



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111393528 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 202010061118.0

(22)申请日 2020.01.19

(71)申请人 中国药科大学

地址 211198 江苏省南京市江宁区龙眠大道639号

(72)发明人 邱郑 王旻 陶慧敏 邢黎军

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

代理人 曹坤

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61K 47/68(2017.01)

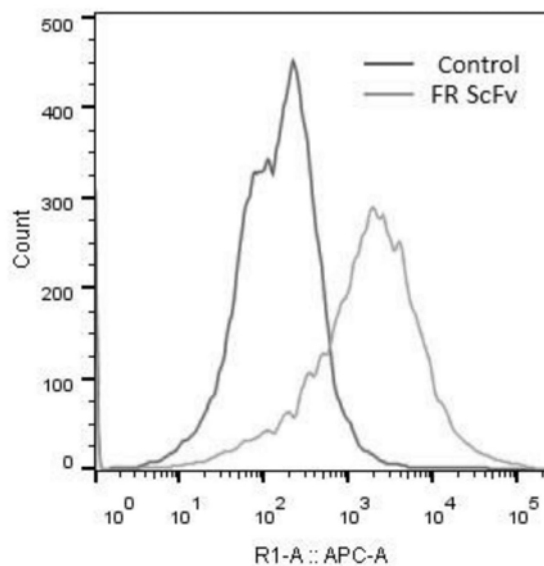
权利要求书2页 说明书17页
序列表5页 附图9页

(54)发明名称

一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体及其应用,属于肿瘤靶向治疗领域,所述叶酸受体 α 单链抗体核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述SEQ ID NO.2中的CDR区如SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.8所示。本发明所述的叶酸受体 α 单链抗体序列由噬菌体展示技术筛选所得,经原核表达系统表达抗体分子,可用于靶向叶酸受体 α 表达阳性的肿瘤细胞。本发明可利用所获得的单链抗体分子在肿瘤诊断中发挥潜在的医学和药学价值,为肿瘤的靶向治疗提供一种新的方法。



1. 一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,其特征在于,所述单链抗体的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,其特征在于,所述的SEQ ID NO.1为:

CAGGCGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC
TCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAG
CTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTC
CAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAGGGCG
GTTGGTTCGGGGGTGGCGGTTTTGGGGCCAAGGTACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGAGGCGGTTCTGGCGGAG
GTGGCTCAGGCGGTGGAGGCTCGGATATTGTGCTGACTCAGTCTCCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGT
CACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACG
GCTCCCAAACCTCCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTG
GCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATGA
CAGCCTGTTCGGCGGGTATTCGGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT。

3. 一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,其特征在于,所述单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

4. 根据权利要求3所述的一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,其特征在于,所述的SEQ ID NO.2为:

Q A Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V
R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V E G R F T I S R D N S K
N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R A V G R G W R F W G Q G T M V T
V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I V L T Q S P S A S G T P G Q R V T I S
C S G S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P K L L I Y R N N Q R P S G V S
D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A W D D S L S A R
V F G G G T K V D I K R。

5. 根据权利要求3所述的一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,其特征在于,所述单链抗体SEQ ID NO.2中CDR区氨基酸序列如SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.8所示。

6. 根据权利要求5所述的一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,其特征在于,所述SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.8具体如下:

SEQ ID NO.3:GFTFSSYA;

SEQ ID NO.4:SSNIGSNY;

SEQ ID NO.5:ISGSGGST;

SEQ ID NO.6:RNN;

SEQ ID NO.7:ARRAVGRGWRF;

SEQ ID NO.8:AAWDDSL SARV。

7. 一种药物组合物,其特征在于,包含权利要求3所述的氨基酸序列与药物活性成分通过共价或非共价偶联,或包含权利要求3所述的氨基酸序列的递药载体。

8. 如权利要求1所述的核苷酸序列、权利要求3所述的氨基酸序列在肿瘤靶向治疗中的应用。

9. 如权利要求3中所述的氨基酸序列在制备肿瘤诊断试剂盒中的应用。

一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,涉及一种叶酸受体 α 特异性结合的单链抗体及其在肿瘤靶向中的应用。

背景技术

[0002] 噬菌体展示技术是将外源多肽或重组蛋白与噬菌体的衣壳蛋白进行融合表达,使外源蛋白能展示在病毒颗粒表面,同时使编码外源蛋白的DNA位于该病毒粒子内。天然人源噬菌体展示单链抗体文库是将人抗体重链可变区基因(VH)和轻链可变区基因(VL)通过一段linker序列连接到一起,融合到M13噬菌体次要衣壳蛋白(pIII)上,构建为一个组合文库。所展示的单链抗体(ScFv)表达在pIII的N末端,再用各种靶分子(抗体、酶、细胞表面受体等)来进行体外筛选获得具有与靶蛋白结合活性的噬菌体克隆。体外选择程序简单来说就是噬菌体抗体库与固相靶分子共孵育,洗涤去除未结合噬菌体,然后再用特殊的洗脱液洗脱得到能与靶分子特异性结合的噬菌体。被洗脱的噬菌体还需进行扩增,进行下一轮的结合/扩增循环,来富集特异性结合噬菌体。经3~4轮“淘选”后,通过DNA测序可以得到每个特异性结合的序列。

[0003] 叶酸受体(folate receptor,FR)是结合并转运叶酸及其衍生物进入细胞的重要转运体,在体内主要以三种亚型存在:FR α 、 β 和 γ 。叶酸受体 α (folate receptor α ,FR α)是一种由糖基化磷脂酰肌醇(GPI)锚定于细胞膜表面的糖蛋白。已有文献报道,卵巢癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等组织中FR α 呈高表达,而在正常组织中限制性表达,因此被认为是极具潜力的卵巢癌标志物或肿瘤相关抗原(TAA);FR α 对卵巢癌具有的高度特异性,可作为治疗相关肿瘤的靶点;部分研究也表明,FR α 对于卵巢癌的早期诊断具有重要价值。基于此,若能得到与FR α 具有较高亲和力的单链抗体序列,将为肿瘤的靶向性治疗和诊断提供新思路。

[0004] 本实验室前期成功构建了一个库容为 2×10^9 的全人源噬菌体单链抗体文库,可用FR α 蛋白固相亲和筛选以获得特异性靶向的噬菌体克隆。

发明内容

[0005] 为了解决上述问题;本发明提供了一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,本发明利用噬菌体展示技术从本实验室自主构建的全人源噬菌体单链抗体文库中筛选获得一种能与FR α 特异性结合的噬菌体克隆;将该噬菌体克隆所展示的单链抗体基因克隆到工程菌内,构建原核表达系统,以可溶性表达的形式大量制备单链抗体;该单链抗体可用于靶向FR α 表达阳性的肿瘤细胞。

[0006] 本发明的技术方案是:一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,所述单链抗体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1所示。

[0007] 进一步的,所述的SEQ ID NO.1为:

[0008] CAGGCGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG

TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG
 ACAATTCCAAGAA CACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGT GCA
 AGAAGGGCGGTTGGTCGGGGGTGGCGGTTTTGGGGCCAAGGTACAATGGTCACCG TCTCTTCAGGTGGAGGCGGT
 TCTGGCGGAGGTGGCTCAGGCGGTGGAGGCTCGGATAT TGTGCTGACTCAGTCTCCCTCAGCGTCTGGGACCCCC
 GGGCAGAGGGTACCATCTCTT GTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTACCAGCAG
 CTCCC AGGAACGGCTCCCAAACCTCATCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTTTCT GACCGATTCTC
 TGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCG GTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTG
 TGCAGCATGGGATGACAGCCTGTCGGCGCGG GTATTCGGCGGAGGGACCAAAGTGGATATCAAACGT。

[0009] 一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,所述单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0010] 进一步的,所述的SEQ ID NO.2为:

[0011] Q A Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S
 W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V E G R F T I S R D N
 S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R A V G R G W R F W G Q G T M
 V T V S S G G G S G G G S G G G S D I V L T Q S P S A S G T P G Q R V T
 I S C S G S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P K L L I Y R N N Q R P S G
 V S D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A W D D S L S
 A R V F G G G T K V D I K R。

[0012] 进一步的,所述单链抗体SEQ ID NO.2中CDR区氨基酸序列如SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.8 所示。

[0013] 进一步的,所述SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.8具体如下:

[0014] SEQ ID NO.3:GFTFSSYA;

[0015] SEQ ID NO.4:SSNIGSNY;

[0016] SEQ ID NO.5:ISGSGGST;

[0017] SEQ ID NO.6:RNN;

[0018] SEQ ID NO.7:ARRAVGRGWRF;

[0019] SEQ ID NO.8:AAWDDLSARV。

[0020] 一种药物组合物,包含所述的氨基酸序列与药物活性成分通过共价或非共价偶联,或包含所述的氨基酸序列的递药载体。

[0021] 一种分子探针,所述分子探针包含所述的氨基酸序列。

[0022] 进一步的,所述的核苷酸序列及所述氨基酸序列在肿瘤靶向治疗中的应用。

[0023] 进一步的,所述的氨基酸序列在制备肿瘤诊断试剂盒中的应用。

[0024] 本发明具体为:

[0025] (1)、全人源噬菌体单链抗体文库的亲和筛选:以FR α 重组蛋白为靶标,对单链抗体噬菌体展示库进行四轮生物筛选;每轮筛选检测回收率和多克隆ELISA,以判断筛选是否有效;通过单克隆ELISA检测各克隆与FR α 重组蛋白的结合能力;

[0026] (2)、噬菌体阳性单克隆DNA的测序鉴定:根据上述ELISA结果,选择阳性值高的噬菌体单克隆,对其进行测序,且对各个序列进行生物信息学分析;

[0027] (3)、流式细胞术检测噬菌体抗体与天然细胞表面FR α 的结合:选取FR α 表达阳性的

细胞株SKOV3(人卵巢癌细胞),检测噬菌体抗体与细胞株的结合;

[0028] (4)、FR ScFv原核表达系统的构建:首先设计PCR引物,扩增出FR ScFv的基因,获取目的基因片段,通过酶切、酶连反应将扩增出的单链抗体基因插入到pET 22b载体中,并在目的基因下游融合组氨酸(His)标签,构建出单链抗体的重组表达载体;将重组载体转化入宿主菌中,经过菌落PCR验证,测序分析,挑取测序正确的克隆即为构建成功的表达FR ScFv的工程菌;

[0029] (5)、FR ScFv的表达与纯化:将工程菌平板活化后,接种到新鲜的LB液体培养基中, IPTG诱导表达;收集菌体后裂解并进行超声破碎,利用镍柱亲和层析纯化单链抗体,以透析的方式将抗体置换到PBS溶液中;超滤浓缩所得单链抗体;

[0030] (6)、FR ScFv目的蛋白的验证:SDS-PAGE确定单链抗体分子量为28kDa;Western blot 验证单链抗体分子;

[0031] (7)、生物膜干涉法测定单链抗体与FR α 的亲和力:利用ForteBio Octet系统进行测定,使用Octet软件对亲和力数据进行处理,计算FR α 与FR ScFv的亲和力;

[0032] (8)、流式细胞术检测单链抗体与天然细胞表面FR α 的结合:选取FR α 表达阳性的细胞株SKOV3(人卵巢癌细胞),检测FR ScFv与细胞株的结合;

[0033] (9)、pEGFP-N1-FR α 真核表达载体的构建:设计引物,通过PCR的方法将FR α 基因插入到真核表达载体pEGFP-N1,使FR α 和绿色荧光蛋白GFP融合表达;

[0034] (10)细胞免疫荧光检测FR ScFv与FR α 的结合:通过瞬时转染含有FR α 基因的真核表达载体pEGFP-N1-FR α ,使CHO(中国仓鼠卵巢细胞)细胞能够表达FR α 蛋白,荧光显微镜观察FR ScFv的结合情况。

[0035] 本发明的有益效果:本发明提供的可靶向FR α 的噬菌体克隆,经多克隆ELISA和单克隆 ELISA验证,可特异性结合FR α 重组蛋白,同时通过流式细胞术分析,发现筛选出的阳性克隆能与细胞表面天然FR α 特异性结合,符合实验预期;对噬菌体阳性克隆进行测序分析后,构建FR ScFv原核表达系统,分离纯化目标单链抗体;结合生物膜干涉法测定抗体分子亲和力、同时利用流式细胞术及细胞免疫荧光分析,FR ScFv可特异性结合FR α ;以上实验证明了FR ScFv具有靶向性,具有潜在的医学和药学价值,为肿瘤的靶向性治疗提供一种新的方法。

附图说明

[0036] 图1是本发明中靶向FR α 单链抗体噬菌体的筛选回收率柱状图;

[0037] 图2是本发明中噬菌体多克隆ELISA结果图;

[0038] 图3是本发明中第三轮筛选噬菌体单克隆ELISA结果图;

[0039] 图4是本发明中第四轮筛选噬菌体单克隆ELISA结果图;

[0040] 图5是本发明中FR ScFv重链、轻链可变区功能域示意图;

[0041] 图6是本发明中流式细胞术检测不同噬菌体克隆与细胞表面FR α 的结合情况图;

[0042] 图7是本发明中FR ScFv重组表达载体的构建示意图:图7A为PCR扩增FR ScFv基因电泳结果图(泳道M:DL5000 DNA Marker;泳道1-2:PCR扩增的ScFv);图7B为重组载体构建示意图;图7C挑取克隆菌落PCR电泳结果图(泳道M:DL2000 DNA Marker;泳道1-10:不同克隆的菌落PCR结果);

[0043] 图8是本发明中IPTG诱导工程菌表达ScFv不同诱导时间工程菌破碎上清电泳结果图(泳道1:21h无IPTG诱导;泳道2:IPTG诱导0h;泳道3:IPTG诱导2h;泳道4:IPTG诱导4h;泳道5:IPTG诱导6h;泳道6:IPTG诱导8h;泳道7:IPTG诱导10h;泳道8:IPTG诱导12h;泳道9:IPTG诱导21h;泳道M:分子量18.4-116KDa的Unstained Protein Marker);

[0044] 图9是本发明中镍柱纯化单链抗体电泳结果图;其中单链抗体目标分子量为28.32kDa:图9A工程菌破碎上清、过柱流穿液及50-100mM咪唑洗脱产物电泳图(泳道M:Protein Marker;泳道1:细胞破碎上清;泳道2:流穿液;泳道3-7:50mM咪唑的洗脱产物;泳道8-12:100mM咪唑的洗脱产物);图9B为500mM咪唑洗脱产物电泳图(泳道M:分子量18.4-116KDa的Unstained Protein Marker;泳道1-12:500mM咪唑的洗脱产物);

[0045] 图10是本发明中FR ScFv超滤电泳结果和Western Blot检测结果图:图10A为SDS-PAGE结果图(泳道M:分子量18.4-116KDa的Unstained Protein Marker,泳道1-2为FR ScFv);图10B为Western Blot结果图;

[0046] 图11是本发明中生物膜干涉法测定FR ScFv与FR α 的结合解离曲线示意图;

[0047] 图12是本发明中流式细胞术检测FR ScFv与表达FR α 的SKOV3细胞结合效果图;

[0048] 图13是本发明中PCR扩增FR α 基因的电泳结果及真核表达载体PEGFPN1-FR α 的构建示意图和鉴定结果图:图13A为FR α 基因PCR产物电泳图(泳道M为DL5000 DNA Marker,泳道1为FR α 扩增产物);图13B为PEGFPN1-FR α 的重组载体构建示意图;图13C为菌落PCR电泳结果图;

[0049] 图14是本发明中细胞免疫荧光检测FR ScFv与FR α 的特异性结合图。

具体实施方式

[0050] 为了更清楚地阐述本发明,下述内容提供了较为具体的实施方案,本领域的技术人员应该理解,本发明并不仅仅限定于下述实施例。

[0051] 一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,所述单链抗体的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0052] 进一步的,所述的SEQ ID NO.1为:

[0053] CAGGCGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGA GACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCTATGAGCTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGGAGGGCCGTTACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAA CACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTTACTGT GCA AGAAGGGCGGTTGGTCGGGGTGGCGGTTTTGGGGCCAAGGTACAATGGTCACCG TCTCTCAGGTGGAGGCGGT TCTGGCGGAGGTGGCTCAGGCGGTGGAGGCTCGGATAT TGTGCTGACTCAGTCTCCCTCAGCGTCTGGGACCCCC GGGCAGAGGGTCACCATCTCTT GTTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGTAATTATGTATACTGGTACCAGCAG CTCCC AGGAACGGCTCCCAAACCTCATCTATAGGAATAATCAGCGCCCTCAGGGGTTTCT GACCGATTCTC TGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCG GTCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTG CAGCATGGGATGACAGCCTGTGGCGCGG GTATTCGGCGGAGGGACCAAAGTGATATCAAACGT。

[0054] 一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体,所述单链抗体的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0055] 进一步的,所述的SEQ ID NO.2为:

[0056] Q A Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S
W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V E G R F T I S R D N
S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R A V G R G W R F W G Q G T M
V T V S S G G G S G G G S G G G S D I V L T Q S P S A S G T P G Q R V T
I S C S G S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P K L L I Y R N N Q R P S G
V S D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A W D D S L S
A R V F G G G T K V D I K R。

[0057] 进一步的,所述单链抗体SEQ ID NO.2中CDR区氨基酸序列如SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.8 所示。

[0058] 进一步的,所述SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.8具体如下:

[0059] SEQ ID NO.3:GFTFSSYA;

[0060] SEQ ID NO.4:SSNIGSNY;

[0061] SEQ ID NO.5:ISGSGGST;

[0062] SEQ ID NO.6:RNN;

[0063] SEQ ID NO.7:ARRAVGRGWRF;

[0064] SEQ ID NO.8:AAWDDSL SARV。

[0065] 一种药物组合物,包含所述的氨基酸序列与药物活性成分通过共价或非共价偶联,或包含所述的氨基酸序列的递药载体。

[0066] 一种分子探针,所述分子探针包含所述的氨基酸序列。

[0067] 进一步的,所述的核苷酸序列及所述氨基酸序列在肿瘤靶向治疗中的应用。

[0068] 进一步的,所述的氨基酸序列在制备肿瘤诊断试剂盒中的应用。

[0069] 实施例1:

[0070] 全人源噬菌体单链抗体展示库的亲筛和筛选:

[0071] 全人源噬菌体单链抗体展示库为自主构建,库容量 2.7×10^9 个转化子;TG1大肠杆菌是此抗体库的宿主菌。

[0072] (1)、准备工作:

[0073] 将FR α 重组蛋白用包被缓冲液(碳酸盐缓冲液[PH9.6])稀释至终浓度25 μ g/ml,在室温20-25 $^{\circ}$ C下包被过夜;同时设置一个只有PBS包被的免疫管和一个包被封闭液的免疫管,筛选时作为阴性筛选;弃掉抗原包被管中的上清,用PBST洗涤三次,加满封闭液,37 $^{\circ}$ C封闭2h;

[0074] (2)、亲和筛选:

[0075] 弃掉PBS包被管中的上清,将扩增抗体库取2mL(约 10^{13} pfu)先加入到PBS包被的免疫管中,20-25 $^{\circ}$ C下颠倒30min,静置30min;弃掉封闭液包被的免疫管中上清,将PBS管中的抗体库溶液移入到封闭液管中,20-25 $^{\circ}$ C下颠倒30min,静置30min即可完成阴性筛选;(在第一轮和第二轮筛选时进行阴性筛选,第三轮之后的筛选不再进行阴性筛选,直接使用靶蛋白包被管进行筛选)弃掉抗原包被管中的封闭液,用PBST洗涤三次,将完成阴性筛选的抗体库溶液移入抗原包被管中,再加2mL封闭液,20-25 $^{\circ}$ C下颠倒1h,静置1h,弃上清;PBST洗涤10次,PBS洗涤10次;(第二轮之后的筛选洗涤次数一次倍增,分别为第二轮:20+20次,第三轮:40+40次,第四轮:80+80次)将免疫管倒置在吸水纸上5min,去除干净PBS,加入1mL噬菌体

洗脱液,20-25℃下反复颠倒孵育10min,将特异性结合到靶蛋白上的噬菌体洗脱下来;孵育结束后加入 0.5mL中和缓冲液进行中和,中和后的噬菌体可直接用于感染TG1进行第一轮噬菌体洗脱产物的扩增或者于4℃保存;同时取10μL洗脱的噬菌体溶液,稀释后感染对数期的TG1,测定噬菌体滴度;

[0076] (3)、噬菌体抗体库的扩增:

[0077] 噬菌体洗脱液加入到500mL 2×YT-GA液体培养基中(2×YT+2%葡萄糖+100ug/ml氨苄青霉素),37℃250rpm培养至OD₆₀₀达到0.5;取100mL细菌培养物,有 8×10^{10} 个TG1大肠杆菌,向其中加入 1.6×10^{12} 个M13辅助噬菌体,摇匀后37℃静置孵育 30min,37℃250rpm培养30min;3200g离心10min,弃上清收集菌体重悬菌体到500mL 2×YT-AK培养基中(2×YT+25ug/ml卡那霉素+100ug/ml氨苄青霉素),30℃250rpm 培养过夜;10000g离心10min,弃菌体收集上清,如果上清中还有颗粒物质不澄透亮,则可延长离心时间,去除颗粒物;上清中加入1/5体积的PEG溶液,摇匀后4℃静置1h, 10000g离心1h;弃上清收集沉淀,用20mL噬菌体稀释溶液重悬沉淀,再加入1/5体积的PEG溶液,摇匀后冰浴20min,10000g离心30min;弃上清收集沉淀,将离心杯倒置在吸水纸数分钟,把PEG去除干净,用1mL噬菌体稀释液溶解沉淀,0.22μm的滤膜过处理,即为组装好的噬菌体抗体库,4℃保存备用;

[0078] 将扩增后的噬菌体抗体库部分用于第二轮亲和筛选,包被抗原第二轮筛选为12.5 μg/mL,4mL;第三轮为6.5μg/mL,4mL;第四轮为3μg/mL,4mL;收集纯化扩增的噬菌体抗库,重复三次共进行四次筛选;逐轮筛选增加洗涤步骤中的洗涤次数;

[0079] (4)、噬菌体滴度的测定:

[0080] 取10μL第一轮筛选所得的噬菌体洗脱产物用噬菌体稀释液将其进行梯度稀释,从中取10μL感染对数期(OD₆₀₀为0.4~0.6)的TG1;将感染后的TG1进行梯度稀释,原液、 10^{-1} 、 10^{-4} ,分别取100μL涂布2×YT-GA固体平板;37℃培养箱倒置过夜,菌落计数,计算噬菌体滴度;噬菌体保存液的滴度一般是在 $10^{12} \sim 10^{13}$ pfu/mL;

[0081] (5)、噬菌体回收率计算公式:回收率(%)=输入滴度/输出滴度×100%;靶向FRα筛选噬菌体的输入滴度、输出滴度及回收率结果见表1、回收率柱状图见图1。

[0082] 表1:

Rounds	1	2	3	4
Phage input (pfu)	1.8×10^{13}	1.0×10^{13}	5.0×10^{11}	4.5×10^{11}
Phage eluted (pfu)	1.4×10^6	2.0×10^8	8.0×10^6	1.3×10^7
Yield (eluted/input)	7.8×10^{-8}	1.0×10^{-5}	1.6×10^{-5}	3.0×10^{-5}

[0084] 实施例2:

[0085] 噬菌体多克隆ELISA鉴定:

[0086] 将FRα重组蛋白、牛血清白蛋白(BSA)用包被缓冲液稀释至终浓度10μg/ml,每孔包被100μl,4℃包被过夜;隔天弃去包被溶液,并在干净的吸水纸上拍甩去除残余液体,扣干,用PBS缓冲液洗涤3次后,每孔加入200μl封闭液,4℃封闭48h以上;弃掉封闭液,PBS缓冲液洗涤3次,每次5min,在干净的吸水纸上用力拍打,甩净洗涤液;洗涤完毕,取每一轮筛选后沉淀获得的噬菌体50u1(即噬菌体上清),用封闭液稀释到100u1,37℃孵育2h后弃去孔内液体,并用PBST缓冲液和PBS缓冲液依次洗涤3次,每次5min,拍甩除去洗涤液后加入HRP标记的小鼠抗M13抗体作为二抗(用封闭液稀释到工作浓度),37℃孵育2h,弃去孔内液体,洗涤

操作同上一操作；每孔加入 100 μ l TMB底物液进行显色，20-25 $^{\circ}$ C下避光孵育10min，孔内液体应由无色变为蓝色；每孔加入50 μ l 1M H₂SO₄终止液，终止显色反应，在酶标仪上检测OD₄₅₀值；

[0087] 结果如图2所示，四轮筛选的洗脱产物与BSA结合基本一致，但随着筛选轮数增加，洗脱物与FR α 重组蛋白结合的亲和力逐步增加。

[0088] 实施例3：

[0089] 噬菌体单克隆ELISA鉴定及测序鉴定：

[0090] (1)、ELISA检测噬菌体克隆对靶分子的结合能力：

[0091] 待测噬菌体的获取：从第三轮、第四轮噬菌体滴度测定的平板上，随机各挑取96个克隆到2mL 96深孔板中，深孔板中事先已加入400 μ L 2 \times YT-GA培养基，37 $^{\circ}$ C 300rpm培养过夜；取一块新的2mL 96深孔板加入400 μ L 2 \times YT-GA培养基，分别向每一孔中转接4 μ L前一天过夜培养物，37 $^{\circ}$ C300rpm培养2h到对数期，剩余的过夜培养物加入15%的甘油保存菌种；给第二块板中每孔加入2 \times 10⁹pfu M13辅助噬菌体，摇匀后37 $^{\circ}$ C静置30min，37 $^{\circ}$ C300rpm 1h，1800g离心10min，吸弃上清，保留菌体沉淀；将菌体沉淀用新鲜的400 μ L 2 \times YT-AK重悬，30 $^{\circ}$ C300rpm培养过夜；1800g离心 30min，保留上清；

[0092] ELISA检测：以终浓度10 μ g/ml将靶分子FR α 重组蛋白稀释于碳酸盐缓冲液[PH9.6]中，每孔包被100 μ l，在密封的湿盒中4 $^{\circ}$ C包被过夜；甩出多余靶分子溶液，并在干净的纸巾上拍甩除去多余的液体后，PBS洗涤3次；每孔加200 μ l封闭液，37 $^{\circ}$ C封闭2h；甩出封阻液，PBST洗涤6次，拍甩干净酶标板后，加入上一步中获取的噬菌体上清，37 $^{\circ}$ C孵育2h，再用PBST洗涤6次（操作同上），用封阻液按1:10000比例稀释HRP 标记的抗M13抗体，按每孔100 μ l加入孔中，室温反应2h，PBST充分洗涤6次（操作同上），每孔加入100 μ l TMB底物液（现配现用）显色，避光作用10min后每孔再加入 50 μ l 1M H₂SO₄终止液，终止显色反应，在酶标仪上检测OD₄₅₀值；

[0093] 结果如图3、图4所示；图3为第三轮筛选噬菌体单克隆ELISA的结果，图4为第四轮筛选噬菌体单克隆ELISA的结果，表明第三轮和第四轮平板上的克隆与FR α 都有很好的结合，而且第四轮的克隆结合能力明显强于第三轮克隆。

[0094] 实施例4：

[0095] 噬菌体阳性克隆测序鉴定和生物信息学分析：

[0096] 根据上述ELISA结果，选取20个阳性噬菌体单克隆（OD₄₅₀超过阴性对照10倍以上）进行扩增后，送检进行测序，计算各个序列的频率，用DNAMAN软件对各个序列进行同源性分析，将抗体的重、轻链序列与V-BASE (<http://www.vbase2.org/>) 数据库进行比对；用IGBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) 对抗体的序列信息进行预测分析；

[0097] 通过对测序结果进行分析，申请人获得了一条FR ScFv序列，如下所示：

[0098] SEQ ID NO.1：

[0099] CAGGCGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCTATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG
TCTCAGCTATTAGTGGTAGTG GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA
CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTGTATTACTGTGCAAG
AAGGGCGGTTGGTCGGGGGTGGCGTTTTGGGGC CAAGGTACAATGGTCACCGTCTCTTCAGGTGGAGGCGGTTCC

TGGCGGAGGTGG CTCAGGCGGTGGAGGCTCGGATATTGTGCTGACTCAGTCTCCCTCAGCGTCTGG GACCCCGG
 GGCAGAGGGTCACCATCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGA AGTAATTATGTATACTGGTACCAGCAGC
 TCCCAGGAACGGCTCCCAAACCTCCTCA TCTATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTGACCGATTCTCTG
 GCTCCAA GTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCT GATTATTACTGT
 GCAGCATGGGATGACAGCCTGTCGGCGGGTATTCGGCGGAG GGACCAAAGTGGATATCAAACGT

[0100] 上述序列对应的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;

[0101] SEQ ID NO.2:

[0102] Q A Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S
 W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V E G R F T I S R D N
 S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R A V G R G W R F W G Q G T M
 V T V S S G G G S G G G S G G G S D I V L T Q S P S A S G T P G Q R V T
 I S C S G S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P K L L I Y R N N Q R P S G
 V S D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A W D D S L S
 A R V F G G G T K V D I K R

[0103] 图5为FR ScFv重链、轻链可变区功能域示意图;

[0104] 上述SEQ ID NO.2中的CDR区如SEQ ID NO.3-SEQ ID NO.8所示;

[0105] SEQ ID NO.3 (CDR1-VH) :GFTFSSYA;

[0106] SEQ ID NO.4 (CDR1-VL) :SSNIGSNY;

[0107] SEQ ID NO.5 (CDR2-VH) :ISGSGGST;

[0108] SEQ ID NO.6 (CDR2-VL) :RNN;

[0109] SEQ ID NO.7 (CDR3-VH) :ARRAVGRGWRWF;

[0110] SEQ ID NO.8 (CDR3-VL) :AAWDDSLSARV。

[0111] 实施例5:

[0112] 流式检测噬菌体抗体与细胞表面FR α 的结合情况:

[0113] 利用流式细胞术检测筛选出来的阳性噬菌体单克隆与SKOV3肿瘤细胞的结合情况;

[0114] 根据单克隆ELISA的结果选出较好的阳性克隆,分别是E7、H1、C12、E9、F2,按照噬菌体抗体库的扩增方法进行扩增,PEG法纯化后,测定噬菌体滴度;

[0115] 细胞处理:SKOV3细胞培养至细胞密度达80%以上,显微镜下观察细胞形态良好,经0.25%胰酶消化,加入新鲜培养基终止消化作用,500g离心5min,PBS重悬制备单细胞悬液,进行活细胞计数,调整细胞浓度至 $1\sim 2\times 10^6$ 个/ml,分装到1.5ml EP管中,每管250 μ l~350 μ l;细胞沉淀用0.5ml 4%多聚甲醛重悬,20-25 $^{\circ}$ C固定15min,PBS洗涤两次,离心收集细胞重悬于PBS中;500g离心5min后,每管加入50 μ l (含 10^{11} 个噬菌体)稀释好的噬菌体抗体,4 $^{\circ}$ C孵育1h后,取出500g离心5min,弃上清,每管加1ml PBS 洗涤2~3次,吸弃上清;加入100 μ l稀释好的鼠源抗M13二抗,4 $^{\circ}$ C放置1h,取出同上操作进行洗涤,最后加入带FITC标签的羊抗鼠荧光二抗,按1:500稀释比用2%FBS-PBS 稀释,每孔100 μ l,注意此步骤需避光操作;4 $^{\circ}$ C避光孵育1h,洗涤步骤同上,300 μ l PBS 重悬,上流式细胞仪进行检测,Flowjo分析实验数据;

[0116] 检测结合结果如图6所示,E7、H1、C12、E9、F2的结合率分别为61.7%、27.0%、

48.3%、11.6%、55%；大部分克隆都表现出较好的结合活性；其中E7表现出最好的结合活性。

[0117] 实施例6：

[0118] FR ScFv原核表达系统的构建与验证：

[0119] (1)、目的基因的获取：抽提FR ScFv噬菌体克隆质粒，作为DNA模板；

[0120] (2)、PCR扩增目的基因：

[0121] 本发明所构建的原核表达载体是将目的基因插入到pET22b载体中，首先设计PCR引物，上游添加BamH I (GGATCC) 酶切位点，下游添加Hind III (AAGCTT) 位点，pET22b原核表达载体引物对序列如下所示：

[0122] 22b-FR ScFv-F: 5' → 3' CGCGGATCCGCAGGCGCAGCTGTTG

[0123] 22b-FR ScFv-R: 5' → 3' CCCAAGCTTACGTTTGATATCCAC

[0124]	PCR反应扩增体系	
	模板DNA	0.5ul
	上游引物	1ul
	下游引物	1ul
	dNTP	4ul
	10×buffer	5ul
	Taq DNA聚合酶	1ul
	加ddH ₂ O至总体积	50ul

[0125] PCR反应条件：

[0126]
$$\begin{array}{c} 94^{\circ}\text{C} \text{预变性 } 4\text{min} \Rightarrow 94^{\circ}\text{C} \text{变性 } 30\text{s} \\ \text{Hold} \end{array} \left. \begin{array}{l} \Rightarrow 57^{\circ}\text{C} \text{退火 } 30\text{s} \\ \Rightarrow 72^{\circ}\text{C} \text{延伸 } 1\text{min} \end{array} \right\} \Rightarrow \text{共 } 30 \text{ 个循环} \Rightarrow 72^{\circ}\text{C} \text{延伸 } 10\text{min} \Rightarrow 16^{\circ}\text{C}$$

[0127] (3)、PCR产物鉴定：

[0128] 配制1.0%琼脂糖凝胶，PCR产物2ul，恒压60V电泳30min，紫外灯下观察；扩增的FR ScFv基因电泳结果如图7A所示，成功扩增出FR ScFv的基因，分子量大小约为 750bp；

[0129] (4)、PCR产物回收：

[0130] 利用现有的胶回收试剂盒；将鉴定后的PCR产物按以下步骤进行回收；

[0131] 用干净的手术刀将含有目的DNA片段的琼脂糖凝胶切下，放入1.5ml离心管称重；按每100mg琼脂糖加入300ul的比例Buffer B2，置于50℃水浴5-10min至胶块完全融化；将融化好的溶液全部移入吸附柱，8000g离心30s，弃管底液体，再加入300ul Buffer B2，9000g离心30s，弃管底液体；向吸附柱中加入500ul Wash Solution，9000g离心30s，弃管底液体，重复洗涤一次；将空吸附柱和收集管放入离心机，9000g离心1min；在吸附膜中央加入25ul Elution Buffer，室温静置1-2min，9000g离心1min，洗脱所得的液体即含扩增出的单链抗体基因；N A N O d r o p定量后，-20℃保存；

[0132] (5)、抽提pET22b质粒：

[0133] 将冻存的甘油菌平板划线进行复壮，挑取单克隆于液体培养基中过夜培养，过夜培养物使用常规的质粒小提试剂盒抽提pET22b空载体，具体步骤如下：

[0134] 取1.5-5ml过夜培养的菌液,8000g离心2min收集菌体,弃尽培养基;在沉淀中加入250ul Buffer P1彻底悬浮菌体,加入250ul Buffer P2,立即温和颠倒离心管5-10次混匀,室温静置2-4min;加入350ul Buffer P3,立即温和颠倒离心管5-10次混匀;12000g 离心5-10min,将上清移入吸附柱,8000g离心30s,弃管底液体;加入500ul Wash Solution,9000g离心30s,弃管底液体,重复洗涤一次;空吸附柱于9000g离心1min,将吸附柱放入一个干净的1.5ml离心管中,在吸附膜中央加入50-100ul Elution Buffer,20-25℃下静置1min,离心1min;洗脱所得的液体即含pET22b空载体质粒,NANO drop定量后置于-20℃保存;

[0135] (6)、双酶切实验:

[0136] 将PCR扩增出的FR ScFv基因和pET22b空载体质粒使用BamH I和Hind III分别进行双酶切实验,酶切体系如下所示,反应条件为:抗体基因37℃酶切过夜,载体基因 37℃酶切4h;

[0137]	酶切反应物	
	目的基因/载体	42ul
	10×buffer	5ul
	BamH I	1.5ul
	Hind III	1.5ul

[0138] 酶切产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳,DNA胶回收试剂盒回收目的基因(同上),测定抗体基因和载体基因的浓度,4℃放置;

[0139] (7)、酶连反应:

[0140] 用T4连接酶连接,抗体基因和载体基因的摩尔比按7:1的比例混合进行连接反应,反应体系如下所示,连接条件为:16℃连接过夜;

[0141]	酶连反应物	
	5×buffer	4ul
	T4 DNA ligase	2ul
	抗体基因:载体	7:1
	抗体基因+载体	12ul

[0142] 连接产物于4℃保存;

[0143] 酶切、酶连反应示意图如图7B所示,构建FR ScFv的重组表达载体。

[0144] (8)、BL21化转感受态细胞的构建:

[0145] 按照分子克隆CaCl₂法制备BL21化转感受态细胞,具体步骤如下:

[0146] 将冻存的BL21甘油菌平板划线复壮,挑取单克隆于液体培养基中过夜培养,按1:100 转接过夜培养物于新鲜的LB培养基中,37℃培养至对数期;按每管2ml菌液分装,4000rpm冷冻离心5min,弃净上清;每管加入2ml预冷(4℃)的0.1mol/L CaCl₂,轻轻吹打数次重悬菌体沉淀,冰浴放置30min,每5min轻弹一下;3000rpm冷冻离心5min,弃上清;每管加入100ul预冷(4℃)的0.1mol/L CaCl₂,轻轻吹打重悬菌体,4℃暂时保存。

[0147] (9)、转化实验:

[0148] 具体的转化过程为:将制备好的感受态细胞置于冰浴中,在超净工作台中加入连接产物,轻弹混匀,冰浴30min,42℃水浴100s,冰浴2min后加入1ml 37℃预热的SOC培养基,2000rpm 37℃培养1h;取200μL、100μL、10μL涂布含有100μg/mL的固体平板,37℃恒温培养

箱倒置培养过夜直至长出清晰可见的克隆；

[0149] 在进行转化实验时，一定需要设置对照组；空白对照组：将少量感受态细胞分别涂布在一块含有100 μ g/mL氨苄青霉素的固体平板上，和一块没有抗生素的平板上，对感受态细胞进行验证；阳性对照组：转化空质粒，对感受态细胞的转化效率进行验证。

[0150] (10)、菌落PCR和测序验证：

[0151] 从转化后平板上挑取阳性克隆至2ml深孔板中，37 $^{\circ}$ C，220rpm培养过夜；取5 μ L 过夜培养物，12000rpm离心2min，弃上清保留菌体；使用与目的基因扩增时相同的上下游引物，25 μ l反应体系如下所示；

[0152] 菌落PCR反应扩增体系：

	Template	1 μ l (5 μ l 菌液所含菌体)
[0153]	上游引物	0.5 μ l
	下游引物	0.5 μ l

	dNTP	2 μ l
	10 \times Taq Buffer	2.5 μ l
[0154]	Taq DNA Polymerase	0.5 μ l
	ddH ₂ O	18 μ l
	Total	25 μ l

[0155] PCR反应条件：

[0156] 94°C 预变性 5min \Rightarrow 94°C 变性 30s \Rightarrow 57°C 退火 30s \Rightarrow 72°C 延伸 35s } \Rightarrow 共 30 个循环 \Rightarrow 72°C 延伸 10min

[0157] PCR反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳，挑选菌落PCR阳性的克隆送去测序；

[0158] 菌落PCR电泳结果如图7C所示，阳性克隆的分子量均在750bp左右；

[0159] 对测序结果进行分析：首先应与FR ScFv的序列进行比对，比对结果应完全一致；其次应对载体的读码框进行分析，确保插入的抗体序列能够被正确的转录、翻译，防止移码突变；最后检测下游融合的组氨酸标签是否正确；

[0160] 挑取测序正确的克隆即为构建成功的表达单链抗体的工程菌FR ScFv-pET22b-BL21 E.coli。

[0161] 实施例8：

[0162] FR ScFv的诱导表达：

[0163] 将测序正确的克隆接种至含2ml LB液体培养基(含100 μ g/ml氨苄青霉素)中，37 $^{\circ}$ C 220rpm过夜培养；吸取少量过夜培养的菌液进行四区氨苄平板划线，37 $^{\circ}$ C倒置培养直至长出单菌落；

[0164] 挑取单克隆至50ml新鲜的LB液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 220rpm培养过夜；将过夜培养的菌液按1:100接种到500ml新鲜的LB液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 220rpm培养OD₆₀₀至0.5；

[0165] 从摇床中取出培养瓶，置于冰浴中迅速使培养基冷却，将摇床设置到16 $^{\circ}$ C 150rpm，

向每个培养瓶中添加终浓度为200 μ M的IPTG,待摇床温度降到16 $^{\circ}$ C后,16 $^{\circ}$ C 150rpm低温低速诱导蛋白的表达,诱导时间为12个小时;离心收集菌体进行蛋白纯化;

[0166] IPTG诱导工程菌表达FR ScFv,不同诱导时间时工程菌破碎上清电泳结果如图8所示,目标分子量为28.32KDa;泳道Marker为分子量18.4-116KDa的非预染Marker,自诱导第2h起,工程菌开始表达FR ScFv,至第12h表达量达最大值,继续延长诱导时间则出现FR ScFv的表达降解。

[0167] 实施例9:

[0168] FR ScFv的分离纯化:

[0169] 电子天平称重离心后的菌体质量,按照20mL/g的量加入细胞裂解液,搅拌至菌体沉淀全部分散,溶液中没有块状的菌体;搅拌均匀后加入10 μ g/mL的溶菌酶,继续搅拌至溶液变粘稠,加入DNA酶搅匀后静置30min;溶液将不再粘稠,加入100 μ M的PMSF,将溶液放入超声破碎仪,超声破碎30min;

[0170] 4 $^{\circ}$ C 10000g离心20min,弃沉淀收集上清,上清先用0.8 μ m的滤膜抽滤,再用0.22 μ m的滤膜抽滤;向抽滤好的溶液中添加500mM的咪唑溶液使咪唑终浓度为20mM咪唑,调整溶液pH为8.0即为处理好的样品溶液;

[0171] 镍柱亲和纯化:在4 $^{\circ}$ C层析柜中进行有利于保持蛋白的生物学活性;

[0172] 装柱:取2mL镍柱填料,按说明书操作进行装柱;

[0173] 平衡:装好填料后,使用binding buffer平衡亲和柱,流速为1mL/min平衡20个柱体积左右;

[0174] 上样:柱子平衡完之后,添加处理好样品溶液,流速为0.5mL/min,直至样品全部加完;

[0175] 洗涤:流速为1mL/min,待上样完成后先用binding buffer冲洗10个柱体积,再用20mM的咪唑溶液冲洗10个柱体积,最后用50mM的咪唑冲洗20个柱体积,尽量将非特异性结合到镍柱上的杂蛋白去除干净。

[0176] 洗脱:流速为0.5mL/min依次用50、100、200、500mM的咪唑溶液进行特异性洗脱,每个浓度洗脱10个柱体积,每毫升收集一管;

[0177] 每个咪唑浓度洗脱产物取其前三管进行SDS-PAGE电泳;电泳结果如图9所示,图9A泳道Marker为分子量18.4-116KDa的非预染Marker,泳道1为镍柱上样前工程菌破碎上清,泳道2为破碎上清镍柱流穿液,泳道3-7为50mM咪唑的洗脱产物,泳道8-12为100mM咪唑的洗脱产物;图9B的泳道Marker同9A,泳道1-12均为500mM咪唑的洗脱产物;从图中可以看出,破碎上清镍柱流穿液相较镍柱上样前有明显的目的条带,说明FR ScFv与镍柱的亲和能力强;随着咪唑浓度的增加,泳道呈现为杂蛋白越来越少,目的蛋白越来越纯的趋势;

[0178] 选取纯度高没有杂蛋白的洗脱管,进行透析处理,去除溶液中高浓度的咪唑;每次透析一倍降低咪唑浓度,一直到20mM的咪唑浓度,再更换为无咪唑的PBS溶液;每次的透析时间为2-4h,透析应在4 $^{\circ}$ C层析柜中进行;待透析完成后,用10KDa的超滤管进行超滤浓缩蛋白,测定蛋白浓度,分装后保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中。

[0179] 实施例10:

[0180] FR ScFv纯化产物的SDS-PAGE及Western Blot:

[0181] (1)、SDS-PAGE:

- [0182] 制胶:按照分子克隆所述方法,完成PAGE胶的上、下层胶的制备;
- [0183] 蛋白样品的处理:40 μ L蛋白样品与10 μ L 5 \times Loading buffer混合,置于浮漂上煮沸 5-10min,瞬时离心将液体旋至离心管底部;
- [0184] 上样:将处理好的蛋白样品加入到PAGE胶中的上样孔中;
- [0185] 电泳:上样完成后,接通电路进行电泳,开始时设置为80V恒压,待溴酚蓝跑至分离胶部分后将电压调制120V进行电泳,等溴酚蓝跑至PAGE胶下边缘后,停止电泳;
- [0186] 染色:将跑的PAGE胶从玻璃板上剥下,置于瞬蓝染色液中10min左右,即可观察蛋白条带;
- [0187] (2)、Western Blot:
- [0188] 首先进行SDS-PAGE电泳,直至染色前一步;
- [0189] 切胶:切下目的条带所在的PAGE胶,裁好PVDF膜和滤纸;
- [0190] 转膜:PVDF膜放入甲醇中活化30s,按照滤纸、胶、膜、滤纸的顺序放置好避免面之间有气泡产生,放入转膜装置中,切记PAGE胶靠近转膜槽负极,PVDF膜在靠近正极的一侧;向膜槽中加入转膜缓冲液,接通电源开始转膜,60V恒压转膜2h,由于在转膜过程中有大量的热产生,因此将转膜槽放置在碎冰上进行,防止仪器温度过高;
- [0191] 封闭:转膜完成后取出PVDF膜,置于PBST溶液中漂洗一次后,移入到5%脱脂牛奶-PBS溶液中,4 $^{\circ}$ C封闭过夜;
- [0192] 孵育一抗:1:10000用5%脱脂牛奶-PBS稀释His一抗,PVDF膜在一抗溶液中孵育2h;
- [0193] 漂洗:PVDF膜用PBST洗涤三次,每次5min;PBS洗3遍,每次5min;
- [0194] 孵育二抗:1:10000用5%脱脂牛奶-PBS稀释HRP标记的二抗,PVDF膜在二抗溶液中孵育1h;
- [0195] 漂洗:PBST洗涤三次,每次5min;PBS洗3遍,每次5min;
- [0196] 曝光:打开曝光仪,待CCD温度降到-30 $^{\circ}$ C后,配置ECL底物显色液,使用滤纸轻轻吸干膜表面的溶液,将ECL底物显色液均匀滴加到膜表面,置于曝光仪中拍照;
- [0197] 超滤浓缩后的FR ScFv电泳结果如图10A所示,泳道Marker为分子量18.4-116KDa的非预染Marker,目的蛋白分子量符合预期;目的蛋白的验证结果如图10B所示,符合预期。
- [0198] 实施例11:
- [0199] FR ScFv与叶酸受体 α 亲和力的测定:
- [0200] (1)、叶酸受体 α 的生物素化:
- [0201] 从冰箱中取出带有活化基团生物素和单链抗体与叶酸受体 α ,将生物素用DMSO配置成10mM的高浓度储存液;按照蛋白浓度加入足量的生物素,一般生物素和蛋白的摩尔比为20:1,混匀后室温静置30min或冰上静置2h,完成蛋白标记;
- [0202] (2)、标记蛋白的纯化:
- [0203] 将完成标记的混合物加入到葡聚糖脱盐柱中,按照脱盐柱的说明书操作,除去溶液中多余的生物素分子,得到只含有生物素化的叶酸受体 α 的蛋白溶液;
- [0204] (3)、亲和力的测定:
- [0205] 测定叶酸受体 α 与FR ScFv的亲和力是使用ForteBio Octet系统,利用生物膜干涉(BLI)原理进行亲和力的测定;具体操作过程如下:

[0206] 生物传感器的选择:叶酸受体 α 经生物素标记的能够特异性的结合到链霉亲和素的生物传感器上面;因此选择链霉亲和素的生物传感器;

[0207] ForteBio Octet生物分子相互作用仪进行如下过程:

[0208] 平衡:将传感器在平衡buffer中,平衡作用120s;

[0209] 抗原的固定:传感器插入到10ug/mL的叶酸受体 α 溶液中作用300s;

[0210] 封闭:将传感器插入封闭buffer中,作用120s封闭非特异性的位点;

[0211] 结合:将传感器插入梯度稀释的抗体溶液中,作用600s;

[0212] 解离:将传感器插入解离buffer中,作用300s;

[0213] 保存实验数据,关闭ForteBio Octet检测系统,利用Octet软件对数据进行处理分析,计算叶酸受体 α 与FR ScFv的亲和力。

[0214] 表3为所测的FR ScFv与叶酸受体 α 结合的亲和力参数, K_D 值为 4.13×10^{-8} , K_{on} 值为 3.9×10^{-4} , K_{dis} 值为 1.27×10^{-3} ;图11所示是FR ScFv与叶酸受体 α 的结合解离曲线。

[0215] 表3:

参数	K_{on} (1/MS)	K_{dis} (1/s)	K_D (M)
数值	3.09×10^4	1.27×10^{-3}	4.13×10^{-8}

[0217] 实施例12:

[0218] 流式细胞术检测FR ScFv与天然表达叶酸受体 α 的细胞结合:

[0219] 细胞培养条件:实验室通过流式检测已经确认SKOV3(人卵巢癌细胞)表面有叶酸受体 α 表达,用McCoy's 5A培养基+10%FBS,在37°C、饱和湿度、5%CO₂的无菌培养箱中培养;

[0220] 细胞复苏:打开水浴锅设置温度37°C,待温度达到后,从液氮罐中取出冻存SKOV3细胞,迅速放入水浴锅中融化,冻存管300g离心2min,弃上清,细胞沉淀用新鲜的培养基重悬后加入到细胞培养瓶或培养皿中,补足新鲜的培养基,细胞培养箱中培养;

[0221] 细胞传代:当细胞汇合度达到80%以上后需进行细胞传代操作;从培养箱中,拿出细胞培养瓶,弃上清,PBS荡洗一次,加入1-2mL胰酶消化2-5min,在显微镜下观察,细胞间相互分开有少量细胞飘起,则加入2mL新鲜培养基终止胰酶的消化,轻轻吹打将细胞从瓶壁上吹下形成单细胞悬液,300g离心收集细胞;新鲜培养基重悬细胞均分到2-4个新的细胞瓶中,补足培养基后细胞培养箱中培养;

[0222] 细胞收获:刚复苏的细胞,一般要经过两次传代后待细胞状态稳定后可进行各种细胞实验;细胞传代后待细胞汇合度达到70%以上,胰酶消化收集细胞,PBS洗涤两次后,收集细胞沉淀,进行流式检测实验;

[0223] 细胞固定:细胞沉淀用0.5-1mL 4%的多聚甲醛重悬,室温固定15min,PBS洗涤两次,离心收集细胞重悬于PBS中;

[0224] 细胞计数:使用血球计数板进行细胞计数,调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL,50 μ L/管分装;

[0225] 孵育FR ScFv:向每管细胞中加入50 μ L稀释好的FR ScFv,4°C孵育1h,每过20min可轻弹混匀细胞;

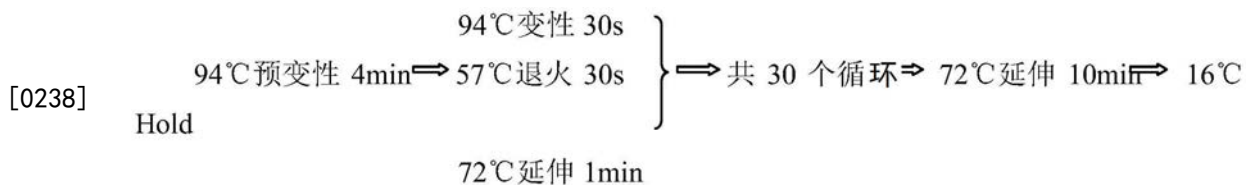
[0226] 漂洗:500g离心5min收集细胞,PBS洗涤2次;

[0227] 孵育二抗:加入100 μ L稀释好的兔抗His的二抗,4°C孵育30min;

- [0228] 漂洗:离心收集细胞,PBS洗涤2次;
- [0229] 孵育荧光抗体:加入100μL稀释的荧光标记AF647-羊抗兔IgG的抗体,4℃孵育30min;
- [0230] 检测:离心收集细胞,重悬于300μL PBS中。上机检测,Flowjo分析实验数据;
- [0231] 流式检测结果如图12所示,SKOV3表面有叶酸受体α表达,实验结果表明,FR ScFv能够很好的结合到表达SKOV3细胞表面。
- [0232] 实施例13:
- [0233] PEGFPN1-FRα真核表达载体的构建与细胞瞬时转染:
- [0234] 设计引物,通过PCR的方法将FRα基因插入到真核表达载体pEGFPN1,使得FRα和GFP融合表达在一起;上游引物为GFP-α-F:5' CCGCTCGAGATGGCTCAGCGGATGAC 3' (Xho I),下游引物为:GFP-α-B:5' CCGGAATTCGGCTGAGCAGCCACAGC 3' (EcoR I),以FRα基因为模板进行PCR,PCR反应体系和反应条件如下:

	PCR 反应扩增体系	
	模板 DNA	0.5ul
	上游引物	1ul
[0235]	下游引物	1ul
	dNTP	4ul
	10× buffer	5ul
	Taq DNA 聚合酶	1ul
[0236]	加 ddH ₂ O 至总体积	50ul

[0237] PCR反应条件:



- [0239] PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果如图13A,目的片段750bp左右;
- [0240] 目的片段经过胶回收、双酶切、胶回收、T4连接酶连接构建真核表达载体;重组载体构建的示意图如图13B所示,
- [0241] CaCl₂法制备JM109感受态细胞,将重组载体转入JM109感受态细胞中,涂布卡那抗性的固体平板;挑取单克隆进行菌落PCR,PCR产物经琼脂糖电泳鉴定,如图13C所示,不同克隆的菌落PCR结果表现一致;对阳性克隆进行测序分析,选取测序正确的克隆扩大培养,抽提质粒即为构建好的pEGFPN1-FRα真核表达载体;
- [0242] DMEM-F12培养的CHO-S细胞,等到细胞汇合度达到70%左右时进行细胞转染实验;
- [0243] 换液:过夜培养的细胞,弃掉旧的培养基上清,PBS荡洗2次,换用新鲜的完全培养基与培养箱中孵育1h左右;
- [0244] 转染复合物的制备,根据培养皿的大小计算所需质粒的量和SuperFectin转染试

剂的量,质粒:SuperFectin=1:3(质量比),分别用1/10体积的无血清培养基稀释DNA和SuperFectin,0.22 μ M的滤膜过滤除菌,室温平衡5min,将稀释好的转染试剂加入到DNA中,涡旋混匀后室温静置20min即为制备好的转染复合物;

[0245] 转染:将制备好的转染复合物均匀滴加到细胞培养皿中,轻轻摇匀后于细胞培养箱中培养4-8h后进行换液,换用完全培养基即完成细胞转染;一般转染后72h检测目的蛋白的表达。

[0246] 实施例14:

[0247] 细胞免疫荧光检测FR ScFv结合特异性:

[0248] CHO细胞表面不表达FR α ,我们通过瞬时转染含有FR α 基因的真核表达载体pEGFPN1-FR α ,使CHO细胞能够表达FR α 蛋白;真核表达载体pEGFPN1表达的GFP呈绿色荧光,由于FR α 与GFP融合表达,可通过GFP检测FR α 的表达;通过细胞免疫荧光实验检测FR ScFv能够结合到表达GFP的CHO细胞表面,不表达GFP的细胞不能够结合FR ScFv。

[0249] 细胞培养:待含有pEGFPN1-FR α 质粒的细胞汇合度至50%左右进行细胞免疫荧光;

[0250] 固定:取出细胞培养皿,弃掉培养基上清,用37 $^{\circ}$ C预热的4%的多聚甲醛室温固定15min,用PBS洗三次,每次5min;

[0251] 加入封闭缓冲液室温封闭1h后,弃掉封闭缓冲液,加入稀释好的叶酸受体 α 单链抗体,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;

[0252] PBS洗涤3次后加入稀释好的兔抗His的二抗,室温孵育1h;

[0253] PBS洗涤3次后加入稀释好的PE标记羊抗兔IgG的抗体室温避光孵育1h;

[0254] PBS洗涤3次后,加入防荧光淬灭试剂,荧光显微镜观察;

[0255] 实验结果如图14所示,FR ScFv特异性结合在表达FR α 的CHO细胞表面,不表达FR α 的CHO细胞表面没有FR ScFv结合,说明FR ScFv能够与FR α 特异性结合。

[0256] 本发明的序列表如下:

[0257] SEQ ID NO.1:

[0258] CAGGCGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCC TGAGACTCTCCTGTG
CAGCCTCTGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCTATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG
TCTCAGCTATTAGTGGTAGTG GTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGGAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGA
CAATTCGAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC GGCCGTGTATTACTGTGCAAG
AAGGGCGGTTGGTTCGGGGTGGCGGTTTTGGGGC CAAGGTACAATGGTCACCGTCTCTCAGGTGGAGGCGGTTT
TGGCGGAGGTGGCT CAGGCGGTGGAGGCTCGGATATTGTGTGACTCAGTCTCCCTCAGCGTCTGGGAC CCCC
GGCAGAGGGTCACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAACATCGGAAGT AATTATGTATACTGGTACCAGCAGC
TCCCAGGAACGGCTCCCAAACCTCATCT ATAGGAATAATCAGCGGCCCTCAGGGGTTTCTGACCGATTCTCTG
GCTCCAAGTC TGGCACCTCAGCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGAT TATTACTGT
GCAGCATGGGATGACAGCCTGTGGCGCGGGTATTCGGCGGAGGGA CCAAAGTGATATCAAACGT.

[0259] SEQ ID NO.2:

[0260] Q A Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S
W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V E G R F T I S R D N
S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R A V G R G W R F W G Q G T M
V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I V L T Q S P S A S G T P G Q R V T

I S C S G S S S N I G S N Y V Y W Y Q Q L P G T A P K L L I Y R N N Q R P S G
V S D R F S G S K S G T S A S L A I S G L R S E D E A D Y Y C A A W D D S L S
A R V F G G G T K V D I K R.

- [0261] SEQ ID NO.3 (CDR1-VH) :GFTFSSYA,
- [0262] SEQ ID NO.4 (CDR1-VL) :SSNIGSNY,
- [0263] SEQ ID NO.5 (CDR2-VH) :ISGSGGST,
- [0264] SEQ ID NO.6 (CDR2-VL) :RNN,
- [0265] SEQ ID NO.7 (CDR3-VH) :ARRAVGRGWRF,
- [0266] SEQ ID NO.8 (CDR3-VL) :AAWDDSLSARV。

序列表

<110> 中国药科大学

<120> 一种靶向叶酸受体 α 的单链抗体及其应用

<160> 8

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 732

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

Cys Ala Gly Gly Cys Gly Cys Ala Gly Cys Thr Gly Thr Thr Gly Gly
1           5           10           15
Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Thr
           20           25           30
Gly Gly Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
           35           40           45
Thr Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr
           50           55           60
Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Gly Gly Ala Thr Thr
65           70           75           80
Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr
           85           90           95
Gly Cys Thr Ala Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys
           100          105          110
Gly Cys Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala Ala
           115          120          125
Gly Gly Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Gly Thr Cys
           130          135          140
Thr Cys Ala Gly Cys Thr Ala Thr Thr Ala Gly Thr Gly Gly Thr Ala
145          150          155          160
Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Ala Gly Cys Ala Cys Ala Thr Ala
           165          170          175
Cys Thr Ala Cys Gly Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Gly Thr Gly
           180          185          190
Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys Gly Gly Thr Thr Cys Ala Cys Cys Ala
           195          200          205
Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Ala Thr Thr Cys
210          215          220

```

Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Ala Cys Gly Cys Thr Gly Thr Ala Thr
 225 230 235 240
 Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Ala Gly Cys Cys
 245 250 255
 Thr Gly Ala Gly Ala Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Cys Ala Cys
 260 265 270
 Gly Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr
 275 280 285
 Gly Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr Gly
 290 295 300
 Gly Thr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr
 305 310 315 320
 Thr Thr Gly Gly Gly Gly Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Ala Cys Ala
 325 330 335
 Ala Thr Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Thr Thr
 340 345 350
 Cys Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Gly Gly Thr Thr Cys
 355 360 365
 Thr Gly Gly Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Cys Thr Cys Ala
 370 375 380
 Gly Gly Cys Gly Gly Thr Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Cys Gly Gly
 385 390 395 400
 Ala Thr Ala Thr Thr Gly Thr Gly Cys Thr Gly Ala Cys Thr Cys Ala
 405 410 415
 Gly Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Cys Thr
 420 425 430
 Gly Gly Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Gly Gly Gly Cys Ala Gly Ala
 435 440 445
 Gly Gly Gly Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Thr Thr Gly
 450 455 460
 Thr Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys
 465 470 475 480
 Ala Ala Cys Ala Thr Cys Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ala Ala Thr Thr
 485 490 495
 Ala Thr Gly Thr Ala Thr Ala Cys Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala
 500 505 510
 Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Ala Cys Gly
 515 520 525
 Gly Cys Thr Cys Cys Cys Ala Ala Ala Cys Thr Cys Cys Thr Cys Ala

530	535	540														
Thr Cys Thr Ala Thr Ala Gly Gly Ala Ala Thr Ala Ala Thr Cys Ala																
545	550	555	560													
Gly Cys Gly Gly Cys Cys Cys Thr Cys Ala Gly Gly Gly Gly Thr Thr																
	565	570	575													
Thr Cys Thr Gly Ala Cys Cys Gly Ala Thr Thr Cys Thr Cys Thr Gly																
	580	585	590													
Gly Cys Thr Cys Cys Ala Ala Gly Thr Cys Thr Gly Gly Cys Ala Cys																
	595	600	605													
Cys Thr Cys Ala Gly Cys Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys																
610	615	620														
Ala Thr Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Cys Thr Cys Cys Gly Gly Thr																
625	630	635	640													
Cys Cys Gly Ala Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Ala																
	645	650	655													
Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys Ala																
	660	665	670													
Thr Gly Gly Gly Ala Thr Gly Ala Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Thr																
	675	680	685													
Cys Gly Gly Cys Gly Cys Gly Gly Gly Thr Ala Thr Thr Cys Gly Gly																
690	695	700														
Cys Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Ala Gly Thr Gly																
705	710	715	720													
Gly Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala Ala Cys Gly Thr																
	725	730														

<210> 2

<211> 244

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Gln Ala Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly																
1	5	10	15													
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr																
	20	25	30													
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val																
	35	40	45													
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val																
	50	55	60													
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr																

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser	Leu Arg Ala Glu Asp Thr	Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85	90	95
Ala Arg Arg Ala Val Gly Arg Gly Trp Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
	115	120	125
Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser			
	130	135	140
Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser			
145	150	155	160
Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr			
	165	170	175
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val			
	180	185	190
Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala			
	195	200	205
Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala			
	210	215	220
Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ala Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val			
225	230	235	240
Asp Ile Lys Arg			
<210> 3			
<211> 8			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<400> 3			
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala			
1	5		
<210> 4			
<211> 8			
<212> PRT			
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)			
<400> 4			
Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr			
1	5		
<210> 5			
<211> 8			
<212> PRT			

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

1 5

<210> 6

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

Arg Asn Asn

1

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

Ala Arg Arg Ala Val Gly Arg Gly Trp Arg Phe

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Ala Arg Val

1 5 10

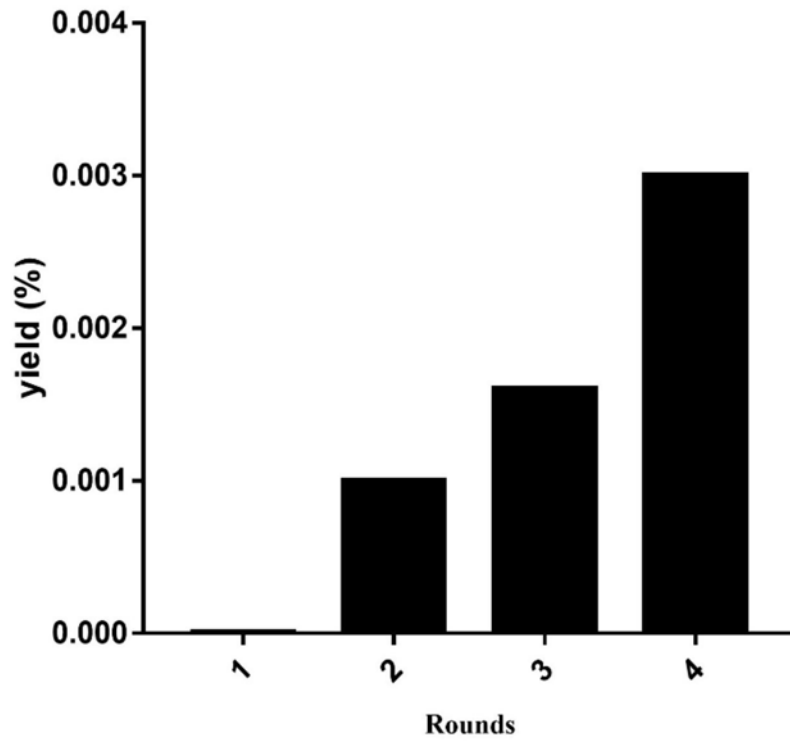


图1

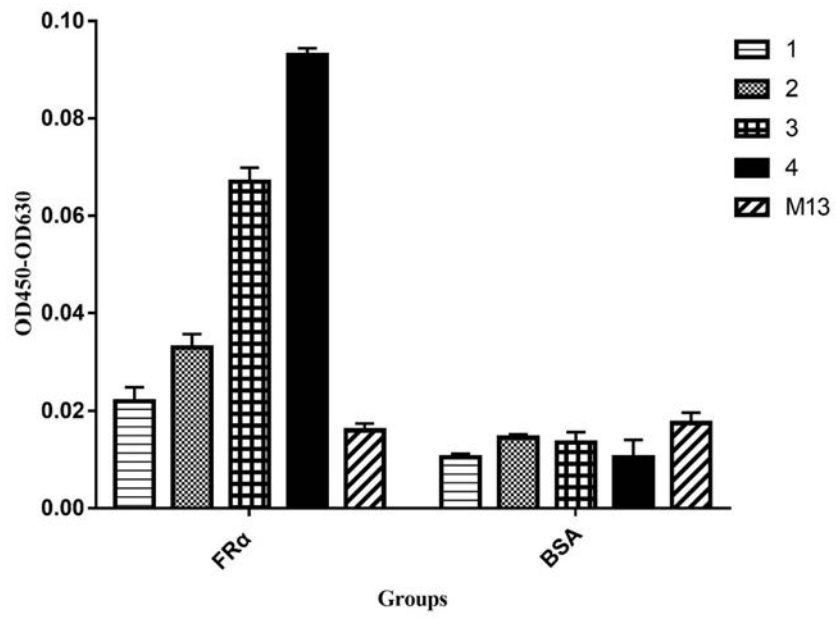


图2

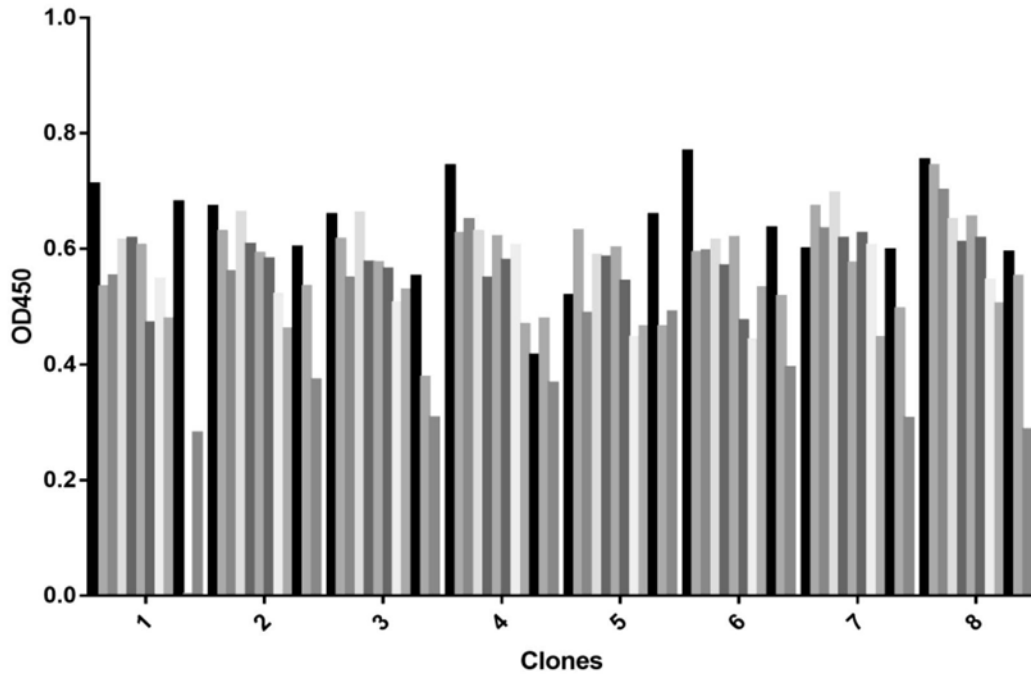


图3

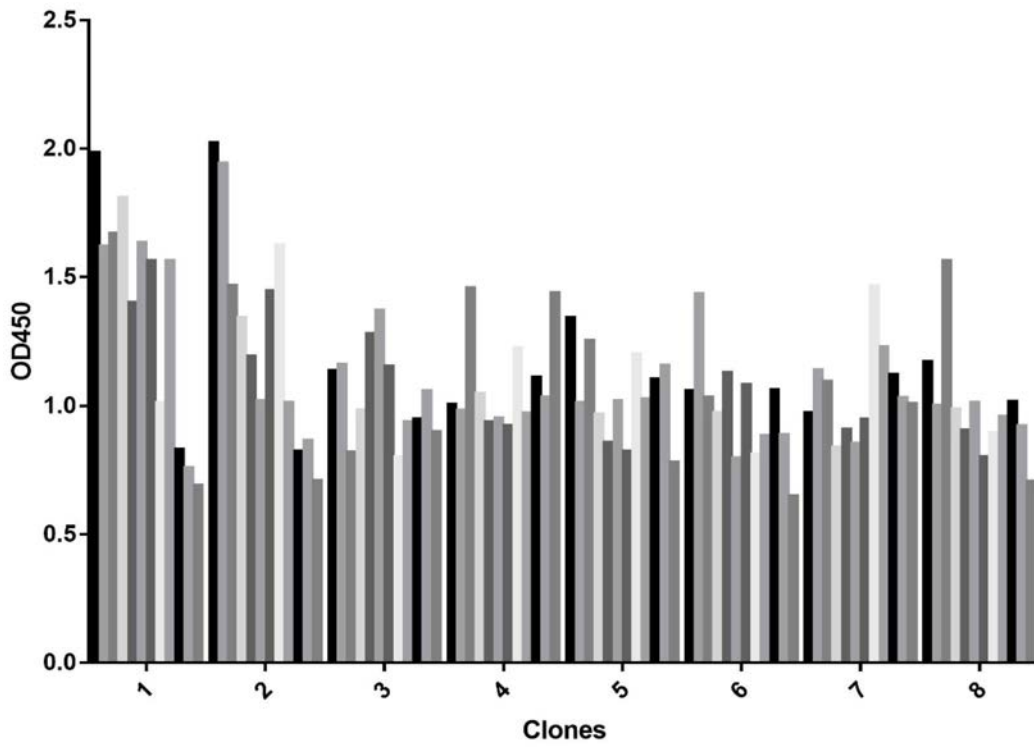


图4

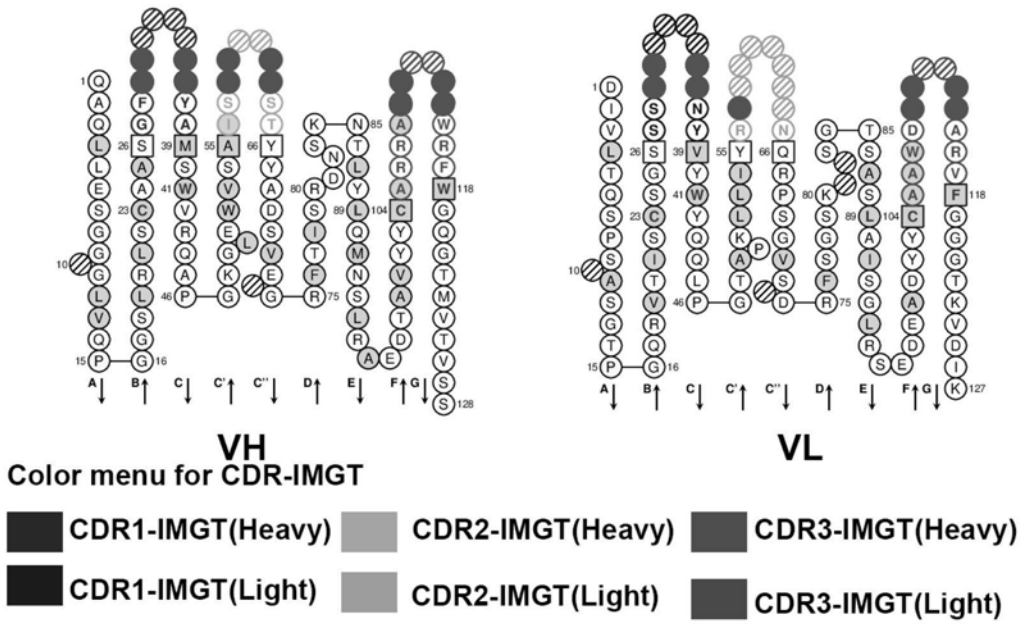


图5

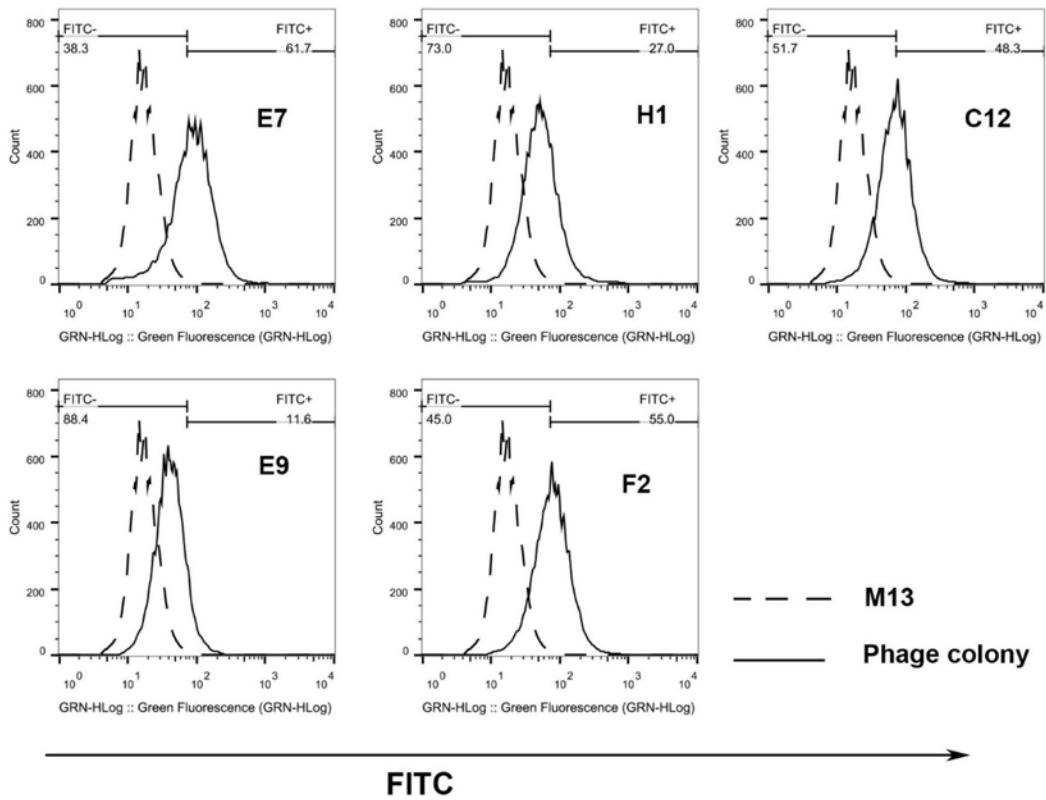


图6

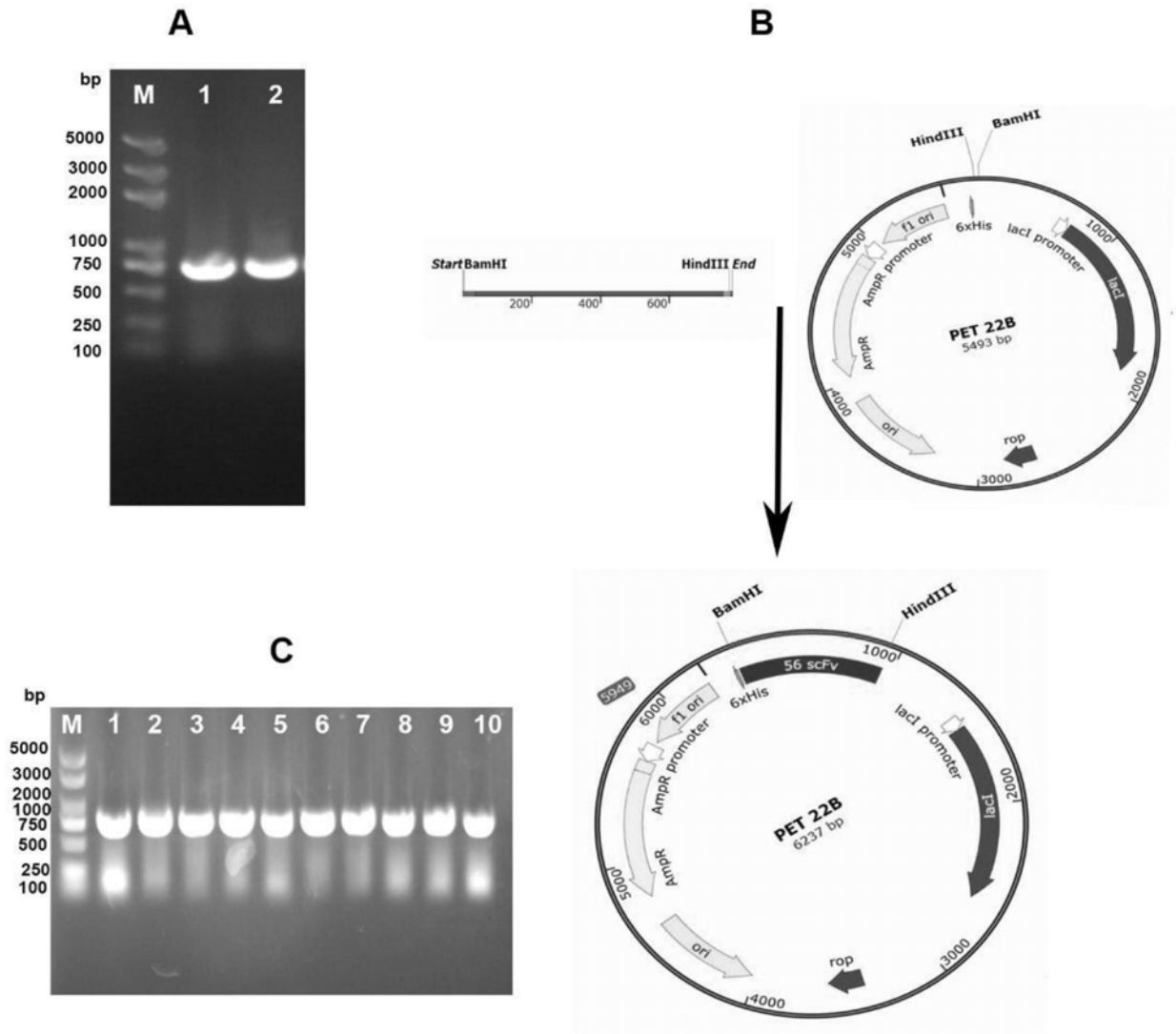


图7

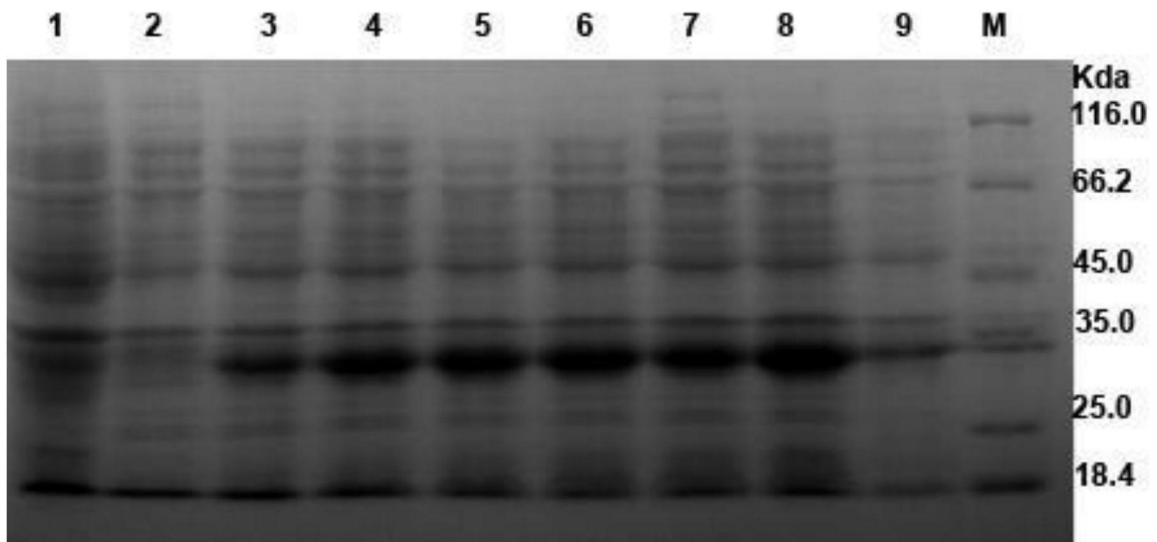


图8

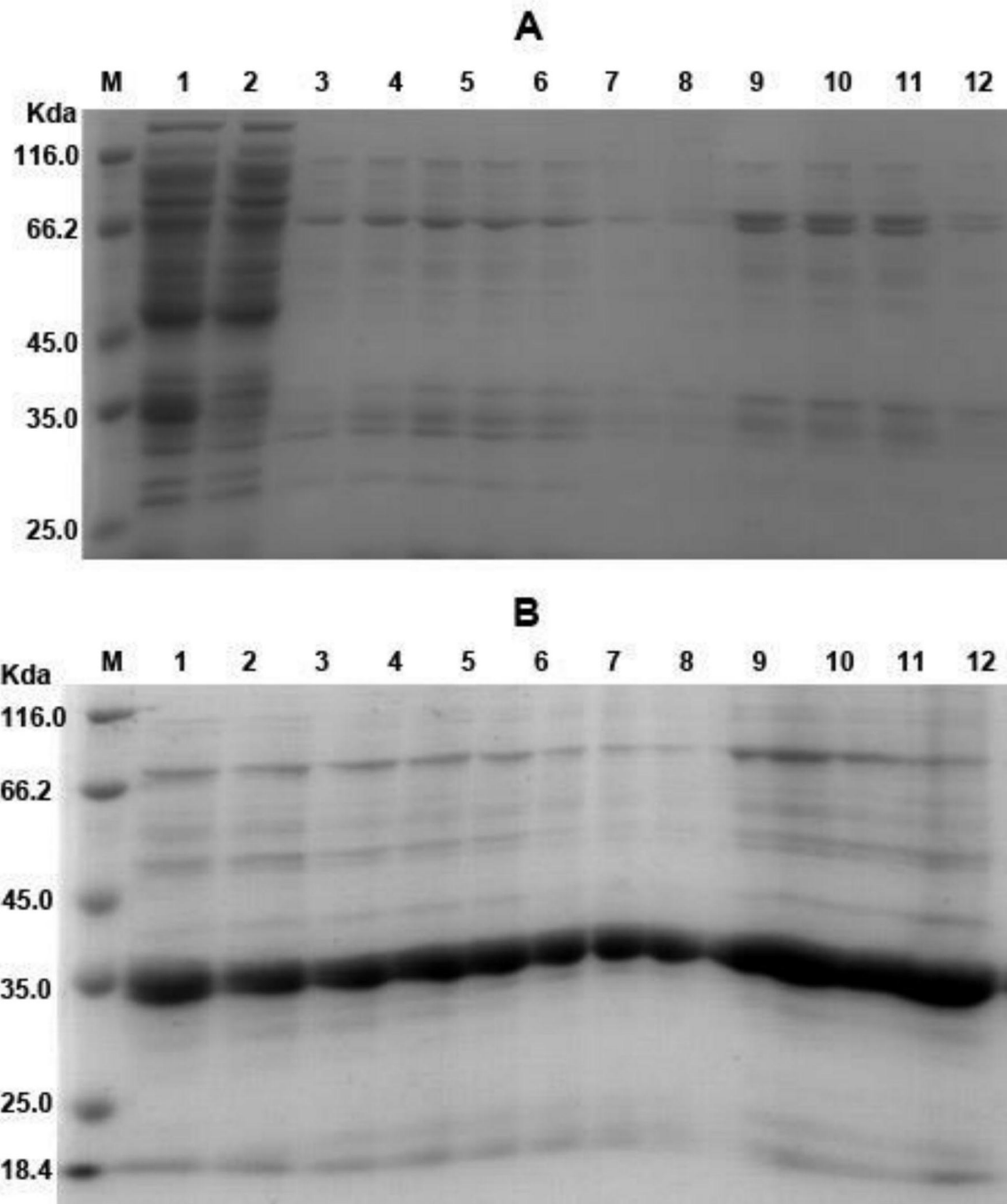


图9

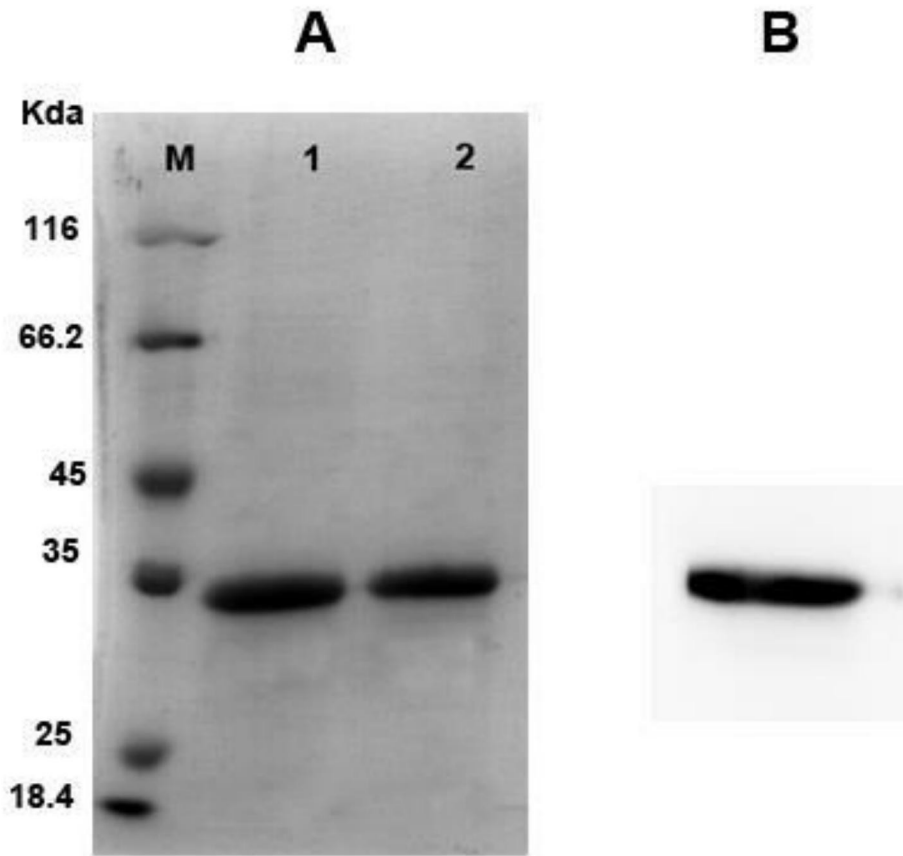


图10

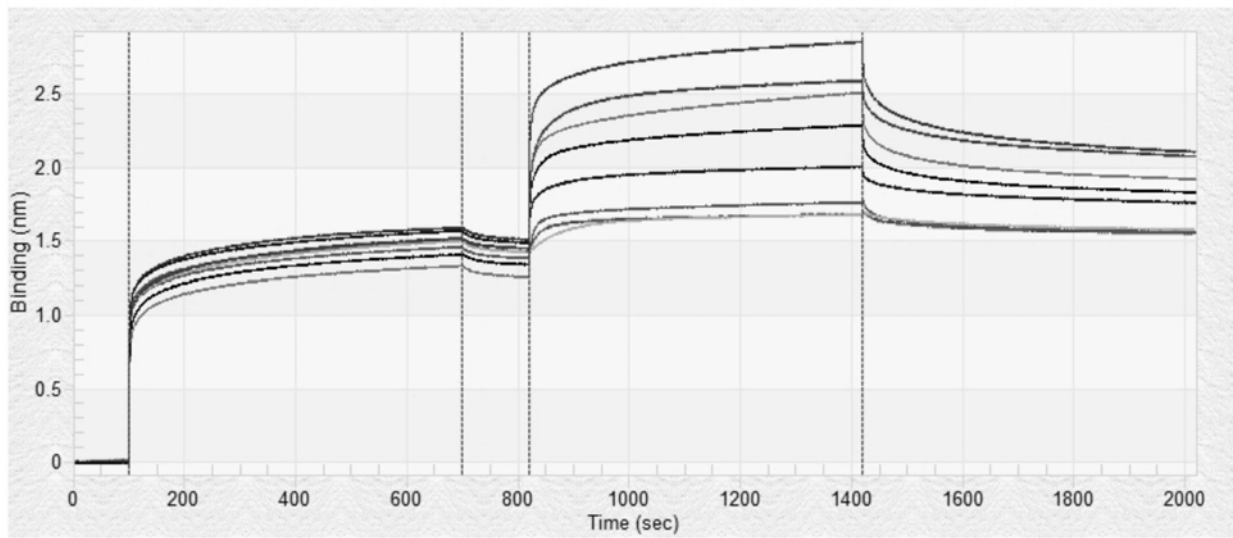


图11

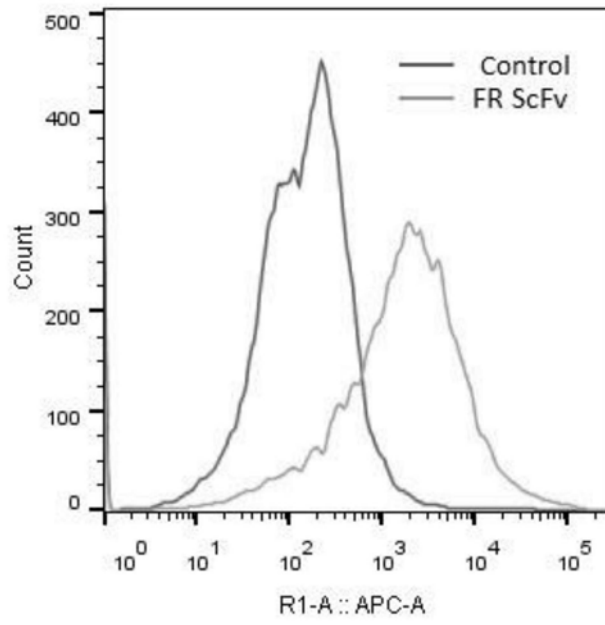


图12

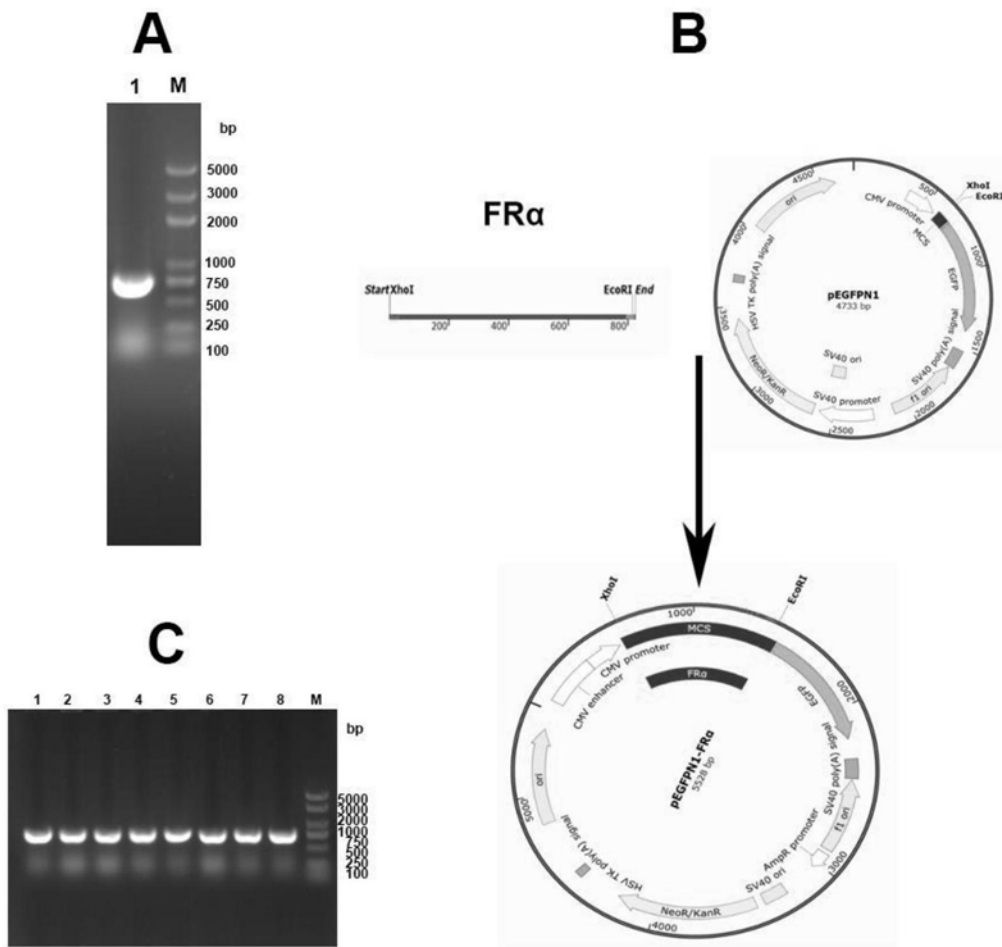


图13

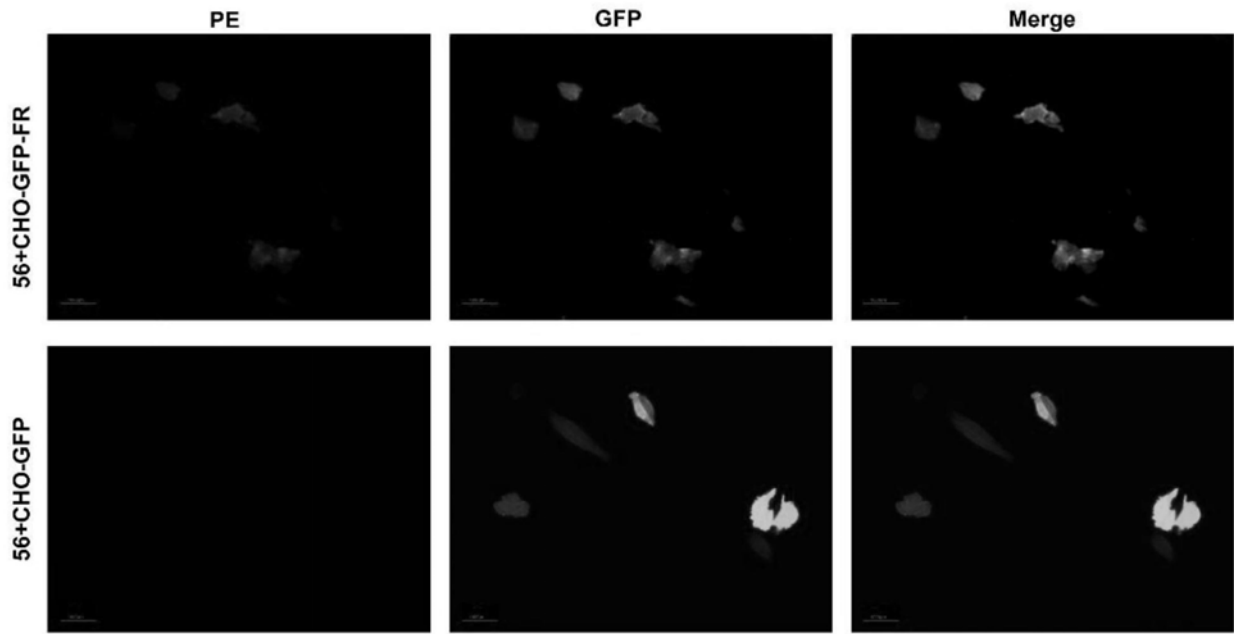


图14