盒与应用,通过活化培养脐血NK细胞,再添加唑来膦酸和重组IL-2因子对所得脐血NK细胞增殖培养14~35天,即可获得大量的NK细胞。然而,由于脐血和外周血中细胞差异极大,该方法仅适用于脐血,无法应用于外周血中,应用范围较小。

[0004] 目前,NK细胞的培养主要包括滋养层细胞培养和纯因子细胞培养,二者都存在成本极高的问题。如何提供一种成本较低的NK细胞的培养方法,已成为亟待解决的问题。

### 发明内容

[0005] 针对现有技术的不足和实际需求,本发明提供一种NK滋养层细胞及其应用,构建的重组细胞的细胞膜可以表达CD86、CD19、IL-21-CD8 $\alpha$ 、CD137L和CD64,协同刺激NK细胞长期保持增殖能力,提高扩增效率,诱导NK细胞的分化与成熟,方法简单高效,容易操作,可应用于NK细胞的相关研究中,具有广阔的应用前景。

[0006] 为达此目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 第一方面,本发明提供了一种NK滋养层细胞,所述NK滋养层细胞表达细胞因子组合物,所述细胞因子组合物包括CD86、CD19、IL-21、CD137L和CD64;

[0008] 所述CD86包括SEQ ID No.1所示的氨基酸序列。

[0009] SEQ ID No.1:

[0010] MGLSNILFVMAFLLSGAAPLKIQAYFNETADLPCQFANSQNSLSELVVFWDQENLVLNEVYLGKEK  
FDSVHVKYMGRTSFDSDSWTLRLHNLQIKDKGLYQCIHKKPTGMIRIHQMNSELSVLNFSQPEIVPISNITEN  
VYINLTCSSIHGYPEPKMSVLLRRTKNSTIEYDGIQKSDNVTELYDVSISLSVSFPDVTSNMTIFCILETDKTR  
LLSSPFSIELEDPPPPDHIPWITAVLPTVVICVMVFLILWKWKKKRPRNSYKCGTNTMERESEQTKKREKIH  
IPERSDEAQRVFKSSKTSSCDKSDTCF。

[0011] 本发明中,CD86和CD19可以激活并提升NK细胞对肿瘤细胞和肿瘤相关的巨噬细胞和B细胞的杀伤能力,增殖得到的NK细胞的免疫功能更好;IL-21为活化的T细胞分泌的细胞因子,具有促进骨髓前体细胞增殖以及促进NK细胞增殖、分化和增强细胞毒活性的作用;CD137L属于TNF超家族,与其配体结合后,可以产生共刺激信号促进NK细胞增殖;CD64可以增强NK细胞的ADCC(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,抗体依赖的细胞

介导的细胞毒性作用) 效应。通过构建表达上述蛋白的重组细胞与分离得到的NK细胞共同培养,可以在体外诱导NK细胞的增殖、分化与成熟,提高了扩增效率,降低了生产成本,应用价值很高。

[0012] 优选地,所述CD19包括SEQ ID No.2所示的氨基酸序列。

[0013] 优选地,所述IL-21通过与CD8 $\alpha$ 跨膜区融合形成IL-21-CD8 $\alpha$ 表达在所述NK滋养层细胞表面。

[0014] 优选地,所述IL-21-CD8 $\alpha$ 包括SEQ ID No.3所示的氨基酸序列。

[0015] 优选地,所述CD137L包括SEQ ID No.4所示的氨基酸序列。

[0016] 优选地,所述CD64包括SEQ ID No.5所示的氨基酸序列。

[0017] SEQ ID No.2:

[0018] MPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLLKLSLGL  
PGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLNRSSEGP  
SSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSLNLQSLSQLTMAPGSTLWLSGCVPPDSVSRGPLSWTHVHPK  
GPKSLLSLELKDDRPARDMWMETGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHLLRTGGWKVSAVT  
LAYLIFCLCSLVGILHL。

[0019] SEQ ID No.3:

[0020] MRSSPGNMERIVICLMVIFLGLTVHKSSSQGDRHMIRMRLIDIVDQL KNYVNDLVPEFLPAPEDV  
ETNCEWSAFSCFQKAQLKSANTGNNERI INVSIKKLRKPPSTNAGRROKHRLTCPSCDSYEKPPKEFLERFKSL  
LQKMIHQHLSRTHGSEDSGSYIWAFLAGTCGVLLLSLVITLYC。

[0021] SEQ ID No.4:

[0022] MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLAAACAVFLACPWAVSGARASPGSAASP  
RLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVYF  
FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA  
RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE。

[0023] SEQ ID No.5:

[0024] MWFLTLLLLWVPVDGQVDTTKAVITLQPPWVSVFQEETVTLHCEVLHLPGSSSTQWFLNGTATQTSTP  
SYRITSASVNDSEYRCQRGLSGRSDPIQLEIHRGWLLQVSSRVFTEGEPLALRCHAWKDKLVYNVLYYRNGKAF  
KFFHWNSNLTILKTNISHNGTYHCSGMGKHRYTSAGISVTVKELFPAPVLNASVTSPLLEGNLVTLSCETKLLLR  
PGLQLYFSFYMGSKTLRGRNTSSEYQILTARREDSGLYWCEAATEDGNVLKRSPELELQVLGLQLPTPVWFHVLFY  
LAVGIMFLVNTVLWVTIRKELKRKKKWDLEISLDSGHEKKVISSLQEDRHLEELKCKEQKEEQLEQGVHRKEPQG  
AT。

[0025] 第二方面,本发明提供了一种重组载体,所述重组载体用于制备第一方面所述的NK滋养层细胞。

[0026] 优选地,所述重组载体包括CD86编码序列、CD19编码序列、IL-21-CD8 $\alpha$ 编码序列、CD137L编码序列或CD64编码序列中的任意一种或至少两种组合。

[0027] 优选地,所述CD86编码序列包括SEQ ID No.6所示的核酸序列。

[0028] 优选地,所述CD19编码序列包括SEQ ID No.7所示的核酸序列。

[0029] 优选地,所述IL-21-CD8 $\alpha$ 编码序列包括SEQ ID No.8所示的核酸序列。

[0030] 优选地,所述CD137L编码序列包括SEQ ID No.9所示的核酸序列。

[0031] 优选地,所述CD64编码序列包括SEQ ID No.10所示的核酸序列。

[0032] SEQ ID No.6:

[0033] atgggactgagtaacattctcttttgatggccttcctgctctctgggtgctgctcctctgaagattca  
 agcttattttcaatgagactgcagacctgccatgccaatttgcaaaactctcaaaaccaaagcctgagtgagctagta  
 gtattttggcaggaccaggaaaacttggttctgaatgaggtatacttaggcaaagagaaatttgacagtgttcatt  
 ccaagtatatgggcccacacaagttttgattcggacagttggaccctgagacttcacaatcttcagatcaaggacaa  
 gggcttgatcaatgtatcatccatcaciaa aagccacaggaatgattcgcacccagatgaattctgaact  
 gtcagtgtttgtaacttcagtcaacctgaaatagtaccaatttctaataaacagaaaatgtgtacataaatttg  
 acctgctcatctatacacggttaccagaacctagaagatgagtggttttgctaagaaccaagaattcaactatcg  
 agtatgatggattatgcagaaatctcaagataatgtcacagaactgtacgacgtttccatcagcttgtctgtttc  
 attccctgatgttacgagcaatatgaccatcttctgtattctggaaactgacaagacgaggcttttatcttcaact  
 ttctctatagagcttgaggacctcagctccccagaccacattccttggttacagctgtacttccaacagtta  
 ttatatgtgtgatggtttctgtctaatcttatggaaatggagaagaagaagcggctcgcaactcttataaatg  
 tgaaccaacacaatggagagggagagagtgaacagaccaagaaaagagaaaaaatccatataacctgaaagatct  
 gatgaagcccagcgtgtttttaaagttcgaagacatcttcatgcaaaaagtgatacatgtttttaa。

[0034] SEQ ID No.7:

[0035] atgccacctctcgcctctctctctctctctctctctctctctctctcaccatggaagtcaggcccgaggaaacc  
 tctagtgggtgaagggtggaagaggagataacgctgtgctgcagtgctcaaggggacctcagatggcccccactcag  
 cagctgacctgggtctcgggagtcctcgcttaaaccttcttaaaaactcagcctggggctgccaggcctgggaatcc  
 acatgaggccccctggccatctggcttttcatcttcaacgtctctcaacagatggggggcttctacctgtgccagcc  
 ggggccccctctgagaaggcctggcagcctggctggacagtcattgtggagggcagcggggagctgttccgggtgg  
 aatgtttcggacctaggtggcctgggctgtggcctgaagaacaggtcctcagaggggccagctccccttccggga  
 agctcatgagcccaagctgtatgtgtgggccaagaccgcccctgagatctgggaggagagcctccgtgtctccc  
 accgagggacagcctgaaccagagcctcagccaggacctaccatggccccctggctccacactctggctgtcctgt  
 ggggtacccccctgactctgtgtccaggggccccctctctctggacctgtgcaccccaaggggctaagtattgc  
 tgagcctagagctgaaggacgatcggccggccagagatatgtgggtaatggagacgggtctgtttgttggccgggc  
 cacagctcaagacgctggaaagtattattgtcacctggcaacctgacctgtcattccacctggagatcactgct  
 cggccagtaactatggcactggctgctgaggactgggtggctggaaggtctcagctgtgactttggcttatctgatct  
 tctgcctgtgttcccttgtgggcattcttcatctt。

[0036] SEQ ID No.8:

[0037] atgagatccagtcctggcaacatggagaggattgtcatctgtctgatggtcattcttctggggacact  
 ggtccacaaatcaagctcccaaggctcaagatcgccacatgattagaatgctcaacttatagatattgttgatcag  
 ctgaaaaattatgtgaatgacttggtcctgaatttctgcccagctccagaagatgtagagacaaactgtgagtggt  
 cagctttttctgttttcagaaggcccaactaaagtcagcaaaatacaggaaacaatgaaaggataatcaatgtatc  
 aattaaagctgaagaggaaaccacctccacaaatgcagggagaagacagaaacacagactaacatgcccttca  
 tgtgattcttatgagaaaaaccacccaaagaattcctagaagattcaaatcacttctccaaaagatgattcacc  
 agcatctgtcctctagaacacacggagtgaaatccggatcctacatctggggcgccttggccgggacttgtgg  
 ggtccttctctgtcactggttatcaccctttactgctaa。

[0038] SEQ ID No.9:

[0039] atggaatacgcctctgacgcttcaactggaccccgaagccccgtggcctcccgcgccccgcgctcgcgcctgcccgcgtactgccttgggcccctggctcgcggggctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgcccgcctgcccgcctctctcgcctgcccctgggcccgtgtccggggctcgcgcctcgcggctccgcggccagcccagactccgcgagggtcccagactttcgcggacgatcccgcggcctcttggacctgcggcagggcatgtttgctcagctggtggcccaaatgtttctgctgatcgatgggcccctgagctggtacagtgaccaggcctggcaggcgtgtccctgacggggggcctgagctacaaagaggacacgaaggagctggtggtggccaaggctggagcttactatgtcttctttcaactagagctcggcgcgtggtggccggcgagggtcaggctccgtttcacttgcgctgcacctgcagccactgcgctctgctgctgggcccgcgcccctggctttgaccgtggacctgccaccgcctcctccgaggctcggaaactggccttcggtttccagggccgcttgctgcacctgagtgccggccagcgcctgggctccatcttcacactgaggccagggcacgccatgctggcagcttaccagggcgccacagtcttgggactcttccgggtgacccccgaaatcccagccggactcccttcacgaggtcgggaataa。

[0040] SEQ ID No.10:

[0041] atgtggttcttgacaactctgctcctttgggttccagttgatggcaagtggacaccacaaaggcagtgatcactttgcagcctccatgggtcagcgtgttccaagaggaaaccgtaacctgcattgtgaggtgctccatctgcctgggagcagctctacacagtgggtttctcaatggcacagccactcagacctgacccccagctacagaatcacctctgccagtgatcaatgacagtggtgaatacaggtgccagagaggtctctcagggcgaagtgacccccatacagctggaatccacagaggctggctactactgcaggtctccagcagagctcttcacggaaggagaacctctggccttgaggtgtcatgctggaaggataagctggtgtacaatgtgctttactatcgaaatggcaaagcctttaagttttccactggaattctaacctcaccattctgaaaaccaacataagtcacaatggcacctaccattgctcagggatgggaaagcatcgtacacatcagcaggaatatctgtcactgtgaaagagctatttccagctccagtgctgaatgcatctgtgacatcccactcctggaggggaaatctggtcacctgagctgtgaaacaaagttgctcttgacagggcctgggttgcagctttacttctccttctacatgggcagcaagacctgcgaggcaggaacacatcctctgaatacacaataactgctagaagagaagactctgggttatactgggtgcgaggctgccacagaggatggaaatgtccttaagcgcagccctgagttggagcttcaagtgttggcctccagttaccaactcctgtctgggttcatgtcctttctatctggcagtggggaataatgttttagtgaacactgttctctgggtgacaatacgtaaagaactgaaaagaaagaaaagtggtgatttagaaatctctttggattctggtcatgagaagaaggtaatttccagccttcaagaagacagacatttagaagaagagctgaaatgtcaggaacaaaaagaagaacagctgcaggaaggggtgcaccggaaggagccccagggggccacgtag。

[0042] 优选地,所述重组载体为包括CD86编码序列、CD19编码序列、IL-21-CD8 $\alpha$ 编码序列、CD137L编码序列或CD64编码序列中的任意一种或至少两种的组合物pUC57载体。

[0043] 第三方面,本发明提供了一种重组慢病毒,所述重组慢病毒包括第二方面所述的重组载体。

[0044] 本发明中,通过构建重组慢病毒,再将慢病毒导入受体细胞中,重组载体中的编码序列可以整合到细胞的基因组中,实现了蛋白的持续表达,可以对NK细胞进行持续激活,滋养NK细胞的效果更好,增殖率更高。

[0045] 优选地,所述重组慢病毒由第二方面所述的重组载体和辅助质粒共同导入哺乳动物细胞后包装得到。

[0046] 优选地,所述哺乳动物细胞包括293T细胞。

[0047] 第四方面,本发明提供了一种第一方面所述的NK滋养层细胞的制备方法,所述NK滋养层细胞的制备方法包括:

[0048] 构建第二方面所述的重组载体,与辅助质粒共同导入哺乳动物细胞,得到第三方面所述的重组慢病毒;

[0049] 将所得重组慢病毒侵染宿主细胞,经嘌呤霉素筛选、单克隆筛选和磁珠阳性分选,得到所述NK滋养层细胞。

[0050] 本发明中,所述NK滋养层细胞的制备方法操作简便,成功率高,对操作人员的技术水平要求较低,为NK滋养层细胞的推广与应用创造了条件。

[0051] 第五方面,本发明提供了一种NK细胞培养基,所述NK细胞培养基包括第一方面所述的NK滋养层细胞。

[0052] 本发明中,通过向培养基中添加NK滋养层细胞,可以持续分泌具有刺激作用的蛋白,促进NK细胞的增殖、分化和成熟,NK细胞的增殖速率更快,免疫功能更好,生产成本更低,应用前景更加广阔。

[0053] 优选地,所述NK细胞培养基还包括基础培养液、血清、血浆或抗生素中的任意一种或至少两种的组合。

[0054] 优选地,所述抗生素包括硫酸庆大霉素。

[0055] 第六方面,本发明提供了第一方面所述的NK滋养层细胞、第二方面所述的重组载体、第三方面所述的重组慢病毒或第五方面所述的NK细胞培养基中的任意一种或至少两种的组合在培养NK细胞中的应用。

[0056] 本发明中,通过构建重组载体,再包装出重组慢病毒,导入受体细胞中,得到的重组细胞可以持续分泌刺激NK细胞增殖的蛋白,配合基础培养液、血清、血浆或抗生素等常规组分,制成的NK培养基可以刺激NK细胞保持长效增殖的能力,并诱导其分化与成熟,增殖后的NK细胞具有更强效的细胞毒活性,实现了NK细胞的高效率、低成本扩增,应用价值极其广泛。

[0057] 相比于现有技术,本发明具有如下有益效果:

[0058] (1) 本发明通过将CD86、CD19、IL-21-CD8 $\alpha$ 、CD137L和CD64的编码序列整合到受体细胞的基因组中,构建得到的重组细胞可以持续分泌刺激因子,配合常规培养基中的组分,可以诱导NK细胞在体外的增殖、分化与成熟,传代培养后15d左右,NK细胞的数量达到最大值,约为初始数量的70倍;制备得到的NK细胞具有更强的细胞毒活性,实现了NK细胞的快速扩增,且生产成本较低,具有广阔的应用前景;

[0059] (2) 本发明所述NK细胞的制备方法简单高效,容易操作,成功率高,对生产人员的技术水平要求较低,可以实现批量化生产,为相关产品的推广与应用提供了条件。

## 附图说明

[0060] 图1A为本发明实施例3中重组K562细胞中CD64蛋白表达的流式检测的结果图片;

[0061] 图1B为本发明实施例3中重组K562细胞中CD19蛋白表达的流式检测的结果图片;

[0062] 图1C为本发明实施例3中重组K562细胞中IL-21蛋白表达的流式检测的结果图片;

[0063] 图1D为本发明实施例3中重组K562细胞中CD86蛋白表达的流式检测的结果图片;

[0064] 图1E为本发明实施例3中重组K562细胞中CD137L蛋白表达的流式检测的结果图片;

[0065] 图2为本发明实施例4中NK细胞的增殖曲线的结果图片。



## 具体实施方式

[0066] 为进一步阐述本发明所采取的技术手段及其效果,以下结合实施例和附图对本发明作进一步地说明。可以理解的是,此处所描述的具体实施方式仅仅用于解释本发明,而非对本发明的限定。

[0067] 实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购获得的常规产品。

[0068] 材料:

[0069] CD19CD86、IL-21-CD8 $\alpha$ 、CD64和CD137L四种基因通过生工生物工程(上海)股份有限公司合成;

[0070] pUC57购自上海柯雷生物技术有限公司;

[0071] 辅助质粒购自上海柯雷生物技术有限公司;

[0072] 质粒提取试剂盒购自Invitrogen;

[0073] 转染试剂盒购自碧云天生物技术公司,产品编号为C0508;

[0074] 离心超滤管购自美国密理博,产品编号为UFC910096;

[0075] 培养基购自Gibco;

[0076] 嘌呤霉素购自吉满生物;

[0077] 反转录试剂购自Invitrogen;

[0078] 血清购自Gibco;

[0079] 硫酸庆大霉素购自索莱宝。

[0080] 实施例1

[0081] 本实施例构建重组载体pUC57-CD19CD86、pUC57-IL-21-CD8 $\alpha$ 、pUC57-CD64和pUC57-CD137L,具体步骤如下:

[0082] 合成CD19CD86、IL-21-CD8 $\alpha$ 、CD64和CD137L四种基因,通过酶切位点连接到pUC57载体上,酶切位点为BamHI和EcoRI。

[0083] 其中,CD19和CD86通过SEQ ID No.11所示的连接序列进行连接。

[0084] SEQ ID No.11:

[0085] GGAAGCGGAGCTACCAACTTCTCCCTGCTGAAGCAGGCCGGCGACG TGGAGGAGAACCCCGGCCCC。

[0086] 对构建的重组载体pUC57-CD19CD86、pUC57-IL-21-CD8 $\alpha$ 、pUC57-CD64和pUC57-CD137L进行酶切验证,酶切体系如表1所示。

[0087] 表1

组分	体积( $\mu$ L)
重组载体	5 $\mu$ g
10 $\times$ 缓冲液	2.5
0.1%BSA	5
BamHI	2.5
EcoRI	2.5
超纯水	补足至50
总体积	50

[0089] 酶切条件为:在30℃下水浴1h,再在37℃下水浴1.5h。

[0090] 对酶切产物进行核酸电泳。

[0091] 称取0.5g琼脂糖,加入50mL的1×TBE,加热煮沸3次,冷却至60℃后加入核酸染色剂,混合后倒入模具中,插入胶孔梳,冷却成型后即可点样进行电泳。电泳条件为在120V下恒流30min。

[0092] 由结果可知,重组载体的酶切片段大小与预期相符,证明重组载体构建成功。随后还对重组载体中的插入片段进行了测序验证,测序结果表明插入片段序列无突变,至此重组载体pUC57-CD19CD86、pUC57-IL-21-CD8 $\alpha$ 、pUC57-CD64和pUC57-CD137L构建成功,可用于后续的实验。

[0093] 实施例2

[0094] 本实施例使用实施例1构建的重组载体,构建重组慢病毒Lent-CD19CD86、Lent-IL-21-CD8 $\alpha$ 、Lent-CD64、Lent-CD137L和对照慢病毒Lent-EGFP,具体步骤如下:

[0095] (1) 重组质粒的提取:

[0096] a. 取出保存的菌种,平板划线后,在37℃培养12h,挑取单克隆,加入到5mL培养基中,在37℃下震荡培养6h,取1mL菌液加入到100mL培养基中,在37℃下震荡培养12h;

[0097] b. 取30mL菌液加入50mL离心管中,在室温下4900g离心10min收集菌体,重复操作直至菌液中的全部菌体收集完毕;

[0098] c. 加入10mL的Solution 1(已加入RNase A),重悬菌体;

[0099] d. 加入10mL的Solution 2,上下颠倒10次,在室温下孵育2min;

[0100] e. 加入5mL的Buffer N3,颠倒后在室温下孵育2min;

[0101] f. 将e中所得溶液转移到带滤膜的注射器中,将溶液置于一个新的50mL离心管中;

[0102] g. 向离心管中加入ETR溶液,所述ETR溶液的体积为f中溶液体积的0.1倍,上下颠倒8次,冰浴10min,之后42℃水浴5min,在4900g离心5min,将上清液移至新的50mL的离心管中,避免吸入下层蓝色液体;

[0103] h. 向滤管中加入5mL的Buffer GPS,室温下孵育5min,在4900g离心5min,弃滤液,滤管备用;

[0104] i. 向g中的上清液中加入无水乙醇,所述无水乙醇的体积为g中的上清液体积的0.5倍,混合后在室温下孵育2min;

[0105] j. 将步骤i中的液体加入h中的滤管中,在4900g离心4min,弃滤液,重复操作直至全部液体通过滤膜;

[0106] k. 向滤管中加入10mL的Buffer HB,在4900g离心4min,弃滤液;

[0107] l. 向滤管中加入15mL的DNA Wash Buffer,在4900g离心4min,弃滤液;

[0108] m. 向滤管中加入10mL的DNA Wash Buffer,在4900g离心4min,弃滤液;

[0109] n. 滤管在5900g离心15min,转移至新的50mL离心管中;

[0110] o. 向滤管的滤膜中加入1mL的去离子水,在室温下孵育2min,5900g离心5min,收集DNA溶液。

[0111] 测量提取的质粒的浓度,并进行核酸电泳鉴定。

[0112] 结果显示,重组载体pUC57-CD19CD86、pUC57-IL-21-CD8 $\alpha$ 、pUC57-CD64和pUC57-CD137L提取成功。

[0113] (2) 磷酸钙转染包装慢病毒:

[0114] a. 使用浓度为0.125%的胰蛋白酶消化对数生长期的293T细胞,以完全培养基(DMEM:葡萄糖浓度为4.5g/L,补加5%丙酮酸钠、10%血清和1mg/mL双抗)调整细胞密度,按1:4进行传代,重新接种于培养皿中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>浓度和饱和湿度下培养;

[0115] b. 细胞密度达到60%后,将细胞培养基更换为新鲜纯培养基(DMEM:葡萄糖浓度为4.5g/L,补加5%丙酮酸钠,不含血清和双抗),孵育1h;

[0116] c. 在灭菌离心管中加入制备的各DNA溶液,与等体积CaCl<sub>2</sub>混合均匀,在室温下温育5min,形成DNA-氯化钙溶液;

[0117] d. 将DNA-氯化钙溶液缓慢加入BBS液中,轻柔混匀,在室温下孵育15min,形成DNA-氯化钙-BBS溶液,相关试剂的用量如表2所示;

[0118] e. 将DNA-氯化钙-BBS溶液滴加于293T细胞的培养液中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>浓度和饱和湿度下培养8h,弃含磷酸钙沉淀的培养液,换成新鲜的完全培养液,继续培养24h,观察转染效果达到90%以上,再培养48h,进行病毒的收集。

[0119] 表2

培养用具	DNA	CaCl <sub>2</sub>	BBS
6孔板	100μg, 体积≤20μL	100μL	100μL
T175/d15	100μg, 体积≤368μL	1.84mL	1.84mL

[0121] (3) 病毒的浓缩与收集:

[0122] a. 离心超滤管滤膜内外用PBS浸泡1h,在冰上孵育;

[0123] b. 轻晃病毒包装培养液,收集培养液于无菌离心管中,冰浴10min至温度不高于4℃;

[0124] c. 培养液在4℃下,4500g离心5min,上清使用0.45μm滤器过滤,收集过滤液;

[0125] d. 将过滤液加入离心超滤管中,在4℃下,5000g离心30min,过滤,弃废液;重复操作直至全部液体过滤完成,加入4℃的目的培养基进行洗涤浓缩;

[0126] e. 收集滤器中的病毒液,按50μL/支进行分装,标记后,于-80℃密封冻存。

[0127] (4) 病毒滴度的测定:

[0128] a. 接种293T细胞于6孔板中,细胞密度达到70%,对接种细胞进行计数,细胞数目记为N;

[0129] b. 细胞贴壁后8h,分别加入梯度体积的病毒液(10μL、7.5μL、5μL和2.5μL),通过流式检测各培养孔中的侵染百分率,选择接近50%的侵染组,侵染率记为M,对应的病毒加入体积记为V,根据公式计算病毒的滴度:

[0130]  $T = N \times M / V \times 1000$  (TU/mL)。

[0131] 式中,T为病毒滴度,N为细胞数目,M为侵染率,V为病毒加入体积。

[0132] 综上,本实施例成功制备了重组慢病毒Lent-CD19CD86、Lent-IL-21-CD8α、Lent-CD64、Lent-CD137L和对照慢病毒Lent-EGFP,病毒滴度满足后续实验的要求。

[0133] 实施例3

[0134] 本实施例使用实施例2制备的重组慢病毒来制备滋养层细胞,并进行检测,具体步骤如下:

[0135] (1) 重组慢病毒侵染K562细胞:

[0136] 培养K562细胞,按照MOI为150:1的比例加入病毒液混合,观察细胞,根据细胞的状态进行换液或传代;

[0137] (2) 蛋白水平检测:

[0138] 收集病毒侵染后的细胞,使用质控流式仪检测细胞膜蛋白CD64、CD19、IL-21、CD86和CD137L的表达情况,检测结果如图1A、图1B、图1C、图1D和图1E所示。

[0139] 由图可知,重组K562细胞中可以检测到CD64、CD19、IL-21、CD86和CD137L的表达,其中CD64的表达量为67.93%,CD19的表达量为98.66%,IL-21的表达量为68.4%,CD86的表达量为99.96%,CD137L的表达量为99.91%。综上,相关基因已成功在宿主细胞中表达,可以用于筛选稳定细胞株。

[0140] (3) 稳定细胞的筛选:

[0141] a. 转染细胞:

[0142] 在60mm培养皿内接种K562细胞,待细胞密度为80%时,准备接种病毒;

[0143] 取3mL无抗生素无血清的培养基,加入聚凝胺(Polybrene),使终浓度为8 $\mu$ g/mL,再加入0.5mL病毒液,混合。除去培养皿内的旧培养基,加入含病毒培养基,孵育12h。

[0144] b. 嘌呤霉素浓度的确定:

[0145] 培养待转染的细胞,待细胞密度达到70%时,用新鲜无抗生素无血清的培养基稀释成密度 $1.5 \times 10^5$ 个/mL的细胞悬液;

[0146] 向96孔培养板中加入细胞悬液,每孔加入100 $\mu$ L(每孔细胞数为 $1.5 \times 10^4$ 个),补加新鲜无抗生素无血清的培养基,在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>浓度和饱和湿度下培养12h;

[0147] 用嘌呤霉素浓度分别为0、2 $\mu$ g/mL、4 $\mu$ g/mL、6 $\mu$ g/mL、8 $\mu$ g/mL和10 $\mu$ g/mL的新鲜无抗生素无血清培养基溶液替换各孔中的旧培养基,每个浓度重复3次;

[0148] 检查细胞活力,每隔2d更换含嘌呤霉素的新鲜无抗生素无血清培养基溶液1次,如细胞生长较快,可以缩短换液时间,5d内,杀死全部细胞所需的最小的浓度即为最优的嘌呤霉素浓度。

[0149] c. 嘌呤霉素筛选细胞:

[0150] 病毒感染后24h,更换成含最优浓度的嘌呤霉素的培养基,同时设置不加病毒液的对照组,加入相同的含最优浓度的嘌呤霉素的培养基;

[0151] 每隔1d更换新鲜的含嘌呤霉素的无抗生素无血清培养基,替换含大量死细胞的培养基,直至筛选出抗性细胞;

[0152] 待抗性细胞长满以后,转入10cm培养皿,留一部分细胞在原来的60mm平皿内;

[0153] 60mm平皿内细胞长满后,收获细胞,在蛋白或mRNA水平进行鉴定;10cm培养皿内的细胞待长满后传代,冻存。

[0154] d. 有限稀释法筛选单克隆细胞:

[0155] 制备细胞悬液,调整密度为80000个/mL,取25 $\mu$ L(含2000个细胞)悬液稀释至1mL(密度为2000个/mL),再稀释至10mL(密度为200个/mL);

[0156] 取1mL细胞悬液补加9mL培养基(密度为20个/mL),再取3mL细胞悬液补加7mL培养基(密度为6个/mL),将稀释后的细胞悬液加入96孔细胞培养板中,每孔加0.1mL,平均每孔中含有0.6个细胞。

[0157] e. 磁珠分选:

- [0158] 取 $1 \times 10^7$ 个病毒侵染后的细胞,在 $20^{\circ}\text{C}$ 下,300g离心10min;
- [0159] 弃上清,加入100 $\mu\text{L}$  Buffer,重悬;
- [0160] 加入10 $\mu\text{L}$  PE抗体,混合,在 $4^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育10min;
- [0161] 加入2mL Buffer,混合,在 $20^{\circ}\text{C}$ 下,300g离心10min;
- [0162] 弃上清,加入100 $\mu\text{L}$  Buffer重悬,加入20 $\mu\text{L}$  PE磁珠,混合,在 $4^{\circ}\text{C}$ 下避光孵育15min;
- [0163] 加入2mL Buffer,混合,在 $20^{\circ}\text{C}$ 下,300g离心10min;
- [0164] 弃上清,加入500 $\mu\text{L}$  Buffer,使用滤网过滤细胞;
- [0165] 将分选柱置于分选器上,加入3mL Buffer润洗柱子,液体流空后,将细胞加入柱子中;
- [0166] 液体流空后加入3mL Buffer冲洗柱子,并重复2次,收集阴性细胞;
- [0167] 将柱子从分选器上取出,置于新的15mL离心管中,加入5mL Buffer,快速推动活塞,收集阳性细胞;
- [0168] 计数,对阳性细胞进行培养或流式检测。
- [0169] 综上,本实施例将重组慢病毒导入宿主细胞中,经嘌呤霉素筛选、单克隆筛选和磁珠分选,成功构建了稳定表达CD86、CD19、IL-21-CD8 $\alpha$ 、CD137L和CD64的K562细胞株,即所述的滋养层细胞。
- [0170] 实施例4
- [0171] 本实施例对实施例3构建的滋养层细胞进行功能验证,具体步骤如下:
- [0172] (1) 分离外周血单个核细胞(PBMC)/脐血单个核细胞(CBMC):
- [0173] a. 将抗凝管中的血液用移液管抽出,加入50mL离心管中,2900rpm离心10min;
- [0174] b. 离心所得的上层血浆转移至新的50mL离心管中;
- [0175] c. 所得血浆在 $40^{\circ}\text{C}$ 下水浴30min,1500rpm离心10min去除沉淀,将上层血浆转移至新的50mL离心管中,用生理盐水稀释,生理盐水与血浆的体积比为2:1,混合;
- [0176] d. 将稀释血液小心加到分离液上,稀释血液和分离液的体积比为2:1,1500rpm最低降速离心20min;
- [0177] e. 离心完毕后,吸出单个核细胞层的细胞悬液,加入生理盐水,生理盐水与细胞悬液的体积比为2:1,混合,1700rpm离心10min,弃上清;
- [0178] f. 向离心管中加入5mL生理盐水,吹打细胞,加入生理盐水至40mL,1000rpm离心10min,弃上清;
- [0179] g. 用培养液重悬,调整细胞密度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ ,转移至75 $\text{cm}^2$ 培养瓶中,加入GT-T561培养液(含200U/mL的IL-2)20mL,补加终浓度为5%的自体血清和终浓度为80U/mL的硫酸庆大霉素,再加入2只1mL滋养层细胞(离心去除冻存液),放在 $\text{CO}_2$ 恒温培养箱中培养。
- [0180] (2) 原代培养:
- [0181] a. 培养后第3天,培养瓶中的培养液300g离心8min,弃上清,加入30mL新鲜的GT-561(含200U/mL的IL-2)悬浮沉淀,补加终浓度为5%的自体血浆和终浓度为80U/mL的硫酸庆大霉素,置于培养箱中继续培养;
- [0182] b. 观察细胞,若细胞状态良好,培养液无明显发黄,可不做处理,如果培养液发黄,补加GT-561(含200U/ml的IL-2)培养基,补加终浓度为1%血浆和终浓度为80U/mL的硫酸庆

大霉素,继续培养。

[0183] (3) 传代培养:

[0184] a. 原代细胞培养7d后,转入640cm<sup>2</sup>培养袋中,加入5支1mL滋养层细胞(离心去除冻存液),加入GT-561培养液(含200U/mL的IL-2),补加终浓度为1%血浆和终浓度为80U/mL的硫酸庆大霉素,加入的培养液与原培养液的体积比为1:1;

[0185] b. 细胞转移后,8d观察细胞悬液颜色变化,显微镜下观察细胞生长情况,若细胞悬液明显变黄且细胞克隆较多,加入GT-561培养液(含200U/mL的IL-2),补加终浓度为1%血浆和终浓度为80U/mL的硫酸庆大霉素,加入的培养液与原培养液的体积比为1:1;

[0186] c. 细胞培养15d即可收集细胞,收集前2d从细胞培养袋内取8mL培养液进行细胞计数,并进行细菌内毒素、支原体、革兰氏染色和细胞表面抗体检测。

[0187] 传代培养后,每隔1d对NK细胞进行计数,连续记录20d,构建NK细胞的增殖曲线,如图2所示。

[0188] 由图可知,传代培养4~6d后,细胞增殖速度明显增加,在14~18d时,细胞数量达到最大值,约为初始数量的70倍左右,18d后细胞数量开始缓慢下降。以上结果表明,本发明制备的滋养层细胞可以促进NK细胞在体外的增殖,实现了NK细胞的快速扩增,且成本较低,为相关的研究提供了便利的条件。

[0189] 综上所述,本发明通过构建重组载体,包装得到重组慢病毒,将CD86、CD19、IL-21-CD8 $\alpha$ 、CD137L和CD64整合到K562细胞的基因组中,构建得到的重组细胞的细胞膜表达上述蛋白,可以作为NK细胞的滋养层细胞应用于NK细胞的体外增殖中,细胞增殖迅速,成本较低,操作简单,高效可行,具有广阔的应用前景。

[0190] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细方法,但本发明并不局限于上述详细方法,即不意味着本发明必须依赖上述详细方法才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式的选择等,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 河南省华隆生物技术有限公司

&lt;120&gt; 一种NK滋养层细胞及其应用

&lt;130&gt; 2021

&lt;160&gt; 11

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 323

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;400&gt; 1

```

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

```

210	215	220
Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile		
225	230	235
Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val Ile Ile Cys Val Met Val		
	245	250
Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Lys Lys Lys Lys Arg Pro Arg Asn		
	260	265
Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu Arg Glu Glu Ser Glu Gln		
	275	280
Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala		
	290	300
Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp		
305	310	315
Thr Cys Phe		
<210> 2		
<211> 313		
<212> PRT		
<213> 人工合成		
<400> 2		
Met Pro Pro Pro Arg Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Leu Thr Pro Met		
1	5	10
Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp		
	20	25
Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln		
	35	40
Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu		
	50	55
Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile		
65	70	75
Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu		
	85	90
Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr		
	100	105
Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp		
	115	120
Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro		
	130	135
Ser Ser Pro Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala		
145	150	155
		160



Lys Asp Arg Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro  
 165 170 175  
 Arg Asp Ser Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro  
 180 185 190  
 Gly Ser Thr Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser  
 195 200 205  
 Arg Gly Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser  
 210 215 220  
 Leu Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp  
 225 230 235 240  
 Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala  
 245 250 255  
 Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu  
 260 265 270  
 Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly  
 275 280 285  
 Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu  
 290 295 300  
 Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu  
 305 310  
 <210> 3  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 3  
 Met Arg Ser Ser Pro Gly Asn Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met  
 1 5 10 15  
 Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln  
 20 25 30  
 Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln  
 35 40 45  
 Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro  
 50 55 60  
 Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile  
 85 90 95  
 Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala  
 100 105 110

Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr  
 115 120 125  
 Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu  
 145 150 155 160  
 Asp Ser Gly Ser Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val  
 165 170 175  
 Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys  
 180 185  
 <210> 4  
 <211> 254  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 4  
 Met Glu Tyr Ala Ser Asp Ala Ser Leu Asp Pro Glu Ala Pro Trp Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Pro Arg Ala Arg Ala Cys Arg Val Leu Pro Trp Ala Leu Val  
 20 25 30  
 Ala Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Cys Ala Val Phe  
 35 40 45  
 Leu Ala Cys Pro Trp Ala Val Ser Gly Ala Arg Ala Ser Pro Gly Ser  
 50 55 60  
 Ala Ala Ser Pro Arg Leu Arg Glu Gly Pro Glu Leu Ser Pro Asp Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Ala Gly Leu Leu Asp Leu Arg Gln Gly Met Phe Ala Gln Leu Val  
 85 90 95  
 Ala Gln Asn Val Leu Leu Ile Asp Gly Pro Leu Ser Trp Tyr Ser Asp  
 100 105 110  
 Pro Gly Leu Ala Gly Val Ser Leu Thr Gly Gly Leu Ser Tyr Lys Glu  
 115 120 125  
 Asp Thr Lys Glu Leu Val Val Ala Lys Ala Gly Val Tyr Tyr Val Phe  
 130 135 140  
 Phe Gln Leu Glu Leu Arg Arg Val Val Ala Gly Glu Gly Ser Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Val Ser Leu Ala Leu His Leu Gln Pro Leu Arg Ser Ala Ala Gly Ala  
 165 170 175  
 Ala Ala Leu Ala Leu Thr Val Asp Leu Pro Pro Ala Ser Ser Glu Ala  
 180 185 190

Arg Asn Ser Ala Phe Gly Phe Gln Gly Arg Leu Leu His Leu Ser Ala  
 195 200 205  
 Gly Gln Arg Leu Gly Val His Leu His Thr Glu Ala Arg Ala Arg His  
 210 215 220  
 Ala Trp Gln Leu Thr Gln Gly Ala Thr Val Leu Gly Leu Phe Arg Val  
 225 230 235 240  
 Thr Pro Glu Ile Pro Ala Gly Leu Pro Ser Pro Arg Ser Glu  
 245 250  
 <210> 5  
 <211> 374  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 5  
 Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser  
 20 25 30  
 Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu  
 35 40 45  
 Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln  
 50 55 60  
 Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile  
 85 90 95  
 Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg  
 100 105 110  
 Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys  
 115 120 125  
 Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe  
 130 135 140  
 Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile  
 145 150 155 160  
 Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr  
 165 170 175  
 Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro  
 180 185 190  
 Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val  
 195 200 205

Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln  
 210 215 220  
 Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn  
 225 230 235 240  
 Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly  
 245 250 255  
 Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg  
 260 265 270  
 Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro  
 275 280 285  
 Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu  
 290 295 300  
 Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys  
 305 310 315 320  
 Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys  
 325 330 335  
 Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 340 345 350  
 Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys  
 355 360 365  
 Glu Pro Gln Gly Ala Thr  
 370

<210> 6

<211> 972

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 6

atgggactga gtaacattct ctttgtgatg gccttctctgc tctctggtgc tgctcctctg 60  
 aagattcaag cttatttcaa tgagactgca gacctgceat gccaatttgc aaactctcaa 120  
 aaccaaagcc tgagtgagct agtagtattt tggcaggacc aggaaaactt ggttctgaat 180  
 gaggtatact taggcaaaga gaaatttgac agtgttcatt ccaagtatat gggccgcaca 240  
 agttttgatt cggacagttg gacctgaga cttcacaate ttcagatcaa ggacaagggc 300  
 ttgtatcaat gtatcatcca tcacaaaaag cccacaggaa tgattcgcac ccaccagatg 360  
 aattctgaac tgtcagtget tgetaacttc agtcaacctg aatagtagc aatttctaat 420  
 ataacagaaa atgtgtacat aaatttgacc tgctcatcta tacacggtta cccagaacct 480  
 aagaagatga gtgttttget aagaaccaag aattcaacta tcgagtatga tggattatg 540  
 cagaaatctc aagataatgt cacagaactg tacgacgttt ccatcagctt gtctgtttca 600  
 ttccctgatg ttacagacaa tatgaccatc ttctgtatc tggaaactga caagacgcgg 660  
 cttttatctt cacctttctc tatagagctt gaggaccctc agcctcccc agaccacatt 720

ccttggatta cagctgtact tccaacagtt attatatgtg tgatggtttt ctgtctaatt 780  
 ctatggaaat ggaagaagaa gaagcggcct cgcaactctt ataaatgtgg aaccaacaca 840  
 atggagaggg aagagagtga acagaccaag aaaagagaaa aatccatat acctgaaaga 900  
 tctgatgaag cccagcgtgt ttttaaaagt tcgaagacat cttcatgcga caaaagtgat 960  
 acatgttttt aa 972

<210> 7

<211> 939

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 7

atgccacctc ctgcctcct cttcttctc ctcttctca ccccatgga agtcaggccc 60  
 gaggaacctc tagtggtgaa ggtggaagag ggagataacg ctgtgctgca gtgcctcaag 120  
 gggacctcag atggccccac tcagcagctg acctggtctc gggagtcccc gcttaaacc 180  
 ttcttaaaac tcagcctggg gctgccaggc ctgggaatcc acatgaggcc cctggccatc 240  
 tggcttttca tcttcaacgt ctctcaacag atggggggct tctacctgtg ccagccgggg 300  
 cccccctctg agaaggcctg gcagcctggc tggacagtca atgtggaggg cagcggggag 360  
 ctgttccggt ggaatgttcc ggacctaggt ggctgggct gtggcctgaa gaacaggtcc 420  
 tcagagggcc ccagctcccc ttccgggaag ctcatgagcc ccaagctgta tgtgtgggcc 480  
 aaagaccgcc ctgagatctg ggaggagag cctccgtgtc tcccaccgag ggacagcctg 540  
 aaccagagcc tcagccagga cctcaccatg gcccttggt ccacactctg gctgtcctgt 600  
 ggggtacccc ctgactctgt gtccagggc ccctctcct ggacctatgt gacccccaa 660  
 gggcctaagt cattgctgag cctagagctg aaggacgat gcccgccag agatatgtgg 720  
 gtaatggaga cgggtctgtt gttgccccgg gccacagctc aagacgtgg aaagtattat 780  
 tgtcaccgtg gcaacctgac catgtcattc cacctggaga tcaactgctg gccagtacta 840  
 tggcactggc tgctgaggac tggtggtgg aaggtctcag ctgtgacttt ggcttatctg 900  
 atcttctgcc tgtgttcct tgtgggcatt cttcatctt 939

<210> 8

<211> 564

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 8

atgagatcca gtccctggcaa catggagagg attgtcatct gtctgatggc catcttcttg 60  
 gggacactgg tccacaaatc aagctcccaa ggtcaagatc gccacatgat tagaatgcgt 120  
 caacttatag atattgttga tcagctgaaa aattatgtga atgacttggc cctgaattt 180  
 ctgccagctc cagaagatgt agagacaaac tgtgagtggc cagctttttc ctgttttcag 240  
 aaggcccaac taaagtcagc aaatacagga aacaatgaaa ggataatcaa tgtatcaatt 300  
 aaaaagctga agaggaaacc accttcaca aatgcaggga gaagacagaa acacagacta 360  
 acatgccctt catgtgattc ttatgagaaa aaaccacca aagaattcct agaaagattc 420  
 aaatcacttc tccaaaagat gattcatcag catctgtcct ctagaacaca cggaagtgaa 480

gattccggat cctacatctg ggcgcccttg gccgggactt gtggggtcct tctcctgtca 540  
ctggttatca ccctttactg ctaa 564

<210> 9

<211> 765

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 9

atggaatacg cctctgacgc ttcactggac cccgaagccc cgtggcctcc cgcgccccgc 60  
gctcgcgcct gccgcgtact gccttgggcc ctggtcgcgg ggctgctgct gctgctgctg 120  
ctcgtgccc cctgcgccgt ctctctgcc tgcccctggg ccgtgtccgg ggctcgcgcc 180  
tcgcccggct ccgcggccag cccgagactc cgcgagggtc ccgagctttc gcccgacgat 240  
cccgccggcc tcttggacct gcggcagggc atgtttgcgc agctggtggc ccaaaatggt 300  
ctgctgatcg atgggcccct gagctggtac agtgaccag gcctggcagg cgtgtccctg 360  
acggggggcc tgagctacaa agaggacacg aaggagctgg tggtaggcaa ggctggagtc 420  
tactatgtct tctttcaact agagctgcgg cgcgtggtgg ccggcgaggg ctccagctcc 480  
gtttcacttg cgctgcacct gcagccactg cgctctgctg ctggggccgc cgccctggct 540  
ttgaccgtgg acctgccacc cgctctctcc gaggtcggga actcggcctt cggtttccag 600  
ggccgcttgc tgcacctgag tgccggccag cgctggggc tccatcttca cactgaggcc 660  
agggcacgcc atgcctggca gcttaccag ggcgccacag tcttgggact cttccgggtg 720  
acccccgaaa tcccagccgg actcccttca ccgaggtcgg aataa 765

<210> 10

<211> 1125

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 10

atgtggttct tgacaactct gtccttttg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca 60  
aaggcagtga tcaactttgca gcctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aaccgtaacc 120  
ttgcattgtg aggtgctcca tctgcctggg agcagctcta cacagtgggt tctcaatggc 180  
acagccactc agacctcgac ccccagctac agaateacct ctgccagtgt caatgacagt 240  
ggtgaataca ggtgccagag aggtctctca gggcgaagtg acccataca gctggaaatc 300  
cacagaggct ggctactact gcaggtctcc agcagagtct tcacggaagg agaacctctg 360  
gccttgaggt gtcctgcgtg gaaggataag ctggtgtaca atgtgcttta ctatcgaat 420  
ggcaaagcct ttaagttttt ccaactggaat tetaacctca ccattctgaa aaccaacata 480  
agtcacaatg gcacctacca ttgctcaggc atgggaaagc atcgtacac atcagcagga 540  
atatctgtca ctgtgaaaga gctatttcca gctccagtgc tgaatgcac tgtgacatcc 600  
ccactcctgg aggggaatct ggtcacctg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg 660  
cctggtttgc agctttactt ctctttctac atgggcagca agacctgcg aggcaggaac 720  
acatcctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctgggtt atactggtgc 780  
gaggctgcca cagaggatgg aaatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg 840

cttggcctcc agttaccaac tcctgtctgg tttcatgtcc ttttctatct ggcagtggga 900  
ataatgtttt tagtgaacac tgttctctgg gtgacaatac gtaaagaact gaaaagaaag 960  
aaaaagtggg atttagaaat ctctttggat tctggtcacg agaagaaggt aatttccagc 1020  
cttcaagaag acagacattt agaagaagag ctgaaatgac aggaacaaaa agaagaacag 1080  
ctgcaggaag gggcgcaccg gaaggagccc cagggggcca cgtag 1125

<210> 11

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 11

ggaagcggag ctaccaactt ctccctgctg aagcaggccg gcgacgtgga ggagaacccc 60  
ggcccc 66

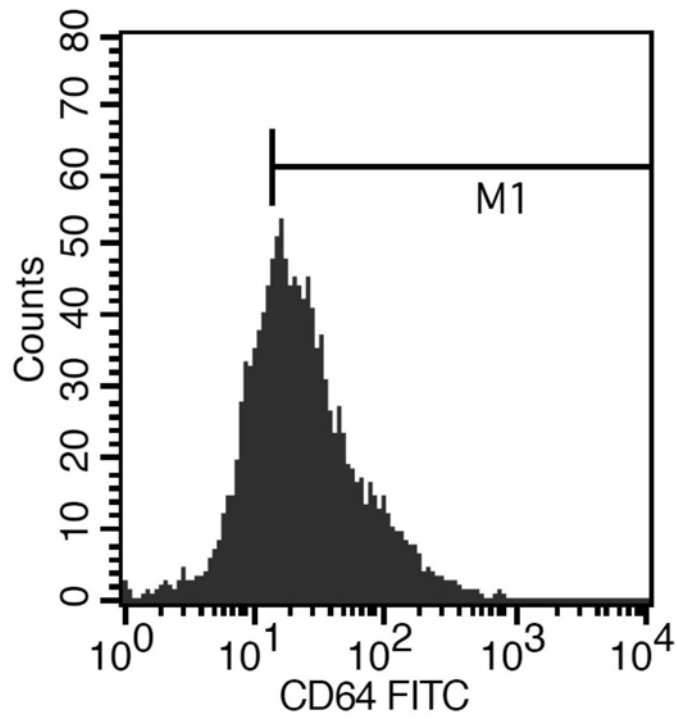


图1A

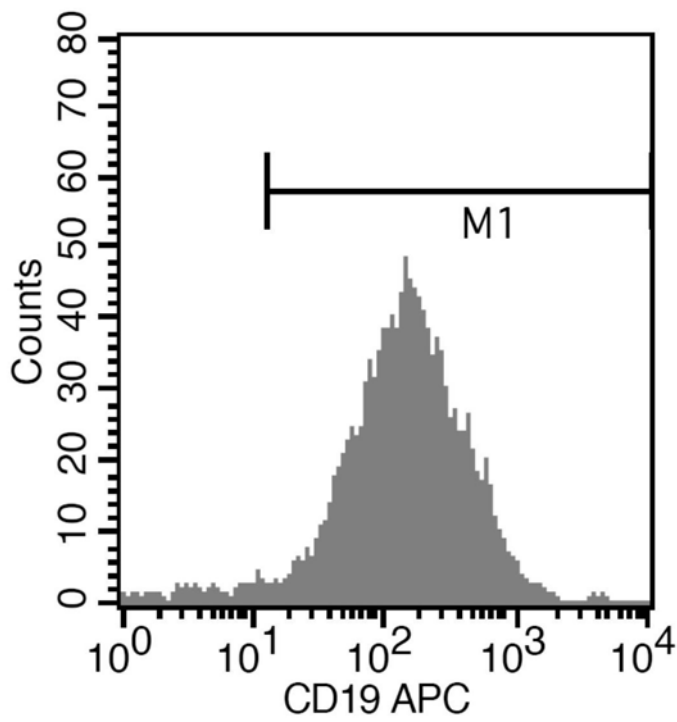


图1B



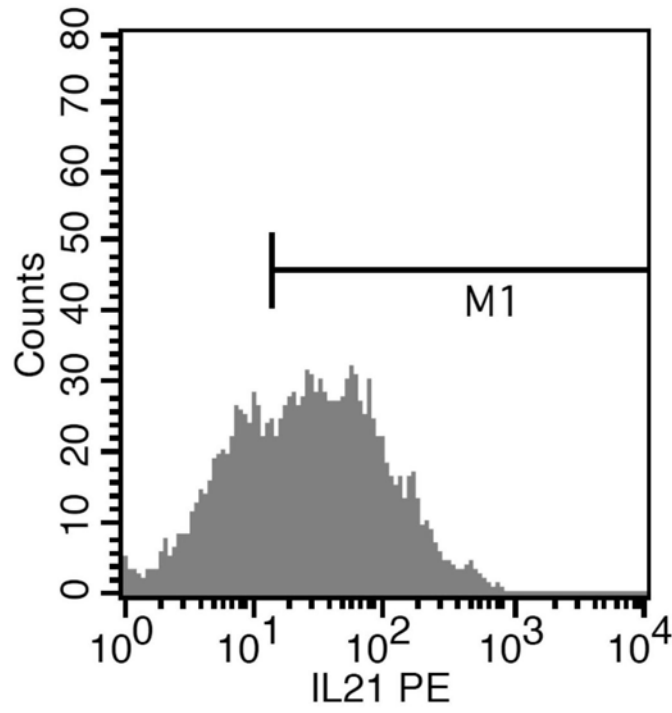


图1C

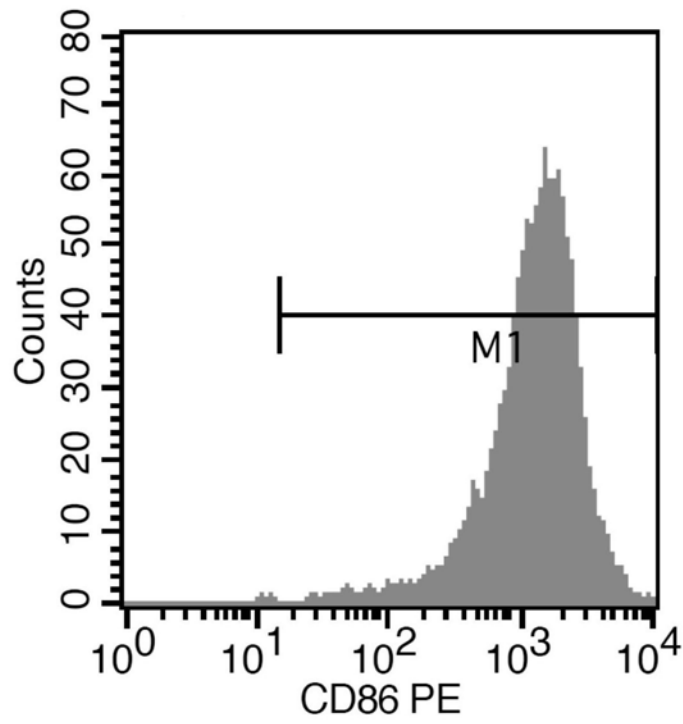


图1D

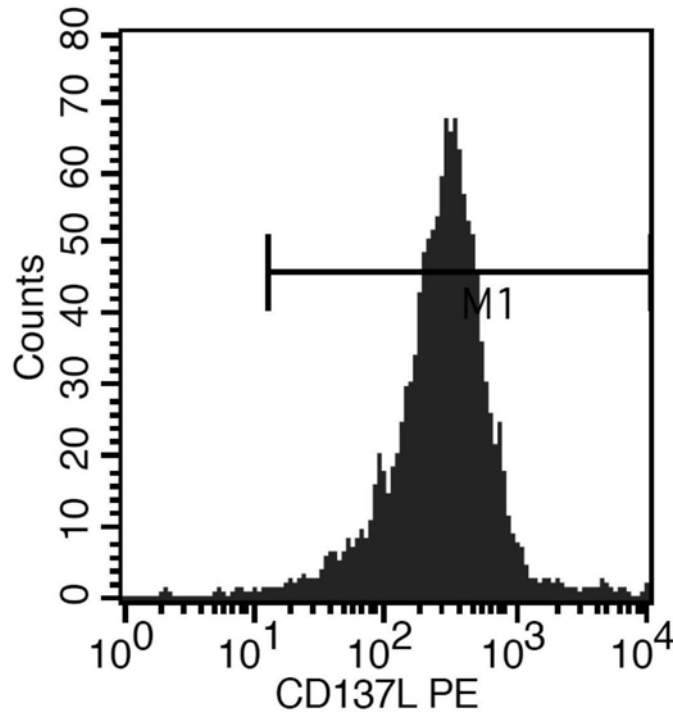


图1E

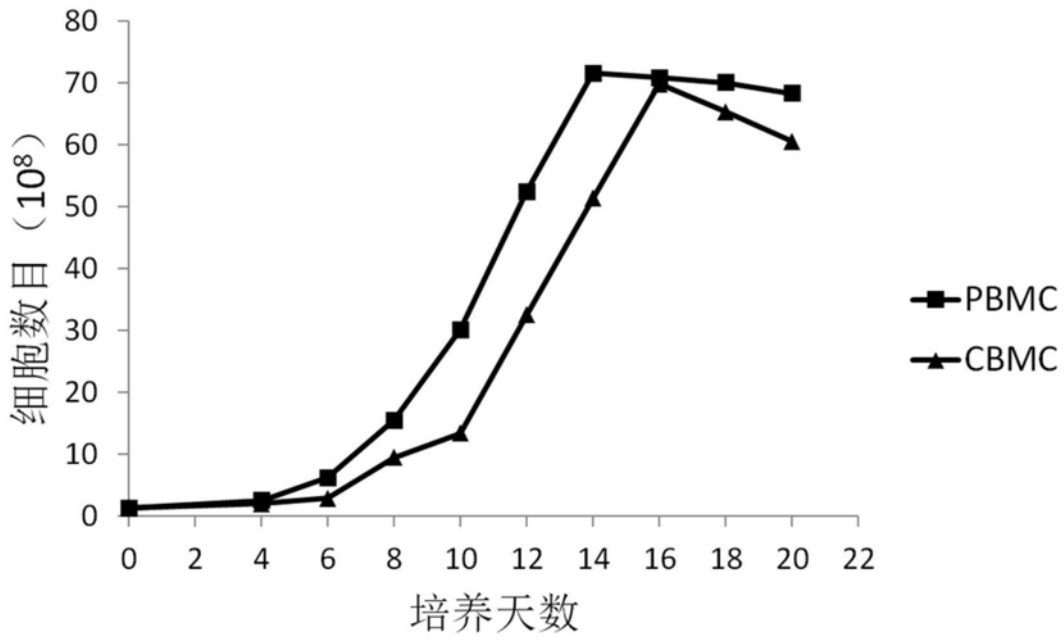


图2