



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110760483 B

(45) 授权公告日 2021.06.22

(21) 申请号 201911088251.9

C12N 15/85 (2006.01)

(22) 申请日 2019.11.08

G01N 33/68 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110760483 A

(43) 申请公布日 2020.02.07

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:C2019129 2019.06.17

(73) 专利权人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72) 发明人 焦新安 陈祥 李昕 谈悦

徐正中 朱兆成 夏爱鸿 王蕾

顾丹

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所(普通

合伙) 31219

代理人 严晨 许亦琳

(51) Int.Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104447986 A,2015.03.25

CN 108752475 A,2018.11.06

WO 2020041300 A1,2020.02.27

CN 104892760 A,2015.09.09

CN 102482700 A,2012.05.30

Yanzhang Li 等.Cell-Specific

Expression and Lipopolysaccharide-Induced

Regulation of Tumor Necrosis Factor alpha

(TNF alpha) and TNF Receptors in Rat

Dorsal Root Ganglion.《The Journal of

Neuroscience》.2004,第24卷(第43期),

凌媛等.抗TNF- α 单链抗体的表达及其纯

化.《微生物学免疫学进展》.2009,第37卷(第3

期),

审查员 孔维纳

权利要求书1页 说明书16页

序列表6页 附图3页

(54) 发明名称

具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆抗体的
制备及应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种杂交瘤细胞株,并进一步涉及通过该杂交瘤细胞株制备获得的抗TNF- α 抗体、及其制备方法和用途。本发明提供一种杂交瘤细胞株或其传代细胞株,所述杂交瘤细胞株的保藏号为CCTCC NO:C2019129,并进一步提供了由所述杂交瘤细胞株或其传代细胞株产生的抗TNF- α 抗体。本发明所提供的单克隆抗体具有效价高、与天然抗原结合亲和力强的优势,可用于检测天然牛TNF- α 、羊TNF- α 。

1. 一种杂交瘤细胞株,所述杂交瘤细胞株的保藏号为CCTCC NO:C2019129。
2. 一种抗TNF- α 抗体,由保藏号为CCTCC NO:C2019129的杂交瘤细胞株产生。
3. 一种抗TNF- α 抗体,所述抗TNF- α 抗体包括重链可变区和轻链可变区,所述轻链可变区的CDR为氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的CDR-L1、氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的CDR-L2、氨基酸序列如SEQ ID No.3所示的CDR-L3,所述重链可变区的CDR为氨基酸序列如SEQ ID No.6所示的CDR-H1、氨基酸序列如SEQ ID No.7所示的CDR-H2、氨基酸序列如SEQ ID No.8所示的CDR-H3。
4. 如权利要求3所述的抗TNF- α 抗体,其特征在于,所述抗TNF- α 抗体的轻链可变区的氨基酸序列包括如SEQ ID No.4所示的氨基酸序列。
5. 如权利要求3所述的抗TNF- α 抗体,其特征在于,所述抗TNF- α 抗体的轻链的氨基酸序列包括如SEQ ID No.5所示的氨基酸序列。
6. 如权利要求3所述的抗TNF- α 抗体,其特征在于,所述抗TNF- α 抗体的重链可变区的氨基酸序列包括如SEQ ID No.9所示的氨基酸序列。
7. 如权利要求3所述的抗TNF- α 抗体,其特征在于,所述抗TNF- α 抗体的重链的氨基酸序列包括如SEQ ID No.10所示的氨基酸序列。
8. 一种分离的多核苷酸,编码如权利要求3-7任一权利要求所述的抗TNF- α 抗体。
9. 一种构建体,含有如权利要求8所述的分离的多核苷酸。
10. 一种抗体的表达系统,所述表达系统含有如权利要求9所述的构建体或基因组中整合有外源的如权利要求8所述的多核苷酸。
11. 如权利要求2-7任一权利要求所述的抗TNF- α 抗体的制备方法,包括如下步骤:培养如权利要求10所述的抗体的表达系统,从而表达出所述的抗体,纯化分离出所述的抗体;和/或,由保藏号为CCTCC NO:C2019129的杂交瘤产生。
12. 如权利要求2-7任一权利要求所述的抗TNF- α 抗体在制备TNF- α 检测试剂盒中的用途。
13. 一种检测试剂盒,所述检测试剂盒包括如权利要求2-7任一权利要求所述的抗TNF- α 抗体。

具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆抗体的制备及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别是涉及一种杂交瘤细胞株,并进一步涉及通过该杂交瘤细胞株制备获得的抗TNF- α 抗体、及其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 机体免疫系统在被激活后,会产生一种能够使肿瘤发生出血性坏死的细胞因子,被命名为肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor,TNF- α)。TNF- α 是一种涉及到系统性炎症的细胞因子,主要由巨噬细胞分泌。其主要功能是调节免疫细胞,作为一种内源性致热源,可以导致发热,引起细胞凋亡,阻止肿瘤发生和病毒复制等。TNF- α 表达水平的改变与感染性疾病、免疫功能异常、炎症性疾病及肿瘤的发展等具有一定相关性。

[0003] TNF- α 的免疫学检测是在特异性抗TNF- α 单克隆抗体(MAb)的基础上建立的用于对样本中的TNF- α 进行定性定量分析的实验方法。应用不同的单克隆抗体标记物和检测技术,可建立多种检测方法,如酶联免疫吸附法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay,简称ELISA),流式细胞术(Flow Cytometry,简称FCM)分析法等。作为细胞免疫状态的重要指标之一,TNF- α 的免疫学检测方法被广泛地用于基础研究和临床医学、疫苗免疫效果评估、疾病诊断、过敏反应等。

[0004] 但是,现有技术中制备的抗牛、羊TNF- α 抗体,在应用于上述检测方法时往往遇到很大问题,特别是当用于检测天然牛、羊TNF- α 时效果不佳。

发明内容

[0005] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种杂交瘤细胞株,并进一步提供通过该杂交瘤细胞株制备获得的抗TNF- α 抗体、及其制备方法和用途,用于解决现有技术中的问题。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明一方面提供一种杂交瘤细胞株或其传代细胞株,所述杂交瘤细胞株的保藏号为CCTCC NO:C2019129。

[0007] 本发明另一方面提供一种抗TNF- α 抗体,由保藏号为CCTCC NO:C2019129的杂交瘤细胞株或其传代细胞株产生。

[0008] 本发明另一方面提供一种抗TNF- α 抗体,所述抗TNF- α 抗体包括重链可变区和轻链可变区,所述轻链可变区的CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的CDR-L1、氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的CDR-L2、氨基酸序列如SEQ ID No.3所示的CDR-L3,所述重链可变区的CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.6所示的CDR-H1、氨基酸序列如SEQ ID No.7所示的CDR-H2、氨基酸序列如SEQ ID No.8所示的CDR-H3。

[0009] 在本发明一些实施方式中,所述抗TNF- α 抗体为单克隆抗体。

[0010] 在本发明一些实施方式中,所述抗TNF- α 抗体的轻链可变区的氨基酸序列包括:

[0011] a) 如SEQ ID No.4所示的氨基酸序列;或

[0012] b) 与SEQ ID No.4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性、且具有a)所限定的氨

基酸序列功能的氨基酸序列。

[0013] 在本发明一些实施方式中,所述抗TNF- α 抗体的轻链的氨基酸序列包括如SEQ ID No.5所示的氨基酸序列。

[0014] 在本发明一些实施方式中,所述抗TNF- α 抗体的重链可变区的氨基酸序列包括:

[0015] c) 如SEQ ID No.9所示的氨基酸序列;或

[0016] d) 与SEQ ID No.9所示的氨基酸序列具有80%以上同源性、且具有c)所限定的氨基酸序列功能的氨基酸序列。

[0017] 在本发明一些实施方式中,所述抗TNF- α 抗体的重链的氨基酸序列包括如SEQ ID No.10所示的氨基酸序列。

[0018] 本发明另一方面提供一种分离的多核苷酸,编码所述的抗TNF- α 抗体的重链可变区和/或轻链可变区和/或全长氨基酸。

[0019] 本发明另一方面提供一种构建体,含有所述的分离的多核苷酸。

[0020] 本发明另一方面提供一种抗体的表达系统,所述表达系统含有所述的构建体或基因组中整合有外源的所述的多核苷酸。

[0021] 本发明另一方面提供所述的抗TNF- α 抗体的制备方法,包括如下步骤:培养所述的抗体的表达系统,从而表达出所述的抗体,纯化分离出所述的抗体;

[0022] 和/或,由保藏号为CCTCC NO:C2019129的杂交瘤产生。

[0023] 本发明另一方面提供所述的抗TNF- α 抗体在制备TNF- α 检测试剂盒中的用途。

[0024] 本发明另一方面提供一种检测试剂盒,所述检测试剂盒包括所述的抗TNF- α 抗体。

附图说明

[0025] 图1显示为本发明实施例5中Western-Blot方法的牛、羊TNF- α 蛋白检测结果图:A.rHis-BoTNF- α 、rGST-BoTNF- α 蛋白的Western-Blot检测结果;B.rHis-ShTNF- α 、rGST-ShTNF- α 蛋白的Western-Blot检测结果。

[0026] 图2显示为本发明实施例9实验中牛、羊外周血单核细胞样品的直接免疫荧光(DFA)检测结果。A.PMA联合离子霉素刺激牛外周血单核细胞检测结果;B.未刺激牛外周血单核细胞检测结果;C.PMA联合离子霉素刺激羊外周血单核细胞检测结果;D未刺激羊外周血单核细胞检测结果。

[0027] 图3显示为本发明实施例11实验中FCM试剂盒的牛、羊外周血单核细胞样品检测结果图:A.未刺激牛外周血单核细胞及PMA联合离子霉素刺激牛外周血单核细胞检测结果;B.未刺激羊外周血单核细胞及PMA联合离子霉素刺激羊外周血单核细胞检测结果。

[0028] 图4显示为本发明实施例13实验中牛结核病FCM检测试剂盒检测牛外周血单个核细胞样品检测结果。

具体实施方式

[0029] 为了使本发明的发明目的、技术方案和有益技术效果更加清晰,以下结合实施例对本发明进行进一步详细说明,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容容易地了解本申请发明的其他优点及功效。

[0030] 本发明发明人经过大量研究,提供了一种杂交瘤细胞株,并进一步涉及通过该杂

交瘤细胞株制备获得的抗TNF- α 抗体,所述抗TNF- α 抗体能与天然牛、羊TNF- α 高亲和力地结合,具有高度的灵敏度和高特异性,在此基础上完成了本发明。

[0031] 本发明第一方面提供一种杂交瘤细胞株或其传代细胞株,所述杂交瘤细胞株的保藏号为CCTCC NO:C2019129,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏地址为中国.武汉.武汉大学,保藏日期为2019年6月17日。

[0032] 本发明第二方面提供一种抗TNF- α 抗体,由保藏号为CCTCC NO:C2019129的杂交瘤细胞株或其传代细胞株产生。本发明所提供的抗TNF- α 抗体,可以由本发明第一方面所提供的杂交瘤细胞株或其传代细胞株分泌获得。所述抗TNF- α 抗体通常为单克隆抗体。单克隆抗体通常指一个抗体的群体,该群体中所包括的抗体是基本相同的(除少数可能存在的天然发生的突变外)。单克隆抗体通常针对抗原上特定的决定簇。所述抗TNF- α 抗体可以是鼠源的。所述抗TNF- α 抗体能与天然牛、羊TNF- α 高亲和力地结合,在抗体的特异性鉴定中,只与rBoTNF- α 、ShTNF- α (牛、羊的天然TNF- α)发生反应,而不与其他的原核表达的重组细胞因子反应,且在效价测定中具有极高的效价,具有高度的灵敏度和高特异性的特点。

[0033] 本发明第三方面提供一种抗TNF- α 抗体,所述抗TNF- α 抗体包括重链可变区和轻链可变区,所述轻链可变区的CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的CDR-L1、氨基酸序列如SEQ ID No.2所示的CDR-L2、氨基酸序列如SEQ ID No.3所示的CDR-L3,所述重链可变区的CDR包括氨基酸序列如SEQ ID No.6所示的CDR-H1、氨基酸序列如SEQ ID No.7所示的CDR-H2、氨基酸序列如SEQ ID No.8所示的CDR-H3。

[0034] CDR(互补决定区,complementarity determining region)通常指抗体中在空间结构上可以与抗原决定簇形成互补的区域。抗体中的可变性通常并不均匀地分布在整个抗体的可变区中,单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区通常均具有3个超变区(hypervariable region,HVR),这些区域在空间结构上通常可以与抗原决定簇形成互补,所以超变区也被称为互补决定区(CDR),即重链可变区通常包括三个互补决定区,即CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,轻链可变区通常包括三个互补决定区,即CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0035] 所述抗TNF- α 抗体中,所述抗TNF- α 抗体的轻链可变区的氨基酸序列可以包括:

[0036] a) 如SEQ ID No.4所示的氨基酸序列;或

[0037] b) 与SEQ ID No.4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性、且具有a)所限定的氨基酸序列功能的氨基酸序列。具体的,所述b)中的氨基酸序列具体指:如SEQ ID No.4所示的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或多个(具体可以是1-50、1-30个、1-20个、1-10个、1-5个、或1-3个)氨基酸而得到的,或者在N-末端和/或C-末端添加一个或多个(具体可以是1-50个、1-30个、1-20个、1-10个、1-5个、或1-3个)氨基酸而得到的,且具有如SEQ ID No.4所示的氨基酸序列功能的氨基酸序列。所述b)中的氨基酸序列可与SEQ ID No.4具有80%、85%、90%、93%、95%、97%、或99%以上的同源性。

[0038] 在本发明一具体实施例中,所述抗TNF- α 抗体的轻链的氨基酸序列可以包括如SEQ ID No.5所示的氨基酸序列。

[0039] 所述抗TNF- α 抗体中,所述抗TNF- α 抗体的重链可变区的氨基酸序列包括:

[0040] c) 如SEQ ID No.9所示的氨基酸序列;或

[0041] d) 与SEQ ID No.9所示的氨基酸序列具有80%以上同源性、且具有c)所限定的氨基酸序列功能的氨基酸序列;具体的,所述d)中的氨基酸序列具体指:如SEQ ID No.9所示

的氨基酸序列经过取代、缺失或者添加一个或多个(具体可以是1-50、1-30个、1-20个、1-10个、1-5个、或1-3个)氨基酸而得到的,或者在N-末端和/或C-末端添加一个或多个(具体可以是1-50个、1-30个、1-20个、1-10个、1-5个、或1-3个)氨基酸而得到的,且具有如SEQ ID No.9所示的氨基酸序列功能的氨基酸序列。所述d)中的氨基酸序列可与SEQ ID No.9具有80%、85%、90%、93%、95%、97%、或99%以上的同源性。

[0042] 在本发明一具体实施例中,所述抗TNF- α 抗体的重链的氨基酸序列可以包括如SEQ ID No.10所示的氨基酸序列。

[0043] 本发明第四方面提供一种分离的多核苷酸,编码如本发明第三方面所提供的抗TNF- α 抗体的重链可变区和/或轻链可变区和/或全长氨基酸。

[0044] 本发明第五方面提供一种构建体,含有如本发明第四方面所提供的多核苷酸。所述构建体可以由所述分离的多核苷酸插入到表达载体的多克隆位点构建而成。本发明中的表达载体通常指本领域熟知的各种市售表达载体,例如可以是细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒或其他载体。

[0045] 本发明第六方面提供一种抗体的表达系统,所述表达系统含有本发明第五方面所提供的构建体或基因组中整合有外源的本发明第四方面所提供的多核苷酸。任何适用于表达载体进行表达的细胞都可以作为宿主细胞,例如,所述宿主细胞可以是原核细胞,如细菌细胞等;或是低等真核细胞,如酵母细胞等;或是高等真核细胞,如哺乳动物细胞等。

[0046] 本发明第七方面提供本发明第二方面、或第三方面所提供的抗TNF- α 抗体的制备方法,所述制备方法可以包括如下步骤:在适合表达所述抗体的条件下,培养如权利要求11所述的抗体的表达系统,从而表达出所述的抗体,纯化分离出所述的抗体。合适的表达所述抗体的条件对于本领域技术人员来说应该是已知的,本领域技术人员可根据经验选择适用的培养基,在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子,将细胞再培养一段时间。在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0047] 所述抗TNF- α 抗体也可以由保藏号为CCTCC NO:C2019129的杂交瘤产生,制备方法可以包括如下步骤:采用体内诱生腹水法进行制备。合适的利用杂交瘤体内诱生腹水以提供单克隆抗体的方法对于本领域技术人员来说应该是已知的,本领域技术人员可根据经验将杂交瘤细胞对小鼠进行腹腔接种,收集腹水。如果需要,可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于:常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

[0048] 本发明第八方面提供本发明第二方面、或第三方面所提供的抗TNF- α 抗体在制备TNF- α 检测试剂盒中的用途。

[0049] 本发明第八方面提供一种检测试剂盒,所述检测试剂盒包括第二方面、或第三方

面所提供的抗TNF- α 抗体,具体可以为诊断有效剂量的,所述有效量通常指能够提供诊断效益的量。所以诊断试剂盒通常可以针对作用靶标TNF- α 抗原,以TNF- α 抗原作为生物标志物进行诊断。所述诊断试剂盒还可以包括抗TNF- α 抗体的标记物,所述抗TNF- α 抗体的标记物通常可以用于标记所述抗TNF- α 抗体,可选用的标记物的种类包括但不限于荧光标记物、放射性标记物、酶标标记物、化学发光性标记物等中的一种或多种的组合。根据试剂盒的检测原理,所述试剂盒通常还可包含检测所需的一种或多种试剂。此外,所述试剂盒中还可根据需要进行包括:容器、对照物(阴性或阳性对照)、缓冲剂、助剂等,本领域技术人员可根据具体情况对其进行选择。

[0050] 在本发明一具体实施例中,所述试剂盒可以是Western-Blot检测试剂盒,所述试剂盒可以用于检测牛或羊外周血单核细胞分泌的天然牛或羊TNF- α 蛋白。所述Western-Blot检测试剂盒可以包括被标记的所述抗TNF- α 抗体,具体可以为辣根过氧化物酶标记的所述抗TNF- α 抗体,所述Western-Blot检测试剂盒还可以包括其他试剂,例如,可以是封闭液、底物液、洗涤液等中的一种或多种的组合。

[0051] 在本发明另一具体实施例中,所述试剂盒可以是直接免疫荧光(DFA)检测试剂盒,所述检测试剂盒被用于以HeLa细胞为表达宿主的牛、羊TNF- α 蛋白的检测方法,也可以用于分析牛、羊外周血单核细胞样品。所述直接免疫荧光(DFA)检测试剂盒可以包括被标记的所述抗TNF- α 抗体,具体可以为异硫氰酸荧光素标记的所述抗TNF- α 抗体,所述直接免疫荧光检测试剂盒可以包括其他试剂,例如,可以是固定剂、洗涤液等中的一种或多种的组合。

[0052] 在本发明另一具体实施例中,所述试剂盒可以是FCM检测试剂盒,所述试剂盒可以用于检测分泌牛、羊TNF- α 的单核细胞,从而进行机体免疫状态评价及疾病诊断方面的研究。所述FCM检测试剂盒可以包括被标记的所述抗TNF- α 抗体,具体可以为异硫氰酸荧光素标记的所述抗TNF- α 抗体,所述直接免疫荧光检测试剂盒可以包括其他试剂,例如,可以是阻断剂、固定剂、破膜剂、洗涤液等中的一种或多种的组合。

[0053] 本发明第九方面提供一种检测方法,包括:通过本发明第二方面、或第三方面所提供的抗TNF- α 抗体、或本发明第八方面所提供的检测试剂盒,检测样品中牛TNF- α 和/或羊TNF- α 。所述检测可以是非诊断治疗目的的,所述非诊断目的检测包括重组表达牛、羊TNF- α 的检测、对离体组织进行检测、表位鉴定研究。

[0054] 本发明所提供的单克隆抗体具有效价高、与天然抗原结合亲和力强的优势,可用于检测天然牛TNF- α 、羊TNF- α 。基于本发明所提供的单克隆抗体所建立的Western-Blot检测试剂盒,可以有效检测大肠杆菌表达系统表达的牛、羊TNF- α 蛋白,同时也可以检测牛、羊外周血单核细胞(PBMC)分泌的天然牛、羊TNF- α 蛋白;基于本发明所提供的单克隆抗体所建立的直接免疫荧光(DFA)检测试剂盒,可以有效检测牛、羊外周血单核细胞样品和真核质粒表达分泌的牛、羊TNF- α ;基于本发明所提供的单克隆抗体所建立的牛、羊TNF- α 的FCM检测试剂盒,在检测牛、羊外周血单个核细胞样品时,可以检测出较高水平的分泌牛、羊TNF- α 的牛、羊外周血单个核细胞。可见,本发明所提供的单克隆抗体及其相关试剂盒操作简便,极大缩短了检测时间,可以广泛应用于免疫学研究,用作牛机体免疫状态的评价及感染性疾病诊断相关的研究、以及非诊断目的的牛、羊TNF- α 的检测。

[0055] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实

施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0056] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin(P.M.Wassarman and A.P.Wolffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119,Chromatin Protocols(P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0057] 实施例1:杂交瘤细胞株的获得

[0058] 保藏号为CCTCC NO:C2019129的杂交瘤细胞株的获得。

[0059] 1、rHis-BoTNF- α 重组蛋白的纯化

[0060] 根据GenBank中BoTNF- α cDNA序列(XM_005223596.4)设计引物,表达重组载体pET-30a(+)-BoTNF- α 的引物序列P1:5'-ACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCCTCAGGTCCTTCTCTCAA-3'(划线部分为BamHI的酶切位点)P2:5'-TGGTGCTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTTCACAGGGCGATGATCCCAAAGTA-3'(划线部分为Hind III的酶切位点)。

[0061] 按照RNeasy plus Mini试剂盒说明书提取牛外周血淋巴细胞总RNA,并进行反转录。对BoTNF- α 基因的扩增并对pET-30a(+)载体进行双酶切。将回收纯化的载体与目的基因以1:3的摩尔质量比进行混匀,加入一步法连接酶37℃作用30min,将目的基因与载体进行连接,热转入BL21(DE3)。重组菌命名为BL21(DE3)(pET-30a(+)-BoTNF- α)。之后对重组菌BL21(DE3)(pET-30a(+)-BoTNF- α)进行诱导表达及纯化,获得rHis-BoTNF- α 纯化蛋白。

[0062] 2、动物免疫

[0063] 具体免疫程序如下:首次免疫BALB/c小鼠,腹部皮下多点注射100 μ g经弗氏完全佐剂充分乳化的rHis-BoTNF- α 纯化蛋白,2周后腹部皮下多点注射100 μ g经弗氏不完全佐剂充分乳化的纯化蛋白进行二次免疫,间隔2周后腹腔注射100 μ g不加佐剂的纯化蛋白进行第三次免疫,7天后采血测定血清抗体效价,选取效价较高的小鼠进行腹腔加强免疫100 μ g不加佐剂的纯化蛋白。

[0064] 3、细胞融合

[0065] 具体步骤如下:腹腔注射加强免疫3天后,采集少量血液,分离血清,-20℃冻存,作为筛选时的阳性克隆对照。按生物安全方法无菌取免疫小鼠脾脏细胞与处于对数生长期的骨髓瘤细胞SP2/0在聚乙二醇PEG(MW1500)作用下融合,用ICR小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养细胞,融合好的细胞及饲养细胞用HAT培养基悬浮,分装96孔板,置37℃、5%CO₂培养箱中培养。5天后加入新鲜HAT培养基,10天后改用HT培养基进行培养,定期观察,换液和检测。

[0066] 4、间接ELISA检测方法的建立

[0067] 采用间接ELISA方法筛选阳性克隆细胞。方阵试验确定检测抗原的包被浓度。

[0068] 检测抗原用包被缓冲液横向梯度稀释,每孔100 μ L包被ELISA板,4 $^{\circ}$ C过夜;PBST洗涤3次,每孔加入200 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育2h;免疫鼠血清纵向倍比稀释,每孔100 μ L,正常小鼠血清同样倍比稀释作为阴性对照,37 $^{\circ}$ C孵育2h;用PBST洗涤3次,加入工作浓度的酶标二抗,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h;PBST洗涤后,加3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色,酶联检测仪测定OD₄₅₀的值,判定检测抗原的最佳包被浓度。

[0069] 根据方阵试验确定的检测抗原的包被浓度,将稀释后的检测抗原100 μ L/孔加入酶标板中,4 $^{\circ}$ C过夜,PBST洗涤3次,5min/次,用含1%BSA(牛血清白蛋白)的PBST,4 $^{\circ}$ C封闭过夜,PBST洗涤后拍干,-20 $^{\circ}$ C保存,用于筛选阳性克隆细胞。

[0070] 5、筛选阳性克隆

[0071] 采用建立的间接ELISA方法检测杂交瘤细胞分泌抗体的情况。具体方法如下:将杂交瘤细胞上清加入预先以步骤3中确定的最佳包被浓度包被好的ELISA板中,100 μ L/孔,以SP2/0细胞上清作为阴性对照,免疫鼠多抗血清作为阳性对照,37 $^{\circ}$ C水浴2h;PBST洗涤3次;加入工作浓度的辣根过氧化物酶HRP标记的羊抗鼠IgG,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C水浴1.5h;洗涤后,加TMB显色10-15min,显色终止后酶标仪测定OD₄₅₀读数。被测孔OD₄₅₀读数大于阴性对照2倍以上判定为阳性。将筛选的阳性克隆命名为3C1。

[0072] 6、阳性杂交瘤细胞的克隆化

[0073] 采用有限稀释法对筛选到的阳性细胞克隆3C1进行3次的亚克隆并进行保藏。阳性细胞克隆3C1对应保藏号为CCTCC NO:C2019129的杂交瘤细胞株。

[0074] 实施例2:具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆抗体的制备

[0075] 1、腹水制备

[0076] 采用体内诱生腹水法,按常规方法进行。10-12周龄健康BALB/c小鼠腹腔注射液体石蜡0.3-0.5mL/只,7-10天后,分别腹腔接种经PBS稀释的培养至对数期生长的杂交瘤细胞3C1,5 $\times$ 10⁵个细胞/只;七天后,收集腹水,离心去除沉淀,收集上清,分装,-70 $^{\circ}$ C保存。

[0077] 2、抗体纯化

[0078] 将制备的单抗mAb 3C1腹水使用Protein A亲和层析方法进行纯化。

[0079] 实施例3:单克隆抗体特性检测

[0080] 1、单抗亚类的鉴定

[0081] 按单克隆抗体亚类试剂盒说明书进行,采用抗原介导的ELISA法。在已包被的酶标板内分别加入细胞培养上清100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 1h,PBST洗涤3次,每次5min;分别加入1:1000稀释的羊抗鼠IgA、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM亚类抗体50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 0.5h,加入单抗mAb 3C1,PBST洗涤3次,每次5min;加入1:5000稀释的兔抗羊酶标二抗50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 15min,PBST洗涤3次;加TMB显色液100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C避光显色10-15min,2M H₂SO₄ 50 μ L/孔终止反应,以肉眼观察颜色明显高于其他孔者所加亚类抗体为单抗亚类。

[0082] 结果显示,单抗mAb 3C1亚类为IgG1。

[0083] 经鉴定,结果表明,单克隆抗体3C1的轻链可变区互补决定区1(CDR1)的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,具体为:

[0084] RASENIYIYLA (SEQ ID NO.1)

[0085] 单克隆抗体3C1的轻链可变区互补决定区2(CDR2)的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,具体为:

[0086] NAKTLAE (SEQ ID NO.2)

[0087] 单克隆抗体3C1的轻链可变区互补决定区3 (CDR3) 的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示, 具体为:

[0088] QHHYGTPWT (SEQ ID NO.3)

[0089] 单克隆抗体3C1的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示, 具体为:

[0090] DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYIYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO.4)

[0091] 单克隆抗体3C1的轻链的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示, 具体为:

[0092] MSVPTQVLGLLLLWLTGARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYIYLAWYQQKQKSPQLLVYNAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLNINSLQPEDFGSYQCQHHYGTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO.5) 亦即单克隆抗体3C1的轻链含有127个氨基酸。

[0093] 单克隆抗体3C1的重链可变区互补决定区1 (CDR1) 的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示, 具体为:

[0094] NFSVH (SEQ ID NO.6)

[0095] 单克隆抗体3C1的重链可变区互补决定区2 (CDR2) 的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示, 具体为:

[0096] VMWGGSTDYNAAFIS (SEQ ID NO.7)

[0097] 单克隆抗体3C1的重链可变区互补决定区3 (CDR3) 的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示, 具体为:

[0098] SGPYYSLDY (SEQ ID NO.8)

[0099] 单克隆抗体3C1的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示, 具体为:

[0100] QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNFSVHWVRQPPGKGLEWLGVMWGGSTDYNAAFISRLSI IKDNSKSQVFFKMNGLQADDTAIYYCARGPYYYSLDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO.9)

[0101] 单克隆抗体3C1的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示, 具体为:

[0102] MAVLVLLFCLVTFPSCVLSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNFSVHWVRQPPGKGLEWLGVMWGGSTDYNAAFISRLSI IKDNSKSQVFFKMNGLQADDTAIYYCARGPYYYSLDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO.10) 亦即单克隆抗体3C1的重链含有137个氨基酸。

[0103] 对应地, 单克隆抗体3C1的轻链可变区互补决定区1 (CDR1) 的核苷酸序列如SEQ ID NO.11所示, 具体为:

[0104] CGAGCAAGTGAGAATATTTACATTTATTTAGCA (SEQ ID NO.11)

[0105] 单克隆抗体3C1的轻链可变区互补决定区2 (CDR2) 的核苷酸序列如SEQ ID NO.12所示, 具体为:

[0106] AATGCAAAAACCTTAGCAGAA (SEQ ID NO.12)

[0107] 单克隆抗体3C1的轻链可变区互补决定区3 (CDR3) 的核苷酸序列如SEQ ID NO.13所示, 具体为:

[0108] CAACATCATTATGGTACTCCGTGGACG (SEQ ID NO.13)

[0109] 单克隆抗体3C1的轻链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.14所示, 具体为:

[0110] GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACATTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTC

TATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGA
ACATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGGTACTCCGTGGACGTTTCGG
TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO.14)

[0111] 单克隆抗体3C1的轻链的核苷酸序列如SEQ ID NO.15所示,具体为:

[0112] ATGAGTGTGCCACTCAGGTCCTGGGGTTGCTGCTGTGGCTTACAGGTGCCAGATGTGACATCCA
GATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAAT
ATTTACATTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCT
TAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAACATCAACAGCCTGCA
GCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGGTACTCCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTG
GAAATCAAA (SEQ ID NO.15)

[0113] 亦即单克隆抗体3C1的轻链的核苷酸含有381个碱基。

[0114] 单克隆抗体3C1的重链可变区互补决定区1 (CDR1) 核苷酸序列如SEQ ID NO.16所
示,具体为:

[0115] AACTTTAGTGTTTAC (SEQ ID NO.16)

[0116] 单克隆抗体3C1的重链可变区互补决定区2 (CDR2) 核苷酸序列如SEQ ID NO.17所
示,具体为:

[0117] GTGATGTGGAGTGGTGAAGCACAGACTATAATGCTGCTTTCATATCC (SEQ ID NO.17)

[0118] 单克隆抗体3C1的重链可变区互补决定区3 (CDR2) 核苷酸序列如SEQ ID NO.18所
示,具体为:

[0119] AGCGGTCCTTATTACTATTCTCTGGACTAC (SEQ ID NO.18)

[0120] 单克隆抗体3C1的重链可变区的核苷酸序列如SEQ ID NO.19所示,具体为:

[0121] CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCAC
AGTCTCTGGTTTCTCATTAACCTTTAGTGTTCACTGGGTTGCCAGCCTCCAGGAAAGGTCTGGAGTGGCTG
GGAGTGATGTGGAGTGGTGAAGCACAGACTATAATGCTGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCATCAAGGACAAC
CCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAATGAACGGTCTGCAAGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAAGCGG
TCCTTATTACTATTCTCTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO.19)

[0122] 单克隆抗体3C1的重链的核苷酸序列如SEQ ID NO.20所示,具体为:

[0123] ATGGCTGTCCTGGTGCTGCTTCTGCCTGGTGACATTCCCAAGCTGTGTCCTATCCAGGTGCAGCT
GAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCATTA
ACTAACTTTAGTGTTCACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATGTGGAGTGGTG
GAAGCACAGACTATAATGCTGCTTTCATATCCAGACTGAGCATCATCAAGGACAACCTCAAGAGCCAAGTTTTCTT
TAAATGAACGGTCTGCAAGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAAGCGGTCCTTATTACTATTCTCTG
GACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO.20) 亦即,单克隆抗体3C1的重链
的核苷酸含有411个碱基。

[0124] 2、单抗腹水效价的测定

[0125] 根据GenBank中BoTNF- α cDNA序列(XM_005223596.4)设计引物,表达重组载体
pGEX-6p-1-BoTNF- α 的引物序列P3:5'-TTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCCTCAGGTCCTCTTCTCA
AGCCTCAA-3' (划线部分为BamH I的酶切位点),P4:5'-AGTCAGTCACGATGCGGCGCTCGAGTCACA
GGGCGATGATCCCAAAGTAG (划线部分为Xho I的酶切位点)。

[0126] 对pGEX-6P-1载体进行双酶切,回收纯化的载体。将纯化的载体与BoTNF- α 目的基因以1:3的摩尔质量比进行混匀,加入一步法连接酶37℃作用30min,将目的基因与载体进行连接,热转入BL21。重组菌命名为BL21 (pGEX-6p-1-BoTNF- α)。之后对重组菌BL21 (pGEX-6p-1-BoTNF- α) 进行诱导表达及纯化,获得rGST-BoTNF- α 纯化蛋白。

[0127] 使用碳酸盐缓冲液将rGST-BoTNF- α 稀释至0.5 μ g/mL,每孔100 μ L包被ELISA板,4℃过夜;PBST洗涤3次,每孔加入200 μ L封闭液,37℃孵育2h;将单抗腹水(实施例2中第一部分制备的样品)倍比稀释,每孔100 μ L,同样倍数稀释SP2/0腹水(SP2/0腹水的制备方法参照实施例2,仅是将杂交瘤细胞3C1替换为SP2/0细胞)作为阴性对照,37℃孵育2h;用PBST洗涤3次,加入工作浓度的羊抗鼠IgG酶标二抗,每孔100 μ L,37℃孵育1.5h;PBST洗涤后,TMB显色,酶联检测仪测定OD₄₅₀的值,以P/N $\geq$ 2.1为判定标准,测定单抗腹水效价。

[0128] 结果显示,单抗mAb 3C1的效价为1:13107200。单抗mAb 3C1具有很高的效价,表示利用其制备诊断试剂能产生高的灵敏性。

[0129] 3、单抗特异性的鉴定

[0130] 采用间接ELISA方法鉴定单抗的特异性。将0.5 μ g/mL的商品化rBoTNF- α (美国R&D公司,2279-BT-025)、rBoIL-2 (Kingfisher-Biotech公司,rp0026B-005)、rBoIFN- γ (美国R&D公司,2300-BG-02)、rPoTNF- α (美国R&D公司,690-PT-025)、rMoTNF- α (美国R&D公司,485-MI-100)、ShTNF- α (英国Abcam公司,ab184579)和rhuTNF- α (PeproTech,300-01A-50)蛋白包被过夜;次日,PBST洗涤3遍,每遍5min,尽量将液体拍干,2%牛血清白蛋白BSA的磷酸缓冲盐溶液PBS封闭2h;PBST洗涤3遍,每遍5min,尽量将液体拍干,加入杂交瘤细胞3C1的培养上清,100 μ L/孔,37℃孵育2h;PBST洗涤6遍,每遍5min,将洗涤液尽量拍干,加入用1%BSA的PBS稀释至工作浓度的HRP-羊抗鼠IgG,100 μ L/孔,37℃孵育1h;PBST洗涤6次,每次5min,将洗涤液尽量拍干,加入TMB显色液,100 μ L/孔,37℃避光孵育5min;加入2mol/L H₂SO₄终止反应,50 μ L/孔,测定OD₄₅₀值。

[0131] 在间接ELISA试验中,单抗MAb 3C1只与商品化rBoTNF- α 及ShTNF- α 有反应,而不与上述其它原核表达的重组细胞因子反应,具体结果如表1所示,说明本发明杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆抗体与rBoTNF- α 和ShTNF- α 蛋白具有良好的反应性、特异性和亲和力。

[0132] 表1单抗特异性的鉴定结果

[0133]	mAbs	rBoTNF- α	rBoIL-2	rBoIFN- γ	rPoTNF- α	rMoTNF- α	ShTNF- α	rhuTNF- α
	杂交瘤细胞株培养上清(效价)	+	-	-	-	-	+	-
		(1:102400)					(1:51200)	

[0134] 实施例4:Western-Blot试剂盒的组装

[0135] Western-blot试剂盒的组装步骤如下:

[0136] 1、制备辣根过氧化物酶标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆抗体(命名为HRP-3C1):

[0137] 称取辣根过氧化物酶(HRP) 2mg于5mL离心管,以0.5mL去离子水溶解,此时溶液显红棕色立即避光保存;加入0.5mL新鲜配置的0.06mol/L高碘酸钠,此时溶液变青色,4℃避

光作用30min;加入160mmol/L乙二醇0.5mL室温作用30min;加入纯化单克隆抗体MAb 3C1 2mg混匀,将混合液装入透析袋在2L 0.05mol/L碳酸盐缓冲液中透析,4℃过夜;将透析液转入离心管中,加入0.2mL新鲜配置的5mg/mL硼氢化钠混匀,于4℃作用2h;加入等体积饱和硫酸铵4℃作用30min,以4000rpm/min离心20min弃上清,用PBS溶解沉淀4℃透析过夜,加等体积甘油,加入0.1%ProClin300,0.45μm滤膜过滤,按110μL/支分装,2-8℃保存。

[0138] 2、将辣根过氧化物酶标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF-α单克隆抗体MAb 3C1 (HRP-3C1) 以及PMA、离子霉素刺激剂,包装组装成试剂盒。

[0139] 进一步的,试剂盒中依次需要组装入:封闭液(含5%脱脂奶粉的TBST)、洗涤液(TBST)、底物液(DAB显色液)的一种或多种。

[0140] 实施例5:重组牛、羊TNF-α蛋白的Western-Blot检测

[0141] 1、ShTNF-α蛋白的表达及纯化:

[0142] 根据GenBank中ShTNF-αcDNA序列(NM_001024860)设计引物,表达重组载体pET-30a(+)-ShTNF-α的引物序列P5:5'-GCTGATATCGGATCCGAATTCGGGACACCAGGGGACCAG-3' (划线部分为EcoR I的酶切位点)P6:5'-GTGGTGGTGGTGGTGCCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTCTTTTCTCAGG-3' (划线部分为Xho I的酶切位点)。表达重组载体pGEX-6p-1-ShTNF-α的引物序列P7:5'-CCCCTGGGATCCCCGGAATTCGGGACACCAGGGGACCAG-3' (划线部分为EcoR I的酶切位点),P8:5'-GTCACGATGCGGCCGCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTCTTTTCTCAGG (划线部分为Xho I的酶切位点)。

[0143] 按照RNeasy plus Mini试剂盒说明书提取牛外周血淋巴细胞总RNA,并进行反转录。对ShTNF-α基因的扩增并对pET-30a(+)和pGEX-6p-1(+)载体进行双酶切。将回收纯化的载体与目的基因以1:3的摩尔质量比进行混匀,加入一步法连接酶37℃作用30min,将目的基因与载体进行连接,热转入BL21(DE3)。重组菌分别命名为BL21(DE3)(pET-30a(+)-ShTNF-α)和BL21(pGEX-6p-1-ShTNF-α)。之后对重组菌BL21(DE3)(pET-30a(+)-ShTNF-α)和BL21(pGEX-6p-1-ShTNF-α)进行诱导表达及纯化,获得纯化的rHis-ShTNF-α和rGST-ShTNF-α重组蛋白。

[0144] 2、SDS-PAGE电泳

[0145] 将重组蛋白rHis-BoTNF-α、rGST-BoTNF-α、rHis-ShTNF-α及rGST-ShTNF-α分别加入蛋白上样buffer,100℃煮沸10min,进行SDS-PAGE电泳。

[0146] 3、转印

[0147] 电泳结束后,将凝胶置于转印Buffer中浸泡5min,同时将NC膜和滤纸同样浸泡,按照从上到下为2张滤纸-NC膜-凝胶-2张滤纸的顺序,铺好后转至半干转印仪中,注意排去气泡。通过Pyxis™ Gel Processor快速转印仪将蛋白转印至NC膜上。

[0148] 4、检测

[0149] ①用含5%脱脂奶的PBS封闭,室温摇晃封闭过夜;

[0150] ②用PBST清洗膜,洗涤4次,每次10min,将膜上的残留洗涤液尽量甩干;

[0151] ③加入用PBS 1:1000稀释的HRP-3C1(实施例4制备获得),室温震荡作用2h;

[0152] ④用PBST清洗膜,洗涤4次,每次10min,将膜上的残留洗涤液尽量甩干;显色后扫描仪拍照反应结果。

[0153] 结果见图1,A显示mAb 3C1与rHis-BoTNF-α及rGST-BoTNF-α反应的Western-Blot结果图,B显示mAb 3C1与rHis-ShTNF-α及rGST-ShTNF-α反应的Western-Blot结果图。结果

显示Western-Blot方法可以有效检测大肠杆菌表达系统表达的BoTNF- α 和ShTNF- α 蛋白,具有较好的灵敏度。

[0154] 实施例6:牛、羊外周血单个核细胞样品的Western-Blot检测

[0155] 1、制备牛、羊外周血单核细胞

[0156] ①无菌各采取5mL待测牛、羊血加入含肝素钠的采血管中,在采集血液后颠倒混匀得到抗凝血;

[0157] ②将抗凝血与灭菌PBS 1:1稀释后,再按1:1的比例将稀释牛、羊血缓缓加入含淋巴细胞分离液的无菌离心管中,形成明显界面,在室温下2000rpm离心20-30min;

[0158] ③可见外周血单核细胞存在于云雾状层中,用灭菌滴管吸取外周血单核细胞层至一干净的离心管中,加入灭菌PBS,将细胞混匀后,于4℃2000rpm离心10min,重复两次,得到沉淀细胞;

[0159] ④弃去上清培养液,加入完全1640培养基重悬沉淀细胞,取10 μ L细胞悬液加入10 μ L酚蓝混匀后加入血球计数板,在显微镜下计数,并使用完全1640培养基将细胞悬液稀释至 1×10^7 个细胞/mL。

[0160] 2、细胞孵育

[0161] 在24孔细胞培养板中加入下列试剂:每孔加入500 μ L稀释的细胞悬液,加入浓度为500ng/mL的PMA及终浓度为1 μ g/mL的离子霉素进行刺激,置于37℃,5%CO₂培养箱培养24-48小时,收集细胞作为检测样品;

[0162] 3、SDS-PAGE电泳

[0163] 将细胞裂解液加入蛋白上样缓冲液,100℃煮沸10min,进行SDS-PAGE电泳。

[0164] 4、转印

[0165] 电泳结束后,将凝胶置于转印Buffer中浸泡5min,同时将NC膜和滤纸同样浸泡,按照从上到下为2张滤纸-NC膜-凝胶-2张滤纸的顺序,铺好后转至半干转印仪中,注意排去气泡。通过Pyxis™ Gel Processor快速转印仪将蛋白转印至NC膜上。

[0166] 5、检测

[0167] ①用含5%脱脂奶的PBS封闭,室温摇晃封闭过夜;

[0168] ②用PBST清洗膜,洗涤4次,每次10min,将膜上的残留洗涤液尽量甩干;

[0169] ③加入用PBS 1:1000稀释的HRP-3C1(实施例4制备获得),室温震荡作用2h;

[0170] ④用PBST清洗膜,洗涤4次,每次10min,将膜上的残留洗涤液尽量甩干;显色后扫描仪拍照反应结果。

[0171] 结果显示Western-Blot检测试剂盒可以有效检测牛、羊外周血单核细胞分泌的天然牛、羊TNF- α 蛋白。

[0172] 实施例7:直接免疫荧光(DFA)检测试剂盒的组装

[0173] DFA试剂盒的组装步骤如下:

[0174] 1、制备异硫氰酸荧光素标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆抗体(命名为FITC-3C1):

[0175] 将纯化MAb 3C1单抗采用标准异硫氰酸荧光素标记法进行标记。将待交联单抗MAb3C1(浓度 ≥ 1 mg/ml)对交联反应液4℃透析三次,至pH为9.0;将新鲜配制的FITC(浓度为1mg/mL)溶于DMSO中;按P:F(蛋白质:FITC)=1mg:150 μ g的比例将FITC缓慢加入于抗体溶液

中,边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,避光4℃反应8h;加入5mol/L的 NH_4Cl 至终浓度50mmol/L,4℃终止反应2h;将交联物在PBS中透析四次以上,至透析液清亮;进行交联物蛋白浓度、F/P比例的鉴定;FITC交联的蛋白应置于pH7.4的磷酸盐缓冲液中,加入0.1% NaN_3 、1%BSA,4℃避光保存。

[0176] 2、将异硫氰酸荧光素标记具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆抗体(FITC-3C1)、刺激剂PMA及离子霉素,分别包装组装成试剂盒。

[0177] 进一步的,试剂盒中依据需要组装入:固定剂(多聚甲醛)以及洗涤液中的一种或多种。

[0178] 实施例8:牛、羊TNF- α 的直接免疫荧光(DFA)检测

[0179] 1、重组质粒pCMV-Myc-BoTNF- α 、pCMVP-Myc-ShTNF- α 的构建

[0180] 将pCMV-Myc载体进行双酶切并回收纯化的载体,将载体与目的基因(BoTNF- α 和ShTNF- α)以1:3的摩尔质量比进行混匀,加入一步法连接酶37℃作用30min,将目的基因与载体进行连接。重组质粒分别命名为pCMV-Myc-BoTNF- α 、pCMVP-Myc-ShTNF- α 。

[0181] 2、转染

[0182] ①转染前24h,消化接种HeLa细胞于24孔板中, 2×10^5 个细胞/孔;

[0183] ②加入Lipofectamine® 1.5μL至含Opti-MEM的1.5mL指形管中至总体积50μL;

[0184] ③分别加入重组质粒pCMV-Myc-BoTNF- α 、pCMVP-Myc-ShTNF- α 和空载体质粒pCMV-Myc各1μL,以及P3000™ 2μL至含Opti-MEM的1.5mL指形管中至总体积50μL;

[0185] ④分别加入含Lipofectamine® Opti-MEM 50μL,静置5min,分别加入细胞板中,置培养箱继续培养。

[0186] 3、真核表达的牛、羊TNF- α 蛋白的检测

[0187] ①吸去HeLa(pCMV-Myc-BoTNF- α)、HeLa(pCMV-Myc-ShTNF- α)、HeLa(pCMV-Myc)细胞的培养上清,使用500μL PBS洗两次,加入500μL-20℃预冷的冰甲醇于-20℃固定10min;

[0188] ②用500μL PBS洗三次,加入1:1000稀释的MAb FITC-3C1(实施例7制备获得),置37℃水浴锅孵育2h;

[0189] ③用500μL PBS洗3次,使用荧光倒置显微镜进行观察。

[0190] 结果显示直接免疫荧光(DFA)方法可以有效检测真核表达系统中的牛、羊TNF- α 蛋白。

[0191] 实施例9:牛、羊外周血单核细胞样品的直接免疫荧光(DFA)检测

[0192] 1、制备牛、羊外周血单核细胞

[0193] ①无菌各采取5mL待测牛、羊血加入含肝素钠的采血管中,在采集血液后颠倒混匀得到抗凝血;

[0194] ②将抗凝血与灭菌PBS1:1稀释后,再按1:1的比例将稀释牛、羊血缓缓加入含淋巴细胞分离液的无菌离心管中,形成明显界面,在室温下2000rpm离心20-30min;

[0195] ③可见外周血单核细胞存在于云雾状层中,用灭菌滴管吸取外周血单核细胞层至一干净的离心管中,加入灭菌PBS,将细胞混匀后,于4℃2000rpm离心10min,重复两次,得到沉淀细胞;

[0196] ④弃去上清培养液,加入完全1640培养基重悬沉淀细胞,取10μL细胞悬液加入10μL酚蓝混匀后加入血球计数板,在显微镜下计数,并使用完全1640培养基将细胞悬液稀释至

1×10^7 个细胞/mL。

[0197] 2、细胞孵育

[0198] 在24孔细胞培养板中加入下列试剂:500 μ L培养液至每个对照孔,500 μ L含有500ng/mL PMA及1 μ g/mL离子霉素的培养液至每个阳性孔。每孔加入500 μ L稀释的细胞悬液,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱培养24-48小时,收集细胞;

[0199] 3、天然牛、羊TNF- α 的免疫荧光检测

[0200] ①吸去细胞的培养上清,使用500 μ L PBS洗两次,加入500 μ L -20 $^{\circ}$ C预冷的冰甲醇于-20 $^{\circ}$ C固定10min;

[0201] ②用500 μ L PBS洗三次,加入1:1000稀释的FITC-3C1(实施例7制备),置37 $^{\circ}$ C水浴锅孵育2h;

[0202] ③用500 μ L PBS洗3次,使用荧光倒置显微镜进行观察。

[0203] 结果如图2显示,在检测牛外周血单核细胞样品时,阳性样品孔有明显绿色荧光,而对照样品孔没有绿色荧光,具体结果如图2(A、B)所示。检测羊外周血单核细胞样品时,阳性样品孔有明显绿色荧光,而对照样品孔没有绿色荧光,如图2(C、D)所示,这表明该试剂盒可以有效检测出PMA联合离子霉素刺激牛、羊外周血中TNF- α 的细胞。

[0204] 实施例10:牛、羊TNF- α FCM检测试剂盒的组装

[0205] FCM检测试剂盒的组装步骤如下:

[0206] 1、制备异硫氰酸荧光素标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆(命名FITC-3C1):

[0207] 将纯化单抗mAb 3C1采用标准异硫氰酸荧光素标记法进行标记。将待交联单抗mAb 3C1(浓度>1mg/mL)对交联反应液4 $^{\circ}$ C透析三次,至pH为9.0;将新鲜配置的FITC(浓度为1mg/mL)溶于DMSO中;按P:F(蛋白质:FITC)=1mg:150 μ g的比例将FITC缓慢加入于抗体溶液中,边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀,避光4 $^{\circ}$ C反应8小时;加入5mol/L的NH₄Cl至终浓度50mmol/L,4 $^{\circ}$ C终止反应2h;将交联物在PBS中透析四次以上,至透析液清亮;进行交联物蛋白浓度、F/P比例的鉴定;FITC交联的蛋白应置于pH 7.4的磷酸盐缓冲液中,加入0.1%NaN₃、1%BSA,4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0208] 2、将异硫氰酸荧光素标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆抗体、PMA联合离子霉素刺激剂,分别包装组装成试剂盒。

[0209] 进一步的,试剂盒中依次需要组装入:阻断剂(Brefeldin A Solution)、固定剂(多聚甲醛)、破膜剂(Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer)以及洗涤液(1%BSA的PBS)。

[0210] 实施例11:牛、羊外周血单核细胞样品的FCM检测

[0211] 1、制备牛、羊外周血单核细胞

[0212] ①无菌采取5mL待测牛或羊外周血加入含肝素钠的采血管中,在采集血液后颠倒混匀得到抗凝血;

[0213] ②将抗凝血与灭菌PBS 1:1稀释后,再按1:1的比例将稀释牛、羊血缓缓加入含淋巴细胞分离液的无菌离心管中,形成明显界面,在室温下2000rpm离心20-30min;

[0214] ③可见外周血单核细胞存在于云雾状层中,用灭菌滴管吸取外周血单核细胞层至一干净的离心管中,加入灭菌PBS,将细胞混匀后,于4 $^{\circ}$ C2000rpm离心10min,重复两次,得到

沉淀细胞；

[0215] ④弃去上清培养液，加入完全1640培养基重悬沉淀细胞，取10 μ L细胞悬液加入10 μ L酚蓝混匀后加入血球计数板，在显微镜下计数，并使用完全1640培养基将细胞悬液稀释至 1×10^7 个细胞/mL。

[0216] 2、细胞孵育

[0217] ①在24孔细胞培养板中加入下列试剂：500 μ L培养液至每个对照孔，500 μ L含有500ng/mL PMA及1 μ g/mL离子霉素的培养液至每个阳性孔。每孔加入500 μ L的细胞悬液置于37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱培养4-6小时；

[0218] ②加入细胞因子分泌阻断剂BFA，在放入37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱培养16小时。

[0219] 3、细胞因子检测：

[0220] ①次日收集培养细胞，使用含1%BSA的PBS洗涤细胞，于4 $^{\circ}$ C 2000rpm离心10min，弃上清；

[0221] ②加固定剂，室温静置作用15min；用含1%BSA的PBS洗涤细胞；于4 $^{\circ}$ C 2000rpm离心10min，弃上清，重复两次；

[0222] ③使用破膜剂稀释FITC标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单抗FITC-3C1（实施例10制备）至0.5 μ g/mL，室温静置作用15min，使用含1%BSA的PBS洗涤细胞；于4 $^{\circ}$ C 2000rpm离心10min，弃上清，重复两次；

[0223] ④使用200 μ L PBS重悬细胞，进行FACS检测分泌牛、羊TNF- α 的细胞比例。

[0224] 结果见图3，结果显示在检测牛、羊外周血单核细胞样品时，阳性样品孔B中分泌牛TNF- α 细胞比例（18.4%）高于对照样品孔（0.051%），阳性样品孔D中分泌羊TNF- α 细胞比例（13.4%）高于对照样品孔（0.027%）这表明该试剂盒有效检测出PMA联合离子霉素刺激牛、羊外周血中分泌牛、羊TNF- α 的细胞。

[0225] 实施例12：牛（羊）结核病FCM检测试剂盒的组装

[0226] 制备异硫氰酸荧光素标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆（命名FITC-3C1）：

[0227] 将纯化单抗mAb 3C1采用标准异硫氰酸荧光素标记法进行标记。将待交联单抗mAb 3C1（浓度>1mg/mL）对交联反应液4 $^{\circ}$ C透析三次，至pH为9.0；将新鲜配置的FITC（浓度为1mg/mL）溶于DMSO中；按P:F（蛋白质：FITC）=1mg：150 μ g的比例将FITC缓慢加入于抗体溶液中，边加边轻轻晃动使其与抗体混合均匀，避光4 $^{\circ}$ C反应8小时；加入5mol/L的NH₄Cl至终浓度50mmol/L，4 $^{\circ}$ C终止反应2h；将交联物在PBS中透析四次以上，至透析液清亮；进行交联物蛋白浓度、F/P比例的鉴定；FITC交联的蛋白应置于pH 7.4的磷酸盐缓冲液中，加入0.1% NaN₃、1%BSA，4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0228] 将染色板、异硫氰酸荧光素标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF- α 单克隆3C1、特异性刺激剂CFP-10和ESAT-6的融合蛋白、阴性对照（完全1640培养基）和阳性对照（PMA和离子霉素）分别包装组装成试剂盒。

[0229] 进一步地，试剂盒中依据需要组装入：固定剂（多聚甲醛）、破膜剂（Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer）、洗涤剂（1%BSA的PBS）、细胞培养液（完全1640）、染色板、流式管。

[0230] 实施例13：牛（羊）结核病FCM检测试剂盒检测牛、羊外周血单个核细胞样品

[0231] 1、制备牛、羊外周血单个核细胞

[0232] ①无菌各采取5mL结核阳性牛、结核阴性牛、结核阳性羊、结核阴性羊外周血加入含肝素钠的采血管中,在采集血液后颠倒混匀得到抗凝血;

[0233] ②将抗凝血与灭菌PBS 1:1稀释后,再按1:1的比例将稀释牛血缓缓加入含牛淋巴细胞分离液的无菌离心管中,形成明显界面,在室温下2000rpm离心20-30min;

[0234] ③可见外周血单核细胞存在于云雾状层中,用灭菌滴管吸取外周血单核细胞层至一干净的离心管中,加入灭菌PBS,将细胞混匀后,于4℃2000rpm离心10min,重复两次,得到沉淀细胞;

[0235] ④弃去上清培养液,加入完全1640培养基重悬沉淀细胞,取10μL细胞悬液加入10μL酚蓝混匀后加入血球计数板,在显微镜下计数,并使用完全1640培养基将细胞悬液稀释至 1×10^7 个细胞/mL。

[0236] 2、细胞孵育

[0237] ①在24孔细胞培养板中加入下列试剂:500μL培养液至每个对照孔,500μL含有10μg/mL的CFP-10和ESAT-6融合蛋白的培养液至每个阳性孔。置于37℃,5%CO₂培养箱培养4-6小时;

[0238] ②加入细胞因子分泌阻断剂BFA,在放入37℃、5%CO₂培养箱培养16小时。

[0239] 3、细胞因子检测:

[0240] ①次日收集培养细胞,使用含1%BSA的PBS洗涤细胞,于4℃2000rpm离心10min,弃上清;

[0241] ②加固定剂,室温静置作用15min;用含1%BSA的PBS洗涤细胞;于4℃2000rpm离心10min,弃上清,重复两次;

[0242] ③使用破膜剂稀释FITC标记的具牛、羊交叉反应的抗TNF-α单克隆抗体MAb FITC-3C1(实施例12制备)至0.5μg/mL,室温静置作用15min,使用含1%BSA的PBS洗涤细胞;于4℃2000rpm离心10min,弃上清,重复两次;

[0243] ④使用200μL PBS重悬细胞,进行FACS检测分泌牛、羊TNF-α的细胞比例。

[0244] 结果如图4所述,由图4可知在检测牛外周血单核细胞样品时,经CFP-10和ESAT-6融合蛋白刺激后结核阳性牛分泌牛TNF-α细胞比例高于结核阴性牛分泌牛TNF-α细胞比例。经CFP-10和ESAT-6融合蛋白刺激后结核阳性羊分泌羊TNF-α细胞比例高于结核阴性羊分泌羊TNF-α细胞比。这表明该试剂盒能够有效区分结核阴阳性牛以及结核阴阳性羊,具有较好的灵敏度。

[0245] 综上所述,本发明有效克服了现有技术中的种种缺点而具高度产业利用价值。

[0246] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

[0247] 分类命名:杂交瘤细胞株3C1

[0248] 保藏单位全称及简称:中国典型培养物保藏中心(CCTCC)

[0249] 地址:中国武汉武汉大学

[0250] 保藏日期:2019年6月17日

[0251] 保藏编号:CCTCC NO:C2019129

[0001]	序列表
[0002]	<110> 扬州大学
[0003]	<120> 具牛、羊交叉反应的抗TNF-α单克隆抗体的制备及应用
[0004]	<160> 20
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0006]	<210> 1
[0007]	<211> 11
[0008]	<212> PRT
[0009]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0010]	<400> 1
[0011]	Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ile Tyr Leu Ala
[0012]	1 5 10
[0013]	<210> 2
[0014]	<211> 7
[0015]	<212> PRT
[0016]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0017]	<400> 2
[0018]	Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
[0019]	1 5
[0020]	<210> 3
[0021]	<211> 9
[0022]	<212> PRT
[0023]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0024]	<400> 3
[0025]	Gln His His Tyr Gly Thr Pro Trp Thr
[0026]	1 5
[0027]	<210> 4
[0028]	<211> 107
[0029]	<212> PRT
[0030]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0031]	<400> 4
[0032]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[0033]	1 5 10 15
[0034]	Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ile Tyr
[0035]	20 25 30
[0036]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
[0037]	35 40 45
[0038]	Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0039]	50	55	60
[0040]	Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Asn Ile Asn Ser Leu Gln Pro		
[0041]	65	70	75
[0042]	Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Trp		
[0043]	85	90	95
[0044]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0045]	100	105	
[0046]	<210> 5		
[0047]	<211> 127		
[0048]	<212> PRT		
[0049]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0050]	<400> 5		
[0051]	Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr		
[0052]	1	5	10
[0053]	Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser		
[0054]	20	25	30
[0055]	Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn		
[0056]	35	40	45
[0057]	Ile Tyr Ile Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro		
[0058]	50	55	60
[0059]	Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser		
[0060]	65	70	75
[0061]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Asn Ile Asn		
[0062]	85	90	95
[0063]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr		
[0064]	100	105	110
[0065]	Gly Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0066]	115	120	125
[0067]	<210> 6		
[0068]	<211> 5		
[0069]	<212> PRT		
[0070]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0071]	<400> 6		
[0072]	Asn Phe Ser Val His		
[0073]	1	5	
[0074]	<210> 7		
[0075]	<211> 16		
[0076]	<212> PRT		
[0077]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

[0078]	<400> 7
[0079]	Val Met Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser
[0080]	1 5 10 15
[0081]	<210> 8
[0082]	<211> 10
[0083]	<212> PRT
[0084]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0085]	<400> 8
[0086]	Ser Gly Pro Tyr Tyr Tyr Ser Leu Asp Tyr
[0087]	1 5 10
[0088]	<210> 9
[0089]	<211> 118
[0090]	<212> PRT
[0091]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0092]	<400> 9
[0093]	Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
[0094]	1 5 10 15
[0095]	Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Phe
[0096]	20 25 30
[0097]	Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
[0098]	35 40 45
[0099]	Gly Val Met Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
[0100]	50 55 60
[0101]	Ser Arg Leu Ser Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
[0102]	65 70 75 80
[0103]	Lys Met Asn Gly Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
[0104]	85 90 95
[0105]	Arg Ser Gly Pro Tyr Tyr Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
[0106]	100 105 110
[0107]	Ser Val Thr Val Ser Ser
[0108]	115
[0109]	<210> 10
[0110]	<211> 137
[0111]	<212> PRT
[0112]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0113]	<400> 10
[0114]	Met Ala Val Leu Val Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys
[0115]	1 5 10 15
[0116]	Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln

[0117]	20	25	30
[0118]	Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu		
[0119]	35	40	45
[0120]	Thr Asn Phe Ser Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu		
[0121]	50	55	60
[0122]	Glu Trp Leu Gly Val Met Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala		
[0123]	65	70	75
[0124]	Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln		
[0125]	85	90	95
[0126]	Val Phe Phe Lys Met Asn Gly Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr		
[0127]	100	105	110
[0128]	Tyr Cys Ala Arg Ser Gly Pro Tyr Tyr Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly		
[0129]	115	120	125
[0130]	Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		
[0131]	130	135	
[0132]	<210> 11		
[0133]	<211> 33		
[0134]	<212> DNA		
[0135]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0136]	<400> 11		
[0137]	cgagcaagtg agaataattta catttattta gca 33		
[0138]	<210> 12		
[0139]	<211> 21		
[0140]	<212> DNA		
[0141]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0142]	<400> 12		
[0143]	aatgcaaaaa ccttagcaga a 21		
[0144]	<210> 13		
[0145]	<211> 27		
[0146]	<212> DNA		
[0147]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0148]	<400> 13		
[0149]	caacatcatt atggtactcc gtggacg 27		
[0150]	<210> 14		
[0151]	<211> 321		
[0152]	<212> DNA		
[0153]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0154]	<400> 14		
[0155]	gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60		

[0156] atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac atttatttag catggtatca gcagaaacag 120
[0157] ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 180
[0158] aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga acatcaacag cctgcagcct 240
[0159] gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat cattatggta ctccgtggac gttcgggtgga 300
[0160] ggcaccaagc tggaaatcaa a 321
[0161] <210> 15
[0162] <211> 381
[0163] <212> DNA
[0164] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0165] <400> 15
[0166] atgagtgtgc ccactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacagg tgccagatgt 60
[0167] gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120
[0168] atcacatgtc gagcaagtga gaatatattac atttatttag catggtatca gcagaaacag 180
[0169] ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca 240
[0170] aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga acatcaacag cctgcagcct 300
[0171] gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat cattatggta ctccgtggac gttcgggtgga 360
[0172] ggcaccaagc tggaaatcaa a 381
[0173] <210> 16
[0174] <211> 15
[0175] <212> DNA
[0176] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0177] <400> 16
[0178] aacttttagtg ttcac 15
[0179] <210> 17
[0180] <211> 48
[0181] <212> DNA
[0182] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0183] <400> 17
[0184] gtgatgtgga gtggtggaag cacagactat aatgctgctt tcatatcc 48
[0185] <210> 18
[0186] <211> 30
[0187] <212> DNA
[0188] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0189] <400> 18
[0190] agcggtcctt attactattc tctggactac 30
[0191] <210> 19
[0192] <211> 354
[0193] <212> DNA
[0194] <213> 人工序列(Artificial Sequence)

[0195] <400> 19
[0196] caggtgcagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
[0197] acctgcacag tctctggttt ctcatctaact aacttttagtg ttcactgggt tcgccagcct 120
[0198] ccaggaaagg gtctggagtg gctgggagtg atgtggagtg gtggaagcac agactataat 180
[0199] gctgctttca tatccagact gagcatcatc aaggacaact ccaagagcca agttttcttt 240
[0200] aaaatgaacg gtctgcaagc tgatgacaca gccatatact actgtgccag aagcggtcct 300
[0201] tattactatt ctctggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354
[0202] <210> 20
[0203] <211> 411
[0204] <212> DNA
[0205] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0206] <400> 20
[0207] atggctgtcc tgggtgctgct cttctgcctg gtgacattcc caagctgtgt cctatcccag 60
[0208] gtgcagctga agcagtcagg acctggccta gtgcagccct cacagagcct gtccatcacc 120
[0209] tgcacagtct ctggtttctc attaactaac tttagtgttc actgggttcg ccagcctcca 180
[0210] ggaaagggtc tggagtggct gggagtgatg tggagtgggt gaagcacaga ctataatgct 240
[0211] gctttcatat ccagactgag catcatcaag gacaactcca agagccaagt tttctttaaa 300
[0212] atgaacggtc tgcaagctga tgacacagcc atatactact gtgccagaag cggtccttat 360
[0213] tactattctc tggactactg gggccaagga acctcagtca ccgtctcctc a 411

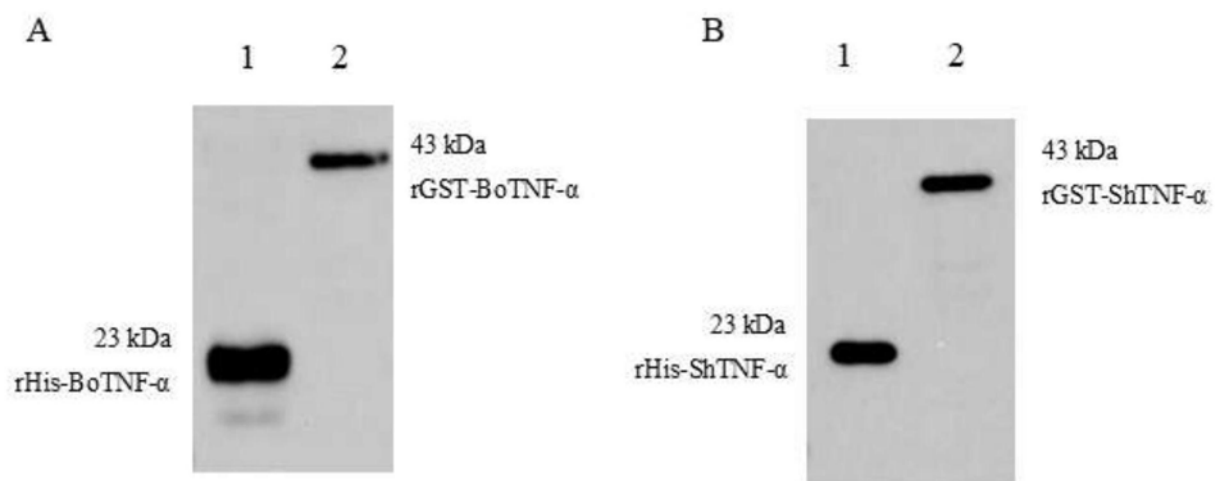


图1

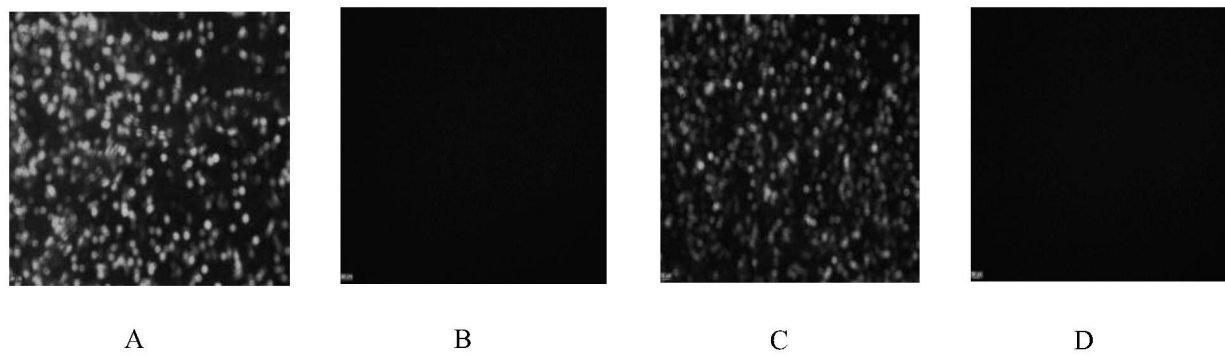


图2

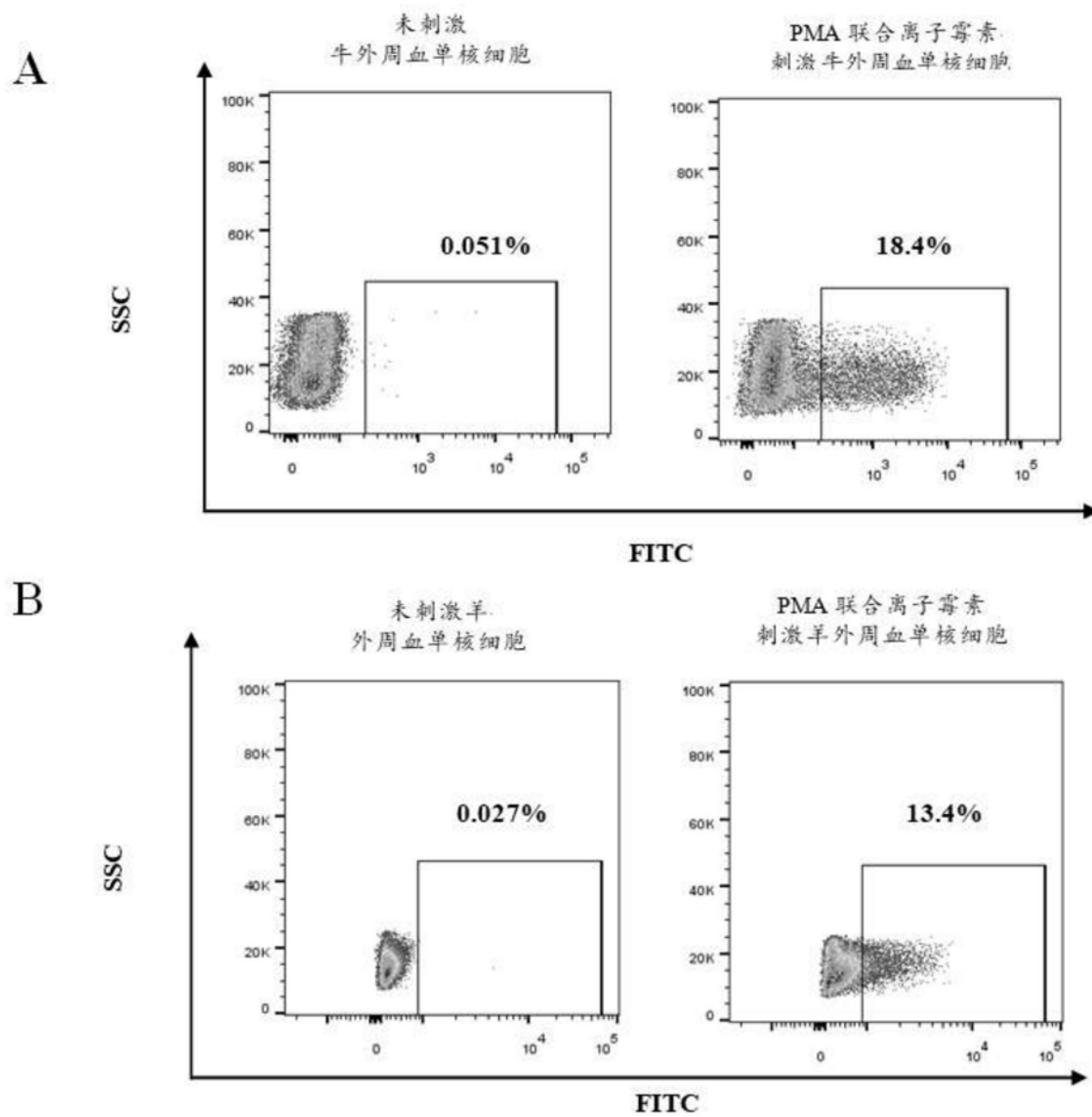


图3

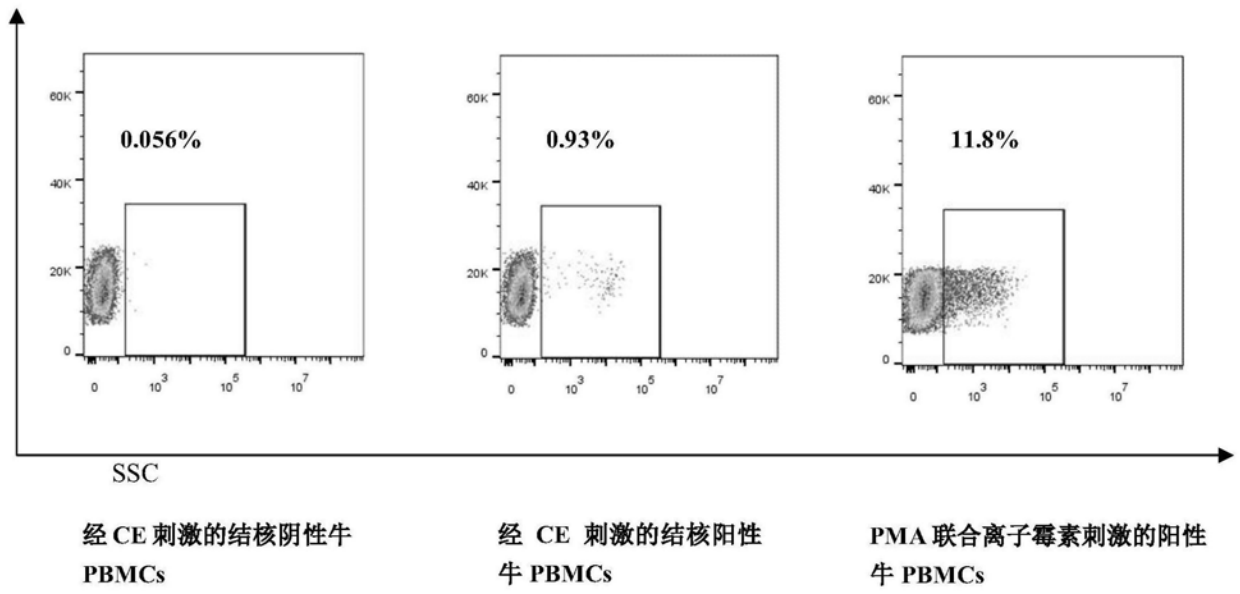


图4