



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102757504 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 31

(21) 申请号 201210215680. X

(22) 申请日 2012. 06. 27

(71) 申请人 中国人民解放军第三军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街  
30 号

(72) 发明人 黄泽民 倪兵 吴玉章 唐艳

田志强 田易 张轶 倪东京

(74) 专利代理机构 北京元本知识产权代理事务

所 11308

代理人 秦力军

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006. 01)

C07K 1/14 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

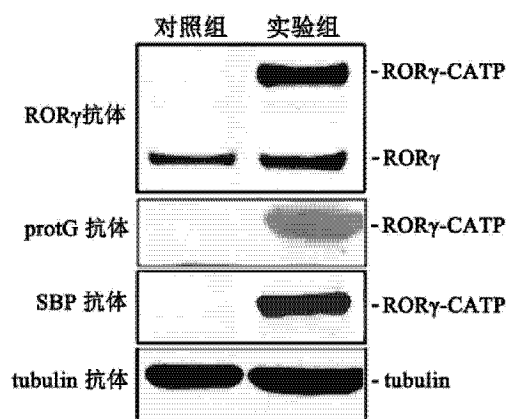
序列表 4 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白及 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白  
的捕获方法

### (57) 摘要

本发明涉及 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白, 所述 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白从氨基末端到羧基末端依次由 ROR  $\gamma$  和 CTAP 融合标签组成, 所述 ROR  $\gamma$  指维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$ , 所述 CTAP 融合标从氨基末端到羧基末端依次由 SBP、TEV 蛋白酶切位点以及 protG 组成, ROR  $\gamma$  相互作用蛋白的捕获方法为: 用 ROR  $\gamma$  抗体、protG 抗体和 SBP 抗体中任一种或多种对核蛋白进行蛋白印迹检测, 并通过显影定影技术获得蛋白条带, 所述蛋白条带为 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白; 本发明中构建的 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合基因序列准确且各组成部分表达正确, 能够用于细胞内 ROR  $\gamma$  蛋白复合物的纯化, 适用于大多数实验室在进行 ROR  $\gamma$  蛋白质复合物研究时采用, 具有良好的推广应用价值。



1. 捕获 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白的 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白,其特征在于:所述 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白从氨基末端到羧基末端依次由 ROR  $\gamma$  和 CTAP 融合标签组成,所述 ROR  $\gamma$  指维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$ ,所述 CTAP 融合标从氨基末端到羧基末端依次由链亲和素结合肽、TEV 蛋白酶切位点以及 G 蛋白组成。

2. 根据权利要求 1 所述的 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白,其特征在于:所述 ROR  $\gamma$  的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,所述链亲和素结合肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示,所述 TEV 蛋白酶切位点的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示,所述 G 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

3. ROR  $\gamma$  相互作用蛋白的捕获方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

A PCR 扩增

根据 GenBank 公布的 ROR  $\gamma$  基因序列设计扩增引物,以 ROR  $\gamma$  基因为模板通过 PCR 扩增,得如 SEQ ID NO:5 所示的 ROR  $\gamma$  基因;

B 亚克隆

将步骤 A 所得的 ROR  $\gamma$  基因带入所述 CTAP 融合标签的载体质粒中,得重组载体;

C 转染并提取蛋白

将所述重组载体转染入 HepG2 细胞中,提取转染细胞中核蛋白,其含有蛋白复合物,所述蛋白复合物含有 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白和 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白;

D 蛋白印迹检测

用 ROR  $\gamma$  抗体、protG 抗体和 SBP 抗体中任一种或多种对核蛋白进行蛋白印迹检测,并通过显影定影技术获得蛋白条带,所述蛋白条带为 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白。

4. 根据权利要求 3 所述的捕获方法,其特征在于,步骤 A 中,所述 ROR  $\gamma$  的特异性引物,其上游引物如 SEQ ID NO:6 所示,其下游引物为如 SEQ ID NO:7 所示,所述引物中分别带有 EcoR I 和 Pme I 酶切位点。

5. 根据权利要求 4 所述的捕获方法,其特征在于,步骤 A 中,PCR 扩增条件为:98℃,15 秒;68℃,10 秒;72℃,90 秒;上述 30 个循环。

6. 根据权利要求 5 所述的捕获方法,其特征在于,将如 SEQ ID NO:5 所示的 ROR  $\gamma$  基因插入至 pCeMM TAP 载体中。

7. 根据权利要求 3 所述的捕获方法,其特征在于,在步骤 D 中,用未转染 HepG 细胞来源的核蛋白作为空白对照。

## ROR $\gamma$ -CTAP 融合蛋白及 ROR $\gamma$ 相互作用蛋白的捕获方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质和基因技术,特别涉及 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白的鉴定。

### 背景技术

[0002] 在研究蛋白质相互作用时,运用接近生理条件并具有高亲和力的捕获靶蛋白复合物的方法至关重要。已有一些研究相互作用蛋白的方法,如免疫沉淀、酵母双杂交、GST-pull down 和单标签亲和纯化等,但这些方法要么存在抗体的交叉反应或抗体泄漏进而会产生显著的背景,要么有很高的假阳性率和假阴性率,或者体外易形成复合体及其与细胞内预装配的复合体竞争致使纯化的蛋白得率较低。鉴于上述各种分离纯化蛋白复合体的方法中存在的问题,最近几年国外发展出一种更好的替代方法。串联亲和纯化方法(TAP)使用 2 个或 2 个以上的标签逐步进行纯化,该方法具有高产率、低污染、高特异性等特点,从而大大提高了靶蛋白的真正的伙伴蛋白的得率和大大减少所需要的靶蛋白源细胞数量。但是,关于 TAP 的维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$  (ROR  $\gamma$ ) 相互作用蛋白的捕获方法至今还未有报道。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的之一在于提供一种融合蛋白,该融合蛋白含有 CTAP 融合标签,通过免疫印迹的方法能捕获该融合蛋白。

[0004] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0005] 捕获 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白的 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白,所述 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白从氨基末端到羧基末端依次由 ROR  $\gamma$  和 CTAP 融合标签组成,所述 ROR  $\gamma$  指维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$ ,所述 CTAP 融合标从氨基末端到羧基末端依次由链亲和素结合肽、TEV 蛋白酶切位点以及 G 蛋白组成。

[0006] 进一步,所述 ROR  $\gamma$  的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,所述链亲和素结合肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示,所述 TEV 蛋白酶切位点的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示,所述 G 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0007] 本发明的目的之二在于提供一种维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$  相互作用蛋白的捕获方法,该捕获方法为 ROR  $\gamma$  蛋白复合物的鉴定及纯化工作提供了新的思路。

[0008] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0009] ROR  $\gamma$  相互作用蛋白的捕获方法,具体包括以下步骤:

[0010] A PCR 扩增

[0011] 根据 GenBank 公布的 ROR  $\gamma$  基因序列设计扩增引物,以 ROR  $\gamma$  基因为模板通过 PCR 扩增,得如 SEQ ID NO:5 所示的 ROR  $\gamma$  基因;

[0012] B 亚克隆

[0013] 将步骤 A 所得的 ROR  $\gamma$  基因带入所述 CTAP 融合标签的载体质粒中,得重组载体;

[0014] C 转染并提取蛋白

[0015] 将所述重组载体转染入 HepG2 细胞中,提取转染细胞中核蛋白,其含有蛋白复合物,所述蛋白复合物含有 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白和 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白;

[0016] D 蛋白印迹检测

[0017] 用 ROR  $\gamma$  抗体、protG 抗体和 SBP 抗体中任一种或多种对核蛋白进行蛋白印迹检测,并通过显影定影技术获得蛋白条带,所述蛋白条带为 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白。

[0018] 进一步,步骤 A 中,所述 ROR  $\gamma$  的特异性引物,其上游引物为:

[0019] 5'-gcgaattcatggacagggcccccac-3' (如 SEQ ID NO:6 所示),其下游引物为:5'-cgttttaaacttcttggacagcccccacag-3' (如 SEQ ID NO:7 所示),所述引物中分别带有 EcoR I 和 Pme I 酶切位点。

[0020] 进一步,步骤 A 中,PCR 扩增条件为:98℃,15 秒;68℃,10 秒;72℃,90 秒;上述 30 个循环。

[0021] 进一步,将如 SEQ ID NO:5 所示的 ROR  $\gamma$  基因插入至 pCeMM TAP 载体中。

[0022] 进一步,在步骤 D 中,用未转染 HepG 细胞来源的核蛋白作为空白对照。

[0023] 本发明的有益效果在于:构建的 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合基因序列准确且各组成部分表达正确,能够用于细胞内 ROR  $\gamma$  蛋白复合物的纯化,适用于大多数实验室在进行 ROR  $\gamma$  蛋白质复合物研究时采用,具有良好的推广应用价值。

## 附图说明

[0024] 图 1 为 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白的结构示意图。

[0025] 图 2 为 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合基因的测序结果。

[0026] 图 3 为 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白中各组成部分的免疫印迹表达检测。

## 具体实施方式

[0027] 为了使本发明的目的、技术方案和有点更加清楚,下面将结合附图对本发明的优选实施例进行详细的描述。

[0028] HepG2 细胞由本实验室保持,pCeMM TAP 载体由德国法兰克福大学 EUROSCARF 中心提供,pMSCVpuro 载体购自 Invitrogen 公司,Trizol、各种常规酶、预染蛋白质 marker、DNA marker 购自 TaKaRa 总司,各种蛋白质一抗二抗购自 Santa Cruz 公司。

[0029] 实施例 1 带有融合标签 CTAP 的载体质粒的构建

[0030] 上海英俊生物公司设计并合成所述 ROR  $\gamma$  的特异性引物,其上游引物为:5'-gcgaattcatggacagggcccccac-3' (如 SEQ ID NO:6 所示),其下游引物为:5'-ccgtttaaacttcttggacagcccccacag-3' (如 SEQ ID NO:7 所示),所述引物中分别带有 EcoR I 和 Pme I 酶切位点。以 ROR  $\gamma$  基因为模板通过 PCR 方法扩增出 ROR  $\gamma$  CDS 序列,PCR 扩增条件为:98℃,15 秒;68℃,10 秒;72℃ 90 秒;上述 30 个循环;如 SEQ ID NO:5 所示的 ROR  $\gamma$  基因。

[0031] 实施例 2 细胞转染

[0032] 将测序鉴定过的融合蛋白 ROR  $\gamma$ -CTAP 表达载体转染入 HepG2 细胞中。具体为:HepG2 细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基中。按照试剂说明书方法用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染进 HepG2 细胞中。为获得稳定转染细胞株,细胞转染 36 小时后在完全培养基中添加 1.5  $\mu$ g/ml 浓度的嘌呤霉素进行培养,并在随后的每 2-3 天更换一次

含抗生素的完全培养基。

[0033] 实施例 3 免疫印迹捕获重组蛋白

[0034] 1. 胞浆蛋白和核蛋白的提取：

[0035] ①胰酶消化培养的 HepG2 细胞,计数取  $4 \times 10^6$  个；

[0036] ②按细胞数加入预冷的 CER I (含蛋白酶抑制剂),轻柔混匀,冰浴 10 分钟；

[0037] ③往上步反应液中加入  $11 \mu\text{l}$  预冷的 CER II,涡旋 5sec,冰浴 1 分钟；

[0038] ④涡旋 5 秒,16000g 离心 5 分钟；

[0039] ⑤将上清(浆蛋白)迅速转移至干净的预冷的 EP 管中,冰浴待用或分装  $-80^\circ\text{C}$  冻存；

[0040] ⑥用  $100 \mu\text{l}$  预冷的 NER 重悬沉淀,涡旋 15 秒充分重悬沉淀,冰浴 40 分钟。每 10 分钟涡旋反应液 15 秒；

[0041] ⑦ 16000g 离心 10 分钟；

[0042] ⑧上清为核蛋白,转移至预冷的 EP 管中,冰浴待用或分装  $-80^\circ\text{C}$  冻存；

[0043] ⑨蛋白浓度检测为  $5.2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ,其含有蛋白复合物,所述蛋白复合物含有 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白和 ROR  $\gamma$  相互作用蛋白；所述 ROR  $\gamma$ -CTAP 融合蛋白从氨基末端到羧基末端依次由 ROR  $\gamma$  和 CTAP 融合标签组成,所述 ROR  $\gamma$  指维甲酸相关孤儿核受体  $\gamma$ ,所述 CTAP 融合标从氨基末端到羧基末端依次由链亲和素结合肽、TEV 蛋白酶切位点以及 G 蛋白组成；所述 ROR  $\gamma$  的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,所述链亲和素结合肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示,所述 TEV 蛋白酶切位点的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示,所述 G 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:4 所示。

[0044] 2. 蛋白质凝胶电泳：

[0045] ①电泳凝胶为 NuPAGE<sup>®</sup> Novex 4-12% Bis-Tris Gel；

[0046] ②在样品蛋白中加入上样缓冲液,水煮 10min；

[0047] ③ 12000g 离心 5min,取上清蛋白；

[0048] ④在凝胶加样孔中按实验分组要求加上蛋白样品和预染分子量标准蛋白；

[0049] ⑤电泳。条件为：恒压 200V,1hr；

[0050] ⑥电泳结束,卸下凝胶,用镊子撬开塑料夹板,取出凝胶；

[0051] 3. 电转膜：

[0052] ①取出的凝胶置于电转缓冲液中平衡 15min；

[0053] ② PVDF 膜依次处理：甲醇,浸泡 15sec；超纯水,漂洗 3min；电转缓冲液中平衡 15min；

[0054] ③电转“三明治”由正极向负极依次叠放顺序为：滤纸→凝胶→PVDF 膜→滤纸；

[0055] ④电转条件：30V,1hr；

[0056] ⑤电转结束,取出 PVDF 膜,甲醇短暂漂洗后再在超纯水中漂洗 1min 去掉电转缓冲液；

[0057] 4. 封闭：PVDF 膜放入塑料封闭袋中,加入封闭液(含 0.05% Tween 20 的 Blocking Buffer),室温摇床上缓慢孵育 1.5-2hr 或  $4^\circ\text{C}$  过夜；

[0058] 5. 孵一抗：用封闭液按最适比例稀释一抗后,在封闭袋中对 PVDF 膜进行一抗结合孵育,室温 2hr 或  $4^\circ\text{C}$  过夜；

[0059] 6. 洗一抗 :取出 PVDF 膜,于平皿中用 TBST(含 0.05% Tween20 的 TBS)洗涤 6min/次 ×5 次 ;

[0060] 7. 孵二抗 :用封闭液按 1 : 20000 比例稀释二抗后,在封闭袋中对 PVDF 膜进行二抗结合孵育,室温 1hr ;

[0061] 8. 洗二抗 :取出 PVDF 膜,于平皿中用 TBST(含 0.05% Tween20 的 TBS)洗涤 6min/次 ×5 次 ;

[0062] 9. 显色 :将结合有一抗二抗的 PVDF 膜置于显色底物 ECL 发光液中,避光孵育 5min ;

[0063] 10. 曝光 :挤出发光液,在暗室内用 X 光片曝光。一般曝光时间点设为 8sec, 30sec, 1min, 5min 等,具体曝光时间随条带的荧光强度改变 ;

[0064] 11. 显影定影 :曝光过的 X 光片于首先置于显影液中显影 2min,经过自来水充分漂洗,最后置于定影液中定影 2min。自来水漂洗后,挂于通风处晾干,扫描胶片结果。

[0065] 结果显示, ROR  $\gamma$  -CTAP 转染 HepG 细胞来源的实验组和未转染 HepG 细胞来源的对照组,用 ROR  $\gamma$  抗体均能检测出内源性的 ROR  $\gamma$  蛋白,此外实验组还检测到 ROR  $\gamma$  -CTAP 融合蛋白 ;如图 3 所示,而当用 protG 抗体或 SBP 抗体分别进行蛋白印迹检测时,实验组中 ROR  $\gamma$  -CTAP 融合蛋白均能正确表达。

[0066] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

[0001]

&lt;110&gt; 中国人民解放军第三军医大学

<120> ROR $\gamma$ -CTAP 融合蛋白及 ROR $\gamma$  相互作用蛋白的捕获方法

&lt;160&gt; 1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 518

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人 (homo sapiens)

&lt;220&gt;

<223> ROR $\gamma$ 

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Arg | Ala | Pro | Gln | Arg | Gln | His | Arg | Ala | Ser | Arg | Glu | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Leu | Ala | Ala | Lys | Lys | Thr | His | Thr | Ser | Gln | Ile | Glu | Val | Ile | Pro |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Cys | Lys | Ile | Cys | Gly | Asp | Lys | Ser | Ser | Gly | Ile | His | Tyr | Gly | Val |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |
| Ile | Thr | Cys | Glu | Gly | Cys | Lys | Gly | Phe | Phe | Arg | Arg | Ser | Gln | Arg |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |
| Cys | Asn | Ala | Ala | Tyr | Ser | Cys | Thr | Arg | Gln | Gln | Asn | Cys | Pro | Ile |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |
| Asp | Arg | Thr | Ser | Arg | Asn | Arg | Cys | Gln | His | Cys | Arg | Leu | Gln | Lys |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |
| Cys | Leu | Ala | Leu | Gly | Met | Ser | Arg | Asp | Ala | Val | Lys | Phe | Gly | Arg |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |
| Met | Ser | Lys | Lys | Gln | Arg | Asp | Ser | Leu | His | Ala | Glu | Val | Gln | Lys |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |
| Gln | Leu | Gln | Gln | Arg | Gln | Gln | Gln | Gln | Gln | Glu | Pro | Val | Val | Lys |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |
| Thr | Pro | Pro | Ala | Gly | Ala | Gln | Gly | Ala | Asp | Thr | Leu | Thr | Tyr | Thr |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |
| Leu | Gly | Leu | Pro | Asp | Gly | Gln | Leu | Pro | Leu | Gly | Ser | Ser | Pro | Asp |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |
| Leu | Pro | Glu | Ala | Ser | Ala | Cys | Pro | Pro | Gly | Leu | Leu | Lys | Ala | Ser |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |
| Gly | Ser | Gly | Pro | Ser | Tyr | Ser | Asn | Asn | Leu | Ala | Lys | Ala | Gly | Leu |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |
| Asn | Gly | Ala | Ser | Cys | His | Leu | Glu | Tyr | Ser | Pro | Glu | Arg | Gly | Lys |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 210 |
| Ala | Glu | Gly | Arg | Glu | Ser | Phe | Tyr | Ser | Thr | Gly | Ser | Gln | Leu | Thr |
|     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |
| Pro | Asp | Arg | Cys | Gly | Leu | Arg | Phe | Glu | Glu | His | Arg | His | Pro | Gly |

[0002]

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Gly | Glu | Leu | Gly | Gln | Gly | Pro | Asp | Ser | Tyr | Gly | Ser | Pro | Ser |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |
| Phe | Arg | Ser | Thr | Pro | Glu | Ala | Pro | Tyr | Ala | Ser | Leu | Thr | Glu | Ile |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |
| Glu | His | Leu | Val | Gln | Ser | Val | Cys | Lys | Ser | Tyr | Arg | Glu | Thr | Cys |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |
| Gln | Leu | Arg | Leu | Glu | Asp | Leu | Leu | Arg | Gln | Arg | Ser | Asn | Ile | Phe |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |
| Ser | Arg | Glu | Glu | Val | Thr | Gly | Tyr | Gln | Arg | Lys | Ser | Met | Trp | Glu |
|     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |
| Met | Trp | Glu | Arg | Cys | Ala | His | His | Leu | Thr | Glu | Ala | Ile | Gln | Tyr |
|     |     |     |     | 320 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |
| Val | Val | Glu | Phe | Ala | Lys | Arg | Leu | Ser | Gly | Phe | Met | Glu | Leu | Cys |
|     |     |     |     | 335 |     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |
| Gln | Asn | Asp | Gln | Ile | Val | Leu | Leu | Lys | Ala | Gly | Ala | Met | Glu | Val |
|     |     |     |     | 350 |     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |
| Val | Leu | Val | Arg | Met | Cys | Arg | Ala | Tyr | Asn | Ala | Asp | Asn | Arg | Thr |
|     |     |     |     | 365 |     |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |
| Val | Phe | Phe | Glu | Gly | Lys | Tyr | Gly | Gly | Met | Glu | Leu | Phe | Arg | Ala |
|     |     |     |     | 380 |     |     |     |     | 385 |     |     |     |     | 390 |
| Leu | Gly | Cys | Ser | Glu | Leu | Ile | Ser | Ser | Ile | Phe | Asp | Phe | Ser | His |
|     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |     |     |     |     | 405 |
| Ser | Leu | Ser | Ala | Leu | His | Phe | Ser | Glu | Asp | Glu | Ile | Ala | Leu | Tyr |
|     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |     |     | 420 |
| Thr | Ala | Leu | Val | Leu | Ile | Asn | Ala | His | Arg | Pro | Gly | Leu | Gln | Glu |
|     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |     |     | 435 |
| Lys | Arg | Lys | Val | Glu | Gln | Leu | Gln | Tyr | Asn | Leu | Glu | Leu | Ala | Phe |
|     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |     | 450 |
| His | His | His | Leu | Cys | Lys | Thr | His | Arg | Gln | Ser | Ile | Leu | Ala | Lys |
|     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     | 465 |
| Leu | Pro | Pro | Lys | Gly | Lys | Leu | Arg | Ser | Leu | Cys | Ser | Gln | His | Val |
|     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Glu | Arg | Leu | Gln | Ile | Phe | Gln | His | Leu | His | Pro | Ile | Val | Val | Gln |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |
| Ala | Ala | Phe | Pro | Pro | Leu | Tyr | Lys | Glu | Leu | Phe | Ser | Thr | Glu | Thr |
|     |     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |
| Glu | Ser | Pro | Val | Gly | Leu | Ser | Lys |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 515 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 链亲和素结合肽

[0003]

&lt;400&gt; 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Glu | Lys | Thr | Thr | Gly | Trp | Arg | Gly | Gly | His | Val | Val | Glu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Gly | Leu | Ala | Gly | Glu | Leu | Glu | Gln | Leu | Arg | Ala | Arg | Leu | Glu | His |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| His | Pro | Gln | Gly | Gln | Arg | Glu | Pro |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TEV 蛋白酶切位点

&lt;400&gt; 3

|     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Asn | Leu | Tyr | Phe | Gln | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; G 蛋白

&lt;400&gt; 4

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

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1554

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; ROR γ 基因

&lt;400&gt; 5

|            |            |            |            |             |            |     |
|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|-----|
| atggacaggg | ccccacagag | acagcaccga | gcctcacggg | agctgctggc  | tgcaaagaag | 60  |
| acccacacct | cacaaattga | agtgatccct | tgcaaaatct | gtggggacaa  | gtcgtctggg | 120 |
| atccactacg | gggttatcac | ctgtgagggg | tgcaagggct | tcttccgcgc  | gagccagcgc | 180 |
| tgtaacgcgg | cctactcctg | cacccgtcag | cagaactgcc | ccatcgaccg  | caccagccga | 240 |
| aaccgatgcc | agcactgccg | cctgcagaaa | tgccctggcg | tgggcattgt  | ccgagatgct | 300 |
| gtcaagttcg | gccgcattgt | caagaagcag | agggacagcc | tgcattgcaga | agtgcagaaa | 360 |

[0004]

|             |            |            |             |            |            |      |
|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------|
| cagctgcagc  | agcggcaaca | gcagcaacag | gaaccagtgg  | tcaagacccc | tccagcaggg | 420  |
| gcccgaaggag | cagataccct | cacctacacc | ttggggctcc  | cagacgggca | gctgcccctg | 480  |
| ggctcctcgc  | ctgacctgcc | tgaggcttct | gcctgtcccc  | ctggcctcct | gaaagcctca | 540  |
| ggctctgggc  | cctcatattc | caacaacttg | gccaaggcag  | ggctcaatgg | ggcctcatgc | 600  |
| caccttgaat  | acagccctga | gcggggcaag | gctgagggca  | gagagagctt | ctatagcaca | 660  |
| ggcagccagc  | tgacccctga | ccgatgtgga | cttcgttttg  | aggaacacag | gcctcctggg | 720  |
| cttgggggaa  | tgggacaggg | cccagacagc | tacggcagcc  | ccagtttccg | cagcacaccg | 780  |
| gaggcacccct | atgcctccct | gacagagata | gagcacctgg  | tgcagagcgt | ctgcaagtcc | 840  |
| tacagggaga  | catgccagct | gcggctggag | gacctgctgc  | ggcagcgctc | caacatcttc | 900  |
| tcccgggagg  | aagtgactgg | ctaccagagg | aagtcctatg  | gggagatgtg | ggaacggtgt | 960  |
| gcccaccacc  | tcaccgaggc | cattcagtac | gtgggtggagt | tcgccaagag | gctctcaggc | 1020 |
| tttatggagc  | tctgccagaa | tgaccagatt | gtgcttctca  | aagcaggagc | aatggaagtg | 1080 |
| gtgctggtta  | ggatgtgccg | ggcctacaat | gctgacaacc  | gcacggtctt | ttttgaaggc | 1140 |
| aaatacgggtg | gcatggagct | gttcagagcc | ttgggctgca  | gcgagctcat | cagctccatc | 1200 |
| tttgacttct  | cccactccct | aagtgccttg | cacttttccg  | aggatgagat | tgccctctac | 1260 |
| acagcccttg  | ttctcatcaa | tgcccatcgg | ccagggtccc  | aagagaaaag | gaaagtagaa | 1320 |
| cagctgcagt  | acaatctgga | gctggccttt | catcatcatc  | tctgcaagac | tcctcgccaa | 1380 |
| agcatcctgg  | caaagctgcc | acccaagggg | aagcttcgga  | gcctgtgtag | ccagcatgtg | 1440 |
| gaaaggctgc  | agatcttcca | gcacctccac | cccatcgtgg  | tccaagccgc | tttccctcca | 1500 |
| ctctacaagg  | agctcttcag | cactgaaacc | gagtcacctg  | tggggctgtc | caag       | 1554 |

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> ROR  $\gamma$  基因的上游引物

&lt;400&gt; 6

gcgaattcat ggacagggcc ccac 24

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> ROR  $\gamma$  基因的下游引物

&lt;400&gt; 7

ccgtttaaac ttcttggaca gcccacag 29

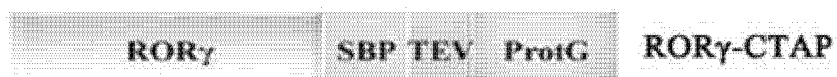


图 1

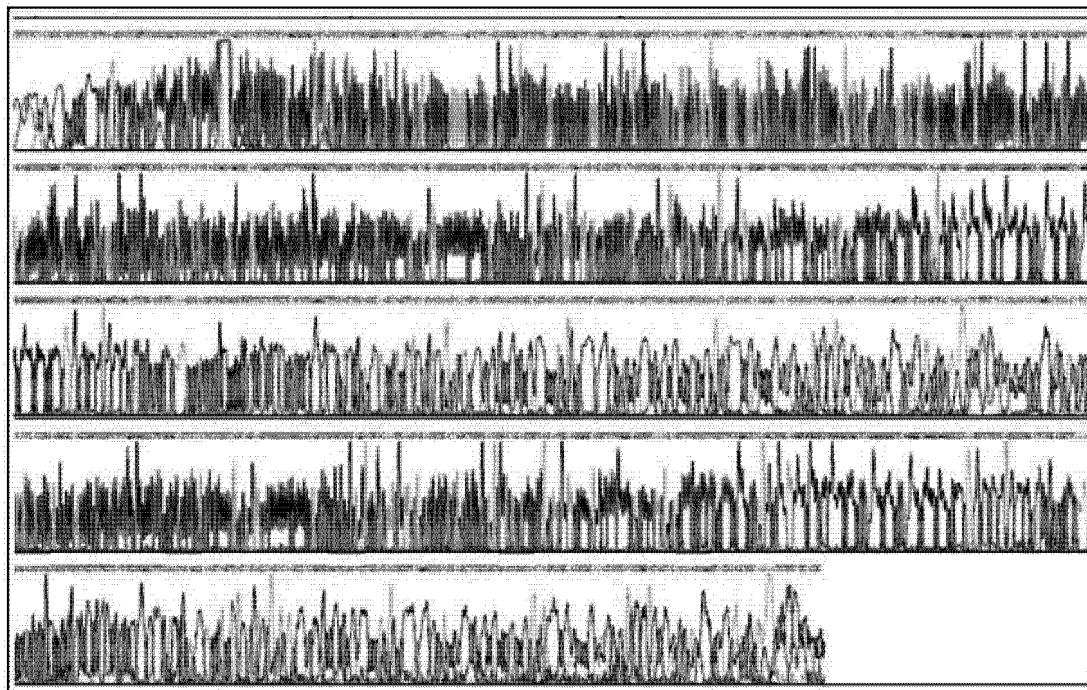


图 2

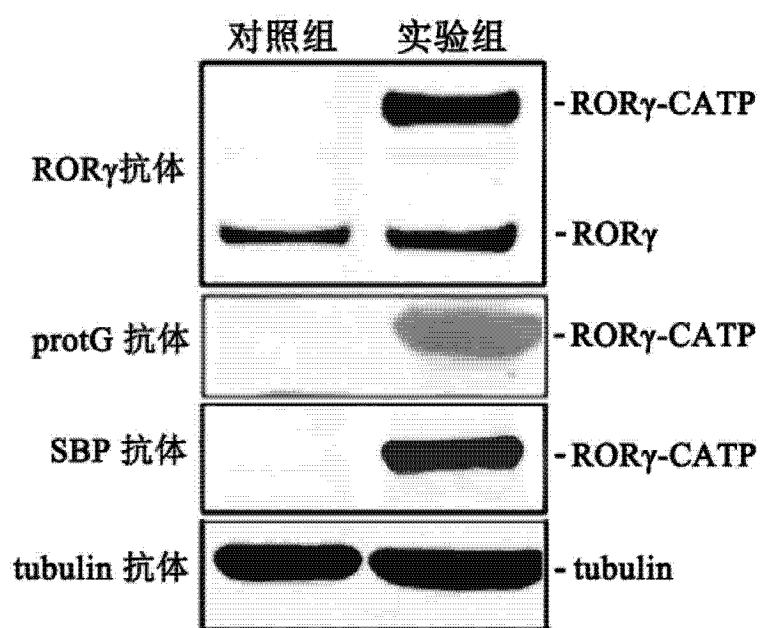


图 3