



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105085675 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201410203598. 4

(22) 申请日 2014. 05. 14

(71) 申请人 深圳市第二人民医院

地址 518035 广东省深圳市福田区笋岗西路  
3002 号

(72) 发明人 黄卫人 余州 吴汉伟 桂耀庭  
蔡志明

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有  
限公司 44281

代理人 向武桥 彭家恩

(51) Int. Cl.

C07K 16/18(2006. 01)

C07K 16/06(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

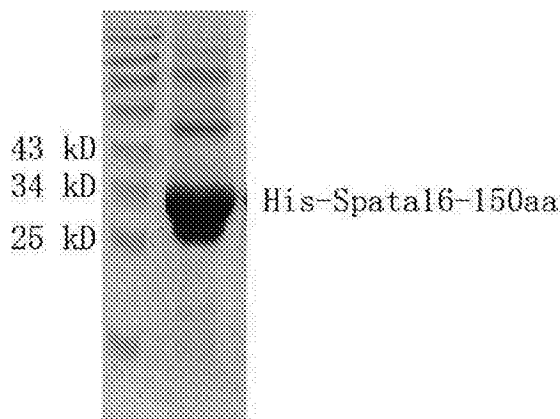
序列表12页 附图1页

(54) 发明名称

鼠 SPATA16 基因多克隆抗体及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种鼠 SPATA16 基因多克隆抗体及其制备方法,包括步骤:a)用 PCR 方法扩增序列如 SEQ ID NO:1 所示的 SPATA16 基因和序列如 SEQ ID NO:2 所示的 pET32a 表达质粒;b)将 SPATA16 基因连接到 pET32a 表达载体中构建重组质粒;c)将所述重组质粒转入 BL21 感受态细菌,经过培养、诱导、裂解和纯化,得到特异性目的蛋白;d)免疫兔子后,采血,纯化抗体血清,得到多克隆抗体。通过制备基因 SPATA16 的多克隆抗体,该抗体能够特异性识别目的蛋白,从而便于研究目的蛋白的表达和定位等。



1. 一种鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
  - a) 用 PCR 方法扩增序列如 SEQ ID NO:1 所示的 SPATA16 基因和序列如 SEQ ID NO:2 所示的 pET32a 表达质粒;
  - b) 将 SPATA16 基因连接到 pET32a 表达载体中构建重组质粒;
  - c) 将所述重组质粒转化到 BL21 感受态细菌中,经过培养、诱导、裂解和纯化,得到特异性目的蛋白;
  - d) 免疫兔子后,采血,纯化抗体血清,得到多克隆抗体。
2. 如权利要求 1 所述的鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤 a) 中,PCR 扩增时,SPATA16 基因上游引物如 SEQ ID NO:3 所示,SPATA16 基因下游引物如 SEQ ID NO:4 所示;pET32a 质粒上游引物如 SEQ ID NO:5 所示,pET32a 质粒下游引物如 SEQ ID NO:6 所示。
3. 如权利要求 1 所述的鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤 c) 中,培养时,将含有所述重组质粒的菌液加入到高压灭菌的无抗生素 LB 培养基中,并加入氨苄抗生素。
4. 如权利要求 1 所述的鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤 c) 中,通过 IPTG 诱导。
5. 如权利要求 1 所述的鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤 c) 中,利用裂解液进行裂解,所述裂解液包括 Tris HCl、NaCl 和 EDTA。
6. 如权利要求 1 所述的鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述步骤 c) 中,所述纯化包括包涵体蛋白处理和梯度透析。
7. 一种鼠 SPATA16 基因多克隆抗体,其特征在于,所述抗体识别的蛋白序列如 SEQ ID NO:7 所示。

## 鼠 SPATA16 基因多克隆抗体及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本申请涉及一种鼠 SPATA16 基因多克隆抗体及其制备方法。

### 背景技术

[0002] SPATA16 基因是一个新基因,研究表明,其在小鼠精子发生过程中具有一定的功能作用,因此,有必要对其进行更进一步的研究。

### 发明内容

[0003] 本发明提供一种新的鼠 SPATA16 基因多克隆抗体及其制备方法。

[0004] 本发明提供一种鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:

[0005] a) 用 PCR 方法扩增序列如 SEQ ID NO:1 所示的 SPATA16 基因和序列如 SEQ ID NO:2 所示的 pET32a 表达质粒;

[0006] b) 将 SPATA16 基因连接到 pET32a 表达载体中构建重组质粒;

[0007] c) 将所述重组质粒转入 BL21 感受态细菌,经过培养、诱导、裂解和纯化,得到特异性目的蛋白;

[0008] d) 免疫兔子后,采血,纯化抗体血清,得到多克隆抗体。

[0009] 所述步骤 a) 中,PCR 扩增时,SPATA16 基因上游引物如 SEQ ID NO:3 所示,SPATA16 基因下游引物如 SEQ ID NO:4 所示;pET32a 质粒上游引物如 SEQ ID NO:5 所示,pET32a 质粒下游引物如 SEQ ID NO:6 所示。

[0010] 所述步骤 c) 中,培养时,将含有所述重组质粒的菌液加入到高压灭菌的无抗生素 LB 培养基中,并加入氨苄抗生素。

[0011] 所述步骤 c) 中,通过 IPTG 诱导。

[0012] 所述步骤 c) 中,利用裂解液进行裂解,所述裂解液包括 Tris HCl、NaCl 和 EDTA。

[0013] 所述步骤 c) 中,所述纯化包括包涵体蛋白处理和梯度透析。

[0014] 一种鼠 SPATA16 基因多克隆抗体,所述抗体识别的蛋白序列如 SEQ ID NO:7 所示。

[0015] 本发明的有益效果是:通过制备基因 SPATA16 的多克隆抗体,该抗体能够特异性识别目的蛋白,从而便于研究目的蛋白的表达和定位等。

### 附图说明

[0016] 图 1 是 SPATA16 克隆鉴定图,其中,SPATA16 截取片段大小为 450bp;片段大小与 spata16 大小一致;

[0017] 图 2 是 Novagen IDA-Ni 树脂纯化 His-Spata16-150aa 蛋白纯化后的电泳图;

[0018] 图 3 是 SPATA16 在不同小鼠睾丸细胞系中的表达特征图,其中,1 表示小鼠睾丸总蛋白;2 表示 TM4 细胞系(小鼠睾丸支持细胞);3 表示 CRL-2053 细胞系(小鼠精原细胞);4 表示 CRL-2196 细胞系(小鼠精母细胞);

[0019] 图 4 是 SPATA16 在 293T 的亚细胞定位图;在 293T 细胞中,SPATA16 主要定位在细

胞核中；

[0020] 图 5 是 SPATA16 在小鼠睾丸组织中的亚细胞定位分析图；在小鼠组织中，胞核中表达信号强度远大于胞浆，表明 SPATA16 定位于小鼠睾丸组织细胞核；

[0021] 图 6 是 SPATA16-150aa 抗体检测 mSPATA16 亚细胞定位图，其中，mSPATA16 主要表达于 HEK293 细胞的细胞核。

### 具体实施方式

[0022] 下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0023] 在一种实施方式中，鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法包括如下步骤：

[0024] a) 用 PCR 方法扩增序列如 SEQ ID NO:1 所示的 SPATA16 基因和序列如 SEQ ID NO:2 所示的 pET32a 表达质粒；其中，SPATA16 基因序列是现有序列，其登录信息是：NM\_027583，该基因的蛋白序列如 SEQ ID NO:8 所示，其登录号是：NP\_081859。

[0025] b) 将 SPATA16 基因连接到 pET32a 表达载体中构建重组质粒；连接时，可以采用 T4 连接酶。

[0026] c) 将所述重组质粒转入 BL21 感受态细菌，经过培养、诱导、裂解和纯化，得到特异性目的蛋白。

[0027] d) 免疫兔子后，采血，纯化抗体血清，得到多克隆抗体。

[0028] 如图 1 至图 6 所示，在另一种实施方式中，鼠 SPATA16 基因多克隆抗体的制备方法包括如下步骤：

[0029] 1、通过不依赖连接酶的克隆方法 (LIC) 重组质粒

[0030] a) 设计质粒 pET32a 以及基因 SPATA16mRNA 的引物，引物如表 1 所示：

[0031] 表 1 质粒 pET32a 和基因 SPATA16 的合成引物

[0032]

SPATA16 基因上游引物	GACGACGACAAGATGGA TTCTGGCAAGAGTAGGA
SPATA16 基因下游引物	GAGGAGAAGCCCGGTTACTGAAGCCCAAGGCACAT
pET32a 质粒上游引物	CCGGGCTTCTCCTCAATTGCGGCCGCACTCGAGCAC
pET32a 质粒下游引物	TCTTGTCGTCGTCAACGCGTGGACAGACCAGAAG

[0033] b) 通过 PCR 的方法扩增目的片段 SPATA16 和表达质粒 pET32a (采用 TAKARA 公司的 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase)，GXL 高保真 PCR 反应体系如表 2 所示：

[0034] 表 2 :PCR 反应体系

[0035]

试剂	使用量
5×PrimeSTAR GXL 缓冲液	10 μ l
dNTP Mixture(2.5mM each)	4 μ l

Primer F(SPATA16 和 pET32a 上游引物)	10 ~ 5pmol
Primer R(SPATA16 和 pET32a 下游引物)	10 ~ 15pmol
Template(模板 DNA)	100ng
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1 $\mu$ l
灭菌蒸馏水	Up to 50 $\mu$ l

[0036] PCR反应条件是:1. 98°C 5min;2. 98°C 10sec;3. 60°C 15sec;4. 68°C 17min;5. 2~4 循环 30 次;6. 60°C 10min;7. 12°C 0/N(overnight, 过夜)

[0037] PCR反应体系中, dNTP Mixture 为 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 的混合溶液, 每种浓度均为 2.5mM

[0038] c) 通过胶纯化试剂盒纯化所得 SPATA16 片段和 pET32a 表达载体。

[0039] d) T4DNA 连接酶 (TAKARA T4DNA Polymerase2040A) 处理 pET32a 表达载体和 SPATA16 片段。

[0040] d1) 每 20ul 反应液加入 0.037pmol 的 pET32a 表达载体;

[0041] d2) 每 20ul 反应液加入 0.12-0.48pmol 的胶回收纯化产物;

[0042] d3) 用 T4 连接酶处理 pET32a 表达载体与 SPATA16 片段, 其反应体系如表 3 所示;

[0043] 表 3 T4 连接酶处理时的反应体系

[0044]

a: Vector Mix	1X
T4 Buffer (缓冲液)	2 $\mu$ l
DTT (100mM)	1 $\mu$ l
T4 Polymerase (T4 连接酶)	0.4 $\mu$ l
dGTP	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	fill to make 20ul
b: Insert Mix	1X
T4 Buffer	2 $\mu$ l
DTT (100mM)	1 $\mu$ l
T4 Polymerase	0.4 $\mu$ l
dCTP	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	fill to make 20 $\mu$ l

[0045] d4) 在 22°C 条件下孵育 30min;

[0046] d5) 75°C 孵育 20min 以灭活 T4 连接酶。

[0047] e) 表达载体与目的片段连接

[0048] e1) 将样品 (表达载体和目的片段的混合液) 离心处理;

[0049] e2) 根据表达载体与目的片段的所得的浓度将两者以 1:1 的拷贝数混合于一管;

[0050] e3) 22°C 孵育 5min;

[0051] e4) 加 2.5  $\mu$  l EDTA (25mM) 并混匀;

[0052] e5) 22°C 孵育 5min;

[0053] e6) 将所构建的重组质粒转入 BL21 感受态细菌。

[0054] 2、表达融合蛋白 pET32a-SPATA16

[0055] a) 挑选转化后的单克隆于 5ML LB 培养基中, 37°C, 280rpm 培养箱摇菌 16h。

[0056] b) 用 500ML 锥形瓶装入 100ml 的无抗生素 LB 培养基, 高压灭菌。

[0057] c) 将含有重组质粒的 1ml 菌液加入到高压灭菌的无抗生素 LB 培养基中, 加入 100ul 浓度 100ug/ml 的氨苄抗生素。

- [0058] d) 37℃, 280rpm 摇菌两小时 45 分钟后, 检测其  $OD_{595} \approx 0.6$ 。
- [0059] e) 冰上冷却 15 分钟。
- [0060] f) 加入 IPTG (原浓度 24mg/ml, 终浓度 1/100)。
- [0061] g) 37℃, 280rpm 摇菌三小时。
- [0062] h) 12000rpm, 4℃, 离心 30min。收集沉菌, 称净重。
- [0063] i) 每 1g 加入 2 ~ 5ml buffer W (100Mm Tris HCl pH8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA), 吹打混匀, 于功率 17% ~ 20% 超声破碎, 至悬液澄清为宜。
- [0064] j) 12000rpm, 4℃, 离心 10min。收集上清液以及沉淀。
- [0065] 3、包涵体蛋白处理:
- [0066] a) 配置 8M 的尿素 (融于 1XPBS) 冰上预冷。
- [0067] b) 将超声破碎后的沉菌融于 8M 尿素中, 吹打混匀, 4℃ 垂直旋转 8h ~ 0/N。
- [0068] c) 4℃, 12000rcf 离心 15min, 收集上清, 上清即为可溶蛋白。
- [0069] d) 用两倍体积的 8M 尿素加 10mM 咪唑溶解可溶蛋白, 加入预先准备的带特定标签的 beadz。
- [0070] e) 4℃ 摇晃 1 ~ 2h。
- [0071] f) 10000rcf 离心 10min。
- [0072] g) 用预装柱收集 beadz。
- [0073] h) 用 8M 尿素配制 300mM 咪唑, 将吸附在 beadz 的目的蛋白洗脱下来。
- [0074] 4、梯度透析:
- [0075] a) 用 1X PBS 分别配制 7M、6M、5M、4M、2M、0M 尿素, 预冷。
- [0076] b) 组装半透膜透析袋, 将目的蛋白密封在透析袋中, 分别从高浓度的尿素到底浓度的尿素进行透析, 每一个浓度透析 4 ~ 6h。
- [0077] c) 回收蛋白溶液, 用超滤管进行超滤浓缩。
- [0078] d) 最后将浓缩蛋白 -80℃ 保持, 以备后续实验使用。
- [0079] 上述梯度透析和包涵体蛋白处理都用于纯化蛋白。
- [0080] 5、获取特异性目的蛋白, 皮下注射入兔子体内。
- [0081] a) 配制 1.5mm SDS-PAGE 蛋白胶若干块。
- [0082] b) 将蛋白溶液进行 SDS-PAGE 跑胶分析。
- [0083] c) 配制 2M KCl 1500ml, 冰上孵育。
- [0084] d) 将蛋白胶完全浸泡入预先准备好的冰镇 KCl 溶液, 摇床摇晃 5min 后, 既能看到在目的条带大小附近有特异的白色条带出现。确定为目的条带后将其切割, 收集于 4ml 的离心管中。
- [0085] e) 用 400 ~ 500ul 1X PBS 溶解, 搅拌器或匀浆器将切割下来的蛋白胶研磨成浆。
- [0086] f) 收集浆液。
- [0087] g) 用三通管注射器将浆液与佐剂以 1:1 的比例混匀。以见乳白色混匀液为宜。
- [0088] h) 充分混匀后, 收集混合液, 注射入兔子体内。每次 2ml, 每周一次, 持续 1.5 个月。兔子是新西兰大白兔。
- [0089] i) 两个月后, 抽取兔子耳静脉血。室温过夜。提取血清即为该目的蛋白的多克隆抗体。

[0090] j) 用 western blot 进行抗体鉴定。

[0091] 以上内容是结合具体的实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 深圳市第二人民医院

&lt;120&gt; 鼠 SPATA16 基因多克隆抗体及其制备方法

&lt;130&gt; 14I20330

&lt;160&gt; 8

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1811

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; SPATA16 基因序列

&lt;400&gt; 1

```

aagagctctc tgaagctcca cagcaggttg gcctgggatt gggaccgttg gcacgacaga      60
tgcctgtaggt ggtagtcact cggctcctct gaccctaaac cacacaggag tctacgggtg     120
gaccaatgga ttctggcaag agtaggagtt tggagactac agtgaagaga gtctatcgag     180
atctgcttct tccaaagata aatacaagca agaaaatgtc caccttgaca aattccccca     240
gcagcctgga agggacacct ggaattaaga agaacagtgg agaatgcaa gctgaagcct     300
cagctgagag agtaaaactc acaaagagca tcaaagaaaa acaaataac gagttagaga     360
aggtggccct taaacggaag gctgacagcg aagagaagct ggtgggaaag aaagaggcca     420
agataatgga actagacaat cagctagtca ccaccgtacc tctgccccac atccccttaa     480
agaacataat ggatgtggaa atgaagctgg tctatgtiga tgaagaggat gtgagctatg     540
agtttgccca gcctaacaig tgccttgggc ttcaggcaac aggccagact gccaccacga     600
tgccacctgc aagtcccceg gatctacca ccctgccaca gatfgacaaa tggcttcagg     660
tagccttaaa ggatgccagc tcttgcata gacagaagaa atatgcegtg gcagcaggac     720
agttcaggac agcacttgag ctttgcagca aaggagcagc tctgggaaa cccttgaag     780

```

[0002]



cacacgctga agacatagca agcatcgcaa gtttcattga gacaaagctc gtcacatget	840
acctacgtat gcggaagcct gacettgccc tgaaccatgc gcacaggagt attgttttaa	900
accagccia tttccgaaac catcttcgte aggcagccgt gtttagatgt ctggagagat	960
actcagaagc tgcccggagt gccatgattg cggactacat gttctggetc tgtggaggga	1020
gcgagcactc tgtaagcaag ctcatcaaac tgtattggca ggccatgatt gaagaagcca	1080
tcaccagggc cgaagcttc tcggttatgt acacgccctt tgcaacaaga atcaagcctg	1140
agaacataga aaaggtgaaa gaggtgttca tgagaactca ccccacctac gtggactgta	1200
tctacacaga taccgaagga ctctatgtac tgcgcagac agccgaetgg tcgtgtttc	1260
ctccccagca atatctgctg acacttgggt tcaaaaacaa agaagacggg aaattcttgg	1320
aaaaagtgtc cagtaggaag ctccccacct acacagaaca taaaactccc ttctctccac	1380
tgaccagaga agatacagtg agacacatgg agacagtggg gaagagaatc ctgcccattc	1440
tggactttat cggagcaca caactgaatg ggaatttcca tgcctgctca ggtgtgatgg	1500
agaagltgca ctatgccagc ctctcagcc ggctgcagag agtgaaggaa caggcccagg	1560
tgatcaatca agcaatggca gagctggcaa cagtccctta tctccaggac atcagteaac	1620
aggaggcaga attgctgcag tcgctaattg cagacgccat ggacaccctt gaaggaaaga	1680
agagtataaa ggagcgtgtg tggaatacaa tceaaaaggt aaaattctga gctgaaggaa	1740
aatacatctt atcctccgag aaaatgtcta ccttgggtca aatctgteta gaagataaaa	1800
aagaaaatgaa a	1811
<210> 2	
<211> 5900	
<212> DNA	
<213> pET32a 质粒序列	
<400> 2	
atccggatat agttctctct ttcagcaaaa aacccctcaa gacccttita gaggcccaaa	60

[0003]

ggggttatgc tagttattgc tcagcgggtg cagcagccaa ctcagcttcc tttcgggcct 120  
 tgttagcagc cggatctcag tgggtggtgt ggtggtgctc gagtgcggcc gcaagcttgt 180  
 cgaecggagct cgaattcgga tccgatata gccatggcct tctcgtcgtc gtcggtaacc 240  
 agatctgggc tgtccatgtg ctggcgcttc aatttagcag cagcggcttc tttcatacca 300  
 gaaccgcgtg gcaccagacc agaagaatga tgatgatgat ggtgcatatg gccagaacca 360  
 gaaccggcca ggttagcgtc gaggaactct tcaactgac ctttagacag tgcacccact 420  
 ttggttgccg ccacttcacc gtttttgaac agcagcagag tcgggatacc accgatgcca 480  
 tatttcggcg cagtgccagg gttttgatcg atgttcagtt ttgcaacggc cagtttgccc 540  
 tgatattcgt cagcgatttc atccagaatc ggggcgatca ttttgcacgg accgcaccac 600  
 tctgccaga aatcgacgag gatcgccccg tccgcttga gtacatecgt gtcaaaactg 660  
 tegtcaatca ggtgaataat ttatcgtc atatgtatat ctcttctta aagttaaaca 720  
 aaattatttc tagaggggaa ttgttatecg ctcaaatc ccetatagtg agtcgtatta 780  
 atttcgcggg atcgagatcg atctcgatcc tctacgccg acgcatcgt gccggcatca 840  
 ccggcgcacc aggtgcggtt gctggecct atatgcgca catcaccgat ggggaagate 900  
 gggctccea cttcgggctc atgagcgtt gtttcggctt ggttatgtg gcaggccccg 960  
 tggccggggg actgttgggc gccatctct tgcattgacc attccttgc gcgcggtgc 1020  
 tcaacggcct caacctacta ctgggtctgt tctaatgca ggagtcgat aaggagagc 1080  
 gtcgagatcc cggacaccat cgaatggcgc aaaaccttc ggggatggc atgalagcc 1140  
 ccggaagaga gtcaattcag gttggtgaat gtgaaaccag taacgttata cgatgtcga 1200  
 gagtatgccg gtgtctetta tcagaccgtt tcccgcgtg tgaaccagc cagccacgtt 1260  
 tctgcgaaaa cgcgggaaaa agtggagcg gcgatggcgg agctgaatta cattccaac 1320  
 ccgctggcac aacaactggc gggcaaacag tcttgcctga ttggcgttgc cacctccagt 1380

[0004]

ctggccctgc acgcgccgtc gcaaatgtc gcgcgatta aatctcgcgc cgateaactg	1440
ggtgccagcg tgggtgtgtc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaageggcg	1500
gtgcacaatc ttctcgcgca acgcgtcagt gggetgatca ttaactatcc gctggatgac	1560
caggatgcca ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc cggcgttatt tcttgatgtc	1620
tctgaccaga cacccatcaa cagtattatt ttctcccatg aagacggtae gcgactgggc	1680
gtggagcatic tggctgcatt gggtcaccag caaatcgcgc tgttagcggg cccattaagt	1740
tctgtctcgg cgcgtctcgg tctggctggc tggcataaat atctcaactc caatcaaatt	1800
cagccgatag cggaacggga aggcgaactgg agtgccatgt ccggttttca acaaaccatg	1860
caaatgctga atgagggcat cgttcccact gcgatcctgg ttgccaacga tcagatggcg	1920
ctgggcgcaa tgcgcgccat taccgagtcc gggctcgcgc ttggtgcgga catctcggtc	1980
gtgggatacg acgataccga agacagctca tgttatatcc cgccttaac caccatcaaa	2040
caggatttcc gcttctggg gcaaaccagc gtggaccgct tgetgcaact ctctcagggc	2100
caggcgggta agggcaatca getgttgccc gtctcactgg tgaaaagaaa aaccacctg	2160
gcgccaata cgcaaacgc ctctcccgc gcgttgccg atcattaat gcagctggca	2220
cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac gcaattaatg taagttagct	2280
cactcattag gcaccgggat ctgaccgat gcccttgaga gccttcaacc cagtcagctc	2340
cttccggctg gcgcggggca tgactatcgt cggcgcactt atgactgtct tctttatcat	2400
gcaactcgtc ggacagggtc cggcagcget ctgggtcatt ttccggcagg accgcttccg	2460
ctggagcggc acgatgatcg gctgtctgct tgggtatcc ggaatcttc acgcctcgc	2520
tcaagccttc gtcaactggc cggccaccaa acgtttcggc gagaagcagg ccattatcgc	2580
cggcatggcg gccccacggg tgcgatgat cgtgtctctg tcggtgagga cccgctagg	2640
ctggcggggt tgccctactg gttagcagaa tgaatcaccg atacgcgagc gaactggaag	2700

[0005]

cgactgctgc	tgcaaaacgt	ctgcgacctg	agcaacaaca	tgaatggctc	tcggtttccg	2760
tgtttcgtaa	agtetggaaa	cgcggaagtc	agcgcctgc	accattatgt	tccggatctg	2820
catcgcagga	tgetgctggc	tacctgtgg	aacacctaca	tctgtattaa	cgaagcctg	2880
gcattgacc	tgagtgattt	ttctctggtc	ccgcgcctc	cataccgcca	gttgtttacc	2940
ctcacaacgt	tecagtaacc	gggcatgttc	atcatcagta	accctatctg	tgagcactct	3000
ctctcgtttc	atcggtatca	ttacccccat	gaacagaaat	cccccttaca	cggaggcctc	3060
agtgacaaa	caggaaaaaa	ccgcccttaa	catggcccgc	tttatcagaa	gccagacatt	3120
aacgctttctg	gagaaactca	acgagctgga	cgcggatgaa	caggcagaca	tctgtgaatc	3180
gcttcacgac	cacgctgatg	agctttaccg	cagctgcctc	gcgcgtttctg	gtgatgacgg	3240
tgaaaacctc	tgacacatgc	agctcccgga	gacggtcaca	gcttgtctgt	aagcggatgc	3300
cgggagcaga	caagcccgtc	agggcgcgtc	agcgggtgtt	ggcgggtgtc	ggggcgcagc	3360
catgaccag	tcacgtagcg	atagcggagt	gtatactggc	ttaactatgc	ggcatcagag	3420
cagattgtac	tgagagtgca	ccatatatgc	ggtgtgaaat	accgcacaga	tcgtaagga	3480
gaaaataaccg	catcaggegc	tcttccgctt	cctcctctac	tgactcctg	cgtctggctg	3540
ttcggctgcg	gcgagcggta	tcagctcact	caaaggcgtt	aatacggtta	tccacagaat	3600
caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	caaaaggcca	gcaaaagccc	aggaaccgta	3660
aaaaggcccgc	gttgcctggc	ttttccata	ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	3720
atcgacgctc	aagtcagagg	tggcgaaacc	cgacaggact	ataaagatac	caggcgtttc	3780
ccccctggaag	ctccctcgtg	cgtctctctg	ttccgacctt	gccgcttacc	ggatacctgt	3840
ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggegc	ttctctatag	ctcacctgtg	aggtatctca	3900
gttcggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagccag	3960
accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgtc	ttagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	4020

[0006]

cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 4080  
 cagagttctt gaagtggtag cctaactacg gctacactag aaggacagta ttigtatctt 4140  
 gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 4200  
 aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 4260  
 aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 4320  
 actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 4380  
 faaattaata atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca 4440  
 gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctatct cgttcateca 4500  
 tagttgacct actccccgct ggttagataa ctacgatacg ggagggttta ccatctggcc 4560  
 ccagtgtctc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc tccagattta tcagcaataa 4620  
 accagccagc cggaagggcc gacgcagaa gtggtccctc aactttatec gcctccatec 4680  
 agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagtcc gccagttaat agtttgcga 4740  
 acgttgttgc cattgctgca ggcategtgg tgtaacgctc gtcgttttgt atggttcat 4800  
 teagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag 4860  
 cggttagctc ctccggctct ccgategttg tcagaagtaa gttggccgca gttttatcac 4920  
 tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt 4980  
 ctgtgactgg tgagtactca accaagtcat tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt 5040  
 gctcttgecc ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc 5100  
 tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttagat 5160  
 ccagtccgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt accttcacca 5220  
 gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggaga 5280  
 cacggaatg ttgaatactc atactcttcc ttttcaata ttattgaage atttatcagg 5340

[0007]

gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 5400  
 ttccgcgcac atttcccga aaagtgccac ctgaaattgt aaacgttaat attttgtaa 5460  
 aattcgcggt aaattttigt taaatcagct cttttttaa ccaataggcc gaaatcgga 5520  
 aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt gagtgttgtt ccagtttga 5580  
 acaagagtcc actattaaag aacgtggaet ccaacgtcaa agggcgaaaa accgtctatc 5640  
 agggcgatgg cccaetacgt gaaccatcac cctaatcaag ttttttggg tcgaggtgcc 5700  
 gtaaagcaet aaatcggaac cctaaaggga gccccgatt tagagcttga cggggaaagc 5760  
 cggcgaacgt ggcgagaaaag gaaggaaga aagcgaagg agcgggect agggcgctgg 5820  
 caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc cgcgcttaat gcgccctac 5880  
 agggcgctc ccattcgcca 5900

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> SPATA16 基因上游引物序列

<400> 3

gacgacgaca agatggattc tggcaagagt agga 34

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> SPATA16 基因下游引物序列

<400> 4

gaggagaagc ccggttactg aagcccaagg cacat 35

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> pET32a 质粒上游引物序列

[0008]

<400> 5  
ccgggettct cctcaattgc ggccgcactc gagcac 36

<210> 6

<211> 34

<212> DNA

<213> pET32a 质粒下游引物序列

<400> 6

tcttgctgct gteaacgcgt ggacagacca gaag 34

<210> 7

<211> 150

<212> PRT

<213> 鼠 SPATA16 基因多克隆抗体识别的蛋白序列

<400> 7

Met Asp Ser Gly Lys Ser Arg Ser Leu Glu Thr Thr Val Lys Arg Val  
1 5 10 15

Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Pro Lys Ile Asn Thr Ser Lys Lys Met Ser  
20 25 30

Thr Leu Thr Asn Ser Pro Ser Ser Leu Glu Gly Thr Pro Gly Ile Lys  
35 40 45

Lys Asn Ser Gly Glu Met Gln Ala Glu Ala Ser Ala Glu Arg Val Lys  
50 55 60

Leu Thr Lys Ser Ile Lys Glu Lys Gln Asn Asn Glu Leu Glu Lys Val  
65 70 75 80

Ala Leu Lys Arg Lys Ala Asp Ser Glu Glu Lys Leu Val Gly Lys Lys  
85 90 95

[0009]

Glu Ala Lys Ile Met Glu Leu Asp Asn Gln Leu Val Thr Thr Val Pro  
 100 105 110

Leu Pro His Ile Pro Leu Lys Asn Ile Met Asp Val Glu Met Lys Leu  
 115 120 125

Val Tyr Val Asp Glu Glu Asp Val Ser Tyr Glu Phe Ala Gln Pro Asn  
 130 135 140

Met Cys Leu Gly Leu Gln  
 145 150

<210> 8

<211> 534

<212> PRT

<213> 鼠 SPATA16 基因的蛋白序列

<400> 8

Met Asp Ser Gly Lys Ser Arg Ser Leu Glu Thr Thr Val Lys Arg Val  
 1 5 10 15

Tyr Arg Asp Leu Leu Leu Pro Lys Ile Asn Thr Ser Lys Lys Met Ser  
 20 25 30

Thr Leu Thr Asn Ser Pro Ser Ser Leu Glu Gly Thr Pro Gly Ile Lys  
 35 40 45

Lys Asn Ser Gly Glu Met Gln Ala Glu Ala Ser Ala Glu Arg Val Lys  
 50 55 60

Leu Thr Lys Ser Ile Lys Glu Lys Gln Asn Asn Glu Leu Glu Lys Val  
 65 70 75 80

[0010]



Ala Leu Lys Arg Lys Ala Asp Ser Glu Glu Lys Leu Val Gly Lys Lys  
 85 90 95

Glu Ala Lys Ile Met Glu Leu Asp Asn Gln Leu Val Thr Thr Val Pro  
 100 105 110

Leu Pro His Ile Pro Leu Lys Asn Ile Met Asp Val Glu Met Lys Leu  
 115 120 125

Val Tyr Val Asp Glu Glu Asp Val Ser Tyr Glu Phe Ala Gln Pro Asn  
 130 135 140

Met Cys Leu Gly Leu Gln Ala Thr Gly Gln Thr Ala Thr Thr Met Pro  
 145 150 155 160

Pro Ala Ser Pro Arg Asp Leu Thr Thr Leu Pro Gln Ile Asp Lys Trp  
 165 170 175

Leu Gln Val Ala Leu Lys Asp Ala Ser Ser Cys Tyr Arg Gln Lys Lys  
 180 185 190

Tyr Ala Val Ala Ala Gly Gln Phe Arg Thr Ala Leu Glu Leu Cys Ser  
 195 200 205

Lys Gly Ala Ala Leu Gly Lys Pro Phe Glu Ala His Ala Glu Asp Ile  
 210 215 220

Ala Ser Ile Ala Ser Phe Ile Glu Thr Lys Leu Val Thr Cys Tyr Leu  
 225 230 235 240

Arg Met Arg Lys Pro Asp Leu Ala Leu Asn His Ala His Arg Ser Ile  
 245 250 255

[0011]

Val Leu Asn Pro Ala Tyr Phe Arg Asn His Leu Arg Gln Ala Ala Val  
 260 265 270

Phe Arg Cys Leu Glu Arg Tyr Ser Glu Ala Ala Arg Ser Ala Met Ile  
 275 280 285

Ala Asp Tyr Met Phe Trp Leu Cys Gly Gly Ser Glu His Ser Val Ser  
 290 295 300

Lys Leu Ile Lys Leu Tyr Trp Gln Ala Met Ile Glu Glu Ala Ile Thr  
 305 310 315 320

Arg Ala Glu Ala Phe Ser Val Met Tyr Thr Pro Phe Ala Thr Arg Ile  
 325 330 335

Lys Pro Glu Asn Ile Glu Lys Val Lys Glu Val Phe Met Arg Thr His  
 340 345 350

Pro Thr Tyr Val Asp Cys Ile Tyr Thr Asp Thr Gln Gly Leu His Val  
 355 360 365

Leu Pro Gln Thr Ala Asp Trp Ser Cys Phe Pro Pro Gln Gln Tyr Leu  
 370 375 380

Leu Thr Leu Gly Phe Lys Asn Lys Glu Asp Gly Lys Phe Leu Glu Lys  
 385 390 395 400

Val Ser Ser Arg Lys Leu Pro Thr Tyr Thr Glu His Lys Thr Pro Phe  
 405 410 415

Ser Pro Leu Thr Arg Glu Asp Thr Val Arg His Met Glu Thr Val Gly  
 420 425 430

[0012]

Lys Arg Ile Leu Pro Ile Leu Asp Phe Ile Arg Ser Thr Gln Leu Asn  
 435 440 445

Gly Asn Phe His Ala Cys Ser Gly Val Met Glu Lys Leu His Tyr Ala  
 450 455 460

Ser Leu Leu Ser Arg Leu Gln Arg Val Lys Glu Gln Ala Gln Val Ile  
 465 470 475 480

Asn Gln Ala Met Ala Glu Leu Ala Thr Val Pro Tyr Leu Gln Asp Ile  
 485 490 495

Ser Gln Gln Glu Ala Glu Leu Leu Gln Ser Leu Met Ala Asp Ala Met  
 500 505 510

Asp Thr Leu Glu Gly Lys Lys Ser Asp Lys Glu Arg Val Trp Asn Thr  
 515 520 525

Ile Gln Lys Val Lys Phe  
 530

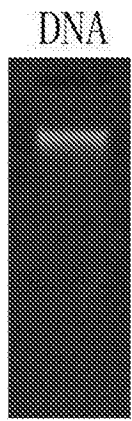


图 1

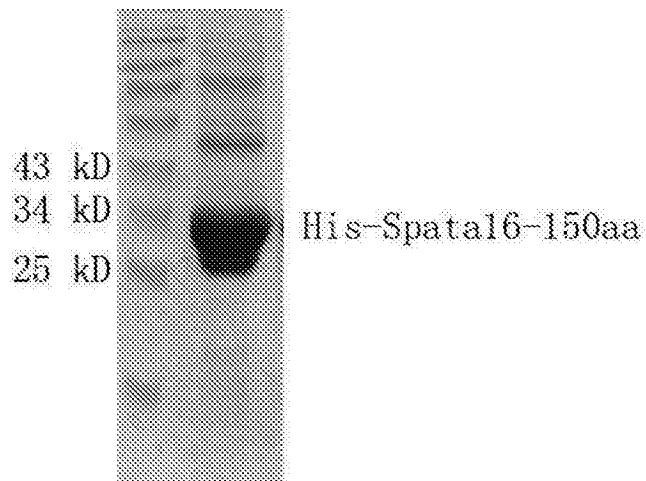


图 2

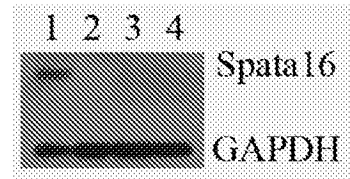


图 3

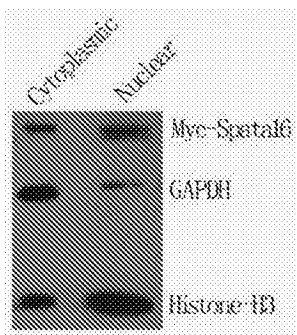


图 4

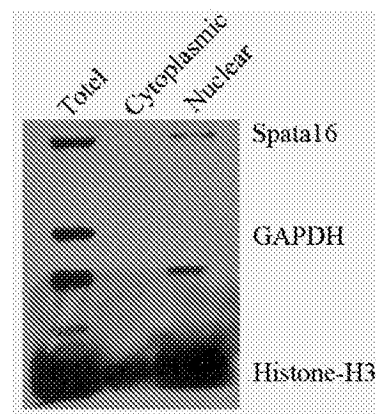


图 5

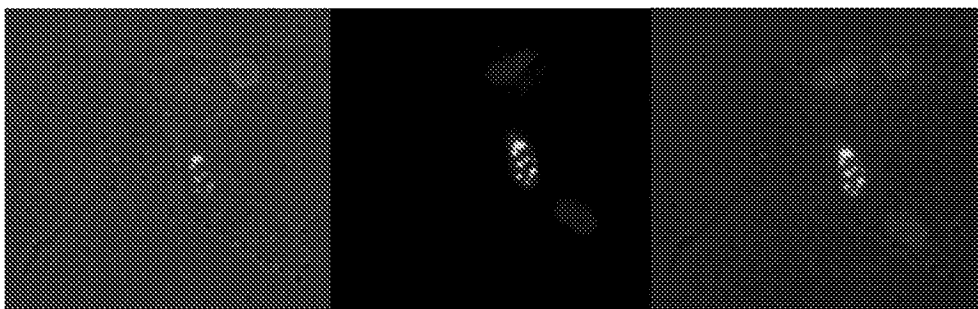


图 6