

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/12
C12N 15/13 C12N 15/82
C07K 16/00 A01H 5/00

[21] 申请号 95197699.0

[43]公开日 1998年6月3日

[11] 公开号 CN 1183802A

[22]申请日 95.12.27

[30]优先权

[32]94.12.30 [33]US [31]08 / 367,395

[32]95.5.4 [33]US [31]08 / 434,000

[86]国际申请 PCT / US95 / 16889 95.12.27

[87]国际公布 WO96 / 21012 英 96.7.11

[85]进入国家阶段日期 97.8.22

[71]申请人 行星生物技术有限公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 盖伊及圣托马斯医院内科和牙科联合学校

[72]发明人 A·C·希尔特 J·K·C·马

T·勒内尔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 吴玉和 谭明胜

权利要求书 8 页 说明书 95 页 附图页数 1 页

[54]发明名称 在植物中生产含有保护性蛋白质的免疫球蛋白的方法和用

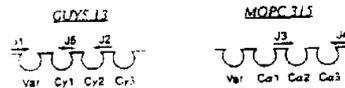
[57]摘要

本发明的免疫球蛋白是针对粘膜表面致病原(例如 S.mutans) 的有用的治疗性免疫球蛋白。该免疫球蛋白含有一种保护性蛋白, 该保护性蛋白在粘膜环境中保护该免疫球蛋白。本发明也包括在植物中生产免疫球蛋白的极大地改进了的方法, 该方法是通过在植物细胞中生产作为免疫球蛋白其他成分的保护性蛋白而完成的。免疫球蛋白的成分以极大地提高了效率装配在一起。本发明也试图在不同细胞中生产含有保护性蛋白的免疫球蛋白, 所述细胞包括植物细胞, 这可被选作有用的额外特性。含有保护性蛋白的免疫球蛋白作为针对粘膜表面和其他致病原的治疗性抗体的应用也是本发明所期望的。

全长的基因序列:

```
31 ACCAGATCTATGGAATGGACCTGGGTTTTTC
32 GCCAAGCTTGGTTTTGAGATGGTTTTCTC
33 GATAAGCTTGGTCTACTCCTCCTCCTCTA
34 AATCTCGAATCAGTAGCAGATGCCATCTCC
35 GGAAGGCTTGTACATATGCAAGGCTTACA
```

PCR扩增:



重组系统:



权 利 要 求 书

1. 由保护性蛋白与免疫球蛋白起源的重链结合而构成的免疫球蛋白，其中重链至少含有部分抗原结合功能区。
- 5 2. 权利要求1中所述免疫球蛋白，它进一步包含免疫球蛋白起源的轻链，所述轻链至少含有部分抗原结合功能区且与上述免疫球蛋白起源的重链相连。
3. 权利要求1或2中所述免疫球蛋白，它进一步包含第二条免疫球蛋白起源的重链，所述重链至少含有部分抗原结合功能区且与上述保护性蛋白相连。
- 10 4. 权利要求3中所述的免疫球蛋白，它进一步包含第二条免疫球蛋白起源的轻链，轻链至少含有部分抗原结合功能区且与上述第二条免疫球蛋白起源的重链相连。
5. 权利要求1-4中所述免疫球蛋白，它进一步包含免疫球蛋白J链，
- 15 所述J链至少与上述免疫球蛋白起源的重链之一相结合。
6. 权利要求1-5中所述的免疫球蛋白，它是治疗性免疫球蛋白。
7. 权利要求6中所述的免疫球蛋白，它能够与粘膜表面致病原抗原结合。
8. 权利要求7中所述的免疫球蛋白，它能够防止龋齿。
- 20 9. 权利要求1-8中所述的免疫球蛋白，其中抗原结合功能区能够与链球菌 *S.mutans* 的血清型抗原 c.e 和 f 或链球菌 *S.sobrinus* 血清型抗原 d 和 g 结合。
10. 权利要求1中所述免疫球蛋白，其中保护性蛋白的氨基酸序列实际上至少与兔多聚免疫球蛋白受体的第1至第627氨基酸序列部分相应，但不含与兔免疫球蛋白受体的第628 - 755氨基酸残基序列相应的氨基酸序列。
- 25 11. 权利要求1中所述免疫球蛋白，其中保护性蛋白的氨基酸序列实际上至少与兔多聚免疫球蛋白受体的第1至第606氨基酸序列部分相应，但不含与兔多聚免疫球蛋白受体的第628 - 755氨基酸残基序列相应的氨基酸序列。
- 30 12. 权利要求10或11中所述的免疫球蛋白，其中保护性蛋白的氨基酸序列不含有相应于兔多聚免疫球蛋白受体第628 - 775氨基酸序列相应的

序列；但含有与下列氨基酸片段之一或一个以上的片段相应的氨基酸序列：

- a)与兔多聚免疫球蛋白受体第 21 - 43 氨基酸相应的氨基酸序列；
- b)与兔多聚免疫球蛋白受体第 1 - 118 氨基酸相应的氨基酸序列；
- 5 c)与兔多聚免疫球蛋白受体第 119 - 223 氨基酸相应的氨基酸序列；
- d)与兔多聚免疫球蛋白受体第 224 - 332 氨基酸相应的氨基酸序列；
- e)与兔多聚免疫球蛋白受体第 333 - 441 氨基酸相应的氨基酸序列；
- f)与兔多聚免疫球蛋白受体第 442 - 552 氨基酸相应的氨基酸序列；
- g)与兔多聚免疫球蛋白受体第 553 - 606 或 553 - 627 氨基酸相应的氨基酸序列。

13. 权利要求 1 中所述免疫球蛋白，其中保护性蛋白的氨基酸序列不含有与兔多聚免疫球蛋白受体的第 628 - 775 氨基酸序列相类似的另一种属的多聚免疫球蛋白受体氨基酸残基序列，但含有与下列氨基酸片段之一，或一个以上的片段相类似的另一种属免疫球蛋白受体的氨基酸序列：

- a)与兔多聚免疫球蛋白受体第 21 - 43 氨基酸相应的氨基酸序列；
- b)与兔多聚免疫球蛋白受体第 1 - 118 氨基酸相应的氨基酸序列；
- c)与兔多聚免疫球蛋白受体第 119 - 223 氨基酸相应的氨基酸序列；
- d)与兔多聚免疫球蛋白受体第 224 - 332 氨基酸相应的氨基酸序列；
- e)与兔多聚免疫球蛋白受体第 333 - 441 氨基酸相应的氨基酸序列；
- 20 f)与兔多聚免疫球蛋白受体第 442 - 552 氨基酸相应的氨基酸序列；
- g)与兔多聚免疫球蛋白受体第 553 - 606 或 553 - 627 氨基酸相应的氨基酸序列。

14. 权利要求 13 中所述的免疫球蛋白，它是人类免疫球蛋白。

15. 权利要求 1 中所述的免疫球蛋白，其中保护性蛋白至少包括以下兔多聚免疫球蛋白受体功能区之一的氨基酸序列：功能区 I，功能区 II，功能区 III，功能区 IV，功能区 V，功能区 VI 的从第 553 至 627 氨基酸序列，而不含相应于第 628 - 755 的氨基酸的序列。

16. 权利要求 1 中所述的免疫球蛋白，其中保护性蛋白不含任何与兔多聚免疫球蛋白受体第 628 - 755 的氨基酸序列相应或相似的氨基酸序列；
30 但含有：

a)至少一个功能区，它源于第一动物的多聚免疫球蛋白受体且至少与下列兔多聚免疫球蛋白受体的氨基酸片段部分相类似：功能区 I，功能区 II，

功能区 III，功能区 IV，功能区 V，功能区 VI 的第 553 至 627 氨基酸序列；

5 b)至少一个功能区，它源于第二动物的多聚免疫球蛋白受体且至少与下列兔多聚免疫球蛋白受体的氨基酸片段部分相类似：功能区 I，功能区 II，功能区 III，功能区 IV，功能区 V，功能区 VI 的第 553 至 627 氨基酸序列。

17. 权利要求 1 中所述的免疫球蛋白，其中保护性蛋白不含任何与兔多聚免疫球蛋白受体第 628 - 755 的氨基酸序列相应或相似的氨基酸序列；但含有：

10 a)至少一个氨基酸片段，它源于第一动物的多聚免疫球蛋白受体且至少与下列兔多聚免疫球蛋白受体的氨基酸片段部分相类似：功能区 I，功能区 II，功能区 III，功能区 IV，功能区 V，功能区 VI 的第 553 至 627 氨基酸序列；

15 b)至少一个氨基酸片段，它源于第二动物的多聚免疫球蛋白受体且至少与下列兔多聚免疫球蛋白受体的氨基酸片段部分相类似：功能区 I，功能区 II，功能区 III，功能区 IV，功能区 V，功能区 VI 的第 553 至 627 氨基酸序列。

18. 权利要求 16 中所述的第一动物，它是哺乳动物；第二动物，它是兔。

20 19. 权利要求 16 中所述的第一动物，它是人；第二动物，它是兔。

20. 权利要求 1 中所述免疫球蛋白，其中免疫球蛋白起源的重链至少含有任何亚型的 IgA 或 IgM 重链的一部分。

21. 权利要求 1 中所述免疫球蛋白，其中免疫球蛋白起源的重链由两种不同同种型免疫球蛋白功能区所构成。

25 22. 权利要求 21 中所述的免疫球蛋白功能区，它由下列各组中选出：

a)小鼠 IgG1 的 CH1 和小鼠 IgA 的 CH2 和 CH3；和

b)小鼠 IgG1 的 CH1 和 CH2 和小鼠 IgA 的 CH2 和 CH3。

23. 权利要求 1 中所述的抗原结合功能区，它实质上相应于 Guy's 13 重链可变区。

30 24. 权利要求 2 中所述的抗原结合功能区，它实质上相应于 Guy's 13 重链可变区。

25. 权利要求 1 中所述免疫球蛋白，其中保护性蛋白的第一序列实质上

相应于兔多聚免疫球蛋白受体的第 1 - 606 或 1 - 627 氨基酸的部分序列，而第二序列与第一序列相邻且不含与兔多聚免疫球蛋白受体的功能性跨膜片段的氨基酸残基序列相应的氨基酸序列。

5 26. 权利要求 25 中所述的第二氨基酸序列，它具有与多聚免疫球蛋白受体的第 665 - 755 氨基酸相应的氨基酸序列。

27. 权利要求 25 中所述的第二氨基酸序列，它为下列组分之一或多种组分：多聚免疫球蛋白分子的细胞内功能区，免疫球蛋白基因超家族成员之一的功能区，一种酶，一种毒素或一种连接片段。

28. 一种真核细胞，它含有权利要求 1 - 24 所述的免疫球蛋白。

10 29. 权利要求 28 所述的真核细胞，它是一种植物细胞。

30. 权利要求 29 所述的植物细胞，它是一种植物的部分组织。

31. 一种含有编码保护性蛋白核苷酸序列的真核细胞。

15 32. 权利要求 31 所述的真核细胞，它亦含有编码至少下列所选分子之一的第二核苷酸序列：一条至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的重链，一条至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的轻链，或一条免疫球蛋白的 J 链。

33. 权利要求 32 所述的真核细胞，它除含有编码免疫球蛋白重链的第二核苷酸序列外亦含有编码至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源轻链的第三核苷酸序列。

20 34. 权利要求 33 所述的真核细胞，它亦含编码免疫球蛋白 J 链的第四核苷酸序列。

35. 权利要求 31-34 所述的真核细胞，它是一种植物细胞。

36. 一种植物细胞，它含有编码保护性蛋白的核苷酸序列，亦含有编码至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的重链的核苷酸序列。

25 37. 一种含有保护性蛋白的真核细胞。

38. 权利要求 37 所述的真核细胞，它亦至少含有下列之一的附加分子：一条至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的重链，一条至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的轻链或一条免疫球蛋白 J 链。

30 39. 权利要求 38 所述的附加分子，它是至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的重链，亦含有免疫球蛋白起源的轻链，轻链上至少含有部分抗原结合功能区。

40. 权利要求 37 中所述的真核细胞, 它亦含免疫球蛋白 J 链。
41. 权利要求 37 - 40 所述的真核细胞, 它是一种植物细胞。
42. 权利要求 29, 35, 36, 41 中所述的植物细胞, 它源于双子叶或单子叶植物。
- 5 43. 权利要求 29, 35, 36, 41 中所述的植物细胞, 它源于茄科植物。
44. 权利要求 29, 35, 36, 41 中所述的植物细胞, 它源于苜蓿植物。
45. 权利要求 29, 35, 36, 41 中所述的植物细胞, 它源于烟草植物。
46. 权利要求 29, 35, 36, 41 中所述的植物细胞, 它是植物的部分
- 10 组织。
47. 一种由权利要求 1 - 24 所述免疫球蛋白和植物大分子构成的混合物。
48. 权利要求 47 中所述的混合物, 其中植物分子源于单子叶, 双子叶, 茄科, 苜蓿或烟草植物。
- 15 49. 权利要求 47 中所述的混合物, 其中植物分子是二磷酸核酮糖羧化酶, 集光复合物, 色素, 二级代谢物或叶绿体。
50. 权利要求 47 中所述的混合物, 其中免疫球蛋白浓度为除水外重量的 0.001% 到 99%。
51. 权利要求 47 中所述的混合物, 其中植物大分子浓度为除水外重量的
- 20 1% 到 99%。
52. 生产权利要求 1 - 24 中所述的免疫球蛋白的方法, 它由下列步骤组成:
- a) 将编码保护性蛋白的核苷酸序列与适宜的转录启动子连接后接入表达载体, 导入植物细胞;
- 25 b) 将编码至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白的核苷酸序列与适宜的转录启动子连接后, 接入表达载体导入上述的植物细胞。
53. 权利要求 52 所述方法, 它进一步包括如下步骤:
- C) 将编码至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白的核苷酸序列与适宜的转录启动子连接后, 接入表达载体导入上述的植物细胞。
- 30 54. 权利要求 52, 53 所述方法, 它进一步包括: 将含有编码免疫球蛋白 J 链的核苷酸序列与适宜的转录启动子连接后, 接入表达载体导入上述的植物细胞。

55. 权利要求 52-54 所述方法，其中免疫球蛋白起源的重链是免疫球蛋白 a 链，免疫球蛋白起源的轻链是免疫球蛋白 K 或 λ 链。

56. 权利要求 52-54 所述方法，其中免疫球蛋白起源的重链是由部分免疫球蛋白 a 链和 λ 链的构成的。

5 57. 权利要求 52-54 所述方法，其中植物细胞是一种植物的部分组织。

58. 权利要求 56 中所述方法，其进一步包括所述植物的生长。

59. 权利要求 56 或 57 中所述植物，它是一种单子叶，双子叶，茄科，豆科，苜蓿或烟草植物。

10 60. 权利要求 52-59 中所述的免疫球蛋白起源的重链，它是一种嵌合性免疫球蛋白重链。

61. 一种生产含有植物大分子的治疗性免疫球蛋白的方法，此方法包括：在压力下剪力处理权利要求 30 或 46 中所述的植物的部分，制备含有治疗性免疫球蛋白和植物大分子的匀浆，含植物大分子的液体源于所述植物的原生质体或原地胞质和固体植物起源的物质。

15 62. 权利要求 61 所述的方法，它进一步包括将所述的固体物与液体分离开。

63. 权利要求 61 或 62 的方法，其中植物的部分是叶，茎，根，管，果或全植物。

20 64. 权利要求 61 所述的方法，其中所述的剪力是应用机械装置达到的，可使液体从所述植物的原生质或原地胞质中释出。

65. 权利要求 62 中所述的方法，其中分离是通过离心，沉降，浆凝或过滤而达到的。

66. 一种生产由重链，轻链，J 链和保护性蛋白装配而成的免疫球蛋白分子的方法，其步骤包括：

25 a) 将编码以下成份的核苷酸序列导入真核细胞；

i) 一条至少含有部分抗原结合功能区免疫球蛋白起源的重链；

ii) 一条至少含有部分抗原结合功能区免疫球蛋白起源的轻链；

iii) 一条免疫球蛋白 J 链；

iv) 保护性蛋白；

30 b) 在一定条件下维持所述细胞的生长，使其生产所述的免疫球蛋白重链，轻链，J 链和保护性蛋白并装配成为的免疫球蛋白分子。

67. 在允许蛋白产生和免疫球蛋白装配的条件下，维持真核细胞产生

装配完毕的具有重链，轻链，J链和保护性蛋白的免疫球蛋白分子，此真核细胞含有适宜于表达而连接后编码以下组分的核苷酸序列：

- i) 一条至少含有部分抗原结合功能区免疫球蛋白起源的重链；
- ii) 一条至少含有部分抗原结合功能区免疫球蛋白起源的轻链；
- iii) 一条免疫球蛋白J链；
- iv) 保护性蛋白。

5 68. 权利要求 66-67 中所述的真核细胞，它是一种植物细胞。

69. 制备对环境条件具有抗性的免疫球蛋白的方法，它包括下列步骤：

10 a) 将编码至少含有部分免疫球蛋白重链的抗原结合功能区的核苷酸序列与编码至少含有免疫球蛋白 a 重链的功能区的核苷酸序列相连接形成编码嵌合免疫球蛋白重链的核苷酸序列；

15 b) 在真核细胞中表达上述编码嵌合免疫球蛋白重链的核苷酸序列以产生嵌合免疫球蛋白重链。其真核细胞已含有至少一种下述其它分子：保护性蛋白，至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的轻链和免疫球蛋白J链；

嵌合免疫球蛋白重链与所述的至少一种其它分子装配形成对环境条件具有抗性的免疫球蛋白。

20 70. 权利要求 69 中所述其它分子，它们为保护性蛋白，所说的真核细胞含有一条至少携有部分抗原结合功能的免疫球蛋白起源的轻链和一条免疫球蛋白J链。

71. 在允许蛋白产生和免疫球蛋白装配的条件下，生产对环境条件有抗性的免疫球蛋白的细胞，其含有：

25 a) 编码嵌合免疫球蛋白重链的核苷酸序列，此序列为：编码至少部分抗原结合功能区的免疫球蛋白重链的核苷酸序列与编码至少一个免疫球蛋白 a 重链功能区的核苷酸序列，二序列相互连接，和

b) 至少一种下列的其它蛋白：保护性蛋白，一条至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的轻链和免疫球蛋白J链，故而允许嵌合免疫球蛋白重链与所说的至少一种其它分子装配形成对环境条件具有抗性的免疫球蛋白。

30 72. 权利要求 50 - 52 中所述的真核细胞，它是一种植物细胞。

73. 一种四重转基因组织，它是由含有四种不同的转基因的细胞组成的，每一种基因均编码复合多肽分子中的一个不同多肽，而每一不同多肽

均与所说的复合肽相联。

74. 权利要求 73 中所述转基因组织, 其中四种转基因之一是编码保护性蛋白的转基因。

5 75. 权利要求 73 中所述转基因组织, 其中四种转基因之一是编码至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的重链的转基因。

76. 权利要求 73 中所述转基因组织, 其中四种转基因之一是编码至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的轻链的转基因。

77. 权利要求 73 中所述转基因组织, 其中四种转基因之一是编码 J 链的转基因。

10 78. 权利要求 73 中所述转基因组织, 其中四种转基因之一是编码一种嵌合性免疫球蛋白的转基因。

79. 权利要求 73 中所述转基因组织, 它是一种植物。

80. 权利要求 73 中所述转基因组织, 它是一种哺乳动物组织。

15 81. 权利要求 1 中所述的嵌合性免疫球蛋白重链, 它含有下列免疫球蛋白重链之一的免疫球蛋白功能区: IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, 同时含有 IgA 或 IgM 的保护性蛋白结合功能区。

82. 权利要求 81 中所述的免疫球蛋白重链, 它是人, 啮齿类动物, 兔, 牛, 绵羊, 山羊, 家禽, 犬, 猪或灵长目的免疫球蛋白重链。

20 83. 权利要求 81 中所述的保护性蛋白结合功能区, 它是源于人, 啮齿类动物, 兔, 牛, 绵羊, 山羊, 家禽, 犬, 猪或灵长目的 IgA。

84. 权利要求 81 中所述的嵌合性免疫球蛋白重链, 它是由小鼠 IgG1 的免疫球蛋白重链组成的, 所说的保护性蛋白结合功能区源于小鼠 IgA 或 IgM。

25 85. 权利要求 81 中所述的嵌合性免疫球蛋白重链, 它是由人 IgG, IgM, IgD 或 IgE 的免疫球蛋白功能区构成的, 而所述抗原结合功能区源于人 IgA 或 IgM。

说明书

在植物中生产含有保护性蛋白质的免疫球蛋白的方法和应用

5

本发明为一九九四年十二月三十日美国专利申请的延续 - 档案编号为 08/367, 395。

发明领域:

10 本发明系关于含有保护性蛋白质的免疫球蛋白在植物中的表达与表达该免疫球蛋白的转基因植物, 同时包括该免疫球蛋白的治疗用途。

发明背景:

15 单克隆抗体用于治疗疾病具有极大潜力, 与常规药物相比, 单克隆抗体治疗具有极大优势。如: 独特的选择性, 多效功能, 简便的分子操作, 放射性同位素标记与其它类型的交联等。大量的靶抗原已用于刺激特异性单克隆抗体的产生。见, "Therapeutic Monoclonal Antibodies" C.A.K. Borrebaeck 和 J.W.Larrick 主编 Stockton 出版社, NewYork(1990). "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" M. Rosenberg 和 G.P. Moore 主编, Springer-
20 Verlag, Berlin(1994)。

单克隆抗体治疗应用之一是被动免疫治疗。将外源性免疫球蛋白通过注射和消化吸收直接导入动物体内。为治疗成功, 必须给予动物适量的免疫球蛋白, 因为被动免疫并不依赖被治疗动物本身的免疫反应。所用免疫球蛋白必须对致病原及分子具有特异性, 以期达到治疗效果。与正常免疫反
25 应相比, 被动免疫反应优点之一是可以加速抗体与抗原的接触, 被动免疫也可用于预防疾病的产生及防止感染。

被动免疫的主要用途是治疗细菌感染。近来对抗菌素具有抗性的细菌的产生使被动免疫治疗细菌感染更具发展前景。抗菌素治疗单一病原菌往往会影
30 响大量正常菌群, 此乃不希望发生的副作用。另一用途为用特异性免疫球蛋白抑制菌群中特异致病菌的功能。因此可用某种特异性的纯化的免疫球蛋白去提供防止病原菌侵入的被动屏障。

除此之外, 用于被动免疫的免疫球蛋白必须达到某种要求, 如: 口腔服

用的免疫球蛋白，必须：1.在极苛刻的环境下，如：胃肠道环境仍然保持其功能。2.免疫球蛋白必须对蛋白酶的作用具有抗性，以免在对抗靶抗原之前被降解。

5 某些类型的细胞，如：上皮细胞，肝细胞，能够包装免疫球蛋白分子使其特异性地在严苛环境中不失功能。这些免疫球蛋白为分泌型免疫球蛋白(sIg)，包括分泌型 IgA(SIgA)和分泌型 IgM(SIgM)。内源性分泌型免疫球蛋白具有的保护作用已被证明。分泌型免疫球蛋白抗细菌感染的机制包括：直接杀伤，凝集，表面接触与侵袭的抑制，使酶和毒素失活，调理，激活补体等。但不仅限于上述几种。

10 内源性的 SIgA 暴露于非常严苛的环境中，在此环境中大量蛋白酶如：肠道和细菌的蛋白酶具有极高活性，同时存在变性剂如：胃酸等。

分泌型免疫球蛋白成份之一，即分泌片可防止上述失活剂对免疫球蛋白的作用，从而增加分泌型免疫球蛋白的生物效能。

15 此类分泌型免疫球蛋白，如 SIgA 和 SIgM 的合成和装配机理非常复杂。在动物细胞中分泌型免疫球蛋白的装配涉及不同细胞类型。每一分泌型免疫球蛋白均由免疫球蛋白重链，轻链，结合链(J链)和分泌片所组成。产生免疫球蛋白的 B 细胞制造和装配免疫球蛋白重链，轻链，结合链(J链)并使其相连形成 IgM 或 IgA 的二聚体或多聚体。第二类细胞，即上皮细胞或肝细胞产生分泌片。分泌型免疫球蛋白在此类细胞中装配并分泌到细胞外。

20 这类细胞装配和分泌分泌型免疫球蛋白的机理非常复杂，需由粘膜组织提供独特的微环境。这种微环境将产生多聚免疫球蛋白的 B 细胞置于装配和分泌分泌型免疫球蛋白的细胞附近，使免疫球蛋白分泌至动物的粘膜表面。

存在于上皮细胞的多聚免疫球蛋白受体(PIgR)，可特异性识别与结合含有 J 链的多聚免疫球蛋白并将其转入细胞。然后通过上皮细胞运输出去。

25 表达于细胞嗜碱性外表面的 PIgR，含有 18 个氨基酸组成的 N - 末端信号肽，629 个氨基酸组成细胞外多聚免疫球蛋白结合部分，23 个疏水基因组成的细胞膜转运片段和 103 个氨基酸组成的细胞质尾部。细胞外部分含有五个 110 - 111 个氨基酸组成的类似免疫球蛋白的功能区构成分子的分泌形式。见，Mostov, Ann. Rev. Immunol., 12: 63-84(1994)。多聚免疫球蛋白受体被切断去产生成熟的分泌部分的位置，目前尚不清楚。

30

在动物中，多聚免疫球蛋白受体位于上表皮细胞的嗜碱性细胞的表面，

产生于B细胞并含有J链的多聚免疫球蛋白与受体结合并进入细胞，通过上皮细胞转运最终分泌到粘膜表面。这种穿越上皮细胞的转运，利用蛋白分解及磷酸化作用，以产生含有分泌片的成熟SIg。分泌型免疫球蛋白的组合，需由粘膜微环境中不同细胞的相互配合，特别是B淋巴细胞和上皮

5 细胞。

在转基因组织中，如在小鼠组织中产生免疫球蛋白十分困难。真菌或植物的转基因组织不含有产生分泌型免疫球蛋白所需的适宜细胞类型和粘膜微环境。在本发明之前，在转基因组织和培养细胞中大量生产分泌型免疫球蛋白是不可能的。用转基因和细胞培养生产分泌型免疫球蛋白，必须在

10

B淋巴细胞中表达免疫球蛋白重链，轻链，和结合链(J链)。去模拟适宜的粘膜微环境，必须有PIgR受体的细胞存在于表面，而这种细胞必须同时与B淋巴细胞密切作用才能去组合具有功能的分泌型免疫球蛋白。

15

这种需要分泌型免疫球蛋白自然组合的精细过程是很难在转基因组织和培养细胞中重复出来的。在细胞培养和转基因组织中产生SIg，需在人工系统中将体外产生免疫球蛋白细胞的功能与上皮细胞的功能结合在一起。进一步说，如果转基因组织为真菌，细菌或植物，这种受体介导的细胞，跨细胞转运及分泌是不存在的。因为这些组织缺少上皮细胞和所需的粘膜微环境。

20

目前为止，在相同细胞内装配重链，轻链，结合链(J链)的免疫球蛋白已有报道。见，Carayannopoulos Proc. Nat Acad. Sci., U.S.A., 91: 8348-8352(1994)。然而，在单一细胞中装配具有附加蛋白质成份和分泌片的免疫球蛋白尚未见报道。

25

本发明阐述一种新的装配复合分子的方法。即摒弃在上皮细胞表面通过多聚免疫球蛋白受体与免疫球蛋白的相互作用，而装配四聚复合体。我们装配由a.J和K免疫球蛋白链和源于PIgR的保护性蛋白所组成的分泌型免疫球蛋白。此发明的转基因植物能更有效的装配分泌型免疫球蛋白。本发明使被动免疫治疗更经济可行。

发明概述:

30

本发明意在构建一种新型的免疫球蛋白分子。此种蛋白含有与免疫球蛋白重链相关的保护性蛋白，而重链至少含有部分抗原结合功能区。另一方面，进一步构建与免疫球蛋白重链相关的含有部分抗原结合功能区的轻

链。

本发明的保护性蛋白使免疫球蛋白具有对抗化学降解及酶解的功能，对变性亦具抗力。这种保护性蛋白加强免疫球蛋白对环境的抗力。

本发明的保护性蛋白由任何种属多聚免疫球蛋白受体的第 1 至 606 氨基酸残基的片段组成，其它保护性蛋白包括含有部分 PIgR 分子的保护性蛋白。

例如，保护性蛋白可由以下部分或全部序列组成：

第 1 - 118 氨基酸(兔 PIgR 第 I 功能区)

第 1 - 223 氨基酸(兔 PIgR 第 II 和第 III 功能区)

10 第 1 - 332 氨基酸(兔 PIgR 第 I, II 和第 III 功能区)

第 1 - 441 氨基酸(兔 PIgR 第 I, II, III, IV 功能区)

第 1 - 552 氨基酸(兔 PIgR 第 I, II, III, IV, V 功能区)

和 PIgR 的第 1 至 606 或第 1 至 627 氨基酸，只要不形成功能性跨膜转运片段，其余的氨基酸，如 PIgR653-755 氨基酸或其它来源的 PIgR 序列均可包括在内。

本发明的免疫球蛋白另一优选实例为：该蛋白含有的保护性蛋白的第一氨基酸序列至少部分与兔多聚免疫球蛋白受体的第 1 至 606 或 627 氨基酸残基相应，而第二氨基酸序列与上述第一氨基酸序列相接。但第二氨基酸序列不相应与兔多聚免疫球蛋白受体的跨膜转运片段的序列。

20 进一步优选实例为：第二氨基酸序列至少部分与多聚免疫球蛋白受体的第 655 至 755 氨基酸残基相应。换言之，第二氨基酸序列至少要含有下例之一：多聚免疫球蛋白分子的细胞内功能区。免疫球蛋白超家族基因之一的功能区，一种酶，一种毒素或一种联接子。

本发明意在构建的保护性蛋白，不含有与多聚免疫球蛋白受体的跨膜片段相关的序列，而含有与细胞内功能区有关的氨基酸序列，因而是一种受体的删除变异性。

本发明亦构建另一种免疫球蛋白，该保护性蛋白源于与兔多聚免疫球蛋白受体相似的其它种属的受体，不含有与兔的受体相类似的 288 - 755 氨基酸序列，但含有下列至少部分与兔的受体相类似的氨基酸序列或功能区：

第 20 - 45

第 1 - 120

第 120 - 230

第 230 - 340

第 340 - 456

第 450 - 550 或 570

5 第 550 或 570 至 606 - 627

氨基酸序列相应的氨基酸残基。

本发明的保护性蛋白可源于许多种属，包括源于哺乳动物，犬类，人类，牛，猪，飞禽，鼠，大鼠，豚鼠，鸡或其它鸟类和兔类。

10 本发明的免疫球蛋白含有两种或四种免疫球蛋白起源的重链，这些重链至少含有部分与保护性蛋白相关的抗原结合功能区。同时含有两种或四种免疫球蛋白起源的轻链，这些轻链至少含有部分与重链相结合的抗原结合功能区。

15 本发明进一步构建的免疫球蛋白含有免疫球蛋白 J 链，此 J 链至少与重链之一结合。本发明的免疫球蛋白各组成部分通过氢键，双硫键，共价键，离子键或上述各键而结合在一起。免疫球蛋白中含的保护性蛋白和/或免疫球蛋白起源的重链，轻链，J 链均不含 N 端连接和/或 O - 连接的寡糖。

20 本发明的免疫球蛋白可作为抗粘膜表面致病原抗原的治疗性免疫球蛋白。它的优化实例为能够与 *S. mutans* 血清型抗原 c, e 和 f; 及结晶型抗原 d 和 g(原命名为 *S. mutans* a, c, d, e, f, g, h 抗原)结合而防止龋齿的发生。

25 本发明亦制备含有本发明免疫球蛋白的真核细胞，包括植物细胞。同时制备含有编码保护性蛋白的核苷酸序列和含有编码免疫球蛋白重链(至少含有部分抗原结合功能区)的核苷酸序列的真核细胞，包括植物细胞。我们亦制备了含有编码免疫球蛋白的轻链(至少含有部分抗原结合功能区)的核苷酸序列的真核细胞，包括植物细胞。构建的含有本发明所示的编码免疫球蛋白的核苷酸序列的真核细胞，包括植物细胞，能够与 *S. mutans* 的血清型抗原 a, c, d, e, f, g, h 结合。为表达该蛋白，RNA 和适当的 DNA 核苷酸序列已经过适当重排。

30 本发明的植物细胞，包括苜蓿和烟草，只为整个植物的一部分，我们同时意在应用所有类型的单子叶和双子叶植物。

本发明旨在构建一种含有免疫球蛋白和植物大分子的结构，这些植物大分子可源于一种植物且对完成免疫球蛋白的功能具有帮助作用。此结构中

特别需要含有双磷酸核酮糖羧化酶，集光复合体，色素，二级代谢物或叶绿体。本发明的免疫球蛋白，理想的成份组合中除水外，免疫球蛋白的浓度应在 0.001%-99.9%之间(重量比)。更为理想的成份组合中，浓度应在 0.1%-99%之间。而植物大分子的浓度占 1%-99%之间。

5 本发明制备免疫球蛋白的方法为：将含有连与翻译启动子的编码保护性蛋白的核苷酸序列的表达载体引入植物细胞，再将含有连与翻译启动子的编码免疫球蛋白的重链(至少含有部分抗原结合功能区)的核苷酸序列的表达载体引入相同细胞。其它方法有：将含有连与翻译启动子的编码免疫球蛋白的轻链(至少含有部分抗原结合功能区)的核苷酸序列的表达载体引入
10 相同细胞。将含有连与翻译启动子的编码免疫球蛋白的 J 链(至少含有部分抗原结合功能区)的核苷酸序列的表达载体引入植物细胞。

将含有免疫球蛋白重链(至少含有部分抗原结合功能区)，轻链(至少含有部分抗原结合功能区)，J 链和保护性蛋白的核苷酸序列的表达载体引入真核细胞去生产包装完毕的免疫球蛋白重链，轻链，J 链和保护性蛋白。研究维持真核细胞生长的条件，使真核细胞产生并包装免疫球蛋白重链，轻
15 链，J 链和保护性蛋白，以形成含有保护性蛋白免疫球蛋白。

本发明意在改造免疫球蛋白的产生方式，使其对不同的环境条件及苛刻条件更具抗力，即更稳定。此方法为：连接编码免疫球蛋白重链的抗原结合区域的部分核苷酸序列与编码免疫球蛋白 u 或 a(IgM 或 IgA)重链的区域的核苷酸序列，形成编码嵌合免疫球蛋白重链的核苷酸序列，并在真核细胞中表达该序列。此表达序列至少含有以下序列之一：保护性蛋白质，至少携有部分抗原结合区的免疫球蛋白轻链和免疫球蛋白 J 链。更进一步的改进是允许嵌合免疫球蛋白重链与相同细胞内其它分子装配以形成对环境
20 具有抗性的免疫球蛋白，且更稳定。

本发明的免疫球蛋白的大规模生产是通过种植含有免疫球蛋白的植物进而提取该蛋白而完成。具体讲，生产治疗性免疫球蛋白的步骤包括：收集植物的叶，茎，根，管，花，仔，果实或整个植物。剪碎植物，高压处理，制成含有治疗性免疫球蛋白和植物大分子的液体部分和固体部分的匀浆。进一步分离液体和固体部分。应用机械破碎或酶解方法，释放液体部分，然后选择性应用离心，沉降，絮凝或过滤的方法完成分离。
30

本发明的免疫球蛋白为嵌合性的，即：含有源于两种不同免疫球蛋白分

子的免疫球蛋白区域组成，特别是此免疫球蛋白含有 IgG， IgM 和 IgA 的组分。

本发明意在构建由不同亚型免疫球蛋白来源的区域构成重链的免疫球蛋白。具体讲，所用的免疫球蛋白区域至少由小鼠的 IgG， IgG1， IgG2a，
5 IgG2b， IgG3， IgA， IgE， IgD 的 CH1， CH2， CH3 或 Cvar 区组成。另外，也可由小鼠的 IgM 的 Cu1， Cu2， Cu3 或 Cu4 区组成免疫球蛋白的重链。

此发明同时意在构建由人的 IgG， IgG1， IgG2， IgG3， IgG4， IgA1， IgA2 或 IgD 的 CH1， CH2， 或 CH3；人的 IgM 的 Cu1， Cu2，
10 Cu3， Cu4 或 Cvar 等不同区域构成的重链组分的免疫球蛋白。哺乳动物，啮齿类动物的任何一种 IgG 亚型， IgA 亚型， IgE， IgM 或 IgD 的不同组分构建免疫球蛋白也在计划之中。

本发明意在完成四基因转化组织。即：该组织由已转入四种不同基因的细胞组成。每种基因均编码不同的多肽或复合肽分子，亦或多肽之一能相互组合形成复合肽分子。本发明构建的转基因组织中的四种基因可编码保护性蛋白，转基因组织中的细胞表达的保护性蛋白能与免疫球蛋白的重链
15 组装以形成免疫球蛋白。转基因组织中的细胞所表达的四基因，有至少含有部分抗原结合区的重链，至少含有部分抗原结合区的轻链，J 链和保护性蛋白。在另外的理想转基因组织中，细胞含有编码嵌合免疫球蛋白重链， IgA 重链来源的免疫球蛋白重链， IgM 重链来源的免疫球蛋白重链，
20 或其它亚型免疫球蛋白重链的基因。

植物是本发明最理想的转基因组织。我们应用了不同类型和不同种属的植物。另外，本发明亦重在应用哺乳动物作为含有不同分子的转基因研究对象。亦已完成哺乳动物转基因组织，该组织含有编码不同的多肽的四种
25 基因。

插图简述：

首先简单描述插图

图 1 人工合成的寡核苷酸 J1-J5 - 用于扩增构建 IgG/A 重链所需的
30 Guy's13 和 a 链的 DNA 片段。(加线处表示限制性内切酶切点)。图示每一寡聚核苷酸编码的相对位置，同时表示出组合不同 DNA 片段在植物中表达所产生的重组重链。

发明的具体阐述:

A. 定义

5 双子叶: 开花植物, 胚胎为双子叶, 双子叶植物有: 烟草; 西红柿; 豆
科植物(包括: 苜蓿); 橡树; 槭树; 玫瑰; 薄荷; 南瓜; 雏菊; 胡桃树;
仙人掌; 紫罗兰和金风花等。

单子叶: 开花植物, 胚胎为单子叶, 单子叶植物有: 百合花; 草; 玉米;
谷物(包括: 燕麦, 小麦和大麦); 兰花; 鸢尾属植物; 洋葱和棕榈等。

10 低等植物: 任何无花植物(包括: 羊齿植物, 针叶树, 马尾草, 苔, 活
的树疣, 红色海藻, 棕色海藻, 绿色海藻等)。

真核细胞杂交载体: 一种能够将编码多肽(插入子)的 DNA 导入真核细
胞的 DNA。

15 染色体外核糖体 DNA(rDNA): 单细胞真核生物中存在于染色体外的
DNA, 携有一种或多种编码核糖体 RNA 且能自动复制的基因(独立于染色
体复制)。

回文 DNA: 具有一个或多个对称中心的 DNA 序列。

DNA: 脱氧核糖核酸。

T - DNA: 被转移的 DNA 片段。

r-DNA: 核糖体 DNA。

20 RNA: 核糖核酸。

r-RNA: 核糖体 RNA。

Ti-质粒: 肿瘤诱导质粒。

Ti-DNA: 源于 Ti-质粒的 DNA 片段。

25 插入子: 与核糖体 DNA 异源的 DNA 序列, 由结构基因和选择性的附加
DNA 序列组成。

结构基因: 编码多肽的基因, 具有适宜的启动子。终止序列和选择性的
DNA 调节序列, 且有正确的阅读框架。

信号序列: 编码与多肽相连的一段氨基酸的 DNA 序列, 此氨基酸序列
将多肽联接于内质网, 为蛋白质分泌所必需。

30 遗传标志: 一段编码表型特征的 DNA 序列, 应用此 DNA 可选择转化细
胞。

启动子: 一段或一组 DNA 序列上的识别位点, 控制基因表达。 RNA 聚

合酶特异性地与其结合从而起动基因的 RNA 合成。

可诱导启动子：可被外源刺激物调节其 RNA 聚合酶结合并起动的启动子。这些刺激包括：光，热，缺氧，营养条件改变，增加或去除某种代谢物，加入配体，微生物攻击，损伤等。

- 5 病毒启动子：具有与病毒基因 5'端启动子相似 DNA 序列的启动子。典型的病毒启动子，存在于 MMTV 5'端编码 P21 蛋白的基因中。见 Huang 等., Cell, 27: 245(1981)。另一例子为由 Benfey 等., Science, 25: 959(1990)。发现于花柳叶镶嵌病毒的 35S 转录过程中的启动子。

10 合成启动子：化学合成而非生物起源的启动子，通常合成启动子具有某些序列改变以使 RNA 聚合酶起效率更高。

基本启动子：RNA 聚合酶结合和起始速率基本稳定，相对不受外界刺激影响的启动子。如：Poszkowski 等., EMBOJ., 3: 2719(1989)和 Odell 等., Nature, 313: 810(1985)所讲过的花柳叶镶嵌病毒的 35S 和 19S 启动子。

- 15 调节启动子：发育过程中 RNA 聚合酶结合与起速率在某一特殊时期或在某一组织的特殊结构中有所变化的启动子或二者兼具。如 chua 等., Science, 244: 174-181(1989)所述。

20 单链抗原结合蛋白：免疫球蛋白轻链可变区氨基酸序列 VL 的羧基端通过一多肽与免疫球蛋白重链可变区氨基酸序列 VH 的氨基端联接构成的多肽。一般来说，连接多肽将任何重链和轻链的抗原结合蛋白连接以形成单一多肽而具有结合功能区构型均可行，包括：VH - 多肽 - VL，VH - 多肽 - 轻链或 VL - 多肽 - Fd。

单链抗原结合蛋白编码基因：编码单链抗原结合蛋白的重组基因。

- 25 多肽和肽：氨基酸基因相互之间通过肽键，即： α -氨基与相邻氨基酸残基的羧基结合联接形成的线性结构。

蛋白质：多于 50 个氨基酸残基相互以肽键联接形成的线性结构。

- 30 免疫球蛋白产物：至少含有免疫球蛋白重链活性部分因而能够与抗原特异性结合的多肽或蛋白质。如：免疫球蛋白重链，免疫球蛋白分子，实际上完整的免疫球蛋白分子，含有互补位的部分免疫球蛋白，包括：Fab 片段，Fab'片段，F(ab')₂片段和 FV 片段。

免疫球蛋白分子：免疫球蛋白重链与轻链的免疫学活性部分通过共价键联接形成的蛋白质能够与抗原特异性结合。

免疫球蛋白起源的重链：由至少含有部分免疫球蛋白重链抗原结合区，部分可变区，部分稳定区形成的多肽，此重链具有与免疫球蛋白基因超家族成员的重要部分同源的氨基酸序列。Fab 片段的重链，即为免疫球蛋白起源的重链。

- 5 免疫球蛋白起源的轻链：由至少含有部分免疫球蛋白轻链抗原结合区，部分可变区，部分稳定区形成的多肽，此轻链具有与免疫球蛋白基因超家族成员的重要部分同源的氨基酸序列。

10 抗原结合功能区：免疫球蛋白上可特异性与抗原结合的多肽部分，免疫球蛋白重链和轻链的抗原结合结合功能区与抗原结合，此功能区也可存在于单一多肽链上。

J 链：与免疫球蛋白聚合和聚合免疫球蛋白通过上皮细胞转运有关的多肽。见，Immunoglobulin helper: The J chain in Immunoglobulin Genes, 345 页, Academic Press(1989)。IgM 多聚体和 IgA 二聚体中含有 J 链，通过二硫键相联，J 链的研究限于小鼠与人。

- 15 Fab 片段：由部分免疫球蛋白分子组成的蛋白质，含有共价结合的免疫球蛋白重链与轻链的活性部分，具有特异性与抗原结合的能力。用木瓜蛋白酶消化裂解完整的免疫球蛋白分子，产生 Fab 片段。亦可通过在宿主细胞中表达免疫球蛋白重链和轻链制备 Fab 片段。

20 FV 片段：免疫球蛋白重链与轻链的可变区的活性部分通过共价键结合形成的蛋白质，具有特异性与抗原结合的能力。通过在宿主细胞中表达免疫球蛋白重链和轻链的可变区，制备 FV 片段。

无性繁殖：用切下的叶，茎，根，单一植物细胞或胼胝再生，整个植物而产生后代的方式。

- 25 自花授粉：在同一植物上，花粉从雄性花部分传至雌性花部分，此过程通常产生籽。

异花授粉：花粉从一植物的雄花部分传至另一植物的雌花部分，此过程通常产生能繁殖的籽。

表位：特异性由免疫球蛋白产物所识别的分子部分，亦称决定簇或抗原决定簇。

- 30 嵌合免疫球蛋白重链：由至少含有源于不同亚型免疫球蛋白重链或某些其它肽，多肽，或蛋白质的部分氨基酸序列而组成的免疫球蛋白重链。通常，嵌合免疫球蛋白重链的氨基酸序列，源于至少二种不同亚型免疫球蛋白

白的重链。

转基因：被引入一种动物的生殖细胞系的基因，基因可在早期发育阶段引入动物，亦可通过逆转录病毒在晚期引入动物细胞。

复合分子：一种以上的肽或多肽通过化学键连接构成的分子。

5

B.含有保护性蛋白的免疫球蛋白

本发明为制备含有保护性蛋白的免疫球蛋白提供了新的方法。免疫球蛋白含有与免疫球蛋白起源的重链相关的保护性蛋白，而重链至少含有部分抗原结合功能区。

10

本发明的保护性蛋白的氨基酸序列部分相应或相似于兔多聚免疫球蛋白受体的第1至627以上氨基酸序列。本蛋白起源于兔多聚免疫球蛋白受体的前体蛋白，但不含兔多聚免疫球蛋白受体的第627以上氨基酸序列的核苷酸或氨基酸序列的类似物。如由 Moston 等报告：Nature, 308: 37(1984)和 EMBL/基因库 K01291。兔多聚免疫球蛋白受体的核苷酸序列为

15

SEQ ID No.1 和相关的氨基酸序列为 SEQ ID No.2。

20

任何种属的多聚免疫球蛋白受体均可作为保护性蛋白的来源。这些蛋白源于前体蛋白，但不含有前体蛋白，而前体蛋白不含有免疫球蛋白第1至627氨基酸序列以外的氨基酸序列或类似物。理想的实例是：保护性蛋白来源于任何种属的前体蛋白，至少含有部分与多聚免疫球蛋白受体第1至

606氨基酸序列相似的序列，而不含第607至755氨基酸序列类似的序列。

25

人多聚免疫球蛋白受体的序列已确定并报告。Krajci 等., Eur. J. Immunol., 22: 2309-2315(1992)和 Krajci 等., Biochem. Biophys. Res. Comm., 158: 783-789(1989)和 EMBL/基因库 Accession No.X73079。人多聚免疫球蛋白受体核苷酸序列为 SEQ ID No.3 和相关的氨基酸序列为

SEQ ID No.4。人多聚免疫球蛋白受体与兔多聚免疫球蛋白受体具有很大的序列同源性和功能区结构相似性。见, Kraehenbuhl 等., Trends in Cell Biol., 2: 170(1992)。人多聚免疫球蛋白受体与兔多聚免疫球蛋白受体的功能区与氨基酸序列的相似性见表1。

30

Banting 等., FEBS Lett., 254: 177-183(1989)和 EMBL/基因库 Accession No.X15741 已确定并报告了大鼠的多聚免疫球蛋白受体，大鼠多聚免疫球蛋白受体的核苷酸序列为 SEQ ID No.9 和相关的氨基酸序列为 SEQ ID No.10。大鼠多聚免疫球蛋白受体与兔多聚免疫球蛋白受体具有序

列同源性和功能区结构相似性。见 Knaehenbuhl 等., T. Cell Biol., 2: 170(1992)。大鼠多聚免疫球蛋白受体与兔多聚免疫球蛋白受体功能区与氨基酸序列的相似性见表 1。

牛多聚免疫球蛋白受体的序列已确定并报告在 EMBL/基因库 Accession No.X81371。牛多聚免疫球蛋白受体核基酸序列为 SEQ ID No.5 和相关的氨基酸序列为 SEQ ID No.6。牛多聚免疫球蛋白受体与兔和人多聚免疫球蛋白受体具有序列同源性和功能区结构相似性。牛多聚免疫球蛋白受体与兔多聚免疫球蛋白受体的功能区与氨基酸序列的相似性见表 1。

Piskurich 等., J. Immunol., 150: 38(1993)和 EMBL/基因库 Accession No.U06431 已确定并报告了小鼠的多聚免疫球蛋白受体的序列, 小鼠多聚免疫球蛋白受体的核苷酸序列为 SEQ ID No.7 和相关的氨基酸序列为 SEQ ID No.8。小鼠多聚免疫球蛋白受体与兔多聚免疫球蛋白受体具有序列同源性和功能区结构相似性。小鼠多聚免疫球蛋白受体与兔多聚免疫球蛋白受体序列和功能区与氨基酸序列的相似性见表 1。

本发明意在应用任何种属的多聚免疫球蛋白受体部分序列, 以产生保护性蛋白。不同种属的多聚免疫球蛋白受体的功能区使得可以在不同种属中选择相似的氨基酸序列。本发明就是应用从不同种属的多聚免疫球蛋白受体中选择相似的氨基酸序列。几种多聚免疫球蛋白受体的序列中的相似序列已例于表 1。

表 1: 几种多聚免疫球蛋白受体氨基酸序列的相似区, 核苷酸序列大致与分子功能区的范围相等。

	兔 (SEQ ID NO.2)	牛 (SEQ ID NO.6)	人 (SEQ ID NO.4)	大 鼠 (SEQ ID NO.10)	小 鼠 (SEQ ID NO.8)
功能区 I 的 免疫球蛋白 结合残基	21 - 43	-13 - 45	-13 - 45	-13 - 45	-13 - 45
功能区 I	1 - 118	1 - 120	1 - 120	1 - 120	1 - 120
功能区 II	119 - 223	110 - 230	110 - 230	110 - 230	110 - 230
功能区 III	224 - 332	210 - 340	210 - 340	210 - 340	210 - 340
功能区 IV	333 - 441	320 - 450	320 - 450	320 - 450	320 - 450
功能区 V	442 - 552	440 - 570	440 - 550	440 - 550	440 - 550
功能区 VI 的细胞外部 分	553 - 606 & 553 - 627	550 - 606 & 550 - 627			
跨膜片段	630 - 652	625 - 660	625 - 660	625 - 660	625 - 660
细胞内部分	653 - 755	650 - end	650 - end	653 - end	653 - end

5 本发明的保护性蛋白，可以仅含有多聚免疫球蛋白受体的部分而不是全部氨基酸序列。在实际应用中，保护性蛋白至少要含有多聚免疫球蛋白受体的第 1 - 606 氨基酸的部分序列。与天然多聚免疫球蛋白不同，本发明的保护性蛋白源于前体蛋白，此前体蛋白源于天然多聚免疫球蛋白受体，但不含有第 627 氨基酸残基以上的氨基酸序列，此保护性蛋白的氨基酸数目可以多于或少于分泌片。理想的设计是：本发明的保护性蛋白不含有天然兔多聚免疫球蛋白受体中第 606 氨基酸残基以上氨基酸序列，而用天然多聚免疫球蛋白部分序列作为保护性蛋白。在另外的设计中，此保护性蛋白可终止在第 606 - 627 氨基酸序列的任一氨基酸残基，如：607，608，
10 609，610，611，612，613，614，615，616，617，618，619，
15 620，621，622，623，624，625，626 位。

本发明的保护性蛋白应具与下例氨基酸序列相应的氨基酸序列：

1. 与兔多聚免疫球蛋白功能区 I 的第 21 - 43 氨基酸相应的氨基酸；

- 2.与兔多聚免疫球蛋白功能区 I 的第 1 - 118 氨基酸相应的氨基酸;
- 3.与兔多聚免疫球蛋白功能区 II 的第 119 - 223 氨基酸相应的氨基酸;
- 4.与兔多聚免疫球蛋白功能区 III 的第 224 - 332 氨基酸相应的氨基酸;
- 5.与兔多聚免疫球蛋白功能区 IV 的第 333 - 441 氨基酸相应的氨基酸;
- 5 6.与兔多聚免疫球蛋白功能区 V 的第 442 - 552 氨基酸相应的氨基酸;
- 7.与兔多聚免疫球蛋白功能区 VI 的第 553 - 606 或 553 - 627 氨基酸残基相应的氨基酸, 但不含与第 607 - 755 或 628 - 755 氨基酸残基相应的氨基酸。

10 应注意到的是在每 20 个氨基酸内, 功能区的确切界限可能改变, 但有经验者可清楚功能区的结构和界限。

另外, 本发明构建的保护性蛋白终止氨基酸序列, 无论是在兔多聚免疫球蛋白受体或其它种属中相应的氨基酸序列, 均为第 58 - 605 氨基酸残基。

15 在另外的优选实例中, 保护性蛋白源于特殊种属的多聚免疫球蛋白受体, 但氨基酸序列相应于下例氨基酸序列片段。

- 1.与兔多聚免疫球蛋白功能区 I 的第 21 - 43 氨基酸相应的氨基酸;
- 2.与兔多聚免疫球蛋白功能区 I 的第 1 - 118 氨基酸相应的氨基酸;
- 3.与兔多聚免疫球蛋白功能区 II 的第 119 - 223 氨基酸相应的氨基酸;
- 4.与兔多聚免疫球蛋白功能区 III 的第 224 - 332 氨基酸相应的氨基酸;
- 20 5.与兔多聚免疫球蛋白功能区 IV 的第 333 - 441 氨基酸相应的氨基酸;
- 6.与兔多聚免疫球蛋白功能区 V 的第 442 - 552 氨基酸相应的氨基酸;
- 7.与兔多聚免疫球蛋白功能区 VI 的第 553 - 606 或 553 - 627 氨基酸残基相应的氨基酸, 但不含与第 607 - 755 或 628 - 755 氨基酸残基相应的氨基酸序列。

25 另一优选实例即保护性蛋白由兔多聚免疫球蛋白受体的功能区 I, IV, V 和 VI 的第 550 - 606 或 550 - 627 氨基酸残基组成或由其它种属的多聚免疫球蛋白受体上与此序列相类似的氨基酸序列组成。

30 另外, 本发明的保护性蛋白序列源于兔多聚免疫球蛋白受体同源的其它种属的受体, 其中至少部分氨基酸序列与第 1 - 627 氨基酸残基类似。该部分氨基酸序列至少部分相应于该种属的多聚免疫球蛋白受体细胞内功能区的氨基酸序列。

另一优选实例为保护性蛋白一种与兔多聚免疫球蛋白受体的氨基酸序

列组成，该序列至少部分与兔免疫球蛋白受体的第 1 - 606 氨基酸序列相类似。

另一选择是本发明的保护性蛋白的氨基酸序列，如不是源于兔多聚免疫球蛋白受体，至少相应或相似于下列部分氨基酸序列：

- 5 1.与兔多聚免疫球蛋白功能区 I 的第 21 - 43 氨基酸相应的氨基酸；
- 2.与兔多聚免疫球蛋白功能区 I 的第 1 - 118 氨基酸相应的氨基酸；
- 3.与兔多聚免疫球蛋白功能区 II 的第 119 - 223 氨基酸相应的氨基酸；
- 4.与兔多聚免疫球蛋白功能区 III 的第 224 - 332 氨基酸相应的氨基酸；
- 5.与兔多聚免疫球蛋白功能区 IV 的第 333 - 441 氨基酸相应的氨基酸；
- 10 6.与兔多聚免疫球蛋白功能区 V 的第 442 - 552 氨基酸相应的氨基酸；
- 7.与兔多聚免疫球蛋白功能区 VI 的第 553 - 606 或 553 - 627 氨基酸残基相应的氨基酸，但不含与第 607 - 755 或 628 - 755 氨基酸残基相应的氨基酸序列。

另一优化实例中，本发明的保护性蛋白的第一氨基酸序列相应于兔多聚免疫球蛋白受体的第 1 - 606 或 1 - 627 氨基酸序列；而第二氨基酸序列与上述第一氨基酸序列相联，但第二氨基酸序列中不含有与兔多聚免疫球蛋白受体跨膜片段的序列相应的序列。

更优化的实例为第二氨基酸序列至少部分与兔多聚免疫球蛋白受体的第 665 - 755 氨基酸序列相应。其它的实例为第二氨基酸序列由下列一部分或多部分组成：多聚免疫球蛋白分子的细胞内功能区，免疫球蛋白基因超家族成员的功能区，一种酶，一种毒素或一种连接体。

本发明的保护性蛋白不含有与兔多聚免疫球蛋白受体的跨膜片段相应的氨基酸序列，但含有与细胞内功能区相应的氨基酸序列。此蛋白质为受体的删除变异性。

25 本发明的保护性蛋白的另一实例为：其氨基酸序列至少部分与一种特殊种属的多聚免疫球蛋白受体的细胞内功能区相应。保护性蛋白的氨基酸序列的部分片段可与一种属多聚免疫球蛋白受体的细胞外功能区的序列相应，而其它部分片段可与另一种属的细胞外功能区的序列相应。本发明意在强调保护性蛋白的氨基酸序列部分片段相应于一种属多聚免疫球蛋白受体，而在同一功能区可有第二氨基酸序列相应于其它不同种属的氨基酸序列。这样，保护性蛋白单一功能区或某一功能区的特殊部分可由与不同种属的多聚免疫球蛋白相应的氨基酸序列组成。

另一实例为保护性蛋白部分氨基酸序列源于免疫球蛋白超家族成员。见， williams 和 Barclay ， "The Immunoglobulin Superfamily" in Immunoglobulin Genes ， p.361 ， Academic Press(HonjoAlt 与 Rabbits 主编， 1989)。这些部分可包括编码免疫球蛋白超家族分子的多肽，功能区或多功能区的氨基酸序列。

5 本发明亦旨在构建一种编码保护性蛋白的核苷酸序列。第一核苷酸序列编码至少含部分兔多聚免疫球蛋白受体的第 1 - 606 或 1 - 627 氨基酸，但此核苷酸序列不含编码功能性跨膜片段的序列。进一步构建联于第一核苷酸序列 3'端的第二核苷酸序列。第二核苷酸序列可编码不同的分子，包括：兔或其它种属的多聚免疫球蛋白受体的细胞内功能区或部分免疫球蛋白超家族分子。另外，第二核苷酸序列亦可编码不同的效应分子，酶，毒素及类似物。优先考虑的第二核苷酸序列为编码兔或其它种属的多聚免疫球蛋白受体的第 655 至 775 氨基酸序列相应氨基酸残基的核苷酸序列。

10 本发明同时构建含有保护性蛋白的核苷酸序列并适当连接的载体以表达保护性蛋白，此表达载体将核苷酸序列置于启动子序列的 3'端，使其在特殊细胞内转录和表达。表达载体亦可含有不同的增强子以增强翻译的效率。另外，亦可包括终止子，多聚腺苷酸位置和其它的 3'端加工信号以增加在特殊细胞内的将被翻译的核苷酸序列的数量。

20 保护性蛋白为免疫球蛋白的一部分且与具有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白重链相关。众所周知，免疫球蛋白起源的重链含有至少部分抗原结合功能区。Huse 等.， Science 246: 1275(1989)， Lerner 和 Sorge， PCT 应用 WO90/14430， 1990 年 11 月 29 日出版。这些文件的引用均经作者同意。

25 另外的实例中，本发明的免疫球蛋白含有保护性蛋白的免疫球蛋白起源的重链和轻链，而轻链至少含有部分与重链相关联的抗原结合位点。众所周知，免疫球蛋白含有部分抗原结合功能区。见， Early 与 Hood， Genetic Engineering ， Setlow 与 Hollaender 主编， Vol.3 ， Plenum Publishing Corp.， NEW YORK(1981)， 157-188 页； Kabot 等.， Sequences of Immunologic Interest ， NIH ， Bethesda ， Maryland(1987)， 此处引用的所有参考文献均经作者同意。

30 复合体的免疫球蛋白成份(a， J， K， 或 λ)。可含有全长或部分多肽，这些肽链的某部分可用来替代整链。例如，全长的免疫球蛋白 a-重链可由

可变区和稳定区与其它成份装配的部分稳定区所替代，同时，切短含有小部分稳定区 K 或 λ 亦可替代全长的 K 或 λ 。任何复合体的基本要求是具有与保护性蛋白结合的能力。

除了切短的成份外，本发明亦构建了由不同类型免疫球蛋白组合而成的免疫球蛋白。例如，含有 IgCH1 和 CH2 的重链稳定区与含有 IgACH1 和 CH2 区的片段结合形成含有保护性蛋白稳定的复合体，此已为熟知的范例。

本发明的含有保护性蛋白的免疫球蛋白的优越之处在于含有至少部分 IgM 或 IgA 重链，这样即可使免疫球蛋白重链与 J 链结合，进而与保护性蛋白结合。本发明的免疫球蛋白重链可以由 IgM 或 IgA 重链或其它重链亚型的单功能区组成。免疫球蛋白的功能区亦可源于非 IgM 或 IgA 重链，但此重链经分子加工后，可与 J 链结合，这种重链亦可用于本发明的免疫球蛋白。

免疫球蛋白由功能区组成。每一功能区大约含有 100 - 140 个氨基酸残基，不同的功能区的结构与界限亦已阐明。应用现代分子生物学方法，很容易将抗体分子的单一功能区移除，而用另一抗体分子的功能代替。功能区为球状结构，其稳定赖于链间的二硫键。这使功能区具有单一形状，能与其它相似形状的功能区互相替代和转换。免疫球蛋白重链区使具有该功能区的分子具有不同的抗体效应功能。这些效应功能包括：固定补体，穿越胎盘，与葡萄球菌蛋白结合。结合链球菌 G 蛋白，与单核细胞，中性细胞或肥大细胞和嗜碱性细胞结合。这些效应功能与特殊免疫球蛋白亚型与特殊功能区之间的关联已被阐述清楚。见 Immunology, Roitt 等., mosby St.Louis, Missouri(1993)。

本发明的免疫球蛋白除含有保护性蛋白外，尚含有免疫球蛋白重链，轻链和重链结合的 J 链。在优化实例中，本发明的免疫球蛋白由二条或四条免疫球蛋白起源的重链，二条或四条轻链和一条至少与一条免疫球蛋白起源的重链结合的 J 链所组成。免疫球蛋白的 J 链已阐述清楚。见，M.Koshland, The Immunoglobulin Helper: The J Chain, in Immunoglobulin Genes, Academic Press, London, Pg.345(1989)和 Matsuchi 等., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83: 456 - 460(1986)。

本发明的免疫球蛋白含有保护性蛋白。保护性蛋白至少与一条免疫球蛋白起源的重链相联，这种关联可通过氢键，二硫键，共价键，离子键或上

述各键的混合而完成。典型的免疫球蛋白分子的结合是免疫球蛋白重链与轻链通过二硫键联接。保护性蛋白通过非共价键或二硫键与免疫球蛋白相互作用。

5 本发明的免疫球蛋白所含有的保护性蛋白，免疫球蛋白重链，轻链和 J 链是通过氢键，二硫键，共价键，离子键或上述各键的混合而联接在一起。然后将所需的免疫球蛋白重链，轻链和 J 链构建为单一多肽，使其能够与抗原和保护性蛋白结合，这种蛋白的范例为单链抗原结合蛋白。

10 本发明装配多聚免疫球蛋白的方法包括下列步骤：将编码全部或部分免疫球蛋白 J 链的 DNA 片段引入组织，同时引入编码全部或部分免疫球蛋白 a 链的 DNA 片段，编码全部或部分免疫球蛋白 K 链或 λ 链的 DNA 片段。在相同的组织中，引入保护性蛋白序列。上述保护性蛋白由兔多聚免疫球蛋白受体(PIgR)的第 1 至 606 氨基酸部分序列组成或其它种属的类似物组成。保护性蛋白源于前体蛋白，该前体蛋白不含跨膜功能区和跨膜功能起始部分的氨基酸片段，即多聚免疫球蛋白受体第 630 - 755 氨基酸序列。
15 理想的前体蛋白不含有兔多聚免疫球蛋白受体或其它种属的类似物中第 606 氨基酸以上的序列。

已知跨膜区域或功能区跨膜片段由相邻部分的 20 - 30 个氨基酸组成，这些氨基酸不带电荷，所有的残基均为疏水的或非极性的，此片段形成 α-螺旋。功能性跨膜片段能够跨过生物膜。跨膜片段可与带电荷的残基结合。
20 PIgR 的跨膜片段是兔多聚免疫球蛋白受体的从第 630 - 755 氨基酸序列。

构成含有保护性蛋白的免疫球蛋白可源于前体蛋白。该前体蛋白的氨基酸末端含有一段信号序列，每一成份均可合成入膜内系统以使装配完成。除信号序列外，复合体的不同组分可能也可能不含 N - 末端糖苷化或其它修饰所用的附加信号序列。这些修饰能够影响复合体的结构。本发明之一，
25 在核苷酸序列中不含或在某些部位含有糖基化信号序列。(即：天冬氨酸 - 丝氨酸或苏氨酸或 O - 连接糖基化所用信号序列)，所产生的抗体将不含糖苷，这在糖基化诱发免疫反应的应用中可能有益。

在本发明的优选实例中，含有免疫球蛋白的保护性蛋白与免疫球蛋白起源的重链相关且不含 N - 连接和或 O - 连接的多糖。众所周知，如编码多肽的基因中，含有 N - 连接的糖基化，(天冬氨酸 - X 丝氨酸/苏氨酸，X
30 可以是除脯氨酸和天冬氨酸以外的任何氨基酸)的信号序列，当被引入植物细胞后，其序列中天冬氨酸残基可被多糖糖基化(N - 连接)，有关具有糖

基化信号功能的多肽序列的阐述，见，Marshall，Ann. Rev. Biochem.，41：673(1972)和Marshall，Biochem. Soc. Symp.，40：17(1974)。这些信号序列可被哺乳动物细胞和植物细胞识别。应用普通的变异法改变编码本发明的保护性蛋白的DNA序列，可以去除N-连接的糖基化信号序列。
5 这种变异法通常首先合成去除N-连接的糖基化信号序列的寡聚核苷酸。然后制备含有该核苷酸序列的DNA链。此方法的程序和试剂已成为商品，如Stratagene公司生产的此类产品。

先后或同时将编码各单一多肽的基因导入单一细胞，通过表达可以获得由各单一多肽装配而成的复合肽分子(如，免疫球蛋白)。编码多肽的转化
10 基因可以为单一构建的DNA片段，也可以与其它转化基因共同构建成DNA片段。

各组分的装配如孟德尔的交换率所述，通过各成份链多肽的分离群体集合而成，已证明此为复合多聚糖装配和共分离的适宜方法。美国第5202422号专利已述此方法(已经作者同意)，在本发明中，抗体分子含有少量或不
15 含聚糖。

本发明免疫球蛋白含有保护性蛋白免疫球蛋白起源的重链，选择性地含有免疫球蛋白起源的轻链和J链且可不含N-连接的多糖。

本发明的含有保护性蛋白的免疫球蛋白是理想的治疗性免疫球蛋白，可用于防止动物疾病的发生。优化实例中，本发明的治疗性免疫球蛋白可与
20 粘膜表面的病原体抗原结合。另一优化实例中，本发明的治疗性免疫球蛋白可防止龋齿。本发明免疫球蛋白含有保护性蛋白，其抗原结合功能区可与S.mutans血清型抗原a，c，d，e，f，g结合。这种抗原结合功能已明确且包括如下文献所述结合功能区：美国第5202422号专利，J.k-c.Ma等.，Clin. Exp. Immunol.77：331(1989)；和j.k-c.Ma等.，Ear. J.
25 Immunol.24：131-138(1994)；美国专利第5352446号；美国专利第4594244号；欧洲专利出版物371017B1。这些文献的应用已经作者同意。本发明的免疫球蛋白是在人和动物中具有治疗活力的免疫球蛋白的一部分。治疗性免疫球蛋白的作用是多方面的，然而，我们认为最适宜的治疗作用莫过于预防病原体的侵入，而这些病原体是由可食植物经口腔直接摄入的。

30 治疗性功效部分的插入可在植物或其它转基因组织提取之前或之后。一旦提取，免疫球蛋白可通过常规的方法进一步纯化。如分子排阻，离子交换或亲合层析，转基因组织是可食的植物，复合物的插入是部分纯化后食

入。植物分子亦与复合体一同食入。

植物起源的分子和动物起源的分子的此例可有变化。特殊的植物蛋白的量如双磷酸核酮糖羧化酶或叶绿体，可少至除水外的实重的 1 % 或多至 99.9 %。

5 本发明意在直接应用带有保护性蛋白的免疫球蛋白的治疗性植物提取物，而无需任何纯化。特异性的治疗组分，即抗体可用表面应用，食入或其它适宜的方法将抗体引至粘膜表面的靶致病原处。这种摄入形式完全不同与以往的直接注射或将治疗性植物提取物导入血液的方法。

10 本发明意在改变治疗性植物提取物的品味和结构构成。加入适量的胶状物或添加物，以加强直接食入时抗体与靶致病原之间的接触。

本发明的免疫球蛋白是用于动物的被动免疫。应用预先选择好的抗原制备含有保护性蛋白的免疫球蛋白，将其导入动物粘膜表面后，本发明抗体能够与预先的抗原结合。被动免疫要求抗体量要足够大，为广泛应用抗体必须价廉。

15 含有保护性蛋白与预选的抗原结合的免疫球蛋白可经济有效地在植物细胞中生产。优化实例中，免疫球蛋白分子可以是 IgA，IgM，分泌型 IgM。分泌型 IgA 或具有重链或轻链的嵌合性免疫球蛋白。

20 含有保护性蛋白的免疫球蛋白对蛋白降解和变性更具抗力，故而在严苛的环境中适于应用。严苛环境包括：酸性环境，含蛋白酶的环境，高温和其它严苛环境等。例如：动物的胃肠道因存在蛋白酶和酸，故而是严苛环境。见，Kobayashi 等，*Immunochemistry*，10：73(1973)。

25 本发明的更具抗性的免疫球蛋白对动物的被动免疫的实现是通过含有保护性蛋白的免疫球蛋白与动物粘膜表面的接触。动物有不同的粘膜表面。包括：肺，消化道，鼻咽腔，泌尿道等。通常这些粘膜表面含有产生不同分泌液的细胞。包括：唾液，泪液，鼻液，气管支气管液，胸液，胆汁，子宫颈液等。

30 含有保护性蛋白的免疫球蛋白对预选的抗原具有免疫特异性。通常，这些抗原存在于致病原中，并与粘膜表面的疾病的发生有关。例如：坏死性小肠结肠炎，腹泻，溃疡。由肠吸收致癌物所致的癌症等。见，McNabb 和 Tomasi，*Ann.Rev.Microbiol.*，35：477(1981)和 Lawrence 等，*Science*，243：1462(1989)。典型的与粘膜表面疾病相关的致病原包括细菌和病毒致病原，如，大肠杆菌，鼠伤寒沙门氏菌，霍乱弧菌，幽门菌和

S.mutans 等。见，欧洲专利申请 484148A1，5/6/92 出版(已经作者同意)。本发明的免疫球蛋白能够与这些致病原结合以阻止其引发粘膜相关性疾病。

5 免疫球蛋白能够同 S.mutans 结合而防止龋齿已在欧洲专利申请 371017 中有述，亦见，美国专利 5352440(已经作者同意)。

本发明的含有保护性蛋白的免疫球蛋白能有效地抗细菌感染和抗致癌。是具有治疗活力的单克隆抗体。已在美国专利 4652448，4443549 和 5183756 号中有述。

10 本发明的免疫球蛋白为整个与动物粘膜表面接触结构的一部分，而整个结构系由植物成份和能与预选的抗原结合的免疫球蛋白而部分组成。植物成份可以是植物细胞壁，细胞器，细胞质，完整的植物细胞及有生命的植物等。植物成份的比例，可由约 10000 克植物成份比约 100 纳克免疫球蛋白，至 100 纳克植物成份比约 10 纳克免疫球蛋白等变化不一。理想的情况是：植物成份与免疫球蛋白比例从 10000 克：1 克至 100 纳克。另外，此
15 比例也可由 10000 克植物成份比约 1 毫克免疫球蛋白至 1 毫克植物成份比约 500 毫克免疫球蛋白。

含有本发明的免疫球蛋白的混合物是一种治疗性混合物，混合物中所含有的多肽和蛋白质是具有治疗作用的活性组分。治疗性混合物可以是溶液，也可是混悬液。或在食入前将混悬液置于溶液中。治疗剂可以乳化，
20 活性治疗成份通常与无机和或有机载体混合，这些载体为药物治疗学上允许的，且与活性成份相容。通常，载体与生理条件相符，或多或少的由惰性物质组成。当加入治疗成份之中后赋予治疗混合物以适当的形状和稠度，适宜的载体如水，盐，葡聚糖，甘油等或上述的混合物。另外，如需要，混合物中亦可含少量的辅助物。如，湿化或乳化剂和 PH 缓冲剂，这
25 些可以加强活性成份的效能，治疗混合物中亦可含有具有营养价值的载体。

可用任何方便的方法将治疗性混合物，其含带有保护性蛋白的免疫球蛋白，用于哺乳动物的口腔或牙齿，已知有很多方法且为不同目的应用不同的物质。如，可将混合物直接涂于牙齿表面，也可将混合物置于牙膏，漱
30 口水，口香糖，小药片或胶中进而作用于牙齿。在某些剂型中，可以设计某种剂型使混合物同时亦使含保护性蛋白的免疫球蛋白与牙齿表面的接触时间延长。用于这种目的的剂型有许多，如将混合物置于用于复盖牙齿的

牙架上及用于调整不同牙齿绕颈的牙器上。

在实际应用中，涂于牙齿的混合物的确切用量并不关键，因为这种治疗数量在既定间歇内重复。例如，混于牙膏中的混合物，当每次用牙膏时，都将混合物与牙齿作用，通常一天二次。每次应用含有本发明的免疫球蛋白的混合物时，约有 10 - 100 微克的含保护性蛋白的免疫球蛋白作用于每个牙齿，在不致发生损伤效应的任何条件下，此量不应作为界限，在某点上使用较低的免疫球蛋白浓度可能减低此剂型的保护作用。

本发明的混合物的确切剂型可以依据应用方法和使用频率而变。一般来说，任何剂型均可使用，只要该剂型的 PH 适宜且不含有致使含有保护性蛋白的免疫球蛋白失效的物质。例如，本发明的混合物可以作为简单的水溶液应用。其中每 100 微升含有 0.1-10 毫克免疫球蛋白。一般来说，这种溶液可在牙齿手术中应用，使用量大约为每个牙齿 1 - 10 微升。

本发明的混合物剂型可依据设计而变，主要应考虑的是应用的频率及是否为特殊用途。

含有本发明免疫球蛋白的混合物由对致病原抗原有免疫特异性的免疫球蛋白构成，致病原是在其它组织中能够引起疾病的任何有机体。免疫球蛋白的特殊优点是对粘膜表面的致病原抗原具有免疫特异性，粘膜表面致病原抗原是存在于致病原上，通过粘膜侵入组织，引起粘膜相关疾病的抗原，粘膜致病原包括：肺致病原，鼻腔致病原，肠道致病原，口腔致病原等。有关致病原总论，包括粘膜致病原，见，Davis 等，microbiology 出版，Harper 和 Row，hagerstown，MD(1980)。

抗体对致病原的免疫特异性，可应用标准的单克隆抗体生产技术产生，见，Antibody：A laboratory manual，Harlow 等编，Cold Spring Harbar，NY(1988)。应用链聚酶反应和选择合适的引物可以分离编码轻链和重链可变区的基因。见，Orlandi 等，Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86：3833(1989)和 Huse 等，Science，246：1275(1989)。然后将可变区插入植物表达载体。如 Hiatt 等所描述的表达载体，Nature，342：76-78(1989)。

在应用实例中，本发明的免疫球蛋白对肠道致病原抗原具有免疫特异性，特别对能够引起胃肠道疾病的细菌，病毒，寄生虫等肠道致病原抗原具有免疫特异性，如，大肠杆菌，沙门氏菌，霍乱弧菌，伤寒杆菌，和幽门菌等。

另一实例中，本发明的含有保护性蛋白的免疫球蛋白对牙齿病原体，如链球菌等具有免疫特异性。特别理想的是由以下杂交瘤对链球菌具有免疫特异性的免疫球蛋白和抗体杂交瘤 15B2(ATCCNo.HB8510); 贮存于欧洲动物细胞库的 No.86031901 号杂交瘤。Ma 等., Eur. J. Immunol., 24: 131(1994)和 Smith 和 Lehner, Oral Micro. Immunol., 4: 153(1989)所述的 Guy's 13 单克隆抗体。

5 本发明意在动物，如脊椎动物等中产生被动免疫，此种被动免疫可在鱼，鸟，两栖动物，爬行动物或昆虫中产生。另外也可在哺乳动物，如人，或家禽，如反刍动物，牛，猪，马，狗，猫等中产生，亦可在成年或未成
10 年哺乳动物中产生被动免疫。

理想的应用是，在刚刚断乳的哺乳动物中产生被动免疫。混合物中含有保护性蛋白的免疫球蛋白对预选抗原有免疫特异性。将足够量的此种混合物，给予动物，以在动物体内达到预期的免疫球蛋白浓度，所谓预期浓度是动物体内的免疫球蛋白量足以与存在的致病原结合，以阻止致病原引起
15 可察的疾病，需要达到预期浓度的含有本发明免疫球蛋白混合物量，视下列条件而有所变化：动物的大小，所存在的致病原的量，特殊免疫球蛋白对致病原的亲合力，免疫球蛋白导入体内后在作用部位的有效性等。

C. 含保护性蛋白免疫球蛋白的真核细胞

20 本发明意在制备含有此发明的免疫球蛋白的真核细胞，包括植物细胞。本发明同时制备含有编码免疫球蛋白不同组分的核苷酸序列的植物细胞。编码保护性蛋白，不同免疫球蛋白重链，轻链和 J 链的核苷酸序列，通常连与适当的启动子，作为表达载体的一部分而得到表达。

25 分离免疫球蛋白的重链，轻链，J 链的基因后，将其连与表达载体中的转录启动子上。

所选的需表达的组织成份，可以是独立复制的质粒，染色体的固定成份或能够过渡性地产生转录子以编码所需成份的任何片段 DNA。适宜被转化的组织可为原核细胞，亦可为真核细胞，复合物的各成份的导入，可以通过直接 DNA 转化，即直接将 DNA 导入组织，或通过另一有机体将 DNA
30 导入。如，通过重组的植物细菌对植物细胞的作用等。

在转基因组织中表达蛋白通常需要导入一个适宜的启动子和一段多聚腺苷酸信号序列。本发明实例之一，所选启动子具有在植物所有细胞中结

构性表达各组分的优越性。结构性表达可在部分或所有细胞中完成，此可佐证各成份的前体存在于相同的细胞膜内系统中，以利所需各组分的装配。

5 使用与宿主细胞相容，特别是植物细胞相容的表达载体，表达本发明的基因。有许多典型的用于植物细胞基因的表达载体，包括由 Rogers 等., Meth. in enzymol., 153: 253-277(1987)所述的源于土壤杆菌植物菌的肿瘤诱导质粒的载体，但也有许多其它表达载体系统适于植物细胞，如，Verma 等., PCT 出版物 No.WO87/00551; 和 Cocking 和 Davey, Science, 236: 1256-1262(1987)。

10 上述表达载体含有表达控制成份，包括启动子。将被表达的基因连接于表达载体上，使启动子序列能够指导 RNA 聚合酶的结合，从而合成所需基因编码的多肽。启动子在基因表达中是十分重要的，包括可诱导性启动子，病毒启动子，合成启动子，结构启动子，和调节启动子。表达载体的选择，以及编码本发明免疫球蛋白的核苷酸序列需连接的启动子的选择直接依赖
15 于：所预计的功能特点，即蛋白表达的位置和时间。

被转化的宿主细胞。这些均为组建重组 DNA 分子时所需考虑的。然而，用于本发明的表达载体，至少应能指导复制，并能表达与其相连的编码多肽的 DNA 片段。

20 用于表达基因的载体应含有在植物细胞中有效的选择标志。理想的是药物抗性选择标志，药物抗性选择标志是当基因表达后产生卡那霉素抗性，如含有兰曙红合成启动子。Tn5 新霉素磷酸转移酶 II 和兰曙红合成酶 3' 作翻译区的嵌合基因。如 Rager 等所述 Methods For Plant Molecular Biology, a Weissbach 和 H.Weissbach 编, Academic Press Inc., San Diego, CA(1988)。已成为商品的植物表达载体可从药物公司购得, Piscataway,
25 NJ。

有关表达载体和启动子在植入中表达外源基因的应用，可见，美国专利 5188642, 5349124, 5352605, 和 5034322 号(已获作者同意)。

30 已开发出很多通过互补黏性末端连接的方法将 DNA 与载体相接。例如，互补的均聚物片段可加到待插的 DNA 片段和载体 DNA 上。这样，载体和 DNA 片段，即通过互补的均聚物尾由氢键相联以形成重组 DNA 分子。

另一方法，可用合成的含有一个或多个内切酶位点的连接片段将 DNA

连接于表达载体。将平端 DNA 片段与大量合成连接片段，在连接酶存在的条件下培养，使合成的连接片段与平端 DNA 片段相接这类连接酶，如噬菌体 T4DNA 联接酶，可以催化平端 DNA 片段分子的连接。反应结果是使 DNA 片段在尾部接有合成连接片段。用适宜的内切酶消化 DNA 片段，
5 用相同的酶消化表达载体。使其产生与合成连接片段互补的 DNA 末端，然后将含有连接片段的 DNA 与表达载体连接。许多公司出售含有不同内切酶位点的合成连接片段。如 New England Biolabs, Beverly, MA。

可以直接将编码保护性蛋白和任何本发明的免疫球蛋白的核苷酸序列导入相同的植物细胞，也可以将各成份分别导入不同植物细胞，再通过杂交的方法产生最终含有所需全部成份的植物。
10

很多方法可用于将编码本发明的免疫球蛋白的核苷酸序列导入真核细胞。例如，土壤杆菌介导的植物转化，原生质体转化孢粉基因导入，注射入生殖器官和注射入未成熟胚胎等。每一种方法均有其优缺点。这样，对一种真核细胞或植物细胞有效的基因导入方法可能对其这种真核细胞和植物细胞不适宜。
15

土壤杆菌介导的基因导入法是一种广泛用来转导基因入植物细胞的方法。DNA 可以被直接导入整个植物组织，而略去了从原生质体再生完整植物的需要。这种 DNA 导入植物细胞的方法，已广有报道。如，由 Fruley 等所述的方法，*Biotechnology*, 3: 629(1985)和 Rogers 等，*Methods in Enzymology*, 153: 253 - 277(1987)。进一步 Ti-DNA 的整合是一个精细的过程。被导入的 DNA 片段较长，通常亦可能令将干扰性 DNA 导入植物基因组。如，Spielmann 等., *mol. gen. Genet.*, 205: 34(1986)和 Jorgensen 等., *Mol. gen. Genet.*, 207: 471(1987)所述。现在的土壤杆菌转化载体可在大肠杆菌和土壤杆菌复制，这样即可允许适宜的修整。Klee 等., in
25 *Plant DNA Infectious Agents*, T.Hohn 和 J.Schell 编, Springer-Verlag, NEW YORK(1985)pp.179-203。最近有关土壤杆菌介导的基因转入载体的技术发展，已改进了载体内基因和内切酶位点的排列，使其更宜被组建为表达不同多肽编码基因的表达载体。由 Rogers 等., *methods in Enzymology*, 153: 253(1987), 所述的载体具有方便的多联结合区且与
30 直接表达插入多肽编码基因的启动子和多聚腺苷酸位点相连，因而，适宜于本目的。

土壤杆菌介导的叶片和其它组织的转化似乎仅限于土壤杆菌能够自然感染的植物种属。这样土壤杆菌介导的转化在双子叶植物中最有效。然而，用土壤杆菌转化天门冬植物也已成功。见，Bytebier 等., Proc.Natl.Acad.Sci., 84: 5345(1987)。

5 在这些土壤杆菌介导转化的有效的植物种属中，便利和基因转入的限制性质决定了方法的选择。然而，尽管应用土壤杆菌载体已产生了转基因的天门冬植物。基本上没有单子叶植物可作为土壤杆菌的自然宿主。Bytebier 等., Proc.Natl.Acad.sci.U.S.A., 84: 5345(1987)。所以商业上很重要的谷物类，如，稻米，玉米和麦必须用其它的方法转化。植物原生质体的转化
10 可用磷酸钙沉淀，聚乙二醇处理，电导或上述方法的组合来实现。见，Potrykus 等., Mol. Gen. Genet., 199: 183(1985); Lorz 等., Mol. Gen. Genet., 199: 178(1985); Fromm 等., Nature, 319: 791(1986); Uchimiya 等., Mol. Gen. Genet, 204: 204(1986); Callis 等., Genes and Development, 1: 1183(1987)和 Marcotte 等., Nature, 335:
15 454(1988)。

这些系统对不同植物种属的应用依赖于从原生质体再生特殊植物的能力。从原生质中再生谷物的证明方法见，Fujimura 等., Plant Tissue culture Letters, 2: 74(1985); Toriyama 等., Theor. Appl. Genet, 73: 16(1986); Yamada 等., Plant Cell Rep., 4: 85(1986); Abdullah 等.,
20 Biotechnology, 4: 1087(1986)。

为成功转化不能从原生质再生的植物种属，其它将 DNA 导入完整细胞和组织的方法也可应用。例如，从未成熟的胚胎中再生谷物。见，Visil, Biotechnology, 6: 397(1988)。另外，也可应用"粒子枪"或高速微注射的技术。应用这种方法，DNA 附在小的金属粒子(0.252um)上，以每秒钟 1
25 至几百米的速度穿过细胞壁进入细胞质。Klein 等., Nature327: 70(1987); Klein 等., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 8502(1988)和 McCabe 等., Biotechnology 6: 923(1988)。金属粒子穿越细胞各层，使得组织内细胞得以转化。金属粒子已用来成功地转化了玉米细胞，使其发芽，稳定地转化了烟草和宿主植物。这种转化省略了原生质体发育阶段，加速
30 了转基因植物的生产。

DNA 也可直接导入孢粉，见 ZHOU 等., Methods in Enzymology, 101: 433(1983); D.Hess., Intern Rev. Cytol., 107: 367(1987); Luo

等., *Plant Mol. Biol. Reporter.*, 6: 165(1988)。多肽编码基因的表达也可通过将 DNA 注入植物的生殖器官而获得。Pena 等., *Nature*, 325: 274(1987)。DNA 也可直接注入未成熟的胚胎细胞或脑干之后再水化的细胞内。Neuhaus 等., *Theor. Appl. Genet.*, 75: 30(1987); Benbrook 等., in *Proceedings Bio Expo 1986*, Butterworth, stoneham, MA, pp.27-54(1986)。

可从单一植物原生质体或再植物中再生植物。见, A.Weissbach 和 H.Weissbach 主编., *Methods for plant molecular Biology*, Academic Press, Inc., SanDiego, CA(1988)。这种再生和生长过程。包括, 转化细胞的选择与发芽。植根转化细胞的芽和植物在土壤中生长等步骤。

从叶子已成功地再生了含有由土壤杆菌介导的转化有效的植物。Horsch 等., *Science*, 227: 1229-1231(1985)。在此过程中被转化的细胞在选择剂中生长并在诱导再生的培养基中再生植物的芽。Fraley 等., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 80: 4803(1983)。

此过程通常为: 两到四周内产生芽, 这些转化的芽转移到含有选择剂的适当的诱根培养基中, 加入抗菌素以防止细菌生长。转化的芽在有选择性存在的条件下生根, 然后移植入土, 使根生长, 已知依据不同的植物种属, 这些过程是有变化的。

本发明的免疫球蛋白可以在任何植物细胞中生产。这些植物细胞可源于双子叶, 单子叶植物, 茄属植物, 苜蓿, 豆科植物或烟草。

应用任何方法均可转化有性繁殖的植物种属细胞以产生转基因植物。所用的双子叶植物有: 烟草, 西红柿, 苜蓿, 橡树, 槭树等。单子叶植物有: 百合花, 草, 玉米, 谷物包括: 燕麦, 小麦和大麦, 兰花, 鸢尾属植物, 洋葱和棕榈。低等植物: 任何无花植物, 包括: 羊齿植物, 针叶树, 马尾草, 茗, 活的树疣, 红色海藻, 棕色海藻, 绿色海藻。蕨类植物的孢子体。

除了保护性蛋白和免疫球蛋白起源的重链以外, 本发明的植物细胞亦含有编码免疫球蛋白起源的轻链的核苷酸序例, 此轻链至少含有部分抗原结合功能区。

本发明的植物细胞在免疫球蛋白起源的重, 轻链上含有抗原结合功能区。此功能区能够与链球菌 *S.Mutans* 血清型抗原 d, g, c(原命名为 *S.mutansa*, c, d, e, f, g, h 抗原)结合。存在于这些植物细胞中的抗原结合功能区, 亦能结合粘膜致病原以防止龋齿的发生。

本发明的植物细胞可为植物的一部分，亦可由这些植物细胞生长组成下列植物。如，单子叶植物，双子叶植物，茄属植物，烟草，或其它类的植物。

5 D.含有携保护性蛋白的免疫球蛋白的混合物

本发明旨在制备由本发明的免疫球蛋白和植物大分子构成的混合物，通常，这些植物大分子可源于本发明所用的任何植物。植物大分子与免疫球蛋白可共存于植物细胞内，植物细胞提取物或在植物中。与本发明的免疫球蛋白共存于混合物中的植物大分子，包括：双磷酸核酮糖羧化酶，集光
10 复合体，LH6，色素，二级代谢物或叶绿体。本发明的免疫球蛋白在混合物中的浓度约占除水体重的1% - 99%，另外的混合物中，免疫球蛋白的浓度可在1%-50%之间(重量比)。亦有的混合物含免疫球蛋白的浓度为1%-25%。

本发明的混合物所含的植物大分子的浓度约占除水重量的1% - 99
15 %，通常，混合物的重量为免疫球蛋白和植物大分子的重量之和，当免疫球蛋白的浓度高低有变化，植物大分子的浓度呈现相反变化。理想的情况下，植物大分子的浓度为50%-99%之间。更理想的混合物中，植物大分子的浓度为75%-99%之间。

本发明旨在制备的混合物由下面部分或全部构成：一条IgA重链，一条
20 K或链，一条J链。这些组分组成的复合体与已述的保护性蛋白结合。混合物亦含有植物起源的大分子。通过提取获得含有功能性抗体和植物大分子的混合物。

提取方法包括应用剪力(达因/cm²)，破碎含有复合体的植物原地胞质，而释出上述的复合体。

25 整个植物或植物的提取物含有抗体和不同其它的植物大分子，混合物中的植物大分子有双磷酸核酮糖羧化酶，或双磷酸核酮糖羧化酶的片段。另一大分子为：LHCP，另外亦有叶绿体。

剪力是破碎植物的原地胞质的有效方法。其它类型的力亦可用于影响剪力而使其更有效。如约1磅/平方英寸的直接压力可以增加剪力的效应。常规应用的匀浆技术，包括高速打碎和磨碎能破坏所有的植物结构。因而，
30 不适于抗体的提取。

本发明旨在制备由本发明的免疫球蛋白和植物大分子构成的混合物，通

常，这些植物大分子可源于单子叶植物，双子叶植物，如茄属植物，烟草，或其它类的植物。混合物中的植物分子，可能是双磷酸核酮糖羧化酶，集光复合体，LH6，色素，二级代谢物或叶绿体及其它植物分子。

5 其它提取含免疫球蛋白混合物的方法，包括用不同的试剂提取或应用其它方法。含有免疫球蛋白的本发明混合物的免疫球蛋白浓度可占除水外重量的1% - 99%。植物大分子的浓度亦可在1% - 99%之间。

10 含有本发明免疫球蛋白和植物大分子的治疗性混合物的制备，包括：在一定压力下，应用剪力制备植物部分的匀浆，此匀浆中含有治疗性免疫球蛋白和植物大分子。植物大分子源于含有液体和固体成份的植物原生质和共生质。

15 进一步加工将植物的固体部分和含有免疫球蛋白的液体部分分离。用于这种加工的原始材料，可包括植物的叶，茎，根，管，籽，果或完整的植物。通常，应用特殊的机械装置，使液体从植物的原生质和共生质中释放出来。然后用离心沉淀，絮凝或过滤的方法，分离植物的固体成份和液体成份，已知用这些分离方法可将固体成份从含有免疫球蛋白的液体成份中分离出来。本发明的这些方法可生产特殊的免疫球蛋白，其含有保护性蛋白，和由免疫球蛋白 a 或 r 链的功能区组成的免疫球蛋白重链。这些方法也可生产含有保护性蛋白和由 K 区或 λ 链的功能区组成的免疫球蛋白轻链的免疫球蛋白。

20 本发明的方法适用于植物细胞或植物的各部分。这些方法中也可进一步包括生长植物的方法。本方法适用于任何植物，包括单子叶植物，双子叶植物，茄属植物，烟草，或其它类的植物。本方法可用于从植物的各部分包括叶，茎，根，管，籽，果或完整的植物中提取免疫球蛋白。本方法可用特殊的机械装置，剪力作用使液体从植物的原生质和原地胞质中释放出来。应用下列方法可将本发明的匀浆中的固体植物成份移除，如：离心，25 沉降，絮集或过滤。

E. 生产含有保护性蛋白的免疫球蛋白的方法

本发明的生产含有保护性蛋白的免疫球蛋白的方法包括以下步骤：

30 1. 将含有编码保护性蛋白的核苷酸序列与转录启动子相连，并接于表达载体，导入植物细胞。

2. 将编码含有部分抗原结合功能区免疫球蛋白起源的重链的核苷酸序

列与转录启动子相连，并接于表达载体，导入相同的植物细胞。

本发明的方法包括导入植物细胞两种载体，一种为编码保护性蛋白的序列，另一种是至少部分编码含有抗原结合功能区的免疫球蛋白重链序列，二者均与转录启动子相连。

5 此方法亦包括导入植物细胞下例已与启动子相连的序列：编码保护性蛋白的序列，编码免疫球蛋白重链和轻链的序列，和编码J链的序列。这样即产生了含有与启动子相连的编码免疫球蛋白重链，轻链，J链和保护性蛋白序列的细胞。

10 本发明的植物细胞可作为能生长的植物的一部分。用于本发明的植物，包括单子叶植物，双子叶植物有：茄属植物，烟草，西红柿或其它类的植物。

本发明的方法，包括在真核细胞中生产装配完成的免疫球蛋白重链，轻链，J链和保护性蛋白。将编码含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白重链序列，含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白的轻链序列，免疫球蛋白J链序列和保护性蛋白序列，与表达载体相联，导入细胞，从而构建此种真核细胞。这些需表达的核苷酸序列分别与适宜的启动子相连或单一启动子与多于一种核苷酸序列相连，依次序编码不同的分子。

20 含有编码免疫球蛋白重链，轻链，J链和保护性蛋白序列的真核细胞，在适宜的条件下培养以使这些分子能够再生并装配成为本发明的含有保护性蛋白的免疫球蛋白。

本发明所用的方法可使特殊的免疫球蛋白或抗原结合功能对环境条件更具抗力，即更稳定。这种方法是：将编码至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白重链的核苷酸序列与编码至少含有一个功能区的免疫球蛋白a或 μ 链的核苷酸相连，形成编码嵌合免疫球蛋白重链。这种编码嵌合免疫球蛋白重链的核苷酸序列在真核细胞中表达。

30 这种真核细胞同时也含有下例之一的分子：保护性蛋白，至少含有部分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的轻链，免疫球蛋白J链。理想的情况是细胞含有所有的分子，包括免疫球蛋白起源的轻链，其轻链含有与免疫球蛋白重链互补的抗原结合功能区。这种方法使嵌合免疫球蛋白重链至少与一种其它的分子装配，如：具有互补性抗原结合功能区的轻链，免疫球蛋白J链和保护性蛋白，以形成含有对环境条件有保护性蛋白的免疫球蛋白。

这些免疫球蛋白对环境条件具有抗力，即：当遇到升高或降低温度，PH 高低变化，高，低离子浓度，蛋白酶或其它严苛条件使能够更稳定。这样的严苛条件，通常如自然水源，人体内等条件如内脏内或粘膜表面和动物的表面。

5

F.含有保护性蛋白的嵌合免疫球蛋白。

本发明意在构建含有保护性蛋白的免疫球蛋白，构成此种免疫球蛋白重链和轻链的功能区可源于由不同亚型免疫球蛋白来源的区域构成重链或轻链的免疫球蛋白。应用分子技术，这些功能区可由相似的功能区所取代，
10 这样即产生了两种不同免疫球蛋白分子杂交的免疫球蛋白。这种嵌合性免疫球蛋白使构建的含有保护性蛋白的免疫球蛋白具有不同免疫球蛋白功能区所赋予的不同性能。

本发明亦构建含有重链和轻链和J链的嵌合免疫球蛋白。但其功能区并非完整的不同分子的功能区。应用相同的分子技术，可以构建这样的嵌合
15 性免疫球蛋白。

在优化实例中，本发明的免疫球蛋白至少含有小鼠 IgG， IgG1， IgG2A， IgG2B， IgG3， IgA， IgE， IgD 的 CH1， CH2， CH3 功能区。另外的实例中，免疫球蛋白功能区至少含有小鼠的 IgM 的 Cu1， Cu2， Cu3， 或 Cu4 功能区。另有含有小鼠 IgE 的 Cε2， Cε3， 和 Cε4 功能区的
20 免疫球蛋白。

此发明同时构建源于人免疫球蛋白的嵌合免疫球蛋白，这些嵌合免疫球蛋白含有两种人的不同亚型免疫球蛋白功能区。理想的实例为免疫球蛋白含有人的 IgG， IgG1， IgG2， IgG3， IgG4， IgE， IgA1， IgA2 或 IgGD；人的 IgM 的 CH1， CH2， 或 CH3， 或 Cu4 功能区。本发明亦组
25 建含有两种不同哺乳动物的免疫球蛋白亚型来源的功能区的免疫球蛋白。一般来说，任何哺乳动物的免疫球蛋白均可用于此目的，如下例亚型： IgG 所有亚型， IgA 所有亚型， IgE， IgM 或 IgD。

本发明的免疫球蛋白至少含有源于两种不同哺乳动物免疫球蛋白亚型的稳定区功能区之一。

30 本发明亦构建源于啮齿动物免疫球蛋白的嵌合蛋白，这些蛋白含有不同亚型免疫球蛋白功能区。啮齿动物免疫球蛋白亚型已为人知，本发明的免疫球蛋白可含有至少下例之一功能区的免疫球蛋白起源的重链。小鼠

IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA1, IgA2 或 IgD 的 CH1, CH2, CH3 功能区。小鼠 IgE 或 IgM 的 CH1, CH2, CH3, 或 CH4 功能区,人 IgG, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 或 IgD 的 CH1, CH2, CH3 功能区。人 IgE 或 IgM 的 CH1, CH2, CH3 或 CH4 功能区, 5 哺乳动物的 IgG, IgA, IgE, IgM 或 IgD 的亚型上的 CH1, CH2 或 CH3 功能区。哺乳动物的 IgE 或 IgM 的 CH1, CH2, 或 CH3, 或 CH4 功能区。啮齿类 IgG, IgA, IgE, IgM 或 IgD 的亚型上的 CH1, CH2, 或 CH3 功能区。啮齿类的 IgE 或 IgM 的 CH1, CH2, 或 CH3, 或 CH4 功能区。动物 IgG 亚型, IgA, IgE 或 IgD 亚型的 CH1, CH2, CH3 功能区。动 10 物 IgE 或 IgM 的 CH1, CH2, CH3, 或 CH4 功能区。

本发明亦旨在应用免疫球蛋白超家族起源的分子的蛋白功能区替代相应功能区。属于免疫球蛋白超家族的分子的氨基酸和核苷酸序列与免疫球蛋白具有同源性, 可用氨基酸或核苷酸序列的同源性识别属于免疫球蛋白超家族部分的分子。见: P361。Immunoglobulin Genes, Academic 15 Press(1989)。

四重转基因组织:

本发明构建四重转基因组织, 即: 由已转入四种不同基因, 每一基因均编码不同多肽的细胞或植物组成。这些转基因是不同的: 一种转基因的信息 RNA 和多肽与其它另外几种转基因的信息 RNA 和多肽是不同。这样, 20 本发明所述的转基因数目不包括通常在转基因组织所述的相同转基因的多拷贝数。

本发明所述转基因组织含有四种转基因, 并作其它转基因的相同复制。本发明并不排除四种转基因中各基因有多拷贝数的可能性, 然后, 至少在转基因组织的细胞中存在四种不同的转化基因。另外, 本发明构建四种不同转基因具有关联, 即, 每一转基因所编码的多肽均为复合肽分子的一部分。所以, 本发明认为复合肽分子中的每一多肽存在于转基因组织的单一 25 细胞内。复合肽分子中的每一多肽的表达, 使得在转基因动物细胞内不同的多肽相互结合而形成复合肽分子。这样, 本发明单一细胞内表达四种基因, 而各编码蛋白的转基因相互无关联的情况, 这种相互无关的多重转基因的例子, 可见于的转基因, 如卡那霉素或新霉素或腺苷激酶等抗菌素抗性多肽。 30

本发明的转化基因编码以下四种不同基因的多肽: 保护性蛋白, 含有部

分抗原结合功能区的免疫球蛋白起源的重链，含有部分抗原结合功能区免疫球蛋白起源的轻链，和免疫球蛋白 J 链。另一实例为转基因组织中的转基因之一为编码嵌合免疫球蛋白重链，轻链或 J 链的基因。本发明的转基因组织中的转化基因之一也可是编码部分免疫球蛋白重链，此被编码部分是源于 IgA 或 IgM 的免疫球蛋白。亦可以是编码部分氨基酸序列，此部分序列源于 IgA 或 IgM 的免疫球蛋白。

本发明的转基因组织，包括哺乳动物，植物，啮齿类动物，二栖类动物，昆虫，爬行类动物，鱼或其它生物。本发明的理想实例的转基因组织是植物或哺乳动物，这些组织的产生方法已为所知，见：U.S 专利 4736866，4607388，4870009，4873191。(均经作者同意)

本发明亦构建一种免疫球蛋白，此种免疫球蛋白含有免疫球蛋白重链和轻链，但其功能区已经加工使其功能区在特殊种属中的免疫源性减低。通常，加工免疫球蛋白分子使其“人类化”，即尽管该分子源于其它不同种属，但更类似人免疫球蛋白。

15

实施例：

以下列的实例说明本发明，而这些实施例并非限定本发明的范围。

实施例 1. 构建植物中表达抗体的 DNA 载体。

20 a. 提取编码 Guy's 13 免疫球蛋白的核苷酸序列。

用 Ma 等 Eur. J. Immunol. 24:131(1994)所述的方法克隆。Guy'13 抗 S.mutans 抗体的 r 和 k 链。简述之：从 Guy's 13 杂交瘤中提取 mRNA，用标准程序反转为 cDNA。应用与 r 或 k 的 cDNA 互补的特异性寡聚核苷酸片段扩增 cDNA，在 PCR 中扩增如前所述，由 Taq1 聚合酶催化完成。扩增后的 cDNA 经适宜的限制性内切酶消化后，连与标准的植物表达载体的相互酶切位点。文献报告有许多种此类载体。本例所用为 pBIN 19。

25 在相关的一系列实验中，将 cDNA 克隆入细菌载体，应用此结构依 Maxam 和 Gilbert 方法。确定 r 和 kcDNAs 的序列。

用 PCR 克隆抗体 cDNA，构建 cDNA 文库并将 cDNA 插入适宜载体等技术是人们所熟知的常用技术。

30

b. 编码 Guy's 13 重链可变区，部分 r 链稳定区和部分 a 链稳定区的杂交

cDNA。

如，Ma 等 *Eur. J. Immunol.* 24:131(1994)所述的方法克隆，然后如上所述，连入适当的植物表达载体。最终结构如下：Guy's 13 可变区 - (IgG1CH1)-(IgG1CH2)-(IgACH2)-(IgACH3)，以上作为 IgG2A 重链；Guy's13 5 可变区 - (IgG1CH2)-(IgACH2)-(IgACH3)。

C. 保护性蛋白和 J 链

克隆的兔多聚免疫球蛋白受体 (pIgR)cDNA 如 Mostov , *Nature* 10 308:37(1984)所述，并示于图 8。保护性蛋白部分可通过 PCR 扩增编码 pIgR 的部分核苷酸序列，并连与适宜的植物表达载体而获得。用于此结构中的 pIgR 的保护性蛋白部分包括编码第 1 个至第 606 氨基酸的密码子。此方法已广为所知。所用寡聚核苷酸为 pIgR 的核苷酸序列。

d. 编码重链稳定区的糖基化衍生物的 cDNA

15 按照基因突变的方法，进行突变实验。每种情况(a 稳定区或保护性蛋白)均将天冬氨酸的密码子作为糖化位点，将其改为组氨酸。

实施例 2. 表达治疗性抗体的转基因植物的生产

具有保护性蛋白的免疫球蛋白的植物或植物细胞的生产方法如下：

20

a. 载体转入土壤杆菌

用土壤杆菌完成植物的转化，在能够提供转入功能的辅助细胞株 (pRK2013)存在的条件下，携有重组的 pMON 530 植物表达载体的大肠杆菌 DH52 与土壤杆菌杂交。另一方法是用直接转化的方法将 PMON 530 质粒 DNA 直接转入土壤杆菌。在此程序中，土壤杆菌细胞株首先在 YEP 培养基中，28 度生长过夜，将 2ml 过夜培养基转入 50ml。YEP 培养基中，使其生长至 OD600 达 1.0。然后将细胞冷却至 4 度。离心沉淀细胞。将细胞重新悬浮在 1ml 预冷的 20mM CaCl₂ 中。每 0.1ml 冷却的细胞悬浮中加入 1ug DNA，用液氮或干冰酒精浴，快速冷冻细胞。然后，在 37 度条件下，25 5 分钟溶解细胞后，加入 1ml YEP 培养基。摇动培养细胞 2 - 4 小时，在含有适当抗菌素的 YEP 琼脂板上分离含有重组载体的单克隆。

30

含有 PMON 530 的土壤杆菌在含有卡那霉素，放线壮观素和氯霉素的培

胱甘肽。

2ml 含有土壤杆菌的培养液(约含 1×10^8 的 8 次方土壤杆菌/ml)叶片的表面要完全与土壤杆菌接触, 倾倒入余液体。叶片与细菌在室温共培养 2 天。叶片然后转至含有 25ug/ml 卡那霉素, 和 250ug/ml 羧苄青霉素的 B5H 培养基的琼脂板上。每周将叶片转至新鲜的 B5H-KC 培养板上。直至可见再生芽。再将再生芽转至含 B5H - KC 培养基的琼脂板上。(每升 B5H - KC 培养基含有: 25 毫升大分子营养物, 10 毫升小分子营养物, 25 毫升铁, 30 克蔗糖, 1 毫升维生素, 1 毫升氨基酸混合物, 2 克酵母提取液, 25 毫克卡那霉素, 250 毫克羧苄青霉素, 100 毫克肌醇, 10 克琼脂, 氢氧化钾调至 PH5.9)。

大分子营养物的 40 倍贮存液: 每升含 40 克 KNO_3 , 40 克 NH_4NO_3 , 13.88 克 $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 14 克 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.6 克 KCl , 12 克 KH_2PO_4 。

维生素 100 倍贮存液: 每升含有 100 毫克盐酸维生素 B1, 500 毫克烟酸, 100 毫克盐酸吡哆素。

氨基酸混合物 1000 倍贮存液: 每升含 2 克甘氨酸。

小分子营养物的 100 倍贮存液: 每升含有 580 毫克 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 1550 毫克 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 160 克 H_3BO_3 , 80 毫克 KI 。

铁的 40 倍贮存液为每升含 1.28 克 $NaFeEDTA$ 。

新芽形成后, 将植物移入土壤, 生长至成熟。

d. 转化的西红柿的再生

暖房中生长的 7 天的西红柿置于 2% Chlorox 漂白粉和 0.1% SDS 中。在室温浸泡 8 分钟以消毒。然后浸于 70% 酒精后置于灭菌的培养板上干燥。

用消毒剪刀切下约 0.5cm 直径大小的叶片, 置于含有用打孔机取出约 0.5cm 直径大小的叶片, 置于含有 MS4 培养基的琼脂板上(每升 MS4 培养基含有: 4.4 克 Muroshige 和 skoog 基本盐和基本有机物。30 克蔗糖, 2 毫克 N6 - 异戊烯腺嘌呤核苷, 0.5 毫克吡哆素, 0.5 毫克维生素 B1, 5 毫克烟酸, 1mM 乙酰丁香酮, 10 克琼脂, 氢氧化钾调至 PH5.7)。

2ml 含有土壤杆菌的培养液(约含 1×10^8 的 8 次方土壤杆菌/ml)加至叶片, 叶片的表面要完全与土壤杆菌接触, 倾倒入余液体。叶片与细菌在室温共培养 2 天。叶片然后转至含有 50ug/ml 卡那霉素, 和 250ug/ml 羧苄青霉素

的 MS4 培养基的琼脂板上。每周将叶片转至新鲜的 MS4-KC 培养板上。直至可见再生芽。再将再生芽转至含 MSO - KC 培养基的琼脂板上。(每升 MSO - KC 培养基含有: 4.4 克 Murshige 和 Skoog 基本盐和基本有机物, 30 克蔗糖, 1 毫克烟酸, 1 毫克吡哆素, 10 毫克维生素 B1, 250ug/ml 5 羧苄青霉素和 50ug/ml 卡那霉素, 10 克琼脂, 氢氧化钾调至 PH5.7)。

新芽形成后, 将植物移入土壤, 生长至成熟。

e. 转化的 *Arabidopsis* 植物的再生

10 在无菌培养中生长的完整的 *Arabidopsis thaliana* 的根插入诱导培养 CIM 基中, 28 度避光培养 3 天。(每升 CIM 含: 3.1 克 Gamborg's 培养基粉, 30 克蔗糖, 1 毫克 2,4-二氯苯氧乙酸, 100 微克激动素, 1 毫克肌醇, 0.1 毫克烟酸, 0.1 毫克吡哆素, 0.1 毫克维生素 B1, 8 克琼脂, 氢氧化钾调至 PH5.7)。

15 将 2ml 含有土壤杆菌的培养液(约含 1×10^8 的 8 次方土壤杆菌/ml)加至根上, 根的表面要完全与土壤杆菌接触, 倾倒多余液体。将根切成 5mm 片段, 与细菌在 28 摄氏度共培养 2 天。然后转至含有 50ug/ml 卡那霉素, 和 250ug/ml 羧苄青霉素的 SIM 培养基的琼脂板上。(每升 SIM 培养基含有: 3.1 克 Gamborg's 培养基粉, 30 克蔗糖, 5 毫克 N6 - (2-异戊烯基腺嘌呤, 150 微克吲哚 - 3 - 乙酸, 1 毫克肌醇, 0.1 毫克烟酸, 0.1 毫克吡哆素, 20 0.1 毫克维生素 B1, 8 克琼脂, 氢氧化钾调至 PH5.7)。

每周将叶片转至新鲜的 SIM 培养板上。直至可见再生芽。再将再生芽转至含有 EM 培养基的琼脂板上。(MSO-KC 每升含: 4.4 克 Murshige 和 Skoog 基本盐和基本有机物, 10 克蔗糖, 1 毫克吲哚 - 3 - 丁酸, 1 毫克烟酸, 0.1 毫克吡哆素, 0.1 毫克维生素 B1, 250ug/ml 羧苄青霉素, 8 克琼脂, 25 氢氧化钾调至 PH5.7)。

新芽形成后, 将植物移入土壤, 生长至成熟。

实施例 3. 转基因植物的识别

30 应用前述的 ELISA 方法识别表达单一免疫球蛋白链的卡那霉素抗性转化体, 进一步的分析包括用如 Maniatis 所述的 Northern blotting 检验 RNA。用 Western blotting 查验免疫球蛋白多肽。

每一免疫球蛋白链, 抗原性物质, RNA 和蛋白均用相应的方法检验。

用已认证含有高水平免疫球蛋白链的转化体进行交叉授粉。

实施例 4. 通过转化体交叉授粉装配抗体

交叉授粉的目的是为了获得能够共表达所设计抗体的不同成份的植物，这些交叉授粉后产生的苜蓿，西红柿，烟草和 Arabidopsis 含有下列已装配的成份，所有成份均含有 Guy's 13 抗原结合功能区。

	抗体类型	免疫球蛋白组分
1.	G1 重链	k 轻链
2.	G2/A 重链	k 轻链
10 3.	G2/A 重链	k 轻链 J 链
4.	G1/A 重链	k 轻链 J 链 保护性蛋白
5.	G1/A 重链	k 轻链

实施例 5. 从转基因植物中提取和检验 Guy's 13 1, 2, 3, 4 型抗体

15 a. 提取和富集叶子所含抗体

将叶子剪碎成约 1cm² 大小，置于冷却约 4 摄氏度的瓷臼中，加入含有 10ug/ml leupeptin 的冷 TBS 溶液(每克叶加入 1ml TBS)。研磨碎片至植物液体释出，继续研磨直至碎片形成均匀的浆状(约研磨 3 分钟)，用 50,000 克 4 摄氏度离心沉降均浆，取出上清液。另一方法是使均浆通过 100 目孔径的塑料网过滤。

依据特殊植物中抗体的滴度，上清液可直接或富集至一定浓度后与抗原结合以控制抗体浓度，粗提物中 IgG1 和 IgG/A 的产率通常低于 10ug/ml，平均为 5ug/ml。用于粘膜表面的 Guy's13 抗体的浓度为 1 - 4 毫克/ml，对于 1, 2, 3 型结构，Guy's13 抗体需 10 - 40 倍浓缩以达到所需浓度。浓缩方法包括应用亲和吸收，(用蛋白 A 或蛋白 G)或冰冻干燥，亦可用分子排除层析浓缩抗体。但此方法需要首先分离粗提物。用 ELISA 测试和聚丙烯酰胺凝胶电泳方法得知，1 和 2 型的共表达且装配完成的复合体分子量约为 180 - 200 千道尔顿，而 3 型则为 400 千道尔顿。常规得到的粗提物约含 5 - 10ug/ml 抗体。

30 当保护性蛋白与含 3 型抗体的植物杂交以产生含有 4 型抗体的植物时，抗体的浓度明显增加。用 ELISA 测试和聚丙烯酰胺凝胶电泳方法，这种表达且装配完成的复合体分子量约为 400 千道尔顿。常规粗提物的含量超过

200ug/ml。平均约为 25ug/ml。

故而 Guy's 13 抗体的 SIgA 结构仅需少倍数浓缩即可达到所需浓度。可用上述的技术完成浓缩。另外，已发现用分子量为 200000 道尔顿的超滤膜，超过滤可以很容易地将抗体与大部分植物大分子分离。

5

b. Guy's 13.4 型抗体的功能

用 ELISE 测试抗体功能。所有表达抗体轻链和重链的植物可装配成功能性抗体，功能性抗体具有与链球菌抗(SAI/II)特异结合的性质。结合水平和滴度曲线与小鼠杂交瘤上清的滴度曲线和结合水平相似。仅表达 J 链或保护性蛋白的植物检测不到与 SAI/II 的结合。同时不表达免疫球蛋白的野生型植物亦没有可检测到的结合。

相同实验中，应用抗分泌组分的抗血清，可检测到抗体与固定的纯化链球菌抗原或细菌细胞表面的原始抗原的结合。在这些测试中，只有 4 型抗体可测到结合。功能性的 1, 2, 3, 型抗体并不与抗分泌组分抗血清结合，这些结果证明了保护性蛋白在植物中装配形成 4 型抗体结构，但不影响与抗原的结合。

15

实施例 6. 嵌合抗体的表达

编码小鼠单克隆抗体(mAb Guy's 13)的重链和轻链的基因已克隆并在烟草中表达。转基因植物可被再生并分泌全长的 Guy's 13 抗体。通过处理重链基因序列，导入源于免疫球蛋白 a 重链的稳定功能区，使植物分泌具有嵌合的 a/r 重链的 Guy's 13 抗体。对每一植物抗体均用 Western blotting 分析重链和轻链，应用抗原结合测试方法，验证抗体装配的忠实性和功能的完全性。进一步，植物抗体保持了凝集链球菌的功能。此证明全长抗体的二价抗原结合能力是完整的。

25

a. 克隆重链和轻链基因

应用胍乙啶盐酸/酚/氯仿提取法。从 Guy's 13 和小鼠 IgA(MOPC315)杂交瘤细胞系中纯化信息 RNA。用小鼠白血病病毒逆转录酶制备互补 DNA。应用 PCR 扩增编码 Guy's 13r 和 k 链的 DNA。PCR 中所用的变性寡聚核苷酸，设计为：扩增的 DNA 片段 5'端含有 xhoI 位点，3'端含有 ECoRI 位点。经内切酶消化后。免疫球蛋白编码 DNA 接入植物表达载体(pMON530)。该

30

载体中克隆位点上游，含有小鼠免疫球蛋白导引序列。将重组的载体转化大肠杆菌(DH5-a, GibcoBRL)以放射性同位素标记原始 PCR 产物作为探针。应用 Southern Blotting 筛选转化体。纯化阳性转化体的质粒 DNA 并导入土壤杆菌。

5 应用相同的方法构建两种杂交的 Guy's 13 重链。图 1 中所示的合成寡聚核苷酸用于 PCR 以扩增以下功能区：

(a) Guy's 13 信号序列至 CT1 的 3'端。(J1-J5)。

(b) Guy's 13 信号序列至 CJ2 功能区的 3'端(J1-J2)。

(c) Ca²⁺ 功能区的 5'端至 MOPC315 杂交瘤 DNA 的 3'端(J3-J4)。纯化片段
10 (Gene cleanII, Bio101, LaJolla, CA)在 37°C 用 HindIII 消化 1 小时。经 T4DNA 连接酶催化。在 16 摄氏度作用 16 小时，连接 Guy's13 片段与 MOPC315 片段。用 Guy's13 的 5'端和 MOPC315 3'端的寡聚核苷酸为引物。以上述反应的混合物为模板 DNA，作进一步的 PCR。纯化扩增的 DNA 片段。如上所述，接入 PMON530 载体。本程序中所用的载体不含先前所述
15 的插入的小鼠导引序列。此种情况下，在 PCR 扩增过程中，已包括了编码原始 Guy's 13 导引序列的 DNA。

b. 植物转化和再生

20 将经表面消毒的烟草叶(*Nicotiana tabacum*.var.*xanthii*)剪成 6mm 直径大小叶片在 28 摄氏度与含有免疫球蛋白 cDNA 插入子重组土壤杆菌共培养过夜，将叶片转至培养板中，其中的培养基含有 200mg/l 卡那霉素和 500mg/l 羧苄青霉素。并可诱导培养基中。根出现后，立即将幼植物移植入土壤中。用下述方法筛选免疫球蛋白链的表达。通过交叉授粉将表达重链的植物与表达轻链的植物杂交。所产生的籽种入土壤使其发芽。通过 ELISE 确定共
25 有 22 个含有重链或轻链结构的转基因植物再生。分泌重链和轻链的植物的杂交产生了 3/10 的植物表达 k 和 r 链的 F1 子代植物，4/17 的植物表达 k 链和 G1/A 重链，3/8 的植物表达 k 链和 G2A 重链。

有三种不同形式的 Guy's 13 单克隆抗体在植物中表达，所有均含相同的轻(K)链但含不同的重链。本报告中所用编号例于下图(图 1):

30 植物 G13: Guy's 13 IgG1 与原始的 r 重链,

植物 G2/A: Guy's 13 IgG1 与含 var-r1-r2-a2-a3 功能区的 IgG/IgA 杂交重链,

小鼠 Guy's 13: 作为阳性对照的 Guy's 13 杂交瘤细胞培养上清液。阴性对照植物为 PMON530 载体转化的植物。其载体含有编码无关小鼠蛋白的插入子。

5 C. 抗体链的检测

应用 ELISA 方法检测 r.k. 或 r/a 杂交链的产生。用含有羊抗鼠重链或轻链 IgG 的 TBS(150mM NaCl 20mM tris-HCl, PH8) 溶液包被微滴度板。用含有 5 % 无脂肪干牛奶的 TBS 在 4 摄氏度过夜阻断。含有 Leupeptin(10ug/ml) TBS 中匀浆植物叶。将上清液经二倍连续稀释加入微滴度板, 40 摄氏度过夜孵育, 用含有 0.05 % Tween-20 的 TBS 洗涤后, 在 37 摄氏度 2 小时, 检测试剂为 2, 2'-连氨基 - 双 - (3 - 乙基磺化苯噻唑啉)(Boehringer, FRG), 用连有辣根过氧化酶的羊抗鼠重链或轻链的特异性抗体检测结合的免疫球蛋白链。

应用同样的方法确定小鼠和植物 Guy's 13 抗体的浓度。用已知浓度的小鼠 IgG1 mAb(MOPC21) 和小鼠的 IgA mAb(TEPc21) 作为对照。用抗小鼠 K 链抗血清包被 ELISA 板, 经阻断后, 用连有辣根过氧化酶标记的抗鼠 r 或 a 抗血清检测结合的抗体。用每一抗体的结果曲线为对照, 确定抗体浓度。

同样应用 ELISA 的方法检测抗体与 SAI/II 的结合。ELISA 方法如上所述用完整细胞检测抗体与 Smutans 或大肠杆菌的结合能力, 细胞的制备如下: 将使完整细胞在 37 摄氏度 Guy's 13C 细胞株和大肠杆菌 DH - 2 生长 18 小时至线性生长期, 用 10 % 福尔马林固定备用, 所有抗体溶液的浓度调至 1.5ug/ml, 再作二倍系列稀释。用此方法检测单独表达 Guy's 13 重链或轻链的植物提取物, 以确定是否单一免疫球蛋白链呈现抗原结合能力。用辣根过氧化酶标记的羊抗鼠轻链或重链抗血清(Nordic Pharmaceuticals) 检测与细胞或纯化。SAI/II 结合的抗体。实验重复三遍, 以平均数+标准误表示结果。

用上述的纯化 SAI/II 包被做滴度板进行竞争性 ELISA 测试。1.5ug/ml 浓度的 Guy's13 杂交瘤上清液和连续二倍稀释的浓度与培养板在 37 摄氏度。孵育 1 小时或在 4 摄氏度过夜。洗涤后, 加入 125I 标记的小鼠 Guy's13 然后在 37 摄氏度孵育 2 小时。再洗一次培养板后, 用 γ 计数器 (Hydragama, 16, Innotec, GB) 计数结合的放射性同位素。实验结果一标记的小鼠 Guy's13 结合抑制百分比表示, 其百分之后表示未加阻断剂

的孔内的放射性同位素的计数。

d. Western Blot 分析

10 微升叶片匀浆在 75mM Tris-HCl(PH6.8)和 2%SDS 的还原或非还原条件下煮沸。同样在 10%聚丙烯酰胺胶上电泳，然后将胶转入至乙酸纤维素膜上。转印膜在含有 0.05%Tween-20 和 1%无脂肪干牛奶中孵育 16 小时，然后加入羊抗鼠 IgG1K 或 α 链的特异性抗血清，在 37 摄氏度孵育 2 小时，洗涤之后，加入第二抗体，即碱性磷酸酶标记的兔抗羊 IgG，在 37 摄氏度条件下孵育 2 小时，用 300ug/ml 氮兰四唑和 15pug/ml 5 - 溴 - 4 氯 - 3 碘磷
10 检测抗体的结合。

e. DNA 序列分析

每一克隆的免疫球蛋白基因的插入子的 DNA 序列已证实在 PCR 扩增或克隆过程中没有突变发生，HindIII 位点导入 λ /r 杂交重链导致预期的结果。即在植物 G2/A 的 Cr2 和 Ca2 功能区之间加入了胱氨酸。植物 G2/A 中的附加的 Cr2 功能区结构预计可增加重链长度约 141 个氨基酸残基(约 12000 道尔顿)。G1/A 重链与原始 Guy's 13 重链相比，预计可轻微增加约 33 个氨基酸残基(约 3000 道尔顿)。
15

对从大肠杆菌阳性转化体中纯化的质粒 DNA 进行序列分析。将免疫球蛋白基因插入子剪断，并克隆入 Bluescript(Stratagere USA)。用双脱氧终止法进行 DNA 序列分析(Sequenase, USB, USA)。
20

f. 装配抗体的表达

三个代表性的 F1 子代植物的提取物的 Western blot 分析结果见 Ma 等，图 2。Eur. J. Immunol., 24: 131-138(1994)。在还原条件下电泳样品的结果证明：在小鼠 Guy's13 三个转基因植物中存在约 25Kd 的轻链(K 链)，但在对照植物中不存在，在植物 Guy's 13 中亦存在约 57Kd 的 Guy's13 重链(r 链)，但在对照植物中不存在。不象在产生 Guy's 13 抗体的细胞培养上清液中，转基因植物中可检测到单一蛋白种属，并可持续检测到二种蛋白。
30 小鼠重链的分子量的差别可能是由于转因 j 的不同。此结果提示，在植物中，两重链可以相同方式被糖基化。

用抗 α 链抗血清检测植物 G1/A 和 G2/A 中的重链。与小鼠 G13 重链(约

57Kd)相比。植物 G1/A 的重链的分子量稍大(约 60Kd), 而植物 G2/A 的重链分子量较大(约 70Kd)。这与序列分析所预测的分子量相符。在转基因植物的提取物中, 同时检测到几种其它种类的蛋白质。这些很可能是重链/轻链复合体或重链的降解片段, 而在对照植物的提取物中, 没有发现这些蛋白质。抗 a 链抗血清与仅含有 r 链的小鼠 Guy's13 抗体没有交叉反应。

以在非还原条件下电泳样品证明重链和轻链装配为免疫球蛋白分子的结果。见于 Ma 等的图 3。Eur.J.Immunol, 24: 131-138(1994)。用标记的抗 K 链抗血清检测。所有三个转基因植物均含装配的免疫球蛋白, 其全长抗体的分子量大于 150Kd。植物 G13 抗体的分子量与小鼠 G13 抗体相似, 但植物 G2/A 和植物 G1/A 的抗体, 如所预计, 分子量较大。同时亦检测到几种较小的降解片段。与先前的发现相符。同时说明在抗体提取过程中植物释放某些种类蛋白酶。在对照植物的提取物中未见这些蛋白质。证明了这些蛋白质属抗体片段。

15 g. 抗原结合

加工 10 株含免疫球蛋白的植物。植物提取物中免疫球蛋白的浓度从 1 - 10ug/ml 变化不等(平均 4.5ug/ml)。用 ELISE 方法估算本研究中所用的小鼠抗体和代表性植物中的抗体的浓度: 小鼠 IgG - 15.4ug/ml, 植物 IgG - 7.7ug/ml, 植物 G1/A - 1.5ug/ml, 植物 G2/A - 2.1ug/ml。对含有杂交重链的植物抗体的浓度估算可能低于实际浓度。因为与标准的 mAbIgA 比较, 这些抗体并不含有所有的稳定区决定簇。

三个代表性转基因植物提取物与 SAI/II 结合的滴度曲线见于 Ma 等的图 4。Eur.J.Immunol., 24: 131-138(1994)。在三种转基因植物提取物中可检测到特异性抗体, 其滴度曲线在相同浓度下, 与小鼠杂交瘤细胞培养上清液的滴度曲线相似。尽管滴度曲线相似, 但植物 G1/A 抗体的结合力与其它抗体相比较低。在阴性对照植物中, 没有检测到 SAI/II 的结合活性。这些发现证明表达轻链和重链的转基因植物能够正确地装配抗体分子以形成功能性的抗原结合位点, 而单一的轻链或重链均不能与抗原结合。

植物抗体也能够识别链球菌细胞表面的原始抗原, 见 Ma 等的图 5。Eur.J.Immunol., 24: 131-138(1994)。这进一步证明抗原结合位点在植物抗体中的整合。不同抗体的结合没有显著差异。对照植物的提取物和所表达重链或轻链的植物提取物均不能与 S.mutans 细胞结合。在 1.0 和 0.5ug/ml

浓度下，任何抗体提取物均不能与大肠杆菌细胞结合。

植物抗体与小鼠的原始 Guy's 13 mAb 竞争结合 SAI/II，植物抗体已证明能够抑制 ¹²⁵I 标记的小鼠 Guy's 13 mAb 与 SAI/II 的结合达 85%，见图 6。

Ma 等 Eur.J.Immunol., 24: 131-138(1994)。如前小鼠 Guy's 13 抗体与植物抗体的抑制滴度曲线相似，但对照植物的提取物没有抑制作用。

h.S.mutans 的凝集

植物产生的免疫球蛋白含有 Guy's13 抗原结合区，其对细菌的作用的报告见图 7。Ma 等 Eur.J.Immunol., 24: 131-138(1994)。用 0.22um 孔径的过滤器，过滤消毒植物提取物。用 ToddHewitt 液稀释 10 倍。将 0.05 体积的过夜培养的 S.mutans 接种于样品中，并在 37 摄氏度过夜培养。格兰氏染色样品并在油镜下观察。在小鼠 Guy's13，植物 Guy's13。植物 G1/A 或植物 G2/A 存在的条件下，S.mutans 被凝集并可见细胞成簇。然而，对照植物的提取物对 S.mutans 的生长没有影响。通过 8，12，16 小时培养，任何植物 mAb 对 S.mutans 的生长均没有影响。此结果证明：不仅植物抗体具有装配正确的抗原结合区，而且抗体分子与抗原是二价结合。

实施例 7.含有保护性蛋白的免疫球蛋白的生产 构建四种转基因的烟草植物以表达：

- 1.具有 Guy's 13 轻链的抗原结合位点的小鼠单克隆免疫球蛋白 K 链。
- 2.含有 Cr 和 Ca 链功能区和 Guy's13 重链抗原结合位点的杂交 IgA/G 小鼠免疫球蛋白重链。
- 3.小鼠 J 链
- 4.由多聚免疫球蛋白受体的第 1 - 606 个氨基酸，但不含第 627 - 675 氨基酸所组成的保护性蛋白。见例 1。连续的有性杂交这些植物以产生同时表达所有四种蛋白链的子代植物。在某些情况下，应用回交以生产均一性植物。四种重链多肽装配成含有保护性蛋白的功能性的大分子免疫球蛋白。其分子量约为 470000Kd。保护性蛋白与免疫球蛋白的装配依赖于 J 链存在。当单独表达抗体的植物与表达保护性蛋白的植物杂交时，并未见保护性蛋白的装配。对表达含有保护性蛋白的免疫球蛋白的植物进行显微分析证明，保护性蛋白与免疫球蛋白重链在单一细胞内是共同表达的。在转基因植物中，单细胞能够产生具有保护性蛋白的免疫球蛋白，而在哺乳

动物中则需二个细胞来产生自然的分泌型免疫球蛋白。结果证明：表达重组亚单位的转基因植物的有性杂交对被动免疫所需的含有保护性蛋白的免疫球蛋白的大规模生产是适宜的，同时亦可用于表达其它复合蛋白质分子。

- 5 含有保护性蛋白的免疫球蛋白具有源于 Guy's13 单克隆抗体的重链和轻链抗原结合功能区。可以特异性识别口腔链球菌的细胞表面黏附分子 SAI/II。见 Smith, R.&Lehner, T. *Oral Microbiol. Immunol.*4, 153-158(1989)。已在烟草植物中产生了这种只含有重链和轻链的转基因免疫球蛋白。见例 6, 用与小鼠 J 链 N 端 MKTHLL 和 C 端 SCYPD 相互的合成寡聚核苷酸引物, 成功地扩增了含有编码全长 cDNA 的小鼠 J 链结构。见 matsauchi, L., Cann, G.M. & Koshland, M.E. *PNA* 83, 456-460(1986)。此扩增的核苷酸序列连入植物表达载体 PMON530。此载体含有花柳叶镶嵌病毒的 35S 启动子。见 Rogers, S.G., klee, H.J., Horsch, R. B. *Fraley, R.T.meth.Enzymol.*153, 253-276(1987)。如前所述, 可应用含有重组质粒的土壤杆菌转化烟草叶组织。筛选含有编码 J 链 mRNA 的再生植物, 阳性转化体自我传代以产生同一的子代。J 链表达植物与表达嵌合免疫球蛋白重链和 K 链的植物杂交。在还原条件下, 用抗 K 链抗血清做 Western Blot 以检测植物提取物中的嵌合免疫球蛋白重链, 结果显示, 蛋白质分子量约为 210Kd。与原始的 IgG1 抗体比较, 此结果符合预期, 即:
- 15 嵌合免疫球蛋白重链上含有额外的稳定功能区。表达免疫球蛋白和表达 J 链的植物杂交所产生的子代植物, 所产生的主要免疫球蛋白的分子量大约为 400Kd, 约为相关分子的两倍。此结果证明, 3 个多肽装配形成了二聚体免疫球蛋白(dIgA/G)。

25 用与兔多聚免疫球蛋白受体 N 端 MALFLL 和 C 端第 601 - 606 氨基酸处 AVQSAE 相应的合成寡聚核苷酸作为引物, 扩增编码全长 cDNA 的保护性蛋白结构。兔多聚免疫球蛋白受体的核苷酸序列已由 Mostov, K.E., friedlander, M.&Blobel, G. *Nature* 308, 37-43(1984)。如上所述, 在转基因植物中产生保护性蛋白, 并用 Western Blot 方法识别表达保护性蛋白的阳性转化体。

- 30 表达 J 链并与具有 IgA/G 重链的免疫球蛋白装配而形成二聚体的植物与表达保护性蛋白的植物杂交。在还原条件下进行 Western Blot 结果显示, 子代植物产生含保护性蛋白的免疫球蛋白, 其分子量约为 470Kd。此分子

量与所预期的含有保护性蛋白的免疫球蛋白分子量相符。用特异性识别保护性蛋白的抗血清进行 western blot 证明此大分子蛋白中含有保护性蛋白。用抗 K 链抗体, 而不用保护性蛋白抗血清检测, 植物提取物中亦含有与二聚体 IgA/G 相应的约 400Kd 的蛋白质和与具有嵌合重链相应的 210Kd 的蛋白质。

5 在非还原条件下, 对只生产保护性蛋白的转基因植物进行 Western blot 分析, 并未检测到大分子蛋白质。说明保护性蛋白并不与内源性植物蛋白装配或形成多聚体。Western blot 分析证明表达免疫球蛋白重链的植物提取物(IgA/G, 二聚体 IgA/G 和含有保护性蛋白的免疫球蛋白)具有相同的免疫球蛋白起源的重链和轻链, 而只含保护性蛋白, J 链或野生型植物的提取物中则未见。应用特异性保护性蛋白的抗血清, 只能在含保护性蛋白的植物和具有保护性蛋白的含 IgG/A 免疫球蛋白的植物中, 检测到此类蛋白质。在野生型对照植物中未见交叉反应蛋白质。

10 在哺乳动物中, 分泌片与免疫球蛋白的装配需要 J 链的存在, 见 Brandtzaeg, P. & Prydz, H. Nature. 311, 71-73(1984)。将表达含有嵌合重链(IgA/G)免疫球蛋白的植物与表达保护性蛋白的植物杂交。在所产生的子代植物中, 仅表达免疫球蛋白和保护性蛋白。但没有 J 链的四株植物不能产生装配复合体。而其表达 J 链的 10 株植物中, 则可见含有保护性蛋白的分子量为 470Kd 的免疫球蛋白。

20 这证明了如在哺乳动物中, 保护性蛋白与免疫球蛋白的装配需要 J 链。用抗 K 链抗血清检测 210Kd 单聚体的免疫球蛋白, 与保护性蛋白特异结合的抗血清。仅识别抗性而不与免疫球蛋白重链或轻链结合。应用 ELISA 方法, 对 5 株产生免疫球蛋白的植物进行功能研究。所有表达免疫球蛋白重链和轻链的植物, 均能装配成功能性免疫球蛋白。这些免疫球蛋白能特异性地识别链球菌 SAI/II 抗原。结合水平和滴度曲线与小鼠杂交瘤细胞上清液相似。只表达 J 链或保护性蛋白的植物和野生型植物, 不能识别 SAI/II 抗原。用特异性与保护性蛋白结合的抗血清, 可以检测到免疫球蛋白与纯化的链球菌蛋白或原始的细菌细胞表面抗原的结合。在这些测试中, 可特异性地检测含有保护性蛋白的免疫球蛋白与链球菌抗原的结合。这些结果
25 证明, 保护性蛋白与免疫球蛋白的装配并不影响抗原结合能力。

30 重链和轻链装配成功能性免疫球蛋白分子的效率非常高。见 Hiatt, A.C., cafferkey, R. & Bawdish, K. Nature 342, 76-78(1989)。在重链

和轻链的结构中必须有一段信号肽存在，以引导重组蛋白质在植物内质网中装配。见 Hiatt, A.C., Cafferkey, R. & Broadish, K. Nature 342, 76-78(1989)。此研究证明了免疫球蛋白装配的忠实性，包括在植物中，由 J 链将单聚体抗体装配成二聚体。这些结果证明，在植物中双聚体免疫球蛋白占抗体量的大部分(约 57%)。结果也证明装配完毕的含有保护性蛋白的免疫球蛋白可以象原始小鼠单克隆抗体一样，与相应的抗原结合。这些具有保护性蛋白的免疫球蛋白占总抗体量的大部分约 45 %。

双聚体免疫球蛋白与保护性蛋白在植物中的共表达导致含有保护性蛋白的功能性免疫球蛋白装配成功。用同样的 PMON 530 表达载体和导引序列。将这种复合体的所有四种转基因导入植物。这种载体含有源于花柳叶镶嵌病毒 35S 转录子的启动子序列。可引导转基因在大部分植物的不同细胞中的表达。见 Benfey, P.N.&Chua, N-H.Science 250, 959-966(1990); Barnes, W.M.PNAS 87, 9183-9187(1990)。所有四种基因由相同的启动子指导表达，使其在普通的植物细胞中能够同表达。对表达含有保护性蛋白的免疫球蛋白的植物的显微镜观察显示：叶片的许多类型细胞中含有制备免疫球蛋白的单一蛋白成份。这些蛋白质在未鞘细胞中浓度最高，存在于细胞壁内。在细胞间质腔中未见。大分子免疫球蛋白成份保护性蛋白和嵌合免疫球蛋白重链，均被限制存在于单一细胞的原生质和原地胞质之间。这即将分泌性免疫球蛋白的装配限于合成各组成成份的细胞内。装配的亚细胞位置和机理仍有待研究，但已知在植物中装配多源多聚体 IgG 需要各装配成份与内源膜系统结合。见, Hiatt, A.C., Cafferkey, R. & Bowdish, K. Nature 342, 76-78(1989); and Hein, M.B., Tang, Y., Mclead, D.A.Janda, K.D.&Matt, A.C.Biotechnol Prog. 7, 455-461(1991)。

另外，我们已证明除了膜整合透过细胞及蛋白质降解的信号源于成熟分泌片的保护性蛋白，能够与含有 r 和 a 蛋白质功能区的嵌合免疫球蛋白重链装配。这些结果证明，二聚体免疫球蛋白与保护性蛋白结合，仍保有 IgG 稳定区的功能。结合蛋白 A，固定补体，Fc 受体活力。这些附加能力可以增加用于被动免疫的免疫球蛋白的功能，同时使用于被动免疫的含有保护性蛋白的免疫球蛋白的功能更为增强。含有保护性蛋白的免疫球蛋白的高水平表达和扩大生产使此种单克隆抗体的生产更为经济。

方法:

下例方法用于制备和分析本例的免疫球蛋白,

i)以抗体在转基因的烟草中的装配

- 5 在含有 10ug/ml Leupeptin 的 150mM NaCl 20mM tris-HCl(PH8)(TBS)的溶
液中将植物叶片匀浆, 将提取物煮沸 3 分钟。加入 75mM Tris HCl(PH6.8)
和 2%SDS。非还原条件下, 在 4 % 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 将凝胶转印至
乙酸纤维素膜上, 将转印膜置于含 0.05 % Tween-20 和 1 % 无脂肪干奶中
10 孵育 2 小时。然后加入适宜的抗血清, 在 37 摄氏度孵育 2 小时。经冲洗后,
连有碱性磷酸酶的第二抗体与转印膜在 37 摄氏度共孵育 2 - 3 小时。用与
300mg/ml 的氮兰四唑和 150mg/ml 5-溴-4-氯-3-碘磷溶液共孵育来检测抗
体的结合。用抗 K 链抗血清和特异性识别保护性蛋白的抗血清, 分析非还
原条件下植物提取物的 Western blots, 以确定提取物中是否免疫球蛋白分
子组装为免疫球蛋白。将植物中产生的免疫球蛋白与单克隆的 IgG1 Guy's13
15 免疫球蛋白比较。Smith, R&lehner, T. Oral microbiol. Immunol.4,
153-158(1989)。

ii)Western 分析:

- 20 在还原条件下对每一植物提取物进行 Western 分析以确定免疫球蛋白的
各蛋白质组成组分。不同植物提取物样品的制备如前所述, 但加入 5%二硫
基乙醇。在 10 % 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 并将凝胶转印至乙酸纤维素膜
上。用抗小鼠 r1 重链(sigmaUK), 抗小鼠 K 链(bradsureUK)或特异性识别保
护性蛋白的抗血清作第一抗体。适宜的碱性磷酸酶连接的抗体为第二抗
体, 检测各单一蛋白质。

25

iii)Western 分析以呈现具有保护性蛋白的免疫球蛋白的产生。

- 转基因植物的 Western 分析方法如前所述, 表达含有保护性蛋白的免疫
球蛋白的植物提取物在还原和非还原条件下。在聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 并
将蛋白质转印至乙酸纤维素膜上。用抗 K 链抗血清或特异性识别保护性蛋
30 白的抗血清。适宜的碱性磷酸酶标记的第二抗体, 检测免疫球蛋白组分。

iv)含有保护性蛋白的抗原特异性免疫球蛋白在转基因的烟草中的表

达。

为确定植物产生抗原特异性的免疫球蛋白，应用辣根过氧化物酶标记的抗 K 链抗血清，检测植物提取物与纯化的链球菌 SAI/II 抗原的结合。用对保护性蛋白具有免疫特异性的抗血清，和碱性磷酸酶标记的猴抗羊的第二抗体检测植物提取物与纯化的链球菌 SAI/II 抗原和链球菌细胞的结合。已经证明，抗原特异性的免疫球蛋白中含有保护性蛋白。抗原特异性免疫球蛋白的检测在微滴度板上进行。首先，将溶于 TBS 中(2ug/ml)的纯化的 SAI/II 或处于对数生长期的链球菌(NCTC 10449)包被于培养板上。用含有 5 % 无脂肪干牛奶的 TBS 在室温下阻断 2 小时，植物叶含有在 Leupeptin(10ug/ml)的 TBS 中匀浆。用小鼠 Guy's 13 杂交瘤细胞培养上清液作为阳性对照。将上清液经二倍连续稀释加入微滴度板，室温孵育 2 小时，用含有 0.05 % Tween-20 洗涤后，分别用连有辣根过氧化物酶的羊抗鼠轻链或羊抗 SC 抗血清和碱性磷酸酶标记的猴抗羊抗体作为二抗，在室温下孵育 2 小时检测结合的免疫球蛋白链。辣根过氧化物酶标记的抗体以 2, 2'-连氨基-双-3 苯丙噻唑啉硫酸脂，碱性磷酸酶标记的抗体以磷酸硝基苯酚二钠为显色剂检测免疫球蛋白。

v)植物中免疫球蛋白组分的定位

应用免疫金检测小鼠 a 链的方法，对表达含保护性蛋白的免疫球蛋白的转基因和对照烟叶做显微摄影。简言之：将植物叶切成 2mm x 10 mm 大小置于固定液中。固定液为：3 % 仲甲醛(W/V)，0.5%戊二醛，5 % 蔗糖，100mM 磷酸钠 PH7.4。经酒精脱水后，二甲苯溶液石蜡包埋，切成 3mm 切片。置于玻片上进行免疫化学染色。植物叶片与第一抗体，即：亲和纯化的兔抗小鼠 a 链(与 A/G 杂交重链结合)或羊抗兔 SC，然后与第二抗体，即：羊抗兔-10nm 金，或兔抗羊-10nm 金共孵育，用银加强免疫金信号的强度。对相同的叶片切片进行光镜和相差显微镜观察。保护性蛋白在系列切片中的免疫定位用于表示作为免疫球蛋白的重链的相同的位置。已对下列细胞和细胞池进行了分析：海绵状叶内细胞，表皮细胞，细胞间隙，栅栏状实质细胞和维管束。

进一步分析免疫球蛋白组分的确切定位是通过应用免疫球蛋白各组分的免疫金检测以分析转基因烟草和对照烟草的维管束的连续切片完成的。表达分泌性免疫球蛋白的转基因植物的连续切片与特异性识别保护性蛋白

的抗体或抗 IgA 的抗体孵育，再与相应的金标记的第二抗体孵育。不含有任何免疫球蛋白编码序列的对照植物的切片同时与抗 IgA 抗体继而与金标记的第二抗体孵育，或单独与金标记的第二抗体孵育以验证染色的特异性。应用光镜和相差显微镜观察微小维管束中保护性蛋白的免疫金定位。

- 5 维管束连续切片的光镜观察证明了免疫球蛋白重链与保护性蛋白的免疫金定位是相同的。

实施例 8. 含有保护性蛋白的免疫球蛋白的植物提取物的生产。

- 含有保护性蛋白免疫球蛋白的植物各部(叶, 茎, 花, 根或混合各部分),
10 与匀浆缓冲液混合(每克植物组织的 2ml 缓冲液。匀浆缓冲液: 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, PH7.5), 用组织粉碎器将其制成匀浆。10000 x g 离心以去除碎片, 在室温下, 上清液与等量的 HPLC 级的乙酸乙脂混合摇晃后 10000 x g 离心, 将水相移至另一容器, 真空抽干留下的乙酸乙脂。产生的粗提物每毫升含有 100ug 的保护性蛋白的免疫球蛋白。此方法适于任
15 何含有保护性蛋白的免疫球蛋白的植物的提取。

包括研磨等方法均可用来匀浆, 匀浆过程可在冷却也可在室温条件下完成。

- 可通过用 hexane 或其它有机溶剂的萃取, 脱脂而进一步纯化提取物。脱脂对从植物提取物中萃取有效成份, 并非必须, 但对需最终纯化含有保护性蛋白的免疫球蛋白却是十分有益。在很多情况下, 粗提物不需进一步
20 纯化或浓度即可含有足够量的携保护性蛋白的免疫球蛋白(100ug/ml)。在口腔应用时, 提取物应与添加剂和稳定剂混合, 在牙齿应用时, 提取物应另外与胶质混合以保持提取物与牙齿的有效接触。对胃肠应用时, 混合物可直接吞咽。

25

实施例 9. 保护性蛋白的免疫球蛋白的稳定性。

- 按上述方法制备二种植物粗提物。第一种提取物源于表达 IgG 抗体的植物, 而另一种提取物则源于表达含保护性蛋白的免疫球蛋白。这些植物提取物中含有很多种蛋白酶, 延长提取物在室温或 37 摄氏度的孵育时间会导致蛋白降解。
30

应用 ELISA 方法, 测定二种植物提取物中 r-k 复合体的量作为在室温和 37 摄氏度下的时间功能曲线的指标。在这些测定中, 用抗 K 链抗体包被培养

板, 并与植物提取物在 37 摄氏度下孵育 1 小时。用辣根过氧化酶标记的抗 γ 链抗体, 检测植物起源的免疫球蛋白。植物提取物中的携保护性蛋白的免疫球蛋白的量, 以提取后即测定的量为 100 %。室温 3 小时后, IgG140 % 而携保护性蛋白的免疫球蛋白仍余 >95%; 6 小时后 IgG1 余 20 %, 而含保护性蛋白的免疫球蛋白仍余 >95%; 12 小时后, 未能检测到 IgG1, 而含保护性蛋白的免疫球蛋白仍余约 90%。提取后 48 小时, 保护性蛋白的抗体仍未见显著性减少 (~70%)

实施例 10. 表达携保护性蛋白的免疫球蛋白真核四重转基因细胞。

10 构成含保护性蛋白的免疫球蛋白的四种肽链均可在其它类型细胞体外 (细胞培养) 或体内转基因动物表达。见 *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, B. Hogan. Cold Spring Harbor Laboratory (1986)。在转基因动物中, 纯化制备的适宜的载体 DNA 在 10mM tris, 0.2mM EDTA PH7.4 溶液中调至 2ng/ul 的浓度。对同系动物的受精卵细胞注射载体 DNA, 应用标准方法, 将注射后的卵细胞转入假孕动物体内。应用 PCR 和 ELISA 等方法筛选新生动物中转基因的存在。杂交表达含有保护性蛋白的免疫球蛋白各不同组分的同系动物以产生具有多转化基因的动物。筛选杂交后代以确定其表达所有四种肽链。根据用于受精卵注射的载体类型不同, 在装配含有保护性蛋白的免疫球蛋白各组分的转基因动物中。可检测到不同类型细胞表达装配免疫球蛋白。这些载体 DNA 由特异的启动子组成。故可在特殊细胞或组织中转录基因。每一载体可表达保护性抗体的单一组分 (IgG/A, J 链, 保护性蛋白, 或 K 链) 或表达一种以上的成份。在这种情况下, 载体可含有适当数量的启动子和酶切点以利每种转基因的转录。

25 应用可分别起动每一种成份的 DNA 载体。可以在单一细胞培养系统中表达所有四种肽链。这需在相同的载体 DNA 上含有四种表达装置 (含启动子, 多克隆位点和多聚腺苷酸序列)。另一种方法是只要每一载体提供细胞系选择性抗性, 可用表达单一肽链的各载体依次转染单一细胞系。

30 常用的载体, 如 PMAMneo 即适于多表达系统。又适于作为表达独特选择性标志的系列载体之一。

用常规技术可转染任何真核细胞如成纤维细胞。简言之, 细胞在转染前一天以 1: 20 稀释传代, 在约 30 % 融合的情况下, 以每 5ug DNA/10cm

培养板, 在 125mM CaCl₂, 140mM NaCl, 25mM Hepes, 0.75mM NaHPO₄, PH7.5 的溶液转染。DNA 与细胞孵育 16 小时后, 用 10% DMSO 休克细胞 3 分钟转染后 48 小时, 细胞在含有抗菌素或其它细胞因子的培养基生长以完成选择。

- 5 所产生的细胞可以产生携保护性蛋白的免疫球蛋白的所有成份。这些成份可经适当装配形成含有保护性蛋白的功能性免疫球蛋白。

实施例 11. 兔多聚免疫球蛋白受体的部分细胞质功能区与保护性蛋白的融合工程。

- 10 编码兔多聚免疫球蛋白受体部分细胞质功能区 and 编码保护性蛋白的 DNA 片段结构的融合如前所述。编码从信号序列第一个氨基酸(MET-18) 到 GLU606 的保护性蛋白 cDNA 以 BglII-XhoI 片段形成, 连入任何植物表达载体如 pMON530 载体(用 BglII 和 XhoI 消化)。用含有 BglII 或 XhoI 识别序列, 且与编码兔多聚免疫球蛋白受体的 - 18 至 - 13 和 601 至 606 氨基酸碱基 DNA 互补的适宜的寡聚核苷酸引物, 进行 PCR 扩增, 以获得保护性蛋白的衍生物。用相同的方法, 获得编码从 MET - 18 至 ALA628 的保护性蛋白的 cDNA。所用含有 Xho 位点的寡聚核苷酸与编码 623 至 628 氨基酸的保护性蛋白 cDNA 互补。
- 15

- 可用同样方法将编码兔多聚免疫球蛋白受体细胞质功能区片段的 cDNA, 作为 XhoI 片段通过 PCR 扩增获得。所用寡聚核苷酸与编码含有 XhoI 识别序列的 ARG653 至 ALA755 DNA 互补。此片段连入已含有上述保护性蛋白 cDNA 的 pMON530 载体内。可通过限制性内切酶消化或对转化后的细菌克隆的质粒的序列分析, 确定细胞内功能区 cDNA 的定位。
- 20

- 用于 PCR 扩增的寡聚核苷酸含有适当数量的核苷酸, 以保证所产生的 cDNA 在框架之内, 并能被翻译为含有保护性蛋白和细胞质功能区的融合蛋白质。
- 25

- 所产生的适宜定位的 DNA 结构, 能编码直接与兔多聚免疫球蛋白受体的细胞内功能区融合的保护性蛋白, 但无穿透细胞膜片段的功能。此结构与 DNA 片段(启动子)连接以保证在植物细胞中的表达。此结构编码二个附加氨基酸(SER-TRP), 二者源于 XhoI 位点的引入, 并作为保护性蛋白与细胞质功能区之间的连接物。本载体如前所述, 用于转化土壤杆菌, 然后转化植物细胞。用上述实例中所述的相同技术, 生产表达此种蛋白质的植物。
- 30



	Ser Tyr Lys Cys Gly Val Gly Val Asn Gly Arg Gly Leu Asp Phe Gly	
	115 120 125	
5	GTC AAC GTG CTG GTC AGC CAG AAG CCA GAG CCT GAT GAC GTT GTT TAC Val Asn Val Leu Val Ser Gln Lys Pro Glu Pro Asp Asp Val Val Tyr	552
	130 135 140	
	AAA CAA TAT GAG AGT TAT ACA GTA ACC ATC ACC TGC CCT TTC ACA TAT Lys Gln Tyr Glu Ser Tyr Thr Val Thr Ile Thr Cys Pro Phe Thr Tyr	600
	145 150 155	
10	GCG ACT AGG CAA CTA AAG AAG TCC TTT TAC AAG GTG GAA GAC GGG GAA Ala Thr Arg Gln Leu Lys Lys Ser Phe Tyr Lys Val Glu Asp Gly Glu	648
	160 165 170 175	
	CTT GTA CTC ATC ATT GAT TCC AGC AGT AAG GAG GCA AAG GAC CCC AGG Leu Val Leu Ile Ile Asp Ser Ser Ser Lys Glu Ala Lys Asp Pro Arg	696
	180 185 190	
	TAT AAG GGC AGA ATA ACG TTG CAG ATC CAA AGT ACC ACA GCA AAA GAA Tyr Lys Gly Arg Ile Thr Leu Gln Ile Gln Ser Thr Thr Ala Lys Glu	744
	195 200 205	
15	TTC ACA GTC ACC ATC AAG CAT TTG CAG CTC AAT GAT GCT GGG CAG TAT Phe Thr Val Thr Ile Lys His Leu Gln Leu Asn Asp Ala Gly Gln Tyr	792
	210 215 220	
	GTC TGC CAG AGT GGA AGC GAC CCC ACT GCT GAA GAA CAG AAC GTT GAC Val Cys Gln Ser Gly Ser Asp Pro Thr Ala Glu Glu Gln Asn Val Asp	840
	225 230 235	
20	CTC CGA CTG CTA ACT CCT GGT CTG CTC TAT GGA AAC CTG GGG GGC TCG Leu Arg Leu Leu Thr Pro Gly Leu Leu Tyr Gly Asn Leu Gly Gly Ser	888
	240 245 250 255	
	GTG ACC TTT GAA TGT GCC CTG GAC TCT GAA GAC GCA AAC GCG GTA GCA Val Thr Phe Glu Cys Ala Leu Asp Ser Glu Asp Ala Asn Ala Val Ala	936
	260 265 270	
25	TCC TTG CGC CAG GTT AGG GGT GGC AAT GTG GTC ATT GAC AGC CAG GGG Ser Leu Arg Gln Val Arg Gly Gly Asn Val Val Ile Asp Ser Gln Gly	984
	275 280 285	
	ACA ATA GAT CCA GCC TTC GAG GGC AGG ATC CTG TTC ACC AAG GCT GAG Thr Ile Asp Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Phe Thr Lys Ala Glu	1032
	290 295 300	
	AAC GGC CAC TTC AGT GTA GTG ATC GCA GGC CTG AGG AAG GAA GAC ACA Asn Gly His Phe Ser Val Val Ile Ala Gly Leu Arg Lys Glu Asp Thr	1080
	305 310 315	
30	GGG AAC TAT CTG TGC GGA GTC CAG TCC AAT GGT CAG TCT GGG GAT GGG Gly Asn Tyr Leu Cys Gly Val Gln Ser Asn Gly Gln Ser Gly Asp Gly	1128

	320	325	330	335	
5	CCC ACC CAG CTT CGG CAA CTC TTC GTC AAT GAA GAG ATC GAC GTG TCC				1176
	Pro Thr Gln Leu Arg Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ile Asp Val Ser	340	345	350	
	CGC AGC CCC CCT GTG TTG AAG GGC TTT CCA GGA GGC TCC GTG ACC ATA				1224
	Arg Ser Pro Pro Val Leu Lys Gly Phe Pro Gly Gly Ser Val Thr Ile	355	360	365	
	CGC TGC CCC TAC AAC CCG AAG AGA AGC GAC AGC CAC CTG CAG CTG TAT				1272
	Arg Cys Pro Tyr Asn Pro Lys Arg Ser Asp Ser His Leu Gln Leu Tyr	370	375	380	
10	CTC TGG GAA GGG AGT CAA ACC CGC CAT CTG CTG GTG GAC AGC GGC GAG				1320
	Leu Trp Glu Gly Ser Gln Thr Arg His Leu Leu Val Asp Ser Gly Glu	385	390	395	
	GGG CTG GTT CAG AAA GAC TAC ACA GGC AGG CTG GCC CTG TTC GAA GAG				1368
	Gly Leu Val Gln Lys Asp Tyr Thr Gly Arg Leu Ala Leu Phe Glu Glu	400	405	410	415
15	CCT GGC AAT GGC ACC TTC TCA GTC GTC CTC AAC CAG CTC ACT GCC GAG				1416
	Pro Gly Asn Gly Thr Phe Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Thr Ala Glu	420	425	430	
	GAT GAA GGC TTC TAC TGG TGT GTC AGC GAT GAC GAT GAG TCC CTG ACG				1464
	Asp Glu Gly Phe Tyr Trp Cys Val Ser Asp Asp Asp Glu Ser Leu Thr	435	440	445	
20	ACT TCG GTG AAG CTC CAG ATC GTT GAC GGA GAA CCA AGC CCC ACG ATC				1512
	Thr Ser Val Lys Leu Gln Ile Val Asp Gly Glu Pro Ser Pro Thr Ile	450	455	460	
	GAC AAG TTC ACT GCT GTG CAG GGA GAG CCT GTT GAG ATC ACC TGC CAC				1560
	Asp Lys Phe Thr Ala Val Gln Gly Glu Pro Val Glu Ile Thr Cys His	465	470	475	
25	TTC CCA TGC AAA TAC TTC TCC TCC GAG AAG TAC TGG TGC AAG TGG AAT				1608
	Phe Pro Cys Lys Tyr Phe Ser Ser Glu Lys Tyr Trp Cys Lys Trp Asn	480	485	490	495
	GAC CAT GGC TGC GAG GAC CTG CCC ACT AAG CTC AGC TCC AGC GGC GAC				1656
	Asp His Gly Cys Glu Asp Leu Pro Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly Asp	500	505	510	
	CTT GTG AAA TGC AAC AAC AAC CTG GTC CTC ACC CTG ACC TTG GAC TCG				1704
	Leu Val Lys Cys Asn Asn Asn Leu Val Leu Thr Leu Thr Leu Asp Ser	515	520	525	
30	GTC AGC GAA GAT GAC GAG GGC TGG TAC TGG TGT GGC GCG AAA GAC GGG				1752
	Val Ser Glu Asp Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys Gly Ala Lys Asp Gly	530	535	540	

	CAC GAG TTT GAA GAG GTT GCG GCC GTC AGG GTG GAG CTG ACA GAG CCA	1800
	His Glu Phe Glu Glu Val Ala Ala Val Arg Val Glu Leu Thr Glu Pro	
	545 550 555	
5	GCC AAG GTA GCT GTC GAG CCA GCC AAG GTA CCT GTC GAC CCA GCC AAG	1848
	Ala Lys Val Ala Val Glu Pro Ala Lys Val Pro Val Asp Pro Ala Lys	
	560 565 570 575	
	GCA GCC CCC GCG CCT GCT GAG GAG AAG GCC AAG GCG CGG TGC CCA GTG	1896
	Ala Ala Pro Ala Pro Ala Glu Glu Lys Ala Lys Ala Arg Cys Pro Val	
	580 585 590	
10	CCC AGG AGA AGG CAG TGG TAC CCA TTG TCA AGG AAG CTG AGA ACA AGT	1944
	Pro Arg Arg Arg Gln Trp Tyr Pro Leu Ser Arg Lys Leu Arg Thr Ser	
	595 600 605	
	TGT CCA GAA CCT CGG CTC CTT GCG GAG GAG GTA GCA GTG CAG AGT GCG	1992
	Cys Pro Glu Pro Arg Leu Leu Ala Glu Glu Val Ala Val Gln Ser Ala	
	610 615 620	
	GAA GAC CCA GCC AGT GGG AGC AGA GCG TCT GTG GAT GCC AGC AGT GCT	2040
	Glu Asp Pro Ala Ser Gly Ser Arg Ala Ser Val Asp Ala Ser Ser Ala	
	625 630 635	
15	TCG GGA CAA AGC GGG AGT GCC AAA GTA CTG ATC TCC ACC CTG GTG CCC	2088
	Ser Gly Gln Ser Gly Ser Ala Lys Val Leu Ile Ser Thr Leu Val Pro	
	640 645 650 655	
	TTG GGG CTG GTG CTG GCA GCG GGG GCC ATG GCC GTG GCC ATA GCC AGA	2136
	Leu Gly Leu Val Leu Ala Ala Gly Ala Met Ala Val Ala Ile Ala Arg	
	660 665 670	
20	GCC CGG CAC AGG AGG AAC GTG GAC CGA GTT TCC ATC GGA AGC TAC AGG	2184
	Ala Arg His Arg Arg Asn Val Asp Arg Val Ser Ile Gly Ser Tyr Arg	
	675 680 685	
	ACA GAC ATT AGC ATG TCA GAC TTG GAG AAC TCC AGG GAG TTC GGA GCC	2232
	Thr Asp Ile Ser Met Ser Asp Leu Glu Asn Ser Arg Glu Phe Gly Ala	
	690 695 700	
25	ATT GAC AAC CCA AGC GCC TGC CCC GAT GCC CGG GAG ACG GCC CTC GGA	2280
	Ile Asp Asn Pro Ser Ala Cys Pro Asp Ala Arg Glu Thr Ala Leu Gly	
	705 710 715	
	GGA AAG GAT GAG TTA GCG ACG GCC ACC GAG AGC ACC GTG GAG ATT GAG	2328
	Gly Lys Asp Glu Leu Ala Thr Ala Thr Glu Ser Thr Val Glu Ile Glu	
	720 725 730 735	
	GAG CCC AAG AAG GCA AAA CGG TCA TCC AAG GAA GAA GCC GAC CTG GCC	2376
	Glu Pro Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys Glu Glu Ala Asp Leu Ala	
	740 745 750	
30	TAC TCA GCT TTC CTG CTC CAA TCC AAC ACC ATA GCT GCT GAG CAC CAA	2424
	Tyr Ser Ala Phe Leu Leu Gln Ser Asn Thr Ile Ala Ala Glu His Gln	

	755	760	765	
5	GAT GGC CCC AAG GAG GCC TAG GCACAGCCGG CCACCGCCGC CGCCGCCACC GCCGC			2480
	Asp Gly Pro Lys Glu Ala			
	770			
	CGCCGCCGCC ACCTGTGAAA ATCACCTTCC AGAATCACGT TGATCCTCGG GGTCCCCAGA			2540
	GCCGGGGGCT CAACCGCCCT GCACCCCCCA TGTCACCACC ACCTAAACTT CCCTACCTGT			2600
	GCCAGAGGT GTGCTGGTCC CCTCCTCCAC GGCATCCAGG CCTGGCTCAA TGTTCCCGTT			2660
10	GGGGTGGGGG TGTGAGGGGT TCCTACTTGC AGCCCGGTTT TCCCGAGAGA AGCTAAGGAT			2720
	CCAGGTCCTG AGGGAGGGGC CTCTCGAAGG CAGACAGACC AGAGAGGGGG GAGGAGCCCT			2780
	TGGATGGGAG GCCAGAGGCG CTTTCCGGCC ACCCCCTCCC TCCCTGCCCC CACCCTCCTT			2840
	CCTTCATTCA AAAGTCCCAG TGGCTGCTGC CTAGGGTCCA GGCCTGGCC GCACGCCTCC			2900
	TCGAAGCCGT TGTGCAAACA TCACTGGAGG AAGCCAGGGC TCCTCCCGGG CTGTGTATCC			2960
15	TCACTCAGGC ATCCTGTCTT CCCCAGTATC AGGAGATGTC AAGCGTCTGA AGGCTGTGTG			3020
	CCCTGGGCGT GTCTGCAAGT CACCCAGAC ACATGTTCTC GCCATTTTAC AGATGAGAAC			3080
	ACTGAGGTTG TACTCAAGGG CACCCTGCGA GATGGAGCAA CAGCAAATA GATGGGCTTC			3140
	TGCTGTCTTC TTGGCCAGAG GTCTCTCCAC AGGAGCCCCT GCCCCTGTAG GAAGCAGAGT			3200
20	TTTAGAACAT GGAAGAAGA GAGGGGGATG GCCCTGGACG CTGACCTCTC CCAAGCCCC			3260
	ACGGGGGAAA AGCCCCCTC CTTTCTGTC ACTCTGGGG ACCTGCGGAG TTGAGCATTG			3320
	GTGCCCCGTG TGCTGAAGA GTTCCAGTG GAAAGAAGA AAGAGGGTGT TTGTCAGTGC			3380
	CGGGGAGGGC CTGATCCCCA GACAGCTGAA GTTTAAGGTC CTTGTCCCTG TGAGCTTTAA			3440
	CCAGCACCTC CGGGCTGACC CTTGCTAACA CATCAGAAAT GTGATTTAAT CATTAAACAT			3500
25	TGTGATTGCC ACTGGGA			3517

(2) SEQ ID NO: 2 的资料:

(i) 序列特征:

- 30 (A) 长度: 773 氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

名称: 兔多聚免疫球蛋白受体

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 2:

5 Met Ala Leu Phe Leu Leu Thr Cys Leu Leu Ala Val Phe Ser Ala Ala
1 5 10 15
Thr Ala Gln Ser Ser Leu Leu Gly Pro Ser Ser Ile Phe Gly Pro Gly
20 25 30
Glu Val Asn Val Leu Glu Gly Asp Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr
35 40 45
10 Pro Thr Thr Ser Val Thr Arg His Ser Arg Lys Phe Trp Cys Arg Glu
50 55 60
Glu Glu Ser Gly Arg Cys Val Thr Leu Ala Ser Thr Gly Tyr Thr Ser
65 70 75 80
Gln Glu Tyr Ser Gly Arg Gly Lys Leu Thr Asp Phe Pro Asp Lys Gly
85 90 95
15 Glu Phe Val Val Thr Val Asp Gln Leu Thr Gln Asn Asp Ser Gly Ser
100 105 110
Tyr Lys Cys Gly Val Gly Val Asn Gly Arg Gly Leu Asp Phe Gly Val
115 120 125
Asn Val Leu Val Ser Gln Lys Pro Glu Pro Asp Asp Val Val Tyr Lys
130 135 140
20 Gln Tyr Glu Ser Tyr Thr Val Thr Ile Thr Cys Pro Phe Thr Tyr Ala
145 150 155 160
Thr Arg Gln Leu Lys Lys Ser Phe Tyr Lys Val Glu Asp Gly Glu Leu
165 170 175
Val Leu Ile Ile Asp Ser Ser Ser Lys Glu Ala Lys Asp Pro Arg Tyr
180 185 190
25 Lys Gly Arg Ile Thr Leu Gln Ile Gln Ser Thr Thr Ala Lys Glu Phe
195 200 205
Thr Val Thr Ile Lys His Leu Gln Leu Asn Asp Ala Gly Gln Tyr Val
210 215 220
Cys Gln Ser Gly Ser Asp Pro Thr Ala Glu Glu Gln Asn Val Asp Leu
225 230 235 240
30 Arg Leu Leu Thr Pro Gly Leu Leu Tyr Gly Asn Leu Gly Gly Ser Val
245 250 255
Thr Phe Glu Cys Ala Leu Asp Ser Glu Asp Ala Asn Ala Val Ala Ser

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

名称: 人多聚免疫球蛋白受体

5

(ix) 特征:

(A) 关键名: 编码序列

(B) 位置: 235...2472

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 3:

10

AGAGTTTCAG TTTTGGCAGC AGCGTCCAGT GCCCTGCCAG TAGCTCCTAG AGAGGCAGGG 60
GTTACCAACT GGCCAGCAGG CTGTGTCCCT GAAGTCAGAT CAACGGGAGA GAAGGAAGTG 120
GCTAAACAT TGCACAGGAG AAGTCCGCCT GAGTGGTGCG GCGCTCGGGA CCCACCAGCA 180
ATGCTGCTCT TCGTGTCTAC CTGCCTGCTG GCGGTCTTCC CAGCCATCTC CACG AAG 237
Lys
1

15

AGT CCC ATA TTT GGT CCC GAG GAG GTG AAT AGT GTG GAA GGT AAC TCA 285
Ser Pro Ile Phe Gly Pro Glu Glu Val Asn Ser Val Glu Gly Asn Ser
5 10 15

GTG TCC ATC ACG TGC TAC TAC CCA CCC ACC TCT GTC AAC CGG CAC ACC 333
Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Pro Thr Ser Val Asn Arg His Thr
20 25 30

20

CGG AAG TAC TGG TGC CGG CAG GGA GCT AGA GGT GGC TGC ATA ACC CTC 381
Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Arg Gly Gly Cys Ile Thr Leu
35 40 45

ATC TCC TCG GAG GGC TAC GTC TCC AGC AAA TAT GCA GGC AGG GCT AAC 429
Ile Ser Ser Glu Gly Tyr Val Ser Ser Lys Tyr Ala Gly Arg Ala Asn
50 55 60 65

25

CTC ACC AAC TTC CCG GAG AAC GGC ACA TTT GTG GTG AAC ATT GCC CAG 477
Leu Thr Asn Phe Pro Glu Asn Gly Thr Phe Val Val Asn Ile Ala Gln
70 75 80

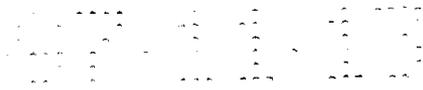
CTG AGC CAG GAT GAC TCC GGG CGC TAC AAG TGT GGC CTG GGC ATC AAT 525
Leu Ser Gln Asp Asp Ser Gly Arg Tyr Lys Cys Gly Leu Gly Ile Asn
85 90 95

AGC CGA GGC CTG TCC TTT GAT GTC AGC CTG GAG GTC AGC CAG GGT CCT 573
Ser Arg Gly Leu Ser Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser Gln Gly Pro
100 105 110

30

GGG CTC CTA AAT GAC ACT AAA GTC TAC ACA GTG GAC CTG GGC AGA ACG 621
Gly Leu Leu Asn Asp Thr Lys Val Tyr Thr Val Asp Leu Gly Arg Thr
115 120 125

	GTG ACC ATC AAC TGC CCT TTC AAG ACT GAG AAT GCT CAA AAG AGG AAG	669
	Val Thr Ile Asn Cys Pro Phe Lys Thr Glu Asn Ala Gln Lys Arg Lys	
	130 135 140 145	
5	TCC TTG TAC AAG CAG ATA GGC CTG TAC CCT GTG CTG GTC ATC GAC TCC	717
	Ser Leu Tyr Lys Gln Ile Gly Leu Tyr Pro Val Leu Val Ile Asp Ser	
	150 155 160	
	AGT GGT TAT GTG AAT CCC AAC TAT ACA GGA AGA ATA CGC CTT GAT ATT	765
	Ser Gly Tyr Val Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Arg Ile Arg Leu Asp Ile	
	165 170 175	
10	CAG GGT ACT GGC CAG TTA CTG TTC AGC GTT GTC ATC AAC CAA CTC AGG	813
	Gln Gly Thr Gly Gln Leu Leu Phe Ser Val Val Ile Asn Gln Leu Arg	
	180 185 190	
	CTC AGC GAT GCT GGG CAG TAT CTC TGC CAG GCT GGG GAT GAT TCC AAT	861
	Leu Ser Asp Ala Gly Gln Tyr Leu Cys Gln Ala Gly Asp Asp Ser Asn	
	195 200 205	
15	AGT AAT AAG AAG AAT GCT GAC CTC CAA GTG CTA AAG CCC GAG CCC GAG	909
	Ser Asn Lys Lys Asn Ala Asp Leu Gln Val Leu Lys Pro Glu Pro Glu	
	210 215 220 225	
	CTG GTT TAT GAA GAC CTG AGG GGC TCA GTG ACC TTC CAC TGT GCC CTG	957
	Leu Val Tyr Glu Asp Leu Arg Gly Ser Val Thr Phe His Cys Ala Leu	
	230 235 240	
	GGC CCT GAG GTG GCA AAC GTG GCC AAA TTT CTG TGC CGA CAG AGC AGT	1005
	Gly Pro Glu Val Ala Asn Val Ala Lys Phe Leu Cys Arg Gln Ser Ser	
	245 250 255	
20	GGG GAA AAC TGT GAC GTG GTC GTC AAC ACC CTG GGG AAG AGG GCC CCA	1053
	Gly Glu Asn Cys Asp Val Val Val Asn Thr Leu Gly Lys Arg Ala Pro	
	260 265 270	
	GCC TTT GAG GGC AGG ATC CTG CTC AAC CCC CAG GAC AAG GAT GGC TCA	1101
	Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Leu Asn Pro Gln Asp Lys Asp Gly Ser	
	275 280 285	
25	TTC AGT GTG GTG ATC ACA GGC CTG AGG AAG GAG GAT GCA GGG CGC TAC	1149
	Phe Ser Val Val Ile Thr Gly Leu Arg Lys Glu Asp Ala Gly Arg Tyr	
	290 295 300 305	
	CTG TGT GGA GCC CAT TCG GAT GGT CAG CTG CAG GAA GGC TCG CCT ATC	1197
	Leu Cys Gly Ala His Ser Asp Gly Gln Leu Gln Glu Gly Ser Pro Ile	
	310 315 320	
	CAG GCC TGG CAA CTC TTC GTC AAT GAG GAG TCC ACG ATT CCC CGC AGC	1245
	Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ser Thr Ile Pro Arg Ser	
	325 330 335	
30	CCC ACT GTG GTG AAG GGG GTG GCA GGA AGC TCT GTG GCC GTG CTC TGC	1293



	Pro Thr Val Val Lys Gly Val Ala Gly Ser Ser Val Ala Val Leu Cys	
	340 345 350	
5	CCC TAC AAC CGT AAG GAA AGC AAA AGC ATC AAG TAC TGG TGT CTC TGG Pro Tyr Asn Arg Lys Glu Ser Lys Ser Ile Lys Tyr Trp Cys Leu Trp	1341
	355 360 365	
	GAA GGG GCC CAG AAT GGC CGC TGC CCC CTG CTG GTG GAC AGC GAG GGG Glu Gly Ala Gln Asn Gly Arg Cys Pro Leu Leu Val Asp Ser Glu Gly	1389
	370 375 380 385	
10	TGG GTT AAG GCC CAG TAC GAG GGC CGC CTC TCC CTG CTG GAG GAG CCA Trp Val Lys Ala Gln Tyr Glu Gly Arg Leu Ser Leu Leu Glu Glu Pro	1437
	390 395 400	
	GGC AAC GGC ACC TTC ACT GTC ATC CTC AAC CAG CTC ACC AGC CGG GAC Gly Asn Gly Thr Phe Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr Ser Arg Asp	1485
	405 410 415	
	GCC GGC TTC TAC TGG TGT CTG ACC AAC GGC GAT ACT CTC TGG AGG ACC Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asn Gly Asp Thr Leu Trp Arg Thr	1533
	420 425 430	
15	ACC GTG GAG ATC AAG ATT ATC GAA GGA GAA CCA AAC CTC AAG GTA CCA Thr Val Glu Ile Lys Ile Ile Glu Gly Glu Pro Asn Leu Lys Val Pro	1581
	435 440 445	
	GGG AAT GTC ACG GCT GTG CTG GGA GAG ACT CTC AAG GTC CCC TGT CAC Gly Asn Val Thr Ala Val Leu Gly Glu Thr Leu Lys Val Pro Cys His	1629
	450 455 460 465	
20	TTT CCA TGC AAA TTC TCC TCG TAC GAG AAA TAC TGG TGC AAG TGG AAT Phe Pro Cys Lys Phe Ser Ser Tyr Glu Lys Tyr Trp Cys Lys Trp Asn	1677
	470 475 480	
	AAC ACG GGC TGC CAG GCC CTG CCC AGC CAA GAC GAA GGC CCC AGC AAG Asn Thr Gly Cys Gln Ala Leu Pro Ser Gln Asp Glu Gly Pro Ser Lys	1725
	485 490 495	
25	GCC TTC GTG AAC TGT GAC GAG AAC AGC CGG CTT GTC TCC CTG ACC CTG Ala Phe Val Asn Cys Asp Glu Asn Ser Arg Leu Val Ser Leu Thr Leu	1773
	500 505 510	
	AAC CTG GTG ACC AGG GCT GAT GAG GGC TGG TAC TGG TGT GGA GTG AAG Asn Leu Val Thr Arg Ala Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys Gly Val Lys	1821
	515 520 525	
	CAG GGC CAC TTC TAT GGA GAG ACT GCA GCC GTC TAT GTG GCA GTT GAA Gln Gly His Phe Tyr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Val Ala Val Glu	1869
	530 535 540 545	
30	GAG AGG AAG GCA GCG GGG TCC CGC GAT GTC AGC CTA GCG AAG GCA GAC Glu Arg Lys Ala Ala Gly Ser Arg Asp Val Ser Leu Ala Lys Ala Asp	1917
	550 555 560	

GCT GCT CCT GAT GAG AAG GTG CTA GAC TCT GGT TTT CGG GAG ATT GAG 1965
 Ala Ala Pro Asp Glu Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Arg Glu Ile Glu
 565 570 575

AAC AAA GCC ATT CAG GAT CCC AGG CTT TTT GCA GAG GAA AAG GCG GTG 2013
 Asn Lys Ala Ile Gln Asp Pro Arg Leu Phe Ala Glu Glu Lys Ala Val
 580 585 590

GCA GAT ACA AGA GAT CAA GCC GAT GGG AGC AGA GCA TCT GTG GAT TCC 2061
 Ala Asp Thr Arg Asp Gln Ala Asp Gly Ser Arg Ala Ser Val Asp Ser
 595 600 605

GGC AGC TCT GAG GAA CAA GGT GGA AGC TCC AGA GCG CTG GTC TCC ACC 2109
 Gly Ser Ser Glu Glu Gln Gly Gly Ser Ser Arg Ala Leu Val Ser Thr
 610 615 620 625

CTG GTG CCC CTG GGC CTG GTG CTG GCA GTG GGA GCC GTG GCT GTG GGG 2157
 Leu Val Pro Leu Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Val Ala Val Gly
 630 635 640

GTG GCC AGA GCC CGG CAC AGG AAG AAC GTC GAC CGA GTT TCA ATC AGA 2205
 Val Ala Arg Ala Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Val Ser Ile Arg
 645 650 655

AGC TAC AGG ACA GAC ATT AGC ATG TCA GAC TTC GAG AAC TCC AGG GAA 2253
 Ser Tyr Arg Thr Asp Ile Ser Met Ser Asp Phe Glu Asn Ser Arg Glu
 660 665 670

TTT GGA GCC AAT GAC AAC ATG GGA GCC TCT TCG ATC ACT CAG GAG ACA 2301
 Phe Gly Ala Asn Asp Asn Met Gly Ala Ser Ser Ile Thr Gln Glu Thr
 675 680 685

TCC CTC GGA GGA AAA GAA GAG TTT GTT GCC ACC ACT GAG AGC ACC ACA 2349
 Ser Leu Gly Gly Lys Glu Glu Phe Val Ala Thr Thr Glu Ser Thr Thr
 690 695 700 705

GAG ACC AAA GAA CCC AAG AAG GCA AAA AGG TCA TCC AAG GAG GAA GCC 2397
 Glu Thr Lys Glu Pro Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys Glu Glu Ala
 710 715 720

GAG ATG GCC TAC AAA GAC TTC CTG CTC CAG TCC AGC ACC GTG GCC GCC 2445
 Glu Met Ala Tyr Lys Asp Phe Leu Leu Gln Ser Ser Thr Val Ala Ala
 725 730 735

GAG GCC CAG GAC GGC CCC CAG GAA GCC TAGACGGTGT CGCCGCCTGC TCCCTGCA 2500
 Glu Ala Gln Asp Gly Pro Gln Glu Ala
 740 745

CCCATGACAA TCACCTCAG AATCATGTCG ATCCTGGGGG CCCTCAGCTC CTGGGGACCC 2560

CACTCCCTGC TCTAACACCT GCCTAGGTTT TTCCTACTGT CCTCAGAGGC GTGCTGGTCC 2620

CCTCCTCAGT GACATCAAAG CCTGGCCTAA TTGTTCTAT TGGGGATGAG GGTGGCATGA 2680

GGAGGTCCCA CTTGCAACTT CTTTCTGTTG AGAGAACCTC AGGTACGGAG AAGAATAGAG 2740
 GTCCTCATGG GTCCTTGAA GGAAGAGGGA CCAGGTGGG AGAGCTGATT GCAGAAAGGA 2800
 GAGACGTGCA GCGCCCCTCT GCACCCATTAT CATGGGATGT CAACAGAATT TTTCCCTCC 2860
 5 ACTCCATCCC TCCCTCCCGT CCTCCCTC TTCTTCTTC CTTACCATCA AAAGATGTA 2919

(2) SEQ ID NO: 4 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 746 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

名称: 人多聚免疫球蛋白受体

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 4:

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



435

440

445

Pro Gly Asn Val Thr Ala Val Leu Gly Glu Thr Leu Lys Val Pro Cys
450 455 460

5

His Phe Pro Cys Lys Phe Ser Ser Tyr Glu Lys Tyr Trp Cys Lys Trp
465 470 475 480

Asn Asn Thr Gly Cys Gln Ala Leu Pro Ser Gln Asp Glu Gly Pro Ser
485 490 495

Lys Ala Phe Val Asn Cys Asp Glu Asn Ser Arg Leu Val Ser Leu Thr
500 505 510

10

Leu Asn Leu Val Thr Arg Ala Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys Gly Val
515 520 525

Lys Gln Gly His Phe Tyr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Val Ala Val
530 535 540

Glu Glu Arg Lys Ala Ala Gly Ser Arg Asp Val Ser Leu Ala Lys Ala
545 550 555 560

15

Asp Ala Ala Pro Asp Glu Lys Val Leu Asp Ser Gly Phe Arg Glu Ile
565 570 575

Glu Asn Lys Ala Ile Gln Asp Pro Arg Leu Phe Ala Glu Glu Lys Ala
580 585 590

Val Ala Asp Thr Arg Asp Gln Ala Asp Gly Ser Arg Ala Ser Val Asp
595 600 605

20

Ser Gly Ser Ser Glu Glu Gln Gly Gly Ser Ser Arg Ala Leu Val Ser
610 615 620

Thr Leu Val Pro Leu Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Val Ala Val
625 630 635 640

Gly Val Ala Arg Ala Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Val Ser Ile
645 650 655

25

Arg Ser Tyr Arg Thr Asp Ile Ser Met Ser Asp Phe Glu Asn Ser Arg
660 665 670

Glu Phe Gly Ala Asn Asp Asn Met Gly Ala Ser Ser Ile Thr Gln Glu
675 680 685

Thr Ser Leu Gly Gly Lys Glu Glu Phe Val Ala Thr Thr Glu Ser Thr
690 695 700

30

Thr Glu Thr Lys Glu Pro Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys Glu Glu
705 710 715 720

Ala Glu Met Ala Tyr Lys Asp Phe Leu Leu Gln Ser Ser Thr Val Ala
 725 730 735

Ala Glu Ala Gln Asp Gly Pro Gln Glu Ala
 740 745

5

(2) SEQ ID NO: 5 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 3630 碱基对
- (B) 类型: 核苷酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 构型: 线性

10

名称: 牛多聚免疫球蛋白受体

(ix) 特征:

- (A) 关键名: 编码序列
- (B) 位置: 152....2425

15

GATCTCCTCG GAGGGTCGTG CAGCGGCCCT GGGTCCCTGC CGGCACCAGT ACTTGCGCGT 60

GTGCTCCCAA AGCTGACGGG ATAGGAGGAA GGAGCTCAAA CAACCACACA GGACGGTGCC 120

TGGCGGCAGA GACCCGCGGG AGCCCCAGC G ATG TCG CGC CTG TTC CTC GCC 172
 Met Ser Arg Leu Phe Leu Ala
 1 5

20

TGC CTG CTG GCC ATC TTC CCA GTG GTC TCC ATG AAG AGT CCC ATC TTC 220
 Cys Leu Leu Ala Ile Phe Pro Val Val Ser Met Lys Ser Pro Ile Phe
 10 15 20

GGT CCC GAG GAG GTG AGC AGC GTG GAA GGC CGC TCA GTG TCC ATC AAG 268
 Gly Pro Glu Glu Val Ser Ser Val Glu Gly Arg Ser Val Ser Ile Lys
 25 30 35

25

TGC TAC TAC CCG CCC ACC TCC GTC AAC CGG CAC ACG CGC AAG TAC TGG 316
 Cys Tyr Tyr Pro Pro Thr Ser Val Asn Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp
 40 45 50 55

TGC CGG CAG GGA GCC CAG GGC CGC TGC ACG ACC CTC ATC TCC TCG GAG 364
 Cys Arg Gln Gly Ala Gln Gly Arg Cys Thr Thr Leu Ile Ser Ser Glu
 60 65 70

30

GGC TAC GTC TCC GAC GAC TAC GTG GGC AGA GCC AAC CTC ACC AAC TTC 412
 Gly Tyr Val Ser Asp Asp Tyr Val Gly Arg Ala Asn Leu Thr Asn Phe
 75 80 85

	300	305	310	
	ACC AGC CTG AGG AAA GAG GAC GCA GGG CGC TAC GTG TGC GGG GCC CAG			1132
	Thr Ser Leu Arg Lys Glu Asp Ala Gly Arg Tyr Val Cys Gly Ala Gln			
	315	320	325	
5	CCT GAG GGT GAG CCC CAG GAC GGC TGG CCT GTG CAG GCC TGG CAA CTC			1180
	Pro Glu Gly Glu Pro Gln Asp Gly Trp Pro Val Gln Ala Trp Gln Leu			
	330	335	340	
	TTC GTC AAT GAA GAG ACG GCA ATC CCC GCA AGC CCC TCC GTG GTG AAA			1228
	Phe Val Asn Glu Glu Thr Ala Ile Pro Ala Ser Pro Ser Val Val Lys			
	345	350	355	
	GGT GTG AGG GGA GGC TCT GTG ACT GTA TCT TGC CCC TAC AAC CCT AAG			1276
	Gly Val Arg Gly Gly Ser Val Thr Val Ser Cys Pro Tyr Asn Pro Lys			
10	360	365	370	375
	GAT GCC AAC AGC GCG AAG TAC TGG TGT CAC TGG GAA GAG GCT CAA AAC			1324
	Asp Ala Asn Ser Ala Lys Tyr Trp Cys His Trp Glu Glu Ala Gln Asn			
	380	385	390	
	GGC CGC TGC CCG CGG CTG GTG GAG AGC CGG GGG CTG ATG AAG GAG CAG			1372
	Gly Arg Cys Pro Arg Leu Val Glu Ser Arg Gly Leu Met Lys Glu Gln			
	395	400	405	
15	TAC GAG GGC AGG CTG GTG CTG CTC ACC GAG CCG GGC AAC GGC ACC TAC			1420
	Tyr Glu Gly Arg Leu Val Leu Leu Thr Glu Pro Gly Asn Gly Thr Tyr			
	410	415	420	
	ACC GTC ATC CTC AAC CAG CTC ACC GAT CAG GAC GCC GGC TTC TAC TGG			1468
	Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr Asp Gln Asp Ala Gly Phe Tyr Trp			
	425	430	435	
20	TGC GTG ACC GAC GGC GAC ACG CGC TGG ATC TCC ACA GTG GAG CTC AAG			1516
	Cys Val Thr Asp Gly Asp Thr Arg Trp Ile Ser Thr Val Glu Leu Lys			
	440	445	450	455
	GTT GTC CAA GGA GAA CCA AGC CTC AAG GTA CCC AAG AAC GTC ACG GCT			1564
	Val Val Gln Gly Glu Pro Ser Leu Lys Val Pro Lys Asn Val Thr Ala			
	460	465	470	
	TGG CTG GGA GAG CCC TTA AAG CTC TCC TGC CAC TTC CCC TGC AAA TTC			1612
	Trp Leu Gly Glu Pro Leu Lys Leu Ser Cys His Phe Pro Cys Lys Phe			
25	475	480	485	
	TAC TCC TTT GAG AAG TAC TGG TGT AAG TGG AGC AAC AGA GGC TGC AGC			1660
	Tyr Ser Phe Glu Lys Tyr Trp Cys Lys Trp Ser Asn Arg Gly Cys Ser			
	490	495	500	
	GCC CTG CCC ACC CAG AAC GAC GGC CCC AGC CAG GCC TTT GTG AGC TGC			1708
	Ala Leu Pro Thr Gln Asn Asp Gly Pro Ser Gln Ala Phe Val Ser Cys			
	505	510	515	
30				

1

	730	735	740	
	AAC CTG GCC TCC GCC GCA ACC CAG AAC GGC CCG ACA GAA GCC TAG ACGGAG			2431
	Asn Leu Ala Ser Ala Ala Thr Gln Asn Gly Pro Thr Glu Ala			
	745	750	755	
5	CCCTGGGCGC CCCTTCCCTC CGCACGTGGC AATCACGCTC CGAATCACGC TGATCCTCAG			2491
	GGCCCTCAGC TCGGGGGGCT CCACTGCCTG CACTCACACC CCGCCTAGGC TTCTCCTGTC			2551
	TGTCCTCAGA GGGTGTGCTG GTTCCCTTCTT GGTGGCATCC AAGCCTGGCT TACTTGTTC			2611
	TATTGGGGGT GAGGTGGTAC GAGGAGTTCC CACCTGCAGC TTATTCGAAC GAGAGAACTA			2671
	AAGGTGTGGA GGAGAATTAA GATCGCAGAG GGGCCTCTCA GAAAGAAAAG GAGTGGGTGG			2731
10	GGAGACAACC GCAGAAAGGG GGCCATTCAG CGCTTCCCTG TCCCCTTATT TGGGGATGTC			2791
	AGTGGAAATCC TCCCTTCCAC CCCATCTCTG CACCTCTCCA TCCCCTCC ATTCCATCTT			2851
	CTCTTCTTCT TCCCTCATT AAAAATGTGC ATTTGGTTAC TACTAGATT CCAGGGACTC			2911
	TGCTAGACAC TGGGATAGGT AGGCCGCAAT CCCAGGCGGC AGCCTTCCGC AAACATCAAG			2971
	GAGCCCCTGG AGCCACAGC ATCTCTTAC GTGTACTC ACTGACCTCT GCCTCTGCTG			3031
15	GGAGAAATCA TAAAGGGTCT GCAGCCCTGA GGCCTTAGGG ATTATGTAAC ACAGGCATAC			3091
	ACACAAGGCA CCATCAACAC ATTCTTACCA TTTCACAGGT GAGAAAGCCG AGGTCCCTGAG			3151
	AGGTGGAGAG GTTTGCTCAG AGTCAGCAAG TGAGATGTAC GAGTCTCAAG CTAAAGATT			3211
	GACACCTGCT GTCCCTACAG GAGGGCCTCC TCTCTCCAGA TGAGACAGCA TTCCATAGGA			3271
20	AGGAGAAGAA AAATGTAAAT AAGACTGGTC TTTCACAGGC CCCACATCAG GGAAGATACC			3331
	CCTTCCCTG TCTGTCACTC ACAGAGACCT AATAGGATAA GAGAATGGTC AACACTCAA			3391
	CCCCGAATG TGAAGAGTTC TAAGTGGAAA GGGAGGAAA AGGGGGGATT TGATGGTGCC			3451
	AGGGAGGGGC TGATCTCCAA AGAACTAAGG TTTAAGTTTT TTTGTTTTTT TTTTCCTTC			3511
	TTCTAAGCTC TGCACTTCAA CTAGCATCTA TGAGCTGGCA CTTGCTAACA AATCAAAAT			3571
25	GTGAATTAAT TAATAATTAA AGACCATGAT TTCCTCCAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA			3630

(2) SEQ ID NO: 6 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 757 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 构型: 线性

名称: 牛多聚免疫球蛋白受体
 (xi) 序列名称: SEQ ID NO: 6:

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

Glu Pro Glu Leu Val Tyr Gly Asp Leu Arg Ser Ser Val Thr Phe Asp
 245 250 255

Cys Ser Leu Gly Pro Glu Val Ala Asn Val Pro Lys Phe Leu Cys Gln
 260 265 270

5 Lys Lys Asn Gly Gly Ala Cys Asn Val Val Ile Asn Thr Leu Gly Lys
 275 280 285

Lys Ala Gln Asp Phe Gln Gly Arg Ile Val Ser Val Pro Lys Asp Asn
 290 295 300

Gly Val Phe Ser Val His Ile Thr Ser Leu Arg Lys Glu Asp Ala Gly
 305 310 315 320

10 Arg Tyr Val Cys Gly Ala Gln Pro Glu Gly Glu Pro Gln Asp Gly Trp
 325 330 335

Pro Val Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Thr Ala Ile Pro
 340 345 350

Ala Ser Pro Ser Val Val Lys Gly Val Arg Gly Gly Ser Val Thr Val
 355 360 365

15 Ser Cys Pro Tyr Asn Pro Lys Asp Ala Asn Ser Ala Lys Tyr Trp Cys
 370 375 380

His Trp Glu Glu Ala Gln Asn Gly Arg Cys Pro Arg Leu Val Glu Ser
 385 390 395 400

Arg Gly Leu Met Lys Glu Gln Tyr Glu Gly Arg Leu Val Leu Leu Thr
 405 410 415

20 Glu Pro Gly Asn Gly Thr Tyr Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr Asp
 420 425 430

Gln Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Val Thr Asp Gly Asp Thr Arg Trp
 435 440 445

Ile Ser Thr Val Glu Leu Lys Val Val Gln Gly Glu Pro Ser Leu Lys
 450 455 460

25 Val Pro Lys Asn Val Thr Ala Trp Leu Gly Glu Pro Leu Lys Leu Ser
 465 470 475 480

Cys His Phe Pro Cys Lys Phe Tyr Ser Phe Glu Lys Tyr Trp Cys Lys
 485 490 495

Trp Ser Asn Arg Gly Cys Ser Ala Leu Pro Thr Gln Asn Asp Gly Pro
 500 505 510

30 Ser Gln Ala Phe Val Ser Cys Asp Gln Asn Ser Gln Val Val Ser Leu
 515 520 525

Asn Leu Asp Thr Val Thr Lys Glu Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys Gly
 530 535 540

Val Lys Glu Gly Pro Arg Tyr Gly Glu Thr Ala Ala Val Tyr Val Ala
 545 550 555 560

5

Val Glu Ser Arg Val Lys Gly Ser Gln Gly Ala Lys Gln Val Lys Ala
 565 570 575

Ala Pro Ala Gly Ala Ala Ile Gln Ser Arg Ala Gly Glu Ile Gln Asn
 580 585 590

Lys Ala Leu Leu Asp Pro Ser Phe Phe Ala Lys Glu Ser Val Lys Asp
 595 600 605

10

Ala Ala Gly Gly Pro Gly Ala Pro Ala Asp Pro Gly Arg Pro Thr Gly
 610 615 620

Tyr Ser Gly Ser Ser Lys Ala Leu Val Ser Thr Leu Val Pro Leu Ala
 625 630 635 640

Leu Val Leu Val Ala Gly Val Val Ala Ile Gly Val Val Arg Ala Arg
 645 650 655

15

His Arg Lys Asn Val Asp Arg Ile Ser Ile Arg Ser Tyr Arg Thr Asp
 660 665 670

Ile Ser Met Ser Asp Phe Glu Asn Ser Arg Asp Phe Glu Gly Arg Asp
 675 680 685

Asn Met Gly Ala Ser Pro Glu Ala Gln Glu Thr Ser Leu Gly Gly Lys
 690 695 700

20

Asp Glu Phe Ala Thr Thr Thr Glu Asp Thr Val Glu Ser Lys Glu Pro
 705 710 715 720

Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys Glu Glu Ala Asp Glu Ala Phe Thr
 725 730 735

Thr Phe Leu Leu Gln Ala Lys Asn Leu Ala Ser Ala Ala Thr Gln Asn
 740 745 750

25

Gly Pro Thr Glu Ala
 755

(2) SEQ ID NO: 7 的资料:

(i) 序列特征:

- 30
- (A) 长度: 3095 碱基对
 - (B) 类型: 核苷酸
 - (C) 链型: 单链
 - (D) 构型: 线性

名称: 鼠多聚免疫球蛋白受体

(ix) 特征:

(A) 关键名: 编码序列

(B) 位置: 85...2400

5 (xi) 序列名称: SEQ ID NO: 7:

	CACCTGGAG AGAAGGAAGT AGCTAAAACA TTCTCATACA AGAAGCCAAC CTGAGCGGCA	60
	CAGCCCCCT GGAAGCCACA AGCA ATG AGG CTC TAC TTG TTC ACG CTC TTG	111
	Met Arg Leu Tyr Leu Phe Thr Leu Leu	
	1 5	
10	GTA ACT GTC TTT TCA GGG GTC TCC ACA AAA AGC CCC ATA TTT GGT CCC	159
	Val Thr Val Phe Ser Gly Val Ser Thr Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro	
	10 15 20 25	
	CAG GAG GTG AGT AGT ATA GAA GGC GAC TCT GTT TCC ATC ACG TGC TAC	207
	Gln Glu Val Ser Ser Ile Glu Gly Asp Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr	
	30 35 40	
15	TAC CCA GAC ACC TCT GTC AAC CGG CAC ACC CGG AAA TAC TGG TGC CGA	255
	Tyr Pro Asp Thr Ser Val Asn Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg	
	45 50 55	
	CAA GGA GCC AGC GGC ATG TGC ACA ACG CTC ATC TCT TCA AAT GGC TAC	303
	Gln Gly Ala Ser Gly Met Cys Thr Thr Leu Ile Ser Ser Asn Gly Tyr	
	60 65 70	
20	CTC TCC AAG GAG TAT TCA GGC AGA GCC AAC CTC ATC AAC TTC CCA GAG	351
	Leu Ser Lys Glu Tyr Ser Gly Arg Ala Asn Leu Ile Asn Phe Pro Glu	
	75 80 85	
	AAC AAC ACA TTT GTG ATT AAC ATT GAG CAG CTC ACC CAG GAC GAC ACT	399
	Asn Asn Thr Phe Val Ile Asn Ile Glu Gln Leu Thr Gln Asp Asp Thr	
	90 95 100 105	
25	GGG AGC TAC AAG TGT GGC CTG GGT ACC AGT AAC CGA GGC CTG TCC TTC	447
	Gly Ser Tyr Lys Cys Gly Leu Gly Thr Ser Asn Arg Gly Leu Ser Phe	
	110 115 120	
	GAT GTC AGC CTG GAG GTC AGC CAG GTT CCT GAG TTG CCG AGT GAC ACC	495
	Asp Val Ser Leu Glu Val Ser Gln Val Pro Glu Leu Pro Ser Asp Thr	
	125 130 135	
30	CAC GTC TAC ACA AAG GAC ATA GGC AGA AAT GTG ACC ATT GAA TGC CCT	543
	His Val Tyr Thr Lys Asp Ile Gly Arg Asn Val Thr Ile Glu Cys Pro	
	140 145 150	

TTC AAA AGG GAG AAT GTT CCC AGC AAG AAA TCC CTG TGT AAG AAG ACA 591
 Phe Lys Arg Glu Asn Val Pro Ser Lys Lys Ser Leu Cys Lys Lys Thr
 155 160 165

AAC CAG TCC TGC GAA CTT GTC ATT GAC TCT ACT GAG AAG GTG AAC CCC 639
 Asn Gln Ser Cys Glu Leu Val Ile Asp Ser Thr Glu Lys Val Asn Pro
 170 175 180 185

5 AGC TAT ATA GGC AGA GCA AAA CTT TTT ATG AAA GGG ACC GAC CTA ACT 687
 Ser Tyr Ile Gly Arg Ala Lys Leu Phe Met Lys Gly Thr Asp Leu Thr
 190 195 200

GTA TTC TAT GTC AAC ATT AGT CAC CTA ACG CAC AAT GAT GCT GGG CTG 735
 Val Phe Tyr Val Asn Ile Ser His Leu Thr His Asn Asp Ala Gly Leu
 205 210 215

10 TAC ATC TGC CAA GCT GGA GAA GGT CCT AGT GCT GAT AAG AAG AAT GTT 783
 Tyr Ile Cys Gln Ala Gly Glu Gly Pro Ser Ala Asp Lys Lys Asn Val
 220 225 230

GAC CTC CAG GTG CTA GCG CCT GAG CCA GAG CTG CTT TAT AAA GAC CTG 831
 Asp Leu Gln Val Leu Ala Pro Glu Pro Glu Leu Leu Tyr Lys Asp Leu
 235 240 245

15 AGG TCC TCA GTG ACT TTT GAA TGT GAC CTG GGC CGT GAG GTG GCA AAC 879
 Arg Ser Ser Val Thr Phe Glu Cys Asp Leu Gly Arg Glu Val Ala Asn
 250 255 260 265

GAG GCC AAA TAT CTG TGC CGG ATG AAT AAG GAA ACC TGT GAT GTG ATC 927
 Glu Ala Lys Tyr Leu Cys Arg Met Asn Lys Glu Thr Cys Asp Val Ile
 270 275 280

20 ATT AAC ACC CTG GGG AAG AGG GAT CCA GAC TTT GAG GGC AGG ATC CTG 975
 Ile Asn Thr Leu Gly Lys Arg Asp Pro Asp Phe Glu Gly Arg Ile Leu
 285 290 295

ATA ACC CCC AAG GAT GAC AAT GGC CGC TTC AGT GTG TTG ATC ACA GGC 1023
 Ile Thr Pro Lys Asp Asp Asn Gly Arg Phe Ser Val Leu Ile Thr Gly
 300 305 310

25 CTG AGG AAG GAG GAT GCA GGG CAC TAC CAG TGT GGA GCC CAC AGT TCT 1071
 Leu Arg Lys Glu Asp Ala Gly His Tyr Gln Cys Gly Ala His Ser Ser
 315 320 325

GGT TTG CCT CAA GAA GGC TGG CCC ATC CAG ACT TGG CAA CTC TTT GTC 1119
 Gly Leu Pro Gln Glu Gly Trp Pro Ile Gln Thr Trp Gln Leu Phe Val
 330 335 340 345

AAT GAA GAG TCT ACC ATT CCC AAT CGT CGC TCT GTT GTG AAG GGA GTC 1167
 Asn Glu Glu Ser Thr Ile Pro Asn Arg Arg Ser Val Val Lys Gly Val
 350 355 360

30 ACA GGA GGC TCT GTG GCC ATC GCC TGT CCC TAT AAC CCC AAG GAA AGC 1215

	Thr Gly Gly Ser Val Ala Ile Ala Cys Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Ser	
	365 370 375	
	AGC AGC CTC AAG TAC TGG TGT CGC TGG GAA GGG GAC GGA AAT GGA CAT	1263
	Ser Ser Leu Lys Tyr Trp Cys Arg Trp Glu Gly Asp Gly Asn Gly His	
	380 385 390	
5	TGC CCC GCG CTT GTG GGG ACC CAG GCC CAG GTG CAA GAA GAG TAT GAA	1311
	Cys Pro Ala Leu Val Gly Thr Gln Ala Gln Val Gln Glu Glu Tyr Glu	
	395 400 405	
	GGC CGA CTG GCA CTG TTT GAT CAG CCA GGC AAT GGT ACT TAC ACT GTC	1359
	Gly Arg Leu Ala Leu Phe Asp Gln Pro Gly Asn Gly Thr Tyr Thr Val	
	410 415 420 425	
10	ATC CTC AAC CAG CTC ACC ACC GAG GAT GCT GGC TTC TAT TGG TGT CTT	1407
	Ile Leu Asn Gln Leu Thr Thr Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Leu	
	430 435 440	
	ACC AAT GGT GAC TCT CGC TGG AGA ACC ACA ATA GAA CTC CAG GTT GCC	1455
	Thr Asn Gly Asp Ser Arg Trp Arg Thr Thr Ile Glu Leu Gln Val Ala	
	445 450 455	
	GAA GCT ACA AGG GAG CCA AAC CTT GAG GTG ACG CCA CAG AAC GCA ACA	1503
	Glu Ala Thr Arg Glu Pro Asn Leu Glu Val Thr Pro Gln Asn Ala Thr	
15	460 465 470	
	GCA GTA CTA GGA GAG ACC TTC ACC GTT TCC TGC CAC TAT CCG TGC AAA	1551
	Ala Val Leu Gly Glu Thr Phe Thr Val Ser Cys His Tyr Pro Cys Lys	
	475 480 485	
	TTC TAC TCC CAG GAG AAA TAC TGG TGC AAG TGG AGC AAC AAG GGT TGC	1599
	Phe Tyr Ser Gln Glu Lys Tyr Trp Cys Lys Trp Ser Asn Lys Gly Cys	
	490 495 500 505	
20	CAC ATC CTG CCA AGC CAT GAC GAA GGT GCC CGC CAA TCT TCT GTG AGC	1647
	His Ile Leu Pro Ser His Asp Glu Gly Ala Arg Gln Ser Ser Val Ser	
	510 515 520	
	TGC GAC CAG AGC AGC CAG CTG GTC TCC ATG ACC CTG AAC CCG GTC AGT	1695
	Cys Asp Gln Ser Ser Gln Leu Val Ser Met Thr Leu Asn Pro Val Ser	
	525 530 535	
	AAG GAA GAT GAA GGC TGG TAC TGG TGT GGG GTA AAG CAA GGC CAG ACC	1743
25	Lys Glu Asp Glu Gly Trp Tyr Trp Cys Gly Val Lys Gln Gly Gln Thr	
	540 545 550	
	TAT GGA GAA ACT ACC GCC ATC TAT ATA GCA GTT GAA GAG AGG ACC AGA	1791
	Tyr Gly Glu Thr Thr Ala Ile Tyr Ile Ala Val Glu Glu Arg Thr Arg	
	555 560 565	
	GGG TCA TCC CAT GTC AAC CCA ACA GAT GCA AAT GCA CGT GCC AAA GTC	1839
	Gly Ser Ser His Val Asn Pro Thr Asp Ala Asn Ala Arg Ala Lys Val	
30	570 575 580 585	

	GCT CTG GAA GAA GAG GTA GTG GAC TCC TCC ATC AGT GAA AAA GAG AAC	1887
	Ala Leu Glu Glu Glu Val Val Asp Ser Ser Ile Ser Glu Lys Glu Asn	
	590 595 600	
5	AAA GCC ATT CCA AAT CCC GGG CCT TTT GCC AAC GAA AGA GAG ATA CAG	1935
	Lys Ala Ile Pro Asn Pro Gly Pro Phe Ala Asn Glu Arg Glu Ile Gln	
	605 610 615	
	AAT GTG AGA GAC CAA GCT CAG GAG AAC AGA GCA TCT GGG GAT GCT GGC	1983
	Asn Val Arg Asp Gln Ala Gln Glu Asn Arg Ala Ser Gly Asp Ala Gly	
	620 625 630	
	AGT GCT GAT GGA CAA AGC AGG AGC TCC AGC TCC AAA GTG CTG TTC TCC	2031
	Ser Ala Asp Gly Gln Ser Arg Ser Ser Ser Lys Val Leu Phe Ser	
	635 640 645	
10	ACC CTG GTG CCC CTG GGT CTG GTG CTG GCA GTG GGT GCT ATA GCT GTG	2079
	Thr Leu Val Pro Leu Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Ile Ala Val	
	650 655 660 665	
	TGG GTG GCC AGA GTC CGA CAT CGG AAG AAT GTA GAC CGC ATG TCA ATC	2127
	Trp Val Ala Arg Val Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Met Ser Ile	
	670 675 680	
15	AGC AGC TAC AGG ACA GAC ATT AGC ATG GCA GAC TTC AAG AAC TCC AGA	2175
	Ser Ser Tyr Arg Thr Asp Ile Ser Met Ala Asp Phe Lys Asn Ser Arg	
	685 690 695	
	GAT TTG GGA GGC AAT GAC AAC ATG GGG GCC TCT CCA GAC ACA CAG CAA	2223
	Asp Leu Gly Gly Asn Asp Asn Met Gly Ala Ser Pro Asp Thr Gln Gln	
	700 705 710	
20	ACA GTC ATC GAA GGA AAA GAT GAA ATC GTG ACT ACC ACG GAG TGC ACC	2271
	Thr Val Ile Glu Gly Lys Asp Glu Ile Val Thr Thr Thr Glu Cys Thr	
	715 720 725	
	GCT GAG CCA GAA GAA TCC AAG AAA GCA AAA AGG TCA TCC AAG GAG GAA	2319
	Ala Glu Pro Glu Glu Ser Lys Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys Glu Glu	
	730 735 740 745	
	GCT GAC ATG GCC TAC TCG GCA TTC CTG CTT CAG TCC AGC ACC ATA GCT	2367
	Ala Asp Met Ala Tyr Ser Ala Phe Leu Leu Gln Ser Ser Thr Ile Ala	
	750 755 760	
25	GCA CAG GTC CAC GAT GGT CCC CAG GAA GCC TAG GCAGTGCTGA CCACCCACCC	2420
	Ala Gln Val His Asp Gly Pro Gln Glu Ala	
	765 770	
	TTGCCTGTGA CAATCAACTT GAGAATCACA CTGATCCGCT CGCAGCCCAC ACTCACCCAT	2480
	CACCTCCGCT CTTCCCTCCT GTCCTCAGAG GTGTGCTGGT TCCTTCCTCG GCCATGGAAG	2540
30	CCTGGCCTAG TTACGCCTGT TTAGGAGAGA GTGTGAGGCG TTCTTTTCTC TATGAAGAGA	2600



GTGAGGTGGA AATGAGGAGG AGGTGAACCT GAGAGACATC TCTGGAGGAA GAGGTTGAG 2660
 AATAGGGGCT CGTTTCAGGA GAAAAGGCCA TTTGAATCTT CTTTATAACC ATATGATAGG 2720
 ATGTCAGCGT AACTCTTCTC TCCTCCATCT CTCCTTTCCT ATCCTCTTGA TTCAAACAAC 2780
 ACATCTGAGA ACTCACTAGG CTTCAGTGCC TACTAAATGC TGAGAGCCAG GCCACAATCT 2840
 5 TTCTATAAAT ATTACTGGAA GAGATGCCAT CTCCTCCCAG ATTCTGTCTT TTCATTAAGA 2900
 TAAGACATCA TTACCAGGCA TACCTCCTGC CTCTGTGCCT CATAGGCATA CACAAGCCAT 2960
 AAGGGCATCA TGATTTTCAG ATGAGAAGAG ATGTTTCTCA AGAGTGCCTA GTGAGATAGA 3020
 CTAGCGTCAA ACCAGATGTG GCAACTCCTG GCTCTTGGCC TACGATCTGT CTCAAGAAA 3080
 10 AAAAAAAAAA AAAAA 3095

(2) SEQ ID NO: 8 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 771 氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (C) 链型: 单链
- (D) 构型: 线性

名称: 鼠多聚免疫球蛋白受体

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 8:

贴

Met Arg Leu Tyr Leu Phe Thr Leu Leu Val Thr Val Phe Ser Gly Val
 1 5 10 15
 Ser Thr Lys Ser Pro Ile Phe Gly Pro Gln Glu Val Ser Ser Ile Glu
 20 25 30
 Gly Asp Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Asp Thr Ser Val Asn
 25 35 40 45
 Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala Ser Gly Met Cys
 50 55 60
 Thr Thr Leu Ile Ser Ser Asn Gly Tyr Leu Ser Lys Glu Tyr Ser Gly
 65 70 75 80
 Arg Ala Asn Leu Ile Asn Phe Pro Glu Asn Asn Thr Phe Val Ile Asn
 30 85 90 95
 Ile Glu Gln Leu Thr Gln Asp Asp Thr Gly Ser Tyr Lys Cys Gly Leu

		100		105		110	
		Gly Thr Ser Asn Arg Gly Leu Ser Phe Asp Val Ser Leu Glu Val Ser					
		115		120		125	
5		Gln Val Pro Glu Leu Pro Ser Asp Thr His Val Tyr Thr Lys Asp Ile					
		130		135		140	
		Gly Arg Asn Val Thr Ile Glu Cys Pro Phe Lys Arg Glu Asn Val Pro					
		145		150		155	160
		Ser Lys Lys Ser Leu Cys Lys Lys Thr Asn Gln Ser Cys Glu Leu Val					
			165		170		175
10		Ile Asp Ser Thr Glu Lys Val Asn Pro Ser Tyr Ile Gly Arg Ala Lys					
			180		185		190
		Leu Phe Met Lys Gly Thr Asp Leu Thr Val Phe Tyr Val Asn Ile Ser					
			195		200		205
		His Leu Thr His Asn Asp Ala Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Ala Gly Glu					
			210		215		220
15		Gly Pro Ser Ala Asp Lys Lys Asn Val Asp Leu Gln Val Leu Ala Pro					
			225		230		240
		Glu Pro Glu Leu Leu Tyr Lys Asp Leu Arg Ser Ser Val Thr Phe Glu					
			245		250		255
		Cys Asp Leu Gly Arg Glu Val Ala Asn Glu Ala Lys Tyr Leu Cys Arg					
			260		265		270
20		Met Asn Lys Glu Thr Cys Asp Val Ile Ile Asn Thr Leu Gly Lys Arg					
			275		280		285
		Asp Pro Asp Phe Glu Gly Arg Ile Leu Ile Thr Pro Lys Asp Asp Asn					
			290		295		300
		Gly Arg Phe Ser Val Leu Ile Thr Gly Leu Arg Lys Glu Asp Ala Gly					
			305		310		315
		His Tyr Gln Cys Gly Ala His Ser Ser Gly Leu Pro Gln Glu Gly Trp					
25			325		330		335
		Pro Ile Gln Thr Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ser Thr Ile Pro					
			340		345		350
		Asn Arg Arg Ser Val Val Lys Gly Val Thr Gly Gly Ser Val Ala Ile					
			355		360		365
30		Ala Cys Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Ser Ser Ser Leu Lys Tyr Trp Cys					
			370		375		380

Arg Trp Glu Gly Asp Gly Asn Gly His Cys Pro Ala Leu Val Gly Thr
 385 390 395 400
 Gln Ala Gln Val Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Arg Leu Ala Leu Phe Asp
 405 410 415
 5 Gln Pro Gly Asn Gly Thr Tyr Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr Thr
 420 425 430
 Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asn Gly Asp Ser Arg Trp
 435 440 445
 Arg Thr Thr Ile Glu Leu Gln Val Ala Glu Ala Thr Arg Glu Pro Asn
 450 455 460
 10 Leu Glu Val Thr Pro Gln Asn Ala Thr Ala Val Leu Gly Glu Thr Phe
 465 470 475 480
 Thr Val Ser Cys His Tyr Pro Cys Lys Phe Tyr Ser Gln Glu Lys Tyr
 485 490 495
 Trp Cys Lys Trp Ser Asn Lys Gly Cys His Ile Leu Pro Ser His Asp
 500 505 510
 15 Glu Gly Ala Arg Gln Ser Ser Val Ser Cys Asp Gln Ser Ser Gln Leu
 515 520 525
 Val Ser Met Thr Leu Asn Pro Val Ser Lys Glu Asp Glu Gly Trp Tyr
 530 535 540
 Trp Cys Gly Val Lys Gln Gly Gln Thr Tyr Gly Glu Thr Thr Ala Ile
 545 550 555 560
 20 Tyr Ile Ala Val Glu Glu Arg Thr Arg Gly Ser Ser His Val Asn Pro
 565 570 575
 Thr Asp Ala Asn Ala Arg Ala Lys Val Ala Leu Glu Glu Glu Val Val
 580 585 590
 Asp Ser Ser Ile Ser Glu Lys Glu Asn Lys Ala Ile Pro Asn Pro Gly
 595 600 605
 25 Pro Phe Ala Asn Glu Arg Glu Ile Gln Asn Val Arg Asp Gln Ala Gln
 610 615 620
 Glu Asn Arg Ala Ser Gly Asp Ala Gly Ser Ala Asp Gly Gln Ser Arg
 625 630 635 640
 Ser Ser Ser Ser Lys Val Leu Phe Ser Thr Leu Val Pro Leu Gly Leu
 645 650 655
 30 Val Leu Ala Val Gly Ala Ile Ala Val Trp Val Ala Arg Val Arg His
 660 665 670

Arg Lys Asn Val Asp Arg Met Ser Ile Ser Ser Tyr Arg Thr Asp Ile
 675 680 685
 Ser Met Ala Asp Phe Lys Asn Ser Arg Asp Leu Gly Gly Asn Asp Asn
 690 695 700
 Met Gly Ala Ser Pro Asp Thr Gln Gln Thr Val Ile Glu Gly Lys Asp
 705 710 715 720
 5 Glu Ile Val Thr Thr Thr Glu Cys Thr Ala Glu Pro Glu Glu Ser Lys
 725 730 735
 Lys Ala Lys Arg Ser Ser Lys Glu Glu Ala Asp Met Ala Tyr Ser Ala
 740 745 750
 Phe Leu Leu Gln Ser Ser Thr Ile Ala Ala Gln Val His Asp Gly Pro
 755 760 765
 10 Gln Glu Ala
 770

(2) SEQ ID NO: 9 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 3269 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

名称: 鼠多聚免疫球蛋白受体

(ix) 特征:

(A) 关键名: 编码序列

(B) 位置: 74...2383

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 9:

GGCAACGAAG GTACCATGGA TCTTATACAA GAAGTGAACC AACATGCCGC AACCTCCTTG 60
 25 GAAGCCACAA GCG ATG AGG CTC TCC TTG TTC GCC CTC TTG GTA ACT GTC 109
 Met Arg Leu Ser Leu Phe Ala Leu Leu Val Thr Val
 1 5 10
 TTC TCA GGG GTC TCC ACA CAA AGC CCC ATA TTT GGT CCC CAG GAT GTG 157
 Phe Ser Gly Val Ser Thr Gln Ser Pro Ile Phe Gly Pro Gln Asp Val
 15 20 25
 30 AGT AGT ATT GAA GGT AAC TCG GTC TCC ATC ACG TGC TAC TAC CCA GAC 205
 Ser Ser Ile Glu Gly Asn Ser Val Ser Ile Thr Cys Tyr Tyr Pro Asp

	30	35	40	
	ACC TCT GTC AAC CGG CAC ACC CGG AAA TAC TGG TGC CGA CAA GGA GCC			253
	Thr Ser Val Asn Arg His Thr Arg Lys Tyr Trp Cys Arg Gln Gly Ala			
	45	50	55	60
5	AAC GGC TAC TGC GCA ACC CTC ATC TCT TCA AAT GGC TAC CTC TCG AAG			301
	Asn Gly Tyr Cys Ala Thr Leu Ile Ser Ser Asn Gly Tyr Leu Ser Lys			
		65	70	75
	GAG TAT TCA GGC AGA GCC AGC CTC ATC AAC TTC CCA GAG AAT AGC ACA			349
	Glu Tyr Ser Gly Arg Ala Ser Leu Ile Asn Phe Pro Glu Asn Ser Thr			
		80	85	90
10	TTT GTG ATT AAC ATT GCA CAT CTC ACC CAG GAG GAC ACT GGG AGC TAC			397
	Phe Val Ile Asn Ile Ala His Leu Thr Gln Glu Asp Thr Gly Ser Tyr			
		95	100	105
	AAG TGT GGT CTG GGT ACC ACT AAC CGA GGC CTG TTT TTC GAT GTC AGC			445
	Lys Cys Gly Leu Gly Thr Thr Asn Arg Gly Leu Phe Phe Asp Val Ser			
		110	115	120
	CTG GAG GTC AGC CAG GTT CCT GAG TTC CCA AAT GAC ACC CAT GTC TAC			493
	Leu Glu Val Ser Gln Val Pro Glu Phe Pro Asn Asp Thr His Val Tyr			
15		125	130	135
	ACA AAG GAC ATA GGC AGA ACT GTG ACC ATC GAA TGC CGT TTC AAA GAG			541
	Thr Lys Asp Ile Gly Arg Thr Val Thr Ile Glu Cys Arg Phe Lys Glu			
		145	150	155
	GGG AAT GCT CAT AGC AAG AAA TCC CTG TGT AAG AAG AGA GGA GAG GCC			589
	Gly Asn Ala His Ser Lys Lys Ser Leu Cys Lys Lys Arg Gly Glu Ala			
		160	165	170
20	TGC GAA GTT GTC ATC GAC TCT ACT GAG TAC GTG GAC CCC AGC TAT AAG			637
	Cys Glu Val Val Ile Asp Ser Thr Glu Tyr Val Asp Pro Ser Tyr Lys			
		175	180	185
	GAC AGA GCA ATC CTT TTT ATG AAA GGG ACC AGC CGC GAT ATA TTC TAT			685
	Asp Arg Ala Ile Leu Phe Met Lys Gly Thr Ser Arg Asp Ile Phe Tyr			
		190	195	200
25	GTC AAC ATT AGC CAC CTA ATA CCC AGT GAT GCT GGA CTG TAT GTT TGC			733
	Val Asn Ile Ser His Leu Ile Pro Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Cys			
		205	210	215
	CAA GCT GGA GAA GGC CCC AGT GCT GAT AAA AAT AAT GCT GAC CTC CAG			781
	Gln Ala Gly Glu Gly Pro Ser Ala Asp Lys Asn Asn Ala Asp Leu Gln			
		225	230	235
30	GTG CTA GAG CCT GAG CCA GAG CTG CTT TAT AAA GAC CTG AGG TCC TCA			829
	Val Leu Glu Pro Glu Pro Glu Leu Leu Tyr Lys Asp Leu Arg Ser Ser			
		240	245	250

GTG ACT TTT GAA TGT GAC CTG GGC CGT GAA GTG GCA AAT GAT GCC AAA 877
 Val Thr Phe Glu Cys Asp Leu Gly Arg Glu Val Ala Asn Asp Ala Lys
 255 260 265

TAT CTG TGT CGG AAG AAC AAG GAA ACC TGT GAT GTC ATC ATC AAC ACC 925
 Tyr Leu Cys Arg Lys Asn Lys Glu Thr Cys Asp Val Ile Ile Asn Thr
 270 275 280

5 CTG GGG AAG AGA GAT CCA GCC TTT GAA GGC AGG ATC CTG CTA ACC CCC 973
 Leu Gly Lys Arg Asp Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Leu Thr Pro
 285 290 295 300

AGG GAT GAC AAT GGC CGC TTC AGT GTG TTG ATC ACA GGC CTG AGG AAG 1021
 Arg Asp Asp Asn Gly Arg Phe Ser Val Leu Ile Thr Gly Leu Arg Lys
 305 310 315

10 GAG GAT GCA GGG CAC TAC CAG TGT GGA GCG CAC AGT TCT GGT TTG CCT 1069
 Glu Asp Ala Gly His Tyr Gln Cys Gly Ala His Ser Ser Gly Leu Pro
 320 325 330

CAA GAA GGC TGG CCC GTC CAG GCT TGG CAA CTC TTT GTC AAT GAA GAG 1117
 Gln Glu Gly Trp Pro Val Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu
 335 340 345

15 TCC ACG ATT CCC AAT AGT CGC TCT GTT GTG AAG GGT GTC ACA GGA GGC 1165
 Ser Thr Ile Pro Asn Ser Arg Ser Val Val Lys Gly Val Thr Gly Gly
 350 355 360

TCT GTG GCC ATC GTC TGT CCC TAT AAC CCC AAG GAA AGC AGC AGC CTC 1213
 Ser Val Ala Ile Val Cys Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Ser Ser Ser Leu
 365 370 375 380

AAG TAC TGG TGT CAC TGG GAA GCC GAC GAG AAT GGA CGC TGC CCG GTG 1261
 Lys Tyr Trp Cys His Trp Glu Ala Asp Glu Asn Gly Arg Cys Pro Val
 385 390 395

20 CTC GTG GGG ACC CAG GCC CTG GTG CAA GAA GGA TAT GAA GGC CGA CTG 1309
 Leu Val Gly Thr Gln Ala Leu Val Gln Glu Gly Tyr Glu Gly Arg Leu
 400 405 410

GCA CTG TTC GAT CAG CCG GGC AGT GGC GCC TAC ACT GTC ATC CTC AAC 1357
 Ala Leu Phe Asp Gln Pro Gly Ser Gly Ala Tyr Thr Val Ile Leu Asn
 415 420 425

25 CAG CTC ACC ACC CAG GAT TCT GGC TTC TAC TGG TGT CTT ACC GAT GGT 1405
 Gln Leu Thr Thr Gln Asp Ser Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asp Gly
 430 435 440

GAC TCT CGC TGG AGA ACC ACG ATA GAA CTG CAG GTT GCT GAA GCT ACA 1453
 Asp Ser Arg Trp Arg Thr Thr Ile Glu Leu Gln Val Ala Glu Ala Thr
 445 450 455 460

30 AAG AAG CCA GAC CTT GAG GTG ACA CCA CAG AAC GCG ACC GCG GTG ATA 1501
 Lys Lys Pro Asp Leu Glu Val Thr Pro Gln Asn Ala Thr Ala Val Ile

	465	470	475	
	GGA GAG ACC TTC ACA ATC TCC TGC CAC TAT CCG TGC AAA TTC TAC TCC			1549
	Gly Glu Thr Phe Thr Ile Ser Cys His Tyr Pro Cys Lys Phe Tyr Ser			
	480	485	490	
5	CAG GAG AAA TAC TGG TGC AAG TGG AGC AAC GAC GGC TGC CAC ATC CTG			1597
	Gln Glu Lys Tyr Trp Cys Lys Trp Ser Asn Asp Gly Cys His Ile Leu			
	495	500	505	
	CCG AGC CAT GAT GAA GGT GCC CGC CAG TCC TCT GTG AGC TGT GAC CAG			1645
	Pro Ser His Asp Glu Gly Ala Arg Gln Ser Ser Val Ser Cys Asp Gln			
	510	515	520	
10	AGC AGC CAG ATC GTC TCC ATG ACC CTG AAC CCG GTC AAA AAG GAA GAT			1693
	Ser Ser Gln Ile Val Ser Met Thr Leu Asn Pro Val Lys Lys Glu Asp			
	525	530	535	540
	GAA GGC TGG TAC TGG TGT GGG GTA AAA GAA GGT CAG GTC TAT GGA GAA			1741
	Glu Gly Trp Tyr Trp Cys Gly Val Lys Glu Gly Gln Val Tyr Gly Glu			
	545	550	555	
	ACT ACA GCC ATC TAT GTA GCA GTT GAA GAG AGG ACC AGA GGG TCA CCC			1789
	Thr Thr Ala Ile Tyr Val Ala Val Glu Glu Arg Thr Arg Gly Ser Pro			
15	560	565	570	
	CAC ATC AAC CCG ACA GAT GCA AAC GCA CGT GCA AAA GAT GCT CCA GAG			1837
	His Ile Asn Pro Thr Asp Ala Asn Ala Arg Ala Lys Asp Ala Pro Glu			
	575	580	585	
	GAA GAG GCA ATG GAA TCC TCT GTC AGG GAG GAT GAA AAC AAG GCC AAT			1885
	Glu Glu Ala Met Glu Ser Ser Val Arg Glu Asp Glu Asn Lys Ala Asn			
20	590	595	600	
	CTG GAC CCC AGG CTT TTT GCA GAC GAA AGA GAG ATA CAG AAT GCG GGA			1933
	Leu Asp Pro Arg Leu Phe Ala Asp Glu Arg Glu Ile Gln Asn Ala Gly			
	605	610	615	620
	GAC CAA GCT CAG GAG AAC AGA GCA TCT GGG AAT GCT GGC AGT GCT GGT			1981
	Asp Gln Ala Gln Glu Asn Arg Ala Ser Gly Asn Ala Gly Ser Ala Gly			
	625	630	635	
25	GGA CAA AGC GGG AGC TCC AAA GTC CTA TTC TCC ACC CTG GTG CCC CTG			2029
	Gly Gln Ser Gly Ser Ser Lys Val Leu Phe Ser Thr Leu Val Pro Leu			
	640	645	650	
	GGT TTG GTG CTG GCA GTG GGT GCT GTG GCT GTG TGG GTG GCC AGA GTC			2077
	Gly Leu Val Leu Ala Val Gly Ala Val Ala Val Trp Val Ala Arg Val			
	655	660	665	
30	CGA CAT CGG AAG AAT GTA GAC CGC ATG TCA ATC AGC AGC TAC AGG ACA			2125
	Arg His Arg Lys Asn Val Asp Arg Met Ser Ile Ser Ser Tyr Arg Thr			
	670	675	680	

(2) SEQ ID NO: 10 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 770 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

名称: 鼠多聚免疫球蛋白受体

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 10:

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

His Leu Ile Pro Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Cys Gln Ala Gly Glu
 210 215 220

Gly Pro Ser Ala Asp Lys Asn Asn Ala Asp Leu Gln Val Leu Glu Pro
 225 230 235 240

5 Glu Pro Glu Leu Leu Tyr Lys Asp Leu Arg Ser Ser Val Thr Phe Glu
 245 250 255

Cys Asp Leu Gly Arg Glu Val Ala Asn Asp Ala Lys Tyr Leu Cys Arg
 260 265 270

Lys Asn Lys Glu Thr Cys Asp Val Ile Ile Asn Thr Leu Gly Lys Arg
 275 280 285

10 Asp Pro Ala Phe Glu Gly Arg Ile Leu Leu Thr Pro Arg Asp Asp Asn
 290 295 300

Gly Arg Phe Ser Val Leu Ile Thr Gly Leu Arg Lys Glu Asp Ala Gly
 305 310 315 320

His Tyr Gln Cys Gly Ala His Ser Ser Gly Leu Pro Gln Glu Gly Trp
 325 330 335

15 Pro Val Gln Ala Trp Gln Leu Phe Val Asn Glu Glu Ser Thr Ile Pro
 340 345 350

Asn Ser Arg Ser Val Val Lys Gly Val Thr Gly Gly Ser Val Ala Ile
 355 360 365

Val Cys Pro Tyr Asn Pro Lys Glu Ser Ser Ser Leu Lys Tyr Trp Cys
 370 375 380

20 His Trp Glu Ala Asp Glu Asn Gly Arg Cys Pro Val Leu Val Gly Thr
 385 390 395 400

Gln Ala Leu Val Gln Glu Gly Tyr Glu Gly Arg Leu Ala Leu Phe Asp
 405 410 415

Gln Pro Gly Ser Gly Ala Tyr Thr Val Ile Leu Asn Gln Leu Thr Thr
 420 425 430

25 Gln Asp Ser Gly Phe Tyr Trp Cys Leu Thr Asp Gly Asp Ser Arg Trp
 435 440 445

Arg Thr Thr Ile Glu Leu Gln Val Ala Glu Ala Thr Lys Lys Pro Asp
 450 455 460

Leu Glu Val Thr Pro Gln Asn Ala Thr Ala Val Ile Gly Glu Thr Phe
 465 470 475 480

30 Thr Ile Ser Cys His Tyr Pro Cys Lys Phe Tyr Ser Gln Glu Lys Tyr

485

490

495

Trp Cys Lys Trp Ser Asn Asp Gly Cys His Ile Leu Pro Ser His Asp
500 505 510

Glu Gly Ala Arg Gln Ser Ser Val Ser Cys Asp Gln Ser Ser Gln Ile
515 520 525

5

Val Ser Met Thr Leu Asn Pro Val Lys Lys Glu Asp Glu Gly Trp Tyr
530 535 540

Trp Cys Gly Val Lys Glu Gly Gln Val Tyr Gly Glu Thr Thr Ala Ile
545 550 555 560

Tyr Val Ala Val Glu Arg Thr Arg Gly Ser Pro His Ile Asn Pro
565 570 575

10

Thr Asp Ala Asn Ala Arg Ala Lys Asp Ala Pro Glu Glu Ala Met
580 585 590

Glu Ser Ser Val Arg Glu Asp Glu Asn Lys Ala Asn Leu Asp Pro Arg
595 600 605

Leu Phe Ala Asp Glu Arg Glu Ile Gln Asn Ala Gly Asp Gln Ala Gln
610 615 620

15

Glu Asn Arg Ala Ser Gly Asn Ala Gly Ser Ala Gly Gly Gln Ser Gly
625 630 635 640

Ser Ser Lys Val Leu Phe Ser Thr Leu Val Pro Leu Gly Leu Val Leu
645 650 655

Ala Val Gly Ala Val Ala Val Trp Val Ala Arg Val Arg His Arg Lys
660 665 670

20

Asn Val Asp Arg Met Ser Ile Ser Ser Tyr Arg Thr Asp Ile Ser Met
675 680 685

Gly Asp Phe Arg Asn Ser Arg Asp Leu Gly Gly Asn Asp Asn Met Gly
690 695 700

Ala Thr Pro Asp Thr Gln Glu Thr Val Leu Glu Gly Lys Asp Glu Ile
705 710 715 720

25

Glu Thr Thr Thr Glu Cys Thr Thr Glu Pro Glu Glu Ser Lys Lys Ala
725 730 735

Lys Arg Ser Ser Lys Glu Glu Ala Asp Met Ala Tyr Ser Ala Phe Leu
740 745 750

Phe Gln Ser Ser Thr Ile Ala Ala Gln Val His Asp Gly Pro Gln Glu
755 760 765

Ala

30

(2) SEQ ID NO: 11 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 322 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

名称: Guy's 13 Kappa

(ix) 特征:

(A) 关键名: 编码序列

(B) 位置: 8...320

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 11:

	CTCGAGC	GAC	ATT	GTG	ATG	ACC	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	49	
		Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser		
	1					5						10					
5																	
	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATA	ACC	TGC	AGT	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	97
	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	
	15					20					25					30	
15																	
	TAC	ATG	CAC	TGG	TTC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGC	ACT	TCT	CCC	AAA	CTC	TGG	145
	Tyr	Met	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Leu	Trp	
					35					40					45		
	CTT	TAT	AGC	ACA	TCC	AAC	CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	GCT	CGC	TTC	AGT	193
	Leu	Tyr	Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	
					50					55					60		
20																	
	GGC	AGT	GGA	TCT	GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	ACA	ATC	AGC	CGA	ATG	GAG	241
	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	
			65					70						75			
	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAT	CAA	AGG	ACT	AGT	TAC	CCG	289
	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Arg	Thr	Ser	Tyr	Pro	
			80					85						90			
25																	
	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	A	TA					322
	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile						
						100					105						

(2) SEQ ID NO: 12 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 105 氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

名称: Guy's 13 Kappa

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 12:

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Leu Tyr
35 40 45

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg Thr Ser Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105

(2) SEQ ID NO: 13 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 402 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

名称: Guy's 13 Gamma 1

(ix) 特征:

(A) 关键名: 编码序列

(B) 位置: 7...402

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 13:

CTCGAG ATG GAA TGG ACC TGG GTT TTT CTC TTC CTC CTG TCA GGA ACT 48
Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Ser Gly Thr
1 5 10

5 GCA GGC GTC CAC TCT GGG GTC CAG CTT CAG CAG TCA GGA CCT GAC CTG 96
Ala Gly Val His Ser Gly Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu
15 20 25 30

GTG AAA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC 144
Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
35 40 45

10 ACA TTC ACT GAC TAC AAC ATA CAC TGG GTG AAG CAG AGC CGT GGA AAG 192
Thr Phe Thr Asp Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys
50 55 60

AGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT ATT TAT CCT TAC AAT GGT AAT ACT TAC 240
Ser Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr
65 70 75

TAC AAC CAG AAG TTC AAG AAC AAG GCC ACA TTG ACT GTA GAC AAT TCC 288
Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser
80 85 90

15 TCC ACC TCA GCC TAC ATG GAG CTC CGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT 336
Ser Thr Ser Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser
95 100 105 110

GCA GTC TAT TAC TGT GCA ACC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC 384
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

20 ACT CTC ACA GTC TCC TCA 402
Thr Leu Thr Val Ser Ser
130

(2) SEQ ID NO: 14 的资料:

(i) 序列特征:

- 25 (A) 长度: 132 氨基酸
(B) 类型: 氨基酸
(C) 链型: 单链
(D) 构型: 线性

名称: Guy's 13 Gamma 1

30 (xi) 序列名称: SEQ ID NO: 14:

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
1 5 10 15
Val His Ser Gly Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

5 Thr Asp Tyr Asn Ile His Trp Val Lys Gln Ser Arg Gly Lys Ser Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Asn Ser Ser Thr
 85 90 95

10 Ser Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 115 120 125

Thr Val Ser Ser
 130

15 (2) SEQ ID NO: 15 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

20 (D) 构型: 线性

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 15:

ACCAGATCTA TGGAATGGAC CTGGGTTTTT C

31

(2) SEQ ID NO: 16 的资料:

25 (i) 序列特征:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

30 (xi) 序列名称: SEQ ID NO: 16:

CCCAAGCTTG GTTTTGGAGA TGGTTTTCTC

30

(2) SEQ ID NO: 17 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 31 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 17:

GATAAGCTTG GTCCTACTCC TCCTCCTCCT A

31

(2) SEQ ID NO: 18 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 18:

AATCTCGAGT CAGTAGCAGA TGCCATCTCC

30

(2) SEQ ID NO: 19 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 单链

(D) 构型: 线性

(xi) 序列名称: SEQ ID NO: 19:

GGAAAGCTTT GTACATATGC AAGGCTTACA

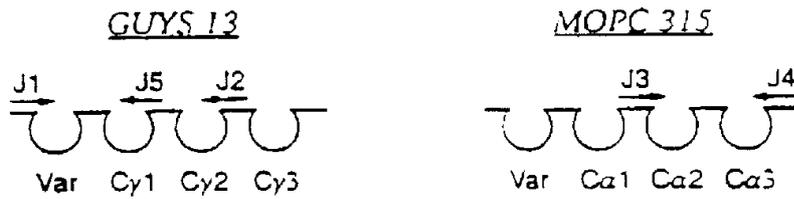
30

说明书附图

合成的寡核苷酸:

31 ACCAGATCTATGGAATGGACCTGGGTTTTTC
32 CCCAAGCTTGGTTTTGGAGATGGTTTTCTC
33 GATAAGCTTGGTCCTACTCCTCCTCCTCCTA
34 AATCTCGAGTCAGTAGCAGATGCCATCTCC
35 GGAAAGCTTGTACATATGCAAGGCTTACA

PCR扩增:

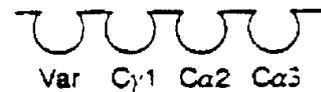


重组重链:

植物 G13



植物 G1/A



植物 G2/A

