



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113717279 B

(45) 授权公告日 2022.03.15

(21) 申请号 202110858661.8

(22) 申请日 2021.07.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113717279 A

(43) 申请公布日 2021.11.30

(73) 专利权人 武汉爱博泰克生物科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开

发区高新二路388号武汉光谷国际生

物医药企业加速器1.1期7栋4层01室

(自贸区武汉片区)

(72) 发明人 陈亮 张云 程瑶 李博 吴知才

(74) 专利代理机构 武汉蓝宝石专利代理事务所

(特殊普通合伙) 42242

代理人 朱才永

(51) Int.Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

审查员 李颖

权利要求书1页 说明书5页

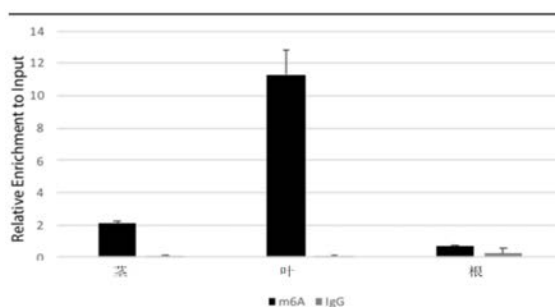
序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法

(57) 摘要

本发明提供了m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法,其重链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.1所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.2所示,重链CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.3所示;其轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.4所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.5所示,CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.6所示。本发明提供的m⁶A重组兔单克隆抗体对m⁶A修饰的RNA有很好的富集能力,且在DNA损伤修复活体细胞模型中,检测m⁶A修饰的RNA有很好的灵敏度。



1. m^6A 重组兔单克隆抗体,其特征在于,
其重链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.1所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.2所示,重链CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.3所示;
其轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.4所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.5所示,CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.6所示。
2. 根据权利要求1所述的 m^6A 重组兔单克隆抗体,其特征在于,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ.NO.7所示,其轻链可变区的氨基酸序列如SEQ.NO.8所示。
3. 根据权利要求1所述的 m^6A 重组兔单克隆抗体,其特征在于,所述兔单克隆抗体的重链恒定区亚型为IgG型,所述轻链恒定区的亚型为 κ 型。
4. 编码权利要求1~3任一项所述的 m^6A 重组兔单克隆抗体的核酸。
5. 根据权利要求4所述的核酸,其特征在于,编码重链可变区的核酸其序列如SEQ.NO.9所示或是与之互补的序列,编码轻链可变区的核酸其序列如SEQ.NO.10所示或是与之互补的序列。
6. 一种表达载体,其特征在于,包括编码权利要求1~3任一项所述的 m^6A 重组单克隆抗体的核酸。
7. 转化或转染权利要求6所述的表达载体的宿主细胞。
8. 权利要求1~3任一项所述的 m^6A 重组兔单克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括:制备权利要求6所述的表达载体、培养权利要求7所述的宿主细胞及 m^6A 重组兔单克隆抗体的表达。
9. 根据权利要求8所述的 m^6A 重组兔单克隆抗体的制备方法,其特征在于,所述表达载体的制备方法包括:将 m^6A 分子与载体蛋白进行偶联,制备免疫原蛋白;然后将所述免疫原蛋白注入兔的体内中进行免疫,获得免疫增强的兔的B细胞,经过培养筛选后,从阳性克隆B细胞中提取所述 m^6A 重组兔单克隆抗体的RNA,再依次经过反转录及扩增,得到编码重链氨基酸的核酸与编码轻链氨基酸的核酸,将编码重链的核酸与编码轻链的核酸连接至载体质粒中后,得到所述表达载体。
10. 权利要求1所述的 m^6A 重组兔单克隆抗体在制备检测RNA m^6A 甲基化修饰的产品中的应用或在制备检测DNA紫外线损伤的产品中的应用。

m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学领域,具体涉及m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法。

背景技术

[0002] N⁶-甲基腺嘌呤(m⁶A)是目前发现的真核生物mRNA上含量最多的化学修饰,同时也广泛存在于多种细菌和RNA病毒中。在动物或植物体内,m⁶A可以被一系列甲基转移酶、去甲基酶和结合蛋白进行修饰、去修饰和识别。m⁶A可以通过影响RNA加工代谢从而调控多种生物学功能。相关研究还发现,RNA m⁶A修饰在UV诱导的DNA损伤反应中的重要作用,RNA的m⁶A修饰主要是指导细胞快速准确的将Pol κ 募集到损伤位点并且加速DNA的损伤修复从而促使细胞存活。因此,有关RNA的m⁶A修饰对于相关疾病机理研究、筛查以及药物研发等领域具有重要的参考因素。

[0003] 目前的检测RNA的m⁶A修饰所采用的方法为m⁶A高通量检测技术与基于抗体特异性检测的技术。两者的共同点在于,为避免细胞中大量rRNA与tRNA的干扰,必须将m⁶A修饰的RNA富集出来。而采取特异性抗体富集便是常用的方法,但是,目前所用的m⁶A抗体依旧存在灵敏度不强的缺陷,难以进行IF实验;同时,在大量干扰RNA的存在下将m⁶A修饰的RNA进行富集非常困难。

发明内容

[0004] 为解决上述技术问题,本发明提供了m⁶A重组兔单克隆抗体及制备方法。

[0005] 具体技术方案如下:

[0006] m⁶A重组兔单克隆抗体,其不同之处在于,

[0007] 其重链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.1所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.2所示,重链CDR3的氨基酸序列如SEQ.NO.3所示;

[0008] 其轻链CDR1的氨基酸序列如SEQ.NO.4所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.5所示,CDR2的氨基酸序列如SEQ.NO.6所示。

[0009] 进一步,其重链可变区的氨基酸序列如SEQ.NO.7所示,其轻链可变区的氨基酸序列如SEQ.NO.8所示。

[0010] 进一步,重链氨基酸序列如SEQ.NO.17所示,轻链氨基酸序列如SEQ.NO.18所示。

[0011] 进一步,所述兔单克隆抗体的重链恒定区亚型为IgG型,所述轻链恒定区的亚型为 κ 型。

[0012] 编码上述m⁶A重组兔单克隆抗体的核酸。

[0013] 进一步,编码重链可变区的核酸其序列如SEQ.NO.9所示或是与之互补的序列,编码轻链可变区的核酸其序列如SEQ.NO.10所示或是与之互补的序列。

[0014] 进一步,编码重链的核酸其序列如SEQ.NO.11所示或是与之互补的序列,编码轻链的核酸其序列如SEQ.NO.12所示或是与之互补的序列。

[0015] 一种表达载体,其不同不处在于,包括编码权利上述m⁶A重组单克隆抗体的核酸。

[0016] 转化或转染上述表达载体的宿主细胞。

[0017] 上述 m^6A 重组兔单克隆抗体的制备方法,其不同之处在于,包括:制备上述表达载体、培养上述宿主细胞及 m^6A 兔单克隆抗体的重组表达。

[0018] 上述 m^6A 重组兔单克隆抗体的制备方法,其不同之处在于,所述表达载体的制备方法包括:将 m^6A 分子与载体蛋白进行偶联,制备免疫原蛋白;然后将所述免疫原蛋白注入兔的体内中进行免疫,获得免疫增强的兔的B细胞,经过培养筛选后,从阳性克隆B细胞中提取所述 m^6A 重组兔单克隆抗体的RNA,再依次经过反转录及扩增,得到编码重链氨基酸的核酸与编码轻链氨基酸的核酸,将编码重链的核酸与编码轻链的核酸连接至载体质粒中后,得到所述表达载体。

[0019] 进一步,扩增编码重链的核酸的引物对如SEQ.NO.13~SEQ.NO.14所示,扩增编码轻链的核酸的引物对为如SEQ.NO.15~SEQ.NO.16所示。

[0020] 在制备检测RNA m^6A 甲基化修饰的产品中的应用或在制备检测DNA紫外线损伤的产品中的应用。

[0021] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0022] (1)本发明提供的 m^6A 重组兔单克隆抗体对 m^6A 修饰的RNA有很好的富集能力,且对于检测DNA紫外损伤有很好的灵敏度。

[0023] (2)本发明提供的 m^6A 重组兔单克隆抗体的制备方法,先制备出表达载体,在进行转染或转化获得宿主细胞,最后再经过重组表达得到抗体,相较于传统的先获得杂交瘤细胞,再进行腹水制备得到抗体,本方法采用重组表达载体制备抗体,优势在于不需要牺牲大量的动物,重组抗体表达载体保存稳定性更高,且很容易放大生产,制备出大量抗体。

[0024] (3)采用兔作为免疫动物,由于兔的脾脏大,基因多样性高,在小分子的抗原呈递上有独特优势,为后续进行阳性克隆筛选时,更容易筛选出更优的阳性克隆;采用单个B细胞培养后再筛选,提高了筛选效率,且成本更低,操作更加简便。

附图说明

[0025] 图1为实施例2的ELISA检测结果;

[0026] 图2为实施例2的DB实验结果;

[0027] 图3为实施例4抗体富集实验的q-PCR检测结果;

[0028] 图4为实施例5抗体对紫外损伤DNA细胞样本中的IF检测结果;

[0029] 图5为对比例1抗体对紫外损伤DNA细胞样本中的IF检测结果。

具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施例对本发明作进一步的详细说明,以使本领域的技术人员更加清楚地理解本发明。

[0031] 以下各实施例,仅用于说明本发明,但不止用来限制本发明的范围。基于本发明中的具体实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的情况下,所获得的其他所有实施例,都属于本发明的保护范围。

[0032] 在本发明实施例中,若无特殊说明,所有原料组分均为本领域技术人员熟知的市售产品;在本发明实施例中,若未具体指明,所用的技术手段均为本领域技术人员所熟知的

常规手段。

[0033] 实施例1

[0034] 本发明提供一种由 m^6A 半抗原合成抗原的方法,具体操作步骤如下:

[0035] 1、称量 m^6A 小分子 40mg,加入一个50ml的试管中,然后逐滴加入0.1M $NaIO_4$ 溶液,直至5ml,边加边摇,室温反应30分钟。再加1ml乙二醇中和过量的 $NaIO_4$,室温反应5min。

[0036] 2、取浓度6.15mg/ml的KLH载体蛋白(Merck,货号:374805)10ml,加入一支新的50ml试管中,用2M的 K_2CO_3 溶液调pH值至pH 9.0~9.5之间。

[0037] 3、然后将步骤2中的载体蛋白缓慢加入步骤1的溶液中,反应45min。期间用5%的 K_2CO_3 溶液调pH值,使pH维持在9~9.5之间。

[0038] 4、称量37.5mg $NaBH_4$ 溶于2.5ml水中,逐滴加入步骤3中的反应液中,边加边摇,然后室温反应18小时。

[0039] 5、将10%(v/v)的甲酸溶液逐滴加入步骤4的反应液中,边加边摇,调pH值至6.0-6.5,室温反应1小时。

[0040] 6、用 NH_4OH 或 $NaOH$ 溶液将步骤5产物调pH值至8.5,然后在4℃透析用0.05M的Tris-HCl (pH8.0)透析36h,即获取所需完全抗原。

[0041] 实施例2

[0042] 本实施例提供利用实施例1合成的抗原免疫动物及阳性克隆筛选的方法,具体步骤如下:

[0043] 1、对兔子背部和腹部多点注射(首免每只兔子750ug抗原,之后每只兔子350ug抗原),每隔2周进行重复免疫,重复3次,本实施例所用兔子为新西兰大白兔,首次免疫用完全佐剂(Sigma,货号:F5881),之后的免疫用不完全佐剂(北京博奥龙,货号:KX0210047Q-10)。

[0044] 2、免疫结束后1周,取兔血清进行ELISA进行多抗检测,合成如下引物:

[0045] M6A-1: m^6A -CUGGUAACGAAUGGCUG-Biotin

[0046] M6A-2:A-CUGGUAACGAAUGGCUG-Biotin

[0047] M6A-3:AAAAAAAAAAAAA-Biotin

[0048] M6A-1引物是正对照,含有 m^6A 修饰的RNA,另外两条是负对照。

[0049] 用链霉亲和素铺板,然后孵育这三条引物,进行ELISA验证实验,选取四只特异性强的兔子抗血清,分别标记为AB1、AB2、AB3及AB4,ELISA结果如图1所示,可见4只兔子均能特异性识别 m^6A 修饰的引物。

[0050] 用200ug免疫原就皮下多点注射,加强免疫一次,然后提取四只兔子的血清抗体,抗血清编号为105(与AB1对应)、106(与AB2对应)、107(与AB3对应)、108(与AB4对应)与市售 m^6A 抗体进行DB实验,结果如图2所示,结果显示,本实施例的多抗效价明显优于市售 m^6A (购于SYSY公司)抗体。特别是编号107血清对应的兔子,效价最高,后续用该兔子进行单抗制备。

[0051] 3、三天后取脾脏牺牲兔子,分离脾脏中的淋巴细胞,用FITC标记的 m^6A 对B淋巴细胞进行荧光标记,用流式细胞仪富集这类细胞,然后将细胞分选到96孔板中,一孔一个细胞。

[0052] 4、对细胞进行培养,10~14天后取细胞上清进行ELISA验证。筛选出抗体效价高,特异性好的孔作为阳性孔。

[0053] 实施例3

[0054] 本实施例提供将实施例2筛选的B细胞进行抗体表达及纯化的方法,具体操作步骤如下:

[0055] 1、阳性克隆的细胞收集裂解后,采用常规方法提取RNA并反转录成cDNA。采用PCR方法,重链扩增引物如SEQ.NO.13~SEQ.NO.14所示。

[0056] 轻链扩增引物如SEQ.NO.15~SEQ.NO.16所示。

[0057] SEQ.NO.15中,Y是C或者T;SEQ.NO.16,R为G或者A)。PCR反应体系为:95℃2min,然后按下列条件进行25个循环反应,95℃1min,56℃1min,72℃0.5min;最后95℃10min。

[0058] 天然配对的兔单克隆抗体重轻链基因(VH和VL)从对应阳性克隆的cDNA中被扩增出来,并经测序确定序列,重链可变区的基因序列如SEQ.NO.9所示,对应的氨基酸序列如SEQ.NO.7所示;轻链可变区的基因序列如SEQ.NO.10所示,对应的氨基酸序列如SEQ.NO.8所示;编码重链的基因序列如SEQ.NO.11所示,对应的氨基酸序列如SEQ.NO.17所示;编码轻链的基因序列如SEQ.NO.12所示,对应的氨基酸序列如SEQ.NO.18所示。

[0059] 2、将抗体重链和轻链的基因分别用同源重组的方式连接至到pcDNA3.1载体(购自invitrogen)中,无内毒素质粒提取后共转染CHO(武汉大学细胞典藏中心)细胞,转染72-96小时后,离心除去细胞,收集细胞上清。

[0060] 3、用Protein A亲和凝胶树脂对细胞表达的上清进行纯化,即为所得抗体。

[0061] 实施例4

[0062] 将实施例3制备的抗体进行植物^m6A修饰的RNA的富集能力检测,其操作步骤如下:

[0063] (1)取相同重量的拟南芥根、茎、叶,用剪刀剪碎后,加液氮速冻后碾磨均匀后,用常规Trizol法提取RNA,然后用化学法将RNA片段化,片段大小约100nt。

[0064] (2)将步骤(1)中片段化的RNA与实施例3制备的抗体进行孵育,富集^m6A修饰的RNA,IgG抗体富集后的RNA作为对照。富集后的^m6A修饰的RNA进行富集效果评估实验,检测结果如图3所示,结果显示,相较于IgG抗体,本发明制备的单克隆抗体对于^m6A修饰的RNA有更优的富集能力。

[0065] 实施例5

[0066] 本实施例提供实施例3制备的对紫外损伤DNA细胞样本的检测,其具体操作如下:

[0067] 细胞系:U2OS(武汉大学细胞典藏中心)

[0068] 1、状态好的U2OS细胞铺24孔板,加BrdU(终浓度10uM/L),培养24-48小时。

[0069] 2、吸出培养基,在超净台打开盖子,打开紫外线照射细胞30秒,再把原来的培养基加上,37℃下培养0、1、2、3、6、8、10、12分钟。

[0070] 3、吸取去掉培养基,固定细胞。后续步骤同常规IF(其中^m6A抗体浓度1mg/ml,抗体稀释倍数1:1500)实验操作一样,测试结果如图4所示,4a为培养0min的^m6A修饰的RNA的情况,4b为培养1min的^m6A修饰的RNA的情况,4c为培养2min的^m6A修饰的RNA的情况,4d为培养3min的^m6A修饰的RNA的情况,4e为培养6min的^m6A修饰的RNA的情况,4f为培养8min的^m6A修饰的RNA的情况,4g为培养10min的^m6A修饰的RNA的情况,4h为培养12min的^m6A修饰的RNA的情况,结果显示,紫外照射后,^m6A修饰的RNA含量增加,随着修复时间的延长,^m6A修饰的含量逐渐下降,而本发明的抗体很好的反应了^m6A修饰的RNA在DNA损伤修复过程中的调控作用。

[0071] 对比例1

[0072] 在实施例2中的步骤(4)中,除筛选出制备实施例3的阳性克隆细胞外,还筛选出了一组阳性克隆细胞。

[0073] 按实施例3的方法制备出另外一组单克隆抗体,制备方法中涉及的引物按常规方法进行设计。最终获得的抗体的重链CDR1序列、CDR2序列、CDR3序列,轻链CDR1序列、CDR2序列、CDR3序列如表1所示。

[0074] 表1 对比例1抗体序列

[0075]

	重链			轻链		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
抗体序列	GFSFSSYY	IDAGSFGAT	AREVIAGVINYLDL	QSVYSNNL	AAS	LGGYDDAADYFA

[0076] 将上述抗体按实施例5操作,抗体浓度1mg/ml,进行1:1000稀释,进行紫外损伤DNA细胞样本的IF检测,检测结果如图5所示,5a为培养0min 的 m^6A 修饰的RNA的情况,5b为培养1min的 m^6A 修饰的RNA的情况,5c为培养2min的 m^6A 修饰的RNA的情况,5d为培养3min的 m^6A 修饰的RNA的情况,5e为培养6min的 m^6A 修饰的RNA的情况,5f为培养8min的 m^6A 修饰的RNA的情况,5g为培养10min的 m^6A 修饰的RNA的情况5h为培养12min的 m^6A 修饰的RNA的情况。可以看出,本发明单克隆抗体其抗体效价优于对比例1效价,均可以进行IF实验。

[0077] 在此有必要指出的是,以上实施例仅限于对本发明的技术方案做进一步的阐述和说明,并不是对本发明的技术方案的进一步的限制,本发明的方法仅为较佳的实施方案,并非用于限定本发明的保护范围。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 武汉爱博泰克生物科技有限公司
[0003]	<120> m6A重组兔单克隆抗体及制备方法
[0004]	<160> 18
[0005]	<170> SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 8
[0008]	<212> PRT
[0009]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0010]	<400> 1
[0011]	Gly Phe Ser Leu His Ser His Cys
[0012]	1 5
[0013]	<210> 2
[0014]	<211> 10
[0015]	<212> PRT
[0016]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0017]	<400> 2
[0018]	Ile Trp Ser Gly Thr Pro Ile Tyr Tyr Pro
[0019]	1 5 10
[0020]	<210> 3
[0021]	<211> 14
[0022]	<212> PRT
[0023]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0024]	<400> 3
[0025]	Phe Cys Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Asn Ser Asp Leu Asp Leu
[0026]	1 5 10
[0027]	<210> 4
[0028]	<211> 8
[0029]	<212> PRT
[0030]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0031]	<400> 4
[0032]	Lys Ser Leu Tyr Glu Tyr Asn Trp
[0033]	1 5
[0034]	<210> 5
[0035]	<211> 3
[0036]	<212> PRT
[0037]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0038]	<400> 5
[0039]	Gly Val Ser
[0040]	1
[0041]	<210> 6

[0042]	<211> 13
[0043]	<212> PRT
[0044]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0045]	<400> 6
[0046]	Met Gly Gly Tyr Asp Cys Arg Tyr Ser Asp Cys Phe Val
[0047]	1 5 10
[0048]	<210> 7
[0049]	<211> 120
[0050]	<212> PRT
[0051]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0052]	<400> 7
[0053]	Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Thr Pro
[0054]	1 5 10 15
[0055]	Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu His Ser His Cys
[0056]	20 25 30
[0057]	Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
[0058]	35 40 45
[0059]	Ile Ile Trp Ser Gly Thr Pro Ile Tyr Tyr Pro Ser Thr Tyr Tyr Ala
[0060]	50 55 60
[0061]	Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val
[0062]	65 70 75 80
[0063]	Asp Leu Glu Ile Pro Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
[0064]	85 90 95
[0065]	Cys Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Asn Ser Asp Leu Asp Leu Trp Gly Gln
[0066]	100 105 110
[0067]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0068]	115 120
[0069]	<210> 8
[0070]	<211> 113
[0071]	<212> PRT
[0072]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0073]	<400> 8
[0074]	Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
[0075]	1 5 10 15
[0076]	Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Tyr Glu Tyr
[0077]	20 25 30
[0078]	Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
[0079]	35 40 45
[0080]	Leu Ile Tyr Gly Val Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
[0081]	50 55 60
[0082]	Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val
[0083]	65 70 75 80

[0084]	Gln Cys Asp Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys Met Gly Gly Tyr Asp Cys	
[0085]	85	90 95
[0086]	Arg Tyr Ser Asp Cys Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val	
[0087]	100	105 110
[0088]	Lys	
[0089]	<210> 9	
[0090]	<211> 360	
[0091]	<212> DNA	
[0092]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0093]	<400> 9	
[0094]	cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtctcgctg ggacaccct gacactcacc	60
[0095]	tgcacagcct ctggattctc cctccatagc cactgtatga actggttcg ccaggctcca	120
[0096]	gggaagggtct tggaatgat cggaatcatc tggagtggta cgcccatata ttatccgagc	180
[0097]	acatattacg cgaggtgggc gaaaggtcga ttcaccatct ccaaacctc gaccacggtg	240
[0098]	gatctggaaa tccccagtcc gacaaccgag gacacggcca cgtatttctg tgctaaatat	300
[0099]	cctggttgta atagtactt ggatctctgg ggccaggga ccttggtcac cgtctctcgc	360
[0100]	<210> 10	
[0101]	<211> 339	
[0102]	<212> DNA	
[0103]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0104]	<400> 10	
[0105]	gcctatgata tgaccagac tccatcctcc gtgtctgcc ctgtgggagg cacagtcacc	60
[0106]	atcagttgtc agtccagtaa gagtctttat gactacaatt ggttatcctg gtatcagcag	120
[0107]	aaaccagggc agcctcccaa gctcctcatc tatggtgtat ccaactctgc atctggggtc	180
[0108]	ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagecagtg	240
[0109]	cagtgtagc atgcttccac ttattattgt atgggcggtt atgattgtcg ttatagtgat	300
[0110]	tgttttgttt tcggcgagg gaccgagtg gtggtcaaa	339
[0111]	<210> 11	
[0112]	<211> 1329	
[0113]	<212> DNA	
[0114]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0115]	<400> 11	
[0116]	cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtctcgctg ggacaccct gacactcacc	60
[0117]	tgcacagcct ctggattctc cctccatagc cactgtatga actggttcg ccaggctcca	120
[0118]	gggaagggtct tggaatgat cggaatcatc tggagtggta cgcccatata ttatccgagc	180
[0119]	acatattacg cgaggtgggc gaaaggtcga ttcaccatct ccaaacctc gaccacggtg	240
[0120]	gatctggaaa tccccagtcc gacaaccgag gacacggcca cgtatttctg tgctaaatat	300
[0121]	cctggttgta atagtactt ggatctctgg ggccaggga ccttggtcac cgtctctcgc	360
[0122]	gggcaacctc aggtccatc agtcttccca ctggccccct gctgcgggga cacaccagc	420
[0123]	tccacggtga ccctgggctg cctggtcaaa ggctacctcc cggagccagt gaccgtgacc	480
[0124]	tggaactcgg gcacctcac caatggggtc cgcacctcc cgtccgtccg gcagtcctca	540
[0125]	ggcctctact cgctgagcag cgtggtgagc gtgacctcaa gcagccagcc cgtcacctgc	600

[0126]	aacgtggccc acccagccac caacaccaa gtggacaaga ccgttgccg ctcgacatgc	660
[0127]	agcaagccca tgtgcccacc ccctgaactc ccggggggac cgtctgtctt catcttcccc	720
[0128]	ccaaaaccca aggacacct catgatctca cgcaccccc aggtcacatg cgtggtggtg	780
[0129]	gacgtgagcc aggatgaccc cgaggtgcag ttcacatggt acataaaca cgagcaggtg	840
[0130]	cgcaccgccc ggccgcccgt acgggagcag cagttcaaca gcacgatccg cgtggtcagc	900
[0131]	acctccccca tcgcgcacca ggactggctg aggggcaagg agttcaagtg caaagtccac	960
[0132]	aacaaggcac tcccggcccc catcgagaaa accatctcca aagccagagg gcagccctg	1020
[0133]	gagccgaagg tctacacat gggccctccc cgggaggagc tgagcagcag gtcggtcagc	1080
[0134]	ctgacctgca tgatcaacgg cttctaccct tccgacatct cgggtggagt ggagaagaac	1140
[0135]	gggaaggcag aggacaacta caagaccag cgcaccgtgc tggacagcga cggctcctac	1200
[0136]	ttctctaca gcaagctctc agtcccacg agtgagtggc agcggggcga cgtcttcacc	1260
[0137]	tgctccgtga tgcacgagc cttgcacaac cactacacgc agaagtccat ctcccgtct	1320
[0138]	ccgggtaaa	1329
[0139]	<210>	12
[0140]	<211>	651
[0141]	<212>	DNA
[0142]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0143]	<400>	12
[0144]	gcctatgata tgaccagac tccatcctcc gtgtctgccg ctgtgggagg cacagtcacc	60
[0145]	atcagtgtc agtccagtaa gagtctttat gagtacaatt ggttatcctg gtatcagcag	120
[0146]	aaaccagggc agcctcccaa gctcctcacc tatggtgtat ccactctggc atctggggtc	180
[0147]	ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcgacgtg	240
[0148]	cagtgtgacg atgcttcac ttattattgt atgggcggtt atgattgtcg ttatagtgt	300
[0149]	tgttttgttt tcggcggagg gaccgaggtg gtgggtcaaag gtgatccagt tgcacctact	360
[0150]	gtcctcatct tcccaccagc tgctgatcag gtggcaactg gaacagtcac catcgtgtgt	420
[0151]	gtggcgaata aatactttcc cgatgtcacc gtcacctggg aggtggatgg caccaccaa	480
[0152]	acaactggca tcgagaacag taaaacaccg cagaattctg cagattgtac ctacaacct	540
[0153]	agcagcactc tgacactgac cagcacacag tacaacagcc acaaagagta cacctgcaag	600
[0154]	gtgaccagg gcacgacctc agtcgtccag agcttcaata ggggtgactg	t 651
[0155]	<210>	13
[0156]	<211>	37
[0157]	<212>	DNA
[0158]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0159]	<400>	13
[0160]	aagcttgcca ccatggagac tgggctgcgc tggcttc	37
[0161]	<210>	14
[0162]	<211>	21
[0163]	<212>	DNA
[0164]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0165]	<400>	14
[0166]	ccattggtga ggggtgcccga	g 21
[0167]	<210>	15

[0168]	<211> 34
[0169]	<212> DNA
[0170]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0171]	<400> 15
[0172]	aagcttgcca ccatggacay gagggccccc actc 34
[0173]	<210> 16
[0174]	<211> 26
[0175]	<212> DNA
[0176]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0177]	<400> 16
[0178]	cagagtrctg ctgaggttgt aggtac 26
[0179]	<210> 17
[0180]	<211> 443
[0181]	<212> PRT
[0182]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0183]	<400> 17
[0184]	Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Thr Pro
[0185]	1 5 10 15
[0186]	Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu His Ser His Cys
[0187]	20 25 30
[0188]	Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
[0189]	35 40 45
[0190]	Ile Ile Trp Ser Gly Thr Pro Ile Tyr Tyr Pro Ser Thr Tyr Tyr Ala
[0191]	50 55 60
[0192]	Arg Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val
[0193]	65 70 75 80
[0194]	Asp Leu Glu Ile Pro Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
[0195]	85 90 95
[0196]	Cys Ala Lys Tyr Pro Gly Cys Asn Ser Asp Leu Asp Leu Trp Gly Gln
[0197]	100 105 110
[0198]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val
[0199]	115 120 125
[0200]	Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr
[0201]	130 135 140
[0202]	Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr
[0203]	145 150 155 160
[0204]	Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val
[0205]	165 170 175
[0206]	Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr
[0207]	180 185 190
[0208]	Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn
[0209]	195 200 205

[0210]	Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Met		
[0211]	210	215	220
[0212]	Cys Pro Pro Pro Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro		
[0213]	225	230	235 240
[0214]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
[0215]	245	250	255
[0216]	Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr		
[0217]	260	265	270
[0218]	Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg		
[0219]	275	280	285
[0220]	Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile		
[0221]	290	295	300
[0222]	Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His		
[0223]	305	310	315 320
[0224]	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg		
[0225]	325	330	335
[0226]	Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu		
[0227]	340	345	350
[0228]	Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe		
[0229]	355	360	365
[0230]	Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu		
[0231]	370	375	380
[0232]	Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Thr Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr		
[0233]	385	390	395 400
[0234]	Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly		
[0235]	405	410	415
[0236]	Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
[0237]	420	425	430
[0238]	Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys		
[0239]	435	440	
[0240]	<210> 18		
[0241]	<211> 217		
[0242]	<212> PRT		
[0243]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0244]	<400> 18		
[0245]	Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly		
[0246]	1	5	10 15
[0247]	Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Tyr Glu Tyr		
[0248]	20	25	30
[0249]	Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu		
[0250]	35	40	45
[0251]	Leu Ile Tyr Gly Val Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe		

[0252]	50	55	60
[0253]	Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val		
[0254]	65	70	75
[0255]	Gln Cys Asp Asp Ala Ser Thr Tyr Tyr Cys Met Gly Gly Tyr Asp Cys		
[0256]	85	90	95
[0257]	Arg Tyr Ser Asp Cys Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val		
[0258]	100	105	110
[0259]	Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala		
[0260]	115	120	125
[0261]	Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys		
[0262]	130	135	140
[0263]	Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln		
[0264]	145	150	155
[0265]	Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys		
[0266]	165	170	175
[0267]	Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn		
[0268]	180	185	190
[0269]	Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val		
[0270]	195	200	205
[0271]	Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys		
[0272]	210	215	

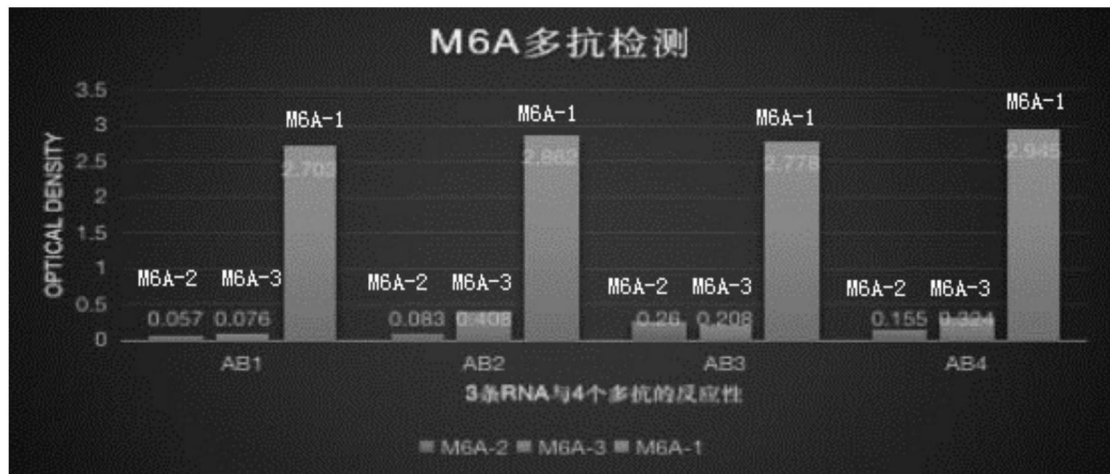


图1

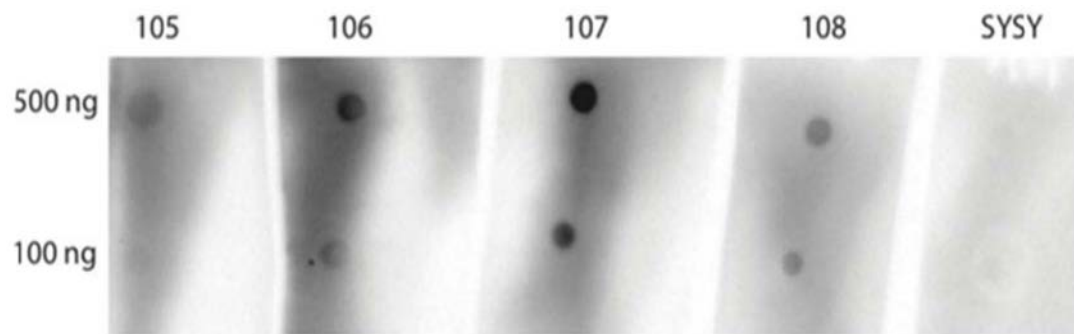


图2

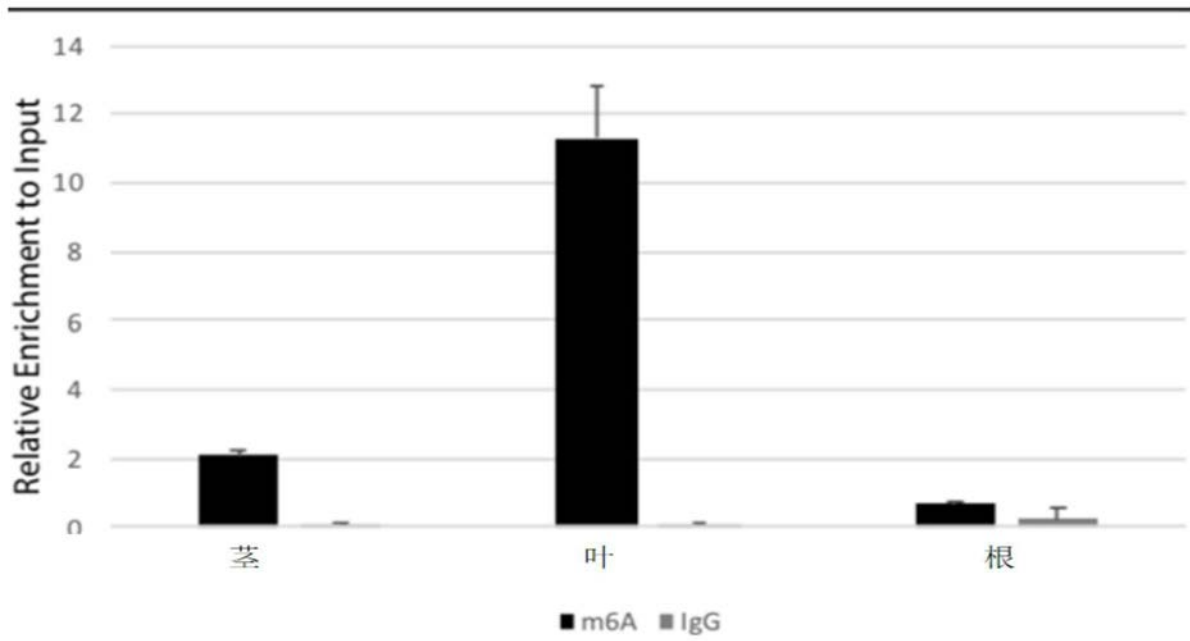


图3

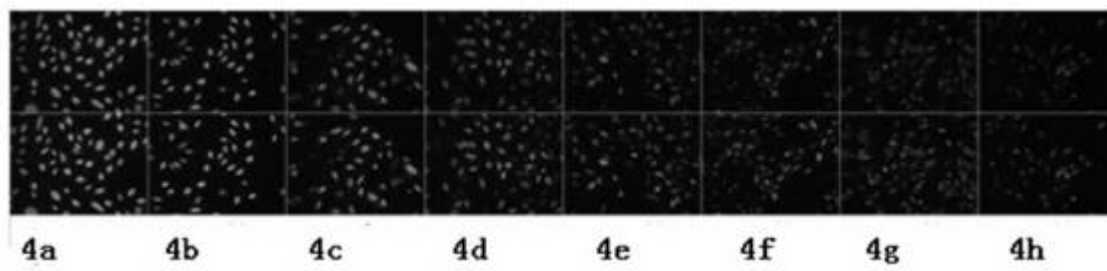


图4

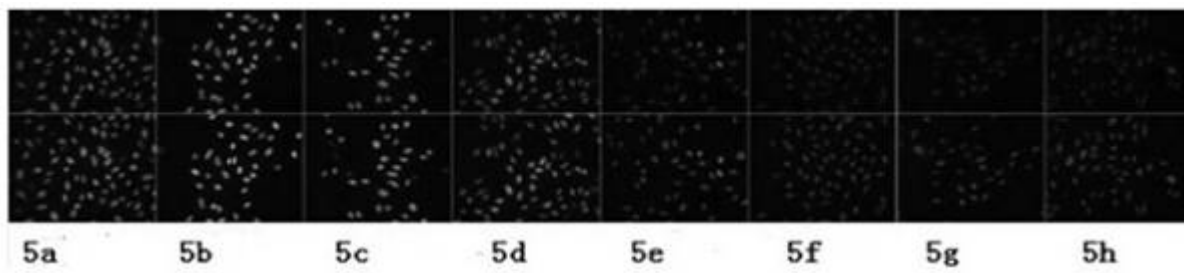


图5