



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107429286 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201680016878.1

(22)申请日 2016.03.31

(30)优先权数据

62/140,920 2015.03.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/025219 2016.03.31

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/161088 EN 2016.10.06

(71)申请人 基本解决方案公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 T·J·祖潘西克 曾令春

S·维达莫西 J·S·勒万德

J·D·基特尔 莫眠

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 侯宝光

(51)Int.Cl.

G12Q 1/04(2006.01)

G01N 33/554(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书5页 说明书24页

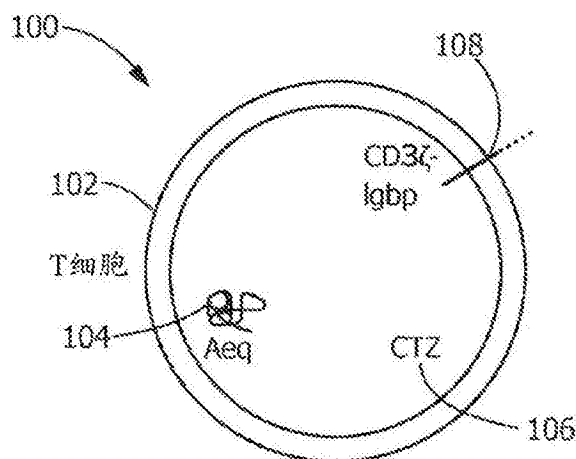
序列表63页 附图6页

(54)发明名称

用于快速检测分析物的生物传感器系统

(57)摘要

本发明总体上涉及用于检测生物样品中的各种分析物的系统、装置和方法。这个第一系统的示例性实施方案包括：活的工程化生物传感器细胞；报告蛋白，其被工程化到所述活的工程化生物传感器细胞中并由所述活的工程化生物传感器细胞产生并且发出可检测信号；信号转导途径，其被工程化到所述活的工程化生物传感器细胞中或自然存在于所述活的工程化生物传感器细胞内；至少一种类型的检测器分子，其中每种检测器分子适于结合到特异性分析物；至少一种分析物，其结合到对所述分析物有特异性的所述检测器分子；以及多个跨膜非抗体信号转导元件。



1. 一种用于快速检测分析物的系统,所述系统包括:

(a) 活的工程化生物传感器细胞,其中所述活的工程化生物传感器细胞来源于哺乳动物免疫系统的细胞组分;

(b) 报告蛋白,其中所述报告蛋白被工程化到所述活的工程化生物传感器细胞中并由所述活的工程化生物传感器细胞表达,并且其中所述报告蛋白响应于所述活的工程化生物传感器细胞中某些预定的细胞溶质变化而发出可检测信号;

(c) 信号转导途径,其被工程化到所述活的工程化生物传感器细胞中或天然存在于所述活的工程化生物传感器细胞内,其中所述信号转导途径控制所述活的工程化生物传感器细胞的所述细胞溶质内的生物过程,并且其中当发生所述生物过程时,其使得所述报告蛋白发出可检测信号;

(d) 至少一种类型的检测器分子,其中每种检测器分子适于结合到特异性分析物;

(e) 至少一种分析物,其中所述至少一种分析物结合到对所述分析物特异的所述检测器分子;

(f) 多个跨膜非抗体信号转导元件,其由所述活的工程化生物传感器细胞表达,其中每个信号转导元件适于接收检测器分子;并且

(g) 其中在足够数量的分析物结合到足够数量的检测器分子(其本身结合到跨膜非抗体信号转导元件)后,在所述生物传感器细胞表面上发生信号转导元件的聚集,所述信号转导途径被激活,发生所述生物过程,并且由所述报告蛋白发出所述可检测信号。

2. 如权利要求1所述的系统,其中所述活的工程化细胞来源于B细胞或T细胞,所述报告蛋白是水母发光蛋白,所述信号转导途径涉及细胞内钙的增加,所述检测器分子是结合到食源性病原体的抗体,所述分析物是食源性病原体,并且所述多个信号转导元件适于通过结合到细菌IgG结合蛋白的一部分来接收抗体。

3. 如权利要求1所述的系统,其中所述生物传感器细胞来源于B细胞或T细胞。

4. 如权利要求1所述的系统,其中所述报告蛋白是水母发光蛋白,并且所述可检测信号是蓝光的闪光。

5. 如权利要求1所述的系统,其中由所述信号转导途径控制的所述生物过程还包括细胞内钙的增加。

6. 如权利要求1所述的系统,其中所述非抗体信号转导元件是由所述生物传感器细胞表达的嵌合融合蛋白,并且其中所述融合蛋白还包括:

(a) 蛋白质的至少一种组分,其适于结合到所述至少一种类型的检测器分子;以及

(b) 受体复合体的至少一种组分,其正常在一种类型的免疫细胞的表面上表达,所述生物传感器细胞来源于所述类型的免疫细胞。

7. 如权利要求6所述的系统,其中适于结合到所述至少一种类型的检测器分子的所述蛋白质的所述至少一种组分来源于细菌抗体结合蛋白。

8. 如权利要求6所述的系统,其中适于结合到所述至少一种类型的检测器分子的所述蛋白质的所述至少一种组分是来源于FcR受体蛋白或其他受体蛋白的抗体结合结构域。

9. 如权利要求6所述的系统,其中正常在所述免疫细胞的表面上表达的所述受体复合体的所述至少一种组分是IgM、Igα/β、IgE、CD19、CD3ζ或其组合。

10. 如权利要求1所述的系统,其中所述非抗体信号转导元件由DNA序列编码,所述DNA

序列与选自SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11和17组成的组的DNA序列具有至少95%同一性。

11. 如权利要求1所述的系统,其中所述非抗体信号转导元件是嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白具有选自SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12和18组成的组的氨基酸序列。

12. 如权利要求1所述的系统,其中所述至少一种检测器分子是可溶性抗体。

13. 如权利要求1所述的系统,其中所述至少一种检测器分子是可溶性IgG。

14. 如权利要求1所述的系统,其中所述分析物是食源性致病因子。

15. 如权利要求1所述的系统,其中所述分析物是细菌或病毒。

16. 一种用于检测分析物的方法,所述方法包括使含有所述分析物的样品与如权利要求1所述的系统接触,以及在所述报告蛋白发出信号时检测所述分析物。

17. 一种用于制备如权利要求1所述的系统的方法,所述方法包括用编码所述系统的元件(b)、(c)和(f)的一种或多种多核苷酸转染或转化免疫细胞。

18. 一种用于快速检测分析物的系统,所述系统包括:

(a) 活的工程化生物传感器细胞,其中所述活的工程化生物传感器细胞来源于哺乳动物免疫系统的细胞组分,并且其中所述活的工程化生物传感器细胞在其表面上表达多个至少一种预定类型的受体分子;

(b) 报告蛋白,其中所述报告蛋白被工程化到所述活的工程化生物传感器细胞中并由所述活的工程化生物传感器细胞表达,并且其中所述报告蛋白响应于所述活的工程化生物传感器细胞中某些预定的细胞溶质变化而发出可检测信号;

(c) 信号转导途径,其被工程化到所述活的工程化生物传感器细胞中或天然存在于所述活的工程化生物传感器细胞内,其中所述信号转导途径控制所述活的工程化生物传感器细胞的所述细胞溶质内的生物过程,并且其中当发生所述生物过程时,其使得所述报告蛋白发出可检测信号;

(d) 至少一种类型的检测器分子,其中每种检测器分子适于结合到特异性分析物;

(e) 至少一种分析物,其中所述至少一种分析物结合到对所述分析物特异的所述检测器分子;

(f) 多个可溶性非抗体信号转导元件,其中每个可溶性信号转导元件适于结合到所述活的工程化生物传感器细胞的表面上的受体分子以及结合到检测器分子;并且

(g) 其中在足够数量的分析物结合到足够数量的检测器分子、足够数量的非抗体信号转导元件(其本身结合到所述细胞表面受体分子)后,发生所述受体分子的聚集,所述信号转导途径被激活,发生所述生物过程,并且由所述报告蛋白发出所述可检测信号。

19. 如权利要求15所述的系统,其中所述生物传感器细胞来源于肥大细胞。

20. 如权利要求18所述的系统,其中在所述生物传感器细胞的表面上表达的所述至少一种预定类型的受体分子是FcεRI。

21. 如权利要求18所述的系统,其中所述报告蛋白是水母发光蛋白,并且所述可检测信号是蓝光的闪光。

22. 如权利要求18所述的系统,其中由所述信号转导途径控制的所述生物过程还包括细胞内钙的增加。

23. 如权利要求18所述的系统,其中每个非抗体信号转导元件是可溶性嵌合融合蛋白,所述可溶性嵌合融合蛋白包含融合到具有GSASGSG(SEQ ID NO:19)接头的IgE恒定结构域

的细菌IgG结合结构域。

24. 如权利要求18所述的系统,其中每个非抗体信号转导元件是可溶性嵌合融合蛋白,所述可溶性嵌合融合蛋白包含融合到具有GSASGSG (SEQ ID NO:19)接头的IgE恒定结构域的Fc γ RI抗体结合结构域。

25. 如权利要求18所述的系统,其中所述非抗体信号转导元件由DNA序列编码,所述DNA序列与选自SEQ ID NO:13和15组成的组的DNA序列具有至少95%同一性。

26. 如权利要求18所述的系统,其中所述非抗体信号转导元件是嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白具有选自SEQ ID NO:14和16组成的组的氨基酸序列。

27. 如权利要求18所述的系统,其中所述至少一种检测器分子是可溶性抗体。

28. 如权利要求18所述的系统,其中所述至少一种检测器分子是可溶性IgG。

29. 如权利要求18所述的系统,其中所述分析物是食源性致病因子。

30. 如权利要求18所述的系统,其中所述分析物是细菌或病毒。

31. 一种用于检测分析物的方法,所述方法包括使含有所述分析物的样品与如权利要求18所述的系统接触,以及在所述报告蛋白发出信号时检测所述分析物。

32. 一种用于制备如权利要求18所述的系统的方法,所述方法包括用编码所述系统的元件(b)、(c)和(f)的一种或多种多核苷酸转染或转化免疫细胞。

33. 一种用于快速检测分析物的生物传感器,所述生物传感器包括:

(a) 活的工程化细胞,其中所述活的工程化细胞来源于免疫细胞;

(b) 报告蛋白,其中所述报告蛋白被工程化到所述免疫细胞中并由所述免疫细胞表达,并且其中所述报告蛋白响应于所述免疫细胞中某些预定的细胞溶质变化而发出可检测信号;

(c) 信号转导途径,其被工程化到所述免疫细胞中或天然存在于所述免疫细胞内,其中所述信号转导途径控制所述免疫细胞的所述细胞溶质内的生物过程,并且其中当发生所述生物过程时,其使得所述报告蛋白发出可检测信号;以及

(d) 多个非抗体信号转导元件,其直接结合到待分析样品中的分析物,或者通过所述分析物和至少一种抗体或其他检测器分子的复合体间接地结合到待分析样品中的分析物,其中所述结合的非抗体信号转导元件然后与所述生物传感器细胞配合以直接或间接地激活所述信号转导途径。

34. 如权利要求33所述的生物传感器,其还包括在所述工程化细胞的表面上表达的多个至少一种预定类型的受体分子,其中所述至少一种预定类型的受体分子与所述信号转导途径相互作用,并且其中所述至少一种预定类型的受体分子结合到所述非抗体信号转导元件。

35. 如权利要求34所述的生物传感器,其中在所述工程化细胞的表面上表达的所述至少一种预定类型的受体分子是Fc ϵ RI。

36. 如权利要求33所述的生物传感器,其还包括适于与所述非抗体信号转导元件配合的至少一种外源性抗体或其他检测器分子,其中所述至少一种外源性抗体或其他检测器分子也适于结合到特异性分析物。

37. 如权利要求36所述的生物传感器,其中所述至少一种外源性抗体是可溶性IgG。

38. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述免疫细胞是B细胞、T细胞或肥大细胞。

39. 如权利要求33所述的生物传感器,其中非抗体信号转导元件作为跨膜嵌合融合蛋白由所述工程化细胞表达。

40. 如权利要求33所述的生物传感器,其中非抗体信号转导元件由所述工程化细胞产生,然后作为可溶性融合蛋白从所述工程化细胞排出。

41. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述报告蛋白是水母发光蛋白,并且所述可检测信号是蓝光的闪光。

42. 如权利要求33所述的生物传感器,其中由所述信号转导途径控制的所述生物过程还包括细胞内钙的增加。

43. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述非抗体信号转导元件是嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包括:

(a) 蛋白质的至少一种组分,其适于结合到至少一种类型的检测器分子;以及

(b) 受体复合体的至少一种组分,其正常在一种类型的免疫细胞的表面上表达,所述活的工程化细胞来源于所述类型的免疫细胞。

44. 如权利要求43所述的生物传感器,其中适于结合到所述至少一种类型的检测器分子的所述蛋白质的所述至少一种组分来源于细菌抗体结合蛋白。

45. 如权利要求43所述的生物传感器,其中适于结合到所述至少一种类型的检测器分子的所述蛋白质的所述至少一种组分是来源于FcR受体蛋白或其他受体蛋白的抗体结合结构域。

46. 如权利要求43所述的生物传感器,其中正常在所述活的工程化细胞的表面上表达的所述受体复合体的所述至少一种组分是IgM、Ig α / β 、IgE、CD19、CD3 ζ 或其组合。

47. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述非抗体信号转导元件由DNA序列编码,所述DNA序列与选自由SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11和17组成的组的DNA序列具有至少95%同一性。

48. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述非抗体信号转导元件是嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白具有选自由SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12和18组成的组的氨基酸序列。

49. 如权利要求33所述的生物传感器,其中每个非抗体信号转导元件是可溶性嵌合融合蛋白,所述可溶性嵌合融合蛋白包含融合到具有GSASGSG (SEQ ID NO:19) 接头的IgE恒定结构域的细菌IgG结合结构域。

50. 如权利要求33所述的生物传感器,其中每个非抗体信号转导元件是可溶性嵌合融合蛋白,所述可溶性嵌合融合蛋白包含融合到具有GSASGSG (SEQ ID NO:19) 接头的IgE恒定结构域的Fc γ RI抗体结合结构域。

51. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述非抗体信号转导元件由DNA序列编码,所述DNA序列与选自由SEQ ID NO:13和15组成的组的DNA序列具有至少95%同一性。

52. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述非抗体信号转导元件是嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白具有选自由SEQ ID NO:14和16组成的组的氨基酸序列。

53. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述分析物是食源性致病因子。

54. 如权利要求33所述的生物传感器,其中所述分析物是细菌或病毒。

55. 一种嵌合融合蛋白,其具有选自由SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12和18组成的组的氨基酸序列。

56. 一种嵌合融合蛋白, 其具有选自由SEQ ID NO:14和16组成的组的氨基酸序列。

用于快速检测分析物的生物传感器系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2015年3月31日提交并且题为“System for Rapid Detection of Analytes”的美国临时专利申请序列号62/140,920和于2015年10月23日提交并且题为“Systems and Devices for the Rapid Detection of Analytes”的美国临时专利申请序列号62/245,595的权益,所述临时专利申请的公开内容以引用的方式整体并入本文,并且出于所有目的而成为本美国实用专利申请的一部分。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明总体上涉及用于检测生物样品或其他样品类型中的各种分析物的系统、装置和方法,并且更具体地涉及一种基于生物传感器的系统,其基于当生物传感器与测试样品中感兴趣的分析物反应时发出可检测信号来用于实时检测和鉴定感兴趣的分析物。

[0005] 一般来说,生物传感器是将敏感生物组分与物理化学检测器部件组合的用于检测分析物的系统或装置。典型的生物传感器系统的部件包括生物元件、转换器或检测器元件以及以有意义和有用的方式显示测试结果的相关电子器件或信号处理器。生物元件通常包括可通过已知的生物工程方法产生的生物材料,诸如组织、微生物、细胞器、细胞受体、酶、抗体、核酸等。转换器或检测器元件以物理化学方式(例如,光学、压电和/或电化学)工作,所述物理化学方式将由分析物与生物元件相互作用产生的信号转化成可更容易测量和定量的另一种信号。生物传感器起源于分子生物学和信息技术(例如微电路、光纤等)的整合,以对生物分子-分析物相互作用(诸如抗体-抗原相互作用)进行定性或定量。考虑到对用于检测食品中的致病因子、病原体或/和毒素的快速、敏感、易于处理和成本有效的检测工具的需求很大(参见例如Mead等人,Food Related Illness and Death in the United States,Emerging Infectious Diseases;第5卷,第5期,1999年9月-10月(607-625),其以引用的方式整体并入本文),对在实时的现场便携式装置和仪器中使用生物传感器来检测和鉴定食品和许多其他物品中的致病因子、病原微生物、毒素以及其他污染物的需要持续增强。

[0006] 发明概述

[0007] 以下提供本发明的某些示例性实施方案的概述。本概述并不是广泛的综述,并且不意图确定本发明的重要或关键的方面或要素或者描绘其范围。

[0008] 根据本发明的一个方面,提供用于快速检测分析物的第一系统。这个第一系统的示例性实施方案包括:活的工程化生物传感器细胞,其来源于哺乳动物免疫系统的细胞组分;报告蛋白,其被工程化到活的工程化生物传感器细胞中并由活的工程化生物传感器细胞产生,并且响应于活的工程化生物传感器细胞的细胞溶质中的某些预定变化而发出可检测信号;信号转导途径,其被工程化到活的工程化生物传感器细胞中或天然存在于活的工程化生物传感器细胞内,所述信号转导途径控制活的工程化生物传感器细胞的细胞溶质内的生物过程,其中当发生生物过程时,其使得报告蛋白发出可检测信号;至少一种类型的检测器分子,其中每种检测器分子适于结合到特异性分析物;至少一种分析物,其结合到检测器分子并且所述检测器分子对所述分析物特异;多个跨膜非抗体信号转导元件,其由活的

工程化生物传感器细胞表达,其中每个信号转导元件适于接收检测器分子;并且其中在足够数量的分析物结合到足够数量的检测器分子(其本身结合到跨膜非抗体信号转导元件)后,在生物传感器细胞表面上发生信号转导元件的聚集,信号转导途径被激活,发生生物过程,并且由报告蛋白发出可检测信号。

[0009] 根据本发明的另一个方面,提供用于快速检测分析物的第二系统。这个第二系统的示例性实施方案包括:活的工程化生物传感器细胞,其中活的工程化生物传感器细胞来源于哺乳动物免疫系统的细胞组分,并且其中活的工程化生物传感器细胞在其表面上表达多个至少一种预定类型的受体分子;报告蛋白,其中报告蛋白被工程化到活的工程化生物传感器细胞中并由活的工程化生物传感器细胞表达,并且其中报告蛋白响应于活的工程化细胞的细胞溶质中的某些预定变化而发出可检测信号;信号转导途径,其被工程化到活的工程化生物传感器细胞中或天然存在于活的工程化生物传感器细胞内,其中信号转导途径控制活的工程化生物传感器细胞的细胞溶质内的生物过程,并且其中当发生生物过程时,其使得报告蛋白发出可检测信号;至少一种类型的检测器分子,其中每种检测器分子适于结合到特异性分析物;至少一种分析物,其中至少一种分析物结合到对所述分析物特异的检测器分子;多个可溶性非抗体信号转导元件,其中每个可溶性信号转导元件适于结合到受体分子和检测器分子;并且其中在足够数量的分析物结合到足够数量的检测器分子、足够数量的非抗体信号转导元件(其本身结合到细胞表面受体分子)后,发生受体分子的聚集,信号转导途径被激活,发生生物过程,并且由报告蛋白发出可检测信号。

[0010] 根据本发明的还另一方面,提供用于快速检测样品中的分析物的生物传感器。这个生物传感器包括:活的工程化细胞,其中活的工程化细胞来源于哺乳动物免疫系统的细胞组分(即,免疫细胞);报告蛋白,其中报告蛋白被工程化到活的工程化细胞中并由活的工程化细胞表达,并且其中报告蛋白响应于活的工程化细胞的细胞溶质中的某些预定变化而发出可检测信号;信号转导途径,其被工程化到活的工程化细胞中或天然存在于活的工程化细胞内,其中信号转导途径控制活的工程化生物传感器细胞的细胞溶质内的生物过程,并且其中当发生生物过程时,其使得报告蛋白发出可检测信号;以及多个非抗体信号转导元件,其直接或间接地结合到待分析样品中的分析物,其中结合的非抗体信号转导元件然后与生物传感器细胞配合以直接或间接地激活信号转导途径。

[0011] 本领域普通技术人员在阅读和理解示例性实施方案的以下详细描述后,本发明的另外特征和方面将变得显而易见。如将由技术人员了解的,在不脱离本发明的范围和精神的情况下,本发明的其他实施方案是可能的。因此,附图和相关描述本质上应被视为说明性而非限制性。

[0012] 附图简述

[0013] 并入本说明书中并形成其一部分的附图示意性地示出本发明的一个或多个示例性实施方案,并且连同上文所给出的总体描述和下文所给出的详细描述,用来解释本发明的原理,并且其中:

[0014] 图1a-b是根据本发明的示例性实施方案的第一生物传感器的图示,其中Jurkat T细胞已被工程化以产生水母发光蛋白并且表达跨膜非抗体信号转导元件IgGbp-CD3 ζ ;

[0015] 图2a-b是根据本发明的示例性实施方案的第二生物传感器的图示,其中MC/9肥大细胞已被工程化以产生水母发光蛋白,并且其中MC/9细胞表达天然受体Fc ϵ RI,其结合到可

溶性非抗体信号转导元件IgGbp-IgE;

[0016] 图3a-b是根据本发明的示例性实施方案的第三生物传感器的图示,其中MC/9肥大细胞已被工程化以产生水母发光蛋白,并且其中MC/9细胞表达天然受体FcεRI,其结合到已由MC/9肥大细胞排出的可溶性非抗体信号转导元件IgGbp-IgE;

[0017] 图4是根据本发明的示例性实施方案的第四生物传感器的图示,其中生物传感器细胞已被工程化以产生水母发光蛋白并且表达跨膜非抗体信号转导元件mSA-CD3ζ,其结合到生物素化检测器元件;并且

[0018] 图5是根据本发明的示例性实施方案的第五生物传感器的图示,其中生物传感器细胞已被工程化以产生水母发光蛋白并且表达跨膜非抗体信号转导元件mSA-CD3ζ,其结合到生物素化检测器元件。

[0019] 发明详述

[0020] 现参考附图对本发明的示例性实施方案进行描述。虽然出于说明目的,以下详细描述含有许多详情,但是本领域普通技术人员将了解,以下细节的许多变化和改变在本发明的范围内。因此,本发明的以下实施方案是在不丧失所要求保护的发明的任何一般性以及不对其强加限制的情况下阐述的。

[0021] 本发明总体上涉及用于检测生物样品或其他样品类型中的各种分析物的系统、装置和方法,并且更具体地涉及一种基于生物传感器的系统,其基于当生物传感器与测试样品中感兴趣的分析物反应时发出可检测信号来用于实时检测和鉴定感兴趣的分析物。本发明的工程化细胞是极其敏感和有效的生物传感器,并且因为这些生物传感器细胞具有固有的检测能力,所以它们提供多功能的系统,其可通过简单地选择对特定病原体或其他感兴趣的靶标具有特异性的替代可溶性检测器(例如,抗体)分子来容易地适于检测很多种不同的致病因子或其他靶标。此外,本发明的系统可被容易地配置用于在单一测定中多重检测若干致病因子或其他分析物,从而提供极大的灵活性和实用性。本发明的多功能性来源于元件的独特组合,并且具体地来源于通用生物传感器细胞与特异性可溶性检测器(例如,抗体)的组合。通用生物传感器细胞具有响应于可被检测器分子识别的基本上任何靶分子的存在的能力。因为在一些实施方案中,检测器或检测器抗体被添加到系统中作为可溶性因子,所以系统可被配置成通过简单地选择适当的替代检测器或检测器抗体来检测替代靶标。所公开的系统的特异性由检测器分子确定,所述检测器分子基于其对致病因子或其他靶分析物特有的靶分子的特异性和亲和力来选择。这种通用生物传感器细胞和可溶性检测器的组合还通过在测试系统内简单地包括多个检测器分子(例如,抗体)来实现多重测定的构建,其中靶分子基于其对替代致病因子或其他分析物的特异性而选择。

[0022] 与本发明一起使用的生物传感器细胞类型的遗传操纵和修饰通常涉及使用适当选择的基因递送媒介物,其含有在选定的细胞类型中高效地起作用的遗传元件。例如,采用引导所引入的转基因在选定的特异性生物传感器细胞中高水平表达的启动子元件是有用的。在本发明的示例性实施方案中,这样的启动子元件可直接来源于生物传感器细胞本身,然后用于表达感兴趣的转基因。在本发明的另一个实施方案中,通过比较替代基因递送媒介物环境中的替代启动子元件的功能,可凭经验确定适当的元件,以便鉴定对选定的细胞类型有效的启动子、转基因、载体组合。可使用标准技术(诸如电穿孔)或化学转染试剂(例如像脂质体转染试剂(lipofectamine))将转基因(诸如编码发光报告蛋白的基因)引入到

生物传感器细胞中。本领域普通技术人员已知的其他遗传工程方法也与本发明相容。

[0023] 在一般实施方案中,本发明提供一种用于快速检测分析物的系统和方法,所述系统和方法包括以下组件:(i)活的工程化生物传感器细胞,其中活的工程化生物传感器细胞是哺乳动物免疫系统的组分;(ii)报告蛋白,其中报告蛋白由活的工程化生物传感器细胞表达,并且其中报告蛋白响应于活的工程化细胞的细胞溶质中的某些预定变化而发出可检测信号;(iii)信号转导途径,其由活的工程化生物传感器细胞表达,其中信号转导途径控制活的工程化生物传感器细胞的细胞溶质内的生物或生物化学过程,并且其中当生物或生物化学过程发生时,其使得报告蛋白发出可检测信号;(iv)至少一种类型的检测器分子,其中每种检测器分子适于结合到特异性分析物;(v)至少一种分析物,其中至少一种分析物结合到对所述分析物特异的检测器分子;(vi)多个非抗体信号转导元件,其由活的工程化生物传感器细胞表达,或者主动地结合到由活的工程化生物传感器细胞表达的受体或受体组分,其中每个信号转导元件适于接收检测器分子。在足够数量的分析物结合到足够数量的检测器分子(其本身结合到非抗体信号转导元件)后,在细胞表面上发生信号转导元件的聚集,信号转导途径被激活,发生生物化学过程,并且由报告蛋白发出可检测信号。这种系统还可包括:用于将活细胞连同可溶性组分与含有感兴趣的分析物或致病因子的样品混合同时保持活的生物传感器细胞的生存力和功能性的装置;以及用于检测由生物传感器细胞发出的信号的检测器。

[0024] 活的工程化生物传感器细胞

[0025] 本发明的示例性实施方案包括活的工程化生物传感器细胞,其通常是哺乳动物免疫系统的组分(例如,免疫细胞)。在本发明的某些实施方案中,生物传感器细胞是人类或小鼠B细胞。B细胞或B淋巴细胞是淋巴细胞亚型的白细胞类型,其通过分泌抗体在适应性免疫系统的体液免疫组分中起作用。在本发明的其他实施方案中,生物传感器细胞是人类或小鼠T细胞。T细胞或T淋巴细胞是另一种类型的淋巴细胞,其作为适应性免疫系统的一部分在细胞介导免疫中发挥重要作用。由于在细胞表面上存在T细胞受体,所以T细胞可区别于其他淋巴细胞。在本发明的其他实施方案中,生物传感器细胞是肥大细胞。肥大细胞也是被称为粒细胞的白细胞类型,其来源于作为免疫系统和神经免疫系统的一部分的髓样干细胞。其他类型的细胞与本发明相容,包括嗜碱性粒细胞,其是另一种类型的白细胞并且在外观和功能上类似于肥大细胞。

[0026] 报告蛋白

[0027] 本发明的示例性实施方案包括报告元件,诸如由活的工程化生物传感器细胞产生或表达的报告蛋白或酶。报告蛋白响应于活的工程化生物传感器细胞的细胞溶质中的某些预定变化而发出可检测信号。在本发明的某些实施方案中,报告蛋白是生物发光光蛋白,诸如来源于水螅类维多利亚多管发光水母的水母发光蛋白。水母发光蛋白先前已被用于使活的生物传感器细胞工程化,以响应于很多种信号转导途径的激活而产生光信号;因此,用于操纵活细胞中水母发光蛋白的产生的各种方法是技术人员所熟知的。具体地,技术人员可选择并且采用任何适当的基因递送媒介物,例如像细菌质粒载体或病毒载体,以用于将适当的遗传物质引入到生物传感器细胞中。然后将通过所引入的遗传物质的表达来控制生物传感器细胞内的报告蛋白的产生。本领域普通技术人员还将了解,可将其他光蛋白或其他类型的报告蛋白、酶和分子并入到本发明的各种替代实施方案中并且与其一起使用。

[0028] 信号转导途径

[0029] 本发明的示范性实施方案包括由活的工程化生物传感器细胞表达的信号转导途径。信号转导途径控制活的工程化细胞的细胞溶质内的至少一种生物过程,并且当至少一种生物过程发生时,其使得报告蛋白发出可检测信号。在本发明的某些实施方案中,信号转导途径是其中响应于细胞表面信号转导分子(诸如受体蛋白)的激活而诱导细胞内 Ca^{2+} 浓度增加的任何生物化学途径。与本发明一起使用的生物传感器细胞可选自能够响应于细胞表面信号转导分子的激活而产生细胞质 Ca^{2+} 增加的一组活细胞。例如,B细胞、T细胞和肥大细胞具有分别响应于细胞表面信号转导分子诸如B细胞受体、T细胞受体和 $\text{Fc}\epsilon$ 受体(肥大细胞)的激活而诱导 Ca^{2+} 浓度增加的能力。

[0030] 因为在培养中生长的哺乳动物细胞通常生成细胞群,其中特定的个体细胞可具有不同的诱导 Ca^{2+} 浓度增加的能力,所以选择或筛选具有强大的生成 Ca^{2+} 信号的能力的细胞亚群或克隆细胞系是有用的。例如,这可通过分析对水母发光蛋白诱导的闪光的感应来实现。具体地,通过将转基因引入到细胞中产生的转染子是来源于大量的独立基因插入事件的混合细胞群。因此,当构建生物传感器细胞时,筛选或选择具有高效的信号转导能力连同所引入转基因的有用表达水平的特定细胞子集或克隆细胞系是有用的。出于这个目的,使用荧光激活细胞分选(FACS)技术来选择高表达细胞的亚群或生成克隆细胞系是特别有用的。

[0031] 如前所述,水母发光蛋白先前已被用于使活的生物传感器细胞工程化,以响应于很多种信号转导途径(特别是其中此类信号转导途径导致活细胞内细胞质 Ca^{2+} 离子增加)的激活而产生光信号。在本发明的某些实施方案中,产生水母发光蛋白作为报告蛋白的生物传感器细胞在其用于检测测定中之前用腔肠素(CTZ)进行负载。这种负载步骤将水母发光蛋白共价连接到疏水性辅基(例如,CTZ),并且在钙(Ca^{2+})结合后,CTZ发生包括构象变化的不可逆反应并发出蓝光(在469nm处)。

[0032] 检验器分子

[0033] 本发明的示范性实施方案包括至少一种类型的检测器元件,诸如检测器分子,其中每种检测器分子适于结合到特异性靶分析物。检测器分子可以是并非以任何方式由生物传感器细胞表达的可溶性抗体。与本发明一起使用的特定检测器分子基于其明确鉴别感兴趣的靶分析物的能力来选择。在示范性实施方案中,检测器分子是可溶性抗体,诸如对特定分析物(诸如,致病因子)特异的可商购获得的IgG。在另一个示范性实施方案中,检测器分子是对预定分析物特异的生物素化分子(或基于链霉亲和素的分子),例如像对抗自身抗原抗体特异的生物素化的自身抗原分子。根据本发明的检测器或靶分子可包括与自身免疫疾病相关联的自身抗原或自身抗体。代表性的自身免疫疾病或病症包括:类风湿性关节炎(RA)、幼年型RA(JRA)、1型糖尿病、系统性红斑狼疮、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、硬皮病、乳糜泻、克隆氏病、溃疡性结肠炎、干燥综合征、多发性硬化症、古德帕斯丘综合征、艾迪生氏病、韦格纳肉芽肿病、原发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、风湿性多肌痛症、颞动脉炎/巨细胞性动脉炎和格-巴二氏综合征。检测器或靶分子还可包括:肿瘤特异性或肿瘤相关抗原或此类抗原的抗体;或生物活性分子,诸如EGF、肽类激素(包括胰岛素和生长激素)、细胞因子、白介素、干扰素、TNF等,或此类生物活性分子的抗体。

[0034] 分析物和测试样品

[0035] 本发明的预期用途是检测存在于或可能存在于待测试样品内的各种分析物。在本发明的示范性实施方案中，待检测的分析物将结合到对所述分析物特异的检测器分子，诸如可溶性抗体。待测试的样品可取自大量食物来源，包括：(i) 肉类，诸如牛肉、猪肉、羔羊肉、野牛肉、家禽肉和海鲜；以及(ii) 植物和蔬菜。待测试的样品也可取自许多其他来源，诸如水、消耗性液体、防腐液和体液（诸如血液）。可检测的分析物几乎包括将特异性结合到检测器或检测器分子的任何物质，诸如化学品、毒素和致病因子（诸如病毒、细菌和其他生物材料或药剂）。在本发明的示范性实施方案中，具体致病因子是大肠杆菌，但可用本发明检测其他致病因子（诸如沙门氏菌、李斯特氏菌和弯曲杆菌）和污染物。在单独测定或多重测定中，大肠杆菌0157H7、026、045、0103、0111、0121和0145都可潜在地使用本发明进行检测。

[0036] 本发明能够检测许多不同的分析物，包括肉类病原体以及在菠菜、莴苣和其他蔬菜和食物上发现的那些病原体。分析物可含有抗原或过敏原的一个或多个表位，包括线性或构象表位；它还可含有由互作受体或配体识别的一个或多个配体或受体。示范性分析物包括：细菌，诸如芽孢杆菌属（例如，炭疽芽孢杆菌）、肠杆菌科（例如，沙门氏菌、大肠杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、克雷伯氏菌和志贺氏菌）、耶尔森氏菌属（例如，鼠疫耶尔森氏菌或小肠结肠炎耶尔森氏菌）、葡萄球菌属（例如，金黄色葡萄球菌）、链球菌属、淋病、肠球菌属（例如，粪肠球菌）、李斯特氏菌属（例如，单核细胞增生李斯特氏菌）、布鲁氏菌属（例如，流产布鲁氏菌、马尔他布鲁氏菌或猪布鲁氏菌）、弧菌属（例如，霍乱弧菌）、白喉棒状杆菌、假单胞菌属（例如，类鼻疽假单胞菌或铜绿假单胞菌）、伯克霍尔德菌（例如，鼻疽伯克霍尔德菌或类鼻疽伯克霍尔德菌）、志贺氏菌属（例如，痢疾志贺氏菌）、立克次体属（例如，立氏立克次体、普氏立克次体或伤寒立克次体）、土拉热弗朗西斯杆菌、鹦鹉热衣原体、贝氏柯克斯体、支原体属（例如，牛肺疫支原体）等；过敏原，诸如花生粉尘、霉菌毒素、霉菌孢子或细菌孢子（诸如肉毒梭状芽孢杆菌和产气荚膜梭状芽孢杆菌）；毒素，诸如蓖麻毒素、霉菌毒素、河豚毒素、炭疽毒素、肉毒杆菌毒素、葡萄球菌肠毒素B或蛤蚌毒素；病毒，诸如腺病毒科（例如，腺病毒）、沙粒病毒科（例如，马丘波病毒）、布尼亚病毒科（例如，汉坦病毒或裂谷热病毒）、冠状病毒科、正粘病毒科（例如，流感病毒）、丝状病毒科（例如，埃博拉病毒和马尔堡病毒）、黄病毒科（例如，日本脑炎病毒和黄热病病毒）、嗜肝DNA病毒科（例如，乙型肝炎病毒）、疱疹病毒科（例如，单纯疱疹病毒）、乳多空病毒科（例如，乳头瘤病毒）、副粘病毒科（例如，呼吸道合胞体病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒或副流感病毒）、小DNA病毒科、小RNA病毒科（例如，脊髓灰质炎病毒）、痘病毒科（例如，天花病毒）、呼肠孤病毒科（例如，轮状病毒）、逆转录病毒科（例如，人类嗜T淋巴细胞病毒(HTLV) 和人类免疫缺陷病毒(HIV)）、弹状病毒科（例如，狂犬病病毒）和披膜病毒科（例如，脑炎病毒、黄热病病毒和风疹病毒）；原虫，诸如小隐孢子虫、脑炎原虫、疟原虫、刚地弓形虫、棘阿米巴、溶组织内阿米巴、兰伯氏贾第虫、阴道毛滴虫、利什曼原虫或锥虫属（例如，布氏锥虫和克氏锥虫）；蠕虫，诸如绦虫类（绦虫）、吸虫类（吸虫）或线虫（蛔虫，例如，人蛔虫、毛首鞭虫、美洲板口线虫或十二指肠钩口线虫）；寄生虫（例如，本文所述的任何原虫或蠕虫）；真菌，诸如曲霉、环管苔虫科、粗球孢子菌和隐球菌属；环境污染物；水添加剂；农业标记；核酸（例如，寡核苷酸、多核苷酸、核苷酸、核苷、DNA分子或RNA分子，包括染色体、质粒、病毒基因组、引物或基因）；蛋白质（例如，糖蛋白、金属蛋白、酶、朊病毒或免疫球蛋白）；代谢物；糖；脂质；脂多糖；盐；或离子。靶标还包括：食源性病原体，诸如沙门氏菌属（例如，鼠伤寒沙门氏菌）、致病性大肠杆菌（例如，0157:H7）、芽孢杆菌属（例

如,蜡样芽胞杆菌)、肉毒梭状芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、耶尔森氏菌属(例如,小肠结肠炎耶尔森氏菌)、诺罗病毒(例如,诺沃克病毒)、志贺氏菌属、金黄色葡萄球菌、刚地弓形虫、弧菌属(例如,创伤弧菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌)、空肠弯曲菌和产气荚膜梭状芽孢杆菌;以及武器化病原体,诸如炭疽芽孢杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉热弗朗西斯杆菌、布鲁氏菌(例如,猪布鲁氏菌)、鼻疽伯克霍尔德菌、类鼻疽伯克霍尔德菌、志贺氏菌属、肉毒梭状芽孢杆菌、天花(例如,重型天花)、丝状病毒科(例如埃博拉病毒和马尔堡病毒)、沙粒病毒科(例如,拉沙病毒和马丘波病毒)、产气荚膜梭状芽孢杆菌、任何食源性病原体(例如,沙门氏菌属物种、大肠杆菌0157:H7或志贺氏菌属)、鹦鹉热衣原体、贝氏柯克斯体、金黄色葡萄球菌、立克次体(例如,普氏立克次体或立氏立克次体)、甲病毒属(例如,委内瑞拉马脑炎病毒、东部马脑炎病毒或西部马脑炎病毒)、霍乱弧菌、小隐孢子虫、亨尼帕病毒属(例如,尼帕病毒)、布尼亚病毒科(例如,汉坦病毒或裂谷热病毒)、黄病毒科(例如,日本脑炎病毒和黄热病病毒)和球孢子菌属。

[0037] 可作为分析物或分析物的部分进行检测的表位通常是免疫球蛋白(或其抗原结合片段)可特异性结合的抗原上的抗原决定簇位点。可由通过蛋白质的三级折叠来并置的连续氨基酸或不连续氨基酸形成表位。可在免疫球蛋白的Fab(可变)区(被称为“独特型决定簇”)上发现表位,并且其包括免疫球蛋白的“独特型”。表位和抗原可以是自然存在的或人工产生的。例如,根据表位或抗原的性质,表位或抗原可从合成或重组产生的基质或物质的起源分离或纯化。可用作分析物的表位和抗原可来自人类或非人类的动物、植物、细菌、原生动物、寄生虫、病毒等。在一些实施方案中,分析物是多肽、核酸分子、碳水化合物、糖蛋白、脂质、脂蛋白、糖脂或小分子。在一些实施方案中,分析物选自癌抗原、自身抗原、过敏原、内源性抗原、致病因子抗原、药物(小分子)抗原、毒素、毒液、生物抗原、环境抗原、移植抗原和植入抗原。

[0038] 分析物可包括癌抗原的表位。在一些实施方案中,分析物是肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,分析物是肿瘤特异性抗原。在本发明的一些实施方案中,分析物是肿瘤相关抗原(TAA),并且TAA是具有与野生型蛋白不同的一种或多种翻译后修饰的碳水化合物抗原,包括由存在于恶性细胞中但不存在于非恶性细胞中的基因融合产生的蛋白质融合区,和/或其中TAA包括受体酪氨酸激酶(RTK),其由于RTK基因或蛋白质中的自分泌激活、染色体易位、RTK过表达或功能获得型突变而在肿瘤细胞中去调节和/或功能失调。在本发明的一些实施方案中,分析物是由B细胞恶性肿瘤表达的免疫球蛋白。B细胞恶性肿瘤的实例包括但不限于:非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、套细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。另外的B细胞恶性肿瘤包括例如:B细胞幼淋巴细胞性白血病、淋巴浆细胞性白血病、脾边缘区淋巴瘤、边缘区淋巴瘤(结外和结内)、浆细胞肿瘤(例如,浆细胞骨髓瘤、浆细胞瘤、单克隆免疫球蛋白沉积病、重链病)和滤泡性淋巴瘤(例如,I、II、III或IV级)。

[0039] 在一些实施方案中,分析物是来源于获自受试者的肿瘤细胞的肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原是选自以下项的一种或多种抗原:17-1A、707-AP、AFP、膜联蛋白II、ART-4、BAGE、BAGE-1、 β -连环蛋白、BCG、bcr/abl、Bcr/abl e14a2融合连接、bcr-abl(b3a2)、bcr-abl(b3a2)、bcr-abl p190(e1a2)、bcr-abl p210(b2a2)、bcr-abl p210(b3a2)、bcr-abl p210(b3a2)、大疱性类天疱疮抗原-1、CA19-9、CA125、CA215、CAG-3、CAMEL、癌-睾丸抗原、半胱天冬酶-8、CCL3、CCL4、CD16、CD20、CD3、CD30、CD55、CD63、CDC27、

CDK-4、CDR3、CEA、聚簇5、聚簇-5A、细胞周期蛋白依赖性激酶-4、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、Dec-cain、E7、EGFR、EGFRvIII、EGP40、ELF2M、EpCAM、FucGM1、G250、GA733、GAGE、GAGE-1-8、胃泌素癌相关抗原、GD2、GD3、globoH、血型糖蛋白、GM1、GM2、GM3、GnTV、Gn-T-V、gp100、Her-2/neu、HERV-K-ME、高分子量相关抗原、高分子量蛋白多糖 (HMPG)、HPV-16E6、HPV-16E7、HPVE6、HSP70-2M、HST-2、hTERT、人体绒毛膜促性腺激素 (HCG)、人乳脂肪小球 (HMFG)、iCE、KIAA0205、KK-LC-1、KM-HN-1、L6、LAGE-1、Lcose4Cer、LDLR/FUT、Lewis A、Lewis v/b、M蛋白、MAGE-1、MVC、MAGE-A1-12、MAGE-C2、MAHGE-3、MART-1/Melan-A、MC1R、ME491、MUC1、MUC2、粘蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、突变p53、肌球蛋白、MZ2-E、N9神经氨酸苷酶、NA88、NA88-A、鼻咽癌抗原、NGA、NK1/c-3、具有ABL外显子4的新型bcr/abl融合BCR外显子1、13、14、NY-ESO-1/LAGE-2、NY-ESO-1b、OC125、骨肉瘤相关抗原-1、P15、p190mimor bcr-abl (ela2)、p53、Pml/RARa、聚唾液酸、PRAME、PSA、PSM、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-2、SART-3、唾液酸化LeA、Sp17、SSX-2、SSX-4、表面免疫球蛋白、TAG-1、TAG-2、TEL/AML1、TPI、TRAG-3、TRP-1 (gp75)、TRP-2、TRP2-INT2、hTERT、肿瘤相关糖蛋白-72 (TAG-72)、酪氨酸酶、u-PA、WT1和XAGE-1b或任何前述抗原的免疫原性片段。在一些实施方案中,通过SEREX (重组cDNA表达文库的血清学分析) 方法或基于从各种起源或癌细胞系的肿瘤组织生成的cDNA表达文库的血清学筛选来鉴定肿瘤相关抗原,并且基于其与自体患者血清的反应性而鉴定免疫原性肿瘤蛋白。在一些实施方案中,分析物是肿瘤相关抗原,其是具有与野生型蛋白不同的一个或多个翻译后修饰的碳水化合物抗原。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原包括从存在于恶性细胞中但不存在于非恶性细胞中的基因融合产生的蛋白质融合区。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原包括受体酪氨酸激酶,其由于RTK基因或蛋白质中的自分泌激活、染色体易位、RTK过表达或功能获得型突变而在肿瘤细胞中去调节和/或功能失调。

[0040] 分析物可包括可对受试者致病或非致病的致病因子或非致病因子的抗原表位。分析物可来源于互生、寄生或共生的微生物,包括动物或植物生物群落中的任何微生物,诸如人类消化道、粘膜表面或上皮中的益生菌或共生微生物。在一些实施方案中,细菌病原体选自:鲍氏不动杆菌 (以前称为醋酸钙不动杆菌);放线杆菌;化脓放线菌 (以前称为化脓棒状杆菌);衣氏放线菌;星状诺卡菌、巴西诺卡菌;嗜水气单胞菌;自养无枝酸菌;溶血隐秘杆菌 (以前称为溶血棒状杆菌);欣肖亚利桑那菌--所有血清型;炭疽杆菌;脆弱拟杆菌;汉赛巴尔通体、五日热巴尔通体、文森巴尔通体;博德特氏菌、包括百日咳博德特氏菌;回归热螺旋体、伯氏疏螺旋体;伯克霍尔德菌 (以前称为假单胞菌种) 除BSL III中列出的那些);大肠弯曲杆菌、胎儿弯曲杆菌、空肠弯曲杆菌;鹦鹉热衣原体、砂眼衣原体、肺炎衣原体;肉毒梭状芽孢杆菌 (产生神经毒素的物种)、肉毒梭状芽孢杆菌神经毒素、肉毒梭状芽孢杆菌、溶血梭状芽孢杆菌、溶组织梭状芽孢杆菌、诺维氏梭状芽孢杆菌、败血梭状芽孢杆菌、破伤风梭状芽孢杆菌、产气荚膜梭状芽孢杆菌ε毒素;白喉棒状杆菌、假结核棒状杆菌、牛肾孟炎棒状杆菌;刚果嗜皮菌;迟钝爱德华菌;猪红斑丹毒丝菌;所有肠致病性、肠毒性、肠侵袭性大肠杆菌和携带K1抗原的菌株,包括大肠杆菌O157:H7;杜克雷嗜血杆菌、流感嗜血杆菌;幽门螺杆菌;克雷伯氏菌--除产酸克雷伯氏菌 (RG1) 之外的所有种类;军团杆菌,包括嗜肺军团杆菌;问号钩端螺旋体--所有血清型;李斯特氏菌;莫拉克斯氏菌;分支杆菌 (除BSL III中列出的那些之外),包括鸟分枝杆菌复合体、亚洲分枝杆菌、牛分枝杆菌BCG疫苗株、龟分支杆菌、偶发分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、麻风分枝杆菌、莫尔门分枝杆菌、海洋、分枝杆菌、副结

核分支杆菌、瘰癧分枝杆菌、猴分枝杆菌、斯氏分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、蟾分枝杆菌；支原体；淋病奈瑟菌，脑膜炎奈瑟菌；星状诺卡菌，巴西诺卡菌，豚鼠耳炎诺卡菌，南非诺卡氏菌；奇异变形杆菌，普通变形杆菌；马红球菌；沙门氏菌，包括亚利桑那沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鸡-鸡白痢沙门氏菌、鸡病沙门氏菌、甲型、乙型、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌；志贺氏菌，包括鲍氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌1型、福氏志贺氏菌、索氏志贺氏菌；坏死厌氧丝杆菌；金黄色葡萄球菌；念珠状链杆菌；链球菌，包括肺炎链球菌、酿脓链球菌；苍白密螺旋体，斑点病密螺旋体；霍乱弧菌，副溶血弧菌，创伤弧菌；小肠结肠炎耶尔森氏菌；巴尔通体；布鲁氏菌，包括流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、羊布鲁氏菌；鼻疽伯克霍尔德菌（假单胞菌），类鼻疽伯克霍尔德菌；贝氏柯克斯体；土拉热弗朗西丝菌；牛分枝杆菌（除BCG菌株、BSL II—包括衣原体的细菌剂之外），结核分枝杆菌；非结核分枝杆菌（MOTT）；乙型多杀巴斯德氏菌——“水牛”和其他毒性菌株；小蛛立克次体，澳洲立克次体，加拿大立克次体，康氏立克次体，普氏立克次体，立氏立克次体，西伯利亚立克次体，恙虫病立克次体，伤寒立克次体（莫氏立克次体）；鼠疫耶尔森氏菌。

[0041] 分析物可来源于病毒病原体。例如，在一些实施方案中，分析物来源于选自以下项的病毒病原体：腺病毒；人类病毒—所有类型；甲病毒属（披膜病毒）；东部马脑炎病毒；东部马脑脊髓炎病毒；委内瑞拉马脑脊髓炎疫苗株TC-83；西部马脑脊髓炎病毒；沙粒病毒；淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（非嗜神经株）；塔卡里伯病毒复合体；布尼亚病毒；布尼奥罗病毒；裂谷热病毒疫苗株MP-12；卡里西病毒；冠状病毒；黄病毒（披膜病毒）——B群虫媒病毒；登革热病毒血清型1、2、3和4；黄热病病毒疫苗株17D；甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎病毒；巨细胞病毒；埃巴二氏病毒；1型和2型单纯疱疹病毒，带状疱疹病毒；6型和7型人类疱疹病毒；A型、B型和C型流感病毒；乳多空病毒；乳头瘤病毒；新城疫病毒；麻疹病毒；腮腺炎病毒；1型、2型、3型和4型副流感病毒；多瘤病毒（JC病毒、BK病毒）；呼吸道合胞体病毒；人类细小病毒（B 19）；A型和B型柯萨奇病毒；埃可病毒；脊髓灰质炎病毒；鼻病毒；类天花病毒（轻型天花病毒）；天花病毒（重型天花病毒）；乳白痘呼肠孤病毒；科罗拉多蜱虱热病毒；人类轮状病毒和环状病毒（科罗拉多蜱传热病毒）；狂犬病病毒；水泡性口炎病毒；风疹病毒（风疹）；塞姆利基森林病毒；圣路易斯脑炎病毒；委内瑞拉马脑炎病毒；委内瑞拉马脑脊髓炎病毒；沙粒病毒（又名南美出血热病毒）；Flexal病毒；淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒（LCM）（嗜神经株）；汉坦病毒属，包括汉坦病毒；裂谷热病毒；日本脑炎病毒；黄热病病毒；猴痘病毒；1型和2型人类免疫缺陷病毒（HIV）；1型和2型人类嗜T淋巴细胞病毒（HTLV）；猴免疫缺陷病毒（SIV）；水泡性口炎病毒；瓜纳里托病毒；拉沙热病毒；胡宁病毒；马丘波病毒；沙比亚病毒；克里米亚-刚果出血热病毒；埃博拉病毒；马尔堡病毒；蜱传脑炎病毒复合体（黄病毒），包括中欧蜱传脑炎、远东蜱传脑炎、汉扎洛瓦、Hypr、Kumlinge、科萨努尔森林病、鄂木斯克出血热和俄罗斯春夏型脑炎病毒；猴疱疹病毒（疱疹B病毒或猴B病毒）；猕猴疱疹病毒1型（疱疹B病毒）；马麻疹病毒（亨德拉病毒和亨德拉样病毒）；尼帕病毒；重型天花病毒（天花病毒）；轻型天花病毒（类天花病毒）；非洲猪瘟病毒；非洲马瘟病毒；赤羽病病毒；禽流感病毒（高致病性）；蓝舌病毒；骆驼痘病毒；猪瘟病毒；反刍类考德里氏体（心水病）；口蹄疫病毒；山羊痘病毒；日本脑炎病毒；结节性皮肤病病毒；恶性卡他热病毒；梅南高病毒；新城疫病毒（VVND）；小反刍兽疫病毒；牛瘟病毒；绵羊痘病毒；猪水泡病病毒；水泡性口炎病毒（外来）。

[0042] 分析物可来源于寄生虫。例如，在一些实施方案中，分析物来源于选自以下项的寄

生虫：人体钩口线虫，包括十二指肠钩口线虫、锡兰钩口线虫；蛔虫，包括人蛔虫、猪蛔虫；巴贝虫，包括分歧巴贝虫、田鼠巴贝虫；布鲁格丝虫，包括马来丝虫、帝纹丝虫；球虫；隐孢子虫，包括小隐孢子虫；猪囊尾蚴（棘球蚴、猪带绦虫的幼虫）；棘球绦虫，包括细粒棘球绦虫、多房棘球绦虫、和伏氏棘球绦虫；溶组织内阿米巴；蛲虫；片吸虫，包括巨片吸虫、肝片吸虫；贾第虫，包括兰伯氏贾第虫；异形吸虫；膜壳绦虫，包括缩小膜壳绦虫、微小膜壳绦虫；等孢球虫；利什曼原虫，包括巴西利什曼原虫、杜氏利什曼原虫、埃塞俄比亚利什曼原虫、硕大利什曼原虫、墨西哥利什曼原虫、秘鲁利什曼原虫、热带利什曼原虫；罗阿罗阿线虫；微孢子虫；福氏耐格里阿米巴；人体板口线虫，包括美洲板口线虫；盘尾丝虫，包括旋盘尾丝虫；食蟹猴疟原虫、恶性疟原虫、三日疟原虫、卵形疟原虫、间日疟原虫；肉孢子虫，包括猪人肉孢子虫；血吸虫，包括埃及血吸虫、间插血吸虫、日本血吸虫、曼氏血吸虫、湄公血吸虫；类圆线虫，包括粪类圆线虫；猪带绦虫；弓蛔虫，包括犬弓蛔虫；弓浆虫，包括刚地弓形虫；旋毛形线虫；锥虫，包括布氏布氏锥虫、布氏冈比亚锥虫、布氏罗得西亚锥虫、克氏锥虫；或者班氏丝虫。

[0043] 分析物可以是真菌病原体。例如，在一些实施方案中，分析物来源于选自以下项的真菌病原体：烟曲霉、皮炎芽生菌、斑替枝孢霉、白假丝酵母菌、毛样（木丝霉）枝孢霉、新型隐球菌、奔马指霉（奔马赭霉）、表皮癣菌属、皮炎（王氏霉）外瓶霉、裴氏着色霉、小孢子菌、巴西副球孢子菌、马尔尼菲青霉菌、卡氏肺孢菌、申克孢子丝菌、毛癣菌属、粗球孢子菌、*Coccidioides posadasii*、荚膜组织胞浆菌、荚膜组织胞浆菌杜波氏变种。

[0044] 分析物可以是毒素。在一些实施方案中，分析物是选自以下项的毒素：相思豆毒素、肉毒杆菌神经毒素、产气荚膜梭状芽孢杆菌 ϵ 毒素、芋螺毒素、蛇形菌素、蓖麻毒素、蛤蚌毒素、志贺样核糖体失活蛋白、志贺毒素、葡萄球菌肠毒素、T-2毒素和河豚毒素。

[0045] 在一些实施方案中，分析物选自：乙型肝炎表面抗原（HBsAg）、伯氏疏螺旋体OspA、HPV L1、RSV F蛋白、流感血凝素、流感茎环区、流感M2、恶性疟原虫裂殖子表面蛋白1-10、GLURP、SERA、S-抗原、6-半胱氨酸家族、AMA1、EBA175、140、181、MTRAP、PTRAMP、ASP、Rh1、2a、2b、4、5、RAP1、2、3、RAMA、RHOPH1、2、3、间日疟原虫环孢子蛋白、子孢子表面蛋白2、SSP2/TRAP、CSP-N、CSP-R、CSP-C、MSP-1、MSP-9、DBPPIII、AMA-1、Pvs25、Pvs28、金黄色葡萄球菌荚膜多糖、聚-N-乙酰葡萄糖胺、HIV gp120、gp41以及登革热病毒保守区。

[0046] 在另一个实施方案中，分析物包括过敏原的至少一个表位。过敏原可以是自然存在的或人工的（诸如过敏症疫苗中所含有的过敏原）。过敏原的实例包括但不限于：动物产品（例如，Fel d 1、毛皮皮屑、蟑螂萼、羊毛、尘螨排泄物）、药物（例如，青霉素、磺酰胺类、水杨酸盐、局部麻醉剂）、食物（例如，芹菜和块根芹、玉米、蛋（例如，白蛋白）、水果、豆类（例如，菜豆、豌豆、花生、黄豆）、乳、海鲜（例如，贝类）、芝麻、大豆、木本坚果（例如，山核桃、杏仁）、小麦、昆虫毒液（例如，火蚁、蜜蜂螫针毒液、黄蜂螫针毒液）、胶乳、金属、植物花粉（例如，草（例如，黑麦草、梯牧草、杂草（例如，豚草、车前、荨麻、艾草、藜、酸模）和树木（例如，桦树、桤木、榛树、角树、七叶树、柳树、杨树、法国梧桐、椴树、洋橄榄、阿什杜松）。

[0047] 在一些实施方案中，分析物是来源于胶乳蛋白的过敏原，例如未加工的胶乳树液、含有氨的生胶乳或其中蛋白质已经暴露于化学品和高温的胶乳成品。在一些实施方案中，过敏原是螨虫的过敏原，例如粉尘螨、屋尘螨、粗脚粉螨、热带无爪螨、拱殖嗜渣螨、埋内欧尘螨（*Euroglyphus cannei*）、害嗜鳞螨、腐食酪螨或家甜食螨。在一些实施方案中，过敏原

来自毒液,例如熊蜂属、黄边胡蜂、意蜂、长黄胡蜂属、马蜂属、黄胡蜂属、斑长黄胡蜂或长黄胡蜂。在一些实施方案中,分析物是来自昆虫的过敏原,例如宾夕法尼亚弓背蚁、红火蚁、黑火蚁、美洲大蠊、德国小蠊、东方蠊、虻属、家蝇、蜉蝣属、蚊属或蛾属。

[0048] 在一些实施方案中,过敏原分析物是来自有机体的上皮、皮屑或毛发,例如金丝雀、猫(家猫)、家牛、红原鸡(家鸡)、家犬、绿头鸭、长爪沙鼠、家山羊、家鹅、豚鼠(荷兰猪)、叙利亚仓鼠、野猪、家马、小家鼠、鸚鵡科、斑尾鸽、穴兔、褐家鼠或家绵羊。

[0049] 在一些实施方案中,过敏原分析物来自真菌,例如:顶头孢霉、细交链孢霉、灰绿曲霉、黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、土曲霉、杂色曲霉、出芽短梗霉(出芽茁霉)、麦根腐德氏霉、麦根腐长蠕孢霉、灰葡萄孢霉、白假丝酵母菌、球毛壳霉、腊叶芽枝霉、枝孢属(*Cladosporium sphaerospermum*) (着色真菌(*Homodendrum hordei*))、特别德氏霉(穗状弯孢霉)、黑附球菌(紫附球菌)、絮状表皮癣菌、串珠镰刀菌、腐皮镰刀菌、白地霉、绿粘帚霉、茄长蠕孢、犬小孢子菌、卷枝毛霉原变型、卷枝毛霉拉斯坦变种、密丛毛霉、菌盖疣孢霉、间型脉孢菌、稻黑孢菌、宛氏拟青霉、短密青霉、沙门柏干酪青霉、产黄青霉、指状青霉、扩展青霉、点青霉、萎地青霉、甜菜茎点霉、草茎点霉、稻根霉、匍枝根霉、胶红酵母、酿酒酵母、短帚霉、泪菌、真菌禾长蠕孢菌、匍柄霉、茄匍柄霉、哈茨木霉、须毛癣菌、红色毛癣菌或粉红单端孢霉。在一些实施方案中,过敏原来自黑粉菌,例如大麦散黑粉菌、狗牙根黑粉菌、*Ustilago candidis*、高粱散孢堆黑粉菌、燕麦散黑粉菌或小麦散黑粉菌。

[0050] 在一些实施方案中,过敏原分析物来自草,例如百喜草、狗牙根、加拿大早熟禾、无芒雀麦、鹼草、*Zea mays*、偃麦草(匍匐冰草)、石茅、草地早熟禾、草甸羊茅(牛尾草)、燕麦、鸭茅、巨序剪股颖(小糠草)、黑麦、巨型滨麦草(披碱草属)、多花黑麦草、多年生黑麦草、黄花茅、猫尾草、绒毛草、普通小麦或史密斯披碱草(冰草属)。

[0051] 在一些实施方案中,过敏原分析物来自杂草,例如多果滨藜、香根菊、沙漠扫帚、美国海墨菊、绿穗苋、苍耳(耳(*communis*))、皱叶酸模、泽兰属泥炭藓(*Eupatorium capillifolium*)、一枝黄花属、糙果苋(*Achillea tamariscina*)、*Allenrolfea occidentalis*、香藜、地肤、藜、假苍耳、*Iva angustifolia*、土荆芥、北艾、银叶艾、大荨麻、刺苋、长叶车前、小花假苍耳(*Iva axillaris*)、大滨藜(*Atriplex lentiformis*)、豚草属铁杉(*Ambrosia dumosa*)、刺果豚草(*Ambrosia acanthicarpa*)、三裂叶豚草、普通豚草、密花豚草、牛膝豚草(*Ambrosia bidentata*)、裸穗猪草、钾猪毛菜(*pestifer*)、加州蒿、冷蒿、三齿蒿、瑞氏滨藜(*Atriplex wrightii*)、密叶滨藜或黄花蒿。

[0052] 在一些实施方案中,过敏原分析物来自树木,例如:相思树属、普通赤杨、美国赤杨、斑点桤木(*Alnus incana ssp. rugosa*)、菱叶桤木、绒毛白蜡、美国红桤、俄勒冈白蜡、美国白蜡、美洲山杨、蜡杨梅、国山毛榉(美洲山毛榉)、木麻黄、山桦、垂枝桦、河桦、水桦(红色桦树)、灰桦(*Betula populifolia*)、桤叶槭、日本柳杉、阿希刺柏(*Juniperus ashei* (*sabinoides*))、北美圆柏、红花多枝怪柳、毛果香脂杨、美洲黑杨、弗里氏杨、*Populus wislizeni*、美洲黑杨念珠杨(*Populus monilifera*) (*sargentii*)、绿干柏、落羽杉、地中海柏木、美国榆、硬叶榆(*Ulmus crassifolia*)、垂枝榆、蓝桉、美洲朴、美洲榛、欧榛、鳞皮山核桃、糙皮山核桃、*Carya alba*、樱桃圆柏、*Juniperus princhotii*、落矶山圆柏、北美西部圆柏、刺槐、芒果、大叶枫、美国红枫、糖枫、五脉白千层(白千层)、腺牧豆树(柔黄花牧豆树)、构树、红桑、白桑、甘氏栎(*Quercus gambelii*)、美洲黑栎、大果栎、加州黑栎、海岸栎、加州

白栎、冬青栎、星毛栎、北美红栎、加州丛栎、弗吉尼亚栎、黑栎、奥里根白栎、白栎、油橄榄、沙枣、甜橙、皇后葵(*Cocos plumosa*)、长山核桃、秘鲁胡椒木、巴西胡椒木、火炬松、北美乔松、长叶松、西黄松、湿地松、矮松、西部白松、萌芽松、黑杨、银白杨、欧洲女贞、北美枫香、一球悬铃木、三球悬铃木、加利福尼亚悬铃木、二球悬铃木、黑胡桃、加州胡桃、普通胡桃、黄柳(*Salix lasiolepis*)、黑柳或褪色柳。在一些实施方案中,过敏原来自花,例如法兰西菊、西洋蒲公英或向日葵。在一些实施方案中,过敏原来自农场植物,例如紫花苜蓿、蓖麻、红三叶草、芸苔属或甜菜。

[0053] 在一些实施方案中,过敏原分析物来自植物性食物(可食用的植物),例如扁桃、苹果、杏、香蕉(大蕉)、大麦、棉豆、菜豆、菜豆属、菜豆、黑莓、越橘属、花椰菜、荞麦、甘蓝、可可、甜瓜、野胡萝卜、花椰菜、甜芹(*Apium graveolens var.dulce*)、李属、锡兰肉桂、小果咖啡、*Zea mays*、蔓越莓、黄瓜、大蒜、姜、葡萄属、葡萄柚、蛇麻、柠檬、莴苣、蘑菇、芸苔属、肉豆蔻、燕麦、油橄榄、分蘖洋葱(*Allium cepa var.cepa*)、甜橙、豇豆、豌豆、桃、西洋梨、黑胡椒、灯笼椒(*Capsicum annuum var.annuum*)、菠萝、番薯、马铃薯、华北覆盆子(*Rubus idaeus var.idaeus*)、水稻、黑麦、芝麻(胡麻)、大豆、菠菜、密生西葫芦(*Cucurbita pepo var.melopepo*)、智利草莓、普通番茄(番茄)、芜菁(*Brassica rapa var.rapa*)、香莢兰、野生西瓜种质(*Citrullus lanatus var.lanatus*)或普通小麦。

[0054] 在一些实施方案中,过敏原分析物来自鱼类或贝类,例如黑鲈属、斑点叉尾鲷、硬壳蛤、大西洋鳕、蓝蟹、川鲈属、庸鲈属、美洲螯龙虾、大西洋鲑鱼、美洲牡蛎、海平鲷、大西洋鲑、鲱形目、海扇贝、对虾属、红点鲑属或金枪鱼属。在一些实施方案中,过敏原是动物性食物产品,例如来自家牛、家绵羊或野猪。在一些实施方案中,过敏原是家禽产品,例如鸡(红原鸡)产品或火鸡(普通火鸡)产品。在一些实施方案中,过敏原来自乳制品,例如牛酪蛋白或牛乳。在一些实施方案中,过敏原是坚果,例如巴西坚果、腰果、椰子、美洲榛、花生、美国山核桃、黑胡桃或普通胡桃。在一些实施方案中,过敏原是粉尘,例如大麦谷物粉尘、玉米谷物粉尘、房屋粉尘、床垫粉尘、燕麦谷物粉尘、小麦谷物粉尘、室内装潢粉尘或胶乳粉尘。

[0055] 在一些实施方案中,抗原分析物是与自身免疫性病症相关联的自身抗原。在一些实施方案中,自身免疫性病症是细胞或器官特异性自身免疫性病症,并且自身抗原分析物选自:乙酰胆碱受体(重症肌无力)、肌动蛋白(慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化)、嘌呤核苷酸转运体(ANT)(扩张性心肌病、心肌炎)、 β -肾上腺素受体(扩张程度的心肌病)、芳香族L-氨基酸脱羧酶(I型自身免疫性多内分泌腺病综合征(APS-1))、去唾液酸糖蛋白受体(自身免疫性肝炎)、杀菌/增加渗透性的蛋白(Bpi)(囊性纤维化血管炎)、钙敏感受体(获得性甲状旁腺功能减退)、胆固醇侧链裂解酶(CYP11a)(APS-1)、IV型胶原 $\alpha 3$ -链(肺出血肾炎综合征)、细胞色素P450 2D6(CYP2D6)(自身免疫性肝炎)、肌间线蛋白(克隆氏病、冠状动脉疾病)、桥粒芯蛋白1(落叶型天疱疮)、桥粒芯蛋白3(寻常型天疱疮)、F-肌动蛋白(自身免疫性肝炎)、GM神经节苷脂(格-巴二氏综合征)、谷氨酸脱羧酶(GAD65)(1型糖尿病、僵人综合征)、谷氨酸受体(GLUR)(拉斯穆森脑炎)、H/K ATP酶(自身免疫性胃炎)、17- α -羟化酶(CYP17)(APS-1)、21-羟化酶(CYP21)(艾迪生氏病)、IA-2(ICA512)(1型糖尿病)、胰岛素(1型糖尿病、胰岛素低血糖综合征(Hirata病)、B型胰岛素抵抗、棘皮症、系统性红斑狼疮(SLE))、1型内在因子(恶性贫血症)、白细胞功能相关抗原(LFA-1)(抗治疗性莱姆关节炎)、髓鞘相关糖蛋白(MAG)(多发性神经病)、髓鞘碱性蛋白(多发性硬化症、脱髓鞘疾病)、髓鞘

少突胶质细胞糖蛋白(MOG)(多发性硬化症)、肌球蛋白(风湿热)、p-80-螺旋蛋白(特应性皮炎)、丙酮酸脱氢酶复合体-E2(PDC E2)(原发性胆汁性肝硬化)、钠碘同向转运体(NIS)(格雷夫斯病、自身免疫性甲状腺功能减退症)、SOX-10(白癜风)、甲状腺和眼肌共享蛋白(自身免疫性甲状腺炎)、甲状腺过氧化物酶(自身免疫性桥本甲状腺炎)、促甲状腺素受体(格雷夫斯病)、组织型转谷氨酰胺酶(乳糜泻)、转录共激活剂p75(特应性皮炎)、色氨酸羟化酶(APS-1)、酪氨酸酶(白癜风、转移性黑素瘤)以及酪氨酸羟化酶(APS-1),其中在每种自身抗原分析物之后立即附带地列出相关的自身免疫性病症。

[0056] 在一些实施方案中,自身免疫性病症是系统性自身免疫性病症,并且自身抗原分析物选自:ACTH(ACTH缺陷)、氨酰基-tRNA组氨酰合成酶(肌炎、皮肤炎)、氨酰基-tRNA合成酶(多发性肌炎、皮肤炎)、心磷脂(SLE)、碳酸酐酶II(SLE、干燥综合征、系统性硬化症)、胶原(类风湿性关节炎(RA)、SLE、进行性系统性硬化症)、着丝粒相关蛋白(系统性硬化症)、DNA依赖性核小体刺激性ATP酶(皮肤炎)、纤维蛋白(硬皮病)、纤连蛋白(SLE、RA、硬斑病)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(RA)、 β 2-糖蛋白I(β 2-GPI)(原发性抗磷脂综合征)、高尔基体蛋白(95、97、160和/或180)(干燥综合征、SLE、RA)、热休克蛋白(各种免疫相关病症)、半桥粒蛋白180(大疱性类天疱疮、妊娠疱疹、瘢痕性类天疱疮、组蛋白H2A-H2B-DNA(SLE)、IgE受体(慢性特发性荨麻疹)、角蛋白(RA)、Ku-DNA-蛋白激酶(SLE)、Ku-核蛋白(结缔组织综合征)、La磷蛋白(La 55-B)(干燥综合征)、髓过氧化物酶(坏死性和新月体性肾小球肾炎(NCGN)、系统血管炎)、蛋白酶3(PR3)(韦格纳肉芽肿病、变应性肉芽肿性血管炎)、RNA聚合酶I-III(RNP)(系统性硬化症、SLE)、信号识别蛋白(SRP54)(多发性肌炎)、拓扑异构酶-1(Sc1-70)(硬皮病、雷诺综合征)、微管蛋白(慢性肝病、内脏利什曼病)以及波形蛋白(系统性自身免疫性疾病),其中在每种自身抗原之后立即附带地列出相关的自身免疫性病症。

[0057] 在一些实施方案中,自身免疫性病症是血浆蛋白自身免疫性病症或细胞因子自身免疫性病症,并且自身抗原分析物选自:C1抑制剂(自身免疫性C1缺陷)、C1q(SLE、膜增生性肾小球肾炎(MPGN))、细胞因子(例如,IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 γ 、IL-10、LIF)(RA、系统性硬化症)、凝血因子II(延长凝血时间)、凝血因子V(延长凝血时间)、凝血因子VII(延长凝血时间)、凝血因子VIII(延长凝血时间)、凝血因子IX(延长凝血时间)、凝血因子X(延长凝血时间)、凝血因子XI(延长凝血时间)、凝血因子XII(延长凝血时间)、凝血酶(延长凝血时间)、vWF(延长凝血时间)、糖蛋白IIb/IIIa和Ib/IX(自身免疫性血小板减少性紫癜)、IgA(免疫缺陷)以及氧化型LDL(OxLDL)(动脉粥样硬化),其中在每种自身抗原分析物之后立即附带地列出相关的自身免疫性病症。

[0058] 在一些实施方案中,自身免疫性病症是癌症或副肿瘤性自身免疫性病症,并且自身抗原分析物选自:两性蛋白(神经病、小细胞肺癌)、细胞周期蛋白B 1(肝细胞癌)、DNA拓扑异构酶II(肝癌)、桥粒斑蛋白(副肿瘤性天疱疮)、桥尾蛋白(副肿瘤性僵人综合征)、Hu蛋白(副肿瘤性脑脊髓炎)、神经元烟碱型乙酰胆碱受(亚急性自主神经病、癌症)、p53(癌症、SLE)、p62(IGF-II mRNA-结合蛋白)(肝细胞癌)、恢复蛋白(癌症相关的视网膜病)、R1蛋白(副肿瘤性眼阵挛肌阵挛性共济失调)、 β IV血影蛋白(下运动神经元综合征)、突触结合蛋白(朗伯-伊顿肌无力症候群)、电压门控钙通道(朗伯-伊顿肌无力症候群)和Yo蛋白(副肿瘤性小脑变性)。

[0059] 在一些实施方案中,抗原分析物是内源性抗原,其为异常表达的多肽。此类内源性

抗原的实例包括但不限于： β 淀粉样蛋白(A- β 或A. β .)、 α 突触核蛋白、半胱氨酸蛋白酶抑制剂C、tau、ABri、ADan、超氧化物歧化酶(SOD)、突变亨廷顿蛋白、PrP.^{sup}.sc或任何前述蛋白质的片段。

[0060] 在本发明的一些实施方案中,分析物包括待引入到受试者中的植入物的至少一个表位、植入材料的代谢或降解产物或者特异性结合到植入材料的表位的物质,诸如开发成植入材料或其降解产物的抗体。此类植入物可包括例如电动植入物(例如,人工起搏器)、生物植入物(通过外科手术植入受试者体内以替代受损组织(例如,矫形重建假体)的生物材料、心脏假体(人工瓣膜)、皮肤和角膜)、避孕植入物、牙齿植入物、矫形植入物和粘附防止装置。可携带表位的植入材料的实例包括:胶乳;硅树脂;金属,诸如钴铬(Co--Cr)合金、钛和钛合金;聚合物,诸如超高分子量聚乙烯(UHMWPE)和聚甲基丙烯酸甲酯粘固剂(PMMA);以及生物陶瓷,诸如羟基磷灰石和生物玻璃。

[0061] 非抗体信号转导元件

[0062] 本发明的示例性实施方案包括各种非抗体信号转导元件。每个信号转导元件适于接收即结合本身适于接收即结合感兴趣的特异性分析物的检测器分子。在一个实施方案中,信号转导元件是跨膜嵌合融合蛋白,其被工程化到生物传感器细胞的表面中并在生物传感器细胞的表面上表达,并且其适于激活最终导致报告蛋白发出可检测信号的信号转导途径。在另一个实施方案中,信号转导元件是可溶性嵌合融合蛋白,其适于结合到细胞表面信号转导子,诸如适于激活最终导致报道蛋白发出可检测信号的信号转导途径的天然受体或受体蛋白。在又一个实施方案中,信号转导元件是被工程化到生物传感器细胞中并由生物传感器细胞表达的可溶性嵌合融合蛋白。然后可溶性嵌合融合蛋白被分泌/排泄到细胞外空间中,在那里其结合到细胞表面信号转导子,诸如适于激活最终导致报道蛋白发出可检测信号的信号转导途径的天然受体或受体蛋白。

[0063] 本发明的嵌合融合蛋白可包括:(i)适于结合到至少一种类型的检测器分子(例如,可溶性抗体)的蛋白质的组分;以及(ii)正常由活的工程化生物传感器细胞表达的受体复合体的组分。在一些实施方案中,适于结合到至少一种类型的检测器分子的蛋白质的组分可来源于细菌结合蛋白(即,来源于细菌的抗体结合蛋白),例如像链球菌G蛋白(本文中被称为IgGbp或附图中被称为Igbp)的IgG结合结构域。可包括这种IgG结合结构域的串联重复序列以增加结合蛋白对可溶性抗体的亲和力。在替代实施方案中,适于结合到至少一种类型的检测器分子的嵌合融合蛋白的组分是来源于例如像鼠科Fc γ RI(Fc γ RI)受体的受体蛋白的抗体结合结构域。在各种示例性实施方案中,正常由活的工程化生物传感器细胞表达的受体复合体的组分是IgM(对于B细胞生物传感器)、Ig α / β (对于B细胞生物传感器)、IgE(对于肥大细胞生物传感器)、CD19(对于B细胞生物传感器)、CD3 ζ (对于T细胞生物传感器)或Fc ϵ RI(对于肥大细胞生物传感器)。

[0064] 本发明的非抗体信号转导元件可包括完整的蛋白质序列或工程化蛋白质片段,诸如来源于较大蛋白质分子的所选择的蛋白质结构域。本领域普通技术人员将了解,可使用标准基因工程技术诸如合成基因技术来产生较大分子的片段。当较大蛋白质的片段用于使抗体结合基序工程化呈嵌合融合蛋白的样子时,重要的是设计工程化蛋白质以确保所选择的蛋白质片段的正确构象折叠。因此,(在融合蛋白中)包括不易形成蛋白质二级结构的短的间隔物元件或接头元件是有用的。例如,氨基酸(诸如甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸)的短组合

可用于这些间隔物元件或接头元件。在示例性实施方案中,氨基酸序列甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、甘氨酸(G)用于在工程化蛋白质分子中将结合结构域与受体复合体的组分分离(参见SEQ ID NO:19)。关于用于将检测器元件连接到信号转导元件或使信号转导元件的不同区段互相连接的肽接头或间隔物:接头通常将一个元件的羧基末端接合到另一个元件的氨基末端。肽接头的长度可在0至25个氨基酸之间变化或任何中间整数值,并且通常但不总是包含亲水性氨基酸,诸如甘氨酸(G)和丝氨酸(S)。

[0065] 如前所述,每个信号转导元件结合到与感兴趣的特异性分析物结合的检测器分子。已经结合到分析物的检测器分子将(i)结合到跨膜信号转导元件;或(ii)结合到本身将结合到细胞表面信号转导子(例如,天然受体)的信号转导元件。在第一种情况下,在足够数量的分析物结合到足够数量的检测器分子(其本身结合到跨膜非抗体信号转导元件)后,在生物传感器细胞表面上发生信号转导元件的聚集,信号转导途径被激活,发生生物过程,并且由报告蛋白发出可检测信号。在第二种情况下,在足够数量的分析物结合到足够数量的检测器分子、足够数量的非抗体信号转导元件(其本身结合到适当的天然受体)后,在细胞表面上发生受体的聚集,信号转导途径被激活,发生细胞内钙增加,并且由报告蛋白发出可检测信号。

[0066] 根据本发明的示例性实施方案的第一非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到IgM重链恒定结构域(B细胞)的细菌结合蛋白(IgGbp)。SEQ ID NO:1为信号转导元件IgGbp-IgM提供DNA序列,并且SEQ ID NO:2为信号转导元件IgGbp-IgM提供蛋白质序列。

[0067] 根据本发明的示例性实施方案的第二非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到B细胞受体的Igα/β组分的细菌结合蛋白(IgGbp)。SEQ ID NO:3为信号转导元件IgGbp-Igα/β提供DNA序列,并且SEQ ID NO:4为信号转导元件IgGbp-Igα/β提供蛋白质序列。

[0068] 根据本发明的示例性实施方案的第三非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到T细胞受体的CD3ζ链的细菌结合蛋白(IgGbp)。SEQ ID NO:5为信号转导元件IgGbp-CD3ζ提供DNA序列,并且SEQ ID NO:6为信号转导元件IgGbp-CD3ζ提供蛋白质序列。

[0069] 根据本发明的示例性实施方案的第四非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到IgM重链恒定结构域(B细胞)的FcγRI抗体结合结构域。SEQ ID NO:7为信号转导元件FcγRI-IgM提供DNA序列,并且SEQ ID NO:8为信号转导元件FcγRI-IgM提供蛋白质序列。

[0070] 根据本发明的示例性实施方案的第五非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到B细胞受体的Igα/β组分的FcγRI抗体结合结构域。SEQ ID NO:9为信号转导元件FcγRI-Igα/β提供DNA序列,并且SEQ ID NO:10为信号转导元件FcγRI-Igα/β提供蛋白质序列。

[0071] 根据本发明的示例性实施方案的第六非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到T细胞受体的CD3ζ链的FcγRI抗体结合结构域。SEQ ID NO:11为信号转导元件FcγRI-CD3ζ提供DNA序列,并且SEQ ID NO:12为信号转导元件FcγRI-CD3ζ提供蛋白质序列。

[0072] 根据本发明的第七示例性非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到IgE恒定结构域(B细胞)的细菌结合蛋白(IgGbp)。SEQ ID NO:13为信号转导元件IgGbp-IgE提供DNA序列,并且SEQ ID NO:14为信号转导元件IgGbp-IgE提供蛋白质序列。

[0073] 根据本发明的第八示例性非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到IgE恒定结构域(B细胞)的FcγRI抗体结合结构域。SEQ ID NO:15为信号转导元件FcγRI-IgE提

供DNA序列,并且SEQ ID NO:16为信号转导元件Fc γ RI-IgE提供蛋白质序列。

[0074] 根据本发明的第九示例性非抗体信号转导元件包含用GSASGSG接头融合到T细胞受体的CD3 ζ 链的单体型链霉亲和素。SEQ ID NO:17为信号转导元件mSA-CD3 ζ 提供DNA序列,并且SEQ ID NO:18为信号转导元件mSA-CD3 ζ 提供蛋白质序列。单体型链霉亲和素是包括将链霉亲和素四聚物断裂成单体并增强所得分离亚基溶解度的突变的重组形式的链霉亲和素。

[0075] 示例生物传感器I

[0076] 如前所述,参考图1a-b,根据本发明的示例性实施方案的第一生物传感器100包括Jurkat T细胞102,其已经被工程化以产生水母发光蛋白104并且已经负载有CTZ 106以形成水母发光蛋白/CTZ复合体。这种特定生物传感器也已经被工程化来表达跨膜非抗体信号转导元件108即IgGbp-CD3 ζ (SEQ ID NO:5-6),但跨膜非抗体信号转导元件Fc γ RI-CD3 ζ (SEQ ID NO:11-12)也可与生物传感器100一起使用。生物传感器细胞102还包括至少一条信号转导途径110,对其的激活导致细胞内Ca²⁺112增加。如图1b所示,当靶分析物116(例如,大肠杆菌0157)所结合的足够数量的检测器分子114(例如,可溶性抗体)结合到跨膜非抗体信号转导元件108时,信号转导途径110被激活,细胞内Ca²⁺112增加,水母发光蛋白/CTZ复合体发生构象变化并发出由光电倍增管120检测的光118的信号(光子),并且尖峰122以图形方式显示在测试装置上(参见下文描述),指示测试样品内的靶分析物116的存在。关于靶分析物116,显示可以是定性的和定量的。

[0077] 示例生物传感器II

[0078] 如前所述,参考图2a-b,根据本发明的示例性实施方案的第二生物传感器200包括MC/9 (ATCC[®] CRL-8306[™]) 肥大细胞202,其已经被工程化以产生水母发光蛋白204并且已经负载有CTZ 206以形成水母发光蛋白/CTZ复合体。这种特定生物传感器表达结合到可溶性非抗体信号转导元件208即IgGbp-IgE (SEQ ID NO:13-14)的天然Fc ϵ 受体(即,Fc ϵ RI) 207,但非抗体信号转导元件Fc γ RI-IgE (SEQ ID NO:15-16)也可与生物传感器200一起使用。如图2b所示,当靶分析物216(例如,大肠杆菌0157)所结合的足够数量的检测器分子214(例如,可溶性抗体)结合到非抗体信号转导元件208(其先前已经结合到天然Fc ϵ 受体207)时,信号转导途径210被激活,细胞内Ca²⁺212增加,水母发光蛋白/CTZ复合体发生构象变化并发出由光电倍增管220检测的光218的信号(光子),并且尖峰222以图形方式显示在测试装置上(参见下文描述),指示测试样品内的靶分析物216的存在。关于靶分析物216,显示可以是定性的和定量的。

[0079] 示例生物传感器III

[0080] 如前所述,参考图3a-b,根据本发明的示例性实施方案的第三生物传感器300包括MC/9 (ATCC[®] CRL-8306[™]) 肥大细胞302,其已经被工程化以产生水母发光蛋白304并且已经负载有CTZ 306以形成水母发光蛋白/CTZ复合体。这种特定生物传感器表达结合到非抗体信号转导元件308即IgGbp-IgE (SEQ ID NO:13-14)的天然Fc ϵ 受体(即,Fc ϵ RI) 307,但非抗体信号转导元件Fc γ RI-IgE (SEQ ID NO:15-16)也可与生物传感器300一起使用。在这个特定实施方案中,生物传感器细胞302已经被进一步工程化以表达IgGbp-IgE,并且将这种非抗体信号转导元件排出到细胞外空间中,其中所述信号转导元件结合到在细胞表面上表达的天然Fc ϵ RI。如图3b所示,当靶分析物316(例如,大肠杆菌0157)所结合的足够数量的检

测器分子314(例如,可溶性抗体)结合到非抗体信号转导元件308(其先前已经结合到天然Fcε受体307)时,信号转导途径310被激活,细胞内Ca²⁺312增加,水母发光蛋白/CTZ复合体发生构象变化并发出由光电倍增管320检测的光318的信号(光子),并且尖峰322以图形方式显示在测试装置上(参见下文描述),指示测试样品内的靶分析物316的存在。关于靶分析物316,显示可以是定性的和定量的。

[0081] 示例生物传感器IV

[0082] 参考图4,根据本发明的示例性实施方案的第四生物传感器400包括生物传感器细胞402,其已经被工程化以产生水母发光蛋白并且表达跨膜非抗体信号转导元件408即mSA-CD3ζ(SEQ ID NO:17-18)。非抗体信号转导元件mSA-CD3ζ(单体型链霉亲和素-CD3ζ)结合到生物素化检测器分子414,其特异性地结合到靶分子416,例如像表皮生长因子(EGF)。如前所述,抗靶分子抗体417(例如像抗EGF)产生聚集多个信号转导元件并诱导信号转导的靶标多聚体。在其他实施方案中,单体型链霉亲和素组分被生物素化组分替代,并且可采用替代连接装置。

[0083] 示例生物传感器V

[0084] 参考图5,根据本发明的示例性实施方案的第五生物传感器500包括生物传感器细胞502,其已经被工程化以产生水母发光蛋白并且表达跨膜非抗体信号转导元件508即mSA-CD3ζ(SEQ ID NO:17-18)。非抗体信号转导元件mSA-CD3ζ(单体型链霉亲和素-CD3ζ)结合到生物素化检测器分子514,其在一些实施方案中是自身抗原分子。生物素化检测器分子514特异性地结合到靶分子516,其在一些实施方案中是抗自身抗原分子。如前所述,血清样品中的自身抗体产生聚合多个信号转导元件并诱导信号转导的靶多聚体。在其他实施方案中,单体型链霉亲和素组分被生物素化组分替代,并且可采用替代连接装置。

[0085] 用于产生本发明的嵌合蛋白的信号转导多肽的氨基酸序列可与由以下登录号鉴别或以下登录号中的蛋白质或结构域具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%序列同一性或相似性:IgM重链(GenBank:CAC20458.1)、Ig-α(P11912.2,GI:547896)、Ig-β(P40259.1,GI:728994)、CD19(AAA69966.1,GI:901823)、CD3ζ(P20963.2,GI:23830999)、IgEα(1F2Q_A,GI:9257150)和Fc-εR1亚基α(P12319.1,GI:119865)。

[0086] 金黄色葡萄球菌蛋白A(P02976.3,GI:110283003)由金黄色葡萄球菌的spa基因编码,并且其结构(包括其Ig结合区段)和免疫球蛋白结合特性是众所周知的,并通过参考Graille等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2000年5月9日;97(10):5399-404和Roben等人J Immunol.1995年6月15日;154(12):6437-45并入。蛋白A或其与已知的蛋白A氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%序列同一性或相似性的免疫球蛋白结合区段的变体和结合到免疫球蛋白或其他分析物的能力(诸如由Graille等人和Roben等人描述的那些)可通过本领域中众所周知的分子生物技术产生,包括通过直接合成编码免疫球蛋白结合氨基酸序列的核酸。

[0087] 其他细菌免疫球蛋白结合蛋白(诸如链球菌蛋白G和此类蛋白质的工程化变体)是已知的,并且通过参考Bailey等人,J Immunol Methods.2014年12月15日;415:24-30(doi:10.1016/j.jim.2014.10.003)(电子版2014年10月22)和Watanabe等人,J Biol Chem.2009年5月1日;284(18):12373-8(doi:10.1074/jbc.M809236200)(电子版2009年5月6日)并入。

蛋白G或其与已知的蛋白G氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%序列同一性或相似性的免疫球蛋白结合区段的变体和结合到免疫球蛋白或其他分析物的能力(诸如由Bailey等人和Watanabe等人描述的那些)可通过本领域中众所周知的分子生物技术产生,包括通过直接合成编码免疫球蛋白结合氨基酸序列的核酸。

[0088] Fc受体(FcR)结合到免疫球蛋白的Fc部分,并且许多类型的此类Fc受体是已知的,包括Fc γ RI和Fc ϵ RI。这些FcR的结构和功能结合特征通过参考Fridman,FASEB J.1991年9月;5(12):2684-90并入。FcR或其与已知的FcR氨基酸序列(诸如由Fridman描述的序列)具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%序列同一性或相似性的免疫球蛋白结合区段的变体可通过本领域中众所周知的分子生物技术产生,包括通过直接合成编码免疫球蛋白结合氨基酸序列的核酸。

[0089] 根据本发明的信号转导蛋白可与所公开的由SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16和18描述的嵌合信号转导蛋白具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%序列同一性或相似性,并且还具有结合分析物(诸如免疫球蛋白)、然后将信号转导到工程化生物传感器细胞中的能力。可通过分子生物领域中众所周知的方法或通过化学合成编码变体嵌合报告蛋白的多核苷酸、将编码序列插入到载体中以及用载体转化或转染感受态细胞来构建此类变体。

[0090] 细胞分选和克隆

[0091] 本发明的生物传感器的设计和构建在培养时产生生物传感器细胞的混合群。一些细胞并不表达工程化因子,而其他细胞则在不同程度表达因子。在成功的电穿孔和基因插入后,培养生物传感器细胞并测试其作为混合群的生物响应(闪光信号)。使用流式细胞仪进行单细胞分选。对细胞进行分离、然后扩增用于分析,以选择表达高水平期望蛋白质的那些。对于这个过程,使用荧光标记的抗体靶向生物传感器细胞上的不同受体,从而实现分选过程。对单独克隆进行信号传导筛选,并且选择最佳克隆。通过这个过程鉴定和分离最合适的克隆。如下所述进行荧光激活细胞分选(FACS)和针对细胞外蛋白的活细胞染色。

[0092] 对工程化生物传感器细胞进行计数,轻轻离心,并且重悬于洗涤缓冲液(HBSS+2% BSA)中至最终浓度为 1×10^7 – 1×10^8 个细胞/mL。在每个实验中,使用具有Fc区的完整抗体或F(ab)₂。当使用完整抗体时,将1–0.5 μ g Fc受体阻断抗体添加到待接收细胞的每个空的12x15mm管中。在Fc阻断抗体的顶部,将100 μ L细胞(1×10^6 至 1×10^7 个细胞)添加到这些管中的每个中。将细胞轻轻混合并在4℃或室温下孵育15分钟。当使用F(ab)₂时,省略了先前的阻断Fc的步骤。添加总共1 μ g的一抗(针对选择的受体),然后将细胞轻轻混合,之后在冰上(或在4℃下)孵育20–40分钟。这个温度阻止受体内化。将细胞间歇地轻轻搅拌(涡旋)以促进标记。添加2mL体积的冷洗涤缓冲液,然后将细胞在4℃下离心并且弃去上清液。在将细胞重悬于100 μ L洗涤/分选缓冲液中之前重复洗涤步骤。向细胞中添加FITC标记的二抗(0.5–1 μ g)并混合,之后在冰上(或在4℃下)孵育20–40分钟。在整个过程期间,保护细胞免受光照。添加2mL体积的冷洗涤缓冲液,然后将细胞离心并且弃去上清液。重复洗涤步骤,并且将细胞重悬于0.5–1mL洗涤缓冲液中。将细胞在冰上孵育直到分选的时间。尽快进行分选(至少在同一天)。如下所述进行单细胞分选后的细胞克隆和培养。

[0093] 将生物传感器细胞分选到96孔板中,其中每个孔含有一个细胞和100–200 μ L细胞

生长培养基。在接下来的10至14天内对板进行扫描/监测,以确定生长速率并判断何时转移到24孔板。在扫描期间,不同的标记用于不同的条件。如果一些孔含有活细胞但是还没有准备好转移,则对其进行标记,并且对污染的孔也进行标记。将细胞转移到每个孔中含有1.0mL适当培养基的24孔板中。在细胞污染的情况下,通过将来自孔的所有细胞悬浮液添加到15mL锥形管中的5mL无菌1x PBS中来洗涤。然后将细胞在170RCF下离心10分钟并且弃去上清液。将沉淀物重悬于24孔板中的1.0mL新鲜培养基中待培养。在继续生长后,将细胞转移到每孔具有1.5mL新鲜培养基的12孔板中。

[0094] 对于克隆筛选,在12孔板中生长之后,对细胞进行计数,以确定它们是否准备好进行负载和闪光测试。在闪光测试期间,单次迭代涉及25,000个细胞。使足够的细胞生长以适应测试,并且还留一些继续生长。这个步骤标志着第一轮克隆筛选。使所选择的克隆进一步生长并根据期望的特性经受后续的测试。对于生物响应,例如,使用抗CD3 ϵ 抗体(阳性对照)和针对细菌的单克隆抗体与相应细菌筛选Jurkat-Fc γ RI-CD3 ζ 克隆,而洋地黄皂苷用于化学响应测试。使用抗Fc ϵ RI抗体(生物响应)和洋地黄皂苷(化学响应)筛选MC/9-Aeq克隆。

[0095] 总之,使用荧光抗体标记进行荧光激活细胞分选(FACS),以选择和分离高度表达期望蛋白质(在这种情况下所述蛋白质是工程化受体)的细胞。这个过程产生高度表达的生物传感器细胞群,其通过使用测试装置中的PMT的闪光测试进一步确认。在整个过程期间,使用自动细胞计数器对细胞进行计数,以消除人为误差并增强一致性和效率。当用抗大肠杆菌O111mAb和大肠杆菌O111细菌测试时,Jurkat-Fc γ RI-CD3 ζ 的不同克隆产生不同水平的生物响应。以相同的方式对许多克隆进行测试,并且将最高响应者保存在克隆库中。同样,获自使用化学品洋地黄皂苷测试不同MC/9-Aeq克隆的化学响应结果表明,不同的克隆根据水母发光蛋白表达的水平产生不同水平的化学响应。将具有最高信号的克隆保存在克隆库中。

[0096] 培养生物传感器细胞

[0097] 不同的培养基配方用于不同的细胞系,以确保最佳生长条件。将MC/9肥大细胞培养于肥大细胞完全培养基(DMEM-Sigma,目录号D5796;1x青霉素/链霉素;10%FBS;10%T-Stim补充剂;50 μ M β -巯基乙醇)中。将Jurkat T细胞培养于完全RPMI培养基(RPMI-ThermoFisher;10%FBS;1x青霉素/链霉素)中。根据电穿孔的构建体的特征,不同的抗生素用于细胞培养中的选择。在电穿孔后2-3天向生长培养基中添加适当的抗生素,以选择已经成功整合线性化DNA构建体的细胞。为了最佳细胞生长,将细胞浓度保持在 4.0×10^5 与 1.0×10^6 个细胞/mL之间。为了长期储存,对不同的细胞系和克隆进行加工,并且将库存如下冻存在液氮中:(i)将细胞在150RCF下离心10分钟并且弃去上清液;(ii)将细胞沉淀物以 5.0×10^5 个细胞/mL的浓度重悬于冻存培养基(RPMI;50%FBS;10%DMSO)中;并且(iii)将1mL的体积等分到2mL Nunc Cryo小瓶中,并且在-80 $^{\circ}$ C下冻存24小时,之后转移到液氮中长期储存。

[0098] 对生物传感器细胞进行负载

[0099] 将本发明的生物传感器细胞在50mL锥形管中在150RCF下离心10分钟。弃去上清液,并且将沉淀物以25,000个细胞/180 μ L的浓度重悬于负载培养基(RPMI;10%抗体耗尽的FBS;1x青霉素/链霉素;0.1%Pluronic F68和1.5mM腔肠素)中。另外,细胞还以不同的浓度进行负载,例如像100,000个细胞/180 μ L和400,000个细胞/180 μ L。在室温下轻轻振荡/摇动

24-26小时,对细胞进行负载。在使用之前,可使用其他抗体耗尽体系进一步纯化可商购获得的抗体耗尽的FBS。

[0100] 浓缩细胞

[0101] 证明本发明的生物传感器细胞在较低浓度而非较高浓度下被更有效地负载。例如,与400,000个细胞/180 μ L相比,以25,000个细胞/180 μ L的密度对细胞进行负载显示导致可检测信号增加两倍。将Jurkat-Fc γ RI-CD3 ζ 克隆P5G7细胞以400,000个细胞/180 μ L和25,000个细胞/180 μ L进行负载,然后在每个反应中以400,000个细胞/180 μ L进行测试。过夜大肠杆菌0111细菌培养物与23nM抗大肠杆菌0111mAb一起使用。以较低浓度进行负载的生物传感器细胞对于相同数量的测试细菌细胞产生更高的信号。生物传感器细胞密度主要通过负载之后对细胞进行浓缩来改变,以允许最佳病原体检测。当检测器分子是可溶性抗体时,根据靶病原体和抗体品质使用不同浓度进行病原体检测。通过在150RCF下离心10分钟来对生物传感器细胞进行浓缩,并且将细胞沉淀物重悬于期望体积的测试培养基中。负载培养基也可充当测试培养基。在某些情况下,由于正常FBS中的抗体浓度高,向培养基中添加正常FBS触发生物响应,从而产生生物传感器信号(闪光)。因此,在负载过程中使用可商购获得的抗体耗尽的FBS,其在不完全消除抗体的情况下降低抗体触发的信号。使用另外的方法来进一步耗尽可商购获得的抗体耗尽的FBS中的痕量抗体。

[0102] 生物测定

[0103] 在本发明的示例性实施方案中,用生物传感器细胞和对所述分析物(例如,病原体)特异的可溶性单克隆抗体(mAb)对分析物生物测定进行格式化。在这些实施方案中,生物测定的特异性与可溶性抗体选择性结合到靶分析物直接相关,并且通过生物发光的检测和测量来确定生物传感器的特异性和灵敏度。在这种方法中,首先使用发光分子即腔肠素(CTZ)对生物传感器细胞进行负载。然后添加选择的可溶性抗体和分析的样品。如果靶病原体存在于样品中,则它与结合到由生物传感器细胞表达的融合蛋白的可溶性抗体相互作用,从而最终触发导致从生物传感器细胞发出光的信号级联。所发出的光由测试装置中的光电倍增管(PMT)检测,并且由生物传感器细胞发出的信号显示为每秒的光子计数。如下所述,已经开发基于可溶性抗体和靶病原体检测病原体的各种方法。下文所详细描述三种此类方法包括:(i)即时添加检测器分子(例如,抗体);(ii)用检测器分子(例如,抗体)包被生物传感器细胞;以及(iii)用抗体包被分析物(例如,细菌)。

[0104] 测试单元

[0105] 本文的本发明生物测定方面可在设计用于与台式或便携式测试系统和装置一起使用的测试子单元或测试盒中进行,诸如美国专利申请号13/711,296(美国专利号9,023,640)中所公开的那个,所述美国专利以引用的方式整体并入本文。可以是单次使用的一次性物品的测试盒接收样品和生物传感器,并且以可预测和受控的方式将生物传感器引入到测试盒中混合样品和生物传感器。测试盒还包括用于接收测试样品和生物传感器的反应室,其中反应室具有预定的内部几何结构,并且出于改善总体信噪比的目的,已经进一步适于最小化或消除背景噪音。至少一个稳定器可位于反应室中,以在混合过程期间最小化对测试样品和生物传感器的剪切力损伤。

[0106] 在示例性实施方案中,测试盒内的反应室和通向反应室的流体通道被设计来实现若干目的。用于流体进入反应室的入口通道包括管状形状,并且管的直径相对较小并且在

反应室的入口处逐渐变细而变得更小。这增加流体进入反应室的速度,并且由于反应室内的试剂的牵连运动而促进更剧烈和均匀的混合。期望将试剂和样品以分子扩散以外的促进混合的方式混合,以便通过确保存在于样品中的任何致病因子快速碰撞生物传感器来最小化测试的持续时间。入口通道可从反应室的中心轴线偏移,以便在混合流体时促进试剂围绕测试室的中心轴线顺时针或逆时针旋转运动,以便增加混合物的均匀性。入口通道还大致与反应室的内部表面相切以允许进入的流体从入口通道行进到反应室,同时与反应室的侧面保持接触,这允许湍流流动最小以及引入到混合流体中的气泡最少。由于气泡在由试剂发出的光在行进穿过混合试剂内或混合试剂表面上的气泡时引起不可预测的光折射,所以气泡是不期望的。入口通道的轴线可在水平面上方成角度(例如,约30度),以向进入的流体流提供部分向下的方向,以便确保试剂与驻留于反应室底部处的流体混合。可替代地,可通过以下方式将试剂引入到测试室:使用替代的流体输送装置(诸如竖直通道),以将试剂输送到反应室的底部;或者将流体直接输送到测试室的中心轴线上,以便产生流入测试室中的试剂柱,从而通过夹带促进混合。

[0107] 反应室的形状(即,预定的几何结构)可以是有利于混合流体围绕反应室的中心轴线顺时针或逆时针运动的旋转剖面。可替代地,如果需要,可使用除诸如矩形或不规则形状的旋转剖面之外的反应室形状。在一个实施方案中,用于形成反应室的旋转剖面是椭圆的一部分,以有利于收集由试剂发出的杂散光并将这种光朝向检测器的表面反射,所述检测器可以是光电倍增管(PMT) (Hamamatsu)。反应室的表面可以是反射性的,以便增强椭圆形的的光收集特性。在一些实施方案中,对PMT表面的最大直径进行限制,以实现系统的输出的最大信噪比。反应室的直径可被设计来大致匹配PMT的直径,所述直径影响在被设计来容纳特定体积的流体的反应室中可实现的椭圆形。在受约束的椭圆形的情况下,由于当不会以另外的方式直接反射到PMT表面的光被白色表面部分地漫射并且这种漫射的一小部分朝向PMT表面引导时发生的另外光收集,反应室表面颜色可以是部分漫射的白色。可替代地,如果需要,可使用其他表面抛光和材料,诸如近镜面抛光铝或透明材料。此外,为了防止从反应室本身发出的光遮蔽从试剂发出的任何光并妨碍检测,期望反应室材料是最低磷光性的。虽然已经发现诸如丙烯腈丁二烯苯乙烯的白色聚合物材料或其他此类聚合物材料表现出低水平的磷光,但是已经发现由光反射和漫射的组合提供的另外光收集对光感测电路输出的信噪比有利。

[0108] 在示例性实施方案中,测试子单元提供用于样品分析中的系统。系统包括:生物传感器试剂,其中生物传感器试剂包括活的生物细胞;储液器卡,其具有长环部分和短环部分,其中储液器卡储存生物传感器试剂;以及测试盒底座,其中测试盒底座被配置来接受储液器卡。测试盒底座还包括:(i) 具有中心轴线的反应室,其中反应室的形状为旋转半椭圆;以及(ii) 连接到反应室的入口通道,其中入口通道以水平面上方15-60度的角度定位于反应室上方,其中入口通道从反应室的中心轴线偏移,并且其中在通过入口通道将待分析样品引入到测试盒底座中后,样品与生物传感器试剂均匀混合,同时最小化对活的生物细胞的损伤。

[0109] 在另一个示例性实施方案中,测试子单元提供用于快速检测生物样品中分析物的存在的系统。这种系统包括生物传感器试剂,其包括对预定分析物和生物发光剂特异的至少一种抗体,其中至少一种抗体在活的工程化淋巴细胞的表面上表达,并且其中生物发光

剂由活的工程化淋巴细胞表达,生物传感器试剂被操作以:(i)检测待测试样品中特异性分析物的存在;以及(ii)当生物传感器试剂与样品反应并检测样品中特异性分析物的存在时,发出可检测的光信号。还包括测试盒。测试盒还包括:(i)储液器卡,其中储液器卡还包括生物传感器试剂;以及(ii)测试盒底座,其中测试盒底座被配置来接受储液器卡。测试盒底座还包括:a)具有中心轴线的反应室,其中反应室的形状为旋转半椭圆;b)连接到反应室的入口通道,其中入口通道以水平面上方15-60度的角度定位于反应室上方,并且其中入口通道从反应室的中心轴线偏移;以及c)其中在通过入口通道将样品引入到测试盒底座中后,样品与生物传感器试剂均匀混合,同时最小化对活的工程化淋巴细胞的损伤并且最小化反应室中混合的生物传感器试剂和样品的任何鼓泡。还包括适于接收测试盒的测试单元。测试单元包括用于检测生物传感器试剂在与样品反应时发出的可检测光信号的传感器,检测发出的可检测光信号指示样品中分析物的存在,并且其中样品中的特异性分析物的检测实时发生。

[0110] 示例生物测定1:即时添加抗体

[0111] 在本发明的生物测定的示例性实施方案中,其中检测器分子是可溶性抗体,在将生物传感器细胞引入到测试样品之前将可溶性抗体和待测试的样品立即混合在一起。在这个实施方案中,将负载的生物传感器细胞在负载培养基中离心并浓缩至约400,000个细胞/180 μ L(适合于单一反应)。然后将负载的生物传感器细胞的180 μ L(约400,000个细胞)等分试样加载到储液器卡的长环部分中。对于阳性对照,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体的RPMI培养基溶液加载到储液器卡的短环部分中。然后将储液器卡锁定到测试盒底座中。将2 μ L体积的针对靶病原体的抗体(在0.5mg/mL下),诸如抗大肠杆菌0111(其中靶病原体是大肠杆菌0111),与28 μ L待测试样品在盒混合室中混合。将测试盒底座插入测试装置中,并且将负载的生物传感器细胞注入到反应室中以引发反应。记录所得的信号,持续4至8分钟,并且在测试周期结束时,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体从储液器的短环注入到反应室中作为阳性对照反应,对其进行记录,持续2分钟。作为替代阳性对照,可使用30 μ L的0.61mM洋地黄皂苷而非抗CD3 ϵ 抗体。可使用对所使用的抗体没有特异性的预定病原体进行阴性对照测试。

[0112] 示例生物测定2:用抗体包被生物传感器细胞

[0113] 在本发明的生物测定的另一个示例性实施方案中,其中检测器分子是可溶性抗体,在将待测试样品与生物传感器细胞混合之前,将生物传感器细胞用可溶性抗体包被一段时间。在这个实施方案中,将负载的生物传感器细胞在负载培养基中离心并浓缩至约400,000个细胞/180 μ L(适合于一种反应)。然后将生物传感器细胞的180 μ L(约400,000个细胞)等分试样与2 μ L体积的针对靶病原体的抗体(在0.5mg/mL下),诸如抗大肠杆菌0111(其中靶病原体是大肠杆菌0111),在Eppendorf管中混合。将与抗体混合的生物传感器细胞在室温下孵育10分钟,然后加载到储液器卡的长环部分中。对于阳性对照,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体的RPMI培养基溶液加载到储液器卡的短环部分中。然后将储液器卡锁定到测试盒底座中。将30 μ L体积的待测试样品添加到反应室中。将测试盒底座插入测试装置中,并且将生物传感器细胞注入到混合室中以引发反应。记录所得的信号,持续4至8分钟,并且在测试周期结束时,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体从储液器的短环注入到反应室中作为阳性对照反应,对其进行记录,持续2分钟。作为替代阳性对照,可使用30 μ L的0.61mM洋地黄皂苷而非抗CD3 ϵ 抗体。可使用对所使用的抗体没有特异性的预定病原体进行阴性对照测试。

[0114] 示例生物测定3:用抗体包被分析物

[0115] 在本发明的生物测定的另一个示例性实施方案中,其中检测器分子是可溶性抗体,在将待测试样品与生物传感器混合之前,将分析物(例如,致病性细菌)用可溶性抗体包被一段时间。在这个实施方案中,将负载的生物传感器细胞在负载培养基中离心并浓缩至约400,000个细胞/180 μ L(适合于一种反应)。将生物传感器细胞的180 μ L(约400,000个细胞)等分试样加载到储液器卡的长环部分中。对于阳性对照,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体的RPMI培养基溶液加载到储液器卡的短环部分中。然后将储液器卡锁定到盒底座中。将2 μ L体积的针对靶病原体的抗体(在0.5mg/mL下),诸如抗大肠杆菌0111(其中靶病原体是大肠杆菌0111),与28 μ L待测试样品在Eppendorf管中混合。将样品在室温下孵育10分钟,然后添加到盒混合室中。将盒插入PMT中,并且将生物传感器细胞注入到混合室中以引发反应。记录所得的信号,持续4至8分钟,并且在测试周期结束时,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体从储液器的短环注入到反应室中作为阳性对照反应,对其进行记录,持续2分钟。作为替代阳性对照,可使用30 μ L的0.61mM洋地黄皂苷而非抗CD3 ϵ 抗体。可使用对所使用的抗体没有特异性的预定病原体进行阴性对照测试。

[0116] 本文所述的示例性生物测定可包括降低背景噪音和增强信号的其他添加项。使用抗CD3 ϵ 抗体作为阳性对照,已经证明系统在50,000个不负载的生物传感器细胞的混合物中检测到少于10个负载的生物传感器细胞。已经证明生物传感器本身在30 μ L的样品中检测到230个细菌CFU。在上述生物测定中,针对大肠杆菌0111细菌的专有单克隆抗体(1F11)用于检测大肠杆菌0111细菌,其中大肠杆菌0157用作阴性对照。证明大肠杆菌0157产生阴性结果,从而证明系统的特异性。多种可商购获得的抗体也可与所描述的生物测定一起使用。关于专有单克隆抗体(1F11),如下所述实现抗体分析和单克隆抗体的选择。

[0117] 通过在96孔多孔板中进行的ELISA确定抗体产生。每个孔用不同的LPS(大肠杆菌0157、大肠杆菌0127、大肠杆菌0111、大肠杆菌026、肺炎克雷伯氏菌、肠道沙门氏菌和未处理(naïve)血清)或细菌细胞(大肠杆菌0157、大肠杆菌0111、大肠杆菌26和大肠杆菌DH5 α)包被。将来自mAb 0157或mAb 0111的不同克隆的杂交瘤上清液添加到孔中。辣根过氧化物酶缀合(HRP)的山羊抗小鼠IgG用于检测(附录III.A.3)。大肠杆菌0157的两种杂交瘤克隆(1B10和6G1)唯一地识别大肠杆菌0157的LPS和大肠杆菌0157。大肠杆菌0111的九种杂交瘤克隆特异性地识别大肠杆菌0111的LPS和大肠杆菌0111。选择来自最高光密度(OD)读数的克隆进行验证,其如下所述来实现。

[0118] 收集杂交瘤细胞沉淀物,并在RNA提取之前储存于-80 $^{\circ}$ C下。将提取的RNA用作用于逆转录为cDNA的模板,随后进行嵌套式PCR扩增。将所有阳性PCR产物克隆到TA克隆载体中并送去进行测序。在分析序列之后确定轻链和重链的可变区。重组表达0157(1B10)的四种单链抗体(scFv)(由FSC产生的定制mAb)和ATCC HB 10452,以及由FSC(1F11和1F2)产生的0111的两种单链抗体,并且通过固定化金属离子亲和色谱法(IMAC)纯化。scFv的序列按以下顺序进行构建:pe1 B分泌信号+氨基酸丙氨酸+组氨酸标签+氨基酸甘氨酸-丝氨酸-丝氨酸-甘氨酸+TEV裂解位点+氨基酸甘氨酸-丝氨酸-丝氨酸-甘氨酸+重链可变区+接头区丝氨酸-丙氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-丙氨酸-赖氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-丙氨酸-丙氨酸-赖氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-丙氨酸-赖氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸+轻链可变区。使用包被有0157或0111的LPS的多孔板测试纯化的scFv。

[0119] 本研究的目的是调查单克隆抗体 (mAb) 与全细菌细胞 (大肠杆菌0157或大肠杆菌0111) 的相互作用, 并估计抗体-细菌相互作用的动力学常数 (KD)。在这些测定中, 使用山羊抗大肠杆菌0157多克隆抗体、山羊抗大肠杆菌0111多克隆抗体、针对大肠杆菌0157的三种单克隆抗体 (1022、1024和1061) 以及针对大肠杆菌0111的一种单克隆抗体。还使用CM5传感器芯片和胺耦合试剂盒。所有测定均在Biacore X100仪器上进行。在草案中, 将一种多克隆抗体 (针对选定的细菌) 固定到CM5传感器芯片上。然后结合选定的细菌, 随后在连续缓冲液流中注入针对相同细菌的单克隆抗体。对相互作用进行实时监测。以共振单位 (RU) 记录抗体与每种细菌的相对结合。大肠杆菌0157特异性抗体 (mAb FF754) 与大肠杆菌0157和大肠杆菌0111结合的BIAcore分析的结果表明0157mAb对其靶抗原是特异性的。

[0120] 虽然通过描述其示例性实施方案来对本发明进行阐明, 并且虽然已经在一定细节上对实施方案进行描述, 但是并不意图将所附权利要求书的范围限定或以任何方式限制于这种细节。本领域的技术人员将很容易想到另外的优势和修改。因此, 本发明在其更广泛的方面不限于任何具体细节、代表性装置和方法/或所示和所述的说明性实例。因此, 在不脱离总体发明构思的精神或范围的情况下, 可偏离此类细节。

[0001]	<110>	Fundamental Solutions Corporation Zupancic, Thomas J. Zeng, Lingchun Vedamoorthy, Srikanth Lwande, Joel S. Joseph, Kittle D.	
	<120>	用于快速检测分析物的系统	
	<130>	35044-0006	
	<160>	19	
	<170>	PatentIn 3.5 版	
	<210>	1	
	<211>	1929	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	嵌合蛋白: BBP-IgM	
	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	(1)..(1929)	
	<400>	1	
		atg gtg ctg cag acg caa gtg ttt atc tcc ctg ctg ctc tgg atc agc	48
		Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
		1 5 10 15	
		gga gcg tac ggc act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg aag	96
		Gly Ala Tyr Gly Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys	
		20 25 30	
		ggt gag acc acc act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag gtc	144
		Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val	
		35 40 45	
		ttt aaa cag tat gcc aat gat aac ggc gtg gac gcc gag tgg acc tac	192

[0002]	Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr	
	50 55 60	
	gat gac gcc act aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg att	240
	Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile	
	65 70 75 80	
	gac gcg tcc gaa ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt atc	288
	Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile	
	85 90 95	
	aac ggc aag act ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat gcc	336
	Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala	
	100 105 110	
	gcc acc gcc gag aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg gtg	384
	Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val	
	115 120 125	
	gac ggg gag tgg acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg acc	432
	Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr	
	130 135 140	
	gag aag ccc gaa gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg aca	480
	Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr	
	145 150 155 160	
	ggc tct gct tct ggt tct ggt ggt tca gca tca gca cca act ttg ttt	528
	Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe	
	165 170 175	
	cca ctt gtc tca tgt gag aac tcg cca tcg gat acc tcg agc gta gcg	576
	Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala	
	180 185 190	
	gtc gga tgt ctc gct caa gac ttt ctt ccg gac agc atc acg ttt tca	624
	Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser	
	195 200 205	
	tgg aag tat aag aac aat tcg gat att tcg agc acg cga gga ttt ccc	672
	Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro	
	210 215 220	
	agc gta ttg aga ggg gga aag tac gcg gca aca agc cag gtg ctg ctc	720

[0003]	Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu	
	225 230 235 240	
	cca agc aag gat gtg atg cag ggc act gac gag cat gta gta tgc aag	768
	Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys	
	245 250 255	
	gta cag cac ccc aat gga aac aag gaa aag aat gtc cct ctg cct gta	816
	Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val	
	260 265 270	
	att gcc gag ctc cct cct aaa gtg tca gtg ttc gtg ccg ccc aga gat	864
	Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp	
	275 280 285	
	ggg ttc ttt gga aac ccg cga tcg aag tcg aaa ctg atc tgc cag gcc	912
	Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Ser Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala	
	290 295 300	
	acg gga ttc agc cct cgg cag att caa gtg tcg tgg ttg cgg gag gga	960
	Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly	
	305 310 315 320	
	aaa cag gtg gga tcg ggg gtg acc aca gac cag gtg cag gcg gag gct	1008
	Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala	
	325 330 335	
	aaa gaa agc ggt ccc acc aca tat aag gtc act tcc acc ctt act att	1056
	Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile	
	340 345 350	
	aag gaa tcg gat tgg ttg tca cag tcg atg ttc aca tgt aga gtc gat	1104
	Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp	
	355 360 365	
	cat cgc gga ctc acg ttt caa cag aac gcg tca tca atg tgt gta ccc	1152
	His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro	
	370 375 380	
	gat caa gat acg gcg atc aga gta ttc gcc att ccg cct agc ttc gca	1200
	Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala	
	385 390 395 400	
	tcc att ttt ctc acc aaa agc aca aag ctg aca tgt ctt gtg aca gac	1248

[0004]	Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp 405 410 415	
	etc aca acg tac gat tca gtc aca att tca tgg acc agg cag aat ggg Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly 420 425 430	1296
	gag gcg gta aag acg cac acc aac att teg gaa agc cat ccc aac gcc Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala 435 440 445	1344
	acg ttt tgc gcg gtc ggg gag gca tgc att tgt gag gac gat tgg aat Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn 450 455 460	1392
	tca ggg gag cgc ttc aca tgc acg gtc act cac acg gat etc cca tcc Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser 465 470 475 480	1440
	ccg ttg aag cag aca atc teg cga ccc aaa ggt gtc gca ctg cac agg Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg 485 490 495	1488
	ccc gac gtc tac etc etg cct cct gcc agg gaa cag etc aac etc cgg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg 500 505 510	1536
	gaa tca gca acg atc acg tgt ctt gta acc ggg ttt tca ccg gct gac Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp 515 520 525	1584
	gtc ttt gtc caa tgg atg cag cgg gga caa ccc ttg tca cca gag aag Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys 530 535 540	1632
	tat gtg aca tca gcg ccc atg ccc gag cca cag gct ccg ggt agg tat Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr 545 550 555 560	1680
	ttt gcc cat tcc atc etc act gtg tcc gag gaa gag tgg aac acc ggc Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly 565 570 575	1728
	gaa acg tac acg tgc gtc gta gca cac gaa gcg ttg ccc aat aga gtg	1776

Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val	
580 585 590	
act gag aga act gta gat aag tcc act gag ggc gaa gta agc gcg gat	1824
Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp	
595 600 605	
gaa gaa ggt ttc gaa aac ttg tgg gct aca gcg agc acg ttt atc gtg	1872
Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val	
610 615 620	
ttg ttc ttg ctt tca ctc ttc tac tcc aca act gta acc ctg ttc aag	1920
Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys	
625 630 635 640	
gtc aag tag	1929
Val Lys	

[0005]

<210> 2
 <211> 642
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 2

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser
1 5 10 15

Gly Ala Tyr Gly Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys
20 25 30

Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val
35 40 45

Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr
50 55 60

	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile	
	65					70					75					80	
	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Val	Ile	
					85					90					95		
	Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	
					100					105					110		
	Ala	Thr	Ala	Glu	Lys	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val	
					115					120					125		
	Asp	Gly	Glu	Trp	Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	
					130					135					140		
[0006]	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	
	145					150					155					160	
	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe	
					165					170					175		
	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala	
					180					185					190		
	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser	
					195					200					205		
	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro	
					210					215					220		
	Ser	Val	Leu	Arg	Gly	Gly	Lys	Tyr	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	
	225					230					235					240	

Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp
595 600 605

Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val
610 615 620

Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys
625 630 635 640

Val Lys

<210> 3

<211> 1884

<212> DNA

<213> 人工序列

[0009]

<220>

<223> 嵌合蛋白: BBP-IgAB

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1884)

<400> 3

atg ccg ggt gga ccc gga gtg ctc cag gca ttg cct gca acc atc ttc 48
Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
1 5 10 15

ctg ctg ttc ttg ttg tcc gcc gtc tac ctt gga cct ggt tgc cag gca 96
Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
20 25 30

act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg aag ggt gag acc acc 144
Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr
35 40 45

	act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag gtc ttt aaa cag tat	192
	Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr	
	50 55 60	
	gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc tac gat gac gcc act	240
	Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr	
	65 70 75 80	
	aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg att gac geg tcc gaa	288
	Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu	
	85 90 95	
	ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt atc aac ggc aag act	336
	Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr	
	100 105 110	
	ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat gcc gcc acc gcc gag	384
	Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu	
	115 120 125	
[0010]	aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg gtg gac ggg gag tgg	432
	Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp	
	130 135 140	
	acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg acc gag aag ccc gaa	480
	Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu	
	145 150 155 160	
	gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg aca ggt tet get teg	528
	Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Gly Ser Ala Ser	
	165 170 175	
	ggc tca gga ctg tgg atg cat aag gtg cct gca teg ctc atg gtg agc	576
	Gly Ser Gly Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser	
	180 185 190	
	ctg ggc gaa gat gca cat ttt cag tgt ccc cat aac agc tcc aac aac	624
	Leu Gly Glu Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn	
	195 200 205	
	gcg aac gtg acc tgg tgg cgg gtg ctc cat gcc aat tac acc tgg ccg	672
	Ala Asn Val Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro	
	210 215 220	

	cct gaa ttt ctc gga ccg gga gag gac ccg aat ggg acc ctt atc atc Pro Glu Phe Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile 225 230 235 240	720
	cag aac gtg aat aag tcc cac gga gga atc tac gtc tgc cgc gtg caa Gln Asn Val Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln 245 250 255	768
	gag gga aat gag agc tac caa cag tca tgc gga acg tac ctc cgc gtc Glu Gly Asn Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val 260 265 270	816
	egg cag cca cca ccg agg ccg ttc ctc gat atg gga gag gga act aag Arg Gln Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys 275 280 285	864
	aac egg atc att acc gcc gaa ggc atc atc ctc ctc ttc tgc gcc gtc Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val 290 295 300	912
[0011]	gtg ccg ggg act ctg ctt ctg ttc cgg aaa agg tgg caa aac gaa aag Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys 305 310 315 320	960
	ctg ggt ctg gac gct ggg gac gaa tac gag gat gaa aac ttg tac gag Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu 325 330 335	1008
	ggc ctg aat ctg gac gat tgc tgc atg tat gag gac att agc aga gga Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly 340 345 350	1056
	ctg cag ggt acc tac caa gac gtg gga agc ctg aac atc ggg gat gtg Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val 355 360 365	1104
	cag ctc gag aaa cca agg aaa aga aga gct agc gaa gga cgc gga tca Gln Leu Glu Lys Pro Arg Lys Arg Arg Ala Ser Glu Gly Arg Gly Ser 370 375 380	1152
	ctg ctt act tgc ggc gat gtc gaa gaa aat ccc gga cca atg gcc aga Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Arg 385 390 395 400	1200

	ttg gcg ctg tcg ccg gtc cct tcg cac tgg atg gtg gcc ctg ctg ctc Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu 405 410 415	1248
	ttg ctt tcg gcg gct gag ccg gtg cca gcg get aga tcg gag gac cgc Leu Leu Ser Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg 420 425 430	1296
	tac aga aat ccg aag ggt tcc get tgc tca cgc atc tgg caa tca cca Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro 435 440 445	1344
	cgc ttc atc gcg cgc aaa cgc ggc ttc act gtc aag atg cac tgc tat Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr Val Lys Met His Cys Tyr 450 455 460	1392
	atg aac tcg gcc agc ggg aat gtg tcg tgg ctg tgg aag cag gaa atg Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met 465 470 475 480	1440
[0012]	gac gag aat ccg cag caa ctg aaa ctg gag aag ggc cgg atg gaa gaa Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu 485 490 495	1488
	tcc cag aat gag tcg ctg gcc acc ctt act atc caa ggt atc cgg ttt Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe 500 505 510	1536
	gaa gat aac ggg atc tac ttc tgt caa cag aag tgt aac aac act tca Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser 515 520 525	1584
	gag gtg tac cag gga tgc ggc acc gaa ctc cgc gtc atg gga ttc tcc Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser 530 535 540	1632
	acc ctc gcc caa ctg aag cag cgc aac acg ctg aag gac ggc atc att Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile 545 550 555 560	1680
	atg atc cag acc ctg ctg atc atc ctg ttc atc att gtg ccg atc ttt Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe 565 570 575	1728

ctg ctc ttg gat aag gac gac tcg aaa gcc gga atg gaa gag gac cac 1776
 Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His
 580 585 590

acg tac gaa ggt ctg gac atc gac caa act gcg act tac gag gac att 1824
 Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
 595 600 605

gtg acc ctc cgg act ggc gaa gtc aag tgg tcc gtg ggt gaa cac cct 1872
 Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
 610 615 620

gga cag gaa tag 1884
 Gly Gln Glu
 625

<210> 4
 <211> 627
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0013]

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 4

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
 20 25 30

Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr
 35 40 45

Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr
 50 55 60

Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr

65	70	75	80
Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu			
85	90	95	
Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr			
100	105	110	
Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu			
115	120	125	
Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp			
130	135	140	
Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu			
145	150	155	160
[0014]			
Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Gly Ser Ala Ser			
165	170	175	
Gly Ser Gly Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser			
180	185	190	
Leu Gly Glu Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn			
195	200	205	
Ala Asn Val Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro			
210	215	220	
Pro Glu Phe Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile			
225	230	235	240
Gln Asn Val Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln			

	245	250	255
Glu Gly Asn Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val			
	260	265	270
Arg Gln Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys			
	275	280	285
Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val			
	290	295	300
Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys			
	305	310	315
			320
Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu			
	325	330	335
[0015]			
Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly			
	340	345	350
Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val			
	355	360	365
Gln Leu Glu Lys Pro Arg Lys Arg Arg Ala Ser Glu Gly Arg Gly Ser			
	370	375	380
Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Arg			
	385	390	395
			400
Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu			
	405	410	415
Leu Leu Ser Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg			

	420		425		430
Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro					
	435		440		445
Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr Val Lys Met His Cys Tyr					
	450		455		460
Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met					
465		470		475	480
Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu					
	485		490		495
Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe					
	500		505		510
[0016]					
Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser					
	515		520		525
Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser					
	530		535		540
Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile					
545		550		555	560
Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe					
	565		570		575
Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His					
	580		585		590
Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile					

	595	600	605	
	Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro			
	610	615	620	
	Gly Gln Glu			
	625			
	<210> 5			
	<211> 936			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 嵌合蛋白: BBP-CD3Z			
	<220>			
[0017]	<221> CDS			
	<222> (1).. (936)			
	<400> 5			
	atg aag tgg aag gcg ctt ttc acc gcg gcc atc ctg cag gca cag ttg			48
	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu			
	1 5 10 15			
	cag att aca gag gca act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg			96
	Pro Ile Thr Glu Ala Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu			
	20 25 30			
	aag ggt gag acc acc act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag			144
	Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys			
	35 40 45			
	gtc ttt aaa cag tat gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc			192
	Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr			
	50 55 60			
	tac gat gac gcc act aag aca ttc act glg act gaa aag ccc gag gtg			240
	Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val			
	65 70 75 80			

	att gac gcg tcc gaa ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val 85 90 95	288
	atc aac ggc aag act ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp 100 105 110	336
	gcc gcc acc gcc gag aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly 115 120 125	384
	gtg gac ggg gag tgg acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val 130 135 140	432
	acc gag aag ccc gaa gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val 145 150 155 160	480
[0018]	aca ggt tct gct tct ggt tct ggt cag agc ttt ggc ctg ctg gat ccc Thr Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro 165 170 175	528
	aaa ctc tgc tac ctg ctg gat gga atc ctc ttc atc tat ggt gtc att Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile 180 185 190	576
	ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg aag ttc agc agg agc gca gac gcc Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala 195 200 205	624
	ccc gcg tac cag cag ggc cag aac cag ctc tat aac gag ctc aat cta Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu 210 215 220	672
	gga cga aga gag gag tac gat gtt ttg gac aag aga cgt ggc cgg gac Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp 225 230 235 240	720
	cct gag atg ggg gga aag ccg cag aga agg aag aac cct cag gaa ggc Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly 245 250 255	768

ctg tac aat gaa ctg cag aaa gat aag atg gcg gag gcc tac agt gag	816
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu	
260 265 270	
att ggg atg aaa ggc gag cgc cgg agg ggc aag ggg cac gat ggc ctt	864
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu	
275 280 285	
tac cag ggt ctc agt aca gcc acc aag gac acc tac gac gcc ctt cac	912
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His	
290 295 300	
atg cag gcc ctg ccc cct cgc taa	936
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
305 310	

<210> 6
 <211> 311
 <212> PRT
 [0019] <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 6

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu
20 25 30

Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys
35 40 45

Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr
50 55 60

	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	
	65					70					75					80	
	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Val	
					85					90					95		
	Ile	Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Asp	
				100					105						110		
	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Lys	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	
				115					120						125		
	Val	Asp	Gly	Glu	Trp	Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	
		130					135						140				
[0020]	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	
	145					150					155					160	
	Thr	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe	Gly	Leu	Leu	Asp	Pro	
					165					170					175		
	Lys	Leu	Cys	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Phe	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	
					180				185						190		
	Leu	Thr	Ala	Leu	Phe	Leu	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	
				195					200						205		
	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	
		210					215					220					
	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	
	225					230					235				240		

Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
245 250 255

Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
260 265 270

Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
275 280 285

Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
290 295 300

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
305 310

[0021]

<210> 7

<211> 2340

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合蛋白: Fc γ R1-IgM

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2340)

<400> 7

atg att ctt acc agc ttt gga gat gac atg tgg ctt cta aca act ctg 48
Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu
1 5 10 15

cta ctt tgg gtt cca gtc ggt ggg gaa gtc gtt aat gcc acc aag gcc 96
Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala
20 25 30

gtg atc acc ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat 144
Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn

35	40	45	
gtc act tta tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca			192
Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr			
50	55	60	
caa tgg ttt atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat			240
Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr			
65	70	75	80
agc atc cca gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag			288
Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln			
85	90	95	
ata ggt tcc tca atg cca agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat			336
Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn			
100	105	110	
gat tgg ctg cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa			384
Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu			
115	120	125	
[0022] ccc ctg gcc ttg agg tgt cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat			432
Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn			
130	135	140	
gtg gtt ttc tat aga aat gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tgc			480
Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser			
145	150	155	160
gag gtc gcc att ctg aaa acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac			528
Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His			
165	170	175	
tgc tca ggc acg gga aga cac cgc tac aca tct gea gga gtg tcc atc			576
Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile			
180	185	190	
acg gtg aaa gag ctg ttt acc acg cca gig ctg aga gea tcc gtg tca			624
Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser			
195	200	205	
tct ccc ttc ccg gag ggg agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat			672
Ser Pro Phe Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn			

210	215	220	
ttg ctc ctg cag aga ccc ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg			720
Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val			
225	230	235	240
ggc agc aag atc ctg gag tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata			768
Gly Ser Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile			
245	250	255	
gca agg gcg gaa aga gaa gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc			816
Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala			
260	265	270	
acg gag gac agc agt gtc ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa			864
Thr Glu Asp Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln			
275	280	285	
gtg ctt ggt ccc cag tca tca gct cct ggt tct gct tct ggt tct ggt			912
Val Leu Gly Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly			
290	295	300	
[0023]			
ggt tca gca tca gca cca act ttg ttt cca ctt gtc tca tgt gag aac			960
Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn			
305	310	315	320
tcg cca tcg gat acc tcg agc gta gcg gtc gga tgt ctc gct caa gac			1008
Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp			
325	330	335	
ttt ctt ccg gac agc atc acg ttt tca tgg aag tat aag aac aat tcg			1056
Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser			
340	345	350	
gat att tcg agc acg cga gga ttt ccc agc gta ttg aga ggg gga aag			1104
Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys			
355	360	365	
tac gcg gca aca agc cag gtg ctg ctc cca agc aag gat gtg atg cag			1152
Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln			
370	375	380	
ggc act gac gag cat gta gta tgc aag gta cag cac ccc aat gga aac			1200
Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn			

385	390	395	400	
aag gaa aag aat gtc cct ctg cct gta att gcc gag ctc cct cct aaa				1248
Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys				
	405	410	415	
gtg tca gtg ttc gtg ccg ccc aga gat ggg ttc ttt gga aac ccg cga				1296
Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg				
	420	425	430	
tcg aag tcg aaa ctg atc tgc cag gcc acg gga ttc agc cct cgg cag				1344
Ser Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln				
	435	440	445	
att caa gtg tcg tgg ttg cgg gag gga aaa cag gtg gga tcg ggg gtg				1392
Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val				
	450	455	460	
acc aca gac cag gtg cag gcg gag gct aaa gaa agc ggt ccc acc aca				1440
Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr				
	465	470	475	480
[0024]				
tat aag gtc act tcc acc ctt act att aag gaa tcg gat tgg ttg tca				1488
Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser				
	485	490	495	
cag tcg atg ttc aca tgt aga gtc gat cat cgc gga ctc acg ttt caa				1536
Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln				
	500	505	510	
cag aac gcg tca tca atg tgt gta ccc gat caa gat acg gcg atc aga				1584
Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg				
	515	520	525	
gta ttc gcc att ccg cct agc ttc gca tcc att ttt ctc acc aaa agc				1632
Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser				
	530	535	540	
aca aag ctg aca tgt ctt gtg aca gac ctc aca acg tac gat tca gtc				1680
Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val				
	545	550	555	560
aca att tca tgg acc agg cag aat ggg gag gcg gta aag acg cac acc				1728
Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr				

	565	570	575	
	aac att tcg gaa agc cat ccc aac gcc acg ttt tcg gcg gtc ggg gag			1776
	Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu			
	580	585	590	
	gca tcg att tgt gag gac gat tgg aat tca ggg gag cgc ttc aca tgc			1824
	Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys			
	595	600	605	
	acg gtc act cac acg gat ctc cca tcc ccg ttg aag cag aca atc tcg			1872
	Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser			
	610	615	620	
	cga ccc aaa ggt gtc gca ctg cac agg ccc gac gtc tac ctc ctg cct			1920
	Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro			
	625	630	635	640
	cct gcc agg gaa cag ctc aac ctc cgg gaa tca gca acg atc acg tgt			1968
	Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys			
	645	650	655	
[0025]	ctt gta acc ggg ttt tca ccg gct gac gtc ttt gtc caa tgg atg cag			2016
	Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln			
	660	665	670	
	cgg gga caa ccc ttg tca cca gag aag tat gtg aca tca gcg ccc atg			2064
	Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met			
	675	680	685	
	ccc gag cca cag gct ccg ggt agg tat ttt gcc cat tcc atc ctc act			2112
	Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr			
	690	695	700	
	gtg tcc gag gaa gag tgg aac acc ggc gaa acg tac acg tgc gtc gta			2160
	Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val			
	705	710	715	720
	gca cac gaa gcg ttg ccc aat aga gtg act gag aga act gta gat aag			2208
	Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys			
	725	730	735	
	tcc act gag ggc gaa gta agc gcg gat gaa gaa ggt ttc gaa aac ttg			2256
	Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu			

	740	745	750	
	tgg gct aca gcg agc acg ttt atc gtg ttg ttc ttg ctt tca ctc ttc			2304
	Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe			
	755	760	765	
	tac tcc aca act gta acc ctg ttc aag gtc aag tag			2340
	Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys Val Lys			
	770	775		
<210>	8			
<211>	779			
<212>	PRT			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	合成构建体			
<400>	8			
[0026]	Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu			
	I 5 10 15			
	Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala			
	20 25 30			
	Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn			
	35 40 45			
	Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr			
	50 55 60			
	Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr			
	65 70 75 80			
	Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln			
	85 90 95			

Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn
100 105 110

Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu
115 120 125

Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn
130 135 140

Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser
145 150 155 160

Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His
165 170 175

[0027] Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile
180 185 190

Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser
195 200 205

Ser Pro Phe Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn
210 215 220

Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val
225 230 235 240

Gly Ser Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile
245 250 255

Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala
260 265 270

	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Glu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Ser	Gly	Val
	450						455						460			
	Thr	Thr	Asp	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Ala	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr
	465					470					475					480
	Tyr	Lys	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Glu	Ser	Asp	Trp	Leu	Ser
					485					490						495
	Gln	Ser	Met	Phe	Thr	Cys	Arg	Val	Asp	His	Arg	Gly	Leu	Thr	Phe	Gln
			500						505					510		
	Gln	Asn	Ala	Ser	Ser	Met	Cys	Val	Pro	Asp	Gln	Asp	Thr	Ala	Ile	Arg
			515					520						525		
[0029]	Val	Phe	Ala	Ile	Pro	Pro	Ser	Phe	Ala	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser
	530						535					540				
	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val
	545					550					555					560
	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr
					565					570					575	
	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala	Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu
				580					585					590		
	Ala	Ser	Ile	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn	Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys
			595					600					605			
	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser
	610						615					620				

Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro
625 630 635 640

Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys
645 650 655

Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln
660 665 670

Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met
675 680 685

Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr
690 695 700

[0030] Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val
705 710 715 720

Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys
725 730 735

Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu
740 745 750

Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe
755 760 765

Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys Val Lys
770 775

<210> 9

<211> 2259

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合蛋白: Fc γ R1-IgAB

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2259)

<400> 9

atg att ctt acc agc ttt gga gat gac atg tgg ctt cta aca act ctg 48

Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu

1 5 10 15

cta ctt tgg gtt cca gtc ggt ggg gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct 96

Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala

20 25 30

gtg atc acc ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat 144

Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn

35 40 45

[0031]

gtc act tta tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca 192

Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr

50 55 60

caa tgg ttt atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat 240

Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr

65 70 75 80

agc atc cca gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag 288

Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln

85 90 95

ata ggt tcc tca atg cca agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat 336

Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn

100 105 110

gat tgg ctg cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa 384

Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu

115 120 125

ccc ctg gcc ttg agg tgt cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat 432

[0032]	Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn 130 135 140	
	gtg gtt ttc tat aga aat gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tgc Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser 145 150 155 160	480
	gag gtc gcc att ctg aaa acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His 165 170 175	528
	tgc tca ggc acg gga aga cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile 180 185 190	576
	acg gtg aaa gag ctg ttt acc acg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser 195 200 205	624
	tct ccc ttc ccg gag ggg agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat Ser Pro Phe Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn 210 215 220	672
	ttg ctc ctg cag aga ccc ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val 225 230 235 240	720
	ggc agc aag atc ctg gag tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata Gly Ser Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile 245 250 255	768
	gca agg gcg gaa aga gaa gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala 260 265 270	816
	acg gag gac agc agt gtc ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa Thr Glu Asp Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln 275 280 285	864
	gtg ctt ggt ccc cag tca tca gct cct ggt tct gct tgc ggc tca gga Val Leu Gly Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly 290 295 300	912
	ctg tgg atg cat aag gtg cct gca tgc ctc atg gtg agc ctg ggc gaa	960

[0033]	Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu	
	305 310 315 320	
	gat gca cat ttt cag tgt ccc cat aac agc tcc aac aac gcg aac gtg	1008
	Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val	
	325 330 335	
	acc tgg tgg cgg gtg etc cat ggc aat tac acc tgg ccg cct gaa ttt	1056
	Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe	
	340 345 350	
	etc gga ccg gga gag gac ccg aat ggg acc ctt atc atc cag aac gtg	1104
	Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val	
	355 360 365	
	aat aag tcc cac gga gga atc tac gtc tgc cgc gtg caa gag gga aat	1152
	Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn	
	370 375 380	
	gag agc tac caa cag tca tgc gga acg tac etc cgc gtc ccg cag cca	1200
	Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro	
	385 390 395 400	
[0033]	cca ccg agg ccg ttc etc gat atg gga gag gga act aag aac cgg atc	1248
	Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile	
	405 410 415	
	att acc gcc gaa ggc atc atc etc etc ttc tgc gcc gtc gtg ccg ggg	1296
	Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly	
	420 425 430	
	act ctg ctt ctg ttc cgg aaa agg tgg caa aac gaa aag ctg ggt ctg	1344
	Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu	
	435 440 445	
	gac gct ggg gac gaa tac gag gat gaa aac ttg tac gag ggc ctg aat	1392
	Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn	
	450 455 460	
	ctg gac gat tgc tcg atg tat gag gac att agc aga gga ctg cag ggt	1440
	Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly	
	465 470 475 480	
	acc tac caa gac gtg gga agc ctg aac atc ggg gat gtg cag etc gag	1488

[0034]	Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu	
	485 490 495	
	aaa cca agg aaa aga aga gct agc gaa gga cgc gga tca ctg ctt act	1536
	Lys Pro Arg Lys Arg Arg Ala Ser Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr	
	500 505 510	
	tgc ggc gat gtc gaa gaa aat ccc gga cca atg gcc aga ttg gcg ctg	1584
	Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Arg Leu Ala Leu	
	515 520 525	
	tcg ccg gtc cct tcg cac tgg atg gtg gcc ctg ctg ctc ttg ctt tcg	1632
	Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu Leu Ser	
	530 535 540	
	gcg gct gag ccg gtg cca gcg gct aga tcg gag gac cgc tac aga aat	1680
	Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn	
	545 550 555 560	
	ccg aag ggt tcc gct tgc tca cgc atc tgg caa tca cca cgc ttc atc	1728
	Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile	
	565 570 575	
	gcg cgc aaa cgc ggc ttc act gtc aag atg cac tgc tat atg aac tcg	1776
	Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser	
	580 585 590	
	gcc agc ggg aat gtg tcg tgg ctg tgg aag cag gaa atg gac gag aat	1824
	Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn	
	595 600 605	
	ccg cag caa ctg aaa ctg gag aag ggc cgg atg gaa gaa tcc cag aat	1872
	Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn	
	610 615 620	
	gag tcg ctg gcc acc ctt act atc caa ggt atc cgg ttt gaa gat aac	1920
	Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn	
	625 630 635 640	
	ggg atc tac ttc tgt caa cag aag tgt aac aac act tca gag gtg tac	1968
	Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr	
	645 650 655	
	cag gga tgc ggc acc gaa ctc cgc gtc atg gga ttc tcc acc ctc gcc	2016

	Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala	
	660 665 670	
	caa ctg aag cag cgc aac acg ctg aag gac ggc atc att atg atc cag	2064
	Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln	
	675 680 685	
	acc ctg ctg atc atc ctg ttc atc att gtg cgc atc ttt ctg ctc ttg	2112
	Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu	
	690 695 700	
	gat aag gac gac tcg aaa gcc gga atg gaa gag gac cac acg tac gaa	2160
	Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu	
	705 710 715 720	
	ggt ctg gac atc gac caa act gcg act tac gag gac att gtg acc ctc	2208
	Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu	
	725 730 735	
	cgg act ggc gaa gtc aag tgg tcc gtg ggt gaa cac cct gga cag gaa	2256
[0035]	Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu	
	740 745 750	
	tag	2259
	<210> 10	
	<211> 752	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 10	
	Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu	
	1 5 10 15	
	Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala	
	20 25 30	

Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn
35 40 45

Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr
50 55 60

Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr
65 70 75 80

Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln
85 90 95

Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn
100 105 110

[0036] Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu
115 120 125

Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn
130 135 140

Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser
145 150 155 160

Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His
165 170 175

Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile
180 185 190

Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser
195 200 205

	Ser	Pro	Phe	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Asn	Cys	Glu	Thr	Asn	
	210						215					220					
	Leu	Leu	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	His	Phe	Ser	Phe	Tyr	Val	
	225					230				235					240		
	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	His	Ile	
				245					250						255		
	Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Ala	
			260					265					270				
	Thr	Glu	Asp	Ser	Ser	Val	Leu	Lys	Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	
		275						280					285				
[0037]	Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	
	290					295						300					
	Leu	Trp	Met	His	Lys	Val	Pro	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ser	Leu	Gly	Glu	
	305					310					315				320		
	Asp	Ala	His	Phe	Gln	Cys	Pro	His	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn	Ala	Asn	Val	
					325					330				335			
	Thr	Trp	Trp	Arg	Val	Leu	His	Gly	Asn	Tyr	Thr	Trp	Pro	Pro	Glu	Phe	
				340					345					350			
	Leu	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Ile	Ile	Gln	Asn	Val	
		355						360					365				
	Asn	Lys	Ser	His	Gly	Gly	Ile	Tyr	Val	Cys	Arg	Val	Gln	Glu	Gly	Asn	
	370						375					380					

	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Ser	Cys	Gly	Thr	Tyr	Leu	Arg	Val	Arg	Gln	Pro	
	385					390					395					400	
	Pro	Pro	Arg	Pro	Phe	Leu	Asp	Met	Gly	Glu	Gly	Thr	Lys	Asn	Arg	Ile	
					405					410					415		
	Ile	Thr	Ala	Glu	Gly	Ile	Ile	Leu	Leu	Phe	Cys	Ala	Val	Val	Pro	Gly	
				420					425						430		
	Thr	Leu	Leu	Leu	Phe	Arg	Lys	Arg	Trp	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly	Leu	
		435						440						445			
	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asn	Leu	Tyr	Glu	Gly	Leu	Asn	
		450					455					460					
[0038]	Leu	Asp	Asp	Cys	Ser	Met	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	
	465					470					475					480	
	Thr	Tyr	Gln	Asp	Val	Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Gly	Asp	Val	Gln	Leu	Glu	
					485					490					495		
	Lys	Pro	Arg	Lys	Arg	Arg	Ala	Ser	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	
				500					505					510			
	Cys	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	
				515				520					525				
	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	His	Trp	Met	Val	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	
		530					535				540						
	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	Ala	Arg	Ser	Glu	Asp	Arg	Tyr	Arg	Asn	
	545					550					555					560	

Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu
740 745 750

<210> II

<211> 1335

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合蛋白: Fc γ RI-CD3Z

<220>

<221> CDS

<222> (I), (1335)

<400> II

atg aag tgg aag gcg ctt ttc acc gcg gcc atc ctg cag gca cag ttg 48
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

[0040]

cag att aca gag gca gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct gtg atc acc 96
Pro Ile Thr Glu Ala Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr
20 25 30

ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat gtc act ita 144
Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu
35 40 45

tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca caa tgg ttt 192
Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe
50 55 60

atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat agc atc cca 240
Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro
65 70 75 80

gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag ata ggt tcc 288
Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser
85 90 95

tca atg cca agt gac cct gtg cag tgg caa atc cac aat gat tgg ctg 336
Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu

	100	105	110	
	cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa ccc ctg gcc			384
	Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala			
	115	120	125	
	ttg agg tgt cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat gtg gtt ttc			432
	Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe			
	130	135	140	
	tat aga aat gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tcg gag gtc gcc			480
	Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala			
	145	150	155	160
	att ctg aaa acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac tgc tca ggc			528
	Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly			
	165	170	175	
	acg gga aga cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc acg gtg aaa			576
	Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys			
	180	185	190	
[0041]	gag ctg ttt acc acg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca tct ccc ttc			624
	Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe			
	195	200	205	
	ccg gag ggg agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat ttg ctc ctg			672
	Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu			
	210	215	220	
	eag aga ecc ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg ggc agc aag			720
	Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val Gly Ser Lys			
	225	230	235	240
	atc ctg gag tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata gca agg gcg			768
	Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile Ala Arg Ala			
	245	250	255	
	gaa aga gaa gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc acg gag gac			816
	Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala Thr Glu Asp			
	260	265	270	
	agc agt gtc ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa gtg ctt ggt			864
	Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly			

275	280	285	
ccc cag tca tca gct cct ggt tct gct tct ggt tct ggt cag agc ttt			912
Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Phe			
290	295	300	
ggc ctg ctg gat ccc aaa etc tgc tac ctg ctg gat gga atc etc ttc			960
Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe			
305	310	315	320
atc tat ggt gtc att ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg aag ttc agc			1008
Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser			
325	330	335	
agg agc gca gac gcc ccc gcg tac cag cag ggc cag aac cag etc tat			1056
Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr			
340	345	350	
aac gag ctc aat cta gga cga aga gag gag tac gat gtt ttg gac aag			1104
Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys			
355	360	365	
[0042] aga cgt ggc cgg gac cct gag atg ggg gga aag ccg cag aga agg aag			1152
Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys			
370	375	380	
aac cct cag gaa ggc ctg tac aat gaa ctg cag aaa gat aag atg gcg			1200
Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala			
385	390	395	400
gag gcc tac agt gag att ggg atg aaa ggc gag cgc cgg agg ggc aag			1248
Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys			
405	410	415	
ggg cac gat ggc ctt tac cag ggt ctc agt aca gcc acc aag gac acc			1296
Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr			
420	425	430	
tac gac gcc ctt cac atg cag gcc ctg ccc cct cgc taa			1335
Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
435	440		
<210> 12			

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

Met	Lys	Trp	Lys	Ala	Leu	Phe	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Gln	Ala	Gln	Leu
1				5						10				15	

Pro	Ile	Thr	Glu	Ala	Glu	Val	Val	Asn	Ala	Thr	Lys	Ala	Val	Ile	Thr
			20					25					30		

Leu	Gln	Pro	Pro	Trp	Val	Ser	Ile	Phe	Gln	Lys	Glu	Asn	Val	Thr	Leu
		35					40						45		

[0043] Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe

50						55						60			
----	--	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	----	--	--	--

Ile	Asn	Gly	Thr	Ala	Val	Gln	Ile	Ser	Thr	Pro	Ser	Tyr	Ser	Ile	Pro
65					70					75				80	

Glu	Ala	Ser	Phe	Gln	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Ile	Gly	Ser
				85					90					95	

Ser	Met	Pro	Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Gln	Ile	His	Asn	Asp	Trp	Leu
				100				105						110	

Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Arg	Arg	Val	Leu	Thr	Glu	Gly	Glu	Pro	Leu	Ala
				115				120					125		

Leu	Arg	Cys	His	Gly	Trp	Lys	Asn	Lys	Leu	Val	Tyr	Asn	Val	Val	Phe
		130					135					140			

	Tyr	Arg	Asn	Gly	Lys	Ser	Phe	Gln	Phe	Ser	Ser	Asp	Ser	Glu	Val	Ala
	145					150				155						160
	Ile	Leu	Lys	Thr	Asn	Leu	Ser	His	Ser	Gly	Ile	Tyr	His	Cys	Ser	Gly
					165					170					175	
	Thr	Gly	Arg	His	Arg	Tyr	Thr	Ser	Ala	Gly	Val	Ser	Ile	Thr	Val	Lys
				180					185					190		
	Glu	Leu	Phe	Thr	Thr	Pro	Val	Leu	Arg	Ala	Ser	Val	Ser	Ser	Pro	Phe
			195					200					205			
	Pro	Glu	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Leu	Asn	Cys	Glu	Thr	Asn	Leu	Leu	Leu
	210						215					220				
[0044]	Gln	Arg	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	His	Phe	Ser	Phe	Tyr	Val	Gly	Ser	Lys
	225					230					235					240
	Ile	Leu	Glu	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	His	Ile	Ala	Arg	Ala
					245					250				255		
	Glu	Arg	Glu	Asp	Ala	Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Ala	Thr	Glu	Asp
				260					265					270		
	Ser	Ser	Val	Leu	Lys	Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Gly
			275					280					285			
	Pro	Gln	Ser	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Gln	Ser	Phe
	290						295					300				
	Gly	Leu	Leu	Asp	Pro	Lys	Leu	Cys	Tyr	Leu	Leu	Asp	Gly	Ile	Leu	Phe
	305					310					315					320

Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser
325 330 335

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
340 345 350

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
355 360 365

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys
370 375 380

Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
385 390 395 400

[0045] Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
405 410 415

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
420 425 430

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
435 440

<210> 13

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合蛋白: Fc γ R1-IgE

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1848)

<400> 13

cat atg gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct gtg atc acc ttg cag cct	48
His Met Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro	
1 5 10 15	

cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat gtc act tta tgg tgt gag	96
Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu Trp Cys Glu	
20 25 30	

ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca caa tgg ttt atc aac gga	144
Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe Ile Asn Gly	
35 40 45	

aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat agc atc cca gag gcc agt	192
Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro Glu Ala Ser	
50 55 60	

ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag ata ggt tcc tca atg cca	240
Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser Ser Met Pro	
65 70 75 80	

[0046]

agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat gat tgg ctg cta ctc cag	288
Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu Leu Leu Gln	
85 90 95	

gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa ccc ctg gcc ttg agg tgt	336
Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys	
100 105 110	

cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat gtg gtt ttc tat aga aat	384
His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe Tyr Arg Asn	
115 120 125	

gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tgg gag gtc gcc att ctg aaa	432
Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala Ile Leu Lys	
130 135 140	

acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac tgc tca ggc acg gga aga	480
Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly Thr Gly Arg	
145 150 155 160	

cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc acg gtg aaa gag ctg ttt	528
---	-----

	His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys Glu Leu Phe	
	165 170 175	
	acc aeg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca tct ccc ttc ccg gag ggg	576
	Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe Pro Glu Gly	
	180 185 190	
	agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat ttg ctc ctg cag aga ccc	624
	Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu Gln Arg Pro	
	195 200 205	
	ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg ggc age aag atc ctg gag	672
	Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val Gly Ser Lys Ile Leu Glu	
	210 215 220	
	tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata gca agg gcg gaa aga gaa	720
	Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile Ala Arg Ala Glu Arg Glu	
	225 230 235 240	
	gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc acg gag gac agc agt gtc	768
	Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala Thr Glu Asp Ser Ser Val	
[0047]	245 250 255	
	ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa gtg ctt ggt ccc cag tca	816
	Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Pro Gln Ser	
	260 265 270	
	tca gct cct ggt tct gct tct ggt tct ggt gtt cga cca gtt aac atc	864
	Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Pro Val Asn Ile	
	275 280 285	
	acc gag ccc aca ctg gaa ctg ctg cac agc agc tgc gac ccc aac gcc	912
	Thr Glu Pro Thr Leu Glu Leu Leu His Ser Ser Cys Asp Pro Asn Ala	
	290 295 300	
	ttc cac agc acc atc cag ctg tat tgc ttc atc tac ggc cac atc ctg	960
	Phe His Ser Thr Ile Gln Leu Tyr Cys Phe Ile Tyr Gly His Ile Leu	
	305 310 315 320	
	aac gac gtg tcc gtg tcc tgg ctg atg gac gac aga gag atc acc gac	1008
	Asn Asp Val Ser Val Ser Trp Leu Met Asp Asp Arg Glu Ile Thr Asp	
	325 330 335	
	acc ctg gcc cag acc gtg ctg atc aaa gag gaa ggc aag ctg gcc tct	1056

	Thr Leu Ala Gln Thr Val Leu Ile Lys Glu Glu Gly Lys Leu Ala Ser	
	340 345 350	
	acc tgc agc aag ctg aat atc aca gag cag cag tgg atg agc gag agc	1104
	Thr Cys Ser Lys Leu Asn Ile Thr Glu Gln Gln Trp Met Ser Glu Ser	
	355 360 365	
	acc ttc acc tgt aaa gtg acc tcc cag ggc gtg gac tac ctg gcc cac	1152
	Thr Phe Thr Cys Lys Val Thr Ser Gln Gly Val Asp Tyr Leu Ala His	
	370 375 380	
	acc aga aga tgc ccc gac cac gaa ccc aga ggc gtg atc acc tac ctg	1200
	Thr Arg Arg Cys Pro Asp His Glu Pro Arg Gly Val Ile Thr Tyr Leu	
	385 390 395 400	
	atc ccc cct agc ccc ctg gac ctg tac cag aac ggc gct cct aag ctg	1248
	Ile Pro Pro Ser Pro Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Gly Ala Pro Lys Leu	
	405 410 415	
	acc tgc ctg gtg gtg gac ctg gaa agc gag aag aac gtg aac gtg aca	1296
	Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Val Thr	
[0048]	420 425 430	
	tgg aac cag gaa aag aaa acc agc gtg tcc gcc agc cag tgg tac acc	1344
	Trp Asn Gln Glu Lys Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr	
	435 440 445	
	aag cac cac aac aac gcc acc acc tcc atc acc agc atc ctg ccc gtg	1392
	Lys His His Asn Asn Ala Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val	
	450 455 460	
	gtg gcc aag gac tgg atc gag ggc tac ggc tac cag tgc atc gtg gac	1440
	Val Ala Lys Asp Trp Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp	
	465 470 475 480	
	cac ccc gac ttc cct aag ccc atc gtg cgg agc atc acc aag acc cct	1488
	His Pro Asp Phe Pro Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro	
	485 490 495	
	ggc cag aga tct gcc ccc gag gtg tac gtg ttc ccc cca cct gag gaa	1536
	Gly Gln Arg Ser Ala Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu	
	500 505 510	
	gag tcc gag gac aag aga acc ctg acc tgt ctg atc cag aac ttc ttc	1584

	Glu Ser Glu Asp Lys Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe	
	515 520 525	
	cca gag gac atc agc gtg cag tgg ctg ggc gac ggc aag ctg atc tcc	1632
	Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser	
	530 535 540	
	aac agc cag cac agc aca acc acc cct ctg aag tcc aac ggc agc aac	1680
	Asn Ser Gln His Ser Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn	
	545 550 555 560	
	cag ggc ttc ttc atc ttc agc aga ctg gaa gtg gcc aag acc ctg tgg	1728
	Gln Gly Phe Phe Ile Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp	
	565 570 575	
	acc cag aga aag cag ttt aca tgc caa gtg atc cat gag gcc ctg cag	1776
	Thr Gln Arg Lys Gln Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln	
	580 585 590	
	aag ccc aga aag ctg gaa aag acc atc agc acc agc ctg ggc aac acc	1824
	Lys Pro Arg Lys Leu Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr	
	595 600 605	
[0049]	tec ctg cgc cct agt tag ctc gag	1848
	Ser Leu Arg Pro Ser Leu Glu	
	610 615	
	<210> 14	
	<211> 613	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 14	
	His Met Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro	
	1 5 10 15	
	Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu Trp Cys Glu	
	20 25 30	

Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe Ile Asn Gly
 35 40 45

Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro Glu Ala Ser
 50 55 60

Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser Ser Met Pro
 65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu Leu Leu Gln
 85 90 95

Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys
 100 105 110

[0050]

His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe Tyr Arg Asn
 115 120 125

Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala Ile Leu Lys
 130 135 140

Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly Thr Gly Arg
 145 150 155 160

His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys Glu Leu Phe
 165 170 175

Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe Pro Glu Gly
 180 185 190

Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu Gln Arg Pro
 195 200 205

	Gly	Leu	Gln	Leu	His	Phe	Ser	Phe	Tyr	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Leu	Glu	
	210						215					220					
	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	His	Ile	Ala	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	
	225					230					235				240		
	Asp	Ala	Gly	Phe	Tyr	Trp	Cys	Glu	Val	Ala	Thr	Glu	Asp	Ser	Ser	Val	
				245						250					255		
	Leu	Lys	Arg	Ser	Pro	Glu	Leu	Glu	Leu	Gln	Val	Leu	Gly	Pro	Gln	Ser	
				260						265					270		
	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Val	Arg	Pro	Val	Asn	Ile	
		275						280						285			
[0051]	Thr	Glu	Pro	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	His	Ser	Ser	Cys	Asp	Pro	Asn	Ala	
	290						295					300					
	Phe	His	Ser	Thr	Ile	Gln	Leu	Tyr	Cys	Phe	Ile	Tyr	Gly	His	Ile	Leu	
	305					310					315					320	
	Asn	Asp	Val	Ser	Val	Ser	Trp	Leu	Met	Asp	Asp	Arg	Glu	Ile	Thr	Asp	
				325						330					335		
	Thr	Leu	Ala	Gln	Thr	Val	Leu	Ile	Lys	Glu	Glu	Gly	Lys	Leu	Ala	Ser	
				340					345					350			
	Thr	Cys	Ser	Lys	Leu	Asn	Ile	Thr	Glu	Gln	Gln	Trp	Met	Ser	Glu	Ser	
		355						360					365				
	Thr	Phe	Thr	Cys	Lys	Val	Thr	Ser	Gln	Gly	Val	Asp	Tyr	Leu	Ala	His	
	370							375				380					

	Thr	Arg	Arg	Cys	Pro	Asp	His	Glu	Pro	Arg	Gly	Val	Ile	Thr	Tyr	Leu	
	385					390					395					400	
	Ile	Pro	Pro	Ser	Pro	Leu	Asp	Leu	Tyr	Gln	Asn	Gly	Ala	Pro	Lys	Leu	
				405						410						415	
	Thr	Cys	Leu	Val	Val	Asp	Leu	Glu	Ser	Glu	Lys	Asn	Val	Asn	Val	Thr	
			420						425							430	
	Trp	Asn	Gln	Glu	Lys	Lys	Thr	Ser	Val	Ser	Ala	Ser	Gln	Trp	Tyr	Thr	
		435						440						445			
	Lys	His	His	Asn	Asn	Ala	Thr	Thr	Ser	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Pro	Val	
		450						455					460				
[0052]	Val	Ala	Lys	Asp	Trp	Ile	Glu	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Cys	Ile	Val	Asp	
	465					470					475					480	
	His	Pro	Asp	Phe	Pro	Lys	Pro	Ile	Val	Arg	Ser	Ile	Thr	Lys	Thr	Pro	
				485						490						495	
	Gly	Gln	Arg	Ser	Ala	Pro	Glu	Val	Tyr	Val	Phe	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	
			500						505						510		
	Glu	Ser	Glu	Asp	Lys	Arg	Thr	Leu	Thr	Cys	Leu	Ile	Gln	Asn	Phe	Phe	
		515						520					525				
	Pro	Glu	Asp	Ile	Ser	Val	Gln	Trp	Leu	Gly	Asp	Gly	Lys	Leu	Ile	Ser	
		530					535					540					
	Asn	Ser	Gln	His	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro	Leu	Lys	Ser	Asn	Gly	Ser	Asn	
	545					550					555					560	

Gln Gly Phe Phe Ile Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp
 565 570 575

Thr Gln Arg Lys Gln Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln
 580 585 590

Lys Pro Arg Lys Leu Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr
 595 600 605

Ser Leu Arg Pro Ser
 610

<210> 15

<211> 1449

<212> DNA

<213> 人工序列

[0053]

<220>

<223> 嵌合蛋白: BBP-IgE

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1449)

<400> 15

cat atg act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg aag ggt gag 48
 His Met Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu
 1 5 10 15

acc acc act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag gtc itt aaa 96
 Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys
 20 25 30

cag tat gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc tac gat gac 144
 Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp
 35 40 45

	gcc act aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg att gac gcg Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala 50 55 60	192
	tcc gaa ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt atc aac ggc Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly 65 70 75 80	240
	aag act ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat gcc gcc acc Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr 85 90 95	288
	gcc gag aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg gtg gac ggg Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly 100 105 110	336
	gag tgg acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg acc gag aag Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys 115 120 125	384
[0054]	ccc gaa gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg aca ggt tct Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Gly Ser 130 135 140	432
	gct tct ggt tct ggt gtt cga cca gtt aac atc acc gag ccc aca ctg Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Pro Val Asn Ile Thr Glu Pro Thr Leu 145 150 155 160	480
	gaa ctg ctg cac agc agc tgc gac ccc aac gcc ttc cac agc acc atc Glu Leu Leu His Ser Ser Cys Asp Pro Asn Ala Phe His Ser Thr Ile 165 170 175	528
	cag ctg tat tgc ttc atc tac ggc cae atc ctg aac gac gtg tcc gtg Gln Leu Tyr Cys Phe Ile Tyr Gly His Ile Leu Asn Asp Val Ser Val 180 185 190	576
	tcc tgg ctg atg gac gac aga gag atc acc gac acc ctg gcc cag acc Ser Trp Leu Met Asp Asp Arg Glu Ile Thr Asp Thr Leu Ala Gln Thr 195 200 205	624
	gtg ctg atc aaa gag gaa ggc aag ctg gcc tct acc tgc agc aag ctg Val Leu Ile Lys Glu Glu Gly Lys Leu Ala Ser Thr Cys Ser Lys Leu 210 215 220	672

	aat atc aca gag cag cag tgg atg agc gag agc acc ttc acc tgt aaa	720
	Asn Ile Thr Glu Gln Gln Trp Met Ser Glu Ser Thr Phe Thr Cys Lys	
	225 230 235 240	
	gtg acc tcc cag ggc gtg gac tac ctg gcc cac acc aga aga tgc ccc	768
	Val Thr Ser Gln Gly Val Asp Tyr Leu Ala His Thr Arg Arg Cys Pro	
	245 250 255	
	gac cac gaa ccc aga ggc gtg atc acc tac ctg atc ccc cct agc ccc	816
	Asp His Glu Pro Arg Gly Val Ile Thr Tyr Leu Ile Pro Pro Ser Pro	
	260 265 270	
	ctg gac ctg tac cag aac ggc gct cct aag ctg acc tgc ctg gtg gtg	864
	Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Gly Ala Pro Lys Leu Thr Cys Leu Val Val	
	275 280 285	
	gac ctg gaa agc gag aag aac gtg aac gtg aca tgg aac cag gaa aag	912
	Asp Leu Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Val Thr Trp Asn Gln Glu Lys	
	290 295 300	
[0055]	aaa acc agc gtg tcc gcc agc cag tgg tac acc aag cac cac aac aac	960
	Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr Lys His His Asn Asn	
	305 310 315 320	
	gcc acc acc tcc atc acc agc atc ctg ccc gtg gtg gcc aag gac tgg	1008
	Ala Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val Val Ala Lys Asp Trp	
	325 330 335	
	atc gag ggc tac ggc tac cag tgc atc gtg gac cac ccc gac ttc cct	1056
	Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp His Pro Asp Phe Pro	
	340 345 350	
	aag ccc atc gtg egg agc atc acc aag acc cct ggc cag aga tct gcc	1104
	Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro Gly Gln Arg Ser Ala	
	355 360 365	
	ccc gag gtg tac gtg ttc ccc cca cct gag gaa gag tcc gag gac aag	1152
	Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu Glu Ser Glu Asp Lys	
	370 375 380	
	aga acc ctg acc tgt ctg atc cag aac ttc ttc cca gag gac atc agc	1200
	Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Ser	
	385 390 395 400	

```

gtg cag tgg ctg ggc gac ggc aag ctg atc tcc aac agc cag cac agc      1248
Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser Asn Ser Gln His Ser
          405              410              415

aca acc acc cct ctg aag tcc aac ggc agc aac cag ggc ttc ttc atc      1296
Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn Gln Gly Phe Phe Ile
          420              425              430

ttc agc aga ctg gaa gtg gcc aag acc ctg tgg acc cag aga aag cag      1344
Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp Thr Gln Arg Lys Gln
          435              440              445

ttt aca tgc caa gtg atc cat gag gcc ctg cag aag ccc aga aag ctg      1392
Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln Lys Pro Arg Lys Leu
          450              455              460

gaa aag acc atc agc acc agc ctg ggc aac acc tcc ctg cgc cct agt      1440
Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu Arg Pro Ser
          465              470              475              480

tag ctc gag      1449
Leu Glu

```

[0056]

```

<210> 16
<211> 480
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 16

```

```

His Met Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu
1              5              10              15

```

```

Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys
          20              25              30

```

```

Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp

```

35	40	45	
Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala			
50	55	60	
Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly			
65	70	75	80
Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr			
85	90	95	
Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly			
100	105	110	
Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys			
115	120	125	
[0057]			
Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Gly Ser			
130	135	140	
Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Pro Val Asn Ile Thr Glu Pro Thr Leu			
145	150	155	160
Glu Leu Leu His Ser Ser Cys Asp Pro Asn Ala Phe His Ser Thr Ile			
165	170	175	
Gln Leu Tyr Cys Phe Ile Tyr Gly His Ile Leu Asn Asp Val Ser Val			
180	185	190	
Ser Trp Leu Met Asp Asp Arg Glu Ile Thr Asp Thr Leu Ala Gln Thr			
195	200	205	
Val Leu Ile Lys Glu Glu Gly Lys Leu Ala Ser Thr Cys Ser Lys Leu			

210	215	220
Asn Ile Thr Glu Gln Gln Trp Met Ser Glu Ser Thr Phe Thr Cys Lys		
225	230	235 240
Val Thr Ser Gln Gly Val Asp Tyr Leu Ala His Thr Arg Arg Cys Pro		
245	250	255
Asp His Glu Pro Arg Gly Val Ile Thr Tyr Leu Ile Pro Pro Ser Pro		
260	265	270
Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Gly Ala Pro Lys Leu Thr Cys Leu Val Val		
275	280	285
Asp Leu Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Val Thr Trp Asn Gln Glu Lys		
290	295	300
[0058]		
Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr Lys His His Asn Asn		
305	310	315 320
Ala Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val Val Ala Lys Asp Trp		
325	330	335
Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp His Pro Asp Phe Pro		
340	345	350
Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro Gly Gln Arg Ser Ala		
355	360	365
Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu Glu Ser Glu Asp Lys		
370	375	380
Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Ser		

385	390	395	400
Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser Asn Ser Gln His Ser			
405	410	415	
Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn Gln Gly Phe Phe Ile			
420	425	430	
Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp Thr Gln Arg Lys Gln			
435	440	445	
Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln Lys Pro Arg Lys Leu			
450	455	460	
Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu Arg Pro Ser			
465	470	475	480

[0059]

<210> 17

<211> 864

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合蛋白: mSa-CD3Z

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(864)

<400> 17

atg aag tgg aaa gcc ctt ttt acc gcc gcc att ctg caa gcg caa ttg	48
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu	
1 5 10 15	

ccg atc act gaa gcc gca tcg gcc gag gcc ggt atc act gga acc tgg	96
Pro Ile Thr Glu Ala Ala Ser Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp	
20 25 30	

	tac aac cag cac gga tcc aca ttc acc gtg acc gcc ggt gct gac gga Tyr Asn Gln His Gly Ser Thr Phe Thr Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly 35 40 45	144
	aat ctg acc gga cag tac gag aat cgg gct cag ggc acc ggt tgt cag Asn Leu Thr Gly Gln Tyr Glu Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln 50 55 60	192
	aac tcc cct tac acc ctc act ggg aga tac aac ggc acc aag ctg gaa Asn Ser Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Arg Tyr Asn Gly Thr Lys Leu Glu 65 70 75 80	240
	tgg agg gtg gaa tgg aac aac tcc acc gaa aac tgc cat tcc cgc act Trp Arg Val Glu Trp Asn Asn Ser Thr Glu Asn Cys His Ser Arg Thr 85 90 95	288
	gag tgg cgc gga cag tat cag ggg gga gcc gaa gcg cgg atc aac acc Glu Trp Arg Gly Gln Tyr Gln Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr 100 105 110	336
[0060]	caa tgg aac ctg acc tac gag ggc ggg agc gga ccc gcg act gag cag Gln Trp Asn Leu Thr Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Thr Glu Gln 115 120 125	384
	ggc cag gat acg ttc act aag gtc aag ggc agc gca tca ggc tgc gga Gly Gln Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly 130 135 140	432
	cag agc ttt ggc ctg ctg gat ccc aaa ctc tgc tac ctg ctg gat gga Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly 145 150 155 160	480
	atc ctc ttc atc tat ggt gtc att ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val 165 170 175	528
	aag ttc agc agg agc gca gac gcc ccc gcg tac cag cag ggc cag aac Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn 180 185 190	576
	cag ctc tat aac gag ctc aat cta gga cga aga gag gag tac gat gtt Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val 195 200 205	624

ttg gac aag aga cgt ggc cgg gac cct gag atg ggg gga aag ccg cag	672
Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln	
210 215 220	
aga agg aag aac cct cag gaa ggc ctg tac aat gaa ctg cag aaa gat	720
Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp	
225 230 235 240	
aag atg gcg gag gcc tac agt gag att ggg atg aaa ggc gag cgc cgg	768
Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg	
245 250 255	
agg ggc aag ggg cac gat ggc ctt tac cag ggt ctc agt aca gcc acc	816
Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr	
260 265 270	
aag gac acc tac gac gcc ctt cac atg cag gcc ctg ccc cct cgc taa	864
Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
275 280 285	

[0061]

- <210> 18
 <211> 287
 <212> PRT
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 合成构建体

 <400> 18

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
 1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Ala Ser Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp
 20 25 30

Tyr Asn Gln His Gly Ser Thr Phe Thr Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly
 35 40 45

Asn Leu Thr Gly Gln Tyr Glu Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln
50 55 60

Asn Ser Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Arg Tyr Asn Gly Thr Lys Leu Glu
65 70 75 80

Trp Arg Val Glu Trp Asn Asn Ser Thr Glu Asn Cys His Ser Arg Thr
85 90 95

Glu Trp Arg Gly Gln Tyr Gln Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr
100 105 110

Gln Trp Asn Leu Thr Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Thr Glu Gln
115 120 125

[0062] Gly Gln Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly
130 135 140

Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly
145 150 155 160

Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val
165 170 175

Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn
180 185 190

Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val
195 200 205

Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln
210 215 220

Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
225 230 235 240

Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
245 250 255

Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
260 265 270

[0063] Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
275 280 285

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头

<400> 19

Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly
1 5

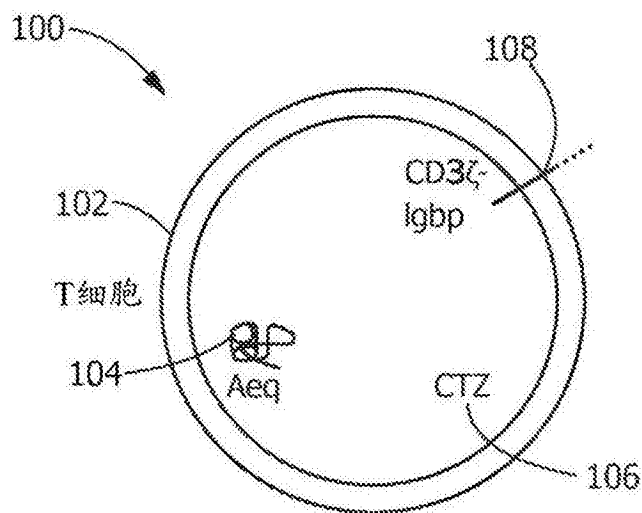


图1a

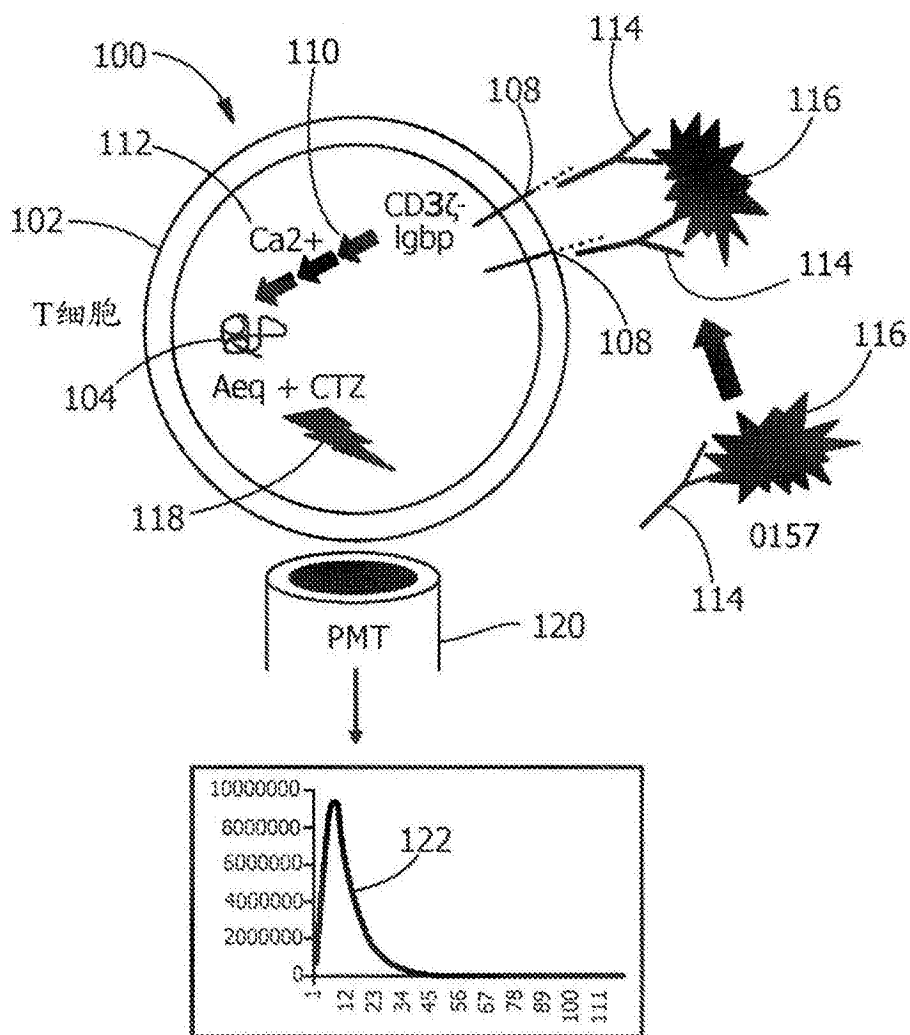


图1b

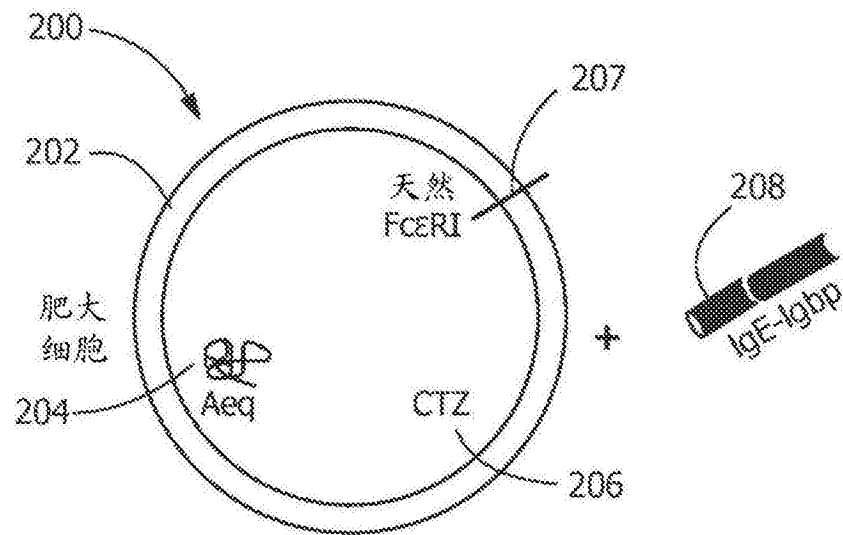


图2a

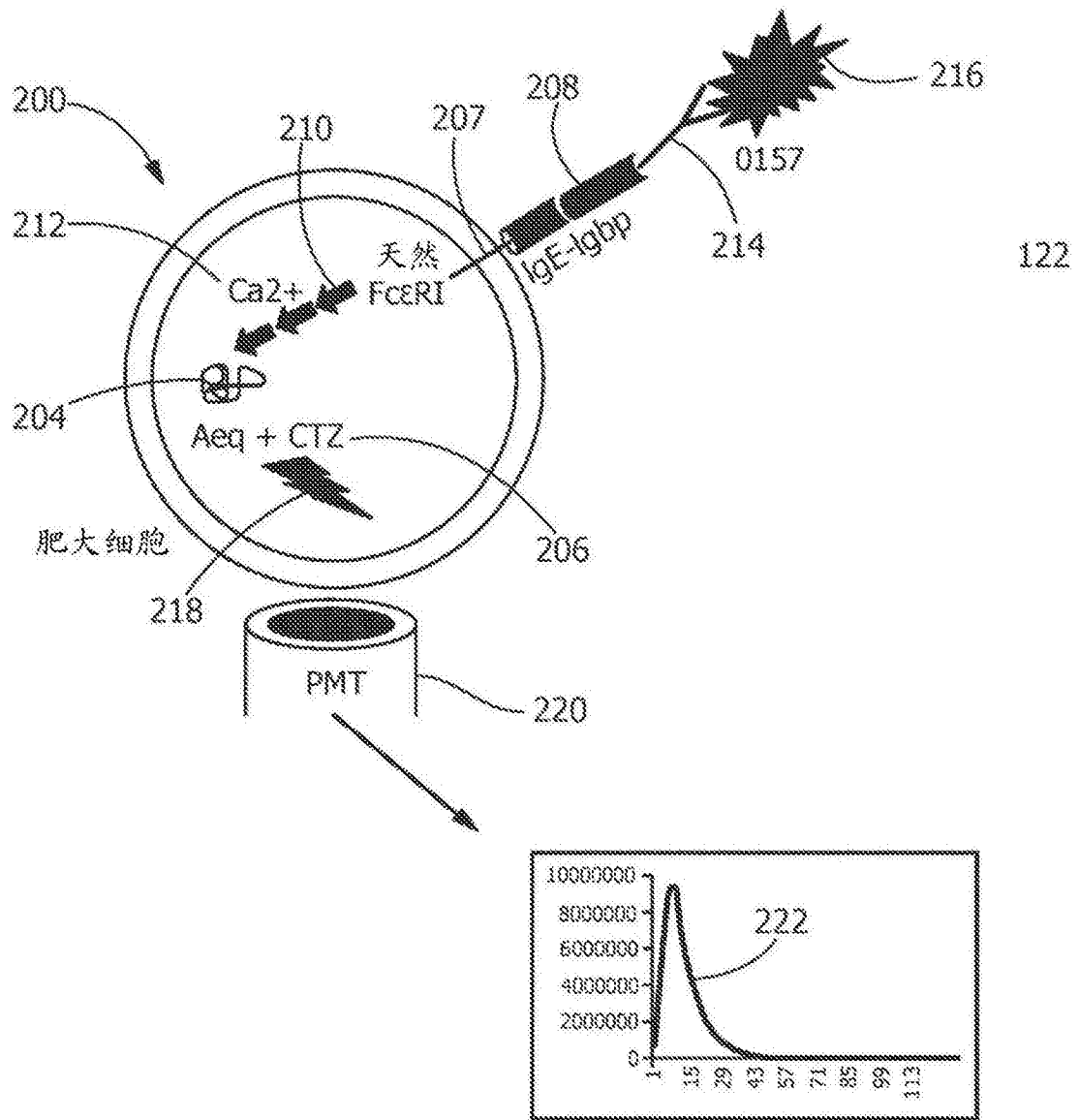


图2b

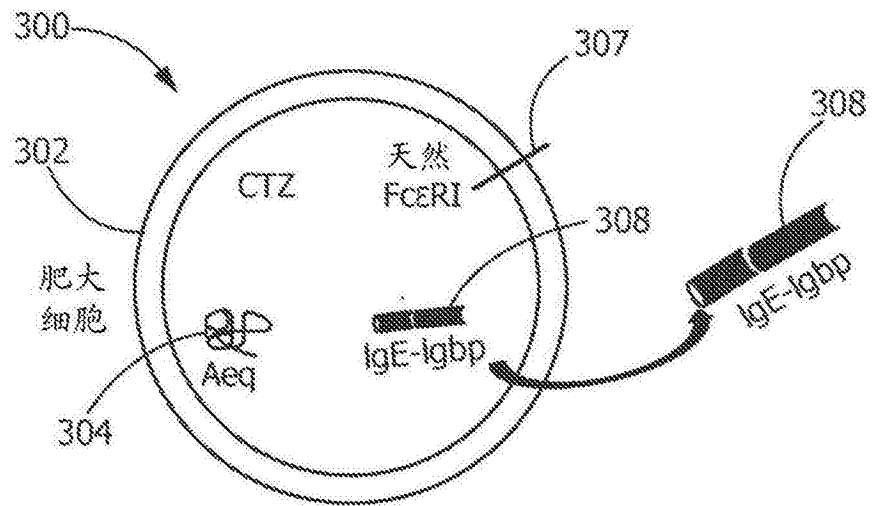


图3a

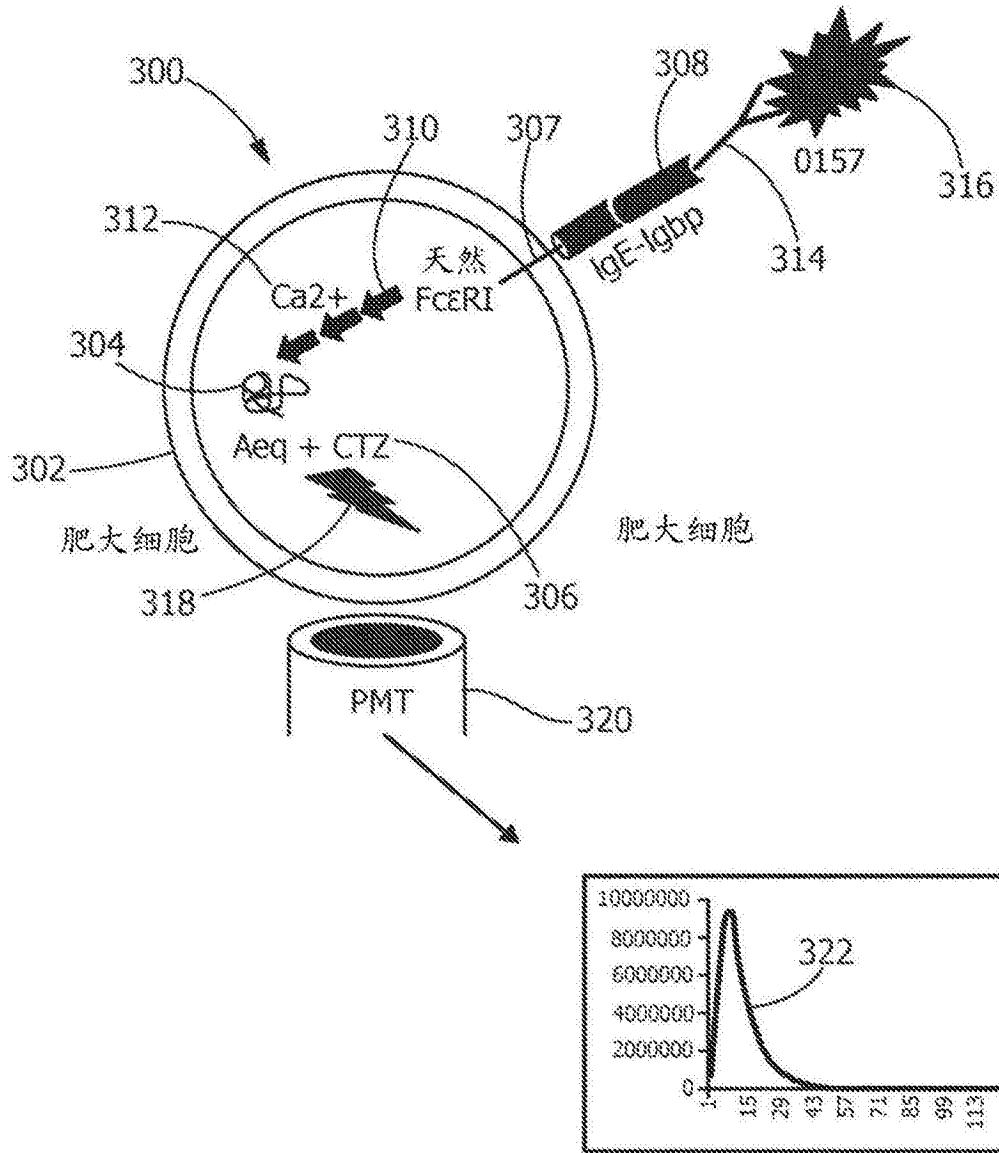


图3b

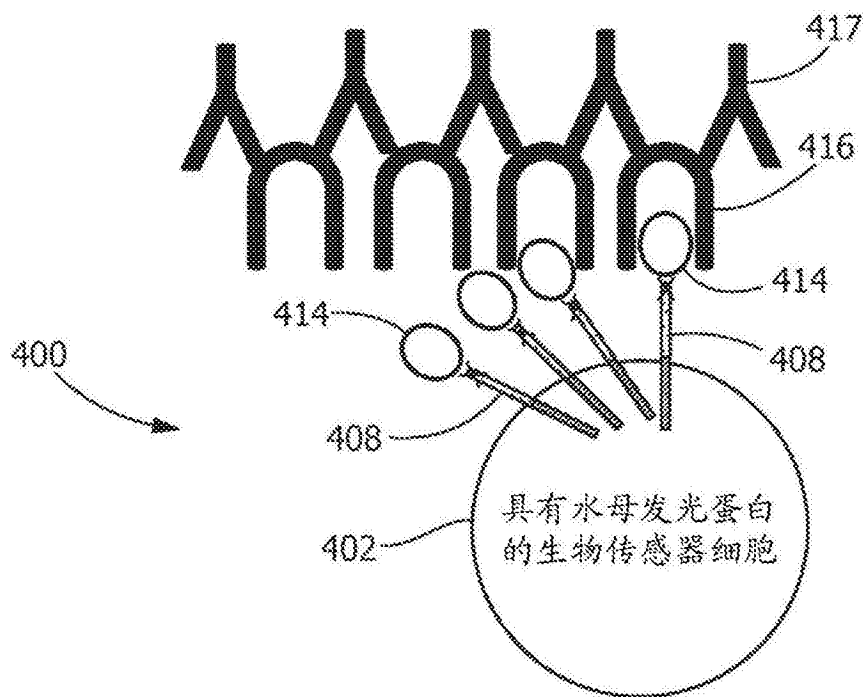


图4

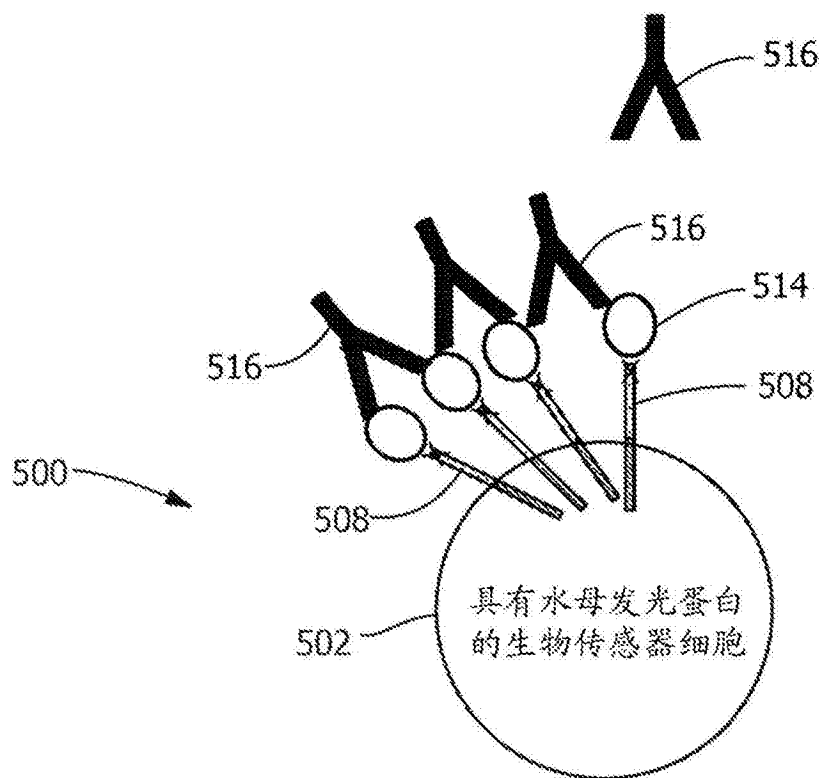


图5