(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102199593 A
(43)申请公布日 2011.09.28

(21)申请号 201110059890.X

(22)申请日 2004.09.17

(30)优先权数据
PA200301867 2003.12.17 DK
PA200400782 2004.05.15 DK
60/504,455 2003.09.18 US
60/504,589 2003.09.18 US

(62)分案原申请数据
200480027028.9 2004.09.17

(71)申请人 西福根有限公司
地址 丹麦灵比

(72)发明人 M·B·奥列克西维奇 L·S·尼尔森
P·S·安德森 M·H·汉森

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 罗菊华

(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C40B 50/06(2006.01)
C40B 40/08(2006.01)
C40B 40/02(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C07K 16/12(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 39/40(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 21/02(2006.01)

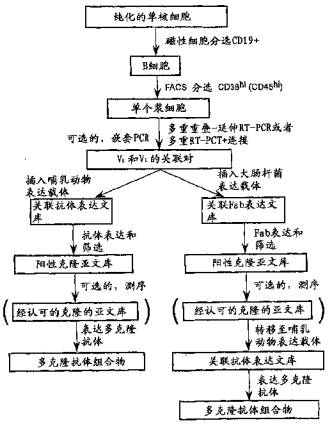
权利要求书 4 页 说明书 74 页
序列表 103 页 附图 37 页

(54)发明名称

连接目标序列的方法

(57)摘要

本发明涉及连续目标序列的方法。多重重叠－延伸 RT-PCR 提供了在单一反应中连接两个或者更多杂聚蛋白结构域或者亚基编码核苷酸序列的有效方法。特别地，来自例如免疫球蛋白、T 细胞受体或者 B 细胞受体的可变区编码序列的连接通过使用本发明的方法而被简化。这产生了更为有效的制备可变区编码序列文库的方法。使用来自分离的单一细胞的模板进行多重重叠－延伸 RT-PCR 的能力使得能够以高通量形式产生关联对文库。



CN 102199593 A

1. 连接多个非相邻目标核苷酸序列的方法，所述的方法包含 ：a) 在多重分子扩增步骤中使用来自分离的单个细胞或者等基因细胞群的模板，扩增目标核苷酸序列 ；以及 b) 实现步骤 a) 中扩增出的目标核苷酸序列的连接。

2. 根据权利要求 1 的方法，其中目标核苷酸序列包含可变区编码序列，且连接产生可变区编码序列的关联对。

3. 根据权利要求 1 或者 2 的方法，其中目标核苷酸序列包含免疫球蛋白可变区编码序列，且连接产生了轻链可变区编码序列与重链可变区编码序列的关联对。

4. 根据权利要求 1 或者 2 的方法，其中目标核苷酸序列包含 T 细胞受体可变区编码序列，且连接产生了由 α 链可变区编码序列与 β 链可变区编码序列组成的关联对或者由 γ 链可变区编码序列与 δ 链可变区编码序列组成的关联对。

5. 随机连接多个非相邻目标核苷酸序列的方法，所述的方法包含 ：a) 在多重分子扩增步骤中使用来自遗传多样性细胞群的模板，扩增目标核苷酸序列 ；以及 b) 实现步骤 a) 中扩增出的目标核苷酸序列的连接。

6. 根据权利要求 5 的方法，所述的细胞群是被裂解的。

7. 根据权利要求 5 或者 6 的方法，其中所述的目标核苷酸序列包含可变区编码序列，且连接产生可变区编码序列对的组合文库。

8. 根据权利要求 7 的方法，其中所述的目标核苷酸序列包含免疫球蛋白可变区编码序列，且连接产生了轻链可变区编码序列与重链可变区编码序列对的组合文库。

9. 根据权利要求 7 的方法，其中所述的目标核苷酸序列包含 T 细胞受体可变区编码序列，且连接产生 α 链可变区与 β 链可变区编码序列对的组合文库。

10. 根据前面权利要求中任何一项的方法，其中所述的多重分子扩增步骤是多重 RT-PCR 扩增。

11. 根据权利要求 10 的方法，其中所述的多重 RT-PCR 扩增是两步过程，包括在多重 PCR 扩增之前的独立的逆转录 (RT)。

12. 根据权利要求 10 的方法，其中所述的多重 RT-PCR 扩增以单一步骤进行，包含最初将进行逆转录 (RT) 和多重 PCR 扩增所需的所有组分加入到单个容器中。

13. 根据前面权利要求中任何一项的方法，其中所述的目标核苷酸序列的连接与多重分子扩增在同一个容器中进行。

14. 根据权利要求 10 到 13 中任何一项的方法，其中使用多重重叠 - 延伸引物混合物，所述的目标核苷酸序列的连接与多重 PCR 扩增被一同实现。

15. 根据前面权利要求中任何一项的方法，其中所述的目标核苷酸序列的连接通过连接方法实现。

16. 根据前面权利要求中任何一项的方法，其中使用适用于扩增连接后目标核酸序列的引物混合物进行额外的分子扩增。

17. 根据权利要求 14 的方法，其中的多重重叠 - 延伸引物混合物包含了引物组，其中每个引物组中的至少一个引物组成员包含能够与第二引物组中的引物组成员的重叠 - 延伸尾巴杂交的重叠 - 延伸尾巴。

18. 根据权利要求 14 或者 17 的方法，其中的多重重叠 - 延伸引物混合物包含 ：a) 至少一个与免疫球蛋白轻链区编码序列有义链互补的 C_L 或者 J_L 引物 ；b) 至少一个与免疫球蛋

白轻链可变区编码序列反义链或者轻链可变区前导序列反义链互补并且能够与步骤 a) 中的引物形成引物组的 V_L 5′ 引物或者 V_{LL} 引物 ;c) 至少一个与免疫球蛋白恒定重链结构域编码序列的有义链互补或者与重链连接区编码序列有义链互补的 C_H 或者 J_H 引物，以及 d) 至少一个与免疫球蛋白重链可变区编码序列反义链或者重链可变区前导序列反义链互补并且能够与步骤 c) 中的引物形成引物组的 V_H 5′ 引物或者 V_{HL} 引物。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中步骤 b) 的引物是 V_{LL} 引物，与 SEQ ID 93 到 98 的基因特异区域有至少 90％的序列一致性，步骤 d) 的引物是 V_{HL} 引物，与 SEQ ID 86 到 92 的基因特异区域有至少 90％的序列一致性。

20. 根据前面权利要求中任何一项的方法，其中从含有淋巴细胞的细胞级分获得所述单个细胞、等基因细胞群或者遗传上不同的细胞群。

21. 产生关联对文库的方法，所述关联对包含连接的可变区编码序列，所述的方法包含 a) 提供来自供体的含有淋巴细胞的细胞级分 ;b) 可选地从所述细胞级分中富集某个淋巴细胞群 ;c) 获得分离的单细胞群体，包含将细胞从所述的细胞级分中逐个分配到多个容器中 ;以及 d) 根据权利要求 1 到 4 或者 10 到 20 中任何一项的方法，扩增所述的分离的单细胞群体中含有的可变区编码序列以及实现其连接，这些取决于权利要求 1 到 4 中的任何一项。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中在进行扩增和连接 (步骤 d) 以前，单细胞群体中的单个分离的单细胞被扩充为等基因细胞群。

23. 根据权利要求 20 到 22 任何一项的方法，其中含有淋巴细胞的细胞级分组成全血、骨髓、单核细胞或者白细胞。

24. 根据权利要求 20 到 23 任何一项的方法，其中含有淋巴细胞的细胞级分富集了 B 淋巴细胞谱系的细胞。

25. 根据权利要求 20 到 24 任何一项的方法，其中含有淋巴细胞的细胞级分或者 B 淋巴细胞谱系富集了浆细胞。

26. 根据权利要求 20 到 25 任何一项的方法，其中来自含有淋巴细胞的细胞级分、B 淋巴细胞谱系或者浆细胞的细胞对抗原特异性进行富集。

27. 根据权利要求 20 到 23 任何一项的方法，其中含有淋巴细胞的细胞级分对 T 淋巴细胞谱系的细胞进行富集。

28. 根据权利要求 20 到 23 任何一项的方法，其中抗原特异的 T 细胞通过刺激含有淋巴细胞的细胞级分产生。

29. 根据前面权利要求中任何一项的方法，还包含将连接后的核苷酸序列或者关联对文库插入到载体中。

30. 根据权利要求 29 的方法，其中所述的载体选自克隆载体、穿梭载体、展示载体或者表达载体。

31. 根据权利要求 29 或者 30 的方法，其中连接后的核苷酸序列或者关联对文库的单个成员包含免疫球蛋白重链可变区编码序列与轻链可变区编码序列，且所述的序列按照阅读框插入到载体中，所述载体中已经含有编码一个或者更多免疫球蛋白恒定结构域或者其片段的序列。

32. 根据权利要求 29 或者 30 的方法，其中连接后的核苷酸序列或者关联对文库的单个

成员包含 T 细胞受体 α 链可变区编码序列与 β 链可变区编码序列，且所述的序列按照阅读框插入到载体中，所述载体中已经含有编码一个或者更多 T 细胞受体恒定结构域或者其片段的序列。

33. 根据权利要求 21 到 32 中任何一项的方法，还包含通过选择连接后的编码具有所需靶标特异性的结合蛋白的可变区序列的关联对的亚组建立亚文库，产生可变区编码序列的靶标特异性关联对的文库。

34. 根据权利要求 31 到 33 中任何一项的方法，还包含将所述的关联对或者可变区编码序列的靶标特异性关联对文库转移到哺乳动物表达载体中。

35. 根据权利要求 34 的方法，其中的哺乳动物表达载体编码一个或者更多恒定区结构域，所述恒定区结构域选自人类免疫球蛋白类型 IgA1，IgA2，IgD，IgE，IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgM，κ 轻链或者 λ 轻链或者选自人 T 细胞受体 α，β，δ 和 / 或 γ 链。

36. 根据权利要求 29 到 35 中任一项的方法，还包含以下的步骤 :a) 将编码连接后的核苷酸序列片段的载体引入宿主细胞中 ;b) 在适于表达的条件下培养所述的宿主细胞 ;以及 c) 获得插入到所述宿主细胞的载体表达的蛋白质产物。

37. 根据权利要求 36 的方法，其中所述的蛋白质产物是包含轻链可变区连接重链可变区的关联对的单克隆抗体。

38. 根据权利要求 36 的方法，其中所述的多肽产物是单克隆 T 细胞受体，所述的单克隆 T 细胞受体包含 α 链可变区连接 β 链可变区的关联对。

39. 由连接的可变区编码序列组成的关联对的文库。

40. 根据权利要求 39 的文库，其中通过根据权利要求 21 或者任何其从属权利要求的方法获得所述的可变区编码序列关联对。

41. 根据权利要求 39 或者 40 的文库，其中所述的关联对的单个成员包含免疫球蛋白轻链可变区编码序列与重链可变区编码序列。

42. 根据权利要求 41 的文库，其中所述的单个成员编码全长的抗体，所述抗体选自人免疫球蛋白类型 IgA1，IgA2，IgD，IgE，IgG1，IgG2，IgG3，IgG4 或者 IgM。

43. 根据权利要求 39 或者 40 的文库，其中所述的关联对的单个成员包含 TcR α 链可变区编码序列与 β 链可变区编码序列或者 γ 链可变区编码序列与 δ 链可变区编码序列。

44. 根据权利要求 40 的文库，其中所述的单个成员编码全长的 TcR。

45. 可变区编码序列的关联对的亚文库，所述编码序列编码表现出针对某个靶标的所需结合特异性的蛋白。

46. 亚文库，其编码表现出针对某个靶标的所需结合特异性的蛋白，该亚文库选自根据权利要求 39 到 44 中任一项的文库。

47. 连接的免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区编码序列的关联对的亚文库，其中可以从所述文库表达的免疫球蛋白能够与破伤风毒素反应或者与其结合。

48. 包含根据权利要求 39 到 47 中任何一项的文库或者亚文库的宿主细胞群。

49. 根据权利要求 48 的宿主细胞群，其中的细胞是哺乳动物细胞。

50. 表达自根据权利要求 48 或者 49 的宿主细胞的重组多克隆蛋白。

51. 能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆免疫球蛋白或者其片段。

52. 根据权利要求 51 的重组多克隆免疫球蛋白，其中的单个成员是关联对。

53. 根据权利要求 51 或者 52 的重组多克隆免疫球蛋白，包含至少两个单个的关联对，所述关联对包含免疫球蛋白重链可变区与轻链可变区编码序列，所述关联对与选自以下 SEQ ID 对的单个 SEQ ID 对具有至少 90％的序列一致性 :229:276，262:309，240:287，245:292，267:314，246:293，258:305，242:289，231:278，263:310，232:279，237:284，255:302，260:307，251:298，233:280，228:275，244:291，250:297，252:299，264:311，272:319，235:282 或者 238:285。

54. 能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆免疫球蛋白或者其片段，其中的互补决定区 (CDR1，CDR2 和 CDR3) 来自一个或者更多的权利要求 53 中的 SEQ ID 对。

55. 包含根据权利要求 50 的多克隆重组免疫球蛋白作为活性成分的药物组合物，还含有至少一种药物上可以接受的赋形剂。

56. 包含能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆抗体作为活性成分的药物组合物，可选地还含有药物上可以接受的赋形剂。

57. 根据权利要求 55 或者 56 的药物组合物，用作药物。

58. 预防或者治疗处于破伤风风险的患者的方法，向有此需要的患者给服包含能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆抗体的组合物。

连接目标序列的方法

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 9 月 17 日、申请号为 200480027028.9、发明名称为“连接目标序列的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明的技术领域

[0003] 本发明涉及的是多重分子扩增步骤，它能够将与扩增有关的目标核苷酸序列连接起来，特别是聚合酶链式反应（多重 PCR）。该方法特别有利地用于产生来自免疫球蛋白、T 细胞受体或者 B 细胞受体可变区编码序列的关联对 (cognate pair) 文库以及组合文库。

[0004] 发明背景

[0005] 哺乳动物中存在的参与免疫应答的抗原结合蛋白是表现出广泛多样结合特异性的多克隆大集合。这种多样性是通过编码这些结合蛋白可变区的基因序列的重排产生的。这些可变区结合蛋白包括可溶性的和膜结合形式的 B 细胞受体（也称为免疫球蛋白或者抗体）以及膜结合的 T 细胞受体 (TcR)。就免疫球蛋白而言，在抗原通过 B 细胞抗原受体借助被称为亲和成熟的过程（该过程涉及了这些可变基因体细胞超变的循环）被识别之后，免疫球蛋白的亲和性增强。

[0006] 值得注意的是，已经对免疫球蛋白或者其片段例如 Fab 片段、Fv 片段和单链 Fv(scFv) 分子进行克隆和重组表达。但是所有其他的可变区结合蛋白原则上也可以使用与对于抗体相同的概念进行克隆和表达。

[0007] 具有所需结合特异性的抗体的已知分离方式经常涉及来自被免疫宿主的杂交瘤的制备，接下来对特异克隆进行筛选，或者涉及在大肠杆菌中制备由免疫球蛋白可变区结构域组成的组合表达库，接下来使用例如噬菌体展示的技术对组合表达库进行富集。

[0008] 用于制备治疗性抗体的杂交瘤技术在使用中一个主要的限制是没有适宜作为人 B 淋巴细胞融合伴侣的人淋巴瘤。异源杂交瘤（即人 B 细胞与小鼠淋巴瘤的融合）极为不稳定，因此几乎不能产生用于生产目的的适宜细胞系。通过用 EB 病毒感染无限增殖化的人 B 细胞表现出类似的不稳定性。缺乏稳定可靠的制备用于治疗的人抗体的细胞学方法可以使用分子生物学中更为最近的进展得到补偿。

[0009] 使用组合文库和噬菌体展示可以产生大的抗体克隆集合，可能的多样性超过了 10^{10}。从这个集合中可以就与特异靶标结合进行筛选，这样产生亚文库。可以使用该亚文库制备多克隆或者单克隆抗体。可以从淋巴细胞、浆细胞、杂交瘤或者任何其他表达免疫球蛋白的细胞群中扩增出构成文库的可变区编码序列（例如免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区编码序列）。制备组合文库的当前技术包括从细胞群中分别分离可变区编码序列。这样，例如免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区的编码序列的原始配对就会丢失。但是在组合文库中所述的序列随机配对，且这些可变序列的原始组合仅仅会随机出现。因此，为了分离负责所需结合特异性的可变区编码序列，需要相当大量的筛选。这通常与表达所需特异性的克隆的富集方法，例如核糖体展示或者噬菌体展示联合进行。即使是这样，所获得的多样性对于分离产生与那些在原来细胞中发现的结合蛋白具有类似高度亲和性的结合蛋白的可变区编码序列对，可能仍然不够大。而且，通常用于筛选组合文库的富集步骤引入了很大的偏倚性 (bias)，例如偏好大肠杆菌中非常低毒性的多肽、有效的折叠、缓慢的关闭速率

(off-rate)或者其他系统依赖的参数,这进一步降低了文库的多样性。此外,来源于这种组合文库的克隆更易于产生出与自身抗原发生交叉反应的结合蛋白,因为与原始对(此后称为关联对(cognate pair))相反,他们从未经历过体内针对自身抗原的负选择,对于B和T淋巴细胞受体发育过程中的特定阶段就有负选择出现。因此克隆可变区编码序列的原始配对就是合意的方法。而且,在关联对文库中出现表达所需结合特异性的克隆的频率要比在通常的组合文库中出现所需特异性的频率高很多,特别是如果起始材料细胞来自具有高频率编码特异结合对的细胞的供体,如具有免疫性或者免疫后的供体。由此,关联对文库不需要与组合文库具有相同的大小:具有 10^4 到 10^5 个克隆的关联对文库或者具有 10^2 到 10^3 个克隆的关联对文库(克隆来自具有正在发生的相关免疫应答的供体),对于获得代表广泛多样所需结合特异性的结合蛋白可能已经足够了。

[0010] 为了产生关联对文库,需要来自相同细胞的可变区编码序列的连接。目前已对两种不同的获得可变区编码序列的关联配对的方法进行了描述。

[0011] 细胞内PCR方法将一群细胞固定并且使其通透化,之后来自免疫球蛋白的重链可变区和轻链可变区编码序列在细胞内连接。这一连接可以通过重叠-延伸RT-PCR(WO 93/03151)或者重组(Chapal,N.et al.1997 BioTechniques 23,518-524)进行。在这些出版物中描述的扩增过程,是由下面三个或四个步骤组成的过程:i)使用恒定区引物进行逆转录产生免疫球蛋白cDNA,ii)使用含有重叠-延伸设计或者重组位点的引物组对重链和轻链可变区编码序列进行PCR扩增,iii)重组连接,如果选择了该方法的话,iv)产物进行嵌套PCR产生克隆用的限制性位点。由于细胞被通透化,所以扩增产物很有可能漏到细胞之外,这样会使重链可变区和轻链可变区编码序列混杂,导致同源配对性的丧失。因此,该步骤包含在每一次反应之后的漂洗步骤,使得这个过程耗费劳动,降低了反应的效率。

[0012] 更为一般地,细胞内PCR的效率极为低下,导致低的敏感性。因此细胞内PCR连接技术从未有过广泛的使用,而且原始研究实际上从未以能够被用于证实在细胞内连接的确存在的方式被可靠地重复出来。但是这对于避免重链可变区和轻链可变区编码序列的混杂以及由此引起的关联对的破坏来讲是至关重要的。

[0013] 在WO 01/92291中描述了不同的细胞内方法。该方法基于RNA反式拼接,在细胞内获得 V_H 和 V_L 编码mRNA的连接。该方法需要驱动细胞内反式拼接的DNA构建体。

[0014] 单细胞PCR是一种获得重链可变区和轻链可变区编码序列关联配对的不同方法(参见例如Coronella,J.A.et al.2000Nucleic Acids Res.28,E85;Wang,X.,et al.2000 J.Immunol.Methods 20,217-225)。在这些出版物中,通过使细胞的密度稀释至每个反应1个细胞,来分散一群表达免疫球蛋白的细胞,从而避免了克隆过程中重链可变区和轻链可变区编码序列的混杂。基本上该过程被描述为由三到四个步骤组成的过程:i)使用寡聚dT引物、随机六聚引物或者恒定区引物进行逆转录产生cDNA,ii)将cDNA产物分级进入几个管,使用含有用于克隆的限制性位点的引物组对各自的可变链编码序列进行PCR扩增(在分开的管中),iii)产物进行嵌套PCR产生用于克隆的限制性位点(可选择)以及iv)通过克隆到适宜的载体中将不同管中的重链可变区和轻链可变区编码序列连接起来,这本身是一个多步骤的过程。

[0015] 人类有两种类型的轻链:λ 和 κ。这表明对于每个单一细胞产生的cDNA,必须进行至少三个独立的PCR反应,之后进行分析并将适宜的片段克隆到单个载体中得到关联配

对。这样所描述的单细胞 PCR 需要大量的操作以产生关联配对文库。尽管为了获得代表所需广泛多样结合特异性的结合蛋白，关联对文库不需要与组合文库具有相同的大小，但是用所描述的单细胞 PCR 方法制备一个具有如 10^4 到 10^5 个克隆的文库还是一项耗费劳动的任务。而且大量的操作大大增加了污染和人为错误的风险。

[0016] 为了获得与在免疫应答中通常观察到的亲和性相当的高度亲和的结合蛋白，可变区序列的关联配对与它们的扩增相联合是非常有利的。为了制备具有大量多样性的文库，需要有一种可以适合于进行高通量形式的且污染和混杂的风险最小的克隆技术。

[0017] 同样需要降低克隆的步骤，以制备适合于高通量的形式的组合文库。

[0018] 成果公开

[0019] 本发明提供了使用多重分子扩增步骤，例如多重重叠 - 延伸 RT-PCR 或者多重 RT-PCR 之后通过连接方法或者重组方法连接，来连接两个或者更多目标核苷酸序列如可变区编码序列的有效方法。该方法适用于在单一细胞上进行，这样使关联对的克隆以高通量的方式进行。

[0020] 附图描述

[0021] 图 1 列举了不同类型的重叠 - 延伸尾巴 (tail)。粗线条对应的是引物中基因特异的部分，常规的线条对应的是重叠的尾巴。竖直线条表示了互补区域。引物有助于两个目标核苷酸序列的连接。图 1(I) 显示的是类型 I 的两种重叠 - 延伸尾巴，其中只有延伸尾巴完全或者部分地重叠；图 1(II) 显示了类型 II 的重叠 - 延伸尾巴，其中第一个引物延伸尾巴的 5′ 核苷酸与相邻引物的基因特异部分互补；图 1(III) 显示了类型 III 重叠 - 延伸尾巴，其中整个的重叠 - 延伸尾巴都与相邻引物的基因特异区域互补。

[0022] 图 2 是一幅示意图，图示了用于连接免疫球蛋白可变区编码序列的多重重叠 - 延伸引物混合物的概况。用管状结构表示了待连接的编码轻链 (LC) 和重链可变区 (V_H) 的 cDNA，并且表明了它们有义链的 5′ 和 3′ 端以及扩增产物的预期大小。用于扩增编码序列的多重重叠 - 延伸引物组用箭头指示。具有虚线 5′ 凸出的弯曲的箭尾表示了克隆尾巴。重叠 - 延伸尾巴用粗体表示。尾巴中的限制性位点与尾巴一同命名。多重重叠 - 延伸引物混合物中的引物总数是 16，分布如下：外引物包含一个 Cκ 和一个 C_{H1} 引物，重叠 - 延伸引物包含 6 个 V_L 和 8 个 V_H 引物。C_{H1} 引物在重链恒定结构域 1 的 5′ 端退火。多重重叠 - 延伸 RT-PCR 产生的产物预计大约 1070bp，由整个 κ 轻链（由恒定区、连接基因和可变基因 ($C_\kappa+J_L+V_L$) 构成）和重链可变区（由可变基因、多样性片段和连接基因 (V_H+D+J_H) 构成）构成。5′ 和 3′ 表明了开放阅读框的方向。只有一小部分的 C_{H1} 区域编码序列被这个多重重叠 - 延伸引物混合物扩增，因为 C_{H1} 引物的退火位置靠近重链的 J- 区域。

[0023] 图 3 是一系列的图片，显示了可获得的产物的不同连接方向，取决于连接尾巴上装配了何种引物。实心黑块表示了重叠区域。5′ 和 3′ 表明了开放阅读框的方向。图 3A 表示了产物的头对头定向。图 3B 表示了尾对尾的定向。图 3C 表示了头对尾的定向，前面是轻链编码序列。图 3D 表示了头对尾的定向，前面是重链编码序列。

[0024] 图 4 示意了免疫球蛋白表达载体 pLL113，其中编码序列是头对尾的定向。载体包含以下元件：bla ＝使氨苄青霉素抗性基因表达的启动子；Amp ＝编码氨苄青霉素抗性的基因；pUC ori ＝ pUC 复制起点；AdMLP ＝腺病毒主要晚期启动子；Human IgG1 ＝编码免疫球蛋白同型 G1 重链的序列；hGH pA ＝人生长激素 polyA 信号序列；bGH polyA ＝牛生长激素

polyA 序列。Human Kappa LC ＝编码免疫球蛋白 κ 轻链的序列。FRT ＝ Flp 识别靶标位点。Hygromycin ＝编码潮霉素抗性的基因。SV40 polyA ＝猿猴病毒 40 polyA 信号序列。

[0025] 图 5A 是一个电泳凝胶，显示了两步多重重叠－延伸 RT-PCR 之后进行半嵌套 PCR 的结果。扩增产物来自从单一 CHO Flp-In pLL113 细胞中分离的 cDNA。泳道 1-12 是样品泳道，箭头表明了 1076bp 的正确的嵌套多重重叠－延伸 RT-PCR 产物；M1 是 100bp 的梯度。W 是用作阴性对照模板的水。C 是来自细胞系 HB-8501 的阳性 cDNA 对照模板。在另一张图中描绘了相同的泳道的 W、C 和 100bpDNA 梯度，对比较小，目的是解析出单个的 DNA 片段。图 5B 是图 5A 中凝胶的草图，表明了凝胶上的相关片段。

[0026] 图 6 是一系列的电泳凝胶的照片和图片，表示了没有额外 PCR 扩增的单步多重重叠－延伸 RT-PCR 反应结果。在每一幅图中 M1 是 100bp 的梯度，M2 是 500bp 的梯度。图 6A 是电泳凝胶，显示了来自对应于 100、10、1 或者 0 个细胞的裂解物的扩增产物。箭头指示重叠－延伸产物。图 6B 是对图 6A 中凝胶的草图描绘。图 6C 是电泳凝胶，证实了在图 6A 的 100 个和 1 个细胞的泳道中存在重叠－延伸产物。图 6D 是电泳凝胶，显示了使用 NheI 和 NcoI 的限制性酶分别切割图 6C 中 1 个细胞的泳道中的重叠－延伸产物。

[0027] 图 7 是电泳凝胶，显示了单步多重重叠－延伸 RT-PCR 之后进行半嵌套 PCR 扩增的结果。M1 是 100bp 的梯度，M2 是 500bp 的梯度。多重重叠－延伸引物混合物中含有 C_{H1}，C_{H2}，C_{H3}，C_{H4} 或者 C_{H5} 作为多重重叠－延伸 RT-PCR 反应中的外引物。使用对应于 100、10、1 或者 0 个细胞的细胞裂解物进行反应。重叠－延伸产物的大小用箭头表明。

[0028] 图 8 是电泳凝胶，显示了单步多重重叠－延伸 RT-PCR 之后进行半嵌套 PCR 扩增的结果，使用了富集的人 B 淋巴细胞作为模板。M1 是 100bp 的梯度。泳道 5 和 6 显示了重叠－延伸产物预期大小的条带。

[0029] 图 9A 是一幅示意图，显示了用于制备表达 IgG1- 的细胞系的哺乳动物表达载体 (Em465/01P582/Em465/01P581)，其中编码序列是头对头的定向。载体包含以下元件：Amp ＝编码氨苄青霉素抗性的基因；pUC ori ＝ pUC 复制起点；AdMLP ＝腺病毒主要晚期启动子；EFP ＝延伸因子启动子；AP leader ＝碱性磷酸酶前导序列；VH ＝重链可变区编码序列；IgG1 HC ＝编码免疫球蛋白同型 G1 重链恒定区的序列；rBGpolyA ＝家兔 β 球蛋白 polyA 信号序列；bGH polyA ＝牛生长激素 polyA 序列；IgK leader ＝编码小鼠 κ 前导序列的序列；IgL(1b 或者 1c) ＝编码免疫球蛋白 λ 轻链家族 1b 或者 1c 的序列；FRT ＝ Flp 识别靶标位点；Hygromycin ＝编码潮霉素抗性的基因；SV40 polyA ＝猿猴病毒 40 polyA 信号序列。图 9B 和 9C 是溴化乙锭染色的琼脂糖凝胶，分别使用来自细胞系 CHO Flp-In/Em464/01P581 和 CHOFlp-In/Em464/01P582 的 PCR 产物上样。泳道 1 到 4 对应于分别使用总 RNA 模板浓度为 50pg，5pg，0.5pg 或者 0pg 进行多重重叠－延伸 RT-PCR 反应。M 是 100bp 的梯度 (New England Biolabs，NewEngland，USA)。箭头表示了重叠－延伸 PCR 产物。

[0030] 图 10 是一个流程图，表示了所用的步骤，目的是产生关联抗体表达文库，可以从该表达文库中表达单克隆或者多克隆抗体。

[0031] 图 11 是大肠杆菌载体 JSK301 的示意图，该载体用于通过在载体上所示的 NotI/XhoI 限制性位点处插入包含关联可变区编码序列的重叠－延伸片段，制备 Fab 载体文库。载体包含以下的元件：Amp and Amp pro ＝氨苄青霉素抗性基因及其启动子；pUC19 Ori ＝复制起点；Human CH1 ＝编码人免疫球蛋白 γ 1 重链结构域 1 的序列；Stuffer ＝无关的序

列插入物，在重叠－延伸片段插入后被切除。tac P and lac Z ＝细菌启动子，可以在 NheI 和 AscI 限制性位点处被切除。

[0032] 图 12 是一幅示意图，显示了关联 Fab 表达载体文库的制备。步骤 I 显示了通过 XhoI-NotI 消化将可变区编码序列关联对 (VH_1-VL_1 到 VHx-VLx) 插入大肠杆菌 JSK301 载体中。步骤 II 显示了通过 AscI-NheI 消化将细菌启动子和前导序列盒 (pelB 前导序列 -Ptac- 启动子，引导 VHx 的表达，以及 P lac 启动子 -pelB 前导序列，引导 VLx 的表达) 插入。

[0033] 图 13 显示了使用单步多重重叠－延伸 RT-PCR 以及之后的额外 PCR 扩增使组成 G 蛋白的 α、β 和 γ 亚基连接。给出了每个编码区域以及连接产物的大小。在扩增中通过引物尾巴引入的限制位点在终产物中予以表明。

[0034] 图 14 显示了对 (A) 从供体血液中纯化的 PBMC、(B) 磁性分选的非标记 CD19 阴性细胞级分以及 (C) 磁性分选的 CD19+ 细胞级分的分析性 FACS 染色的点状图。对于每一个级分显示了一个散射 (scatter) 图线、一个 CD19/CD38 图线和一个 CD38/CD45 图线。

[0035] 图 15 显示了图 9C 的 CD19+ 级分，它曾经储存于液氮中，融化并且使用抗 CD19、抗 CD38 和抗 CD45 进行染色。显示了对应于图 9C 的点图线。

[0036] 图 16 显示了用于分选 CD19+ 细胞级分的阈值 (gate)。使用了基于 CD38 和 CD45 的散射阈值和荧光阈值分离 CD38high(CD38hi) 和 CD45intermediate(CD45in) 细胞。

[0037] 图 17 是电泳凝胶，显示了对供体 TT03 进行成功的多重重叠－延伸 RT-PCR 反应 (行 A，8 个 96 孔板上的孔 1-12)。样品已经上样于琼脂糖凝胶的两行 (A 和 B) 中，每一行 48 个样品。重叠－延伸片段的预期大小是大约 1070bp。用箭头标记出推测的重叠－延伸片段。

[0038] 图 18 显示了来自平板 G060 的周质提取物的 ELISA 分析。使用山羊 (gt) 抗人 κ 包被 ELISA 板，被捕获的 Fab 片段使用 HRP 偶联的山羊抗人 Fab 特异的抗体进行检测。

[0039] 图 19 显示了来自平板 G060 的周质提取物的 ELISA 分析。使用 10ug/ml 卵清蛋白 (SigmaA-5503) 包被 ELISA 板，被捕获的 Fab 片段使用 HRP 偶联的山羊抗人 Fab 特异的抗体进行检测。

[0040] 图 20 显示了来自平板 G060 的周质提取物的 ELISA 分析。使用破伤风类毒素包被 ELISA 板，被捕获的 Fab 片段使用 HRP 偶联的山羊抗人 Fab 特异的抗体进行检测。

[0041] 图 21 显示了来自平板 G060 的周质提取物的一步竞争 ELISA 分析。ELISA 板使用破伤风类毒素 (TT) 包被，在每一个孔中加入 10^{-7}M 的可溶性 TT，目的是与细菌上清中的 Fab 片段竞争结合固定化的 TT。被捕获的 Fab 片段用 HRP 偶联的山羊抗人 Fab 特异的抗体进行检测。

[0042] 图 22 显示了来自 G060 板的 TT 抗原结合克隆的可变重链蛋白序列的序列比对。用不同的阴影代表不同程度的序列同源性 :100％、80％和 60％被分别用黑色、灰色和浅灰色表示。CDR1 位于比对位置的 34 到 41。CDR2 位于比对位置的 55 到 73。CDR3 位于比对位置的 107 到 127。早熟终止密码子用星号表示。比对分成 8 幅不同的图 (a-h)，从左至右排列成两排。上面一排是图 22a 到 d，下面一排是图 22e 到 h。

[0043] 图 23 显示了来自 G060 平板的 TT 抗原结合克隆的可变轻链蛋白序列的序列比对。用不同的阴影代表不同程度的序列同源性 :100％、80％和 60％被分别用黑色、灰色和浅灰

色表示。CDR1 位于比对位置的 26 到 42。CDR2 位于比对位置的 58 到 64。CDR3 位于比对位置的 97 到 106。早熟终止密码子用星号表示。比对分成 8 幅不同的图 (a-h)，从左至右排列成两排。上面一排是图 23a 到 d，下面一排是图 23e 到 h。

[0044] 图 24 显示了竞争 ELISA 检测，测定了从平板 G060 中选出的克隆的表观亲和性。浓度从 100nM 到 25pM 的可溶性 TT 稀释液（四倍稀释）加入到 Fab 片段中，这样与 Fab 片段竞争结合固定化 TT。在给定可溶性 TT 浓度下观察到的结合与没有向反应中加入可溶性 TT 时观察到的结合之比作为反应的程度。

[0045] 图 25 显示了双系统发生点矩阵图线，显示了抗体重链和轻链可变结构域序列之间的基因内和基因间的关系。V_H 和 V_L 的系统发生树在点矩阵中配对，以显示特定 V 基因的实际配对。A) 使用噬菌体展示从组合文库中得到的 TT 结合克隆。B) 使用本发明从关联对文库中得到的 TT 结合克隆。

[0046] 发明详述

[0047] 本发明的目的是提供两个或者更多不相邻目标核苷酸序列的扩增和连接方法，使这种序列的克隆适合于高通量的模式。这主要通过降低扩增和连接待克隆的序列所需要的步骤的数目来实现。

[0048] 本发明的一个方面是连接多个不相邻的核苷酸序列的方法，包含在多重分子扩增步骤中，使用来自分离的单个细胞、等基因细胞群或者具有遗传多样性的细胞群的模板扩增目标核苷酸序列并实现扩增出的序列的随后连接。如果模板是分离的单个细胞或者等基因细胞群，连接产生的核酸片段包含以关联方式互相连接的目标核苷酸序列。如果模板是具有遗传多样性的细胞群，连接产生了片段文库，其中每一个片段包含随机连接的目标核酸序列。这也被称为组合文库。

[0049] 在本发明的一个实施方案中，这个多重分子扩增步骤是多重 PCR 扩增，优选地先进行逆转录步骤。在一个优选的实施方案中，逆转录、扩增和连接在单一步骤中进行，使用多重重叠 - 延伸 RT-PCR 或者分成两步进行，使用多重 RT-PCR，之后通过连接方法或者重组方法连接。

[0050] 本发明的另一个实施方案涉及的是包含连接的可变区编码序列，特别是重链可变区和轻链的编码序列或者 T 细胞受体 (TcR) α 链和 β 链编码序列的关联对文库的制备。该过程涉及从至少一个适宜的供体获得含有淋巴细胞的细胞级分，可选地从这个级分中富集某一个淋巴细胞群，例如 B 淋巴细胞或者 T 淋巴细胞，这取决于是需要来自免疫球蛋白还是来自 TcR 的可变区编码序列。含有淋巴细胞的细胞级分或者富集后的细胞级分分配到一系列容器中，每一个容器中一个细胞。对该一系列单细胞进行逆转录 (RT) 步骤或者其它 cDNA 制备步骤，使用来自单细胞群的核酸作为模板。RT 步骤之后是多重分子扩增步骤以及根据本发明的一种方法从每一个细胞产生的可变区编码序列对的连接。

[0051] 本发明公开的克隆技术省略了费力和低效的克隆过程，而且降低了在多次克隆步骤中污染和多样性丢失的风险。

[0052] 本发明的另一个方面涉及的是通过多重分子扩增以及连接过程产生的关联对文库。可以对使用本发明的方法制备的关联对的起始文库（亲本文库）进行筛选，这样产生了编码靶标特异性结合蛋白可变结构域或者全长结合蛋白的关联对的亚文库。

[0053] 在本发明的另一个实施方案中，本发明的文库和亚文库可以在重组单克隆或者多

克隆蛋白的表达中使用，其中存在于供体中的原始结合亲和性和特异性被保留下来。

[0054] 定义

[0055] 术语“关联对”描述的是包含在单个细胞中或者来自单个细胞的非相邻目标核酸的原始配对。在优选的实施方案中，关联对包含两个可变区编码序列，这两个序列共同编码一个结合蛋白可变结构域，所述基因序列来自同一个细胞。这样，当作为完整的结合蛋白或者作为其稳定片段表达时，它们保持了原来从这个细胞表达的结合蛋白的结合亲和性和特异性。关联对可以例如包含抗体可变重链编码序列与来自同一个细胞的可变轻链编码序列，或者 T 细胞受体的 α 链编码序列与来自同一个细胞的 β 链编码序列。关联对文库是这种关联对的集合。

[0056] 术语“热起始聚合酶”描述的是在用于逆转录的温度下无活性或者具有非常低活性的聚合酶。这种聚合酶需要通过高温（90 到 95 摄氏度）激活才能有功能。这对于单步 RT-PCR 步骤而言是一个优势，因为这阻止了聚合酶对逆转录反应的干扰。

[0057] 术语“等基因细胞群”描述的是遗传上相同的细胞群。特别地，通过对分离的单个细胞进行克隆扩充得到的等基因细胞群是本发明感兴趣的。

[0058] 术语“分离的单个细胞”描述的是已经在物理上与细胞群分开的细胞，对应于“单一容器中的单个细胞”。当在多个容器中逐个分散一群细胞时，得到的就是一群分离的单个细胞。正如在标题为“模板来源”部分中所说明的，容器与单个细胞的比例不一定要达到 100％才能称之为单细胞群，

[0059] 来自与扩增相关的“连接”的术语描述了扩增后的编码目标核酸序列的核酸序列连接成单一片段的过程。与关联对相关，片段包含来自相同细胞的编码可变结构域的核酸序列，例如抗体重链可变区与抗体轻链可变区的编码序列。连接可以与扩增一起进行或者在扩增之后立即进行连接步骤。对于片段的形式或者功能性没有要求，它可以是线性的、环形的、单链或者双链的。连接也不一定是永久的，如果需要的话，可以从片段中分离出目标核酸序列中的一个，例如可以从关联对片段中分离出一个可变区编码序列。但是只要组成关联对的原始可变区没有混杂有其他可变区，它们就仍然被当做是关联对，尽管它们没有一起连接成为一个单一片段。连接优选是核苷酸磷酸二酯键连接。但是也可以通过不同的化学交联步骤得到连接。

[0060] 术语“多重分子扩增”描述的是在同一个反应中同时扩增两个或者更多靶标序列。适宜的扩增方法包括聚合酶链式反应 (PCR)(U.S.4,683,202)，连接酶链式反应 (LCR)，(Wu and Wallace,1989,Genomics 4,560-9)，链置换扩增 (SDA) 技术 (Walker et al.,1992,Nucl.Acids Res.20,1691-6)，自动维持序列扩增 (Guatelli et al.,1990,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.,87,1874-8) 以及基于核酸的序列扩增 (NASBA)(Compton J.,1991,Nature 350,91-2)。后两种扩增方法涉及基于等温转录的等温反应，产生单链 RNA(ssRNA) 和双链 DNA(dsDNA)。

[0061] 术语“多重 PCR”描述了一种 PCR 的变体，其中两个或者更多的靶标序列通过在同一个反应中包括一组以上的引物而被同时扩增，例如一组引物适用于扩增重链可变区而另一组引物适用于在同一个 PCR 反应中扩增 κ 链可变区。此外还可以用适用于 λ 链可变区扩增的引物组与这些引物组联合。

[0062] 术语“多重 RT-PCR”描述了多重 PCR 反应，在这个反应之前是逆转录 (RT) 步骤。

多重 RT-PCR 可以用两步过程进行，在多重 PCR 之前有一个独立的 RT 步骤，或者以一步过程进行，其中用于 RT 和多重 PCR 的所有组分混和在一个试管中。

[0063] 术语“多重重叠 - 延伸 PCR”以及“多重重叠 - 延伸 RT-PCR”意味着使用多重重叠 - 延伸引物混合物进行多重 PCR 或者多重 RT-PCR 以扩增靶标序列，这样使靶标序列的扩增和连接同时进行。

[0064] 术语“多个容器”描述了使单个细胞与细胞群物理分离的任何物体（或者物体的集合）。这可以是试管、多孔板（例如 96 孔、384 孔、微量滴定板或者其他多孔板）、阵列、微阵列、微芯片、凝胶或者凝胶基质。优选地，所述物体适宜于 PCR 扩增。

[0065] 如这里所使用的，术语“多克隆蛋白”或者“多克隆性”指的是蛋白质组合物，包含不同的但是同源的蛋白质分子，优选地选自免疫球蛋白超家族。因此，每一个蛋白质分子与组合物中的其他分子都是同源的，但是还含有一个或者更多的可变多肽序列片段，其特征为多克隆蛋白质各成员之间氨基酸序列的差异。这种多克隆蛋白质的已知示例包括抗体或者免疫球蛋白分子、T 细胞受体和 B 细胞受体。多克隆蛋白质可以由确定的蛋白质分子亚组组成，其由共同的特征（例如对于所需的靶标具有共同的结合活性）确定，例如对所需靶标抗原表现出结合特异性的多克隆抗体。

[0066] 正如在这里所使用的，术语“遗传多样的细胞群”指的是细胞群，该细胞群中单个细胞在基因组水平上互不相同。这种遗传多样性的细胞群是例如来自供体的细胞群或者这种细胞的级分（例如含有 B 淋巴细胞或者 T 淋巴细胞的细胞级分）。

[0067] 术语“引物组”与术语“引物对”可以互换使用，它描述的是两个或者更多引物，这些引物一起能够起动目标核苷酸序列（即关联对的一个成员）的扩增。可以设计本发明的引物组使其起动含有可变区编码序列的核苷酸序列家族的扩增。不同家族的示例有抗体 κ 轻链、λ 轻链、重链可变区以及 α、β、γ 或者 δ T 细胞受体可变区。用于含有可变区编码序列的核苷酸序列家族扩增的引物组通常包含多个引物，其中一些引物可以是简并引物。

[0068] 术语“序列一致性”表示为百分比，它表明了两个序列中就最短序列的长度而言核酸序列一致性的程度。它可以计算如下：$(N_{ref}-N_{dif}) \times 100/N_{ref}$，其中 N_{ref} 是较短序列中的残基数目，N_{dif} 是两个序列之间按照 N_{ref} 的长度进行最佳比对匹配后不相同残基的总数。因此，DNA 序列 AGTCAGTC 和序列 TA**A**TCA**A**TCGG(Ndif = 2 且 Nref = 8) 的序列一致性是 75％（下划线显示了最佳的比对，斜体表示 8 个残基中有两个不相同的残基）。

[0069] 在提到连接时，术语“随机地”或者“随机的”指的是并非来自同一个细胞但是在遗传多样的细胞群中横向连接的核苷酸序列的连接。如果目标核苷酸序列是可变区编码序列，这会产生连接序列的组合文库。另一方面，如果目标核苷酸序列编码非多样性杂聚蛋白，则随机连接的序列看起来类似于来自单个细胞的连接的序列。

[0070] 就逆转录而言，术语“来自分离的单个细胞的模板”指的是这种分离的细胞内的核酸。核酸可以例如是 RNA、mRNA、DNA 或者基因组 DNA 的形式。核酸可以从细胞中分离出来或者仍然与细胞的其他物质在一起，细胞是完整无缺的形式或者是裂解的形式。

[0071] 扩增和连接方法

[0072] 本发明的一个特点是使用了一种变异的 PCR 降低了扩增目标核苷酸序列所需的试管的数目，在这种变异的 PCR 中，通过在同一个反应中包含一组以上的引物（例如扩增可变区域编码序列所需的所有引物），两个或者更多的靶标序列在同一个试管中被同时扩增。

一般地，这种方法被称为多重聚合酶链式反应（多重 PCR）。

[0073] 多重 PCR 扩增以及逆转录和随后的多重 PCR（多重 RT-PCR）是诊断领域众所周知的技术，如用于 DNA 突变、删除以及多态性分析，用于 mRNA 水平的定量测定以及鉴定病毒、细菌和寄生虫（综述参见 Markoulatos, P. et al. 2002. J. Clin. Lab. Anal. 16, 47-51）。但是使用由四个以上的引物（包含 Vκ 和 / 或 V_λ 引物组以及 V_H 引物组）组成的多重引物混合物在同一个容器中扩增免疫球蛋白轻链可变区编码序列和免疫球蛋白重链可变区编码序列，只有非常少的实例 (Chapal, N. et al. 1997. BioTechniques 23, 518-524. ; Liu, A. H. et al. 1992. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 7610-7614 ; Embleton, M. J. et al. 1992. Nucleic Acids Res. 20, 3831-3837)。原因可能是适用于抗原结合蛋白可变结构域编码序列扩增的引物对一般包含多个简并引物，目的是捕获这些可变区编码序列的多样性。这样，在对可变区编码序列进行多重 PCR 扩增时，PCR 反应的复杂性大大增加了。

[0074] 本发明的另一个特点是由多重 PCR 扩增的两个或者更多靶标序列在扩增过程后马上连接。特别地，可变区编码序列的关联对由这个过程连接。

[0075] 本发明的一个实施方案利用了多重引物混合物可以设计成在重叠 - 延伸 PCR 步骤中起作用这个特点，使目标核苷酸序列被同时扩增和连接。这个多重重叠 - 延伸 PCR 技术降低了分离和连接目标核苷酸序列，特别是已连接的可变区的关联对，所需的反应数目。

[0076] 本发明的其他实施方案通过连接方法或者重组方法得到连接，作为多重重叠 - 延伸 PCR 的一种替代连接方式。在这些步骤中，连接与多重 PCR 扩增不是同时进行的，而是作为扩增之后立即进行的一个步骤。但是连接仍然可以在进行多重 PCR 的试管中进行。

[0077] 为了进行多重重叠 - 延伸 PCR，需要有两个或者更多的引物组（多重引物混合物），其中每组中至少一个引物带有重叠 - 延伸尾巴。重叠 - 延伸尾巴使扩增过程中每个引物组产生的产物连接起来。这种引物混合物被称为多重重叠 - 延伸引物混合物。多重重叠 - 延伸 PCR 与通常的重叠 - 延伸 PCR 不同之处在于待连接的序列在同一个试管中同时产生，这样在扩增过程中使靶标序列立即连接，而没有任何中间纯化。而且，通常的重叠 - 延伸 PCR 需要用外引物或者嵌套引物进行单独的连接 PCR 反应，目的是产生连接产物 (Horton, R. M. et al. 1989. Gene 77, 61-68)。这样的额外扩增步骤在本发明的多重重叠 - 延伸 PCR 中是可选择的。

[0078] 本发明的另一个特点是多重 PCR 或者多重重叠 - 延伸 PCR 扩增之前的逆转录 (RT) 步骤，使用的模板来自分离的单个细胞或者等基因细胞群。

[0079] 本发明的另一个特点是使用来自分离的单个细胞或者等基因细胞群的核苷酸序列作为模板用于多重 PCR 扩增。优选地，在多重 PCR 之前将来自单个细胞的 RNA 逆转录为 cDNA。对于一些目标核酸序列的扩增，可以使用基因组 DNA 作为 mRNA 之外的另一种选择。通过使用分离的单个细胞或者来自分离的单个细胞进行克隆扩充后得到的等基因细胞群作为模板来源，就可以用来自细胞群中不同细胞的核苷酸序列避免编码目标杂聚蛋白的核苷酸序列的混杂。如果希望获得目标序列的原始组合，则这是非常重要的。特别是对于制备可变区编码序列关联对而言，使用分离的单个细胞或者等基因细胞群作为模板来源是一个重要的特征。

[0080] 多重重叠 - 延伸 PCR 是一项很少用的技术。WO 99/16904 公开了在单一反应中连接来自基因组序列的外显子，这样不需要使用逆转录就可产生 cDNA。根据描述，对于要连接

的每个外显子这个方法使用一个引物组（包含两个引物），这样形成了多重重叠－延伸引物混合物。每个单个引物组都能够通过互补重叠－延伸尾巴与相邻的引物组发生重叠。通过使用多重重叠－延伸引物混合物进行重叠－延伸 PCR 反应，之后进行嵌套 PCR（这被描述为一个必需的步骤），从基因组 DNA 模板产生 cDNA。

[0081] 如 WO 99/16904 中所描述的，由基因组 DNA 的外显子制备 cDNA 是与杂聚蛋白编码序列的克隆不相同的领域。首先，杂聚蛋白 (heteromeric protein) 一般是从不同的基因表达的，而 WO 99/16904 中描述的外显子连接涉及的是来自单一基因的外显子的连接。此外，本发明有助于连接后的目标核酸序列文库的制备，特别是组合文库和可变区关联对的文库的制备，这是与连接来自单一基因的一系列外显子产生单一非可变 cDNA 完全不同的情况。而且，本发明使用了来自单个细胞的核酸，特别是 RNA 形式的核酸，不需要从其他细胞成分中分离出来就可以用作模板。

[0082] 几乎没有出版物中描述了关于可变区编码序列连接的多重重叠－延伸 RT-PCR。

[0083] 多重重叠－延伸 RT-PCR 最简单的形式是从杂交瘤细胞系中分离 scFv 编码序列 (Thirion, S. et al. 1996. Eur. J. Cancer Prev. 5, 507-511 以及 Mullinax, R. L et al. 1992. BioTechniques12, 864-869)。Thirion 和 Mullinax 描述的方法用杂交瘤细胞系提取的总 RNA 和寡聚 dT 引物进行 mRNA 的逆转录，之后进行单独的连接步骤。使用总计 4 个引物，包含两个分别用于扩增重链可变区和轻链可变区的编码序列的引物对，进行连接步骤。V_L 正向引物和 V_H 或者 C_H 反向引物含有互补的重叠－延伸尾巴，使重链可变区和轻链可变区编码序列的扩增和连接同时进行。这些方法没有使用嵌套 PCR 增加连接方法的敏感性。

[0084] 关于可变区编码序列连接的另一个多重重叠－延伸 RT-PCR 的实例在前面提到的 WO 93/03151 中予以描述，其提供了克隆来自相同细胞的重链可变区和轻链可变区编码序列的方法而不需要在克隆前分离单个细胞。WO 93/03151 中描述的方法在 RT 步骤和多重重叠－延伸 PCR 步骤之间需要漂洗。而且，WO 93/03151 的特殊目的之一是解决了需要分离单个细胞以获得可变区编码序列关联对的问题。

[0085] 这些已知的多重重叠－延伸 RT-PCR 技术中没有一项可以在来自分离的单个细胞的模板上起作用。而且没有一项方法能够通过单一步骤 RT-PCR 反应进行。

[0086] 本发明的一个实施方案包括了多个非相邻的目标核苷酸序列的连接。该方法包含在多重 PCR 或者多重 RT-PCR 扩增步骤中使用来自分离的单个细胞或者等基因细胞群的模板扩增目标核苷酸序列并且实现扩增的目标核苷酸序列的连接。而且，该方法包含了对连接后的产物进行一次额外扩增的选择性步骤。

[0087] 本发明的另一个实施方案包括包含连接后的可变区编码序列的关联对文库的制备。该方法包含从供体获得含有淋巴细胞的细胞级分，从这个级分中可选地富集某一个淋巴细胞群。然后，通过在多个容器中分配来自含有淋巴细胞的细胞级分或者富集后的细胞级分的细胞，得到分离的单细胞群。分离的单细胞群中含有的可变区编码序列进行多重分子扩增（多重 RT-PCR 扩增），实现可变区编码序列对的连接（其中单个的对来自分离的单细胞群中的单个细胞）。而且，该技术包含两个可选的步骤：第一步将单细胞群中每个分离的单个细胞扩充为等基因细胞群，然后进行多重 RT-PCR 扩增。这样得到具有多样性等基因细胞群的多个容器（一个容器中一个等基因细胞群）。第二个选择性步骤包括对连接后的可变区编码序列进行额外的扩增。

[0088] 在本发明的优选实施方案中，所述的包含免疫球蛋白轻链可变区编码序列的关联对文库的单个成员与来自同一个细胞的免疫球蛋白重链可变区编码序列相连，或者 T 细胞受体结合结构域编码序列的关联对文库的单个成员由与 α 链可变区相连的 β 链可变区构成或者由与 δ 链可变区相连的 γ 链可变区构成，其中相连的可变区来自同一个细胞。

[0089] 本发明的多重 RT-PCR 扩增可以作为两个步骤的过程进行，其中逆转录 (RT) 和多重 PCR 扩增（或者是多重分子扩增）分别进行，或者作为单一步骤的过程进行，其中 RT 和多重 PCR 扩增步骤使用同样的引物在一个试管中进行。

[0090] 逆转录 (RT) 使用含有逆转录酶活性的酶进行，从来自分离的单细胞的总 RNA、mRNA 或者靶标特异 RNA 产生 cDNA。可以用于逆转录的引物有，例如寡聚 dT 引物、随机六聚体引物、随机十聚体引物、其他随机引物或者对于目标序列特异的引物。

[0091] 两步多重 RT-PCR 扩增步骤使 RT 步骤产生的 cDNA 被分配到一个以上的容器中，这样在进行扩增之前储存了模板级分。此外，cDNA 向一个以上试管中的分配使得可以对来自同一个模板的核酸进行一个以上的多重 PCR 扩增。尽管这导致了独立反应数量的升高，但这打开了降低多重引物混合物复杂性的可能性，如果这是所期望的话。这个两步的方法可以例如用于在一个试管中扩增和连接重链可变区和 κ 轻链可变区编码序列以及使用相同的模板在不同的试管中扩增和连接重链可变区和 λ 轻链可变区编码序列。单个细胞通常只表达一种轻链。但是同时进行反应而不是在进行另一个反应之前等待一个反应的结果通常是更为容易的。而且，κ 和 λ 的扩增作为内部阴性对照，因为预计只有 κ 或者 λ 才能从单个细胞中扩增。

[0092] 在单步多重 RT-PCR 步骤中，在同一个容器中进行逆转录和多重 PCR 扩增。所有在单步中进行逆转录和多重 PCR 必需的组分在一开始就加入到容器中并且进行反应。一般地，一旦反应开始，就无须加入额外的组分。单步多重 RT-PCR 扩增的优势是它进一步减少了产生本发明的连接的核苷酸序列所需的步骤数目。在需要在多个容器中进行相同反应以及在单细胞阵列上进行多重 RT-PCR 时这是非常有用的。通过使用多重引物混合物中存在的反向引物进行单步多重 RT-PCR，该反向引物在多重 PCR 扩增中需要作为逆转录的引物。一般地，单步多重 RT-PCR 所需的组合物包含核酸模板、具有逆转录酶活性的酶、具有 DNA 聚合酶活性的酶、脱氧核苷三磷酸混合物（包含 dATP，dCTP，dGTP 和 dTTP 的 dNTP 混合物）以及多重引物混合物。核酸模板优选是来自分离的单个细胞的总 RNA 或者 mRNA，模板或者是纯化的形式或者是细胞裂解物的形式或者仍然在完好无缺的细胞内。一般地，反应混合物的精确组成需要对每一个用于本发明的多重引物混合物进行一些优化。这适用于两步和单步的多重 RT-PCR 步骤。

[0093] 在本发明的其他实施方案中，使用基因组 DNA 而不是 RNA 作为模板可能是适宜的。在这些情况下省略了逆转录步骤，而本发明的其它步骤根据本申请全文所述的进行。

[0094] 对于一些单步多重 RT-PCR 反应而言，在反应中加入额外的组分可能是有利的。例如，在 RT 步骤之后加入聚合酶。其他组分可以是例如 dNTP 混合物或者可能具有不同引物组成的多重引物混合物。然后这可以被认为是单管 (one-tube) 多重 RT-PCR，一般认为它与单步多重 RT-PCR 具有相同的优点，因为它也限制了为获得所需的连接产物而必需的试管数目。

[0095] 多重 RT-PCR 扩增出的目标核苷酸序列可以通过使用不同的多重引物混合物用

几种方法互相连接，例如多重重叠－延伸 RT-PCR、连接方法或者重组方法。优选地，多重 RT-PCR 扩增和连接方法是单步或者两步方法。但是连接过程可能还可以以多步骤的过程进行，使用例如填充片段以 PCR、连接方法或者重组方法连接目标核酸序列。这种填充片段可能含有顺式元件、启动子元件或者相关的编码序列或者识别序列。在优选的实施方案中，连接过程与多重 RT-PCR 扩增在同一个容器中进行。

[0096] 在本发明的一个实施方案中，与多重 PCR 扩增一起进行多个非相邻的目标核苷酸序列的连接，使用多重重叠－延伸引物混合物。这使目标序列被同时扩增和连接。一般地，多重重叠－延伸 PCR 所需的组合物包含核酸模板，具有 DNA 聚合酶活性的酶、脱氧核苷三磷酸混合物（包含 dATP，dCTP，dGTP 和 dTTP 的 dNTP 混合物）以及多重重叠－延伸引物混合物。

[0097] 在本发明的一个特定实施方案中，通过多重重叠－延伸 RT-PCR，使用来自分离的单个细胞或者等基因细胞群的模板对多个非相邻的目标核苷酸序列进行连接。而且，该方法包含对连接产物进行额外分子扩增的选择性步骤。优选地，多重重叠－延伸 RT-PCR 以单步或者单管反应进行。

[0098] 本发明的多重重叠－延伸引物混合物包含至少两个引物组，该引物组能够起动至少两个可变区编码序列的扩增和连接，例如免疫球蛋白重链可变区家族序列与 κ 或者 λ 轻链可变区家族序列的扩增和连接，或者来自 T 细胞受体家族 α、β、γ 或者 δ 的序列的扩增和连接。

[0099] 在本发明的另一个实施方案中，通过连接方法将多重 RT-PCR 扩增出来的多个目标核苷酸序列连接起来。为了达到这个目的，设计用于多重 RT-PCR 的多重引物混合物，使扩增出来的靶标序列能够被适当的限制性酶切割，并且可以通过 DNA 连接方法进行共价连接（引物设计在“引物混合物和设计”部分中予以描述）。在使用这种多重引物混合物进行多重 RT-PCR 之后，形成靶标序列相容末端所需的限制性酶与连接酶一起加入到混合物中。虽然可以进行纯化，但是在这个步骤之前不必要对 PCR 产物进行纯化。限制性切割和连接联合进行的反应温度大概在 0 到 40 摄氏度之间。但是如果来自多重 PCR 反应的聚合酶仍然存在于混合物中，则孵育温度优选在室温以下，最优选的温度在 4 到 16 摄氏度之间。

[0100] 在本发明的另一个实施方案中，通过重组方法将多重 RT-PCR 扩增出来的多个目标核苷酸序列连接起来。在这种方法中，扩增出的靶标序列可以使用相同的重组位点连接起来。然后加入促进重组的重组酶进行连接。一些适宜的重组酶系统有具有各种 FRT 位点的 Flp 重组酶系统、具有各种 lox 位点的 Cre 重组酶、在 attP 位点和 attB 位点之间进行重组的整合酶 ΦC31、β－重组酶－六系统以及 Gin-gix 系统。已经在两个核苷酸序列（V_H 与 V_L 连接）上示例了通过重组进行的连接（Chapal，N. et al. 1997 BioTechniques 23，518-524），在这里引用作为参考。

[0101] 在一个本发明的优选实施方案中，目标核苷酸序列包含可变区编码序列，连接产生了可变区编码序列的关联对。除了可变区以外，这种关联对可能还包含一个或者更多恒定区编码序列。

[0102] 在本发明的一个更为优选的实施方案中，目标核苷酸序列包含免疫球蛋白可变区编码序列，连接产生了轻链可变区和重链可变区编码序列的关联对。除了可变区以外，这种关联对可能还包含一个或者更多恒定区编码序列。而且，这种关联对可以从来自由含有淋

巴细胞的细胞级分（例如全血细胞、单核细胞或者白细胞）富集的 B 淋巴细胞谱系的细胞的模板中分离出来。

[0103] 在本发明同样优选的实施方案中，目标核苷酸序列包含 TcR 可变区编码序列，连接产生了 α 链可变区和 β 链可变区编码序列的关联对或者 γ 链可变区和 δ 链可变区编码序列的关联对。除了可变区以外，这种关联对可能还包含一个或者更多恒定区编码序列。而且，这种关联对可以从来自由含有淋巴细胞的细胞级分（例如全血细胞、单核细胞或者白细胞）富集的 T 淋巴细胞谱系的细胞的模板中分离出来。

[0104] 本发明的另一方面是使用遗传多样性细胞群作为模板来源的多重 RT-PCR。细胞与细胞之间主要的杂聚蛋白编码序列没有变化，结合蛋白的可变区编码序列不是如此。因此在使用本发明克隆这种非可变杂聚蛋白编码序列时，没有必要进行单个细胞的初步分离。

[0105] 在本发明的该实施方案中，多个非相邻的目标核苷酸序列通过以下的方法被随机连接，该方法包含：使用来自遗传多样细胞群的模板对目标核苷酸序列进行多重 RT-PCR 扩增，然后连接扩增后的目标核苷酸序列。而且该方法包含对连接后的产物进行额外扩增的选择性步骤。如同单细胞方法一样，连接可以使用用于扩增的多重重叠 - 延伸引物混合物进行或者通过连接方法或重组方法进行。优选地来自细胞群的模板不严格局限于细胞内部。细胞群可以例如被裂解。

[0106] 将随机连接过程应用于表达可变结合蛋白的细胞群，使可变区编码序列组合文库的制备简单化。优选地，细胞群包含的细胞表达可变区结合蛋白，例如 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、杂交瘤细胞、浆细胞或者这些细胞的混合物。

[0107] 以上提到的实施方案中的细胞群可以例如被通透化或者被裂解，不需要额外的纯化，或者模板核酸可以通过标准步骤从细胞中分离出来。优选单步多重 RT-PCR 步骤。但是两步方法也可以用于该实施方案中。

[0108] 本发明还提供了包含连接的免疫球蛋白轻链可变区和重链可变区编码序列对的组合文库。

[0109] 提高多重 RT-PCR- 连接过程特异性、敏感性和产量的有效方法是对多重 RT-PCR 得到的连接后的核苷酸序列进行额外的分子扩增，之后通过连接方法或者重组方法进行连接或者使用多重重叠 - 延伸 RT-PCR 进行连接。这个额外的扩增优选地使用 PCR 扩增进行，使用适用于扩增连接的目标核酸序列的引物混合物。使用的引物混合物可以是多重引物混合物或者多重重叠 - 延伸引物混合物的外引物，即与连接后的可变区编码序列有义链最外面的 5′ 端和 3′ 端退火的引物，这样使整个连接产物被扩增。外引物还可以描述为多重重叠 - 延伸引物混合物中不含有重叠 - 延伸尾巴的引物。或者可以使用嵌套或者半嵌套引物组进行连接的核苷酸序列的额外扩增。这种嵌套 PCR 特别用于提高该方法的特异性以及提高连接产物的量。对于本发明，半嵌套式 PCR（如在标题为“引物混合物和设计”的部分中描述的）被认为与嵌套式 PCR 同样有用。因此，尽管对于本发明不是必须的，但是合意的是对多重重叠 - 延伸 RT-PCR 的连接产物或者由连接方法或者重组方法连接的产物进行额外的 PCR 扩增，优选使用嵌套或者半嵌套 PCR。

[0110] 额外的扩增可以使用多重重叠 - 延伸 RT-PCR 反应产物或者连接产物或者重组产物的一个级分或者全部，或者这些产物中任何一个的一个级分，或者使用来自这些反应中任何一个的经过部分纯化（例如对连接产物进行琼脂糖凝胶电泳，然后将对应于连接后的

可变区编码序列预期大小的片段切下来）的连接产物直接进行。对于通过多重重叠－延伸RT-PCR连接的产物，优选地直接在多重重叠－延伸RT-PCR反应的一个级分上进行额外的扩增，因为这会有助于在第一个反应中没有被连接的单个靶标序列的连接。

[0111] 目标序列

[0112] 本发明的目标核苷酸序列可以选自编码不同亚基或者结构域的序列，这些亚基或者结构域在表达后形成蛋白质或者蛋白质的一部分。这些由至少两个不同的亚基组成的蛋白质被称为杂聚蛋白。杂聚蛋白在所有的种中都是常见的。这些蛋白质所属的一些类型有例如酶、抑制剂、结构蛋白、毒素、通道蛋白、G蛋白、受体蛋白、免疫球蛋白超家族蛋白、转运蛋白等等。编码这些杂聚蛋白的核苷酸序列是不相邻的，意味着例如它们来自不同的基因或者不同的mRNA分子。但是如本发明中所使用的，不相邻还可以表示编码同一个蛋白质的结构域的核苷酸序列，其中结构域被非目标核苷酸序列分割开。

[0113] 在本发明的一个实施方案中，目标核苷酸序列含有来自免疫球蛋白超家族例如免疫球蛋白（抗体）、B细胞受体和T细胞受体（TcR′s）的可变区编码序列。来自免疫球蛋白的可变区编码序列是特别感兴趣。这种可变区编码序列包含全长的抗体以及Fab′s、Fv′s、scFv′s以及可变区编码序列片段的组合，例如互补决定区（CDR′s）、连接基因或者V基因或者这些的组合。一般地本发明可以应用于任意组合的可变区编码序列及其片段。本申请例示了整个轻链与重链可变结构域的连接。但是本发明还允许只有重链和轻链的可变结构域的连接，产生Fv或者scFv编码序列，或者整个轻链与重链可变区＋恒定区结构域C_{H1}+部分的铰链区连接，产生Fab、Fab′或者$F(ab)_2$。而且，可以向可变重链中添加重链恒定区结构域的任何区域，产生截短的抗体编码序列或者全长的抗体编码序列。

[0114] 在本发明的另一个实施方案中，可变区编码序列包含一种类型的免疫球蛋白轻链（κ或者λ）编码序列以及一个免疫球蛋白重链可变区编码序列。

[0115] 来自T细胞受体（TcR′s）的可变区编码序列也是感兴趣的。这些TcR编码序列包含全长的α和β链或者γ和δ链以及可溶性TcR的编码序列或者只有这些结构域的可变结构域或者它们的单链融合蛋白（例如单链αβ或者单链的γδ）的编码序列。

[0116] 模板来源

[0117] 本发明的一个特点是将来自分离的单个细胞、等基因细胞群或者没有被分开到单个容器中的遗传多样细胞群的核苷酸序列连接起来的能力。本发明中使用的细胞可以是例如细菌、酵母、真菌、昆虫细胞、植物细胞或者哺乳动物细胞或者这些细胞的级分。来自哺乳动物的血液细胞是可以用于本发明的细胞级分的一个实例。

[0118] 本发明的优选特点是使用分离的单个细胞或者等基因细胞群作为模板来源，原因是目标核酸序列的混杂特别是可变区编码序列的混杂被避免了。如果希望获得原始的配对例如可变区编码序列的原始配对，则这一点是非常重要的。

[0119] 本发明的另一个优选的特点是从包含淋巴细胞例如B淋巴细胞、T淋巴细胞、浆细胞和/或各种不同发育阶段的这些细胞谱系的细胞级分中获得单个细胞或者单细胞群。其他表达来自免疫球蛋白超家族的结合蛋白的细胞群也可以被用于获得单个细胞。细胞系例如杂交瘤细胞、B淋巴细胞或者T淋巴细胞谱系或者病毒无限增殖化细胞系或者来自供体的参与免疫应答的细胞也可以用于本发明。来自供体的含有淋巴细胞的细胞级分可以从富含这些细胞的天然组织或者液体例如血液、骨髓、淋巴结、脾脏组织、扁桃体组织或者肿瘤

内和周围的浸润或者炎症组织浸润获得。用于本发明的适宜的细胞供体可以选自完全含有获得性免疫系统的脊椎动物。供体可以是从未接受免疫接种的或者对所需的靶标是过度免疫的。分离对所需靶标具有结合特异性的抗原结合蛋白时，优选具有过度免疫性的供体。这些具有过度免疫性的供体可以是使用靶标或者靶标的片段进行了免疫接种的供体，或者可以是恢复期的患者、或者是未处于健康状态、对靶标具有天然免疫应答的个体，例如自体免疫患者、癌症患者、具有感染性疾病的患者如 HIV 患者、甲、乙或丙型肝炎患者、SARS 患者等等或者具有慢性疾病的患者。

[0120] 在使用重组蛋白用于治疗时，它们优选地来自与将要被治疗的个体属于相同物种的序列（例如人类的序列用于人类的治疗）。首先，因为来自外源序列（即非人类）的重组蛋白会被免疫系统识别，导致牵涉多克隆抗蛋白质抗体的免疫应答。这些抗蛋白质抗体可以通过占据活性位点阻断药物的作用，它们会加速药物的清除，有可能诱导不良反应，如重复接触后的超敏反应。

[0121] 但是在重组蛋白来自具有物种特性的序列时也可以看到免疫原性。这种免疫原性可以例如被与体内观察到的那些修饰不同的翻译后修饰所诱导。可变区编码序列组合文库也可能产生免疫原性，原因是它们由体外产生的可变区编码序列的随机对组成。控制体内抗体重链和轻链编码序列对（或者 T 细胞受体）形成的规律还没有被完全理解。因此，即使组成对的两个序列都完全是人类序列，一些体外形成的对仍可能被免疫系统识别为外源的。另一方面，从关联文库得到的结合蛋白不会产生所述的异常组合，因此与来自组合文库的结合蛋白相比，它们具有较低的潜在免疫原性。这并不意味着来自组合文库的产物不适宜用于治疗，只是需要对以上提及的它们的副反应进行更大程度的监控。

[0122] 对于本发明中的使用，细胞供体应当优选与将要用从本发明的连接核苷酸序列得到的产物进行治疗的物种属于同一物种。优选地，细胞供体是家养动物、宠物、人或者转基因动物。携带人免疫球蛋白基因座的转基因动物在美国专利 No. 6,111,166 和 Kuroiwa, Y. 等人 Nature Biotechnology ;2002 ;20 :889-893 中有所描述。这样的转基因动物能够产生人免疫球蛋白。这样，对这种转基因动物进行通常的免疫接种技术，可以产生针对特定靶标的完全人抗体。这使编码结合蛋白（这些结合蛋白对更为困难的靶标例如某些人抗原具有特异性，对于所述某些人抗原没有或者只存在有限的天然人抗体应答）的文库的制备成为可能。这样的转基因动物同样可以开发产生人 T 细胞受体。

[0123] 在本发明的另一个实施方案中，含有淋巴细胞的细胞级分由从供体获得的全血、骨髓、单核细胞或者白细胞组成。单核细胞可以从血液、骨髓、淋巴结、脾脏、癌症细胞周围的浸润物以及炎性浸润物中分离。单核细胞可以通过密度离心技术如 Ficoll 梯度进行分离。如果单核细胞从包含组织的样品中分离，在进行梯度离心之前将组织打碎。可以使用例如机械方法如研磨、电穿孔和 / 或化学方法如酶处理等进行组织打碎。可以使用白细胞提取法直接从供体进行白细胞的分离。例如含有淋巴细胞的骨髓或者组织的粗制备物也可以用于本发明。这些制备物需要进行打碎，例如根据以上的描述进行打碎，以促进单细胞的分配。

[0124] 本发明的另一个特点是就某种淋巴细胞群例如来自 B 淋巴细胞或者 T 淋巴细胞谱系的细胞而言，对含有淋巴细胞的细胞级分如全血、单核细胞、白细胞或者骨髓进行富集。可以通过例如使用磁珠细胞分选或者荧光激发细胞分选 (FACS) 进行 B 淋巴细胞的富集，利

用了谱系特异的细胞表面标记蛋白如 CD19 或者其他 B 细胞谱系特异标记。可以通过例如使用细胞表面标记如 CD3 或者其他 T 细胞谱系特异的标记进行 T 淋巴细胞的富集。

[0125] 本发明的优选特点是对富集后的 B 淋巴细胞进行进一步分选，目的是在向多个容器中分配单个细胞之前获得浆细胞。一般通过 FACS 分选分离浆细胞，使用表面标记例如 CD38，可能与 CD45 联合使用。也可以使用其他浆细胞特异的表面标记或者其组合，例如 CD138，CD20，CD21，CD40，CD9，HLA-DR 或者 CD62L，对于标记的精确选择取决于浆细胞的来源，如扁桃体、血液或者骨髓。浆细胞还可以从来自任何以上来源的、未富集的含有淋巴细胞的细胞群中获得。从血液中分离的浆细胞有时被称为早期浆细胞或者成浆细胞。在本发明中这些细胞也被称为浆细胞，尽管它们与骨髓内的浆细胞相比是 CD19 阳性的。对免疫球蛋白编码序列的关联对的分离，使用浆细胞是较好的，因为这些细胞中有更高比例的细胞产生抗原特异抗体（这些抗体反映了对所需抗原的获得性免疫），且大多数细胞发生了体细胞高变，因此编码高亲和性的抗体。而且与其他 B 淋巴细胞群相比，浆细胞中的 mRNA 水平升高，这样在使用单个浆细胞时逆转录步骤更为有效。作为浆细胞分离的代替，也可以使用细胞表面标记如 CD22，从含有淋巴细胞的细胞级分中分离记忆 B 细胞。

[0126] 本发明的另一个特点是在向多个容器中分配细胞之前，根据抗原特异性选择被富集的 B 淋巴细胞。通过富集的 B 淋巴细胞与所需的抗原接触使抗原结合在暴露于表面的免疫球蛋白上，之后分离结合物，从而分离抗原特异的 B 淋巴细胞。这可以通过例如使用所需的抗原包被磁珠之后进行磁珠细胞分选、通过 FACS、通过使用抗原包被层析柱之后进行亲和层析、通过滤膜筛选或者本领域内已知的其他方法进行。如果需要的话，可以根据抗原特异性对浆细胞以及 B 淋巴细胞、未富集的单核细胞、白细胞、全血、骨髓或者组织制备物进行分离。

[0127] 本发明的另一个特点是使用表面标记 CD45RO 和 / 或 CD27 分选富集的 T 淋巴细胞（例如 CD3 阳性细胞），获得记忆 T 细胞级分。也可以使用 MHC- 肽复合体筛选 T 淋巴细胞的 MHC- 抗原特异性（例如 Callan，M.F.et al.1998.J.Exp.Med.187，1395-1402 ；Novak，E.J.et al.1999.J.Clin.Invest 104，R63-R67）。

[0128] 本发明的另一个特点是以上描述的任何分离的细胞级分（例如 B 淋巴细胞、浆细胞、记忆细胞或者 T 淋巴细胞）的无限增殖化。可以在细胞分配之前使用 EB 病毒 (Traggiai，E.，et al.，2004.Nat Med 10，871-875) 进行无限增殖化。或者可以在逆转录之前对分离的单个细胞进行无限增殖化和扩充。Traggiai 等人，Nat Med.2004Aug ；10(8) ：871-5。

[0129] 本发明的另一个特点是所需细胞（例如杂交瘤细胞、B 淋巴细胞或者 T 淋巴细胞谱系的细胞系、全血细胞、骨髓细胞、单核细胞、白细胞、B 淋巴细胞、浆细胞、抗原特异的 B 淋巴细胞、记忆 B 细胞、T 淋巴细胞、抗原 /MHC 特异的 T 淋巴细胞或者记忆 T 细胞）群的细胞向多个容器中进行逐一分配，目的是获得分离的单细胞群。这种单细胞的分离指的是细胞从细胞群中进行物理分离，使单个容器中含有单个细胞，或者对微阵列、芯片或者凝胶基质进行荷载使其产生单个细胞。这些细胞可以通过有限稀释直接分配到大量的容器（例如单个容器的阵列）中。本发明中使用的单个容器优选是适用于 PCR 的容器（例如 PCR 管以及 96 孔或者 384 孔的 PCR 平板或者更大的容器阵列）。但是也可以使用其他的容器。当向大量的单个容器（例如 384 孔的平板）中分配单个细胞时，得到的是单个细胞群。这种分配

可以通过例如将某一体积分配到单个容器中，该体积中平均包含的细胞浓度为 1、0.5 或者 0.3 个细胞，这样得到平均含有单个细胞或者更少细胞的容器。由于通过有限稀释对细胞进行分配是一个统计事件，一部分容器将会是空的，大部分的容器会含有一个细胞，少部分的容器会含有两个或者更多的细胞。当两个或者更多的细胞存在于一个容器中，则可能在该容器的细胞中出现一些可变区编码序列的混杂。但是由于这种混杂是次要事件，所以它不会影响本发明的整体有用性。而且，不具有所需结合亲和性和特异性的可变区编码序列的组合在筛选过程中很有可能不被选中因此被除去。因此，混杂的次要事件不会显著影响本发明的最终文库。

[0130] 通过有限稀释进行细胞分配的替代方法使用例如细胞分选仪如 FACS 仪器或者能够设定程序准确地将单个细胞分配到单个容器中的自动仪器。这些替代方法是优选的，原因是它们消耗更少的劳动，对于均一地将单个细胞分配到单个容器中更为有效。

[0131] 以上描述的富集、分选和分离步骤的实施使得大部分细胞保持完好无损。在富集和分选过程中细胞的破裂可能导致可变区编码序列的混杂。但是预计这不是问题，因为破裂的频率预计很低。在向单个容器中分配之前对细胞进行漂洗和可能的 RNA 酶处理会除去任何在该过程中已经泄露的 RNA。

[0132] 而且，在考虑以上对如何分配细胞以获得单个容器群中的单细胞群的描述时，每一个容器中必需含有单个细胞并不被认为是绝对必需的特征。相反，它表明大多数容器中含有单个细胞，例如含有两个或者更多细胞的容器的数目占所分配细胞总数的 25％以下，或者更好地在 10％以下。

[0133] 本发明的另一个特点是逆转录的进行，使用的模板来自在多个容器中被分配为单一细胞的细胞。

[0134] 对于逆转录 (RT)，根据本发明，认为将要作为 RT 模板来源的单细胞内的核酸来自单个细胞，尽管没有必要将它们从该单个细胞的其他成分中分离出来。

[0135] 当对单个细胞向单个容器中进行了最终分配后，可以在逆转之前对单个细胞进行增殖以获得等基因细胞群。这个过程产生了更多的可以被用作模板的 mRNA，如果要扩增和连接的是稀有的靶标，则这一点可能就很重要。但是就靶标基因而言，在增殖过程中细胞应当保持遗传一致性。只要用于逆转录的模板没有降解，分离的细胞或者等基因细胞群可以保存完好或者裂解。优选对细胞进行裂解，目的是使接下来的逆转录和 PCR 扩增变得容易。

[0136] 在本发明的一个不同的实施方案中，公开的多重重叠－延伸 RT-PCR 方法或者多重 RT-PCR 之后通过连结方法或者重组方法进行连接，还可以用于来自没有被分配到单一容器中的遗传多样细胞群的模板，所述细胞群在一起作为一个细胞库。该方法可以用于产生组合文库。这种方法不需要单个细胞的分配。但是，可以在这一方法中使用的细胞与在单细胞方法中描述的那些细胞是相同的，例如一群分选后的 B 淋巴细胞或者 T 淋巴细胞。在对这样的细胞群进行单步多重重叠－延伸 RT-PCR 或者单步多重 RT-PCR 之后通过连接方法或者重组方法进行连接时，优选地在反应之前裂解细胞，如果需要的话可以从裂解物中分离总 RNA 或者 mRNA。

[0137] 本发明中单步多重重叠－延伸 RT-PCR 的敏感性允许使用非常小量的模板。如实施例 2 和 3 所示，可以用对应于单个细胞裂解物的模板量进行单步多重重叠－延伸 RT-PCR。

[0138] 引物混合物和设计

[0139] 本发明的引物混合物包含至少四个引物，它们两两成对形成引物组，能够扩增至少两个不同的目标靶标序列。两个或者更多的这种引物组组成了多重引物混合物。优选地，多重引物混合物包含至少 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19 或者 20,30,40,50,60,70,80,90100,110,120,130,140 或者 150 个引物组（引物对）。特别对于可变区编码序列的扩增，多重引物混合物中的单个引物组可以由多于两个的引物组成。优选地，一个引物组包含至少 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,20,25,30,35,45,50,60,70,80,90,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190,200,220,240,260,280 或者 300 个引物。优选地，在多重引物混合物中引物的总数至少是 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,20,25,30,35,45,50,60,70,80,90,100,125,150 或者 200，最多是 225,250,275,300,325,350,375 或者 400 个引物。

[0140] 本发明的所有引物包含基因特异的区域，优选地所有的引物还在引物 5′ 末端带有引物尾巴，即与基因特异引物部分的 3′ 端融合的 5′ 非编码序列。这样的引物尾巴大约有 6-50 核苷酸长，但是如果需要的话也可以更长一些。扩增以后，引物尾巴 (primer tail) 被加在靶标序列上。

[0141] 本发明的引物尾巴是例如，克隆尾巴和连接尾巴，如适用于通过连接方法进行连接的尾巴，适用于通过重组方法进行连接的尾巴或者重叠 - 延伸尾巴。

[0142] 克隆尾巴可以为 6 到 20 个核苷酸长或者更长并且包含限制位点和 / 或重组位点，它们对连接产物向适当载体中的插入是有用的。

[0143] 为了通过连接方法进行连接，对多重引物混合物的引物组进行设计使第一引物组的一部分（正向或者反向引物）装配有含有限制位点的连接尾巴，该限制位点在切割后会与位于第二引物组一部分的连接尾巴中的限制位点相容。为了连接多于两个的靶标序列，第二引物组的第二部分装配有限制位点，该限制位点切割后能与第三引物组的一部分中的限制位点相容。位于第二引物组中的所述第二限制位点应该与第一引物组中的限制位点不相容。可以通过这样设计引物来连接相当多的靶标序列。应该选择在靶标序列中出现频率低或者不出现的限制位点。而且，相容性限制位点优选地应该是不同的，使得连接位点不能被所使用的特定限制酶切割。这使得反应向靶标序列 1 与靶标序列 2 的连接方向进行，原因是相同靶标序列之间的连接可以被限制性酶切割。适宜的限制位点对有，例如 SpeI 和 XbaI（或者 NheI 或 AvrII 可以代替这两个中的一个或者全部）、NcoI 和 BspHI、EcoRI 和 MfeI 或者 PstI 和 NsiI。对于连接，SpeI 可以例如位于靶标序列 1 中，XbaI 可以位于靶标序列 2 中，NcoI 可以位于靶标序列的另一端，BspHI 位于靶标序列 3 中，依此类推。为了进一步简化这个过程，如果限制酶在相同的缓冲液中都起作用则是一个优势。

[0144] 为了通过重组方法进行连接，多重引物混合物的引物组可以例如按照 Chapal(1997 BioTechniques 23,518-524) 的文章中所示例的进行设计，该文章在这里被引用作为参考。

[0145] 为了使目标核苷酸序列的连接与多重 PCR 扩增在同一个步骤中进行、向多重引物混合物的每一个引物组的至少一个引物中加入适合于重叠 - 延伸 PCR 的尾巴，这样产生多重重叠 - 延伸引物混合物。

[0146] 重叠 - 延伸尾巴通常更长，长度从 8 到 75 个核苷酸，可能含有限制位点或者重组位点，使得接下来可以插入调控元件如启动子、核糖体结合位点、终止序列或者连接体序列

（如 scFv 中的连接体序列）。如果需要终止密码子的话，重叠 - 延伸尾巴还可以含有终止密码子。一般地有三种类型的重叠 - 延伸尾巴，如图 1 中所示。在类型 I 中，两个引物组中只有重叠 - 延伸尾巴互相重叠。两个重叠 - 延伸尾巴中不必所有的核苷酸都互相互补。在本发明的一方面中，互补的核苷酸占据了重叠 - 延伸尾巴的 60 到 85％。在类型 II 的重叠 - 延伸尾巴中，5′ 核苷酸中的 4 到 6 个核苷酸与相邻靶标序列的基因特异区域互补。在类型 III 的重叠 - 延伸尾巴中，整个的重叠区与相邻的靶标序列互补。如果以后要在连接的靶标序列之间插入调控元件等，则优选类型 I 和类型 II 的重叠 - 延伸尾巴。如果要通过确定的连接体（如 scFv 中的）连接靶标序列，则优选类型 II 的重叠 - 延伸尾巴。如果靶标序列要按照阅读框进行连接，则优选类型 III 的重叠 - 延伸尾巴。

[0147] 重叠 - 延伸尾巴的设计取决于序列的特性，如长度、相对 GC 含量 (GC％）、是否存在限制位点、回文序列、熔解温度、它们所要连接的基因特异的部分等等。重叠 - 延伸尾巴的长度应该在 8 到 75 个核苷酸之间，优选地长度在 15 到 40 个核苷酸之间。更为优选在 22 到 28 个核苷酸之间。使用非常长的重叠 - 延伸尾巴 (50 到 75 个核苷酸）可能对由每个引物组产生的产物的连接有利。但是在使用非常长的重叠 - 延伸尾巴时，重叠 - 延伸尾巴的长度和基因特异区的长度的比例很可能需要进行调整。GC％的偏好取决于重叠 - 延伸尾巴的长度。因为较短的尾巴具有较短的互补区域，所以它们需要比更长的尾巴具有更高的 GC％以加强相互作用。应当同样遵守引物设计的其他原则，例如应当尽可能减少使引物二聚体化和发夹的形成。引物也不能引发错误的反应。而且，已知 Taq DNA 聚合酶通常在新合成的 DNA 链的 3′ 端加上腺嘌呤 (A)，通过使重叠 - 延伸尾巴容纳 3′ 非模板的 A 添加，使其适合于重叠 - 延伸尾巴的设计。

[0148] 携带连接尾巴（例如重叠 - 延伸尾巴、适合于通过连接方法进行连接的尾巴或者适合于通过重组方法进行连接的尾巴）的引物的选择确定了靶标序列连接的顺序和方向。是引物组中的正向引物还是反向引物还是很可能正向和反向引物都配备有连接尾巴，这对于本发明不是重要的。但是，还是必须对此给予一些考虑，因为在最终产物中靶标序列的顺序和方向可能对于例如调控元件（如启动子和终止序列）的插入或者对于靶标序列按照阅读框的连接是重要的。

[0149] 为了连接两个目标核苷酸序列，可以在用于每一个靶标序列 PCR 扩增的每一引物组的反向或者正向引物上加上连接尾巴。本发明示例了向每组引物的 V_H 和 V_L 正向引物中添加重叠 - 延伸尾巴和适于通过连接方法进行连接的尾巴（例如分别如图 2 和实施例 9 所示）。这使得产物的连接方向是 5′ 到 5′（头对头和双向）。但是连接尾巴也可以加在每个引物组的反向引物（例如在第一组的 Cκ 和 / 或 C_λ 或者在第二组中的 C_H 或者 J_H）上。这使得产物的连接方向是 3′ 到 3′（尾对尾和双向）。第三种选择是在第一个引物组的反向引物（例如 Cκ 和 / 或 C_λ 引物）和第二引物组的正向引物（例如 V_H 引物）上加上连接尾巴，反之亦然。这产生了 3′ 到 5′ 的定向（头对尾和单向）。图 3 示意了可以产生的可能方向，这取决于每个引物组中哪个引物装备有连接尾巴。

[0150] 在连接两个以上的目标核苷酸序列时，一些引物组需要在正向和反向引物上都具有连接尾巴，这样使一个尾巴与前一个引物组的一个尾巴互补，另一个尾巴与接下来的引物组中的一个尾巴互补。这个原则适于所有扩增靶标序列（将要在两个其他靶标序列之间被连接）的引物组。

[0151] 基因特异引物部分的设计应当遵守已知的引物设计原则，例如使引物的二聚体化、发夹形成以及非特异退火最小。而且，在可能的情况下应当避免 3′ 的碱基出现多个 G 或者 C 核苷酸。引物组中基因特异区域的熔解温度 (Tm) 优选地应当互相相等，相差正负 5 摄氏度。在本发明中，合意的 Tm 值在 45 摄氏度到 75 摄氏度之间，对于大多数应用，大约 60 摄氏度是最佳的。有利的是，可以在根据本任务而设计的计算机程序的辅助下进行初始的引物设计。但是引物设计一般需要实验室的检测和常规的优化。这可以通过例如对使用该引物组得到的扩增产物的大小、限制片段长度多态性 (RFLP) 和测序进行分析而进行。引物中简并位置的使用在扩增具有可变区域的序列或者在寻找属于特定蛋白质类型的新的家族成员时是有用的方法。简并位置的数目可能也需要进行优化。

[0152] 本发明包含改进的引物组，它们可以一起用于高度多重化的形式中。de Haard(de Haard, H. J. et al. 1999. J. Biol. Chem. 274, 18218-18230) 描述的引物组作为起始点使用，通过修整引物的 3′ 端降低非特异相互作用以及添加重叠 - 延伸尾巴或者适合于通过连接方法进行连接的尾巴，对引物组进行调整。

[0153] 本发明的一个特点是引物混合物由至少两个引物组组成，该引物组能够引起至少两个目标核苷酸序列的扩增，促进它们的连接。本发明的引物混合物能够引起至少两个来自杂聚蛋白质（例如属于酶、抑制剂、结构蛋白、毒素、通道蛋白、G- 蛋白、受体蛋白、免疫球蛋白超家族蛋白、转运蛋白等等）的亚单位或者结构域的扩增。

[0154] 本发明的另一个特点是包含引物组的重叠 - 延伸引物混合物，其中每个引物组的至少一个引物组成员包含一个能够与第二个引物组的一个引物组成员的重叠 - 延伸尾巴发生杂交的重叠 - 延伸尾巴。

[0155] 重叠 - 延伸尾巴通过使每一个产生自引物组的产物装备上与相邻产物互补的尾巴，使得在多重重叠 - 延伸 PCR 扩增中目标核苷酸的即刻连接成为可能。但是这并不意味着连接必须在这个第一轮 PCR 扩增中出现。根据反应的设置，可以在使用第一轮 PCR（多重 PCR 扩增）的外引物进行的额外扩增中进行大部分的实际连接。

[0156] 本发明的另一个特点是引物组，该引物组被设计为扩增含有可变区编码序列的核苷酸序列家族。这些家族的实例有 κ 轻链（如在人中的 VKI-VI），λ 轻链（如在人中的 VL1-10）以及来自免疫球蛋白的可变重链（例如人中的 VH1-7 和小鼠中的 VH1-15），以及 α，β，γ 或者 δ TcR 可变区。用于扩增含有可变区编码序列的核苷酸序列家族的引物组通常包含多个引物，其中一些引物可以是简并引物。例如使用引物组〔包含与 κ 链 ($V_{L\kappa}$ 引物）或者 κ 前导序列 ($V_{L\kappa L}$ 引物）和 / 或 λ 链 ($V_{L\lambda}$ 引物）或者 λ 前导序列 ($V_{L\lambda L}$ 引物）（正向引物）以及恒定区 κ ($C\kappa$ 引物）和 / 或 λ 引物 (C_{λ} 引物）（反向引物）或者大量这种引物的 5′ 端互补的大量引物〕对免疫球蛋白轻链可变区编码序列家族进行扩增。或者可以使用轻链连接区引物 ($J_{L\kappa}$ 和 / 或 $J_{L\lambda}$ 引物）作为反向引物而不使用恒定区引物。或者正向引物与在可变轻链前导序列之前的 UTR 区域退火。同样，可以使用一个引物组（使用各种不同的引物组合）扩增免疫球蛋白重链可变区编码序列家族。例如与重链可变区 5′ 端互补的引物 (V_H 引物）或者与该区前导序列互补的引物 (V_{HL} 引物）（正向引物）以及大量重链连接区引物 (J_H 引物）或者重链恒定区引物（反向引物）。C_H 引物可以是同型特异的并且原则上可以使用任何的 C_H 引物（例如 C_{H1}，C_{H2}，C_{H3}，或 C_{H4}），以及可以产生全长重链的 C_H 引物。或者正向引物与在可变重链前导序列之前的 UTR 区域退火。

[0157] 如果对于可变区引物观察到交叉杂交，则使用与前导序列而不是与可变区 5′ 端退火的正向引物是特别有用的。因为蛋白质在细胞内加工的过程中前导序列可以被切掉，所以可以从最终的蛋白质中除去由于交叉杂交造成的突变。实施例 9 描述了抗体可变重链和 κ 轻链前导序列引物的设计。起动的位点在前导编码序列 3′ 端（C 末端）内使引物比以前的抗体前导序列引物有优势，原因是这导致扩增后的序列在细菌和真核表达载体之间的穿梭，使前导序列在两个系统中都起作用。实施例 9 中描述的设计系统可以很容易地用于抗体 λ 轻链，TcRα、β、γ 或者 δ 链。

[0158] 本发明的一个特点是与可变区编码序列之前的前导编码序列的 3′ 端退火的引物及其在可变区编码序列扩增中的应用。

[0159] 本发明的优选特点是使用与 SEQ ID NO 86 到 92 的基因特异区具有至少 90％序列一致性（优选至少 95％的一致性）的引物，它们对应于在重链前导编码序列的 C 端退火的引物（V_{HL} 引物）。这些 SEQ ID NO 中基因特异的序列对应于所述序列的第 18 号碱基到 3′ 末端（还请参见表 11）。

[0160] 本发明另一个优选的特点是使用与 SEQ ID NO 93 到 98 的基因特异区具有至少 90％序列一致性（优选至少 95％的一致性）的引物，他们对应于在 κ 轻链前导编码序列的 C 端退火的引物（$V_{L\kappa L}$ 引物）。这些 SEQ ID NO 中基因特异的序列对应于所述序列的第 25 号碱基到 3′ 末端（还请参见表 11）。

[0161] 在本发明的一个实施方案中，用于多重重叠－延伸 PCR 以及也可能用于逆转录步骤的多重重叠－延伸引物混合物包含：a) 至少一个与免疫球蛋白轻链区编码序列有义链互补的 C_L 或者 J_L 引物；b) 至少一个与免疫球蛋白轻链可变区编码序列反义链互补的，并且能够与 a) 中的引物形成引物组的 V_L 5′ 引物或者 V_L 前导序列引物；c) 至少一个与免疫球蛋白恒定重链结构域编码序列的有义链互补或者与重链连接区有义链互补的 C_H 或者 J_H 引物，以及 d) 至少一个与免疫球蛋白重链可变区编码序列反义链互补的，并且能够与 c) 中的引物形成引物组的 V_H 5′ 引物或者 V_H 前导序列引物。

[0162] 本发明的引物组可以是例如 $V_{L\kappa}+C\kappa$，$V_{L\lambda}+C_\lambda$，$V_{L\kappa}+J_{L\kappa}$，$V_{L\lambda}+J_{L\lambda}$，$V_{L\kappa L}+C\kappa$，$V_{L\lambda L}+C_\lambda$，$V_{L\kappa L}+J_{L\kappa}$，$V_{L\lambda L}+J_{L\lambda}$，$V_H+J_H$，$V_H+C_H$，$V_{HL}+J_H$ 或者 $V_{HL}+C_H$ 或者这些引物组的组合，它们能够扩增编码可变区的靶标序列。

[0163] 在本发明的另一个实施方案中，$C_L(J_L)$ 引物和 $V_L(V_{LL})$ 引物适合于扩增包含 κ 轻链可变区或者 λ 轻链可变区的序列。

[0164] 在本发明的一个优选实施方案中，$C_L(J_L)$ 引物和 $V_L(V_{LL})$ 引物适合于扩增 κ 轻链可变区和 λ 轻链可变区的编码序列。

[0165] 在本发明的一个更加优选的实施方案中，用于轻链扩增的正向引物 V_{LL} 引物与 SEQ ID 93 到 98 的基因特异区域具有至少 90％的序列一致性（优选至少 95％的一致性），用于重链扩增的正向引物 V_{HL} 引物与 SEQ ID 86 到 92 的基因特异区域具有至少 90％的序列一致性（优选至少 95％的一致性）。

[0166] 在本发明的另一个实施方案中，携带免疫球蛋白 V_L/V_{LL} 和 V_H/V_{HL} 引物连接尾巴，优选是互补重叠－延伸尾巴的形式。这产生了以头－头方式连接的可变区编码序列。对于以头－尾方式连接的可变区编码序列，C_L/J_L 和 V_H/V_{HL} 引物含有连接尾巴或者 V_L/V_{LL} 和 C_H/J_H 引物含有连接尾巴，优选是互补重叠－延伸尾巴的形式。对于以尾－尾方式连接的可变区编

码序列，C_L/J_L 和 C_H/J_H 引物含有连接尾巴，优选是互补重叠 - 延伸尾巴的形式（图 3）。

[0167] 优选地，本发明的多重引物混合物，包括多重重叠 - 延伸引物混合物包含两个引物组。这样，一个多重引物混合物包含至少四个不同的引物。在本发明的另一个方面中，多重引物混合物包含四个以上的不同引物。本发明的多重引物混合物用于在单一容器中靶标序列的扩增。例如在同一个容器中 κ、λ 和重链可变区都被扩增。本发明的一个多重引物混合物包含 16 个不同的简并引物，分布如下：八个 V_H 引物、一个 C_{H1} 引物，六个 $V_{L\kappa}$ 引物和一个 Cκ 引物（图 2）。另一个引物组包含 19 个简并引物，分布如下：八个 V_H 引物、四个 J_H 引物，六个 $V_{L\kappa}$ 引物和一个 Cκ 引物。第三个引物组包含 22 个简并引物，分布如下：八个 V_H 引物、一个 C_{H1} 引物，11 个 $V_{L\lambda}$ 引物和两个 C_λ 引物。第四个引物组包含 27 个简并引物，分布如下：八个 V_H 引物、一个 C_{H1} 引物，六个 $V_{L\kappa}$ 引物，一个 Cκ 引物，11 个 $V_{L\lambda}$ 引物和两个 C_λ 引物。

[0168] 本发明还包含引物，该引物用于对由多重 RT-PCR 以及此后通过连接方法或者重组方法连接或者多重重叠 - 延伸 RT-PCR 得到的连接产物进行额外 PCR。这个额外 PCR 扩增可以使用适用于扩增连接的靶标序列的引物混合物。这样的引物混合物可能包含多重引物混合物或者多重重叠 - 延伸引物混合物的外引物，即与连接的核苷酸序列有义链的最外侧 5′ 端和 3′ 端退火的引物，这样使整个连接的产物被扩增。可以用作本发明中外引物的引物的实例是 C_κ/J_κ 和 / 或 C_λ/J_λ 引物，其与 J_H 或者 C_H 引物形成引物组。这个过程一般用于增加从多重 RT-PCR 以及此后通过连接方法或者重组方法得到或者多重重叠 - 延伸 RT-PCR 得到的连接产物的量。

[0169] 或者，与初次多重 RT-PCR 或者多重重叠 - 延伸 RT-PCR 反应中使用的外引物相比为嵌套的引物组可以用于对连接后的核苷酸序列进行额外的扩增。在本发明中，这种引物组被称为嵌套引物组。嵌套引物的设计一般遵守的规则与前面描述的基因特异引物的引物设计规则相同，所不同的是它们从多重 RT-PCR 或者多重重叠 - 延伸 RT-PCR 中使用的外引物的退火位置的 3′ 端引发。所以由嵌套 PCR 产生的产物比从多重 RT-PCR 以及此后通过连接方法或者重组方法或者多重重叠 - 延伸 RT-PCR 得到的连接产物要短。除了增加连接产物的量，嵌套 PCR 还增加了整体特异性，特别是提高多重重叠 - 延伸 RT-PCR 技术的特异性。但是应当注意在进行额外扩增时不是所有的前面描述的多重引物混合物 / 多重重叠 - 延伸引物混合物都适于与嵌套引物组合在一起。在这种情况下多重引物混合物 / 多重重叠 - 延伸引物混合物中的外引物可以用于额外扩增或者可以进行半嵌套 PCR，后面将对此进行描述。

[0170] 在本发明的一个实施方案中，J_L 和 J_H 引物的混合物用作嵌套引物，用于连接后的免疫球蛋白可变区编码序列的额外扩增。

[0171] 本发明的嵌套引物还可以包含来自第一个多重引物混合物 / 多重重叠 - 延伸引物混合物的反向（或者正向）外引物以及另一个在第一个多重引物混合物 / 多重重叠 - 延伸引物混合物的正向（或者反向）退火位置外引物 3′ 侧引发的嵌套引物。使用这种引物组进行额外的 PCR 扩增，这一般被称为半嵌套 PCR。如果在一个特异区域（例如对于可变区序列）中设计嵌套引物（V 和 J 引物）很困难（因为这样的引物会在互补决定区（CDRs）中退火），则可以例如使用半嵌套 PCR。而且，在需要保持连接序列的一端不发生变化（例如用于克隆目的）时，可以使用半嵌套 PCR。

[0172] 本发明的一个特点是在额外扩增反应中使恒定区轻链编码序列保持完好。与初次反应（多重 RT-PCR 或者多重重叠 - 延伸 RT-PCR 反应）中使用的外引物相比，额外扩增中使用的 C_L（反向）引物只有轻微修饰。修饰包含在用于初次扩增的 C_L 引物的 3′ 端添加几个碱基。另外，可以在嵌套的 C_L 引物上加上不同的克隆尾巴。与在初次反应中使用的恒定区重链特异的外引物相比，在额外扩增中使用的正向引物是完全嵌套的。在额外扩增中，初次反应中的外引物和轻微修饰的嵌套 C_L 引物组合以及完全嵌套的正向引物，使特异性增加，这与使用完全嵌套的引物组进行的嵌套 PCR 可以得到的特异性相当。

[0173] 在本发明的优选实施方案中，使用 J_H 引物和修饰的 C_L 引物进行嵌套 PCR，其中与多重引物混合物 / 多重重叠 - 延伸引物混合物中的第一个 C_L 引物相比，在 3′ 端加上了两个到十个基因特异的碱基对。

[0174] 多重重叠 - 延伸 PCR 的优化

[0175] 可以使用几个参数对两步和单步的多重重叠 - 延伸 PCR 步骤的参数进行优化（参见例如 Henegariu, O. et al. 1997. BioTechniques 23, 504-511 ; Markoulatos, P. et al. 2002. J. Clin. Lab. Anal. 16, 47-51）。一般地，相同的优化参数可以应用于多重 RT-PCR，尽管对于这种反应而言外引物和内引物之间的比例不很重要。

[0176] a. 引物浓度

[0177] 携带重叠 - 延伸尾巴的引物（例如 V_H 和 V_L 引物）的浓度优选地低于没有重叠 - 延伸尾巴的外引物（例如 J_H 和 κ 引物）的浓度。

[0178] 如果靶标序列中一个序列的扩增效率低于其他序列，例如由于更高 GC％导致的低效率，则有可能均衡扩增效率。对于低效率扩增的引物组，可以使用更高的浓度，或者降低另一个引物组的浓度，从而可以实现上述扩增效率的均衡。例如，编码重链可变区的序列一般具有更高的 GC％，所以比轻链可变区的扩增效率低。这促进使用比 V_H 引物浓度更低的 V_L 引物。

[0179] 另外在使用大量引物时，引物的总浓度可能是一个问题。通过滴定实验确定上限。对于来自 Applied Biosystems 的″ AmpliTaq Gold″ PCR 系统，上限是 1.1uM 总寡核苷酸浓度。而对于其他的系统，总寡核苷酸浓度可以高达 2.4uM。这样的寡核苷酸总浓度上限影响了单个引物的最高浓度。如果单个引物浓度过低，有可能导致弱的 PCR 敏感性。

[0180] 还发现寡核苷酸引物的质量对于多重重叠 - 延伸 PCR 很重要。HPLC 纯化的寡核苷酸引物产生最好的结果。

[0181] b. PCR 循环条件 :

[0182] 优选地，循环条件如下 :

[0183] 变性 :10-30 秒 94 摄氏度

[0184] 退火 :30-60 秒 50-70 摄氏度，比引物的 Tm 大约低 5 摄氏度

[0185] 延伸 :1 分钟 x EPL 65-72 摄氏度，EPL 是 kb 表示的预期产物长度 .

[0186] 循环数 :30-80

[0187] 最终延伸 :10 分钟 65-72 摄氏度

[0188] 对于单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR，在以上概述的扩增循环之前，在循环程序中加入以下的步骤 :

[0189] 逆转录 :42-60 摄氏度 30 分钟。在逆转录单独进行时也使用这些条件。

[0190] 聚合酶激活 :95 摄氏度 10-15 分钟。在单步 RT-PCR 中最好使用热起始聚合酶。

[0191] 根据生产商进行激活。

[0192] 可以对所有这些参数进行优化。特别是退火温度很重要。因此,开始时要分别检测组成最终引物混合物的每一个引物组,目的是找到最佳的退火温度和时间以及延伸和变性时间。这会为这些参数可以对多重重叠 - 延伸引物混合物进行优化的范围提供一个很好的概念。

[0193] PCR 灵敏度差的问题,例如由于低的引物浓度或者低的模板浓度所造成的低 PCR 灵敏度可以通过使用大量热循环数目解决。大量热循环数目由 35 到 80 个循环组成,优选大约 40 个循环。

[0194] 另外,更长的延伸时间可以改善多重重叠 - 延伸 PCR 过程。与一般的 1 分钟延伸时间相比,长的延伸时间由 1.5 到 4 分钟 ×EPL 组成。

[0195] c. 辅助物的使用

[0196] 多重PCR反应可以通过使用PCR添加剂例如DMSO、甘油、甲酰胺或者甜菜碱而显著改善,添加剂使 DNA 松弛,使模板变性更容易。

[0197] d. dNTP 和氯化镁

[0198] 脱氧核苷三磷酸 (dNTP) 的质量和浓度对于多重重叠 - 延伸 PCR 来说是重要的。最佳的 dNTP 浓度是每一种 dNTP(dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP)200 到 400uM 之间,在此浓度以上扩增被迅速抑制。更低的 dNTP 浓度 (每种 dNTP 100uM) 足以使 PCR 扩增进行。dNTP 储液对融解 / 冻结循环敏感。三到五次这种循环后多重 PCR 经常进行得不好。为了避免这种问题,可以将 dNTP 分装成小份在 -20 摄氏度保存。

[0199] 对 Mg^{2+} 的浓度进行优化是至关重要的,因为大多数 DNA 聚合酶是依赖于镁的酶。除了 DNA 聚合酶之外,模板 DNA、引物和 dNTP 也与 Mg^{2+} 结合。因此,最佳的 Mg^{2+} 浓度取决于 dNTP 的浓度,模板 DNA 和样品缓冲液的组成。如果引物和 / 或模板 DNA 缓冲液含有螯合剂例如 EDTA 或者 EGTA,表观的 Mg^{2+} 最佳浓度会被改变。过量的 Mg^{2+} 浓度使 DNA 双链稳定,防止 DNA 完全变性,这会降低产量。过量的 Mg^{2+} 也可以稳定引物与不正确模板位点之间形成的虚假退火,这样降低了特异性。另一方面,不足量的 Mg^{2+} 浓度降低了产物的量。

[0200] dNTP 和氯化镁之间的良好平衡是 200-400uM dNTP(每一种) 与 1.5-3mM 的氯化镁。

[0201] e PCR 缓冲液的浓度

[0202] 一般地基于氯化钾的缓冲液对于多重重叠 - 延伸 PCR 足够 ;但是基于其他组分例如硫酸铵、硫酸镁、Tris-HCl 或者这些物质组合的缓冲液也可以进行优化用于多重重叠 - 延伸 PCR。参与较长产物扩增的引物对在低盐浓度 (例如 20 到 50mM 氯化钾) 下作用更好,而参与较短产物扩增的引物对在高盐浓度 (例如 80 到 100mM 氯化钾) 下作用更好。将缓冲液浓度提高到 2× 而不是 1×,可以提高多重反应的效率。

[0203] f DNA 聚合酶

[0204] 本发明使用 Taq 聚合酶作为示例。除此以外也可以使用其他类型的耐热 DNA 聚合酶,包括例如 Pfu, Phusion, Pwo, Tgo, Tth, Vent, Deep-vent。具有或者没有 3′ 到 5′ 外切核酸酶活性的聚合酶可以单独使用或者相互联合使用。

[0205] 载体和文库

[0206] 根据本发明的目标核苷酸序列的连接产生包含连接后的目标核苷酸序列的核苷酸片段。另外，这种连接后的目标核酸序列文库通过本发明的方法制备，特别是可变区编码序列的文库。

[0207] 本发明的一个特点是通过本发明方法制备的、含有连接后的目标核苷酸序列的片段或者连接后的目标核苷酸序列文库向适宜载体中的插入。文库可以是组合文库或者可变区编码序列关联对文库。由外引物、嵌套引物或者半嵌套引物产生的限制位点优选地设计为与所选择的载体的适当限制位点相匹配。如果半嵌套、嵌套引物或者外异物中的一个配备有适宜的重组位点且所选择的载体也含有一个重组位点，则连接后的目标核酸序列也可以通过重组插入到载体中。

[0208] 原则上对于可以用作通过本发明的一种多重 RT-PCR- 连接方法产生的产物的载体没有限制。所选择的载体可以是适宜在细胞中扩增和表达的适宜载体，包括例如细菌、酵母、其他真菌、昆虫细胞、植物细胞或者哺乳动物细胞。这些载体可以用于促进进一步的克隆步骤、载体系统之间的穿梭、插入到载体中的产物的展示、插入产物的表达和 / 或向宿主基因组中的整合。

[0209] 克隆和穿梭载体优选是细菌载体。但是，在克隆和穿梭步骤中也可以应用其他类型的载体。

[0210] 展示载体可以是例如来自 fd、M13 或者 f1 丝状噬菌体的噬菌体载体或者噬菌粒载体。这些载体能够促进蛋白质在丝状噬菌体表面的展示，所述蛋白质包括例如结合蛋白质或者其片段。适宜在核糖体、DNA、酵母细胞或者哺乳动物细胞展示的展示载体也是本领域内已知的。这些包含例如病毒载体或者编码嵌合蛋白的载体。

[0211] 对于所有提到的物种都有表达载体，要选择的载体完全决定于要表达的蛋白质。一些表达载体还能够通过随机整合或者利用适当的重组位点进行位点特异整合，整合到宿主的基因组中。当引入到适当的宿主细胞中时，可以设计表达载体使其提供额外的编码序列，当连接产物按照阅读框插入到这些序列中时，这些编码序列能够使更大的蛋白，例如全长的单克隆抗体表达。按照阅读框的这种插入还可以促进嵌合蛋白的表达，所述嵌合蛋白促进在丝状噬菌体或者细胞表面的展示。在噬菌体展示系统中，连接的目标核苷酸序列可以按照阅读框插入到编码外壳蛋白，例如 pIII 或者 pVIII(Barbas,C.F.et al.1991.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88,7978-7982 ;Kang,A.S.et al.1991.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88,4363-4366) 的序列中。

[0212] 在本发明的一个实施方案中，单个的目标核苷酸序列连接片段包含与轻链可变区编码序列相连的免疫球蛋白重链可变区编码序列。优选地，这些连接后的序列插入到含有编码一个或者更多免疫球蛋白恒定结构域的序列的载体中。对插入进行工程化，使连接后的重链可变区和 / 或轻链可变区编码序列按照阅读框插入到恒定区编码序列中。这样的插入可以例如产生 Fab 表达载体，全长的抗体表达载体或者编码全长抗体的片段的表达载体。优选地这样的载体是适宜用于筛选的表达载体 (例如大肠杆菌、噬菌粒或者哺乳动物载体)，并且恒定区重链编码序列选自人免疫球蛋白类型 IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgM，IgA1，IgA2，IgD，或者 IgE，这样使 Fab 或者全长的重组抗体表达。除了恒定重链编码序列以外，载体可能还含有选自人 λ 或者 κ 链的恒定轻链编码序列。当连接的核苷酸序列只编码免疫球蛋白可变区编码序列 (Fv) 时，这是合适的。

[0213] 在本发明的另一个实施方案中，单个的连接核苷酸序列片段包含与 β 链可变区编码序列相连的 TcR α 链可变区编码序列或者包含与 δ 链可变区编码序列相连的 γ 链可变区编码序列。优选地，这些连接的序列插入到含有一个或者更多 TcR 恒定结构域编码序列的载体中。对插入进行工程化，使插入的连接后的可变区编码序列与相应的 TcR 恒定区编码序列按阅读框融合。在另一个实施方案中，这样的载体是包含编码亮氨酸拉链（与 TcR 恒定区按阅读框融合）序列的嵌合表达载体。已经证明这种构建体提高了可溶性 TcR 的稳定性 (Willcox, B.E. et al. 1999. Protein Sci 8, 2418-2423)。

[0214] 可以通过两种不同的方法将本发明的关联对文库引入到载体中。在第一种方法中，将单一的关联对逐个插入到适宜的载体中。这样的载体文库可以分别保存或者汇集在一起。在第二种方法中，在载体插入之前，汇集所有的关联对，之后批量地插入到适宜的载体中，产生载体的汇集文库（在图 12 中予以阐明）。这种载体文库包含多种多样的可变区编码序列对。

[0215] 本发明的一方面是连接后的可变区编码序列的关联对文库。优选地，文库中的单个关联对包含与重链可变区编码序列相连的免疫球蛋白轻链可变区编码序列。

[0216] 另一个优选的关联对文库包含连接的 TcR 区编码序列，其中每一个 TcR 区编码序列包含与 β 链可变区编码序列相连的 α 链可变区编码序列和 / 或与 δ 链可变区编码序列相连的 TcR γ 链可变区编码序列。

[0217] 本发明的一个实施方案是连接后的可变区编码序列（编码针对某一靶标的所需结合特异性）关联对的亚文库。优选地这些关联对包含连接后的免疫球蛋白轻链可变区和重链可变区编码序列、TcR 的 α 链可变区和 β 链可变区编码序列和 / 或 TcR γ 链可变区和 δ 链可变区编码序列。

[0218] 另一个实施方案是亚文库，选自如整个发明中描述的可变区编码序列关联对的亲本文库。

[0219] 本发明的优选实施方案是编码全长免疫球蛋白（选自人免疫球蛋白类型 IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、或者 IgM）关联对的文库或者亚文库。

[0220] 本发明的另一个优选特点是文库或者亚文库，编码可溶和稳定的 TcR 关联对。

[0221] 本发明的特点是所述文库的多样性，所述文库包含至少 5, 10, 20, 50, 100, 1000, 10^4, 10^5 或者 10^6 个不同的关联对。

[0222] 在本发明的另一个实施方案中，所述的连接后的可变区编码序列的关联对文库可以通过包含这里描述的步骤的方法得到。该文库还被称为亲本文库。

[0223] 筛选和选择

[0224] 使用本发明的一种方法从供体中分离连接后的可变区编码序列对的亲本文库，其预计代表了结合蛋白的多样性，其中的一些蛋白是无关的，即不与所需的靶标结合，特别是对于组合文库而言。因此，本发明包含了对针对某一个靶标的结合多样性亚组的编码亚文库进行富集和筛选。

[0225] 对于关联对文库，文库的多样性预计代表了供体物质中存在的多样性，只有少数的随机连接可变区。因此在筛选由关联对组成的文库中靶标特异的结合亲和性之前，不一定需要富集步骤。

[0226] 在本发明的另一个实施方案中，产生连接后的可变区编码序列对的文库的方法还

包含了通过选择连接后可变区序列对亚组（所述亚组编码具有所需靶标特异性的结合蛋白）建立亚文库。这种对连接的可变区编码序列的选择也被称为靶标特异关联对文库。

[0227] 在本发明的优选实施方案中，可变区编码序列的靶标特异关联对文库被转移到哺乳动物表达载体上。

[0228] 免疫学检测法一般适宜对靶标特异的免疫球蛋白可变区编码序列进行选择。这些检测法是本领域内众所周知的，包括例如 ELISPOTS，ELISA、膜检测法（例如 Western 印迹）、膜上的阵列或者 FACS。检测法可以使用产生自免疫球蛋白可变区编码序列的多肽直接进行。或者免疫检测法可以与富集方法联合进行或在其后进行，例如噬菌体展示、核糖体展示、细菌表面展示、酵母展示、真核病毒展示、RNA 展示或者共价展示（在 FitzGerald，K.，2000. Drug Discov. Today 5，253-258 中有综述）。如图 10 中所阐明的，可以对关联 Fab 表达文库和关联全长抗体表达文库进行筛选，这样产生阳性克隆的亚文库。这种筛选检测和富集步骤也适于 Fv 或者 scFv 片段或者连接的可变区的组合文库。

[0229] 在本发明的优选实施方案中，使用高通量的筛选检测法进行可变区编码序列的靶标特异关联对或者组合对的亚文库的选择。高通量的筛选检测法可以是，但是不止限于，使用半自动化或者全自动化仪器进行的 ELISA 检测。它还可以是膜检测，其中细菌被机械地挑取并用格栅法印到琼脂平板上面的适当的膜上，产生表达抗原结合分子的菌落阵列。分子通过膜分泌到下方的另一个抗原包被的膜上，抗原包被的膜可以独立制备，用于鉴定分泌针对所需靶标的抗原结合分子的克隆 (de Wildt，R. M.，et al. 2000. Nat. Biotechnol. 18，989-994)。

[0230] 在通过适当的技术选择了抗原结合克隆的关联对或者组合对亚文库后，就可能通过对连接的免疫球蛋白轻链可变区和重链可变区编码序列进行 DNA 测序，进行进一步的分析。首先这种 DNA 测序可以提供关于文库多样性的信息，例如胚系来源、家族分布以及 CDR 区内部的成熟。这种分析可以对代表广泛多样性的克隆进行选择，去掉重复的克隆。第二，DNA 测序可以发现在分离过程中引入的突变。

[0231] 在分析可变区编码序列时，在评价一个突变是否可以接受时需要考虑三种类型的突变 ：i) 最常见类型的突变来自家族内的交叉引发 (cross-priming)，其中 V 基因的引物在一个特定的 V 基因家族中引发了错误的亚组。这种被引入的改变主要是在一个特定位置天然存在的密码子被替代。由于在 V 基因家族内部的高度序列同源性，这些改变通常可以被当做保守和可以接受的改变 ；ii) 较不常见的突变是通过家族间的交叉引发诱导的（例如 VH3 家族的引物引发 VH1 家族的编码序列）并且诱导更为显著的结构改变，有时没有天然的对应物。这种改变有可能通过产生新的表位影响可变区的免疫原性。使用标准的分子生物学技术可以容易地鉴定出这种改变并且对其进行修复，或者可以将该克隆从文库中清除 ；iii) 由 Taq DNA 聚合酶产生的错误在恒定区编码序列中很容易发现并且可以容易地去除。但是，由 Taq 引入的突变当然也会在可变区编码序列中存在，在那里它们与天然存在的体细胞突变无法区分，因为体细胞突变也是由于可变区编码序列中的随机突变造成的。考虑到这些突变是非系统突变并且仅仅以独特的方式影响特定的对，所以对这些突变不予理睬是合理的。

[0232] 可以使用进一步的序列分析确定关联对文库的混杂程度性，如表 20 中对 VH 群 H4 所示例的。

[0233] 如实施例 9 中所描述的，使用可以在可变区编码序列前导序列中退火的引物，而不是在可变区 5′ 区退火的引物，可以在表达文库中避免 i) 和 ii) 中所描述的突变。

[0234] 在本发明的另一个实施方案中，靶标特异的亚文库和可能进行了序列分析的连接免疫球蛋白轻链可变区和重链可变区编码序列对被转移到哺乳动物表达载体中。这种转移可以向前面部分中描述的任何载体中进行，使全长的重组抗体被表达。如果使用哺乳动物关联全长抗体表达文库进行筛选，可能就不需要这样的转移。

[0235] 在本发明的另一个实施方案中，从富集了 T 淋巴细胞的含有淋巴细胞的细胞级分产生亲本文库。可以对组成亲本文库的连接后的可变区编码序列对进行选择，从中选出编码连接后可变区序列（由编码具有所需靶标特异性的结合蛋白的 α 及 β 和 / 或 γ 及 δ 链组成）对亚组的序列，产生关联对或者组合对的亚文库。接下来可以使用标准的方法学例如使用四聚体 MHC- 肽复合体染色的方法（例如 Callan,M.F.et al.1998.J.Exp.Med.187,1395-1402 ;Novak,E.J.et al.1999.J.Clin.Invest 104,R63-R67)，通过测量以 IL-2 释放形式的细胞应答或者通过更为精密复杂的方法如酵母或者逆转录病毒展示技术，从转染细胞的混合物中鉴定出抗原特异的 T 细胞受体。

[0236] 宿主细胞和表达

[0237] 本发明的文库可以转移到适于表达和生产蛋白质的载体中，所述蛋白质由连接的目标核酸序列编码，特别是由含有结合蛋白或者其片段的可变区编码。这些载体在“载体和文库”部分中有所描述，提供了例如属于所选种的全长抗体、Fab 片段、Fv 片段、scFv、膜结合或者可溶性 tcR 或者 TcR 片段的表达。

[0238] 本发明的一个特点是连接后可变区编码序列关联对的载体文库或者亚文库或者编码连接后可变区编码序列关联对的单个克隆引入到宿主细胞中，用于扩增和 / 或表达。宿主细胞可以选自细菌、酵母、其他真菌、昆虫细胞、植物细胞或者哺乳动物细胞。对于表达的目的，优选的哺乳动物细胞有中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、COS 细胞、BHK 细胞、骨髓瘤细胞（例如 Sp2/0 细胞，NS0)、NIH 3T3、成纤维细胞或者无限增殖人细胞例如 HeLa 细胞、HEK293 细胞或者 PER.C6。

[0239] 载体向宿主细胞的引入可以通过多种本领域技术人员已知的转化或者转染方法完成，包括磷酸钙沉淀、电穿孔、显微注射、脂质体融合、红细胞外壳融合 (RBC ghost fusion)、原生质体融合、病毒感染等等。单克隆全长抗体、Fab 片段、Fv 片段和 scFv 片段的制备是众所周知的。

[0240] 用于治疗的重组多克隆抗体的制备是相当新的领域。在 PCT 申请 WO 2004/061104 中已经描述了重组多克隆生产技术。简而言之，该技术涉及的是适于作为生产细胞系的细胞库的制备。对于该技术接下来的描述是针对关联对文库的，但是也同样适于组合文库。在细胞库中的单个细胞能够例如从关联对文库中表达重组多克隆结合蛋白的不同成员。为了保证单个细胞表达多克隆结合蛋白的单一关联对而不是几个关联对，编码关联对的核酸序列引入到每个单个细胞基因组中的单个位点特异性位点。这是细胞库的一个重要特点，因为这防止了从每一个细胞中表达的重链和轻链的混杂，但是还因为它产生的细胞互相之间除了单个关联对的可变区中有小的差异以外基本上都是相同的。这个特点可以使细胞库在生产所需的时间段中进行无偏倚的生长。为了保证单一位点特异的整合，应该使用只有一个整合位点的宿主细胞系，这些通常是商业化的，例如含有单一 FRT 位点的 Invitrogen 的

CHO Flp-In 细胞。该细胞系的适当载体含有一个对应的 FRT 位点并且通过 Flp 重组酶引入到基因组中。还有一些其他已知的可以与它们的对应重组位点联合使用的重组酶，例如 Cre、β 重组酶、Gin、Pin、PinB、PinD、R/RS、λ 整合酶或者噬菌体 ΦC31 整合酶。另外，适当的载体含有选择标记，可以对位点特异的整合子进行选择。

[0241] 可以通过几个不同的转染和生产策略实现多克隆生产细胞系的制备以及来自这样的细胞系的重组多克隆蛋白质的制备。

[0242] 一种方式是使用混和成为单一组合物的载体文库，用于转染每个细胞具有单一整合位点的宿主细胞系。该方法被称为批量转染 (bulk transfection) 或者成批转染。一般地，前面描述的载体和宿主细胞设计可以保证在正确选择时可以得到能够进行无偏倚生长的多克隆细胞系。在开始重组多克隆蛋白生产之前可以制备冷冻的多克隆细胞系的储备物。

[0243] 另一种方式是将一个载体文库分成几个级分，使一个组合物中含有大致 5 到 50 个该文库的单个载体，用于转染。优选地，文库的一个级分由 10 到 20 个单个载体组成。然后将每个组合物转染到一等份的宿主细胞中。该方法被称为半批量转染 (semi-bulk transfection)。转染的份数取决于文库的大小和每一个级分中单个载体的数目。如果文库例如由 100 个不同的关联对组成，分成含有 20 个不同成员的级分，则需要用组合物文库（由原始文库的不同级分组成）转染 5 份宿主细胞。对每份宿主细胞筛选位点特异的整合。优选地，每份分别进行选择。但是也可以在选择之前汇集小份。可以对等份的克隆多样性进行分析，只有那些具有足够多样性的等份才会被用于制备多克隆关联对文库储备物。为了获得所需的多克隆细胞系用于生产，在制备冻存储备物之前可以在从储备物中取出小份后或者在短期的增殖和适应时间之后立即将小份混和。可以选择将细胞小份在整个制备过程中分开保存，将每一个小份的产物组合在一起得到多克隆蛋白质组合物，而不是在制备之前汇集细胞的小份。

[0244] 第三种方式是高通量的方法，使用组成关联对文库的单个载体分别转染宿主细胞。该方法被称为单独转染 (individual transfection)。优选地，对单独转染的宿主细胞分别选择位点特异的整合。选择后产生的单个细胞克隆可以分析其增殖时间，优选地具有相似生长速率的克隆被用于制备多克隆关联对文库储备物。在制备储备物之前可以在从储备物中取出小份后或者在短期的增殖和适应时间之后立即将单个细胞克隆混和，得到所需的多克隆细胞系。该方法可以除去在转染、整合和筛选中任何可能的残留序列偏倚。或者在进行选择之前混合单个转染的宿主细胞，这可以控制由于转染造成的序列偏倚。

[0245] 在以上概述的生产策略中共同的特点是所有组成重组多克隆蛋白的单个关联对可以在一个或者有限数目的生物反应器中制备，唯一的区别在于选择在什么阶段制备由多克隆生产细胞系组成的细胞库。

[0246] 本发明的一个实施方案是包含可变区编码序列连接对关联文库或者亚文库的宿主细胞群。

[0247] 在另一个实施方案中，宿主细胞群包含从分离的单细胞群（由淋巴细胞组成）得到的文库，使用本发明的多重 RT-PCR 扩增之后通过连接方法或者重组方法进行连接或者本发明的多重重叠 - 延伸 RT-PCR 技术，以连接关联对。

[0248] 本发明的另一个实施方案是包含可变区编码序列连结对的组合文库或者亚文库

的宿主细胞群。

[0249] 根据本发明的宿主细胞群包含对应于文库多样性的多样性细胞群（细胞已经被所述的文库转化/转染）。优选地，细胞群的每一个细胞只由整个关联对文库的一个关联对组成，没有一个关联对文库的单个成员超过表达自宿主细胞群的个体成员总数的 50％、更为优选 25％，或者最优选 10％。

[0250] 在本发明的一个优选实施方案中，宿主细胞群是哺乳动物细胞。

[0251] 如上描述的宿主细胞群可以用于表达重组多克隆结合蛋白，因为细胞群的单个细胞由具有各种多样性的可变区编码序列组成。

[0252] 本发明的一个实施方案是表达自包含载体文库的宿主细胞的重组多克隆蛋白，所述载体编码连接后的可变区编码序列多样性关联对，其中这样的文库可以通过本发明的方法获得。通常本发明的重组多克隆蛋白包含至少 2，5，10，20，50，100，1000，10^4，10^5 或者 10^6 个由不同关联对组成的蛋白质。

[0253] 本发明的优选实施方案是表达自宿主细胞群的重组多克隆免疫球蛋白，该宿主细胞群包含编码重链可变区和轻链可变区编码序列多样性关联对的载体文库。

[0254] 本发明的另一个优选的实施方案是表达自包含载体文库的宿主细胞群的重组多克隆 TcR，这些载体编码与 β 链可变区编码序列相连的 TcRα 链可变区和/或与 δ 链可变区编码序列相连的 TcRγ 链可变区序列的多样性关联对。

[0255] 本发明的另一个实施方案是适于进行单克隆蛋白质生产的宿主细胞。特别地，单克隆抗体包含轻链可变区与重链可变区形成的关联对或者是包含 α 可变区与 β 可变区或者 δ 可变区与 γ 可变区形成的关联对的单克隆 TcR。优选地，这样的单克隆生产细胞系不是杂交瘤细胞系。

[0256] 这种单克隆抗体或者 TcR 可以通过在连接多个非相邻目标核苷酸序列的方法中加入以下的步骤而产生：a) 向载体中插入所述的连接后的核苷酸序列；b) 将所述的载体引入宿主细胞中；c) 在适于表达的条件下培养所述的宿主细胞；以及 d) 获得表达自插入所述宿主细胞的载体的蛋白质产物。优选地，引入宿主细胞的载体编码可变区编码序列的单个关联对。

[0257] 本发明的应用

[0258] 本发明的一项主要应用是可变区编码序列关联对通过高通量方法的连接，特别是免疫球蛋白重链和轻链可变区编码序列或者 TcRα 和 β 链或者 γ 和 δ 链可变区编码序列的连接，用于制备关联对的文库。除了产生关联对文库之外，也可以使用本发明的多重 RT-PCR 以及随后通过连接方法或者重组方法或者多重重叠－延伸 RT-PCR 技术的连接，在遗传多样性细胞群、来自这种细胞群的细胞裂解物或者从这种细胞群中纯化的 RNA 上进行上述的技术，制备组合文库。文库、亚文库或者来自这些文库中一个文库的单一克隆有助于多克隆或者单克隆蛋白质的表达。特别地可以从本发明的文库中获得单克隆或者多克隆抗体。

[0259] 重组单克隆抗体在诊断、治疗和预防中的使用是众所周知的。通过本发明制备的重组单克隆和多克隆抗体与通过现有技术制备的抗体产物具有相同的应用。特别地，可以通过本发明的方法制备包含与至少一种药物上可以接受的赋形剂联合的多克隆重组免疫球蛋白作为活性成分的药物组合物。更为优选的是药物组合物，其中多克隆重组免疫球蛋

白包含可变区编码序列的关联对。这些多克隆重组免疫球蛋白药物组合物可以用作药物。组合物中的多克隆重组免疫球蛋白对于事先确定的疾病靶标可以是特异的，或者与该靶标具有反应性，这样组合物可以用于治疗、缓解或者阻止哺乳动物例如人、家养动物或者宠物中的疾病例如癌症、感染、炎性疾病、过敏、哮喘和其他呼吸疾病、自体免疫疾病、免疫机能失常、心血管疾病、中枢神经系统疾病、代谢和内分泌疾病、移植排斥或者不需要的妊娠。

[0260] 本发明的另一项应用不能使用常规的单克隆组合抗体技术获得。在保护性抗原表征得很少或者是完全未知的情况下，例如在刚刚出现的感染性疾病中，不可能筛选能够提供针对该疾病保护的单克隆抗体。

[0261] 但是，有可能使用本发明从已经具有确立的保护性抗体应答的供体例如恢复期患者中获得表达抗体的细胞，并且使用来自这些个体的起始材料制备免疫球蛋白重链和轻链可变区编码序列的关联对文库。

[0262] 在例如病毒是已知的但是保护性抗原未知的情况下，可以制备针对病毒上的抗原结构具有宽泛反应性的关联抗体基因对的亚文库。如果从这种亚文库中制备重组多克隆抗体，则抗体可能含有保护性抗体。

[0263] 在抗原完全未知的情况下，产生自关联对文库（来自例如恢复期患者）的重组多克隆抗体，可以与当今正在使用的超敏免疫球蛋白以相同的方式使用。这样做的原因是关联对保证产生的重组多克隆抗体与恢复期患者的抗体免疫应答非常相似。

[0264] 本发明中描述的用于连接可变区关联对的技术的另一项应用是用于诊断和分析的目的。当向患者给服药物时，针对该药物的免疫应答的可能性总是存在。这种免疫原性可以通过常规的技术进行分析，例如使用来自用药物处理的个体的血清或者血浆进行的药物特异的结合分析。或者，本发明的方法可以用于通过分离可变重链和轻链编码序列关联对，反映给服药物后不久患者的免疫应答。然后可以筛选表达自这种文库的抗体对于药物或者药物组分的反应性。如果在血浆或者血清中存在的药物干扰常规方法，则这种方法是非常有用的。这些药物可以是例如抗体。使用常规的方法，对于与使用抗体治疗有关的抗药物免疫应答（例如抗独特型、抗构架区或者抗 Fc 免疫应答）的确定在用于治疗的抗体从血液中被完全清除之前是不能进行的。使用本发明，可以在治疗几周之后从使用该药物进行治疗的个体中分离出编码这种抗药物的抗体的序列并且进行分析。因此，这是一个用于一般评价药物是否（特别是基于抗体的药物）都具有免疫原性的替代方法。

[0265] 本发明的另一项应用是疫苗和免疫程序的验证和比较。在疫苗的开发过程中这是非常有用的，因为除了现在进行的对抗体结合特异性和血清滴度的比较之外，有可能对响应新型候选疫苗而产生的抗体应答的序列多样性进行评价和比较。另外，本发明可以在疫苗在人群中的效力监测中用于分析、监测和比较抗体应答。

[0266] 本发明还在含有可变区的结合蛋白领域以外找到了应用。对于本领域内的一个技术人员而言调整本发明中公开的技术，用于连接两个或者更多编码非结合蛋白的杂聚蛋白的转录核苷酸序列，仅仅是一个优化的问题。这种编码来自杂聚蛋白的结构域或者亚基的序列的连接在分离这些蛋白编码序列时可能是一个优势，因为这会显著降低步骤的数目。而且，有可能通过仅仅使用一个多重引物混合物 / 多重重叠 - 延伸引物混合物分离例如这些蛋白的拼接变异体、突变或者新家族的成员。

[0267] 编码单一蛋白中不同结构域的序列的连接也是一种可能性。这种技术会使与多结

构域蛋白质中某些结构域重要性相关的研究变得简单，原因是这会使中间结构域的删除变得简单。

[0268] 嵌合蛋白或者偶联蛋白的制备也是本发明可以应用的一个领域。即使要连接的蛋白质具有不同的来源，例如人和小鼠蛋白质的嵌合体，也可以通过在逆转录之前混和细胞来应用本发明。这种细胞混合物可以由来自每一个物种的细胞群组成或者由来自每一个物种的单一细胞组成。

实施例

[0269] 实施例 1 ：两步多重重叠 - 延伸 RT-PCR

[0270] 在该实施例中，使用来自分离的单个细胞的模板进行逆转录 (RT)，产生的 cDNA 用作一次以上的多重重叠 - 延伸 PCR 的模板。

[0271] a. 细胞

[0272] 使用 Flp-In 技术 (Invitrogen，Carls bad，CA，USA) 制备表达 IgG1-κ 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

[0273] 以 Flp-In 表达载体 pcDNA5/FRT 为基础构建 IgG-κ 哺乳动物表达质粒载体 pLL113(图 4)。使用 Lipofectamin2000(Invitrogen，Carlsbad，CA，USA)，根据生产商的说明，使用含有抗体编码基因的 pLL113 和可提供 Flp 重组酶瞬时表达的 pOG44 对 CHO-Flp-In 细胞进行共转染。通过免疫检测，根据 IgG-κ 的产生对转化子进行筛选和证实。选择出的细胞系命名为 CHO Flp-In pLL113，并且在添加了 2mM L- 谷氨酰胺、10％ FCS 和 900 潮霉素 B 的 Ham′ s F-12 培养基 (维持培养基) 中维持。

[0274] 使用胰蛋白酶收获 CHO Flp-In pLL113 细胞，用维持培养基漂洗三次。在最后一次漂洗后，细胞重悬于原来体积的维持培养基中。使用 Casy-1 System(Schärfe System GmbH，Reutlingen，Germany) 测定细胞浓度，用维持培养基稀释至 1 个细胞 /5 微升的浓度。

[0275] b. 逆转录

[0276] 将平均含有一个细胞的 CHO Flp-In pLL113 细胞悬液，分配到 96 孔 PCR 平板 (Thermo-Fast 96，围边的 (skirted)AB-0800，ABgene，Epsom，Surrey，UK) 的单一孔中。

[0277] 通过使用 Qiagen One-Step RT-PCR 实验方案 (Qiagen OneStep RT-PCR Kit，Cat# ：210210，Hilden，Germany) 中的逆转录酶 (RT) 步骤从分配的细胞中合成 cDNA。

[0278] 每一个孔含有以下的试剂，总体积是 20 微升 ：

[0279] 1×One Step RT-PCR 缓冲液，

[0280] 每种 dNTP 终浓度是 1mM，

[0281] 5pmol Oligo poly-dT(18)，

[0282] 26U RNA 酶抑制剂 (RNasin，Promega，Madison USA，cat.No N2111)，

[0283] 2 微升 One Step RT-PCR 酶混合物，和

[0284] 5 微升 CHO Flp-In pLL113 细胞悬液。

[0285] 在 55 摄氏度孵育反应混合物 30 分钟以进行 RT 反应。接下来在 94 摄氏度孵育反应混合物 10 分钟以使逆转录酶失活。

[0286] c. 多重重叠 - 延伸 PCR

[0287] 使用步骤 b) 产生的 cDNA 产物的一个级分作为模板用于多重重叠 - 延伸 PCR。反

应在 96 孔平板中进行。

[0288] 每一个孔含有以下的试剂，总体积是 40 微升：

[0289] 1×One Step RT-PCR 缓冲液，

[0290] 每种 dNTP 终浓度是 500μM，

[0291] 多重重叠－延伸引物混合物浓度如表 1 中所示，

[0292] 26U RNA 酶抑制剂 (RNasin，Promega，Madison USA，cat.No N2111)，

[0293] 2 微升 One Step RT-PCR 酶混合物，和

[0294] 1 微升 cDNA 模板（来源于单一细胞（步骤 b））。

[0295] 所使用的多重重叠－延伸引物混合物包含表 1 中所示的引物。

[0296] 表 1

[0297]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列 (5' 到 3' 方向)
V_H	每种 20nM	1	agcctatactattgattaggcgcgccCAGRTGCAGCTGGTGCART
		2	agcctatactattgattaggcgcgccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
		3	agcctatactattgattaggcgcgccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
		4	agcctatactattgattaggcgcgccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
		5	agcctatactattgattaggcgcgccCAGGTGCAGCTACAGCAGT
		6	agcctatactattgattaggcgcgccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
		7	agcctatactattgattaggcgcgccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
		8	agcctatactattgattaggcgcgccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
C_H	100 nM	9	GACSGATGGGCCCTTGGTGG
V_L	每种 20nM	10	cgcctaatcaatagtataggctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
		11	cgcctaatcaatagtataggctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
		12	cgcctaatcaatagtataggctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
		13	cgcctaatcaatagtataggctagccGATATTGTGATGACCCACACT
		14	cgcctaatcaatagtataggctagccGAAACGACACTCACGCAGT
		15	cgcctaatcaatagtataggctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
$C_{L\kappa}$	100 nM	16	atatatatgcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTG

[0298] W = A/T，S = G/C，R = A/G。大写序列相应于基因特异区

[0299] 使用 96 孔的 MWG Primus HT 热循环仪 (MWG Biotech AG，Ebersberg，Germany) 进行反应，使用以下的循环条件：

[0300] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0301] 退火 30 秒 50 摄氏度

[0302] 延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0303] 共 50 个循环

[0304] 最终的延伸 10 分钟 72 摄氏度

[0305] d. 嵌套 PCR

[0306] 使用多重重叠－延伸产物作为模板进行嵌套 PCR。反应在 96 孔平板中进行。

[0307] 每个孔含有总体积为 50 微升的以下试剂：

[0308] 1 x BioTaq 缓冲液，

[0309] 终浓度各为 400 μ M 的每种 dNTP，

[0310] 2mM $MgCl_2$，

[0311] 嵌套 PCR 引物混合物，

[0312] 1.25 U BIOTAQ DNA 聚合酶 (Cat.No BIO-21040，Bioline，UK.)，以及

[0313] 1 微升多重重叠－延伸 PCR 产物（步骤 c).

[0314] 使用的引物在表 2 中示出。

[0315] 表 2

[0316]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
J_H	每种 100nM	17	atattctcGAGACGGTGACCAGGGTG
		18	atattctcGAGACGGTGACCATTGT
		19	atattctcGAGACGGTGACCAGGGTTC
		20	atattctcGAGACGGTGACCGTGGT
$C_{L\kappa}$	100 nM	21	accgcctccaccggcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT

[0317] 大写序列相应于基因特异区

[0318] 使用 96 孔的 MWG Primus HT 热循环仪 (MWG Biotech AG，Ebersberg，Germany) 进行反应，使用以下的循环条件：

[0319] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0320] 退火 30 秒 50 摄氏度

[0321] 延伸 90 秒 72 摄氏度

[0322] 共 25 个循环

[0323] 最终的延伸 10 分钟 72 摄氏度

[0324] 使用 1％琼脂糖凝胶电泳对嵌套 PCR 产物进行分析，使用溴化乙锭进行检测（图 5)。重叠－延伸产物的预期大小是 1076bp。在泳道 1，5，6，7，8 和 12 中可以观察到这样的产物，由箭头表示（图 5A)。在所示的实验中，阴性对照被污染，在样品中也出现了类似的污染。图 5B 绘制显示了图 5A 中与本实验有关的片段。

[0325] 本实验阐明了一种使用来自单个细胞的模板进行两步多重重叠－延伸 PCR 的方式。而且表明使用从分离的单个细胞产生的 cDNA 进行大约 20 次多重重叠－延伸 PCR 是可能的。

[0326] 实施例 2：单步多重重叠－延伸 RT-PCR

[0327] 在该实施例中，逆转录和多重重叠－延伸 PCR 在单一步骤中进行，使用来自裂解的细胞的模板，裂解的细胞的浓度对应于 100、10 或者 1 个细胞。

[0328] a. 细胞

[0329] 产生抗破伤风 IgG1-抗体的人杂交瘤细胞系 HB-8501 从美国模式培养物保藏所获得，在含有 10％胎牛血清的 Iscove′ s Modified Dulbecco′ s 培养基 (Vitacell，Kiev，

Ukraine,cat.No30-2005) 中培养。在进行多重重叠 - 延伸 RT-PCR 之前,收获细胞,计数并且在 -80 摄氏度下在培养基中冷冻保存,浓度为 200 细胞 / 微升 .

[0330] b. 单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR

[0331] 使用Qiagen One-Step RT-PCR试剂盒(Qiagen cat.No210212,Hilden,Germany),基本根据生产商的建议进行多重重叠 - 延伸 RT-PCR。融化细胞裂解物并且用水稀释后加入到 PCR 管中,产生的裂解物浓度对应于每 5 微升 100、10 和 1 个细胞。

[0332] 每个 PCR 管含有总体积为 50 微升的以下试剂 :

[0333] 1 x One-Step RT-PCR 缓冲液,

[0334] 终浓度各为 400 μ M 的每种 dNTP,

[0335] 多重重叠 - 延伸引物混合物,浓度如表 3 中所示,

[0336] 2 微升 One-s tep RT-PCR 酶混合物,

[0337] 50 U RNA 酶抑制剂 (RNasin,Promega,Madison USA,cat.NoN2515),以及

[0338] 5 微升稀释的细胞裂解物。

[0339] 使用的多重重叠 - 延伸引物混合物在表 3 中示出。

[0340] 表 3

[0341]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
V_H	每种 40nM	22	gctagcattattattaccatggccCAGRTGCAGCTGGTGCART
		23	gctagcattattattaccatggccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
		24	gctagcattattattaccatggccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
		25	gctagcattattattaccatggccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
		26	tattggcgcgccatggccsaggtgCAGCTGGTGGAG
		27	gctagcattattattaccatggccCAGGTGCAGCTACAGCAGT
		28	gctagcattattattaccatggccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
		29	gctagcattattattaccatggccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
		30	gctagcattattattaccatggccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
J_H	每种 200nM	31	atattctcGAGACGGTGACCAGGGTG
		32	atattctcGAGACGGTGACCATTGTCC
		33	atattctcGAGACGGTGACCAGGGTTC
		34	atattctcGAGACGGTGACCGTGGTCC

[0342]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
V_L	每种 40nM	35	ccatggtaataataatgctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
		36	ccatggtaataataatgctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
		37	ccatggtaataataatgctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
		38	ccatggtaataataatgctagccGATATTGTGATGACCCACACT
		39	ccatggtaataataatgctagccGAAACGACACTCACGCAGT
		40	ccatggtaataataatgctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
$C_{L\kappa}$	200 nM	16	atatatatgcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTG

[0343] W = A/T, S = G/C, R = A/G. 大写序列相应于基因特异区

[0344] 使用以下的循环条件进行反应：

[0345] 逆转录：30 分钟 55 摄氏度

[0346] 聚合酶激活：15 分钟 95 摄氏度（使逆转录酶失活，激活 Taq 聚合酶）

[0347] PCR 反应：

[0348] 变性 30 秒 94 摄氏度

[0349] 退火 30 秒 44 摄氏度

[0350] 延伸 3 分钟 72 摄氏度

[0351] 共 50 个循环

[0352] 最终的延伸 10 分钟 72 摄氏度

[0353] 使用 1.5％琼脂糖凝胶电泳分析 10 微升的反应产物，使用溴化乙锭检测（图 6A）。

[0354] 片段的预期大小（精确的大小取决于可变区的长度）：

[0355] V_H：410bp

[0356] LC：680bp

[0357] 重叠－延伸片段：1070bp

[0358] 对于所有的细胞裂解物稀释度都观察到了不连续的 DNA 片段，其迁移对应于重链可变区（V_H）以及轻链可变区和恒定区（LC）的长度。在 100 和 10 个细胞的裂解物中观察到强度较弱的片段，其迁移对应于推测的重叠－延伸片段。一个细胞的裂解物样品中的重叠－延伸片段不易识别，尽管可以在原来的凝胶上看见它（参见图 6A 中所示照片中的箭头以及图 6B 中所示的草图）。

[0359] c. 重叠－延伸片段的鉴定

[0360] 从根据以上描述的重复实验中，证实了重叠－延伸条带的存在。从对应于 1 个细胞的泳道和对应于 100 个细胞的泳道中于大概 1070bp 处切下琼脂糖凝胶，用 Qiaex II(Qiagen cat.No 20051, Hilden, Germany) 纯化 DNA，用 20 微升的水洗脱。

[0361] 对 1 微升的洗脱物进行 PCR(Biotaq kit, Bioline, UK cat.No BIO-21040)，根据生产商的说明，使用在推测的重叠－延伸片段侧翼的引物（对应于 SEQ ID NO 32 到 35 的 J_H 引物和对应于 SEQ ID NO：17 的 $C_{L\kappa}$ 引物，每个引物的浓度是 0.5μM）进行。循环参数是：

[0362] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0363] 退火 30 秒 55 摄氏度

[0364] 延伸 1 分钟 72 摄氏度

[0365] 共 30 个循环

[0366] 使用 1％琼脂糖凝胶电泳对 10 微升的每个反应产物进行分析，使用溴化乙锭进行检测。从 1 和 100 个细胞中都可以看见几个片段，包括一个具有预期重叠 - 延伸片段的迁移的片段（图 6C 中的箭头）。根据以上的描述，从对应于一个细胞的凝胶泳道中切下 1kb 的片段，使用 Qiaex II 进行纯化。纯化的片段用限制酶 NheI 和 NcoI 消化（分别），反应产物用 1％琼脂糖凝胶电泳进行分析，使用溴化乙锭进行检测（图 6D）。这些限制位点存在于 VH 和 LC 之间的重叠区中，消化后的预期大小分别是大约 410 和 680bp（图 2）。NheI 消化是部分的，因为在原来的大小处仍然存在很大一部分。

[0367] 实施例 3 :组合的单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR 和嵌套 PCR

[0368] 在该实施例中，逆转录和多重重叠 - 延伸 PCR 反应在单一步骤中进行，之后是半嵌套 PCR 扩增，使用来自裂解的细胞的模板，浓度对应于 100、10 或者 1 个细胞。

[0369] a. 单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR

[0370] 根据实施例 2 所述进行多重重叠 - 延伸 RT-PCR，使用 HB-8501 细胞裂解物和多重重叠 - 延伸引物混合物，包含的引物如表 4 所示。

[0371] 表 4

[0372]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
V_H	每种 40nM	41	tattggcgcgccatggccCAGRTGCAGCTGGTGCART
		42	tattggcgcgccatggccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
		43	tattggcgcgccatggccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
		44	tattggcgcgccatggccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
		45	tattggcgcgccatggccCAGGTGCAGCTACAGCAG
		46	tattggcgcgccatggccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
		47	tattggcgcgccatggccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
		48	tattggcgcgccatggccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
C_{H1-5}	这些引物中每种 200nM	49	AAGTAGTCCTTGACCAGGCAGCC
		50	TGAGTTCCACGACACCGTCA
		51	AGAGGTGCTCTTGGAGGAGG
		52	AGTTTTGTCACAAGATTTGGG
		53	GTTGCAGATGTAGGTCTGGGTGC
V_L	每种 20nM	54	gccatggcgcgccaatagctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
		55	gccatggcgcgccaatagctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
		56	gccatggcgcgccaatagctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
		57	gccatggcgcgccaatagctagccGATATTGTGATGACCCACACT
		58	gccatggcgcgccaatagctagccGAAACGACACTCACGCAGT
		59	gccatggcgcgccaatagctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
$C_{L\kappa}$	200 nM	60	atatatatgcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAA

[0373] W = A/T，S = G/C，R = A/G. 大写序列相应于基因特异区

[0374] 但是应当注意，对于每一个多重重叠－延伸引物混合物，只使用了 C_{H1-5} 引物中的一个，产生 5 个不同的多重重叠－延伸引物混合物。

[0375] 剩余的参数如实施例 2 中对于多重重叠－延伸 RT-PCR 反应所描述的，只有退火温度变为 50 摄氏度。对于每一个重链恒定区反向引物（分别对应于 SEQ ID NO:49 到 53 的 C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}, C_{H4}, C_{H5}）进行一次反应，使用对应于 100、10、1 和 0 个细胞的裂解物。

[0376] b. 半嵌套 PCR

[0377] 1 微升的多重重叠－延伸 RT-PCR 反应产物进行半嵌套 PCR(Biotaq kit,Bioline, UK cat.No BIO-21040)，基本按照生产商的建议进行。反应的总体积是 50 微升。使用的引物如表 5 中所示。

[0378] 表 5

[0379]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
J_H	每种 200nM	61	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTGCC
		62	ggaggcgctcGAGACGGTGACCATTGTCCC
		63	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTTCC
		64	ggaggcgctcGAGACGGTGACCGTGGTCCC
$C_{L\kappa}$	200 nM	21	accgcctccaccggcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT

[0380] 大写序列相应于基因特异区

[0381] 循环条件如下：

[0382] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0383] 退火 30 秒 50 摄氏度

[0384] 延伸 1.5 分钟 72 摄氏度

[0385] 共 25 个循环

[0386] 最终延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0387] 使用 1.5％琼脂糖凝胶电泳对 10 微升的每个反应产物进行分析，使用溴化乙锭进行检测（图 7）。

[0388] 来自对应于一个细胞裂解物、在第一个反应中使用了 C_{H4} 引物的半嵌套 PCR 的推测重叠－延伸片段（参见图 7 的箭头），从琼脂糖凝胶上切下来，使用 Qiaex II 试剂盒 (Qiagen cat.No.20051, Hilden, Germany) 纯化，用 Invitrogen TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitrogen cat.No 45-0641,Carlsbad,CA,USA) 插入到 pCR2.1-TOPO 中。对 8 个克隆的插入物进行测序，其中 7 个看起来由这样的重链可变区组成，即所述重链可变区与轻链可变区和恒定区通过预期的重叠区连接。

[0389] 总之，组合的多重重叠－延伸 RT-PCR 以及半嵌套 PCR 反应的敏感性非常令人满意，5 个恒定区引物中有 4 个能够从对应于单个细胞的裂解物中扩增出显著量的重叠－延伸产物。

[0390] 实施例 4：使用富集的人 B 淋巴细胞作为模板来源进行组合的单步多重重叠－延伸 RT-PCR 和嵌套 PCR

[0391] 在该实施例中，逆转录和多重重叠－延伸 PCR 反应在单一步骤中进行，之后是半嵌

套 PCR 扩增，使用分离的单个人 B 淋巴细胞作为模板来源。

[0392] a. B 细胞的分离

[0393] 用破伤风类毒素免疫人类男性供体。免疫 6 天后收集供体 120 毫升血液样本，使用 Lymphoprep(Axis-Shield，Oslo Norway，prod.No 1001967)，根据生产商的说明分离外周血单核细胞 (PBMC)。利用磁性珠细胞分选来富集 CD19 阳性的细胞群。用缀合 FITC 的抗 CD19 抗体 (Becton Dickinson，NJ，USA，cat.No 345776) 对 PBMC 进行染色。使用缀合抗 FITC 的磁性微珠和柱纯化，根据生产商的说明 (Miltenyi Biotec，Gladbach，Germany，cat.No 130-042-401) 进行磁性珠细胞分选。用含有 2nM EDTA 和 0.5％ BSA 的 PBS 将细胞稀释到每毫升 200 个细胞。5 微升稀释的细胞分配到 PCR 管中，得到每管大约有单个细胞。将管储存于 -80 摄氏度直至使用。

[0394] b. 多重重叠 - 延伸 RT-PCR 和半嵌套 PCR

[0395] 多重重叠 - 延伸 RT-PCR 和半嵌套 PCR 的条件如在实施例 3 中所述。但是反应仅仅使用由对应于 SEQ ID NO：51 的引物 C_{H3} 组成的多重重叠 - 延伸引物混合物来进行。对来自组合的多重重叠 - 延伸 RT-PCR 和半嵌套 PCR 反应的 16 个样品进行分析，即各从每个半嵌套 PCR 反应产物中取 10 微升进行 1％琼脂糖凝胶电泳，使用溴化乙锭检测 (图 8)。

[0396] 从图 8 可以看出，16 个泳道中有两个 (泳道 5 和 6) 含有预期迁移的片段 (大约 1kb)。且泳道 2 在预期迁移的位置含有强度较弱的片段。将泳道 5 和 6 的 1kb 片段从琼脂糖凝胶中切下来，使用 Qiaex II 试剂盒 (Qiagen cat.No 20051) 进行纯化，使用 Invitrogen TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitrogen cat.No 45-0641，Carlsbad，CA，USA) 将片段插入到 pCR2.1-TOPO 中。

[0397] 来自每个分离的片段的两个克隆具有正确大小的插入物。限制酶消化 (NcoI 和 NheI，分别进行) 显示了预期大小的片段 (410bp 和 680bp)，表明在重链可变区与轻链可变和恒定区的编码序列之间有正确的连接。

[0398] 对来自泳道 5 中的片段的两个克隆进行测序，显示它们是相同的，表明连接的 V_H 和 LC 是关联对。

[0399] 实施例 5：使用 V_λ 特异性引物进行组合的单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR 和嵌套 PCR

[0400] 在该实施例中，使用 V_λ 特异性引物以单一步骤进行逆转录和多重重叠 - 延伸 PCR 反应，之后是半嵌套 PCR 反应。从表达 λ 基因家族 1b 和 1e 以及同样重链可变区的两个不同细胞系中提取总 RNA，并作为模板。

[0401] a. 细胞

[0402] 使用 Flp-In 技术 (Invitrogen，Carlsbad，CA，USA) 制备两个表达 IgG1-λ 的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

[0403] 基于 Flp-In 表达载体 pcDNA5/FRT 构建代表两个 λ 基因家族的 IgG1- 哺乳动物表达载体 pEm465/01P581 和 pEm465/01P582(图 9A)。使用 Fugene 6(Roche，Mannheim，Germany)，根据生产商的说明，用以上提到的含有抗体编码基因的质粒和可提供 Flp 重组酶的瞬时表达的 pOG44 共转染 CHO-Flp-In 细胞。筛选转染子是否有插入。选择出的细胞系被称为 CHO Flp-In/Em464/01P581 和 CHO Flp-In/Em464/01P582，维持在添加 2mM L- 谷氨酰胺、10％ FCS 和 900 微克 / 毫升潮霉素 B 的 Ham′ s F-12 培养基 (维持培养基) 中。

[0404] 使用胰蛋白酶收获细胞系，用维持培养基漂洗 3 次。大约 10^7 个细胞用于总 RNA 的

纯化，根据生产商的说明使用 Nucleo Spin L 试剂盒 (Macherey-Nagel，Düren，Germany)。经 OD_{260} 测量确定最终的 RNA 浓度。

[0405] b. 单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR

[0406] 使用 50pg、5pg 或者 0.5pg 总 RNA 作为模板的多重重叠 - 延伸 RT-PCR 基本按照实施例 3 中的描述进行，使用包含表 6 中所示引物的多重重叠 - 延伸引物混合物以及以下说明的循环条件。

[0407] 逆转录 :30 分钟 55 摄氏度

[0408] 聚合酶激活 :15 分钟 95 摄氏度（使逆转录酶失活，激活 Taq 聚合酶）

[0409] PCR 反应 :

[0410] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0411] 退火 30 秒 50 摄氏度

[0412] 延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0413] 共 35 个循环

[0414] 最终的延伸 10 分钟 72 摄氏度

[0415] 表 6

[0416]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向) 3'
V_H	每种 4.0nM	1	agcctatactattgattaggcgcgccCAGRTGCAGCTGGTGCART
		2	agcctatactattgattaggcgcgccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
		3	agcctatactattgattaggcgcgccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
		4	agcctatactattgattaggcgcgccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
		5	agcctatactattgattaggcgcgccCAGGTGCAGCTACAGCAGT
		6	agcctatactattgattaggcgcgccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
		7	agcctatactattgattaggcgcgccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
		8	agcctatactattgattaggcgcgccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
C_H	100 nM	9	GACSGATGGGCCCTTGGTGG
V_λ	每种 100nM	65	cgcctaatcaatagtataggctagccCAGTCTGTGCTGACTCAGCCA
		66	cgcctaatcaatagtataggctagccCAGTCTGTGYTGACGCAGC
		67	cgcctaatcaatagtataggctagccCAGTCTGTCGTGACGCAGC
		68	cgcctaatcaatagtataggctagccCARTCTGCCCTGACTCAGCCT
		69	cgcctaatcaatagtataggctagccTCCTATGWGCTGACTCAGCCA
		70	cgcctaatcaatagtataggctagccTCTTCTGAGCTGACTCAGGAC
		71	cgcctaatcaatagtataggctagccCACGTTATACTGACTCAACCG
		72	cgcctaatcaatagtataggctagccCAGGCTGTGCTGACTCAGC
		73	cgcctaatcaatagtataggctagccAATTTTATGCTGACTCAGCCCCA
		74	cgcctaatcaatagtataggctagccCAGRCTGTGGTGACYCAGGA
		75	cgcctaatcaatagtataggctagccCWGCCTGTGCTGACTCAGC
$C_{\lambda 2/C\lambda 7}$	100 nM	76	gccgcttattaTGAACATTCTGTAGGGGCCA
		77	gccgcttattaAGAGCATTCTGCAGGGGCCA

[0417] Y = C/T, W = A/T, S = G/C, R = A/G. 大写序列相应于基因特异区

[0418] c. 半嵌套 PCR

[0419] 使用 1 微升的多重重叠 - 延伸 RT-PCR 反应产物，基本按照生产商的建议进行半嵌套 PCR(Biotaq kit, Bioline, UK cat. No BIO-21040)。反应的总体积是 20 微升。使用的引物在表 7 中显示。

[0420] 表 7

[0421]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)3'
J_H	每种 200nM	61	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTGCC
		62	ggaggcgctcGAGACGGTGACCATTGTCCC
		63	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTTCC
		64	ggaggcgctcGAGACGGTGACCGTGGTCCC
$C_{L\lambda}$	200 nM	78	atatatatgcggccgcttattaTGAACATTCTGTAGGGGCCACTG
		79	atatatatgcggccgcttattaAGAGCATTCTGCAGGGGCCACTG

[0422] 大写序列相应于基因特异区

[0423] 循环条件如下：

[0424] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0425] 退火 30 秒 50 摄氏度

[0426] 延伸 1.5 分钟 72 摄氏度

[0427] 共 25 个循环

[0428] 最终的延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0429] 取 10 微升嵌套产物通过 1.5％琼脂糖凝胶电泳进行分析，使用溴化乙锭检测（图 9B 和 9C）。箭头显示了重叠－延伸产物，具有大约 1kb 的预期迁移特性。

[0430] 本实验阐明，表 6 中显示的 λ 多重重叠－延伸引物混合物可以用于单步多重重叠－延伸 RT-PCR，与所用的模板无关。而且，在 0.5pg 总 RNA 时产生了特异的重叠－延伸 PCR 产物。这一敏感性提示可以从单个细胞中扩增出关联连接的重链可变区和轻链可变区的编码序列。

[0431] 实施例 6：抗体编码序列的破伤风特异性关联对的亚文库的制备

[0432] 在本实施例中，使用破伤风类毒素（TT）作为靶抗原示例了在图 10 中显示的流程图中概述的步骤。

[0433] a. 供体

[0434] 以前曾经用破伤风疫苗免疫的供体使用破伤风疫苗（Statens Serum Institut, Denmark）进行加强免疫。破伤风疫苗加强免疫后 6 天从供体上抽取大约 200 毫升的血液样本，收集到含有抗凝剂的管中。

[0435] 要求供体通常是健康的并且没有隐蔽或者慢性的感染。他们不应该患有自体免疫疾病或者接受任何免疫抑制性药物治疗，并且他们在最近 3 个月内不应当有任何的疫苗接种。而且，在进行 TT 疫苗加强免疫时，供体在最近一个月内必须不能有任何严重的感染。

[0436] b. 外周血单核细胞（PBMC）的制备

[0437] 使用 Lymphoprep(Axis-Shield PoC AS, Norway, prod.No 1001967)，根据生产商的建议从血液样本中分离 PBMC。简而言之，血液用 PBS 进行 1 ： 1 稀释，将悬液以 2 ： 1 的比例铺于 Lymphoprep 上。于 25 摄氏度、800g 将小管离心 20 分钟，然后收集白色的中间相条带。用含有 2mM EDTA 的 PBS 漂洗细胞。

[0438] c. B 细胞的富集

[0439] 使用以下的步骤用磁性珠细胞分选法富集 PBMC 中的 B 细胞谱系（CD19+ 细胞）

[0440] 使用抗 -CD 19-FITC(Becton Dickenson, NJ, USA, cat.No 345776) 染色分离的

PBMC。所有步骤在4摄氏度下于暗处进行。以每1×10^6个细胞使用10微升抗-CD 19-FITC〔使用M-缓冲液(PBS,pH7.2,0.5% BSA,2mM EDTA),对于每1×10^6个细胞体积为100微升〕进行染色。PBMC中的B细胞谱系会被染色。细胞孵育20分钟,之后用M-缓冲液进行两次漂洗。抗-CD 19-FITC染色的细胞使用缀合抗FITC的微珠进行磁性标记,每1x10^6个细胞使用10微升抗FITC磁性珠(Miltenyi Biotec,Gladbach,Germany,cat.No 130-042-401),体积是每1x10^6个细胞使用100微升M-缓冲液。孵育15分钟后用M-缓冲液漂洗一次。细胞用脱气的M-缓冲液重悬。

[0441] 使用脱气的M-缓冲液根据生产商的说明预先处理MACS LS柱(Miltenyi Biotec,Gladbach,Germany,cat.No130-042-401)。将用抗-CD 19-FITC染色并且用抗FITC-磁性珠标记的细胞悬液加到柱上,使其流过。染色并标记的细胞(CD 19+)会被保留在围绕柱的磁场中,而没有被染色的细胞(CD19-)会流过柱。使用脱气的M-缓冲液漂洗柱。去除磁场并收集CD19+细胞。

[0442] d.浆细胞的分选

[0443] 将MACS柱的洗脱物离心并且用FACS缓冲液(PBS,pH7.2,2% BSA)重悬,浓度是1×10^6个细胞/60微升FACS缓冲液。加入抗-CD19-FITC(Becton Dickenson,NJ,USA,cat.No 345776)(10微升/10^6个细胞)、抗-CD38-PE(Becton Dickenson,NJ,USA,cat.No 555460)(10微升/10^6个细胞)和抗-CD45-PerCP(BectonDickenson,NJ,USA,cat.No 345809)(20微升/10^6个细胞)。4摄氏度于暗处孵育20分钟,之后漂洗两次,用FACS缓冲液重悬。

[0444] 使用荧光激发细胞分选(FACS)对细胞进行分选,使用以下的门控参数:

[0445] 1.前向散射和侧向散射,目的是保留包括成浆细胞(plasma blaster)和浆细胞在内的淋巴细胞和单核细胞,以及避免死细胞和具有非常高侧向散射的细胞,其可能是团聚体或者粒细胞。

[0446] 2.CD19阳性并且CD38表达水平提高($CD38^{hi}$)的细胞。这主要只是对CD38的门控,因为PBMC已经在针对CD19表达的MACS柱上进行了富集,但是这会暴露出任何污染物。

[0447] 3.CD45阳性细胞。所有的淋巴细胞都表达CD45。但是,与早期淋巴细胞分化阶段相比,浆细胞下调它们的CD45表达。因此对CD45进行门控时可以得到不连续的对应于浆细胞的细胞群。

[0448] 经过FACS分选的细胞直接以单个细胞收集在每孔含有5微升PBS(添加5U RNA酶抑制剂(RNasin,Promega,Madison USA,cat.No N2515))的96孔平板的单个孔内。这时可以将细胞冷冻以用于后面的RT-PCR,或者立即进行RT-PCR。

[0449] e.免疫球蛋白可变区编码序列的关联对的连接

[0450] 多重重叠-延伸RT-PCR技术应用于单个细胞,这样获得了转录后的抗破伤风类毒素重链可变区和轻链可变区的编码序列的关联连接。

[0451] e-1.单步多重重叠-延伸RT-PCR

[0452] 使用Qiagen One-Step RT-PCR试剂盒(Qiagen cat.No210212,Hilden,Germany)进行多重重叠-延伸RT-PCR,基本根据生产商的建议。将每孔含有单个细胞的冷冻的96孔平板从冰箱中取出,在孔中没有冰晶时立即向每一个样品(单个细胞)中加入15微升的RT-PCR反应混合物。

[0453] RT-PCR 反应混合物含有总体积是 20 微升的以下试剂：

[0454] 1×One-Step RT-PCR 缓冲液，

[0455] 终浓度各是 400μM 的每种 dNTP，

[0456] 多重重叠－延伸引物混合物，浓度如表 8 中所示，

[0457] 0.8 微升 One-step RT-PCR 酶混合物，以及

[0458] 20U RNA 酶抑制剂 (RNasin，Promega，Madison USA，cat.No N2515)。

[0459] 多重重叠－延伸引物混合物的组成在表 8 中示出。

[0460] 表 8

[0461]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
V_H	每种 40nM	41	tattggcgcgccatggccCAGRTGCAGCTGGTGCART
		42	tattggcgcgccatggccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
		43	tattggcgcgccatggccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
		44	tattggcgcgccatggccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
		45	tattggcgcgccatggccCAGGTGCAGCTACAGCAG
		46	tattggcgcgccatggccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
		47	tattggcgcgccatggccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
		48	tattggcgcgccatggccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
$C_{H(IgG)}$	200 nM	9	GACSGATGGGCCCTTGGTGG
V_L	每种 40nM	54	gccatggcgcgccaatagctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
		55	gccatggcgcgccaatagctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
		56	gccatggcgcgccaatagctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
		57	gccatggcgcgccaatagctagccGATATTGTGATGACCCACACT
		58	gccatggcgcgccaatagctagccGAAACGACACTCACGCAGT
		59	gccatggcgcgccaatagctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
$C_{L\kappa}$	200 nM	60	atatatatgcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAA

[0462] W = A/T，S = G/C，R = A/G. 大写序列相应于基因特异区

[0463] 循环条件如下：

[0464] 逆转录：30 分钟 55 摄氏度

[0465] 聚合酶激活：15 分钟 95 摄氏度（使逆转录酶失活，激活 Taq 聚合酶）

[0466] PCR 反应：

[0467] 变性 30 秒 94 摄氏度

[0468] 退火 30 秒 52 摄氏度

[0469] 延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0470] 共 35 个循环

[0471] 最终的延伸 10 分钟 72 摄氏度

[0472] e-2. 额外的扩增

[0473] 来自每个样品的 1 微升多重重叠－延伸 RT-PCR 反应产物进行半嵌套 PCR(Biotaq kit，Bioline，UK cat.No BIO-21040)，基本按照生产商的建议，使用 96 孔平板进行。每个

反应的总体积是 50 微升，含有终浓度如下的各物质：1×Biotaq 缓冲液，200 μ M 每种 dNTP，2mM 氯化镁，1.25U Bio Taq 聚合酶和表 9 中显示的引物。

[0474] 循环条件如下：

[0475] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0476] 退火 30 秒 55 摄氏度

[0477] 延伸 1.5 分钟 72 摄氏度

[0478] 共 30 个循环

[0479] 最终的延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0480] 表 9

[0481]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
J_H	每种 200nM	61	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTGCC
		62	ggaggcgctcGAGACGGTGACCATTGTCCC
		63	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTTCC
		64	ggaggcgctcGAGACGGTGACCGTGGTCCC
$C_{Lκ}$	200 nM	21	accgcctccaccggcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT

[0482] 大写序列相应于基因特异区

[0483] 对有限的样品组取 10 微升进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析，使用溴化乙锭显示，目的是证实多重重叠 - 延伸 RT-PCR 成功进行。

[0484] 片段的预期大小（精确大小取决于可变区的长度）是：

[0485] V_H：～ 410bp

[0486] LC：～ 680bp

[0487] 重叠 - 延伸片段：～ 1070bp

[0488] 来自同一个供体的、在 96 孔平板上反应的所有样品取 2 微升混于一个管中。汇集的样品使用 XhoI 和 NotI 消化。消化后的重叠 - 延伸片段使用制备型的 1% 琼脂糖凝胶电泳进行纯化；重叠 - 延伸片段从琼脂糖凝胶上切下来，使用 Qiaex II 试剂盒 (Qiagen cat. No20051, Hilden, Germany) 纯化。如果不需要的话，没有必要在这个阶段汇集关联对。那样的话，要对每个单个反应进行限制切割，然后将产物逐个克隆到以下描述的载体中。

[0489] f. 关联 Fab 表达文库

[0490] 通过连接向大肠杆菌载体 JSK 301（图 11）中插入 XhoI/NotI 消化的重叠 - 延伸片段，制备 Fab 载体文库。通过电穿孔使用 Fab 载体文库转化大肠杆菌 (TOP10)，转化子在含有 100 微克 / 毫升羧苄青霉素的 2xYT 琼脂上进行筛选。从琼脂平板上直接挑取菌落以提取质粒 DNA。质粒制备物来自每个供体最小数目的菌落，对应于 3× 的最初分选出的单个浆细胞的总数，目的是保持多样性。产生的质粒制备物使用 AscI 和 NheI 消化，然后插入来自 phh3 的原核启动子和前导序列盒 (Den, W. 等人，1999. J. Immunol. Methods 222, 45-57)，接下来进行连结，以制备 Fab 表达文库。文库的制备过程在图 12 中概述。大肠杆菌 (TG1) 用电穿孔转化，产生的 Fab 表达文库和转化子在含有 100 微克 / 毫升羧苄青霉素的 2×YT 琼脂上进行筛选。在 Den 等人，J Immunol Methods. 1999 Jan 1 ;222(1-2) :45-57 中描述

的步骤期间，每个供体保持分离的状态。但是如果可能需要的话，它们可以在任何阶段被混和。

[0491] g. 克隆的筛选

[0492] 通过抗原特异性 ELISA 检测就 TT 抗原的结合对表达 Fab 的克隆进行筛选

[0493] g-1. 母平板的制备和 Fab 的表达

[0494] TG1 细胞的筛选出的单菌落，每个都含有来自由步骤 (f) 产生的文库中的关联 Fab 表达载体，将单个菌落挑到 96 孔板的单孔中，孔内含有 2 x YT/100 微克 / 毫升 Amp/1％葡萄糖。菌落于 37 摄氏度在轻微振荡下生长过夜。这些平板被称为母平板，加入甘油至终浓度为 15％后储存于 -80 摄氏度。

[0495] 在储存母平板之前，使用母平板和 96 针移样器 (replicator) 接种一个或者多个含有 2 x YT/100 微克 / 毫升 Amp/1％葡萄糖的 384 孔平板。密封这些平板并在 37 摄氏度下振荡 2-3 小时。

[0496] 加入等体积的 2 x YT/100 微克 / 毫升 Amp/0.2mM IPTG，使 IPTG 的终浓度为 0.1mM，以诱导 Fab 的表达。密封平板并在 30 摄氏度下振荡过夜。第二天，用 ELISA 就 TT 抗原结合特异性对含有 Fab 的上清液进行分析。

[0497] g-2. ELISA 分析

[0498] 384 孔的 ELISA 平板 (Nunc，Roskilde，Denmark，cat. No265196) 用在 PBS 中稀释至终浓度为 1 微克 / 毫升的破伤风类毒素 (TT) 抗原在 4 摄氏度包被过夜，每孔 25 微升。加入 2％ M-PBS-T(2％脱脂奶粉，PBS 中，0.05％ Tween 20) 于室温封闭孔中多余的结合位点 1 小时。用 PBS-T(PBS，0.05％ Tween 20) 漂洗孔两次。

[0499] 来自 g-1 的含有 Fab 的细菌上清液用 2％ M-PBS-T 作 1 ： 2 稀释，转移到 ELISA 孔中，每个样品再做一个平行。室温下孵育 1 小时。孔用 PBS-T 漂洗 4 次。向孔中加入用 2％ M-PBS-T 作 1 ： 10000 稀释的山羊抗人 Fab/HRP(Sigma，St. Louis，MO，USA，cat. No A0293)。室温下孵育 1 小时。孔用 PBS-T 漂洗 4 次。加入 TMB Plus(KemEnTec，Copenhagen，Denmark，cat. No 4390L) 底物，孵育 5-15 分钟。加入等体积的 1M 硫酸终止反应。在 ELISA 读板仪 (Multiscan Ascent，Labsystems，Franklin，USA) 中于 450nm 读取反应进行的程度。

[0500] 接下来从原来的母平板中找回对应于 TT 抗原结合性克隆的原始细菌克隆。从分离的抗原阳性 Fab 克隆中制备质粒 DNA，产生 TT 抗原结合性克隆的关联 Fab 表达亚文库。

[0501] 还可以通过抗轻链 ELI SA 检测对克隆进行分析，目的是获得抗原结合性克隆的数目与 Fab 表达性克隆的数目之间的关系。而且，这种分析提供了克隆中 κ 和 λ 轻链表现度 (representation) 的信息。

[0502] h. 关联抗体表达文库

[0503] 为了促进全长人抗体的表达，必须将来自细菌 Fab 表达载体的关联可变区转移到含有来自一种人类免疫球蛋白同种型的恒定结构域的哺乳动物表达载体中。这样的转移可以一个克隆一个克隆进行或者整个地进行。以下描述了如何进行成批的转移。

[0504] 分两步进行成批转移。首先，汇集单独分离的抗原结合性 Fab 克隆的质粒制备物。通过使用 AscI 和 NheI 消化汇集的 Fab 表达亚文库，并随后在文库中插入哺乳动物的启动子和前导序列盒并进行连接，从而将含有原核启动子和前导序列的盒子交换为哺乳动物启动子和前导序列盒，其由人碱性磷酸酶前导序列 (AP Leader)、人延伸因子 1-α 启动

子 (EFP)、腺病毒主要晚期启动子 (AdMLP)、IgK 前导序列组成。用得到的交换了启动子的 Fab 表达文库经电穿孔转化大肠杆菌 (TOP 10),转化子在含有 100 微克 / 毫升羧苄青霉素的 2xYT 琼脂上进行筛选。从琼脂平板上直接挑取菌落以制备质粒 DNA。质粒制备物来自每个供体最少数目的菌落,对应于大约 3× 的原始文库中克隆总数,目的是保持多样性。

[0505] 第二,通过使用 XhoI 和 NotI 消化质粒制备物,分离来自交换了启动子的 Fab 表达载体的关联可变区。分离的片段通过连接而插入到哺乳动物表达载体中,得到关联抗体表达文库。使用的载体与图 9A 中的载体基本相同,区别在于这里的 IgL 对应的是 κ 轻链编码序列。以上使用的哺乳动物表达载体是以位点特异性 Flp-In 系统 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, Cat No K6010-01) 为基础的。用得到的关联抗体表达文库经电穿孔转化大肠杆菌 (TOP10),转化子用含有 100 微克 / 毫升羧苄青霉素的 2xYT 琼脂进行筛选。从琼脂平板上直接挑取菌落以制备质粒 DNA。质粒制备物还是来自每个供体最少数目的菌落,对应于大约 3× 的原始文库中克隆总数,目的是保持多样性。得到的关联抗体表达文库的质粒制备物可以用于转染哺乳动物宿主细胞,例如来自 Invitrogen Flp-In 系统 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, Cat No K6010-01) 的 CHO 细胞,目的是通过 Flp 重组酶介导的整合而产生稳定的哺乳动物表达细胞系。这种细胞系可以用于生产重组多克隆抗体。

[0506] 实施例 7 :通过高密度膜检测进行筛选

[0507] 通过高密度膜检测来筛选来自实施例 6f 的表达 Fab 的克隆。

[0508] a. 母平板的制备

[0509] 母平板根据实施例 6 的步骤 (g-1) 中的描述进行制备。

[0510] b. PVDF 膜的制备

[0511] 使用在 PBS 中稀释至终浓度为 1 微克 / 毫升的 TT 抗原,根据生产商的说明,于 4 摄氏度包被 PVDF 膜 (Amersham, Uppsala, Sweden, cat. No RPN2020F) 过夜。在 2% M-PBS(2% 脱脂奶粉, PBS 中) 中封闭膜上多余的结合位点 1 小时。膜用 PBS 漂洗三次。用 2×YT 浸泡膜几分钟。

[0512] c. 克隆合并

[0513] 使用 96 针移样器将母平板上的克隆转移到一个或者多个每孔含有 20μl 2×YT 的 384 孔平板中,以实现克隆向 384 孔平板中的合并。

[0514] 使用 384 针移样器将细菌转移到一个或者多个置于 2 xYT/Carb/1% 葡萄糖琼脂平板上的尼龙膜 (Amersham, Uppsala, Sweden, cat. No RPN2020B) 上,平行转移两次。平板在 37 摄氏度孵育 4-6 小时。

[0515] d. Fab 诱导

[0516] 将步骤 b 中制备的 PVDF 膜置于 2 x YT/Carb/0.1mM IPTG 琼脂平板上。将具有正在生长的细菌菌落的尼龙膜放在位于含有 IPTG 的琼脂平板上的 PVDF 膜的上面 (每个 PVDF 膜用一张尼龙膜)。含有 IPTG 的琼脂平板在 30 摄氏度孵育过夜,以促进 IPTG 诱导的 Fab 从菌落中的表达。Fab 分子通过尼龙膜扩散到 PVDF 膜上,结合 TT 抗原的 Fab 会被保留在 PVDF 膜上。

[0517] e. 检测

[0518] 去掉尼龙膜, PVDF 膜用 PBS-T(PBS, 0.05% Tween 20) 漂洗 2 次,各 5 分钟。膜在

2% M-PBS 中孵育 30 分钟。PVDF 膜用 PBS-T 漂洗 2 次，各 5 分钟，之后与用 2% M-PBS 作 1 ： 10000 稀释的山羊抗人 IgG/HRP(Sigma，St.Louis，MO，USA，cat.No A0293) 孵育 1 小时。PVDF 膜用 PBS-T 漂洗 3 次，各 5 分钟。最后，根据生产商的说明，PVDF 膜与 SuperSignal West Femto 化学发光底物 (Pierce，Rockford，Il，USA，cat.No 34095) 孵育 5 分钟。去掉多余的底物，PVDF 膜置于 CCD 相机下以检测在 PVDF 膜上 Fab 片段结合 TT 抗原的位置处产生的化学发光信号。

[0519] 阳性的 TT 抗原结合性克隆在图像上会呈现出小点。接下来从原始母平板上找到原来的细菌克隆。从分离的抗原阳性 Fab 克隆中制备质粒 DNA，产生 TT 抗原结合性克隆的关联 Fab 表达亚文库。

[0520] f. 抗原结合性克隆和 Fab 表达性克隆之间的相关性

[0521] 取下步骤 e 中的尼龙膜，置于另一个系列的根据步骤 b 中的过程用抗轻链抗体或者抗 Fab 抗体包被的 PVDF 膜上。然后重复步骤 d 和步骤 e。

[0522] Fab 阳性克隆在图像上会呈现出小点，可以作出 TT 抗原结合性克隆数目与 Fab 表达性克隆数目之间的相关性。

[0523] 实施例 8 :描述编码杂聚蛋白质的序列的分离的示例性实施例

[0524] 本实施例阐明了三聚体鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 (G 蛋白) 如何可以在使用本发明的多重重叠 - 延伸 RT-PCR 技术的单一步骤中分离出来。G- 蛋白亚基家族是一个大的家族，仅在人类中有大约 16 个不同的 α 亚基、5 个 β 亚基和 12 个 γ 亚基。对于本实施例，选择了亚基 Gα S(GenBank 登录号 X04408)，亚基 Gβ 1(GenBank 登录号 AF501822) 和亚基 Gγ 1(GenBank 登录号 BC029367)。连接过程在图 13 中予以说明，其中步骤 1 是多重重叠 - 延伸 RT-PCR 步骤，步骤 2 是连接的产物的额外扩增。

[0525] a. 细胞

[0526] 人肝细胞群来自外科手术废弃的样品。将肝细胞打散并且裂解，根据生产商的说明使用 RNAL 试剂盒 (Macherey-Nagel，Düren，Germany，cat.No 740962.20) 从裂解物中分离总 RNA。

[0527] b. 多重重叠 - 延伸 RT-PCR

[0528] 基本上根据生产商的建议使用 Qiagen One-Step RT-PCR 试剂盒 (Qiagen cat.No 210212，Hilden，Germany) 进行多重重叠 - 延伸 RT-PCR。

[0529] 每个 PCR 管中含有总体积为 50 微升的以下试剂 :

[0530] 1×One Step RT-PCR 缓冲液，

[0531] 终浓度各为 400μM 的每种 dNTP，

[0532] 多重重叠 - 延伸引物混合物，浓度如表 10 所示，

[0533] 2 微升 One step RT-PCR 酶混合物，

[0534] 1U/ 微升 RNA 酶抑制剂 (RNasin，Promega，Madison USA，cat.No N2515)，以及

[0535] 50ng 总 RNA。

[0536] 所使用的多重重叠 - 延伸引物混合物包含的引物如表 10 所示。

[0537] 表 10

[0538]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
α1	400 nM	80	atatatatgcggccgcttaATGGGCTGCCTCGGGAA
α2	80 nM	81	gccatggcgcgccaatagctagccTTAGAGCAGCTCGTACTGACGAA
β1	80 nM	82	tattggcgcgccatggccATGAGTGAGCTTGACCAGTTACG
β2	80 nM	83	ggtacctaataataatcgatcgcTTAGTTCCAGATCTTGAGGAAGCT
γ1	80 nM	84	cgatcgattattattaggtaccccATGCCAGTAATCAATATTGAGGAC
γ2	400 nM	85	ggaggcgctcgagTTATGAAATCACACAGCCTCCTTTG

[0539] 大写序列相应于基因特异区

[0540] 循环条件如下：

[0541] 逆转录：30 分钟 42 摄氏度

[0542] 聚合酶激活：15 分钟 95 摄氏度（使逆转录酶失活，激活 Taq 聚合酶）

[0543] PCR 反应：

[0544] 变性 30 秒 94 摄氏度

[0545] 退火 30 秒 49 摄氏度

[0546] 延伸 3 分钟 72 摄氏度

[0547] 共 45 个循环

[0548] 最终的延伸 10 分钟 72 摄氏度

[0549] c. 扩增 PCR

[0550] 1 微升的多重重叠 - 延伸 RT-PCR 反应产物进行一次额外的 PCR 扩增步骤 (Biotaq kit, Bioline, UK cat.No BIO-21040)，基本上按照生产商的建议进行。使用的引物 α 1 和 γ 2 在表 10 中示出，对应于 SEQ ID NO 80 和 85。反应的总体积是 50 微升。

[0551] 循环条件如下：

[0552] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0553] 退火 30 秒 53 摄氏度

[0554] 延伸 3 分钟 72 摄氏度

[0555] 共 25 个循环

[0556] 最终的延伸 10 分钟 72 摄氏度

[0557] 反应产物中取 5 微升用 1％琼脂糖凝胶电泳进行分析，使用溴化乙锭检测。产物的大小预期是 2215bp。但是可能存在其他的未连接的亚基片段。这些片段的预期大小是 Gα：1228bp，Gβ：1064bp 以及 Gγ：262bp。

[0558] d. 克隆

[0559] 剩余的反应产物进行 1％琼脂糖凝胶电泳，使用溴化乙锭检测，将 2215bp 的重叠 - 延伸片段从琼脂糖凝胶上切下来，使用 Qiaex II 试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany, cat.No 20051) 纯化，使用 Invitrogen 的 TOPO TA 克隆试剂盒 (Invitrogen ca t.No 45-0641, Carlsbad, CA, USA) 插入 pCR2.1-TOPO 中。

[0560] 此外，可以在每个亚基编码序列的上游插入启动子序列或者核糖体结合位点，目的是促进它们从载体中的表达。重叠 - 延伸序列中存在的限制位点适用于这种插入。

[0561] e. 一般考虑

[0562] 如上面描述的，编码组成杂聚蛋白的亚基的序列的连接可以用于大部分其中单个亚基序列已知的杂聚蛋白。而且，在使用能够扩增出某个特定家族中的几个成员（例如所有的G蛋白α、β和γ亚基）的多重重叠-延伸引物混合物时，可以鉴定和连接来自一种细胞类型的任意亚基组合，而不需要首先分析哪种细胞类型表达哪个家族成员。例如，以上的实施例可如此进行，即使用来自分离的单个肝细胞的模板，使用能够扩增并且连接所有16个Gα亚基和5个Gβ亚基和12个Gγ亚基的多重重叠-延伸引物混合物，由此确定每个细胞中表达哪种亚基组合，并同时分离出该亚基组合的编码序列。此外，使用简并引物甚至还可以鉴定出某个特定家族的新成员。

[0563] 在使用本发明的多重重叠-延伸RT-PCR技术连接杂聚蛋白的亚基时应当考虑连接产物的整体大小，因为DNA聚合酶能够扩增的碱基对的数目有限制。来自New England Biolabs,MA,USA的Deep Vent聚合酶是一种能够产生非常长（长度可达14000bp）的引物延伸的DNA聚合酶。理论上，14000bp可以编码平均分子量为510kDa的蛋白质。因此，使用本发明的方法应当可以分离非常大的杂聚蛋白的编码序列。使用DNA聚合酶混合物甚至可能进一步提高延伸能力。

[0564] 实施例9：前导引物的设计

[0565] 在该实施例中，设计多重引物组，其中引物引发的位置在人抗体重链和κ轻链家族的前导区的编码序列中。

[0566] 在使用与可变区家族的N端编码序列退火的引物时，可能会观察到一定程度的交叉杂交。一个特定基因家族序列的引物可以与另一个基因家族的cDNA杂交，这在很多情况下导致新序列的产生。在治疗中使用时，从这些序列产生的蛋白质具有潜在的免疫原性。一般地，这些新型序列可以用PCR进行校正，或者从文库中除去。

[0567] 另外一个解决问题的办法是定位在抗体可变区前导肽区域的编码序列中的引发位点。由于交叉引发产生的杂种序列会在抗体的细胞内加工过程中被去除，在抗体的细胞内加工过程中含有潜在免疫原性序列的肽前导序列会被切除，因此不会在分泌的抗体产物中出现。前面用于抗体克隆的前导引物组，已经被定位在前导区编码序列的5′端，其使得能够直接进行真核表达(Campbell M.J.等人，1992Mol Immunol.29,193-203)。遗憾地是，真核的前导肽几乎不适于进行原核的加工。

[0568] 在细菌中操作核酸序列的简单性使其对于开发克隆系统是具有吸引力的，在所述克隆系统中序列可能在细菌载体和其他宿主生物体的载体之间穿梭。因此，在本实施例中设计了多重引物组，其中引发的位置在前导区编码序列中，这使得在真核和原核表达系统中抗体或者抗体片段都能进行有功能的表达。

[0569] 对于任何前导肽C末端区域的信号肽酶切割的序列要求似乎对于原核和真核系统来说非常相似(Nielsen H.等人，1997Protein Eng.10,1-6.)。而且，可以得出的结论是前导肽C末端区域的突变可能对于N末端区域的构象具有很小的影响，反之亦然。因此，预计C末端序列可以在物种间转移而不会有功能的丧失。

[0570] 本实施例中引物设计的基本理念是将引发位点置于前导肽C末端区域的最后6个密码子。引发位点上游的前导区编码序列的剩余部分（大约50个核苷酸）应当由与宿主物种相匹配的适当的表达载体提供。例如适宜在革兰氏阴性细菌中表达的载体可以被设计成具有部分或者全长的PelB前导序列。对于在真核生物中表达抗体，适宜用具有部分天然

抗体重链前导区编码序列和部分可变 κ 链前导区编码序列的载体。不论表达系统如何，前导区的最后 6 个氨基酸都来自包含在插入到载体中的核酸片段之中的内源抗体前导区编码序列。

[0571] 设计以下的引物序列，用于多重重叠－延伸 RT-PCR（表 11）。但是重叠尾巴（小写字母）可以很容易地重新设计，以在通过连接方法或者重组过程进行的连接中起作用。

[0572] 表 11

[0573]

引物名称	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
V_{HL}	86	tattcccagcggccgccGCCACAGGTGCCCACTC
	87	tattcccagcggccgccCCTTCMTGGGTCTTGTC
	88	tattcccagcggccgccTTARAAGGTGTCCAGTGT
	89	tattcccagcggccgccCCCAGATGGGTCCTG
	90	tattcccagcggccgccCTCCAAGGAGTCTGTTC
	91	tattcccagcggccgccCCATGGGGTGTCCTGTCA
	92	tattcccagcggccgccGCAACAGGTGCCCACT
$C_{H(IgG)}$	9	GACSGATGGGCCCTTGGTGG
$V_{LκL}$	93	ggcggccgctgggaatagctagcgYTCCCAGGTGCCAGATG
	94	ggcggccgctgggaatagctagcgGTCCCTGGATCCAGTG
	95	ggcggccgctgggaatagctagcgCTCCCAGATACCACCGGA
	96	ggcggccgctgggaatagctagcgATCTCTGGTGCCTAC
	97	ggcggccgctgggaatagctagcgATCTCTGATACCAGGGCA
	98	ggcggccgctgggaatagctagcgGTTCCAGCCTCCAGGGGT
$C_{Lκ}$	99	atatatatggcgcgccTTAACACTCTCCCCTGTTGAA

[0574] M = A/T，R = A/G，Y = C/T，S = G/C. 大写序列相应于基因特异区

[0575] 应当注意，与前面的实施例中描述的引物相比，在该引物设计中的限制位点被略微改动。因此，重链和轻链可变区编码序列之间的重叠序列包含了一个 NotI 限制位点和一个 NheI 限制位点，在恒定区 κ 引物（$C_{Lκ}$）中前面的 NotI 位点已经被 AscI 位点替换。在设计额外 PCR 扩增的引物时，后面的改动当然是应当遵守的。而且，图 11 所示克隆载体中的 NotI 位点应当变为 AscI 位点，而在启动子单元中的 AscI 位点应当变为 NotI 位点。

[0576] 前导区切割的功能性已经使用由 Danish Technical University 的 CBS 提供的 SignalP 进行了计算机检测。

[0577] 对于可变重链进行检测的嵌合前导肽由具有下列组成的核酸序列编码：截短的 PelB 序列、C 末端 NotI 位点（SEQ ID NO 100：ATG AAA TAT CTT CTA CCA ACA GCG GCA GCT GGA TTA TTG GCG GCC GCC）以及与 NotI 位点相连的、编码天然 V_{HL} 家族成员的 6 个 C 末端氨基酸的 SEQ ID NO 86 到 92 之一的基因特异部分。使用 SignalP 程序，所有的七个序列都显示了在革兰氏阴性细菌中的信号肽切割。

[0578] 对于可变轻链进行检测的嵌合前导肽由具有下列组成的核酸序列编码：截短的 PelB 序列、C 末端 NheI 位点（SEQ ID NO 101：ATG AAA TAT TTG CTA CCA ACA GCG GCA GCT GGA TTA TTG TTA CTA GCG）以及与 NheI 位点相连的、编码天然 $V_{LκL}$ 家族成员的 6 个 C 末

端氨基酸的 SEQ ID NO 93 到 98 之一的基因特异部分。使用 SignalP 程序，所有的六个序列都显示了在革兰氏阴性细菌中的信号肽切割。

[0579] SEQ ID NO 100 和 101 的序列适于构建与图 11 中图解说明的载体类似的细菌表达载体，其中图 11 中图解的 AscI 位点被 SEQ ID NO 100 替代，NheI 位点被 SEQ ID NO 101 替代。而且，图 11 中图解的 NotI 位点需要被 AscI 位点替代。

[0580] 哺乳动物表达载体（图 9）同样可以重新设计，以使得在可变区编码片段从刚刚描述的细菌载体中转移到哺乳动物细胞中以后在那里表达。

[0581] 实施例 10：一管多重 RT-PCR 以及通过连接方法进行连接

[0582] 本实施例阐明了包含连接的重链可变区和轻链可变区编码序列的关联对如何使用连接而不是重叠 - 延伸 PCR 在单管反应中产生，以达到连接的目的。

[0583] a. 多重 RT-PCR

[0584] 使用有限稀释法将内部制备的、表达具有针对破伤风类毒素特异性的 Fab 分子的细胞系进行分配，以获得单个 PCR 管中有单个细胞。

[0585] 除了单个细胞以外，每个 PCR 管中含有总体积为 20 微升的以下试剂：

[0586] 1 x Phusion HF 缓冲液，

[0587] 终浓度各为 200μM 的每种 dNTP，

[0588] 多重引物混合物，浓度如表 12 所示。

[0589] 0.8 U Phusion 聚合酶 (FinnZymes Cat.No F-530-L)，

[0590] 1 微升 Sensiscript 逆转录酶 (Qiagen Cat.No 205213)，

[0591] 20U RNA 酶抑制剂

[0592] 表 12

[0593]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)'
V_H	每种 200nM	102	tgttgttctagatgaaggcgcgccCAGRTGCAGCTGGTGCART
		103	tgttgttctagatgaaggcgcgccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
		104	tgttgttctagatgaaggcgcgccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
		105	tgttgttctagatgaaggcgcgccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
		106	tgttgttctagatgaaggcgcgccCAGGTGCAGCTACAGCAGT
		107	tgttgttctagatgaaggcgcgccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
		108	tgttgttctagatgaaggcgcgccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
		109	tgttgttctagatgaaggcgcgccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
J_H	每种 200nM	61	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTGCC
		62	ggaggcgctcGAGACGGTGACCATTGTCCC
		63	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTTCC
		64	ggaggcgctcGAGACGGTGACCGTGGTCCC
V_L	每种 200nM	110	aacaacactagtgataggctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
		111	aacaacactagtgataggctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
		112	aacaacactagtgataggctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
		113	aacaacactagtgataggctagccGATATTGTGATGACCCACACT
		114	aacaacactagtgataggctagccGAAACGACACTCACGCAGT
		115	aacaacactagtgataggctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
$C_{L\kappa}$	200 nM	16	atatatatgcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTG

[0594]

[0595] W = A/T, R = A/G, S = G/C. 大写序列相应于基因特异区

[0596] 循环条件如下：

[0597] 逆转录：30 分钟 37 摄氏度

[0598] 变性 30 秒 98 摄氏度

[0599] 变性 10 秒 98 摄氏度

[0600] 退火 30 秒 55 摄氏度

[0601] 延伸 30 秒 72 摄氏度

[0602] 上述最后三个步骤共进行 40 个循环

[0603] 最终的延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0604] b. 通过连接方法进行连接

[0605] 为了通过连接方法进行连接，直接向多重 RT-PCR 的反应产物中加入限制性酶和连接酶。或者在该添加之前纯化多重 RT-PCR 以去除混合物中的聚合酶。

[0606] 向每个管中加入总体积为 40 微升的以下试剂：

[0607] 1 x NEBII 缓冲液，

[0608] 1mM ATP，

[0609] 50 U XbaI(New England Biolabs Cat.No R0145L)，

[0610] 25 U SpeI(New England Biolabs Cat.No R0133S),

[0611] 100 微克 / 毫升 BSA,

[0612] 400U T4D NA 连接酶 (New England Biolabs Cat.No M0202S)

[0613] 反应在 16 摄氏度孵育过夜。

[0614] 通过凝胶电泳并切下来大约 1000bp 的条带,而将连接的重链和轻链可变区编码序列从反应中纯化出来。

[0615] 在本方法的另一种形式中,在多重引物组中使用 C_H 引物而不是 J_H 引物进行多重 RT-PCR 反应。该引物可以装备克隆尾巴,其可以使重链可变区按照阅读框插入到表达载体中,或者用表 5 中的引物进行半嵌套 PCR。

[0616] 实施例 11 :具有针对破伤风类毒素特异性的重组多克隆免疫球蛋白的制备

[0617] 在该实施例中,从用破伤风类毒素 (TT) 免疫的单个供体 (TT03) 中获得的结果用于阐明图 10 的流程图中概述的步骤。

[0618] a. 供体

[0619] 以前已经用破伤风疫苗免疫的八个供体使用破伤风疫苗 (Statens Serum Institut, Denmark) 进行加强免疫。分别给 8 个供体编号 TT01 到 TT08。破伤风疫苗加强免疫后 6 天从供体上抽取大约 200 毫升的血液样本,收集到含有抗凝剂的管中。

[0620] 供体健康并且没有慢性感染、自体免疫疾病或者接受任何免疫抑制性药物治疗,并且他们在最近 3 个月内没有任何的疫苗接种。

[0621] a-1. 监测供体的质量

[0622] 在免疫接种时对供体进行事先采血。十四天后进行另一次采血,以测定血清滴度。所有的供体的反应都是 TT 滴度增加。还设立 ELISPOT 检测以测量 TT 特异性浆细胞的频率。对于 ELISPOT 可以使用不同的细胞级分,例如第六天的主要血液 (major bleed)、PBMC 级分、磁性分选的级分或者 FACS 分选的级分。可以使用 ELISPOT 对供体材料进行评价,确定最佳的反应者,然后他们可继续进行分选步骤和多重重叠 - 延伸 RT-PCR。对于供体 TT03,使用 CD19+ 细胞级分进行 ELISPOT(参见 c 部分)。根据 Lakew 的描述 (Lakew, M. 等人, 1997. J. Immunol. Methods 203, 193-198),但略有改动,进行 ELISPOT 检测。PBMC 级分中 TT 特异性浆细胞的频率计算为 0.021%。

[0623] b. 外周血单核细胞 (PBMC) 的制备

[0624] 使用 Lymphoprep(Axis-Shield PoC AS, Norway, prod.No 1001967),根据生产商的建议从血液样本中分离 PBMC。简而言之,血液用 PBS 进行 1 ： 1 稀释,将悬液以 2 ： 1 的比例铺在 Lymphoprep 上。于 25 摄氏度、800g 将小管离心 20 分钟,然后收集白色的中间相条带。用含有 2mM EDTA 的 PBS 漂洗细胞。

[0625] 从取自供体 TT03 的 200 毫升全血中得到了大约 2×10^8 个 PBMC。

[0626] c. B 细胞的富集

[0627] 使用以下的步骤用磁性珠细胞分选法富集 PBMC 中的 B 细胞谱系 (CD19+ 细胞)

[0628] 使用抗 -CD19-FITC(Becton Dickenson, NJ, USA, cat.No 345776) 染色分离的 PBMC。所有步骤在 4 摄氏度下于暗处进行。使用 10 微升抗 -CD19-FITC/1×10^6 个细胞〔使用 M- 缓冲液 (PBS, pH 7.2, 0.5% BSA, 2mM EDTA),对于每 1×10^6 个细胞体积为 100 微升〕进行染色。PBMC 中的 B 细胞谱系会被染色。细胞孵育 20 分钟,之后用 M- 缓冲液进行两次

漂洗。抗 -CD19-FITC 染色的细胞使用缀合抗 FITC 的微珠进行磁性标记，每 1×10^6 个细胞使用 10 微升抗 FITC 磁珠 (Miltenyi Biotec，Gladbach，Germany，cat.No 130-042-401)，体积是每 1×10^6 个细胞使用 100 微升 M- 缓冲液。孵育 15 分钟后用 M- 缓冲液漂洗一次。细胞用脱气的 M- 缓冲液重悬。

[0629] 使用脱气的 M- 缓冲液根据生产商的说明预先处理 MACSLS 柱 (Miltenyi Biotec，Gladbach，Germany，cat.No130-042-401)。将用抗 -CD 19-FITC 染色并且用抗 FITC- 磁性珠标记的细胞悬液加到柱上，使其流过。染色并标记的细胞 (CD 19+) 被保留在围绕柱的磁场中，而没有被染色的细胞 (CD 19-) 流过柱。使用脱气的 M- 缓冲液漂洗柱。去除磁场并收集 CD19+ 细胞。

[0630] 使用抗 -CD19-FITC、抗 -CD38-PE 和抗 -CD45-PerCP 对来自 TT03 的起始材料 (PBMC)、未标记的级分和 CD19 标记的级分进行分析性染色。这表明磁性细胞分选产生两个与 PBMC 级分相比不同的级分。CD19 阴性细胞在 B 图中显示，CD19 阳性细胞在 C 图中显示。在 PBMC 级分中，11％的细胞是 CD19+，对于 TT03，CD19 阳性细胞的纯化程度达到 R1 的 99.5％ (图 14C 中的散射阈值 (scatter gate))。

[0631] 如图 14C 中所见，抗 CD38/ 抗 CD45 图显示了相当于 R1 的 1.1％的独特的 CD38hi、CD45in 细胞群 (R2)。该细胞群含有浆细胞，并在后面的分选步骤中收集。这表明，在 PBMC 级分中 0.12％的细胞对应的是浆细胞。

[0632] CD19 阳性细胞级分在 FCS(Invitrogen，Cat.No.16000-044)+10％ DMSO(Sigma，Cat.No.D2650) 中冷冻以用于下面的分选。对已经被冷冻的 MACS 纯化后的细胞进行与图 14 中所见类似的分析以确保细胞完好无损 (图 15)。在图 15 中观察到的染色样式与图 14 中观察到的相同，尽管观察到稍微更宽的染色强度。通过分选收集的细胞是 R1 和 R2 的亚组。这对应于 MACS 纯化的细胞的大约 1.1％。

[0633] d. 浆细胞的分选

[0634] 将冷冻的 MACS 柱洗脱物融化，离心，并且用 FACS 缓冲液 (PBS，pH 7.2，2％ BSA) 重悬，浓度为 1×10^6 个细胞 /60 微升 FACS 缓冲液。加入抗 -CD19-FITC(Becton Dickenson，NJ，USA，cat.No345776)(10 微升 /10^6 细胞)、抗 -CD38-PE(Becton Dickenson，NJ，USA，cat.No 555460)(10 微升 /10^6 细胞) 和抗 -CD45-PerCP(Becton

[0635] Dickenson，NJ，USA，cat.No 345809)(20 微升 /10^6 细胞)，将混合物在 4 摄氏度下于暗处孵育 20 分钟，之后漂洗两次，用 FACS 缓冲液重悬。

[0636] 使用荧光激活细胞分选 (FACS) 对细胞进行分选，使用以下的门控参数 ：

[0637] 1. 前向散射和侧向散射，目的是保留包括成浆细胞和浆细胞在内的淋巴细胞和单核细胞，以及避免死细胞和具有非常高的侧向散射的细胞，其可能是团聚体或者粒细胞。

[0638] 2.CD19 阳性并且 CD38 表达水平提高 (CD38hi) 的细胞。这主要只是对 CD38 的门控，因为 PBMC 已经在针对 CD19 表达的 MACS 柱上进行了富集，但是这会暴露出任何污染物。

[0639] 3.CD45 中间阳性细胞。所有的淋巴细胞都表达 CD45。但是，与早期淋巴细胞分化阶段相比，浆细胞下调它们的 CD45 表达。因此对 CD45 进行门控时可以得到不连续的对应于浆细胞的细胞群。

[0640] 经过 FACS 分选的来自供体 TT03 的细胞被收集为两个门 P2 和 P1 的亚组 (分别是图 16A 和 16B)。细胞是 CD38hi(FL2-A)、CD45in(FL3-A) 和 CD19+，后者是由于 MACS

纯化而产生的。简而言之，细胞成批收集、计数并且用含有 10％ FCS(Invitrogen Cat. No. 16000-044)、100 单位 / 毫升的青霉素 - 链霉素 (Invitrogen, cat. No. 15140-122)、2mM L- 谷氨酰胺 (cat No. 25030-024) 的 RPMI(Invitrogen,Cat No. 21875-034) 稀释。然后将细胞分配到 50 块 96 孔 PCR 平板 (ABgene, cat. No. AB-0800) 中，每孔 5 微升培养基中含有一个细胞。密封平板并且立即冷冻，储存以用于后面的 RT-PCR 分析。

[0641] e. 免疫球蛋白可变区编码序列的关联对的连接

[0642] 多重重叠 - 延伸 RT-PCR 技术应用于来自供体 TT03 的单个细胞，这样获得了转录后的抗破伤风类毒素重链可变区和轻链可变区的编码序列的关联连接。

[0643] e-1. 单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR

[0644] 使用 Qiagen One-Step RT-PCR 试剂盒 (Qiagen cat. No210212, Hilden, Germany) 进行多重重叠 - 延伸 RT-PCR，基本根据生产商的建议。将 50 块每孔含有大约单个细胞的冷冻的 96 孔平板从冰箱中取出，在孔中没有冰晶时立即向每个孔中加入 15 微升的 RT-PCR 反应混合物。

[0645] RT-PCR 反应混合物含有总体积是 20 微升的以下试剂：

[0646] 1 x One-Step RT-PCR 缓冲液，

[0647] 终浓度各是 400 μ M 的每种 dNTP，

[0648] 多重重叠 - 延伸引物混合物，浓度如表 13 中所示，

[0649] 0.8 微升 One-step RT-PCR 酶混合物，以及

[0650] 20U RNA 酶抑制剂 (RNasin, Promega, Madison USA, cat. No N2515)。

[0651] 多重重叠 - 延伸引物混合物的组成在表 13 中示出。

[0652] 表 13

[0653]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列 (5' 到 3' 方向)
V_H	每种 40nM	116	tattcccatggcgcgccCAGRTGCAGCTGGTGCART
		117	tattcccatggcgcgccSAGGTCCAGCTGGTRCAGT
		118	tattcccatggcgcgccCAGRTCACCTTGAAGGAGT
		119	tattcccatggcgcgccSAGGTGCAGCTGGTGGAG
		120	tattcccatggcgcgccCAGGTGCAGCTACAGCAGT
		121	tattcccatggcgcgccCAGSTGCAGCTGCAGGAGT
		122	tattcccatggcgcgccGARGTGCAGCTGGTGCAGT
		123	tattcccatggcgcgccCAGGTACAGCTGCAGCAGTC
$C_{H(IgG)}$	200 nM	9	GACSGATGGGCCCTTGGTGG
V_L	每种 40nM	124	ggcgcgccatgggaatagctagccGACATCCAGWTGACCCAGTCT
		125	ggcgcgccatgggaatagctagccGATGTTGTGATGACTCAGTCT
		126	ggcgcgccatgggaatagctagccGAAATTGTGWTGACRCAGTCT
		127	ggcgcgccatgggaatagctagccGATATTGTGATGACCCACACT
		128	ggcgcgccatgggaatagctagccGAAACGACACTCACGCAGT
		129	ggcgcgccatgggaatagctagccGAAATTGTGCTGACTCAGTCT
$C_{L\kappa}$	200 nM	130	atatatatgcggccgcTTAACACTCTCCCCTGTTGAA

[0654]

[0655] W = A/T, S = G/C, R = A/G. 大写序列相应于基因特异区

[0656] 循环条件如下：

[0657] 逆转录：30 分钟 55 摄氏度

[0658] 聚合酶激活：15 分钟 95 摄氏度（使逆转录酶失活，激活 Taq 聚合酶）

[0659] PCR 反应：

[0660] 变性 30 秒 94 摄氏度

[0661] 退火 30 秒 52 摄氏度

[0662] 延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0663] 共 35 个循环

[0664] 最终的延伸 10 分钟 72 摄氏度

[0665] e-2. 额外的扩增

[0666] 来自每个样品的 1 微升多重重叠 - 延伸 RT-PCR 反应产物进行半嵌套 PCR(Biotaq kit, Bioline, UK cat.No BIO-21040)，基本按照生产商的建议，使用 96 孔 PCR 平板 (ABgene, cat.No.AB-0800) 进行。每个反应的总体积是 50 微升，含有终浓度如下的各物质：1×Biotaq 缓冲液，200μM 每种 dNTP，2mM 氯化镁，1.25U Bio Taq 聚合酶和表 14 中显示的引物。

[0667] 表 14

[0668]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向) 3'
J_H	每种 200nM	61	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTGCC
		62	ggaggcgctcGAGACGGTGACCATTGTCCC
		63	ggaggcgctcGAGACGGTGACCAGGGTTCC
		64	ggaggcgctcGAGACGGTGACCGTGGTCCC
$C_{L\kappa}$	200 nM	21	accgcctccaccggcggccgcttaTTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT

[0669] 大写序列相应于基因特异区

[0670] 循环条件如下：

[0671] 变性 30 秒 95 摄氏度

[0672] 退火 30 秒 55 摄氏度

[0673] 延伸 1.5 分钟 72 摄氏度

[0674] 共 30 个循环

[0675] 最终的延伸 5 分钟 72 摄氏度

[0676] 对 A 行中的孔 1-12 的样品取 10 微升进行 1.5％琼脂糖凝胶电泳分析，使用溴化乙锭显示，目的是证实多重重叠 - 延伸 RT-PCR 成功进行。预期的重叠 - 延伸片段大小大约是 1070bp（精确大小取决于可变区的长度）。图 17 显示了来自 8 块 96 孔板的样品。从 50 块 96 孔板来看，成功的重叠 - 延伸 RT-PCR 片段的平均数目估计是每块板 8 个。因此，成功的重叠 - 延伸 RT-PCR 片段的总数估计是大约 400 个。

[0677] 从来自同一个供体的、在 96 孔板上进行的所有反应中取 10 微升，合并于单个管

中。接下来取一份具有 200 微升汇集的 PCR 产物的等分试样使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen cat.No.28106,Hilden,Germany),根据生产商的步骤进行纯化,洗脱使用 60 微升的 EB 缓冲液。纯化的重叠 PCR 产物的汇集物使用 XhoI 和 NotI 消化,接下来使用制备型 1%琼脂糖凝胶电泳进行纯化 ;从琼脂糖凝胶中切下重叠 - 延伸片段,并使用 Qiaex II 试剂盒 (Qiagen cat.No20051,Hilden,Germany) 纯化。

[0678] f. 关联 Fab 表达文库

[0679] 通过两步连接过程制备 Fab 表达文库。开始将以上描述的消化后的重叠 - 延伸片段汇集物连接到 XhoI/NotI 消化的大肠杆菌载体 JSK301(图 11) 中。接下来将连接反应的产物根据生产商的说明转化入电感受态的大肠杆菌细胞 (XL1-Blue 电穿孔感受态, Stratagen, cat.No.200228, La Jolla, USA)。转化后的大肠杆菌细胞涂布于含有 100 微克 / 毫升羧苄青霉素的 2×YT 琼脂上。使用对应于来自许多独立菌落的大约 10^{10}-10^{11} 个细胞 (超过重叠 PCR 产物总数至少 5 倍) 的生物量作为起始材料,使用 Qiagen Plasmid preparation Maxi 试剂盒 (Qiagen cat.No.12163,Hilden,Germany) 进行质粒制备。为了使经克隆的关联连接的 VH 和 VL 编码序列能够表达 Fab,在第二个连接步骤中插入了原核启动子和前导序列盒。使用的双向启动子片段 (SEQ ID NO 321) 是通过 AscI/NheI 消化从亲本 JSK301 中提取的。纯化的质粒汇集物同样使用 AscI/NheI 限制性核酸内切酶消化,并根据前面的描述使用凝胶纯化。接下来将纯化的片段进行连接,并且转化入电感受态的大肠杆菌细胞 (TG1, Stratagene, cat.No.200123, La Jolla, USA),转化后的大肠杆菌细胞涂布于含有 100 微克 / 毫升羧苄青霉素和 1%葡萄糖 (glycose) 的 2×YT 琼脂上。Fab 表达文库的制备过程在图 12 中概述。

[0680] g. 克隆的筛选

[0681] 通过抗原特异性 ELISA 检测就 TT 抗原的结合对表达 Fab 的克隆进行筛选。

[0682] g-1. 母平板的制备和 Fab 的表达

[0683] TG1 细胞的筛选出的单菌落,每个都携带来自根据部分 (f) 中的描述产生的文库中的关联 Fab 表达载体,将单个菌落挑到 96 孔板的单孔中,孔内含有 2 x YT/100 微克 / 毫升 Carb/1%葡萄糖。平板于 37 摄氏度在轻微振荡下孵育过夜。使用 96 针移样器,将四个 96 孔平板合并在一个 384 孔平板的孔中,其孔含有 2x YT/100 微克 / 毫升 Carb/1%葡萄糖。384 孔的平板在 37 摄氏度孵育一天。这些平板被称为母平板,加入甘油至终浓度为 15%后储存于 -80 摄氏度。

[0684] 使用母平板和 96 针移样器接种含有 2 x YT/100 微克 / 毫升 Carb/1%葡萄糖的 384 孔 DeepWell 平板。密封这些平板并在 37 摄氏度下振荡孵育 2-3 小时。

[0685] 加入等体积的 2 x YT/100μg/ml Carb/0.2mM IPTG,使 IPTG 的终浓度为 0.1mM,以诱导 Fab 的表达。密封平板并在 30 摄氏度下振荡过夜。第二天,用 ELISA 就 TT 抗原结合特异性对含有 Fab 的上清液进行分析。

[0686] g-2.ELISA 分析

[0687] 384 孔的 ELISA 平板 (Corning Inc.,Corning,NY,USA,cat.No 3700) 用在 PBS 中稀释至终浓度为 1 微克 / 毫升的破伤风类毒素 (TT) 抗原在 4 摄氏度包被过夜,每孔 25 微升。加入 2% M-PBS-T(2%脱脂奶粉,PBS 中,0.05% Tween 20) 于室温封闭孔中多余的结合位点 1 小时。用 PBS-T(PBS,0.05% Tween 20) 漂洗孔两次。

[0688] 来自部分 (g-1) 的含有 Fab 的细菌上清液用 2% M-PBS-T 作 1 ： 2 稀释，转移到 ELISA 孔中，每个样品再做一个平行。室温下孵育 1 小时。孔用 PBS-T 漂洗 4 次。向孔中加入用 2% M-PBS-T 作 1 ： 10000 稀释的山羊抗人 Fab/HRP(Sigma,St.Louis,MO,USA,cat.No A0293)。室温下孵育 1 小时。孔用 PBS-T 漂洗 4 次。加入 TMB Plus(KemEnTec,Copenhagen, Denmark, cat.No 4390L) 底物，孵育 5-15 分钟。加入等体积的 1M 硫酸终止反应。用分光光度计 (Multiscan Ascent, Labsystems, Franklin, USA) 于 450nm 进行分析。

[0689] 接下来从原来的母平板中找回对应于 TT 抗原结合性克隆的原始细菌克隆。从分离的抗原阳性 Fab 克隆中制备质粒 DNA，产生 TT 抗原结合性克隆的关联 Fab 表达亚文库。

[0690] 克隆的一个亚组进一步使用抗 κ ELISA 检测进行分析，目的是获得抗原结合性克隆的数目与 Fab 表达性克隆的数目之间的关系。抗 κ 检测一般如与 TT 检测相同的方式进行，区别在于孔用采用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 作 1 ： 1000 稀释的山羊抗人 κ 抗体 (Caltag, California, USA, Cat.No H16000) 包被。

[0691] g-3. 筛选结果

[0692] 根据 g-2 中描述的步骤，使用 ELISA 检测就与抗 κ 抗体和 TT 的反应性对来自四个 384 孔平板的克隆进行筛选。得到的结果总结于表 15 到 19。抗 κ ELISA 的结果提供了有关在指定克隆中 Fab 片段表达的信息，而 TT ELISA 的结果提供了有关 Fab 片段功能性的信息。

[0693] 表 15 ELISA 筛选，抗 κ 包被 (总计 1440 克隆)

[0694]

板编号	2× 背景	3× 背景	4× 背景
G050	105	79	73
G051	93	79	68
G052	120	96	73
G053	164	141	125
总计	482	395	339
% Fab 阳性克隆	34%	27%	24%

[0695] 在所分析的 1440 个单独克隆中，482 个或者 34％表现出抗 κ 反应性，其反应水平超过背景反应性水平的两倍，395 个克隆或者 27％的克隆表现出的反应性高于 3 倍背景等等。

[0696] 用 ELISA 对相同的克隆分析其 TT 抗原反应性，结果在下面的表 16 中给出 ：

[0697] 表 16 ELISA 筛选，TT 包被（总计 1440 克隆）

[0698]

板编号	2× 背景	3× 背景	4× 背景
G050	26	19	17
G051	24	18	15
G052	34	31	24
G053	46	36	30
总计	130	104	86
% TT 阳性克隆	9.0%	7.2%	6.1%

[0699] 从这个表格中可以看出9.0%的克隆与TT的反应性是背景的两倍（背景水平定义为通过具有不相关特异性的Fab片段的反应性而得到的信号），104个克隆以3倍背景水平进行反应（7.2%）等等。

[0700] Fab 阳性的克隆中（共 482 个克隆），大约 27%的克隆（130/482）与 TT 的反应性是背景水平的两倍。在其他背景水平下，这个水平没有显著改变。

[0701] 对 6 个 384 孔平板就具有 TT 反应性的克隆进行筛选。与抗原产生反应性的克隆的数目在表 17 中给出。没有对这些平板进行抗 κ ELISA。

[0702] 表 17 ELISA 筛选，TT 包被（总计 2160 克隆）

[0703]

板编号	2× 背景	3× 背景	4× 背景
G054	82	65	52
G055	30	24	21
G056	25	23	21
G057	30	28	26
G058	24	21	19
G059	18	14	13
总计	209	175	151
% TT 阳性克隆	9.7%	8.1%	7,0%

[0704] 在平板 G054-G059 中 TT 阳性克隆的百分比与平板 G050-G053 中阳性克隆的百分比（表 16）相当。

[0705] 从所有就抗 TT 进行筛选的克隆中获得的结果（表 16 和 17）总结于表 18 中。

[0706] 表 18 所有筛选的克隆，TT 反应性克隆

[0707]

板	2× 背景	3× 背景	4× 背景
G050-G053	130	104	86
G054-G059	209	175	151
总计	339	279	237
占总的百分比 (3600)	9.4%	7.8%	6.6%

[0708] 总之，总共 339 个克隆显示了与 TT 的反应性，它们的反应性水平至少是背景水平的 2 倍（表 18）。这对应于所有经筛选的克隆的 9.4%。

[0709] 所有表现出与 TT 的反应性为 2 倍背景水平的阳性克隆从母平板接种于 96 孔的平板上，如前面所述。第二天，4000rpm 离心 15 分钟以收集细菌，沉淀用 0.8mM EDTA、0.4 x PBS、0.8 M NaCl 重悬，在冰上孵育 15 分钟。通过离心收集周质提取物，进一步分析克隆的反应性。这里我们显示了一个这样的平板 (G060) 与抗 κ（图 18）、卵清蛋白（无关抗原）（图 19）、TT（图 20）的反应性结果，以及使用溶液中的 10^{-7}M 浓度的 TT 抗原进行一步竞争检测的结果（图 21）。使用同样的周质提取物在相同稀释度下进行这些 ELISA 检测。

[0710] 大多数克隆表达 Fab 片段 (90/96)（图 13），没有克隆与卵清蛋白反应（图 19）。与固定化的 TT 的反应性被溶液中的 TT 降低或者完全抑制（图 21），表明这些克隆与 TT 有特异的反应。G060 平板中的克隆的反应性在表 19 中予以总结。

[0711] 表 19 G060 板总结（总计 96 个克隆）

[0712]

背景水平	抗 κ 阳性	TT 阳性
2×	94% (90/96)	74% (71/96)
3×	91% (87/96)	72% (69/96)
4×	84% (81/96)	69% (66/96)

[0713] H. 多样性分析和克隆核准

[0714] 从 47 个来自关联的 TT 抗原结合性 Fab 表达亚文库的克隆（来自平板 G060）中分离质粒并进行序列分析。可变重链编码序列使用与 P tac 启动子退火的引物 LSN-HCP：AGGAAACAGGAGATATACAT(SEQ ID No 131) 进行测序；轻链编码序列使用与 P lac 启动子退火的引物 LSN-LCP：TCGCCAAGGAGACAGTCATA(SEQ ID No 132) 进行测序。使用 Vector NTI 软件 (Informax，Frederick，MD，USA) 对序列数据进行分析。对得到的重链序列数据进行整理，得到从上游 AscI 限制位点的 5′ 1 个碱基到下游 XhoI 限制位点的 3′ 的序列。对轻

链序列数据进行整理，得到从上游 NheI 限制位点的第 2 个 5′ 碱基到最后一个编码可变链 C 末端赖氨酸的密码子“AAA”的 3′ 的序列。进行整理的目的是有利于进一步的分析例如每个 DNA 序列的翻译。

[0715] 通过将可变重链和轻链编码序列与 V-base 种系可变区序列数据库 (MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) 比较，对可变重链和轻链编码序列就种系基因使用进行分析。这样对于每一个序列确定出最为密切相关的种系等位基因，显示出来自 12 个不同的可变重链种系等位基因 (属于 VH 家族的 VH1 到 VH5) 以及 8 个不同的可变 κ 轻链种系等位基因 (属于 VKI、VKIII 和 VKIV) 的 V 基因库 (表 20)。

[0716] 另外，将可变基因序列翻译为蛋白质序列，使用 AlignX 软件 (Informax, Frederick, MD, USA) 对蛋白质序列进行比对，如图 22 和图 23 中的描绘。基于蛋白质序列的比对，可变链序列可以根据 V(D)J 重排事件划分为几个组，用 H 标示可变重链序列，用 L 标示可变 κ 链序列，之后是一个唯一的数字。在每一个重排组中，序列根据 CDR1、2 和 3 区域内的成熟基因型 (表 20 中的 M- 类型) 进行分类，按字母顺序用小写字母表示。7 个克隆具有早熟终止密码子，其中 6 个克隆是琥珀突变 (TAG)(克隆 IDg060:b12, d08, f06, c12, f03, c04)，1 个克隆是乳白突变 (TGA)(克隆 ID g060:h12)。这些密码子很有可能被大肠杆菌抑制从而产生有功能的 Fab 片段。这些克隆中四个是含有相似克隆的组的成员，使它们成为冗余克隆。需要对其他克隆进行分析以替换剩下的 3 个具有早熟终止密码子的克隆，因为它们是它们的组中唯一的成员。或者可以通过标准的分子生物学技术如 PCR 对序列进行校正，用一个适当的密码子替换终止密码子。

[0717] 对于可变重链和可变 κ 基因，47 个经分析的 V 区序列可以被分为 20 个独特的 V(D)J 重排组 (在表 20 中标示的“组”)。重排组中的四个可以进一步被分为 1 到 4 个成熟类型 (a 到 d)，得到 27 个独特的抗体编码序列 (表 12)。一般地，特异的重链重排组与特异的轻链重排组组合 (例如 H1 与 L1，H12 与 L24 等等)。而且，成熟类型在可变重链和可变轻链编码序列形成的对之内是匹配的 (例如 H4c 与 L13c 匹配)。这种在重排组和突变类型中配对的严紧性表明可变区编码序列的关联配对。

[0718] 但是重链重排组 H4 是一个例外。H4 与两个不同的轻链 L28 和 L13 配对。L13 对于 H4 是独特的，H4 包含成熟类型 a、b 和 c，其与 L13 的成熟类型相匹配。另一方面，还发现 L28 与重链组 H2 的单一成员配对。7 个 H4a 重链序列中有两个与重链 L13a 配对，7 个 H4a 重链序列中有 5 个与 L28a 配对。总之，这些观察结果提示在单个孔中存在多重重叠 - 延伸 RT-PCR 事件，其中两个产生 TT 特异性抗体的浆细胞的基因型组合是 H2-L28 与 H4a-L13a。由于实验是建立在浆细胞的有限稀释的基础之上，所以预期轻链和重链基因配对的罕见混杂事件例如 H2 和 H4a 与 L28 是会出现的。

[0719] 在来自相同组和相同成熟类型的可变重链和可变轻链编码序列的单个关联对之中的序列同一性至少是 90％，优选至少是 95％。例如来自组 H1 成熟类型 a 的 g060g03 和 g060a01。克隆 g060g03 对应于核酸 SEQ ID 对 168:215，其中可变重链编码序列对应于 SEQ ID NO168，可变轻链编码序列对应于 SEQ ID NO 215。克隆 g060a01 对应于核酸 SEQ ID 对 133:180。当 SEQ ID NO 168 与 SEQ ID NO 133(可变重链) 进行比对时，369 个碱基中有 4 个是不相同的，对于可变轻链 (SEQ ID NO 215 和 180)327 个碱基中有 8 个是不相同的，这对应于两个关联对 (g060g03 和 g060a01) 之间的序列同一性是 98.3％。但是在观察不同组

之间的序列同一性时，预计序列同一性不会高，原因是这是一个多克隆亚文库，需要有多样性。在这个特定的示例中，关联对之间最低的同一性是大约 40％（例如 g060b11 和 g060h11 的序列同一性是 39.5％）。

[0720] 本发明的一个实施方案是免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区编码序列的关联对的亚文库，其中可以从所述的文库中得到的免疫球蛋白能够与破伤风毒素反应或者与其结合。

[0721] 本发明的另一个实施方案是免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区编码序列的关联对的这种亚文库，包含的单个关联对与单个 SEQ ID 对具有至少 90％的序列同一致，所述的单个 SEQ ID 对选自由以下 SEQ ID 对组成的组 ：135:182，168:215，146:193，151:198，173:220，152:199，164:211，148:195，137:184，169:216，138:185，143:190，161:208，166:213，157:204，139:186，134:181，150:197，156:203，158:205，170:217，178:225，141:188 或者 144:191。

[0722]

表 20

	VH						Vkappa					
克隆 ID	类别	M－型	家族	种系	Seq nucl.	Seq prot.	类别	M－型	家族	种系	Seq nucl.	Seq prot.
g060a03	H1	b	VH1	DP-14	42135	136229	L1	b	VKI	DPK9	89182	183276
g060g03	H1	a	VH1	DP-14	75168	169262	L1	a	VKI	DPK9	122215	216309
g060a01	H1	a	VH1	DP-14	13340	134227	L1	a	VKI	DPK9	87180	181274
g060b12	H11	a	VH3	DP-77	52145	146239	L10	a	VKIII	DPK22	99192	193286
g060c03	H11	a	VH3	DP-77	53146	147240	L10	a	VKIII	DPK22	100193	194287
g060d08	H11	a	VH3	DP-77	61154	155248	L10	a	VKIII	DPK22	108201	202295
g060f06	H11	a	VH3	DP-77	69162	163256	L10	a	VKIII	DPK22	116209	210303
g060d04	H12	a	VH1	DP-10	58151	152245	L24	a	VKI	DPK4	105198	199292
g060h02	H12	a	VH1	DP-10	82175	176269	L24	a	VKI	DPK4	129222	223316
g060h10	H12	a	VH1	DP-10	84177	178271	L24	a	VKI	DPK4	131224	225318
g060g11	H12	b	VH1	DP-10	80173	174267	L24	b	VKI	DPK4	127220	221314
g060d05	H12	c	VH1	DP-10	59152	153246	L24	c	VKI	DPK4	106199	200293
g060f09	H12	d	VH1	DP-10	71164	165258	L24	d	VKI	DPK4	118211	212305
g060c07	H15	a	VH5	DP-73	55148	149242	L16	a	VKIII	DPK22	102195	196289
g060d11	H15	a	VH5	DP-73	62155	156249	L16	a	VKIII	DPK22	109202	203296
g060g02	H15	a	VH5	DP-73	74167	168261	L16	a	VKIII	DPK22	121214	215308
g060a09	H16	-	VH1	DP-73	44137	138231	L4	-	VKI	DPK9	91184	185278
g060g04	H17	a	VH4	DP-66	76169	170263	L3	a	VKI	DPK9	123216	217310
g060h04	H17	a	VH4	DP-66	83176	177270	L3	a	VKI	DPK9	130223	224317
g060a10	H18	a	VH2	VII-5	45138	139232	L21	a	VKI	L12a	92185	186279
g060h12	H18	a	VH2	VII-5	86179	180273	L21	a	VKI	L12a	133226	227320
g060b09	H19	a	VH2	VII-5	50143	144237	L23	a	VKI	DPK8	97190	191284
g060f10	H19	a	VH2	VII-5	72165	166259	L23	a	VKI	DPK8	119212	213306
g060f05	H2*	-	VH1	DP-88	68161	162255	L28*	a	VKIV	DPK24	115208	209302
g060f11	H21	a	VH3	DP-32	73166	167260	L31	a	VKI	DPK9	120213	214307
g060g12	H21	a	VH3	DP-32	81174	175268	L31	a	VKI	DPK9	128221	222315

[0723]

	VH						Vkappa				
克隆 ID	类别	M-型	家族	种系	Seq nucl.	Seq prot.	类别	M-型	家族	种系	Seq nucl.	Seq prot.
g060f01	H10	-	VH3	COS-8	64157	158251	L7	-	VKI	DPK8	111204	205298
g060a11	H23	a	VH3	DP-77	46139	140233	L5	a	VKI	DPK9	93186	187280
g060c12	H23	b	VH3	DP-77	56149	150243	L5	b	VKI	DPK9	103196	197290
g060f03	H24	-	VH3	DP-38	66159	160253	L20	-	VKI	DPK8	113206	207300
g060a02	H3	-	VH3	DP-77	41134	135228	L9	-	VKI	O16	88181	182275
g060d03	H4	a	VH1	DP-88	57150	151244	L13	a	VKIII	DPK22	104197	198291
g060f08	H4	a	VH1	DP-88	70163	164257	L13	a	VKIII	DPK22	117210	211304
g060b05	H4*	a	VH1	DP-88	47140	141234	L28*	a	VKIV	DPK24	94187	188281
g060b07	H4*	a	VH1	DP-88	49142	143236	L28*	a	VKIV	DPK24	96189	190283
g060f04	H4*	a	VH1	DP-88	67160	161254	L28*	a	VKIV	DPK24	114207	208301
g060g10	H4*	a	VH1	DP-88	79172	173266	L28*	a	VKIV	DPK24	126219	220313
g060d07	H4*	a	VH1	DP-88	60153	154247	L28*	a	VKIV	DPK24	107200	201294
g060e05	H4	c	VH1	DP-88	63156	157250	L13	c	VKIII	DPK22	110203	204297
g060f02	H4	b	VH1	DP-88	65158	159252	L13	b	VKIII	DPK22	112205	206299
g060g09	H4	c	VH1	DP-88	78171	172265	L13	c	VKIII	DPK22	125218	219312
g060c04	H6	-	VH1	DP-88	54147	148241	L12	-	VKIII	DPK22	101194	195288
g060g07	H20	-	VH4	DP-71	77170	171264	L8	a	VKI	DPK9	124217	218311
g060h11	H7	-	VH2	VII-5	85178	179272	L18	-	VKI	L12a	132225	226319
g060b06	H8	a	VH3	DP-46	48141	142235	L17	a	VKI	DPK1	95188	189282
g060a04	H8	a	VH3	DP-46	43136	137230	L17	a	VKI	DPK1	90183	184277
g060b10	H9	-	VH1	DP-14	51144	145238	L30	-	VKI	DPK1	98191	192285

星号表示涉及混杂的 V 编码序列。Seq prot.表示来自序列表的相应于蛋白质序列的 SEQ ID 号，Seq nucl.表示序列表中相应于核酸序列的 SEQ ID 号。

[0724] i. 表观亲和性

[0725] 设立竞争检测的目的是确定从平板 G060 中选择的克隆的表观亲和性或者 IC_{50}。

[0726] 简而言之，在 50 毫升的培养基中表达 Fab 片段，如下 :0.5 毫升过夜培养物加入到

50 毫升 2×YT/100 微克 / 毫升 Carb/0.1％葡萄糖中，37 摄氏度振荡大约 2 小时。加入 IPTG 至终浓度为 0.1mM，继续在 30 摄氏度振荡过夜。第二天，4000rpm 离心 15 分钟以收集细菌，沉淀重悬于 1 毫升 0.8mM EDTA、0.4×PBS、0.8M NaCl 中，在冰上孵育 15 分钟。离心收集周质提取物，并于 -20 摄氏度储存。

[0727] 如下进行竞争检测：以根据滴定估计的适当稀释度将周质提取物加入到一系列管中。来自噬菌体展示的 Fab 片段 mp584（来自表达抗 TT 抗体的人杂交瘤细胞系 HB8501）作为阳性对照。在第一个管中以 100nM 浓度加入可溶性 TT，接下来在后面的管中进行 4 倍连续稀释，总共得到 TT 的 7 个稀释度（从 100nM 到 25pM）。反应在室温下孵育大约 45 分钟。样品转移到使用 1 微克 / 毫升 TT 包被并且根据前面的描述进行封闭的 ELISA 平板上。平板在室温下孵育 1 小时，之后使用 PBS-T 漂洗 4 次，加入 1 ： 10000 稀释的山羊抗人 Fab/HRP，孵育 1 小时。加入 TMB Plus 底物 (KemEnTech，Denmark，cat.No 4390A) 并孵育大约 10 分钟，用 1M 硫酸终止反应。平板在 450nm 读取数据。数据作图如图 24 中所示。

[0728] 被分析的克隆的表观亲和性在表 21 中给出。

[0729] 表 21

[0730]

克隆	表观亲和性
g060a10	0.50nM
g060b06	0.60nM
g060b12	1.2nM
g060c04	0.55nM
g060d04	1.1nM
g060f01	1.2nM
g060g04	0.9nM
g060g07	0.35nM
g060h11	3.0nM
mp584(pos.cont.)	6.0nM

[0731] 如表 21 中所示，Fab 片段的表观亲和性在低 nM 水平或者高 pM 水平的范围内。而且，所有关联配对的 Fab 片段比噬菌体展示来源的 Fab 片段具有更高的表观亲和性。

[0732] j. 总结

[0733] 在供体 TT03 中，在外周血单核细胞级分中 TT 特异性浆细胞的频率经计算为 0.022％。从 TT03 制备了大约 400 个关联对。使用 ELISA 筛选了来自用关联对文库转化的细胞的 3600 个克隆，其中 339 个克隆在 ELISA 筛选中显示了对 TT 的反应性。对这些克隆

中的 47 个分析了其克隆多样性。在这 47 个克隆中，27 个经证实类似于独特的非混杂的可变区编码序列。这些克隆中有三个含有早熟终止密码子，在转移到哺乳动物表达载体中之前需要进行校正。根据实施例 1 中部分 h 的描述进行向哺乳动物表达载体的转移。对选择出的克隆测量表观亲和性，其范围在低 nM 水平至高 pM 水平。

[0734] k. 展望

[0735] 破伤风毒素是已知最具毒性的物质之一，其致死剂量为几个纳克。该毒素由破伤风梭菌 (Clostridium tetani) 产生，它是一种也存在于高达 25％的人的消化道内的土壤细菌。破伤风免疫接种计划在西方已有效地消除了这种疾病，但是每年在主要的西方国家仍然有 100-200 个病例，病死率是 50％。在发展中国家，病例要多得多。在受到污染的穿入性伤口中细菌的生长可以导致毒素的释放，最终导致强直、痉挛、呼吸停止和死亡。

[0736] 从人类血液供体中分离出的对破伤风类毒素具有高滴度抗体应答的超免疫免疫球蛋白，可以用于预防破伤风，或者如果着手早的话可以治疗已经出现的破伤风，也可以与主动免疫接种联合使用。但是由于人类产品的缺乏，在发展中国家中使用马的超免疫抗破伤风类毒素。针对破伤风类毒素的重组单克隆或者多克隆抗体具有替代超免疫球蛋白产品用于治疗性和 / 或预防性用途的潜力。文献中已经描述了来自传统的杂交瘤技术的重组单克隆抗体可以有效地对抗 TT(Chin, J. 等人，2003.Biologicals 31,45-53)。有趣的是，将两种单克隆抗体混和时观察到了增效作用。因此，能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆抗破伤风类毒素抗体，在对具有破伤风发病风险的患者进行治疗或者预防性保护方面可能是非常有效的。

[0737] 本发明的一个实施方案是能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆免疫球蛋白或者其片段。

[0738] 本发明的一个优选实施方案是能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆免疫球蛋白，它由免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区的关联对组成。

[0739] 本发明的另一个实施方案是通过根据本发明的方法得到的能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆免疫球蛋白。

[0740] 本发明的另一个实施方案是能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆免疫球蛋白，它包含的免疫球蛋白重链可变区和轻链可变区的单个关联对，与选自以下 SEQ ID 对中的单个 SEQ ID 对具有至少 90％的序列同一性 :229:276,262:309,240:287,245:292,267:314,246:293,258:305,242:289,231:278,263:310,232:279,237:284,255:302,260:307,251:298,233:280,228:275,244:291,250:297,252:299,264:311,272:319,235:282 或者 238:285。

[0741] 本发明的另一个实施方案是药物组合物，它包含能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆抗体作为用于治疗或者预防破伤风的活性成分。优选地，重组多克隆抗体与药物上可以接受的赋形剂联合。

[0742] 本发明的另一个实施方案是能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆免疫球蛋白作为对具有破伤风发病风险的患者进行治疗或者预防性保护的药物的用途。

[0743] 另一个实施方案是对具有破伤风发病风险的患者进行预防或者治疗的方法，其通过向需要进行预防或者治疗的患者施用包含能够与破伤风毒素反应或者与其结合的重组多克隆抗体的组合物来进行。

[0744] 实施例 12 :比较从两个供体得到的结果

[0745] 在下面的实施例中,将从供体 TT08 得到的结果与在实施例 11 中从供体 TT03 得到的结果进行比较。结果总结在表 22 中。

[0746] 表 22

[0747]

	TT03	TT08
PBMC 级分中的 TT 特异性浆细胞 (ELISPOT)	0.021%	0.011%
PBMC 中的 CD19+ 细胞 (FACS)	11%	5%
PBMC 级分中的浆细胞 (FACS CD38hi,CD54in)	0.12%	0.08%
连接的 V_H 和 V_L 序列的估计数目	400	400
筛选 Fab 表达的克隆数	1400	2000
Fab 阳性克隆数 (2× 背景)	482	558
筛选 TT 特异性的克隆数	3600	3400
TT 特异性克隆的数目 (2× 背景)	339	188
从 TT 特异性克隆分析的序列数	47	102
VH 种系等位基因	12(VH1-5)	NA
VL 种系等位基因	8(VKI,III,IV)	NA
独特关联对的数目	27	40
表观亲和性范围	0.35-3.0nM	NA

[0748] NA ＝未分析

[0749] 这清楚地阐明具有相似质量的文库可以从两个用 TT 免疫的不同供体中分离出来。

[0750] 在从供体 TT08 得到的文库中独特的关联对数目更高的原因很可能是由于对更多的序列进行了分析。

[0751] 实施例 13 :比较来自实施例 11 的关联对文库与由同一个供体产生的组合噬菌体展示文库

[0752] 在本实施例中,从前面用于制备关联对文库的供体制备组合噬菌体展示文库,目的是比较关联对文库和组合文库之间的文库多样性、亲和性和特异性。

[0753] a. 组合噬菌体文库的构建

[0754] 从供体 TT03 的细胞的 CD19+ 级分 (与实施例 11c 中得到的细胞级分相同) 中制

备噬菌体展示文库。

[0755] 使用 NucleoSpin RNAL 试剂盒 (Machery-Nagel cat.no.740 962.20) 从大约 5×10^6 个 CD19+ 细胞中制备总 RNA。接下来在 oligo(dT)- 引发的反应中，使用 ThermoScript 逆转录酶 (Invitrogen cat.no.11146-016) 合成 cDNA。

[0756] 使用 HotMasterTaq DNA 聚合酶 (Eppendorf cat.no.0032002.692) 和引物来 PCR 扩增 V_H 和 κ 链，基本上与 de Haard 等人 (J.Biol.Chem.274,18218-18230 ;1999) 所描述的一致，只是在 5′ 端的限制酶识别序列有所改变。

[0757] 通过向 Em351 噬菌体展示载体 (改变自 Den，W. 等人，1999J.Immunol.Methods 222,45-57 中描述的 phh3) 中相继插入 κ 和 V_H PCR 产物，制备组合噬菌体展示文库。

[0758] 最终的文库通过电穿孔转移到 TG1 大肠杆菌菌株 (Stratagene) 中。组合文库的大小为含有 3×10^6 个独立的克隆，具有高的插入频率。

[0759] b. 组合文库的淘选

[0760] 根据标准步骤制备展示 Fab 的噬菌体颗粒 (例如 Antibody Engineering，A Practical Approach 1996，ed.McCafferty，Hoogenboom 和 Chiswell)。

[0761] 对在用 PBS 稀释至 1 微克 / 毫升并且固定在 MaxiSorp 免疫管 (Nunc cat.no.444202) 中的破伤风类毒素 (TT ;SSI 批号 89-2) 进行淘选。一小时孵育期和几次漂洗步骤之后，用 100mM TEA(三乙胺) 洗脱结合的噬菌体颗粒。

[0762] 中和噬菌体颗粒洗脱物，用于侵染对数生长的 TG1 细胞，得到对 TT 特异性进行富集的展示 Fab 的噬菌体颗粒。按照以上概述的一般步骤使用洗脱的噬菌体进行第二轮淘选。

[0763] 同时，按照以上概述的步骤对破伤风毒素分子的 C 片段 (Sigma cat.no.T3694) 进行三轮淘选。

[0764] 在以上描述的两组淘选中的每一次淘选之后，从未选择的文库中筛选结合破伤风类毒素以及 C 片段的单菌落。

[0765] c. 比较组合噬菌体颗粒克隆和关联对克隆的特异性和亲和性

[0766] 从未选择的文库中以及在每轮淘选 (对完整的破伤风类毒素 (TT) 和破伤风类毒素 C 片段分别进行淘选) 之后挑取单菌落。通过 ELISA 检测分析展示 Fab 的噬菌体颗粒的反应性。表现出 TT 和 / 或 C 片段反应性 (至少 2 倍背景反应性以及至少 4 倍背景反应性) 的 Fab 阳性克隆的数目在下面的表 23 和表 25 中给出。所有的结果表示为特异性克隆的数目 /Fab 阳性克隆的数目。

[0767] 表 23 :对 TT 选择并用 TT 特异性 ELISA 分析的克隆

[0768]

富集	2× 背景	4× 背景
未选择的克隆	-	13/app.5000
1 轮淘选后	61/99	59/93
2 轮淘选后	165/169	163/166

[0769] 表 24 :对 TT 选择并用 C- 片段特异性 ELISA 分析的克隆

[0770]

富集	2× 背景	4× 背景
未选择的克隆	0/13	0/13
1 轮淘选后	0/85	0/85
2 轮淘选后	0/85	0/85

[0771] 表 25 :对 C- 片段选择并用 C- 片段特异性 ELISA 分析的克隆

[0772]

富集	2× 背景	4× 背景
1 轮淘选后	1/35	0/35
2 轮淘选后	12/47	9/47
3 轮淘洗后	64/126	26/126

[0773] 针对 TT 进行噬菌体展示文库的淘选，发现增加淘选轮数时，TT 特异的克隆的数目增加，在未选择的文库中只鉴定了几个克隆。在未选择的文库中或者在两轮针对 TT 进行的文库淘选之后没有发现有克隆与破伤风类毒素的 C 片段发生反应。为了从组合噬菌体展示文库中得到具有 C 片段特异性的 Fab 片段，需要对该文库进行特异地针对 C 片段的淘选。

[0774] 为进行比较，13 个来自实施例 11 的 TT 特异性克隆进行 C 片段特异性 ELI SA，其中 7 个显示的反应性高于背景反应性的 2 倍。因此具有针对破伤风毒素 C 片段的特异性的 Fab 片段可以从获自经 TT 免疫接种的个体的关联对文库中表达。

[0775] 这清楚地阐明了使用淘选来鉴定对某种特定抗原具有特异性的克隆的缺点。如果重要的抗原片段或者表位是未知的，那么在淘选过程中它们可能会被弃掉，这样最终导致效率较低的产物。

[0776] 另外，根据实施例 11i 的检测中的描述，测量了组合克隆的表观亲和性。对在针对 TT 进行两轮淘选之后得到的 10 个组合克隆进行分析，表观结合亲和性在 1-15nM 之间。

[0777] 为了比较，对 9 个来自关联对文库的克隆（表 21）进行分析，其中有 4 个的亲和性在 pM 的范围内。

[0778] 这表明，作为开始由供体免疫系统选择出的可变区的配对，与作为一个对已经经历的体细胞高变相联合，比起这些可变区的随机组合可能产生更高的表观结合亲和性。

[0779] d. 比较 TT 特异性组合噬菌体颗粒克隆和关联对克隆的序列

[0780] 从两个文库产生的大量序列数据妨碍了原始序列直接进行比较。为了显示在噬菌体展示文库和关联对文库中 V_H 和 V_L 序列之间的差异，对 V_H 和 V_L 序列作出系统发生树，对用点阵表示。在点阵（图 25）中系统发生信息的配对揭示了在两个文库中 V_H 和 V_L 序列对非常不同的分布特性。在噬菌体展示文库中 V_H 和 V_L 序列对分散出现（图 25A）表明 V_H 和 V_L 基因之间几乎没有系统进化的联系，这与该文库中 V 基因的随机配对是相一致的。相反，来自关联对文库的 V_H 和 V_L 序列对显示了成簇的分布（图 25B），表明对于关联对所预期的 V 基

因的共同进化。而且，关联对文库中 V 基因的遗传多样性与组合文库中 V 基因的遗传多样性相比要高得多，表明分离同源配对的 V 基因的方法的偏倚性较小。

[0781] 实施例 14：组合的单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR 以及嵌套 PCR，使用 T 细胞作为模板来源

[0782] 在本实施例中，描述了单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR 如何在来自人类供体的 T 淋巴细胞上进行。

[0783] a. 获得含有淋巴细胞的细胞级分

[0784] 从接触了所需抗原（例如经免疫接种、天然感染、恶性肿瘤，通过自体免疫反应或者其他疾病）的人类供体中获得血液样品。根据生产商的说明使用 Lymphoprep(Axis-Shield，Oslo Norway，prod.No 1001967) 分离外周血单核细胞 (PBMC)。

[0785] 在本实施例中，通过对 PBMC 级分的进一步刺激产生抗原特异性 T 细胞。但是，多重重叠 - 延伸 RT-PCR 也可以直接在来自 PBMC 级分的单个细胞上或者在富集了 T 细胞的细胞级分（例如通过 FACS 分选 CD3 阳性细胞）上进行。

[0786] b. 产生抗原特异性 T 细胞

[0787] PBMC 细胞级分用含有相关细胞因子例如 IL2 的适当培养基重悬。然后向培养基中加入所需的抗原，抗原被 PBMC 级分中存在的抗原呈递细胞 (APC) 呈递给 T 淋巴细胞。或者，事先处理 APC 饲养细胞以使它们呈递所需抗原，可以将这些 APC 饲养细胞加入到 PBMC 级分中。这种 APC 饲养细胞可以是暴露于所需抗原（所需抗原可以是例如肽、蛋白质或者其他分子形式）的 APC，或者是被微生物感染的 APC 或者被转染而表达和呈递抗原的细胞，或者是与其他抗原性细胞（例如以原代组织或者细胞系的形式的癌细胞）共同培养的 APC。从文献中已知许多不同类型的 APC 饲养细胞，包括转化的细胞系、B 细胞系、树状细胞等。

[0788] 培养 PBMC 级分大约 3-5 周，其间与细胞因子一起加入新鲜的抗原呈递细胞，例如每周添加一次。这使 T 淋巴细胞增殖、激活和成熟。在培养末期，细胞培养物将主要是抗原特异性 T 细胞。这些细胞是 CD4+ 还是 CD8+ 取决于疾病、抗原、APC 细胞以及在刺激过程中使用的细胞因子混合物。

[0789] 例如可以使用 CTL 检测、增殖检测以及荷载了所需抗原的 MHC 四聚体 (Altman，J.D. 等人，1996.Science 274，94-96) 来测试抗原特异性。

[0790] 抗原特异性 T 细胞通过有限稀释或者使用 FACS 分配到 PCR 管中，目的是得到每个容器中有单个细胞。容器可以在 -80 摄氏度下储存直至使用。

[0791] b. 单步多重重叠 - 延伸 RT-PCR

[0792] 使用 Qiagen One-Step RT-PCR 试剂盒 (Qiagen cat.No210212，Hilden，Germany)，基本上按照生产商的建议进行多重重叠 - 延伸 RT-PCR。细胞融化之后再向 PCR 管中加入 PCR 反应混合物。

[0793] 最初根据实施例 11e-1 中的描述设置 PCR 反应混合物和循环条件。但是，对于新的引物组预计可能需要一定的优化。

[0794] 多重重叠 - 延伸引物混合物包含的引物在表 26 中显示。

[0795] 表 26

[0796]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
Vα	每种10nM	322	tattggcgcgccatggccGCCCAGTCTGTGACCCAGC
		323	tattggcgcgccatggccGCCCAGAAGATAACTCAA
		324	tattggcgcgccatggccGATGCTAAGACCACCCAG
		325	tattggcgcgccatggccGCCCAGACAGTCACTCAG
		326	tattggcgcgccatggccAAACAGGAGGTGACACAGA
		327	tattggcgcgccatggccGGAGACTCGGTTACCCAGA
		328	tattggcgcgccatggccGGAGATTCAGTGACCCAGA
		329	tattggcgcgccatggccAGCAATTCAGTCAAGCAGA
		330	tattggcgcgccatggccGGACAAAACATTGACCAG
		331	tattggcgcgccatggccAAAAATGAAGTGGAGCAGA
		332	tattggcgcgccatggccGAAGACCAGGTGACGCAGA
		333	tattggcgcgccatggccGGAATACAAGTGGAGCAGA
		334	tattggcgcgccatggccCTACATACACTGGAGCAGA
		335	tattggcgcgccatggccGAAGACAAGGTGGTACAAA
		336	tattggcgcgccatggccGAAAACCAGGTGGAGCACA
		337	tattggcgcgccatggccCAGGAGAATGTGGAGCAG
		338	tattggcgcgccatggccGGAGAGAGTGTGGGGCTG
		339	tattggcgcgccatggccGGAGAGGATGTGGAGCAGA
		340	tattggcgcgccatggccAGCCAAAAGATAGAACAGA
		341	tattggcgcgccatggccAGTCAACAGGGAGAAGAG
		342	tattggcgcgccatggccCAACAACCAGTGCAGAGT
		343	tattggcgcgccatggccAGCCAAGAACTGGAGCAGA
		344	tattggcgcgccatggccGGTCAACAGCTGAATCAGA

[0797]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
		345	tattggcgcgccatggccACCCAGCTGCTGGAGCAGA
		346	tattggcgcgccatggccCAGCAGCAGGTGAAACAA
		347	tattggcgcgccatggccATACTGAACGTGGAACAA
		348	tattggcgcgccatggccGACCAGCAAGTTAAGCAA
		349	tattggcgcgccatggccGGACAACAGGTAATGCAA
		350	tattggcgcgccatggccAAGGACCAAGTGTTTCAG
Cα	200 nM	351	TAGGCAGACAGACTTGTCACT
Vβ	每种 10nM	352	gccatggcgcgccaatagctagccGGTGAAGAAGTCGCCCAGA
		353	gccatggcgcgccaatagctagccGATGCCATGGTCATCCAGA
		354	gccatggcgcgccaatagctagccGAAGCCCAAGTGACCCAGA
		355	gccatggcgcgccaatagctagccCATGCCAAAGTCACACAGA
		356	gccatggcgcgccaatagctagccGACACAGCCGTTTCCCAGA
		357	gccatggcgcgccaatagctagccGAAACGGGAGTTACGCAGA
		358	gccatggcgcgccaatagctagccGAACCTGAAGTCACCCAGA
		359	gccatggcgcgccaatagctagccGAAGCTGACATCTACCAGA
		360	gccatggcgcgccaatagctagccATATCTGGAGTCTCCCACA
		361	gccatggcgcgccaatagctagccGATGCTGGAATCACCCAGA
		362	gccatggcgcgccaatagctagccAATGCTGGTGTCACTCAGA
		363	gccatggcgcgccaatagctagccAGTGCTGTCGTCTCTCAA
		364	gccatggcgcgccaatagctagccGACGCTGGAGTCACACAA
		365	gccatggcgcgccaatagctagccGATGGTGGAATCACTCAGT
		366	gccatggcgcgccaatagctagccACTGCTGGGATCACCCAG
		367	gccatggcgcgccaatagctagccGAAGCTGGAGTTGCCCAGT
		368	gccatggcgcgccaatagctagccGAAGCTGGAGTGGTTCAGT
		369	gccatggcgcgccaatagctagccGAAGCTGGAGTTACTCAGT
		370	gccatggcgcgccaatagctagccGATGCTGTAGTTACACAA
		371	gccatggcgcgccaatagctagccGATGCTGGAGTTATCCAGT
		372	gccatggcgcgccaatagctagccGGTGCTGGAGTCTCCCAG
		373	gccatggcgcgccaatagctagccGATGCTGATGTTACCCAGA
		374	gccatggcgcgccaatagctagccTCTCAGACTATTCATCAAT
Cβ	200 nM	375	CAGGCACACCAGTGTGGCCTT

[0798] c. 半嵌套 PCR

[0799] 同样建议根据实施例 11 e-2 中的描述进行半嵌套 PCR,预计可能需要一些优化。

[0800] 使用的引物在表 27 中示出。

[0801] 表 27

[0802]

引物名称	浓度	SEQ ID NO	引物序列(5' 到 3' 方向)
Cα	200 nM	376	caccttagagctcTTAGAGTCTCTCAGCTGGTACAC
Cβ	200 nM	377	gacattatgCAtGATCTCTGCTTCTGATGGCTC

[0803] 为了证实多重重叠－延伸 RT-PCR 成功进行，对半嵌套 PCR 反应的样品中的一部分进行分析，每个半嵌套PCR反应产物取10微升进行1％琼脂糖凝胶电泳，使用溴化乙锭进行检查。重叠－延伸片段的预计大小是大约 850bp（精确的大小取决于可变区的长度）。

[0804] 从所有进行的来自同一个供体的反应产物中取出大约 10 微升，在一个试管中合并。接下来从汇集的 PCR 产物中取出一份等分试样，用 QIAquick PCR 纯化试剂盒，根据生产商的步骤 (Qiagen cat.No.28106，Hilden，Germany) 进行纯化。纯化的重叠 PCR 产物的汇集物可以使用适当的限制酶消化，然后纯化并且插入到适宜的载体中。

[0805] 在本实验中，设计在半嵌套 PCR 中使用的恒定区引物 (SEQ ID NO 376 和 377) 用于将半嵌套PCR产物亚克隆到适宜的载体中。Cβ 引物的设计依赖于将 β 链恒定区肽上第 21 位的 Ser 改变成 Met，从而可以将一个 NsiI 位点引入核酸序列中：

[0806] NsiI

[0807] tcc cac → atg cat

[0808] Ser His Met His

[0809] 这个转换应该是相对安全的，因为 Ser21 暴露在结构域靠近膜一端的环结构中的 β 链恒定区上。因此这个相对保守的改变不大可能扰乱整体结构域的结构。

[0810] Cα 引物的设计依赖于改变 α 链恒定区肽上第 15-17 位的核苷酸，从而可以将一个 SacI 位点引入核酸序列中：

[0811] SacI

[0812] aaa tcc agt → aag agc tct

[0813] Lys Ser Ser Lys Ser Ser

[0814] 因此，适宜的载体含有 TcR α 和 β 链的恒定区的剩余部分，并且含有关于限制位点的适当修饰。这些改变可以使用标准的 PCR 和亚克隆技术进行。

[0815] e. 额外的考虑

[0816] 在多重重叠－延伸PCR扩增中，大量的可变区引物可能以抑制的方式相互作用。为了避免这一点，可变区引物可以分为亚组并以适当的组合分开使用。

[0817] 其他实施方案

[0818] 所有在本说明书中引用的出版物和专利申请在这里引用作为参考，如同特别并且单独地指明引用每一个单个的出版物或者专利申请作为参考。尽管前述的发明已经通过图解和实施例进行了一些详细的描述，目的是为了理解的清楚，但对于本领域内普通技术人员而言，显然可以依照本发明的教导对其进行某些改变和修饰，而不偏离所附权利要求书的精神和范围。

[0001]

序列表

<110> Symphogen A/S

<120> 连接目标序列的方法

<130> 15881PCT00

<160> 377

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 1
agcctatact attgattagg cgcgcccagr tgcagctggt gcart 45

<210> 2
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 2
agcctatact attgattagg cgcgccsagg tccagctggt rcagt 45

<210> 3
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 3
agcctatact attgattagg cgcgcccagr tcaccttgaa ggagt 45

<210> 4
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 4
agcctatact attgattagg cgcgccsagg tgcagctggt ggag 44

<210> 5
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 5
agcctatact attgattagg cgcgcccagg tgcagctaca gcagt 45

<210> 6
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

[0002]

<220>
<223> 引物序列

<400> 6
agcctatact attgattagg cgcgcccags tgcagctgca ggagt 45

<210> 7
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 7
agcctatact attgattagg cgcgccgarg tgcagctggt gcagt 45

<210> 8
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 8
agcctatact attgattagg cgcgcccagg tacagctgca gcagtc 46

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 9
gacsgatggg cccttggtgg 20

<210> 10
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 10
cgcctaatca atagtatagg ctagccgaca tccagwtgac ccagtct 47

<210> 11
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 11
cgcctaatca atagtatagg ctagccgatg ttgtgatgac tcagtct 47

<210> 12
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0003]

<400> 12
cgcctaatca atagtatagg ctagccgaaa ttgtgwtgac rcagtct 47

<210> 13
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 13
cgcctaatca atagtatagg ctagccgata ttgtgatgac ccacact 47

<210> 14
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 14
cgcctaatca atagtatagg ctagccgaaa cgacactcac gcagt 45

<210> 15
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 15
cgcctaatca atagtatagg ctagccgaaa ttgtgctgac tcagtct 47

<210> 16
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 16
atatatatgc ggccgcttat taacactctc ccctgttg 38

<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 17
atattctcga gacggtgacc agggtg 26

<210> 18
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 18
atattctcga gacggtgacc attgt 25

[0004]

<210> 19
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 19
atattctcga gacggtgacc agggttc 27

<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 20
atattctcga gacggtgacc gtggt 25

<210> 21
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 21
accgcctcca ccggcggccg cttattaaca ctctcccctg ttgaagctct t 51

<210> 22
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 22
gctagcatta ttattaccat ggcccagrtg cagctggtgc art 43

<210> 23
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 23
gctagcatta ttattaccat ggccsaggtc cagctggtrc agt 43

<210> 24
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 24
gctagcatta ttattaccat ggcccagrtc accttgaagg agt 43

<210> 25
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

[0005]

<220>
<223> 引物序列

<400> 25
gctagcatta ttattaccat ggccsaggtg cagctggtgg ag 42

<210> 26
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 26
tattggcgcg ccatggccsa ggtgcagctg gtggag 36

<210> 27
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 27
gctagcatta ttattaccat ggcccaggtg cagctacagc agt 43

<210> 28
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 28
gctagcatta ttattaccat ggcccagstg cagctgcagg agt 43

<210> 29
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 29
gctagcatta ttattaccat ggccgargtg cagctggtgc agt 43

<210> 30
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 30
gctagcatta ttattaccat ggcccaggta cagctgcagc agtc 44

<210> 31
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0006]

<400> 31
atattctcga gacggtgacc agggtg 26

<210> 32
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 32
atattctcga gacggtgacc attgtcc 27

<210> 33
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 33
atattctcga gacggtgacc agggttc 27

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 34
atattctcga gacggtgacc gtggtcc 27

<210> 35
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 35
ccatggtaat aataatgcta gccgacatcc agwtgaccca gtct 44

<210> 36
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 36
ccatggtaat aataatgcta gccgatgttg tgatgactca gtct 44

<210> 37
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 37
ccatggtaat aataatgcta gccgaaattg tgwtgacrca gtct 44

[0007]

<210> 38
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 38
ccatggtaat aataatgcta gccgatattg tgatgaccca cact 44

<210> 39
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 39
ccatggtaat aataatgcta gccgaaacga cactcacgca gt 42

<210> 40
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 40
ccatggtaat aataatgcta gccgaaattg tgctgactca gtct 44

<210> 41
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 41
tattggcgcg ccatggccca grtgcagctg gtgcart 37

<210> 42
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 42
tattggcgcg ccatggccsa ggtccagctg gtrcagt 37

<210> 43
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 43
tattggcgcg ccatggccca grtcaccttg aaggagt 37

<210> 44
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

[0008]

<220>
<223> 引物序列

<400> 44
tattggcgcg ccatggccsa ggtgcagctg gtggag 36

<210> 45
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 45
tattggcgcg ccatggccca ggtgcagcta cagcag 36

<210> 46
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 46
tattggcgcg ccatggccca gstgcagctg caggagt 37

<210> 47
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 47
tattggcgcg ccatggccga rgtgcagctg gtgcagt 37

<210> 48
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 48
tattggcgcg ccatggccca ggtacagctg cagcagtc 38

<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 49
aagtagtcct tgaccaggca gcc 23

<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0009]

<400> 50
tgagttccac gacaccgtca 20

<210> 51
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 51
agaggtgctc ttggaggagg 20

<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 52
agttttgtca caagatttgg g 21

<210> 53
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 53
gttgcagatg taggtctggg tgc 23

<210> 54
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 54
gccatggcgc gccaatagct agccgacatc cagwtgaccc agtct 45

<210> 55
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 55
gccatggcgc gccaatagct agccgatgtt gtgatgactc agtct 45

<210> 56
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 56
gccatggcgc gccaatagct agccgaaatt gtgwtgacrc agtct 45

[0010]

<210> 57
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 57
gccatggcgc gccaatagct agccgatatt gtgatgaccc acact 45

<210> 58
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 58
gccatggcgc gccaatagct agccgaaacg acactcacgc agt 43

<210> 59
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 59
gccatggcgc gccaatagct agccgaaatt gtgctgactc agtct 45

<210> 60
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 60
atatatatgc ggccgcttat taacactctc ccctgttgaa 40

<210> 61
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 61
ggaggcgctc gagacggtga ccagggtgcc 30

<210> 62
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 62
ggaggcgctc gagacggtga ccattgtccc 30

<210> 63
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

[0011]

<220>
<223> 引物序列

<400> 63
ggaggcgctc gagacggtga ccagggttcc 30

<210> 64
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 64
ggaggcgctc gagacggtga ccgtggtccc 30

<210> 65
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 65
cgcctaatca atagtatagg ctagcccagt ctgtgctgac tcagcca 47

<210> 66
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 66
cgcctaatca atagtatagg ctagcccagt ctgtgytgac gcagc 45

<210> 67
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 67
cgcctaatca atagtatagg ctagcccagt ctgtcgtgac gcagc 45

<210> 68
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 68
cgcctaatca atagtatagg ctagcccart ctgccctgac tcagcct 47

<210> 69
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0012]

<400> 69
cgcctaatca atagtatagg ctagcctcct atgwgctgac tcagcca 47

<210> 70
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 70
cgcctaatca atagtatagg ctagcctctt ctgagctgac tcaggac 47

<210> 71
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 71
cgcctaatca atagtatagg ctagcccacg ttatactgac tcaaccg 47

<210> 72
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 72
cgcctaatca atagtatagg ctagcccagg ctgtgctgac tcagc 45

<210> 73
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 73
cgcctaatca atagtatagg ctagccaatt ttatgctgac tcagcccca 49

<210> 74
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 74
cgcctaatca atagtatagg ctagcccagr ctgtggtgac ycagga 46

<210> 75
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 75
cgcctaatca atagtatagg ctagcccwgc ctgtgctgac tcagc 45

[0013]

<210> 76
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 76
gccgcttatt atgaacattc tgtaggggcc a 31

<210> 77
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 77
gccgcttatt aagagcattc tgcaggggcc a 31

<210> 78
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 78
atatatatgc ggccgcttat tatgaacatt ctgtaggggc cactg 45

<210> 79
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 79
atatatatgc ggccgcttat taagagcatt ctgcaggggc cactg 45

<210> 80
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 80
atatatatgc ggccgcttaa tgggctgcct cgggaa 36

<210> 81
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 81
gccatggcgc gccaatagct agccttagag cagctcgtac tgacgaa 47

<210> 82
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工的

[0014]

<220>
<223> 引物序列

<400> 82
tattggcgcg ccatggccat gagtgagctt gaccagttac g 41

<210> 83
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 83
ggtacctaat aataatcgat cgcttagttc cagatcttga ggaagct 47

<210> 84
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 84
cgatcgatta ttattaggta ccccatgcca gtaatcaata ttgaggac 48

<210> 85
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 85
ggaggcgctc gagttatgaa atcacacagc ctcctttg 38

<210> 86
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(34)
<223> 基因特异区域

<400> 86
tattcccagc ggccgccgcc acaggtgccc actc 34

<210> 87
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(34)
<223> 基因特异区域

[0015]

<400> 87
tattcccagc ggccgcccct tcmtgggtct tgtc 34

<210> 88
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(35)
<223> 基因特异区域

<400> 88
tattcccagc ggccgcctta raaggtgtcc agtgt 35

<210> 89
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(32)
<223> 基因特异区域

<400> 89
tattcccagc ggccgccccc agatgggtcc tg 32

<210> 90
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(34)
<223> 基因特异区域

<400> 90
tattcccagc ggccgccctc caaggagtct gttc 34

<210> 91
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(35)
<223> 基因特异区域

<400> 91
tattcccagc ggccgcccca tggggtgtcc tgtca 35

[0016]

<210> 92
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(33)
<223> 基因特异区域

<400> 92
tattcccagc ggccgccgca acaggtgccc act 33

<210> 93
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(41)
<223> 基因特异区域

<400> 93
ggcggccgct gggaatagct agcgytccca ggtgccagat g 41

<210> 94
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(40)
<223> 基因特异区域

<400> 94
ggcggccgct gggaatagct agcggtccct ggatccagtg 40

<210> 95
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(42)
<223> 基因特异区域

<400> 95
ggcggccgct gggaatagct agcgctccca gataccaccg ga 42

<210> 96
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工的

[0017]

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(39)
<223> 基因特异区域

<400> 96
ggcggccgct gggaatagct agcgatctct ggtgcctac 39

<210> 97
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(42)

<400> 97
ggcggccgct gggaatagct agcgatctct gataccaggg ca 42

<210> 98
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (25)..(42)
<223> 基因特异区域

<400> 98
ggcggccgct gggaatagct agcggttcca gcctccaggg gt 42

<210> 99
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 99
atatatatgg cgcgccttaa cactctcccc tgttgaa 37

<210> 100
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 载体序列

<400> 100
atgaaatatc ttctaccaac agcggcagct ggattattgg cggccgcc 48

<210> 101
<211> 48
<212> DNA

[0018]

<213> 人工的

<220>
<223> 载体序列

<400> 101
atgaaatatt tgctaccaac agcggcagct ggattattgt tactagcg 48

<210> 102
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 102
tgttgttcta gatgaaggcg cgcccagrtg cagctggtgc art 43

<210> 103
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 103
tgttgttcta gatgaaggcg cgccsaggtc cagctggtrc agt 43

<210> 104
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 104
tgttgttcta gatgaaggcg cgcccagrtc accttgaagg agt 43

<210> 105
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 105
tgttgttcta gatgaaggcg cgccsaggtg cagctggtgg ag 42

<210> 106
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 106
tgttgttcta gatgaaggcg cgcccaggtg cagctacagc agt 43

<210> 107
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0019]

<400> 107
tgttgttcta gatgaaggcg cgcccagstg cagctgcagg agt 43

<210> 108
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 108
tgttgttcta gatgaaggcg cgccgargtg cagctggtgc agt 43

<210> 109
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 109
tgttgttcta gatgaaggcg cgcccaggta cagctgcagc agtc 44

<210> 110
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 110
aacaacacta gtgataggct agccgacatc cagwtgaccc agtct 45

<210> 111
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 111
aacaacacta gtgataggct agccgatgtt gtgatgactc agtct 45

<210> 112
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 112
aacaacacta gtgataggct agccgaaatt gtgwtgacrc agtct 45

<210> 113
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 113
aacaacacta gtgataggct agccgatatt gtgatgaccc acact 45

[0020]

<210> 114
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 114
aacaacacta gtgataggct agccgaaacg acactcacgc agt 43

<210> 115
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 115
aacaacacta gtgataggct agccgaaatt gtgctgactc agtct 45

<210> 116
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 116
tattcccatg gcgcgcccag rtgcagctgg tgcart 36

<210> 117
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 117
tattcccatg gcgcgccsag gtccagctgg trcagt 36

<210> 118
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 118
tattcccatg gcgcgcccag rtcaccttga aggagt 36

<210> 119
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 119
tattcccatg gcgcgccsag gtgcagctgg tggag 35

<210> 120
<211> 36
<212> DNA

[0021]

<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 120
tattcccatg gcgcgcccag gtgcagctac agcagt 36

<210> 121
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 121
tattcccatg gcgcgcccag stgcagctgc aggagt 36

<210> 122
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 122
tattcccatg gcgcgccgar gtgcagctgg tgcagt 36

<210> 123
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 123
tattcccatg gcgcgcccag gtacagctgc agcagtc 37

<210> 124
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 124
ggcgcgccat gggaatagct agccgacatc cagwtgaccc agtct 45

<210> 125
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 125
ggcgcgccat gggaatagct agccgatgtt gtgatgactc agtct 45

<210> 126
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0022]

<400> 126
ggcgcgccat gggaatagct agccgaaatt gtgwtgacrc agtct 45

<210> 127
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 127
ggcgcgccat gggaatagct agccgatatt gtgatgaccc acact 45

<210> 128
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 128
ggcgcgccat gggaatagct agccgaaacg acactcacgc agt 43

<210> 129
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 129
ggcgcgccat gggaatagct agccgaaatt gtgctgactc agtct 45

<210> 130
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 130
atatatatgc ggccgcttaa cactctcccc tgttgaa 37

<210> 131
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 载体序列

<400> 131
aggaaacagg agatatacat 20

<210> 132
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 载体序列

<400> 132
tcgccaagga gacagtcata 20

[0023]

<210> 133
<211> 369
<212> DNA
<213> 智人

<400> 133
gggcgcgccc aggtgcagct ggtgcaatct ggacctgaag tgaagaagcc tggggcctca 60

gtgagggtct cctgcaaggc ctctggttac tcctttaaga actatggtat ccactgggtg 120

cgacaggccc ctggacaggg gcttgagtgg atggggtgga tcagcgctga caatggtgac 180

acaaccactg cactgaacct ccggggcaga gtctccatga ccacagacac atccacaaac 240

acagtctaca tggaggtgaa gagcctaaga tctgacgaca cggccatata tttctgtgcg 300

cgagattttt atagtgggag ttaccggtcc tttgactgct ggggccaggg caccctggtc 360

accgtctcg 369

<210> 134
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 134
gggcgcgccc aggtgcagct acagcagtct gggggaggcc tggtcaagcc tggggggtcc 60

ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagta gctatagcat gaactgggtc 120

cgccaggctc cagggaaggg gctggagtgg gtctcatcca ttagtagtag tagtagttac 180

atatactacg cagactcagt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaagaac 240

tcactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cggctgtgta ttactgtgcg 300

agacgccctg gttgggctgc tactcgggcg gcgggtgctt ttgatatctg gggccaaggg 360

acaatggtca ccgtctcg 378

<210> 135
<211> 357
<212> DNA
<213> 智人

<400> 135
gggcgcgccc aggtgcagct ggtgcaatct ggacctgaac tgaagaagcc tggggcctca 60

gtgaggatct cctgcaaggc ctctgagaaa tgtgatatcc actgggtgcg acaggcccct 120

ggacaggggc ttgagtggat gggatggatc agcgctgacg atggtgggac aaccactgcg 180

ctgaacctcc ggggcagagt ctccatgacc acagacagag ccacaaacac agtatacatg 240

gaactgaaga gcctaagatc tgacgacacg gccatttatt tctgtgcgcg agatttttat 300

agtgggactt accggtcctt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcg 357

<210> 136
<211> 396
<212> DNA
<213> 智人

<400> 136
gggcgcgcca aggtgcagct ggtggagtct gggggaggcg tggtccagcc tgggacgtcc 60

ctcagactct cctgtgtagt ctctggattc accttcagaa cctatggtat gaactgggtc 120

cgccaggctc caggcaaggg gctggagtgg ctggcatttc tatcatctga tgggagcgat 180

gaattctacg cggactccgt gaagggccga ttcaccgtct ccagggacaa ttccaagagc 240

[0024]

actctctttc tgaaaatgaa cagtctgaga cctgatgaca cggctgtcta ttactgtgcg 300

agggatcgtg gggcccaaat tacacttttt ggagcccctc ttataaggcc ttcgtccttt 360

gactcctggg gccagggcac cctggtcacc gtctcg 396

<210> 137
<211> 362
<212> DNA
<213> 智人

<400> 137
gggcgcgccc aggtgcagct gcaggagtct ggacctgagg tgaagaagcc tggggcctca 60

gtgaaggtgt cctgcaaggc ttctggctac acgtttaaca gttatggaat cgcctgggtg 120

cgacaggtcc ctggacaagg gcttgagtgg atgggatgga tcagccctta cagtggtcac 180

acaaactatg cagagaaggt ccagggcaga gtcaccatga ccacagacac cgccacgagc 240

acagcctgca tggagctgac gagcctgaga tctgacgaca cggccgttta tttctgtgcg 300

agagactaca gtagtccgta ccactttgac tactggggcc agggcacctg gtcaccgtct 360

cg 362

<210> 138
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 138
gggcgcgccc agatcacctt gaaggagtct ggtcctacgc tggtgaaacc cacacagacc 60

ctcacgctga cctgcacctt gtctgggttc tcactctaca ctactggagt gggtgtgggc 120

tggatccgtc agccccccagg aaaggccctg gagtggctgg cacgcattta ttgggatgat 180

gatgagcgct acaacccgtc tctgaagagc aggctcacca tcaccaagga cgcctccaaa 240

aaccaggtgg tccttaaaat gaccaacatg gaccctgtgg acacagccac atattactgt 300

gcccggacca tgggcgtcgt tcttccattt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcg 366

<210> 139
<211> 351
<212> DNA
<213> 智人

<400> 139
gggcgcgcca aggtgcagct ggtggagtct gggggaggcc tggtcaagcc gggggggtcc 60

ctgagactct cctgtgtagt ttctgggttc cccctcaata gatacaccat gaactgggtc 120

cgccaggctc cagggaaggg gctggagtgg ctctcgtcca ttagtagtac tagttcttac 180

atatactacg cagactcagt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaagaat 240

tctctgtttc tgcagatgaa cagcctgaga gccgacgaca cggctctcta tttctgtgcg 300

agtggcaata ctcatgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc g 351

<210> 140
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 140
gggcgcgccc aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagct tgggacgtca 60

[0025]

gtgagggtct cctgcaagac tcctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggcccct 120

ggacaagggc ctgagtggat gggagggatc atcaccaact ttgggacaac aaactacgca 180

cggaagttcc agggcagaat cacggttacc gcggacaaat ccacgaacac agtgtacatg 240

gatttgagca acctggcatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agccccccga 300

ggcacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cgatatttct ttgactcctg gggccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 141
<211> 396
<212> DNA
<213> 智人

<400> 141
gggcgcgccc aggtgcagct tcaggagtct gggggaggcg tggtccagcc tgggacgtcc 60

ctcagactct cctgtgtagt ctctggattc accttcagaa cctatggtat gaactgggtc 120

cgccaggctc caggcaaggt gctggagtgg ctggcatttg tatcatctga tgggagcgat 180

gaattctacg cggactccgt gaagggccga ttcaccgtct ccagggacaa ttccaagagc 240

actctctttc tgaaaatgaa cagtctgaga gctgatgaca cggctgtcta ttactgtgcg 300

agagatcgtg gggcccaaat tacacttttt ggagcccctc ttataaggcc ttcgtccttt 360

gactcctggg gccagggaac cctggtcacc gtctcg 396

<210> 142
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 142
gggcgcgccg aggtgcagct ggtggagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggacctca 60

gtgagggtct cctgcaagac ttctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggcccct 120

ggacaagggc ctgagtggat gggagggatc atcaccagct ttgggacaac aagctacgca 180

cagaagttcc agggcagagt cacgattacc gcggacaaag ccacgaacac agtgtacatg 240

gatttgagcg acctgacatc tgaggacacg gccatatatt actgtgcgaa agccccccga 300

ggcacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cgctatttct ttgactcctg gggccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 143
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 143
gggcgcgccc aggtgcagct gcaggagtct ggtcctacgc tggtgaaacc cacacagacc 60

ctcacgctga cctgctcgtt ctctggtttc tcactcggca ctactggagt caatgtgggc 120

tggatccgtc agccccctgg aaaggccctg gagtggcttg cactcatttc ttgggatggt 180

ggtaagcact acagcccatc tctgaactcc aggatcaccc tcactaagga cgcctccaga 240

gagcaggtgg tggtccctac aatgaccaac atggaccctg cggacacagg cagatattat 300

tgtgcacgta tagtggggac tcacggcttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcg 366

[0026]

<210> 144
<211> 393
<212> DNA
<213> 智人

<400> 144
gggcgcgcca aggtgcagct ggtggagtct ggagctgagg tgaagaagcc tggggccaca 60

gtcagggtct cctgtaaggc ttctggttac aggtttaacg actattgtat cagctgggtg 120

cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg atggggtgga tcaacggtaa caatgctgac 180

acattctatg caccgaagct ccagggcaga gtcaccatga gcacagacac atccacgagc 240

acagcctaca tggagctgag gaacttgaga tcggacgaca cggccgttta tttctgtgcg 300

cgagatcgag gacgtattac tctttttggc gaagttattt taagggcggg atggttcgac 360

tcctggggcc agggcaccct ggtcaccgtc tcg 393

<210> 145
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 145
gggcgcgccc aggtgcagct ggtgcagtct gggggaggcc tggtcaagcc ggggggqtcc 60

ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc tcctttagta ataataacat gaattgggtc 120

cgccagactc caggaaaggg actggagtgg gtcgcatcta ttagttttgg aagtcattac 180

atatcctacg cagactcagt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaggaat 240

gcagtttatc tgcagatgaa cagcctgaga gtcgaggaca cggctgtcta ttactgcacg 300

agatgcaggg gcggaactcg tacctattat tacatggacg tctggggcaa aggcaccctg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 146
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 146
gggcgcgcca aggtgcagct ggtggagtct gggggaggcc tggtcaagcc agggggqtcc 60

ctgagactct cctgtgcagc ctctggatcc tcctttagta ataataacat gaattgggtc 120

cgccagactc caggaaaggg actggagtgg gtcgcatcca ttagttttgg aagtcattac 180

atatcctacg cagactcagt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaggaat 240

gcagtttatc tgcagatgaa cagcctgaga gtcgaggaca cggctgtcta ttactgcacg 300

agatgcaggg gcggaactcg tacctattat tacatggacg tctggggcaa aggcaccctg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 147
<211> 390
<212> DNA
<213> 智人

<400> 147
gggcgcgccc agatgcagct ggtgcaatct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 60

gtgaaggtct cctgccagtc ttctggaggc ccccccaaaa gttatactct cagctgggtg 120

cggcaggccc ctggacaagg ccctgagtgg atgggcggaa tcattctaat ctttggccca 180

ccaaactacg cccagaagtt ccaggacaga ctcacgatca ccgcggacaa gtccaccaac 240

[0027]

acagtctaca tggagttaag tagcctgaga tctgatgaca cggccatgta ctactgtgtg 300

acagcccccg acgacactgg cactatatta gctcgtcaca accgttacta ctttgactcc 360

tggggccagg gcaccctggt caccgtctcg 390

<210> 148
<211> 390
<212> DNA
<213> 智人

<400> 148
gggcgcgcca aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaagaagcc cggggagtct 60

ctgaaaatct cctgtcaggc ttctggatac ggctttaccg tctactggat cggctgggtg 120

cgccagccgc ccgggaaagg cctggagtgg ctgggtatca tctatcctgg tgactctgat 180

accagataca atccgtcctt ccaaggccag gtcaccatct cagccgacaa gtccgtcagc 240

accacctacc tgcagtggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccattta ctactgtgcg 300

agacatctgg actcatacga tgttttcact ggttataatt tgggggggcta catggacgtc 360

tggggcaagg gaaccctggt caccgtctcg 390

<210> 149
<211> 351
<212> DNA
<213> 智人

<400> 149
gggcgcgcca aagtgtagct ggtgcagtct gggggaggcc tggtcaagcc tgggggggtcc 60

ctgagactct cctgtgtagt ctctggattc cccctcaata gatacatcat gaactgggtc 120

cgccagactc cagggaaggg gctggagtgg ctctcgtcca ttagtagtac cagttcttac 180

atatactacg cagactcagc gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaagaat 240

tctctgtttc tgcagatgaa cagcctgaga gccgaggaca caggtctcta ttactgtgcg 300

agtggcaata ctcatgacta ttggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc g 351

<210> 150
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 150
gggcgcgccc agatgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggacctca 60

gtgagggtct cctgcaagac ttctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggccccct 120

ggacaagggc ctgagtggat gggagggatc atcaccaact ttgggacaac aaactacgca 180

cagaagttcc agggcagagt cacgattacc gcggacaaat ccacgaacac agtgtatatg 240

gatttgagca acctgacatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agccccccga 300

ggcacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cggtatttct ttgactcctg gggccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 151
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 151
gggcgcgcca aggtgcagct ggtggagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 60

[0028]

gtgaaggtct cctgcaaggc ctctggaggc agcttcagca cctatgctat cacctgggtg 120

cgccaggccc ctggacaggg gcttgaatgg atgggaggga tcatccctat ctttgcttca 180

agagactacg cacagaagtt tcagggcaga gtcacagtca ccgcggacga atccacgagg 240

acagtgtaca tggagctgag cagcctgaga tctgacgaca cggccgtgta ttactgtgca 300

agagtgctgg gaggtacaag gctctactac gctctgaacg tctggggcca agggacaatg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 152
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 152
gggcgcgcca aggtgcagct ggtggagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 60

gtgaaggtct cctgcaagac atctggaggc agtttcagca catactctat cacctgggtg 120

cgccaggccc ctggacaggg gcttgagtgg atgggaggga tcaaccctat cttcgctaca 180

agagactacg cacagaagtt ccagggcaga gtcacgatca ccgcggacga atccacgagg 240

acagtctaca tggagttgag gaacttgaga tctgaggaca cggccgtgta ttattgtgca 300

agagtgttcg gaggaacaag actctactac gccctgaacg tctggggcca aggcaccctg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 153
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 153
gggcgcgccg aagtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggacgtca 60

gtgagggtct cctgcaagac tcctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggcccct 120

ggacaagggc ctgagtggat gggagggatc atcaccaact ttgggacaac aaactacgca 180

cggaagttcc agggcagaat cacggttacc gcggacaaat ccacgaacac agtgtacatg 240

gatttgagca acctggcatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agccccccga 300

ggcacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cgatatttct ttgactcctg gggccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 154
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 154
gggcgcgcca aggtgcagct ggtggagtct gggggaggcc tggtcaagcc gggggggtcc 60

ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc tcctttagta ataataacat gaattgggtc 120

cgccagaccc caggaaaggg actggagtgg gtcgcatcca ttagttttgg aagtcattac 180

atatcctacg cagactcagt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaggaat 240

gcagtttatc tgcagatgaa cagcctgaga gtcgaggaca cggctgtcta ttactgcacg 300

agatgcaggg gcggaactcg tacctattat tacatggacg tctggggcaa agggacaatg 360

gtcaccgtct cg 372

[0029]

<210> 155
<211> 390
<212> DNA
<213> 智人

<400> 155
gggcgcgcca aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaagaagcc cggggagtct 60

ctgaaaatct cctgtcaggc ttctggatac ggctttaccg tctactggat cggctgggtg 120

cgccagccgc ccgggaaagg cctggagtgg ctgggtatca tctatcctgg tgactctgat 180

accagataca atccgtcctt ccaaggccag gtcaccatct cagccgacaa gtccgtcagc 240

accacctacc tgcagtggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccattta ctactgtgcg 300

agacatctgg actcatacga tgttttcact ggttataatt tgggggggcta catggacgtc 360

tggggcaagg gaaccctggt caccgtctcg 390

<210> 156
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 156
gggcgcgccc aggtgcagct ggtggagtct ggggctgaag tgaagaagcc tgggtcctca 60

gtgaaggtct cctgcaagtc ttctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggccccct 120

gggcaaggac tagagtggat gggagggatc atctccaact ttcgcacggc agagtacgca 180

cggaagttcc agggtagagt caccatgacc gcggacacat ccacgaacac aatctacatg 240

gagctgacca gcctgacatc tgaagacacg gccgtatatt tctgtgtgag cgccccccga 300

gacacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cgatacttct ttgacacctg gggccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 157
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 157
gggcgcgccc aggtgcagct acagcagtcg gggggaggcg tggtccagcc tgggaggtcc 60

ctgagactct cctgtgctgc ctctggattc gccttcagag actatgccat gcactgggtc 120

cgccaggccc caggcaaggg gctggagtgg atgggagtta tctcatttaa tggagatcag 180

atattttacg cagactccat gaagggccgc ttcaccatct ccagagagaa ctccaagaac 240

acgctgcatc tgcgcatgaa cagcctgaga cctgaggaca cggctgtcta ttactgtgcg 300

agagcccgac ttctttttttg tagcggtggt aggtgcgaca tggactcttg gggccaggga 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 158
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 158
gggcgcgcca aagtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggacctca 60

gtgagggtct cctgcaagac ttctggaggc tatgttttca gttgggtgcg acaggccccct 120

ggacacgggc ctgaatggat gggagggatc atcaccaact ttgggacagc aacctacgca 180

[0030]

cagaagttcc agggcagagt ctcgattacc gcggacacat ccacgaacac attttacatg 240

gatttgaaca atctgaaatc tgacgacacg gccgtttatt actgtgcgag cgcccccga 300

gacacgtcga ctatagcggc tcggtttaat cggtacttct ttgacttctg gggcccgggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 159
<211> 348
<212> DNA
<213> 智人

<400> 159
gggcgcgcct aggtgcagct ggtgcagtct gggggaggct tggtaaaacc tgggggtcc 60

cttagactct cctgtgcagc ctctggattc actttcagta acgcctggat gagctgggtc 120

cgccaggctc cagggaaggg gctggagtgg gttggccatg ttaaaagcat gactgatggt 180

gggacaacag actacgctgc acccgtgaaa ggcagattca ccatctcaag agatgattca 240

gaaaacacgc tgtatctgca aatgaacagc ctgaagaccg acgacacagc cgtgtattac 300

tgtaccactc atgactactg gggccagggc accctggtca ccgtctcg 348

<210> 160
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 160
gggcgcgcca aagtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggacgtca 60

gtgagggtct cctgcaagac tcctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggcccct 120

ggacaagggc ctgagtggat gggagggatc atcaccaact ttgggacaac aaactacgca 180

cggaagttcc agggcagaat cacggttacc gcggacaaat ccacgaacac agtgtacatg 240

gatttgagca acctggcatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agcccccga 300

ggcacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cgatatttct ttgactcctg gggccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 161
<211> 393
<212> DNA
<213> 智人

<400> 161
gggcgcgccc aggtgcagct ggtggagtct ggggctgaga tgaagaagcc tgggtcctcg 60

gtgaaggtct cctgccaggc ctctggaggc accttcagca actatggcat caattgggtg 120

cgacacgccc ctggacaagg gcttgagtgg atgggaggaa tcgtccctat ctatggtcca 180

ccgaagtacg cacagaagtt ccagggcaga gtcacgatta ctgcggacac gtccacgagc 240

acagcctaca tggagctgag cagcctgagc tctgatgaca cggccgtgta ttactgtgcg 300

cgactttccc ggactgtgtt tggctcgggg acttatcgtc cgggctacta ctacatggac 360

gtctggggca tagggaccac ggtcaccgtc tcg 393

<210> 162
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 162

[0031]

gggcgcgcct aggtgcagct acagcagtct gggggaggcc tggtcaagcc gggggggtcc 60

ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc tcctttagta ataataacat gaattgggtc 120

cgccagactc caggaaaggg actggagtgg gtcgcatcca ttagttttgg aagtcattac 180

atatcctacg cagactcagt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa cgccaggaat 240

gcagtttatc tgcagatgaa cagcctgaga gtcgaggaca cggctgtcta ttactgcacg 300

agatgcaggg gcggaactcg tacctattat tacatggacg tctggggcaa aggcaccctg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 163
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 163
gggcgcgcca aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggacctca 60

gtgagggtct cctgcaagac ttctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggcccct 120

ggacaagggc ctgagtggat gggagggatc atcaccaact ttgggacaac aaactacgca 180

cagaagttcc agggcagagt cacgattacc gcggacaaat ccacgaacac agtgtacatg 240

gatttgagca acctgacatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agccccccga 300

ggcacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cggtatttct ttgactcctg gggccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 164
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 164
gggcgcgccg aagtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 60

gtgaaggtct cctgcaagac tgaaggaggc accttcagca cctatgttat cagttggatg 120

cgacaggccc ctggacaagg gcttgagtgg atgggaggga tcgtccccat ctttaacaca 180

ccaaactacg ctcagaaatt ccagggcaga gtcacaatta ccgcggacag atccacgagc 240

acagcctaca tggagctgag gagcctggga tctgaggaca cggccgtcta ttactgtgcg 300

agggtagtgg gaggtacaag gtcctactac gctttgggct tctggggcca ggggaccacg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 165
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 165
gggcgcgccc aggtcacctt gaaggagtct ggtcctacgc tggtgaaacc cacacagacc 60

ctcacgctga cctgcacgtt ctctggtttc tcactcggca ctactggagt caatgtgggc 120

tggatccgtc agccccccagg aaaggccctg gagtggcttg cactcatttc ttggggtggt 180

ggtaagcact acagcccatc tctgaactcc aggatcaccc tcactaagga cgcctccaga 240

gagcaggtgg tggtccttac aatggccaac atggaccctg tggacacagg cagatattat 300

tgtgcacgta tagtggggac tcacggcttt gactactggg gccagggcac cctggtcacc 360

gtctcg 366

[0032]

<210> 166
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 166
gggcgcgccg aggtccagct ggtgcagtct gggggaggtg tggtgcggcc tgggggtcc 60

ctgagactct cgtgtgcagg ctctggattc acctttgatg aatacgctat gagctgggtc 120

cgccaagctc cagggaaggg gctggagtgg gtcgctttta ttaattggaa tggtgatagc 180

acatattatg cagactctgt gaagggccga ttcaccgtct ccagaaccaa cgccaagaac 240

tccctgtatc tgcaaatgaa cagtctgaga gccgaggaca cggccttcta ttactgtgcg 300

agagaccccc gcactaaact ggggatgtcc tattttgact attggggcca gggcaccctg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 167
<211> 390
<212> DNA
<213> 智人

<400> 167
gggcgcgccg aagtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaagaagcc cggggagtct 60

ctgaaaatct cctgtcaggc ttctggatac ggctttaccg tctactggat cggctgggtg 120

cgccagctgc ccgggaaagg cctggagtgg ctgggtatca tctatcctgg tgactctgat 180

accagataca atccgtcctt ccaaggccag gtcaccatct cagccgacaa gtccgtcagc 240

accacctacc tgcagtggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccattta ctactgtgcg 300

agacatctgg actcatacga tgttttcact ggttataatt tgggggggcta catggacgtc 360

tggggcaagg ggacaatggt caccgtctcg 390

<210> 168
<211> 369
<212> DNA
<213> 智人

<400> 168
gggcgcgccg aggtgcagct ggtgcagtct ggacctgaag tgaagaagcc tggggcctca 60

gtgagggtct cctgcaaggc ctctggttac tcccttaaga actatggtat ccactgggtg 120

cgacaggccc ctggacaggg gcttgagtgg atggggtgga tcagcgctga caatggtgac 180

acaaccactg cactgaacct ccggggcaga gtctccatga ccacagacac atccacaaac 240

acagtctaca tggaggtgaa gagcctaaga tctgacgaca cggccatata tttctgtgcg 300

cgagattttt atagtgggag ttaccggtcc tttgactact ggggccaggg caccctggtc 360

accgtctcg 369

<210> 169
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 169
gggcgcgccg aagtgcagct ggtgcagtcg ggcccaggac tggtgaagcc ttcggagacc 60

ctgtccctca catgcgctgt ctctggtgcc tccgtcagcg gtggtgatta ctactggagc 120

tggatccggc agcccccagg gaaggcactg gagtggattg ggtatatcta ttacataggg 180

[0033]

agcaccaact acaatccctc tctcaagagt cgactctccc tatcagtaga cacggccaag 240

agccagttct ccctgaagtt gagctctgtg accgctgcgg acacggccat ttatttctgt 300

gcgagagcac gtcggacgta tagtggctac gactccgcct ttgactactg gggccaggga 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 170
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 170
gggcgcgccc aggtgcagct gcagcagtcg ggcccaggac tggtgaagcc ctcggagacc 60

ctgccctca cctgcactgt ctctggtggc tccttcagta cctactactg gagctggatc 120

cggcagtccc cagagaaggg actggagtgg attggatata tccaaaacag tgtgaacacc 180

aactacaacc cctccctcaa gagtcgtgtc atcatttcag tggacacgtc caacaaccag 240

ttctccctga agctgaggtc tgtgaccgct gcggacacgg ccgtatatta ctgtgcgaga 300

gtaagcggct ggggcccaag gggaggcatc tactttgact actggggcca gggaaccctg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 171
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 171
gggcgcgcca aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgaag tgaagaagcc tgggtcctca 60

gtgaaggtct cctgcaagtc ttctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggcccct 120

gggcaaggac tagagtggat gggagggatc atctccaact ttcacacggc agagtacgca 180

cagaagttcc agggtagagt caccatgacc gcggacacat ccacgaacac aatctacatg 240

gagctgacca gcctgacatc tgaagacacg gccgtatatt tctgcgtgag cgccccccga 300

gacacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cgatacttct ttgacacctg gggccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 172
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 172
gggcgcgccg aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggacgtca 60

gtgagggtct cccgcaagac tcctggaggc tatgttttca gctgggtgcg acaggcccca 120

ggacaagggc ctgagtggat gggagggatc atcaccaact ttgggacaac aaactacgca 180

cggaagttcc agggcagaat cacggttacc gcggacaaat ccacgaacac agtgtacatg 240

gatttgagca acctggcatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agccccccga 300

ggcacgtcga ctatagcagc tcgttttaat cgatatttct ttgactcctg gagccagggc 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 173
<211> 372
<212> DNA

[0034]

<213> 智人

<400> 173
gggcgcgccg aggtgcagct ggtggagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 60

gtgaaggtct cctgcaaggc ctctggaggc agcttcagca cctatatttt cacctgggtg 120

cgccaggccc ctggacaggg gcttgagtgg atgggaggga tcaatcctat ctttgctaca 180

agagactacc caaagaagtt ccagggcaga gtcacgatca ccgcggacga atccacgagg 240

actgtctata tggagttgag cagcctcaca tctgaggaca cggccgtcta ttactgtgca 300

agagtgttgg gaggtacaag gctctactac gctctgaacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 174
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 174
gggcgcgccg aagtgcagct ggtgcagtct gggggaggtg tggtgcggcc tgggggggtcc 60

ctgagactct cgtgtgcagg ctctggattc acctttgatg aatacgccat gagctgggtc 120

cgccaagctc cagggaaggg gctgaagtgg gtcgctttta ttaattggaa tggtgatagc 180

acatattatg cagactctgt gaagggccga ttcaccgtct ccagatccaa cgccaagaac 240

tccctgtatc tgcaaatgaa cagtctgaga gccgaggaca cggccttcta ttgctgtgcg 300

agagaccccc gcactaaact ggggatgtcc tattttgact attggggcca gggcaccctg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 175
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 175
gggcgcgccg aggtgcagct ggtgcagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 60

gtgaaggtct cctgcaaggc ctctggaggc agcttcagca cctatgctat cacctgggtg 120

cgccaggccc ctggacaggg gcttgaatgg atgggaggga tcatccctat ctttgcttca 180

agagactacg cacagaagtt tcagggcaga gtcacaatca ccgcggacga atccacgagg 240

acagtgtaca tggagccgag gagcctgaga tctgaagaca cggccgtgta ttactgtgca 300

agagtgctgg gaggtacaag gctctactac gctctgaacg tctggggcca aggcaccctg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 176
<211> 378
<212> DNA
<213> 智人

<400> 176
gggcgcgccg aggtgcagct ggtgcagtcg ggcccaggac tggtgaagcc ttcggagacc 60

ctgtccctca catgcgctgt ctctggtgcc tccgtcagcg gtggtgatta ctactggagc 120

tggatccggc agcccccagg gaaggcactg gagtggattg ggtatatcta ttacataggg 180

agcaccaact acaatccctc tctcaagagt cgactctccc tatcagtaga cacggccaag 240

agccagttct ccctgaagtt gagctctgtg accgctgcgg acacggccac ttatttctgt 300

[0035]

gcgagagcac gtcggacgta tagtggctac gactccgcct ttgactactg gggccaggga 360

accctggtca ccgtctcg 378

<210> 177
<211> 372
<212> DNA
<213> 智人

<400> 177
gggcgcgccg aggtgcagct ggtggagtct ggggctgagg tgaagaagcc tgggtcctcg 60

gtgaaggtct cctgcaaggc ctctggaggc agcttcagca cctatgctat cacctgggtg 120

cgccaggccc ctggacaggg gcttgaatgg atgggaggga tcatccctat ctttgcttca 180

agagactacg cacagaagtt tcagggcaga gtcacaatca ccgcggacga atccacgagg 240

acagtgtaca tggagctgag cagcctgaga tctgacgaca cggccgtgta ttactgtgca 300

agaglgclgg gaggtacaag gctctactac gctctgaacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cg 372

<210> 178
<211> 369
<212> DNA
<213> 智人

<400> 178
gggcgcgccc aggtcacctt gaaggagtct ggtcctacag tggtgaaacc cacacagacc 60

ctcacgctga cctgtagcct ctctgggttc gcactcggca ctaccggagt ggctgtgggc 120

tggatccgtc agcccccagg aaaggccctg gaatggcttg gactcatcga ttggaatgat 180

gataggcgct acagaccctc tctgaagacc agactcacca tcacccagga catgtccagg 240

aaccaggtgg tccttagact gaccaacttg gacccactgg acacaggcac atatttttgt 300

gcacgttcag tagtgccggc gactagggcc tttgacttct ggggccaggg caccctggtc 360

accgtctcg 369

<210> 179
<211> 366
<212> DNA
<213> 智人

<400> 179
gggcgcgccc aggtcacctt gaaggagtct ggtcctacgc tggtgaaacc cacacagacc 60

ctcacgctga cctgcacctt gtctgggttc tcactctaca ctactggagt gggtgtgggc 120

tggatccgtc agcccccagg aaaggccctg gagtgactgg cacgcattta ttgggatgat 180

gatgagcgct acaacccgtc tctgaagagc aggctcacca tcaccaagga cgcctccaaa 240

aaccaggtgg tccttaaaat gaccaacatg gaccctgtgg acacagccac atattactgt 300

gcccggacca tgggcgtcgt tcttccattt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcg 366

<210> 180
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 180
ctagccgaaa ttgtgctgac tcagtctcca tcctccctgt ctgcatctct aggagacaga 60

[0036]

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagcac attagcaatt atttaaattg gtatcagcag 120

aaacctggga aagcccctaa actcctgatc tgtgctgcat ccagtttgca aagtggggtc 180

ccatcaaggt tcactggcag tggatctggg gcagattaca ccctcaccat cagcagtctg 240

caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acagtacctc gtggacgttc 300

ggccaaggga ccacggtgga aatcaaa 327

<210> 181
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 181
ctagccgaaa ttgtgttgac acagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt atttagcctg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagttcctaa gctcctgatc tatgctgcat ccactttgca atcaggggtc 180

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 240

cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaagtata acagtgcccc gtacactttt 300

ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 327

<210> 182
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 182
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca tcctccctgt ctgcatctct aggagacaga 60

gtcagcatca cttgccgggc aagtcaacat attagcaatt atataaattg gtatcagcag 120

aaacctggga aagcccctaa actcctgatc tatgctgctt ccactttgca aagtggggtc 180

ccatcaaggt tcactggcag tggatctggg gcagattaca ctctcaccat caccagtctg 240

caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acggtacctc gtggacgttc 300

ggccaaggga ccacggtgga aatcaaa 327

<210> 183
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 183
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt gggagacaga 60

gtcaccatca cttgccaggc gagtcaagac attaccaact atttaaattg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tacgatgcat ccaatttgca accaggggtc 180

ccatcaaggt tcagtggaag tggatctgtg acagatttta ctttcaccat cagcagcctg 240

cggcctgaag atattgcaac atattactgt caacagtatg atggtccagt gcttactttc 300

ggcggaggga ccaaggtaga gatcaaa 327

<210> 184
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 184
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

[0037]

gtcaccatct cttgccgggc aagtcagccc attagcacct atttaaattg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagcccctaa gatcctgatc tttggtgcat ctcgtttgca aagtggtgtc 180

ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca gtctcaccat caccagtctc 240

caacctgaag attttgcaac ttacatctgt caacaaagca agagtccccc gtacaatttt 300

ggccgggggga ccaagctgga gatcaaa 327

<210> 185
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 185
ctagccgaaa ttgtgttgac acagtctcct tccaccctgt ctgcatctgt aggcgacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc cagtcagagt attggtagct ggttggcctg gtatcaacag 120

aaaccaggga aagcccctaa actcctgatc tataaggcgt ctactttaca aagtgagacc 180

ccttcaaggt tccgcggcag tggatctggg accgaattca ctctcaccat cagcagcctg 240

cagcctgatg attttgcaac ttactactgc caacagttta atagttttc tccgtggacg 300

ttcggccaag ggaccaaggt ggaattcaaa 330

<210> 186
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 186
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca tcgtccctgt ctgcatctgt tggtgacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attaacatta atttaaattg gtttcagcag 120

aaacccggga aagcccctaa cctactgatc tattctgcat ccactttgca aactggggtc 180

ccctcaaggt tcagtggaag tggatctggg acagagttca ctctcaccat cagcagtcta 240

caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagattt acagtcatgt taggacgttc 300

ggccaaggga ccaaggtgga gatcaaa 327

<210> 187
<211> 345
<212> DNA
<213> 智人

<400> 187
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca gactccctgg ctgtgtctct gggcgagagg 60

gccaccatca actgcaagtc cagccagagt cttttgtaca gctccaacaa taagaattac 120

ttagcttggt accagcagaa accaggacag cctcctaagt tgctcattta ctgggcatct 180

acccgggaat ccggggtccc tgaccgattc agtggcagcg ggtctgggac agatttcact 240

ctcaccatca gcagcctgca ggctgaagat gtggcagttt attactgtca gcaatattat 300

agtactcctc cgatgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaa 345

<210> 188
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 188
ctagccgaaa ttgtgttgac acagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt gggagacaga 60

[0038]

atcaccatca cttgccaggc gagtcaagac attaccaact atttaaattg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tacgatgcat ccaatttgca accaggggtc 180

ccatcaaggt tcagtggaag tagatctggg acagatttta ctttcaccat cagcagcctg 240

cggcctgaag atattgcaac atattactgt caacagtatg atggtccagt gcttactttc 300

ggcggaggga ccaaggtaga gatcaaa 327

<210> 189
<211> 345
<212> DNA
<213> 智人

<400> 189
ctagccgaaa ttgtgttgac acagtctcca gactccctgg ctgtgtctct gggcgagagg 60

gccaccatca actgcaagtc cagccagagt cttttataca gctccaacaa taagaactac 120

ttagcttggt accagcagaa accaggacag cctcctaagt tgctcatttt ctgggcatct 180

acccgggaat ccggggtccc tgaccgattc agtggcagcg ggtctgggac agatttcacc 240

ctcaccatca gcagcctgca ggctgaagat gtggcagttt attactgtca gcaatattat 300

agtactcctc cgatgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaa 345

<210> 190
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 190
ctagccgaaa ttgtgttgac acagtctcca tccttcctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc cagtcagggc attgggaatt ttttagcctg gtatcagcaa 120

aaaccaggga aagcccctaa gctcctaatc tctggtgcat ccactttgca aagttgggtc 180

ccatcaaggt tcagcggccg tggatctggg accgaattca ccctcacaat cagcagcctg 240

cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagctta atcgttaccc tccatacact 300

tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa 330

<210> 191
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 191
ctagccgaaa ttgtgatgac gcagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt gggagacaga 60

gtcaccatca cttgccaggc gagtcaggac attagcaaat atttaaattg gtatcagcag 120

aaaccaggga gagcccctaa actcctgatc tacgaagcat ccaatttgga gacaggggtc 180

ccaccaaggt tcagtggaag tggatctggg acacatttta ctttcaccat caccggcctg 240

cagcctgaag atattgcaac atattactgt caacagtgtg atagtctgcc tccggtcttt 300

ggccagggga ccaagctgga agtcaaa 327

<210> 192
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 192
ctagccgaaa ttgtgctgac tcagtctcca ggcaccctgg ctttgtctcc aggtgataga 60

[0039]

gccaccctct cctgcggggc cagtcagagc gtgttcggcg acttcttagc ctggtaccaa 120

cacaagcctg gccaggctcc caggctcctc atctatggtg cttccaccag ggccactggc 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtggagct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aggattttgc agtttatttc tgtcagtagt atggtgactc agtgttcacg 300

ttcggccaag ggaccaagtt gggaatcaaa 330

<210> 193
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 193
ctagccgaaa ttgtgatgac acagtctcca ggcaccctgg ctttgtctcc aggtgataga 60

gccaccctct cctgcggggc cagtcagagc gtgttcggcg acttcttagc ctggtaccaa 120

cacaagcctg gccaggctcc caggctcctc atctatggtg cttccaccag ggccactggc 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtggagct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aggattttgc agtttatttc tgtcagcagt atggtgactc agtgttcacg 300

ttcggccaag ggaccaagtt ggaaatcaaa 330

<210> 194
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 194
ctagccgaaa ttgtgttgac acagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc agggcaaaga 60

gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt gttaacagag actacctagc ctggtaccag 120

cagaaacctg gctaggctcc caggctcctc atctatggtg catccagcag ggccactggc 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct ggaacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcgag acgattttgc agtgtatttc tgtcaccagt atggtagctc acctaacact 300

tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa 330

<210> 195
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 195
ctagccgaaa cgacactcac gcagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

gccaccctct cctgcagggc cagtcagagc gttagcacca actacttagc ctggtaccga 120

cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atccatggtg catccagccg ggccactggc 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aagattttgc agtgtatttc tgtcagcagt atggtagctc acctcagacg 300

ttcggccaag ggaccaggtt ggaaatcaaa 330

<210> 196
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 196
ctagccgaaa ttgtgctgac tcagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt tggtgacaga 60

[0040]

gtcaccacca cttgccggac aagtcagagc attttcatta atttaaattg gtttcagcag 120

aaacccggga aagcccctaa actcctgatc tattctgcat ccactttgca aactggggtc 180

ccctcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat cagcagtcta 240

caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagattt acagtcaggt taggacgttc 300

ggccaaggga ccaaggtgga gatcaaa 327

<210> 197
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 197
ctagccgaca tccagatgac ccagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt gttaacagcg acaacttagc ctggtaccag 120

cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atgtctgggt caaccagtag ggccactgac 180

gtcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aagattttgc agtgtattac tgtcaccagt atggtagctc agataacact 300

tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa 330

<210> 198
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 198
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtttcct tcctctctgt ctgcatctgt gggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt ttttagcctg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagttcctga gctccttatc tatggtgcat ccactttgca atcaggggtc 180

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg gcagagttca cactcaccat caacagcctg 240

cagcctgaag atgttgcgac ttattactgt caaaagtatg acagtggcct gagattcact 300

ttcggccctg ggaccaaagt ggatatcaaa 330

<210> 199
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 199
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcct tcctctctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt ttttagcctg gcatcagcag 120

aaaccagggc aagttcctaa actcctgatc tatggtgcat ccactttgca atcaggggtc 180

ccatctcgct tcagtggcag tggatctggc acagatttca ctctcaccat caacggcctg 240

cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaagtatg acagtggcct gatattcact 300

ttcggccctg ggaccagagt ggagatcaaa 330

<210> 200
<211> 345
<212> DNA
<213> 智人

<400> 200
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca gactccctgg ctgtgtctct gggcgagagg 60

[0041]

gccaccatca actgcaagtc cagccagagt cttttataca gctccaacaa taagaactac 120

ttagcttggt accagcagaa accaggacag cctcctaagt tgctcattta ctgggcatct 180

acccgggaat ccggggtccc tgaccgattc agtggcagcg ggtctgggac agatttcact 240

ctcaccatca gcagcctgca ggctgaagat gtggcagttt attactgtca gcaatattat 300

agtactcctc cgatgctcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaa 345

<210> 201
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 201
ctagccgatg ttgtgatgac ttagtctcca ggcaccctgg ctttgtctcc aggtgataga 60

gccaccctct cctgcggggc cagtcagagc gtgttcggcg acttcttagc ctggtaccaa 120

cacaagcctg gccaggctcc caggctcctc atctatgttg ctttccaccag ggccactggc 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtggagct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aggattttgc agtttatttc tgtcagcagt atggtgactc agtgttcacg 300

ttcggccaag ggaccaagtt ggaaatcaga 330

<210> 202
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 202
ctagccgaaa cgacactcac gcagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

gccaccctct cctgcagggc cagtcagagc gttagcacca actacttagc ctggtaccga 120

cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atccatggtg catccagccg ggccactggc 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aagattttgc agtgtatttc tgtcagcagt atggtagctc acctcagacg 300

ttcggccaag ggaccaggtt ggaaatcaaa 330

<210> 203
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 203
ctagccgaaa ttgtgctgac tcagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

gccaccctct cctgcagggc cagtcggagt gtaaacagca acaacttagc ctggtatcag 120

cagaaacctg accaggctcc caggctcctc atgtatggtg catccagtag ggccactggc 180

atcccagaca ggttcactgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aagattttgc agtgtattac tgtcatcagt atggtgcctc agataacact 300

tttggccagg ggaccaagct ggagatcaag 330

<210> 204
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 204
ctagccgaaa ttgtgatgac acagtctcca tccttcctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

[0042]

gtcaccatca cttgccgggc cagtcaggac attatcactt atttagcctg gtatcaacaa 120

aaaccaggga aagcccctga ggtcctgatc tttggtgcgt ccactttgca aagtggggtc 180

ccatcaagat tcagcggcag tggatctggg accgaattca ctctcactat ctccagcctg 240

cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagatta ttcgttaccc tcgcactttc 300

ggccaaggga ccagggtgga aatcaaa 327

<210> 205
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 205
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

gccaccctct cctgccgggc cagtcagagt gttaacagca acaacttagc ctggtaccag 120

cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atctctgggt caaccaatag ggccactgac 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aagattttgc agtgtattac tgtcaccagt atggtagctc agagaacact 300

tttggccagg ggaccaagct ggagatcaga 330

<210> 206
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 206
ctagccgaaa ttgtgatgac gcagtctcca cccttcctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc cagtcagggc ttaagcactt atttagcctg gtatcaggta 120

aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tatgctgcat ccactttgca aagtggggtc 180

ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagaattca ctctcacaat caacagcctg 240

cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacaacttg atacttaccc tctcactctc 300

ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaa 327

<210> 207
<211> 345
<212> DNA
<213> 智人

<400> 207
ctagccgaaa ttgtgttgac acagtctcca gactccctgg ctgtgtctct gggcgagagg 60

gccaccatca actgcaagtc cagccagagt cttttatata gctccaacaa taagaactac 120

ttagcttggt accagcagaa accaggacag cctcctaagt tgctcattta ctgggcatct 180

acccgggaat ccggggtccc tgaccgattc agtggcagcg ggtctgggac agatttcact 240

ctcaccatca gcagcctgca ggctgaagat gtggcagttt attactgtca gcaatattat 300

agtactcctc cgatgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaa 345

<210> 208
<211> 345
<212> DNA
<213> 智人

<400> 208
ctagccgaca tccagatgac ccagtctcca gactccctgg ctgtgtctct gggcgagagg 60

[0043]

gccaccatca actgcaagtc cagccagagt cttttataca gctccaacaa taagaactac 120

ttagcttggt accagcagaa accaggacag cctcctaagt tgctcattta ctgggcatct 180

acccgggaat ccggggtccc tgaccgattc agtggcagcg ggtctgggac agatttcact 240

ctcaccatca gcagcctgca ggctgaagat gtggcagttt attactgtca gcaatattat 300

agtactcctc cgatgttcgg ccaagggacc agggtggaaa tcaaa 345

<210> 209
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 209
ctagccgaaa ttgtgatgac acagtctcca ggcaccctgg ctttgtctcc aggtgataga 60

gccaccctct cctgcggggc cagtcagagc gtgttcggcg acttcttagc ctggtaccaa 120

cacaagcctg gccaggctcc caggcccctc atctatggtg ctttccaccag ggccactggc 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtggagct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aggattttgc agtttatttc tgtcagcagt atggtgactc agtgttcacg 300

ttcggccaag ggaccaagtt ggaaatcaaa 330

<210> 210
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 210
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

gccaccctct cctgcagggc cagtcagagt gttaacagcg acaacttagc ctggtaccag 120

cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atgtctggtg caaccagtag ggccactgac 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aagattttgc agtgtattac tgtcaccagt atggtagctc agataacact 300

tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa 330

<210> 211
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 211
ctagccgaca tccagttgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt tggagacagc 60

gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt ttttagcctg gtatcagaag 120

aaaccgggaa aagttcctag gctcctgatc tatggtgcat ccactttgca atcaggggtc 180

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg accgatttca ctctcaccat cagcagcctg 240

cagcctgaag atgttgcgac ttattactgt caggagtata gcaatgccct gatattcact 300

ttcggccctg ggaccaaagt tcatatcaaa 330

<210> 212
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 212
ctagccgaaa ttgtgatgac acagtctcca tccttcctgt ctgcgtctgt aggagacaga 60

[0044]

gtcaccatca cttgccgggc cagtcagggc attgggaatt ttttagcctg gtatcagcaa 120

aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tctggtgcat ccactttgca aagttgggtc 180

ccatcaaggt tcagcggccg tggatctggg accgaattca ctctcacaat cagcagcctg 240

cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagctta atcgttaccc tccatacact 300

tttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa 330

<210> 213
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 213
ctagccgaaa ttgtgatgac acagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagacc attagcaacc atttaaattg gtatcagcag 120

aaaccaggga gagcccctaa gctcctgatc tatgttgggt ccagtctgca aagtggggtc 180

ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagtggtctg 240

caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acagtccctc gtacactttt 300

ggccagggga ccaaggtgga gatcaaa 327

<210> 214
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 214
ctagccgaca tccagttgac ccagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

gccaccctct cctgcagggc cagtcagagc gttagcacca actacttagc ctggtaccga 120

cagaaacctg gccaggctcc caggctcctc atccatggtg catccagccg ggccactggc 180

atcccagaca ggttcagtgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aagattttgc agtgtatttc tgtcagcagt atggtagctc acctcagacg 300

ttcggccaag ggaccaggtt ggaaatcaaa 330

<210> 215
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 215
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca tcctccctgt ctgcatctct aggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagcat attagcaatt atttaaattg gtatcagcag 120

aaacctggga aagcccctaa actcctgatc tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc 180

ccatcaaggt tcactggcag tggatctggg gcagattaca ctctcaccat cagcagtctg 240

caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acagcacctc gtggacgttc 300

ggccaaggga ccacggtggg aatcaaa 327

<210> 216
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 216
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

[0045]

gtcagcatca cttgccgggc aagtcggagc gttaagacct atttaaattg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagcccctaa gctcctggtc tatggttcgt ccagtttgga aagtggggtc 180

ccatcaagat tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg 240

caacctgagg attttgcaac ttactactgt caacagagtt tcggtacccc ctacactttt 300

ggccagggga ccaagctgga caccaaa 327

<210> 217
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 217
ctagccgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aagtgacaga 60

gtcaccatta cttgccgggc aagtcagagc attaacaagt tcttaaactg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagcccctca gctcctcatc tatgctgcaa ccaatttgca gagtggggtc 180

ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagacttca ctctcaccat cagcagtctg 240

caaactgaag attttgccac ttactactgt caacagagtt acgatatgcc tcggacgttc 300

ggccaaggga ccaaggtgga gatcaaa 327

<210> 218
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 218
ctagccgaaa ttgtgctgac tcagtctcca ggcaccctgt ctttgtctcc aggggaaaga 60

gccaccctct cctgcagggc cagtcggagt gtatacagca acaacttagc ctggtatcag 120

cagaaacctg accaggctcc caggctcctc atgtatggtg catccagtag ggccactggc 180

atcccagaca ggttcactgg cagtgggtct gggacagact tcactctcac catcagcaga 240

ctggagcctg aagattttgc agtgtattac tgtcatcagt atggtgcctc agataacact 300

tttggccagg ggaccaagct ggagatcaag 330

<210> 219
<211> 345
<212> DNA
<213> 智人

<400> 219
ctagccgaca tccagatgac ccagtctcca gactccctgg ctgtgtctct gggcgagaag 60

gccaccatca actgcaagtc cagccagagt cttttatata gctccaacaa taagaactac 120

ttagcttggt accagcagaa accaggacag cctcctaagt tgctcattta ctgggcatct 180

acccgggaat ccggggtccc tgaccgattc agtggcagcg ggtctgggac agatttcact 240

ctcaccatca gcagcctgca ggctgaagat gtggcagttt attactgtca gcaatattat 300

agtactcctc cgatgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaa 345

<210> 220
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 220
ctagccgaaa ttgtgatgac gcagtctcct tcctctctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

[0046]

gtcaccatct cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt ttttagcctg gtttcagcag 120

aaaccaggtc aagttcctaa gctcctgatc tatgttgcat ccactttgca atcaggggtc 180

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca gtctcaccat caacggcctg 240

cagcctgagg atgttgcaac ttattactgt caaaggtatg acagtggcct gatattcact 300

ttcggccctg ggaccaaagt ggagatcaaa 330

<210> 221
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 221
ctagccgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagacc attagcaacc atttaaattg gtatcagcag 120

aaaccaggga gagcccctaa gctcctgatc tatgttgggt ccagtctgcg aagtggggtc 180

ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagtggtctg 240

caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtt acagtccctc gtacactttt 300

ggccagggga ccaaggtgga gatcaaa 327

<210> 222
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 222
ctagccgaaa ttgtgttgac acagtctcct tcctctctgt ctgcatctgt gggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt ttttagcctg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagttcctga gctccttatc tatggcgcat ccactttgca atcgggggtc 180

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat caacagcctg 240

cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaagtatg acagtggcct gagattcact 300

ttcggccctg gggccaaagt ggatatcaaa 330

<210> 223
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 223
ctagccgatg ttgtgatgac tcagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

gtcagcatca cttgccgggc aagtcggagc gttaagacct atttaaattg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagcccctaa gctcctggtc tatggttcgt ccagtttgga aagtggggtc 180

ccatcaagat tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg 240

caacctgagg attttgcaac ttactgctgt caacagagtt tcggtacccc ctacactttt 300

ggccagggga ccaagctgga catcaaa 327

<210> 224
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 224
ctagccgaca tccagttgac ccagtctcct tcctctctgt ctgcatctgt gggagacaga 60

[0047]

gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt ttttagcctg gtatcagcag 120

aaaccaggga aagttcctga gctccttatc tatggtgcat ccaccttgca atcaggggtc 180

ccatctcggt tcagtggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat caacagcctg 240

cagcctgaag atgttgcgac ttattactgt caaaagtatg atagtggcct gagattcact 300

ttcggccctg ggaccaaagt ggatatcaaa 330

<210> 225
<211> 327
<212> DNA
<213> 智人

<400> 225
ctagccgaca tccagatgac ccagtcttct tccaccctgt ctgcatctgt aggagacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc cagtcagaat attaatatct ggttggcctg gtatcagcag 120

aaagcaggga aagcccccaa actcctgatc tataaggcgt ctactttaga aaggggggtc 180

ccctcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat caccggcctg 240

cgccctgacg atttcggaag ttattattgc caacactatg atggtaattc actaacgttc 300

ggccaaggga ccagggtgga tatccaa 327

<210> 226
<211> 330
<212> DNA
<213> 智人

<400> 226
ctagccgaca tccagttgac ccagtctcct tccaccctgt ctgcatctgt aggcgacaga 60

gtcaccatca cttgccgggc cagtcagagt attggtagct ggttggcctg gtatcaacag 120

aaaccaggga aagcccctaa actcctgatc tataaggcgt ctactttaca aagtgagacc 180

ccttcaaggt tccgcggcag tggatctggg accgaattca ctctcaccat cagcagcctg 240

cagcctgatg attttgcaac ttactactgc caacagttta atagttttc tccgtggacg 300

ttcggccaag ggaccaaggc ggaattcaaa 330

<210> 227
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 227

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
20 25 30

Lys Asn Tyr Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Asp Asn Gly Asp Thr Thr Thr Ala
50 55 60

Leu Asn Leu Arg Gly Arg Val Ser Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn
65 70 75 80

[0048]

Thr Val Tyr Met Glu Val Lys Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile
85 90 95

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Phe Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Ser Phe Asp
100 105 110

Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 228
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 228

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30

Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Pro Gly Trp Ala Ala Thr Arg Ala Ala Gly
100 105 110

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 229
<211> 119
<212> PRT
<213> 智人

<400> 229

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Glu Lys Cys Asp
20 25 30

Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
35 40 45

Trp Ile Ser Ala Asp Asp Gly Gly Thr Thr Thr Ala Leu Asn Leu Arg
50 55 60

Gly Arg Val Ser Met Thr Thr Asp Arg Ala Thr Asn Thr Val Tyr Met
65 70 75 80

[0049]

Glu Leu Lys Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Phe Tyr Ser Gly Thr Tyr Arg Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 230
<211> 132
<212> PRT
<213> 智人

<400> 230

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30

Arg Thr Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Leu Ala Phe Leu Ser Ser Asp Gly Ser Asp Glu Phe Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser
65 70 75 80

Thr Leu Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Arg Pro Asp Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Ala Gln Ile Thr Leu Phe Gly Ala
100 105 110

Pro Leu Ile Arg Pro Ser Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125

Val Thr Val Ser
130

<210> 231
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人

<400> 231

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
20 25 30

Asn Ser Tyr Gly Ile Ala Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

[0050]

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Pro Tyr Ser Gly His Thr Asn Tyr Ala
50 55 60

Glu Lys Val Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ala Thr Ser
65 70 75 80

Thr Ala Cys Met Glu Leu Thr Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr His Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Trp Ser Pro Ser Arg
115 120

<210> 232
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 232

Gly Arg Ala Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Gly Phe Ser Leu
20 25 30

Tyr Thr Thr Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Arg Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Glu Arg Tyr
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Ala Ser Lys
65 70 75 80

Asn Gln Val Val Leu Lys Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
85 90 95

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Met Gly Val Val Leu Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 233
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 233

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Pro Leu
20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

[0051]

Glu Trp Leu Ser Ser Ile Ser Ser Thr Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80

Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Leu
85 90 95

Tyr Phe Cys Ala Ser Gly Asn Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 234
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 234

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Leu Gly Thr Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Thr Pro Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Arg Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Ile Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met
65 70 75 80

Asp Leu Ser Asn Leu Ala Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Pro Arg Gly Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 235
<211> 132
<212> PRT
<213> 智人

<400> 235

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30

[0052]

Arg Thr Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Val Leu
35 40 45

Glu Trp Leu Ala Phe Val Ser Ser Asp Gly Ser Asp Glu Phe Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ser
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Gly Ala Gln Ile Thr Leu Phe Gly Ala
100 105 110

Pro Leu Ile Arg Pro Ser Ser Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125

Val Thr Val Ser
130

<210> 236
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 236

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Ser Phe Gly Thr Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ala Thr Asn Thr Val Tyr Met
65 70 75 80

Asp Leu Ser Asp Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Lys Ala Pro Arg Gly Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 237
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 237

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys
1 5 10 15

[0053]

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
20 25 30

Gly Thr Thr Gly Val Asn Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Lys His Tyr
50 55 60

Ser Pro Ser Leu Asn Ser Arg Ile Thr Leu Thr Lys Asp Ala Ser Arg
65 70 75 80

Glu Gln Val Val Val Pro Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr
85 90 95

Gly Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Val Gly Thr His Gly Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 238
<211> 131
<212> PRT
<213> 智人

<400> 238

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Thr Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe
20 25 30

Asn Asp Tyr Cys Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Gly Asn Asn Ala Asp Thr Phe Tyr Ala
50 55 60

Pro Lys Leu Gln Gly Arg Val Thr Met Ser Thr Asp Thr Ser Thr Ser
65 70 75 80

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Asn Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Arg Gly Arg Ile Thr Leu Phe Gly Glu Val
100 105 110

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

Thr Val Ser
130

<210> 239
<211> 124
<212> PRT

[0054]

<213> 智人

<400> 239

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Asn Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Phe Gly Ser His Tyr Ile Ser Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
65 70 75 80

Ala Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Thr Arg Cys Arg Gly Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Tyr Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 240
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 240

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Asn Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Phe Gly Ser His Tyr Ile Ser Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
65 70 75 80

Ala Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Thr Arg Cys Arg Gly Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Tyr Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 241

[0055]

<211> 130
<212> PRT
<213> 智人

<400> 241

Gly Arg Ala Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ser Ser Gly Gly Pro Pro
20 25 30

Lys Ser Tyr Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Leu Ile Phe Gly Pro Pro Asn Tyr Ala
50 55 60

Gln Lys Phe Gln Asp Arg Leu Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn
65 70 75 80

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met
85 90 95

Tyr Tyr Cys Val Thr Ala Pro Asp Asp Thr Gly Thr Ile Leu Ala Arg
100 105 110

His Asn Arg Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
115 120 125

Val Ser
130

<210> 242
<211> 130
<212> PRT
<213> 智人

<400> 242

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Gly Phe
20 25 30

Thr Val Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Asn
50 55 60

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Val Ser
65 70 75 80

Thr Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Leu Asp Ser Tyr Asp Val Phe Thr Gly Tyr
100 105 110

[0056]

Asn Leu Gly Gly Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr
115 120 125

Val Ser
130

<210> 243
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa 相应于终止密码子

<400> 243

Gly Arg Ala Lys Val Xaa Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Phe Pro Leu
20 25 30

Asn Arg Tyr Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Leu Ser Ser Ile Ser Ser Thr Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80

Ser Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Leu
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Ser Gly Asn Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 244
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 244

Gly Arg Ala Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
50 55 60

[0057]

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met
65 70 75 80

Asp Leu Ser Asn Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Pro Arg Gly Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 245
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 245

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe
20 25 30

Ser Thr Tyr Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Ala Ser Arg Asp Tyr Ala
50 55 60

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Ala Asp Glu Ser Thr Arg
65 70 75 80

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Gly Gly Thr Arg Leu Tyr Tyr Ala Leu
100 105 110

Asn Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120

<210> 246
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 246

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Ser Phe
20 25 30

Ser Thr Tyr Ser Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ile Phe Ala Thr Arg Asp Tyr Ala

[0058]

50 55 60

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Arg
65 70 75 80

Thr Val Tyr Met Glu Leu Arg Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Phe Gly Gly Thr Arg Leu Tyr Tyr Ala Leu
100 105 110

Asn Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 247
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 247

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Thr Pro Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Arg Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Ile Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met
65 70 75 80

Asp Leu Ser Asn Leu Ala Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Pro Arg Gly Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 248
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 248

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Asn Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

[0059]

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Phe Gly Ser His Tyr Ile Ser Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
65 70 75 80

Ala Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Thr Arg Cys Arg Gly Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Tyr Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120

<210> 249
<211> 130
<212> PRT
<213> 智人

<400> 249

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Gly Phe
20 25 30

Thr Val Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Asn
50 55 60

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Val Ser
65 70 75 80

Thr Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Leu Asp Ser Tyr Asp Val Phe Thr Gly Tyr
100 105 110

Asn Leu Gly Gly Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr
115 120 125

Val Ser
130

<210> 250
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 250

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Gly Tyr Val

[0060]

20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Ser Asn Phe Arg Thr Ala Glu Tyr Ala Arg Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ile Tyr Met
65 70 75 80

Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val
85 90 95

Ser Ala Pro Arg Asp Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 251
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 251

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
1 5 10 15

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe
20 25 30

Arg Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Val Ile Ser Phe Asn Gly Asp Gln Ile Phe Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ser Lys Asn
65 70 75 80

Thr Leu His Leu Arg Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Leu Leu Phe Cys Ser Gly Gly Arg Cys
100 105 110

Asp Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 252
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 252

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

[0061]

Pro Gly Thr Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Pro Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Asn Phe Gly Thr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Val Ser Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Phe Tyr Met
65 70 75 80

Asp Leu Asn Asn Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ser Ala Pro Arg Asp Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Phe Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 253
<211> 116
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 相应于终止密码子

<400> 253

Gly Arg Ala Xaa Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30

Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly His Val Lys Ser Met Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp
50 55 60

Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75 80

Glu Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Asp Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr His Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser
115

<210> 254
<211> 126

[0062]

<212> PRT
<213> 智人

<400> 254

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Thr Pro Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Arg Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Ile Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met
65 70 75 80

Asp Leu Ser Asn Leu Ala Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Pro Arg Gly Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 255
<211> 131
<212> PRT
<213> 智人

<400> 255

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Met Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Gln Ala Ser Gly Gly Thr Phe
20 25 30

Ser Asn Tyr Gly Ile Asn Trp Val Arg His Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Ile Val Pro Ile Tyr Gly Pro Pro Lys Tyr Ala
50 55 60

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser
65 70 75 80

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Ser Ser Asp Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Arg Thr Val Phe Gly Ser Gly Thr Tyr
100 105 110

Arg Pro Gly Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Ile Gly Thr Thr Val
115 120 125

[0063]

Thr Val Ser
130

<210> 256
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa 相应于终止密码子

<400> 256

Gly Arg Ala Xaa Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe
20 25 30

Ser Asn Asn Asn Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Phe Gly Ser His Tyr Ile Ser Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn
65 70 75 80

Ala Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Thr Arg Cys Arg Gly Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Tyr Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 257
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 257

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met
65 70 75 80

[0064]

Asp Leu Ser Asn Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Pro Arg Gly Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 258
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 258

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Glu Gly Gly Thr Phe
20 25 30

Ser Thr Tyr Val Ile Ser Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Ile Val Pro Ile Phe Asn Thr Pro Asn Tyr Ala
50 55 60

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser
65 70 75 80

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Gly Ser Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Val Gly Gly Thr Arg Ser Tyr Tyr Ala Leu
100 105 110

Gly Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 259
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 259

Gly Arg Ala Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
20 25 30

Gly Thr Thr Gly Val Asn Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Leu Ile Ser Trp Gly Gly Gly Lys His Tyr
50 55 60

Ser Pro Ser Leu Asn Ser Arg Ile Thr Leu Thr Lys Asp Ala Ser Arg
65 70 75 80

[0065]

Glu Gln Val Val Val Leu Thr Met Ala Asn Met Asp Pro Val Asp Thr
85 90 95

Gly Arg Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Val Gly Thr His Gly Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 260
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 260

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30

Asp Glu Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Phe Ile Asn Trp Asn Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Thr Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Arg Thr Lys Leu Gly Met Ser Tyr Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 261
<211> 130
<212> PRT
<213> 智人

<400> 261

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Ala Ser Gly Tyr Gly Phe
20 25 30

Thr Val Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Leu Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Asn
50 55 60

[0066]

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Val Ser
65 70 75 80

Thr Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Leu Asp Ser Tyr Asp Val Phe Thr Gly Tyr
100 105 110

Asn Leu Gly Gly Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Met Val Thr
115 120 125

Val Ser
130

<210> 262
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 262

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ala Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Leu
20 25 30

Lys Asn Tyr Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Trp Ile Ser Ala Asp Asn Gly Asp Thr Thr Thr Ala
50 55 60

Leu Asn Leu Arg Gly Arg Val Ser Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Asn
65 70 75 80

Thr Val Tyr Met Glu Val Lys Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile
85 90 95

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Phe Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Ser Phe Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 263
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 263

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Ala Ser Val
20 25 30

Ser Gly Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

[0067]

Ala Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ile Gly Ser Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Ser Leu Ser Val Asp Thr Ala Lys
65 70 75 80

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

Ile Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Arg Arg Thr Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser
100 105 110

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

<210> 264
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 264

Gly Arg Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Ser Glu Thr Leu Pro Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Phe
20 25 30

Ser Thr Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Gln Asn Ser Val Asn Thr Asn Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Asn Asn Gln
65 70 75 80

Phe Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Gly Trp Gly Pro Arg Gly Gly Ile Tyr Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 265
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 265

Gly Arg Ala Lys Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ser Ser Gly Gly Tyr Val
20 25 30

[0068]

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Ser Asn Phe His Thr Ala Glu Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ile Tyr Met
65 70 75 80

Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Val
85 90 95

Ser Ala Pro Arg Asp Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Thr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 266
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 266

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Val Arg Val Ser Arg Lys Thr Pro Gly Gly Tyr Val
20 25 30

Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met Gly
35 40 45

Gly Ile Ile Thr Asn Phe Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Arg Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Arg Ile Thr Val Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr Met
65 70 75 80

Asp Leu Ser Asn Leu Ala Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Pro Arg Gly Thr Ser Thr Ile Ala Ala Arg Phe Asn Arg Tyr
100 105 110

Phe Phe Asp Ser Trp Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 267
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 267

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe
20 25 30

[0069]

Ser Thr Tyr Ile Phe Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Ile Phe Ala Thr Arg Asp Tyr Pro
50 55 60

Lys Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Arg
65 70 75 80

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Gly Gly Thr Arg Leu Tyr Tyr Ala Leu
100 105 110

Asn Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 268
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 268

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Arg
1 5 10 15

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30

Asp Glu Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Lys Trp Val Ala Phe Ile Asn Trp Asn Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Ala
50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Ser Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Phe
85 90 95

Tyr Cys Cys Ala Arg Asp Pro Arg Thr Lys Leu Gly Met Ser Tyr Phe
100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 269
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 269

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

[0070]

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe
20 25 30

Ser Thr Tyr Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Ala Ser Arg Asp Tyr Ala
50 55 60

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Arg
65 70 75 80

Thr Val Tyr Met Glu Pro Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Gly Gly Thr Arg Leu Tyr Tyr Ala Leu
100 105 110

Asn Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 270
<211> 126
<212> PRT
<213> 智人

<400> 270

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Ala Ser Val
20 25 30

Ser Gly Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ile Gly Ser Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Ser Leu Ser Val Asp Thr Ala Lys
65 70 75 80

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

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Arg Arg Thr Tyr Ser Gly Tyr Asp Ser
100 105 110

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

<210> 271
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

<400> 271

Gly Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
1 5 10 15

[0071]

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe
20 25 30

Ser Thr Tyr Ala Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Ala Ser Arg Asp Tyr Ala
50 55 60

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Arg
65 70 75 80

Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Gly Gly Thr Arg Leu Tyr Tyr Ala Leu
100 105 110

Asn Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
115 120

<210> 272
<211> 123
<212> PRT
<213> 智人

<400> 272

Gly Arg Ala Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Val Val Lys
1 5 10 15

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Ser Leu Ser Gly Phe Ala Leu
20 25 30

Gly Thr Thr Gly Val Ala Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Leu Glu Trp Leu Gly Leu Ile Asp Trp Asn Asp Asp Arg Arg Tyr
50 55 60

Arg Pro Ser Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Thr Gln Asp Met Ser Arg
65 70 75 80

Asn Gln Val Val Leu Arg Leu Thr Asn Leu Asp Pro Leu Asp Thr Gly
85 90 95

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Val Val Pro Ala Thr Arg Ala Phe Asp
100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 273
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<220>

[0072]

<221> MISC_FEATURE
<222> (52)..(52)
<223> Xaa 相应于终止密码子

<400> 273

Gly Arg Ala Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys
1 5 10 15

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Gly Phe Ser Leu
20 25 30

Tyr Thr Thr Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
35 40 45

Ala Leu Glu Xaa Leu Ala Arg Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Glu Arg Tyr
50 55 60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Ala Ser Lys
65 70 75 80

Asn Gln Val Val Leu Lys Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
85 90 95

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Met Gly Val Val Leu Pro Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 274
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 274

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser
20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Cys Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr
85 90 95

Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Thr Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 275
<211> 109
<212> PRT

[0073]

<213> 智人

<400> 275

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser
20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala
85 90 95

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 276
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 276

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

Leu Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser
20 25 30

Asn Tyr Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu
65 70 75 80

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

Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Thr Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 277
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 277

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

[0074]

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr
20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

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

Val Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 278
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 278

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

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Pro Ile Ser
20 25 30

Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ile
35 40 45

Leu Ile Phe Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Thr Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ile Cys Gln Gln Ser Lys Ser Pro
85 90 95

Pro Tyr Asn Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 279
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 279

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
20 25 30

[0075]

Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Glu Thr Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Phe
85 90 95

Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Phe Lys
100 105 110

<210> 280
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 280

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

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn
20 25 30

Ile Asn Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Tyr Ser His
85 90 95

Val Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 281
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 281

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

Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
50 55 60

[0076]

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 282
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 282

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Thr
20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Gln Pro Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

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

Val Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 283
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 283

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser
1 5 10 15

Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
50 55 60

[0077]

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 284
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 284

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly
20 25 30

Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Ser Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Trp Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Arg Tyr
85 90 95

Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 285
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 285

Leu Ala Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

Lys Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr Phe Thr Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

[0078]

Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Cys Asp Ser Leu
85 90 95

Pro Pro Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys
100 105

<210> 286
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (93)..(93)
<223> Xaa 相应于终止密码子

<400> 286

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ala Leu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gln Ser Val Phe
20 25 30

Gly Asp Phe Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Xaa Tyr Gly Asp
85 90 95

Ser Val Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gly Ile Lys
100 105 110

<210> 287
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 287

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

Pro Gly Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gln Ser Val Phe
20 25 30

Gly Asp Phe Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

[0079]

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Asp
85 90 95

Ser Val Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 288
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(45)
<223> Xaa 相应于终止密码子

<400> 288

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Gln Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn
20 25 30

Arg Asp Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Xaa Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Arg Asp Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys His Gln Tyr Gly Ser
85 90 95

Ser Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 289
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 289

Leu Ala Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
20 25 30

Thr Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile His Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

[0080]

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
85 90 95

Ser Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 290
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 290

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Thr Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Phe
20 25 30

Ile Asn Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

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

Val Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 291
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 291

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

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn
20 25 30

Ser Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Met Ser Gly Ala Thr Ser Arg Ala Thr Asp Val Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser
85 90 95

[0081]

Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 292
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 292

Leu Ala Asp Val Val Met Thr Gln Phe Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser
20 25 30

Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Glu Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asp Ser Gly
85 90 95

Leu Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 293
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 293

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

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser
20 25 30

Asn Phe Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Gly Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asp Ser Gly
85 90 95

Leu Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 294
<211> 115

[0082]

<212> PRT
<213> 智人

<400> 294

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

Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Met Leu Gly Gln Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 295
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8)..(8)
<223> Xaa 相应于终止密码子

<400> 295

Leu Ala Asp Val Val Met Thr Xaa Ser Pro Gly Thr Leu Ala Leu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gln Ser Val Phe
20 25 30

Gly Asp Phe Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Asp
85 90 95

Ser Val Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105 110

[0083]

<210> 296
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 296

Leu Ala Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
20 25 30

Thr Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile His Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
85 90 95

Ser Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 297
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 297

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Val Asn
20 25 30

Ser Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Met Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ala
85 90 95

Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 298
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

[0084]

<400> 298

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

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ile
20 25 30

Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Val
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

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

Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 299
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 299

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

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn
20 25 30

Ser Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser
85 90 95

Ser Glu Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105 110

<210> 300
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 300

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

[0085]

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ser
20 25 30

Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Val Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asp Thr Tyr
85 90 95

Pro Leu Thr Leu Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 301
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 301

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser
1 5 10 15

Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 302
<211> 115
<212> PRT
<213> 智人

<400> 302

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

Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu

[0086]

20 25 30

Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Met Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 303
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 303

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

Pro Gly Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gln Ser Val Phe
20 25 30

Gly Asp Phe Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Pro Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Asp
85 90 95

Ser Val Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 304
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 304

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

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn
20 25 30

[0087]

Ser Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Met Ser Gly Ala Thr Ser Arg Ala Thr Asp Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ser
85 90 95

Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 305
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 305

Leu Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser
20 25 30

Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Lys Lys Pro Gly Lys Val Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Glu Tyr Ser Asn Ala
85 90 95

Leu Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val His Ile Lys
100 105 110

<210> 306
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 306

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

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly
20 25 30

Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Ser Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Trp Val Pro Ser Arg Phe

[0088]

50 55 60

Ser Gly Arg Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Arg Tyr
85 90 95

Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 307
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 307

Leu Ala Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Asn His Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Val Gly Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Pro
85 90 95

Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 308
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 308

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

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
20 25 30

Thr Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Ile His Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

[0089]

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ser
85 90 95

Ser Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 309
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 309

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

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Ser
20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr
85 90 95

Ser Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Thr Val Gly Ile Lys
100 105

<210> 310
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 310

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

Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Ser Val Lys
20 25 30

Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Val Tyr Gly Ser Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

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

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Thr Lys

[0090]

100 105

<210> 311
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 311

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

Val Ser Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn
20 25 30

Lys Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Gln Leu
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Met
85 90 95

Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 312
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 312

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Val Tyr
20 25 30

Ser Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Arg
35 40 45

Leu Leu Met Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg
50 55 60

Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
65 70 75 80

Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Gly Ala
85 90 95

Ser Asp Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 313
<211> 115
<212> PRT

[0091]

<213> 智人

<400> 313

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

Leu Gly Glu Lys Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
50 55 60

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75 80

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
100 105 110

Glu Ile Lys
115

<210> 314
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 314

Leu Ala Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser
20 25 30

Asn Phe Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Val Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Asn Gly Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asp Ser Gly
85 90 95

Leu Ile Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 315
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

[0092]

<400> 315

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

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Asn His Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Val Gly Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Pro
85 90 95

Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 316
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 316

Leu Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser
20 25 30

Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Glu Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asp Ser Gly
85 90 95

Leu Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Ala Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 317
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 317

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

[0093]

Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Ser Val Lys
20 25 30

Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Val Tyr Gly Ser Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

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

Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105

<210> 318
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 318

Leu Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser
20 25 30

Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Glu Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asp Ser Gly
85 90 95

Leu Arg Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 319
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 319

Leu Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Thr Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn
20 25 30

Ile Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

[0094]

Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Arg Pro Asp Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asp Gly Asn
85 90 95

Ser Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Asp Ile Gln
100 105

<210> 320
<211> 110
<212> PRT
<213> 智人

<400> 320

Leu Ala Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly
20 25 30

Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Glu Thr Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Phe
85 90 95

Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Ala Glu Phe Lys
100 105 110

<210> 321
<211> 402
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 载体序列

<400> 321
gctagcgctg gttgggcagc gagtaataac aatccagcgg ctgccgtagg caataggtat 60

ttcattatga ctgtctcctt ggcgactagc tagtttagaa ttaattcgtg aaattgttat 120

ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 180

taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt ccagatctta 240

ctccccatcc ccctgttgac aattaatcat cggctcgtat gatgtgtgga attgtgagcg 300

gataacaatt tcacacagga aacaggagat atacatatga aatacctgct gccgaccgct 360

gctgctggtc tgctgctcct cgctgcccag ccggggcgcg cc 402

[0095]

<210> 322
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 322
tattggcgcg ccatggccgc ccagtctgtg acccagc 37

<210> 323
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 323
tattggcgcg ccatggccgc ccagaagata actcaa 36

<210> 324
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 324
tattggcgcg ccatggccga tgctaagacc acccag 36

<210> 325
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 325
tattggcgcg ccatggccgc ccagacagtc actcag 36

<210> 326
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 326
tattggcgcg ccatggccaa acaggaggtg acacaga 37

<210> 327
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 327
tattggcgcg ccatggccgg agactcggtt acccaga 37

<210> 328
<211> 37
<212> DNA

[0096]

<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 328
tattggcgcg ccatggccgg agattcagtg acccaga 37

<210> 329
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 329
tattggcgcg ccatggccag caattcagtc aagcaga 37

<210> 330
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 330
tattggcgcg ccatggccgg acaaaacatt gaccag 36

<210> 331
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 331
tattggcgcg ccatggccaa aaatgaagtg gagcaga 37

<210> 332
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 332
tattggcgcg ccatggccga agaccaggtg acgcaga 37

<210> 333
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 333
tattggcgcg ccatggccgg aatacaagtg gagcaga 37

<210> 334
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0097]

<400> 334
tattggcgcg ccatggccct acatacactg gagcaga 37

<210> 335
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 335
tattggcgcg ccatggccga agacaaggtg gtacaaa 37

<210> 336
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 336
tattggcgcg ccatggccga aaaccaggtg gagcaca 37

<210> 337
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 337
tattggcgcg ccatggccca ggagaatgtg gagcag 36

<210> 338
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 338
tattggcgcg ccatggccgg agagagtgtg gggctg 36

<210> 339
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 339
tattggcgcg ccatggccgg agaggatgtg gagcaga 37

<210> 340
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 340
tattggcgcg ccatggccag ccaaaagata gaacaga 37

[0098]

<210> 341
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 341
tattggcgcg ccatggccag tcaacaggga gaagag 36

<210> 342
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 342
tattggcgcg ccatggccca acaaccagtg cagagt 36

<210> 343
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 343
tattggcgcg ccatggccag ccaagaactg gagcaga 37

<210> 344
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 344
tattggcgcg ccatggccgg tcaacagctg aatcaga 37

<210> 345
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 345
tattggcgcg ccatggccac ccagctgctg gagcaga 37

<210> 346
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 346
tattggcgcg ccatggccca gcagcaggtg aaacaa 36

<210> 347
<211> 36
<212> DNA

[0099]

<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 347
tattggcgcg ccatggccat actgaacgtg gaacaa 36

<210> 348
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 348
tattggcgcg ccatggccga ccagcaagtt aagcaa 36

<210> 349
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 349
tattggcgcg ccatggccgg acaacaggta atgcaa 36

<210> 350
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 350
tattggcgcg ccatggccaa ggaccaagtg tttcag 36

<210> 351
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 351
taggcagaca gacttgtcac t 21

<210> 352
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 352
gccatggcgc gccaatagct agccggtgaa gaagtcgccc aga 43

<210> 353
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0100]

<400> 353
gccatggcgc gccaatagct agccgatgcc atggtcatcc aga 43

<210> 354
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 354
gccatggcgc gccaatagct agccgaagcc caagtgaccc aga 43

<210> 355
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 355
gccatggcgc gccaatagct agcccatgcc aaagtcacac aga 43

<210> 356
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 356
gccatggcgc gccaatagct agccgacaca gccgtttccc aga 43

<210> 357
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 357
gccatggcgc gccaatagct agccgaaacg ggagttacgc aga 43

<210> 358
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 358
gccatggcgc gccaatagct agccgaacct gaagtcaccc aga 43

<210> 359
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 359
gccatggcgc gccaatagct agccgaagct gacatctacc aga 43

[0101]

<210> 360
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 360
gccatggcgc gccaatagct agccatatct ggagtctccc aca 43

<210> 361
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 361
gccatggcgc gccaatagct agccgatgct ggaatcaccc aga 43

<210> 362
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 362
gccatggcgc gccaatagct agccaatgct ggtgtcactc aga 43

<210> 363
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 363
gccatggcgc gccaatagct agccagtgct gtcgtctctc aa 42

<210> 364
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 364
gccatggcgc gccaatagct agccgacgct ggagtcacac aa 42

<210> 365
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 365
gccatggcgc gccaatagct agccgatggt ggaatcactc agt 43

<210> 366
<211> 42
<212> DNA

[0102]

<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 366
gccatggcgc gccaatagct agccactgct gggatcaccc ag 42

<210> 367
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 367
gccatggcgc gccaatagct agccgaagct ggagttgccc agt 43

<210> 368
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 368
gccatggcgc gccaatagct agccgaagct ggagtggttc agt 43

<210> 369
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 369
gccatggcgc gccaatagct agccgaagct ggagttactc agt 43

<210> 370
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 370
gccatggcgc gccaatagct agccgatgct gtagttacac aa 42

<210> 371
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 371
gccatggcgc gccaatagct agccgatgct ggagttatcc agt 43

<210> 372
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

[0103]

<400> 372
gccatggcgc gccaatagct agccggtgct ggagtctccc ag 42

<210> 373
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 373
gccatggcgc gccaatagct agccgatgct gatgttaccc aga 43

<210> 374
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 374
gccatggcgc gccaatagct agcctctcag actattcatc aat 43

<210> 375
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 375
caggcacacc agtgtggcct t 21

<210> 376
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 376
caccttagag ctcttagagt ctctcagctg gtacac 36

<210> 377
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物序列

<400> 377
gacattatgc atgatctctg cttctgatgg ctc 33

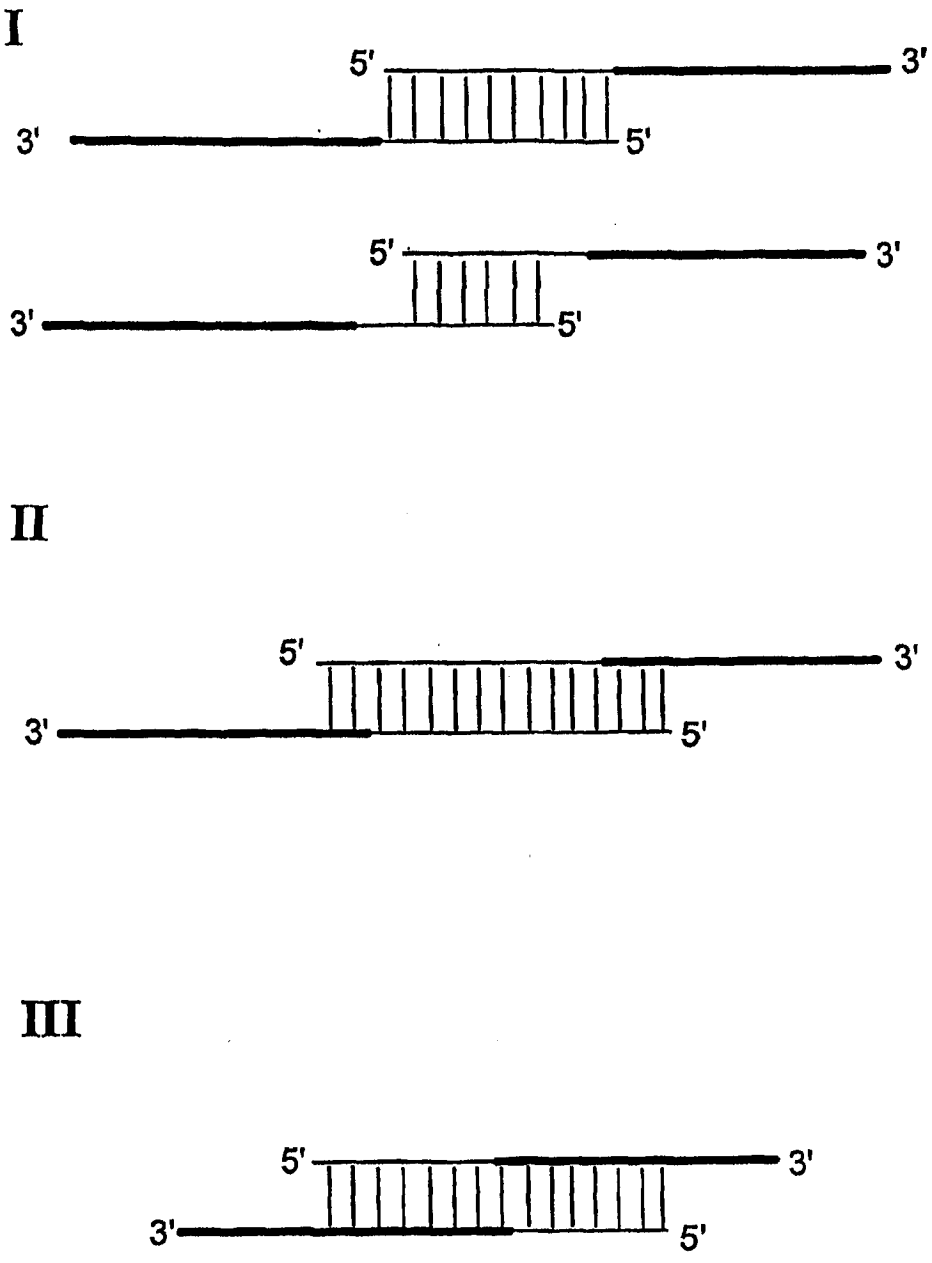


图 1

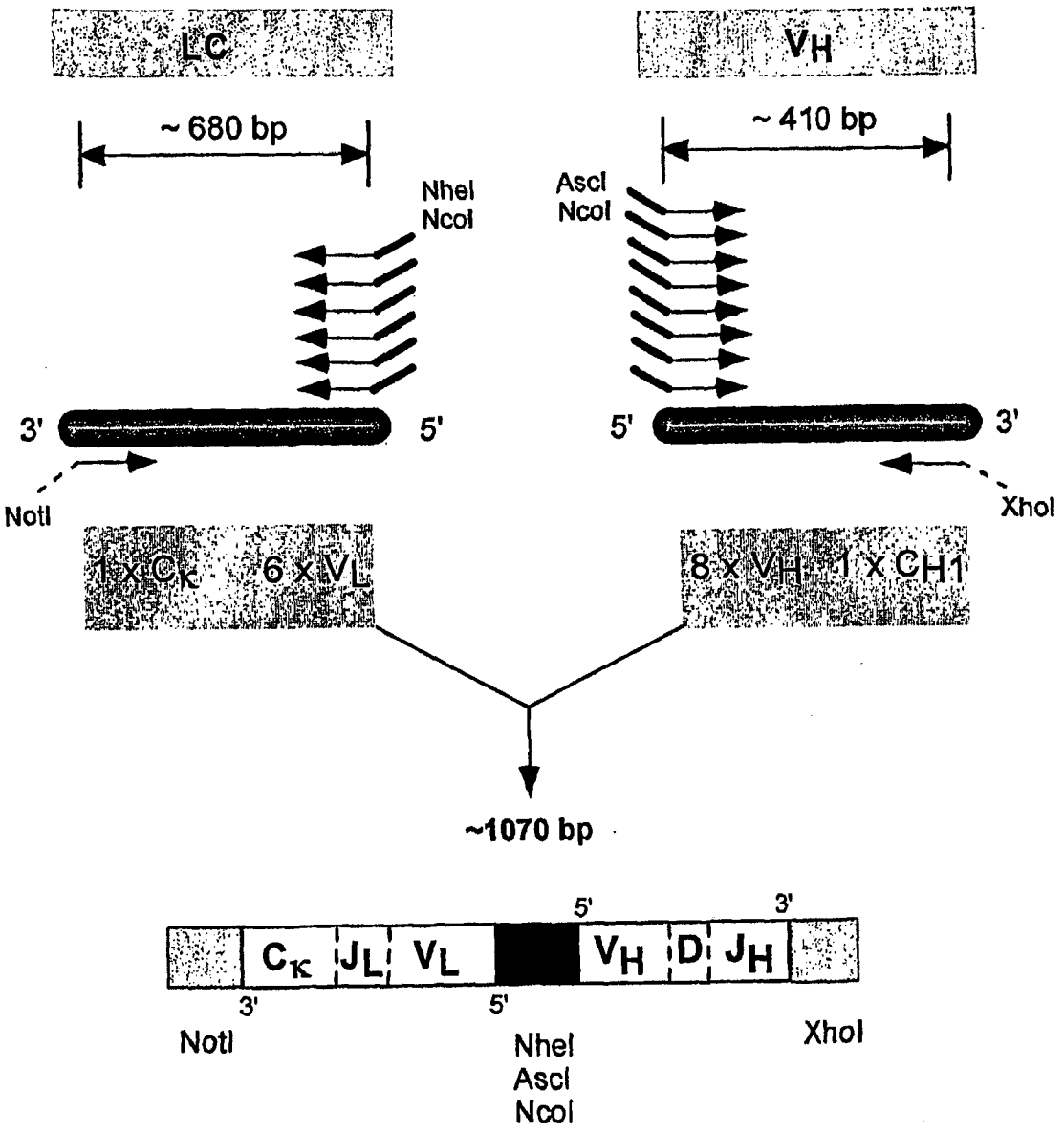

LC
VH
~ 680 bp
~ 410 bp
NheI
NcoI
AscI
NcoI
3'
5'
5'
3'
NotI
XhoI
1 x CK
6 x VL
8 x VH
1 x CH1
~1070 bp
5'
3'
CK
JL
VL
VH
D
JH
3'
5'
NotI
NheI
AscI
NcoI
XhoI

图 2

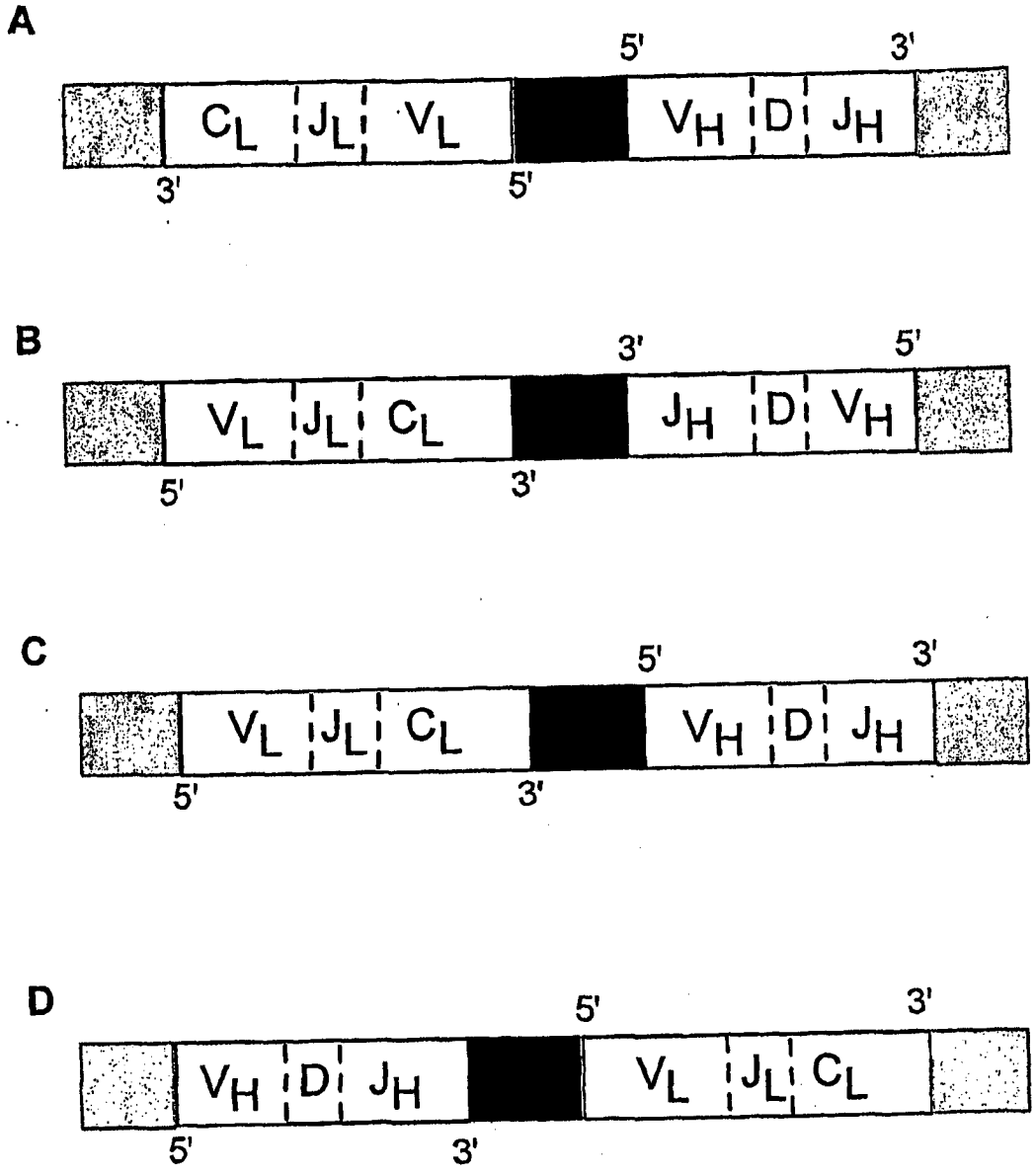

A
5'
3'
CL
JL
VL
VH
D
JH
3'
5'
B
3'
5'
VL
JL
CL
JH
D
VH
5'
3'
C
5'
3'
VL
JL
CL
VH
D
JH
5'
3'
D
5'
3'
VH
D
JH
VL
JL
CL
5'
3'

图 3

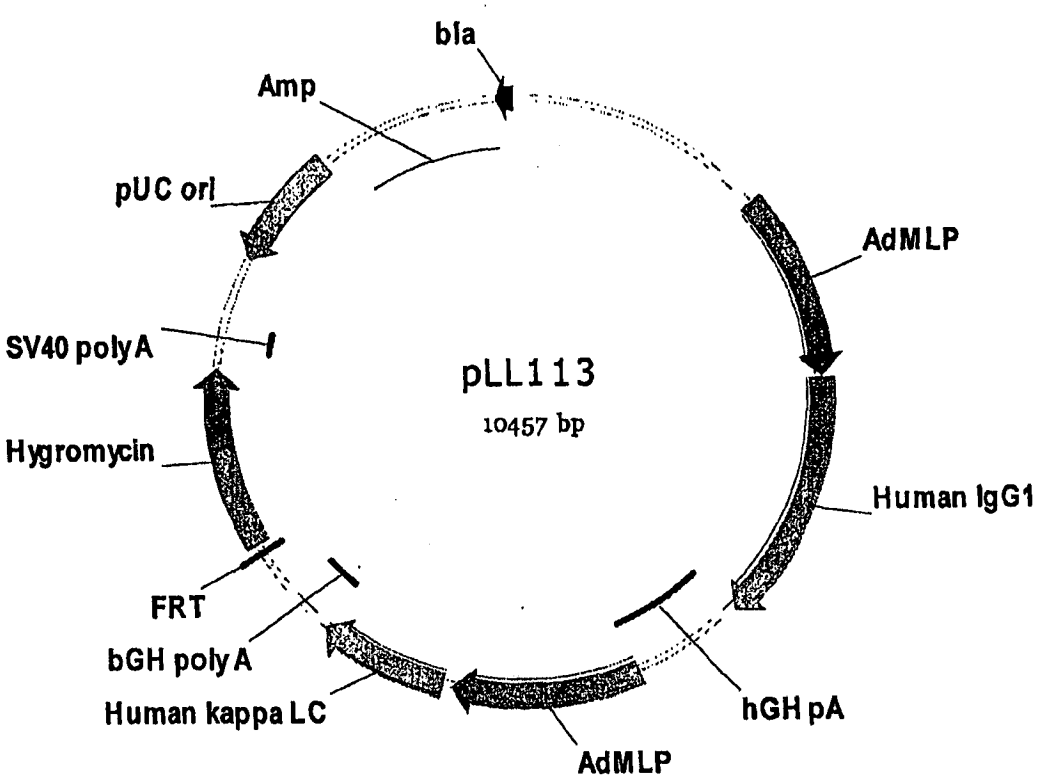

bla
Amp
pUC ori
AdMLP
SV40 polyA
pLL113
10457 bp
Hygromycin
Human IgG1
FRT
bGH polyA
Human kappa LC
hGH pA
AdMLP

图 4

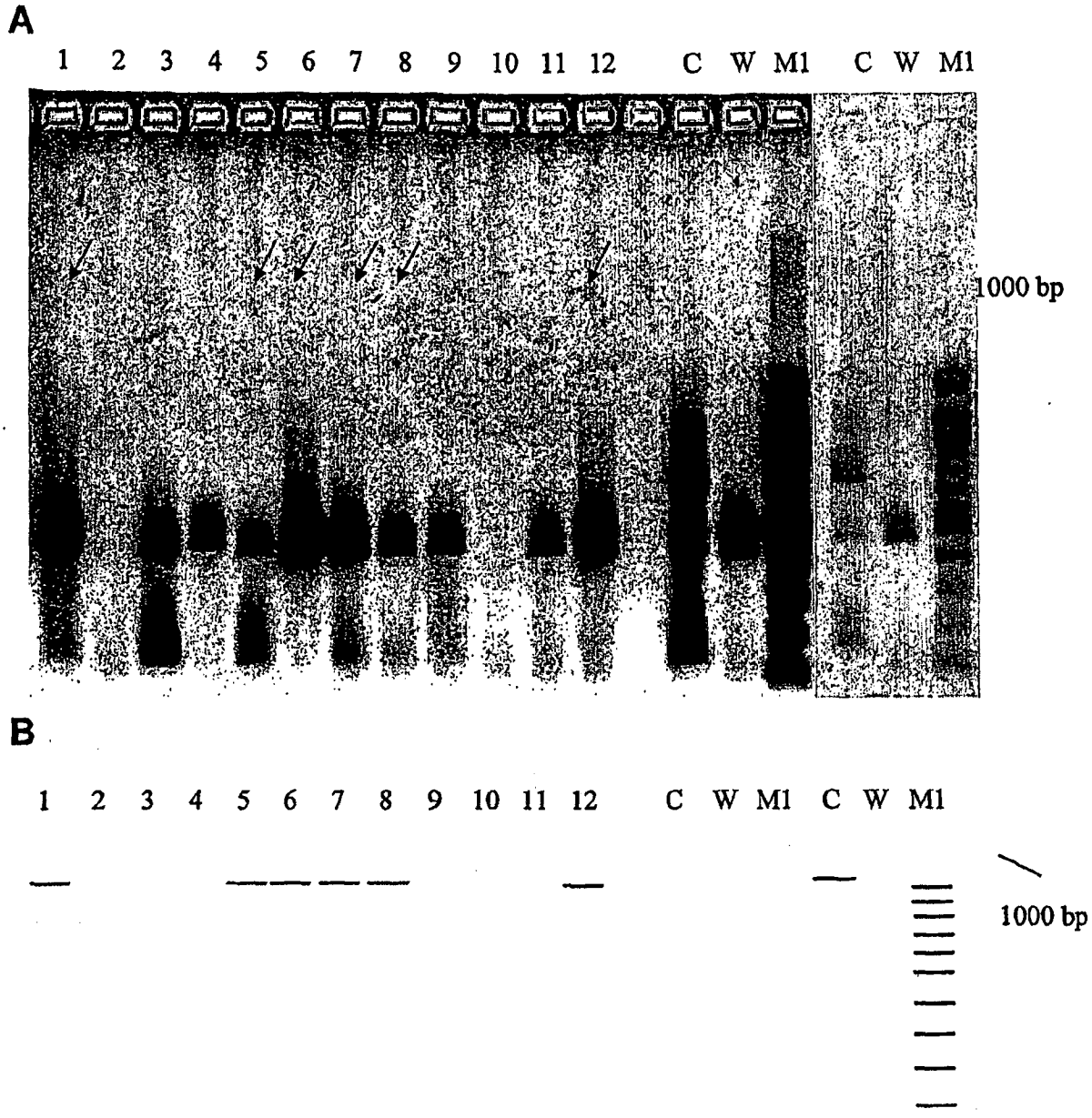

A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 C W M1 C W M1
1000 bp
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 C W M1 C W M1
1000 bp

图 5

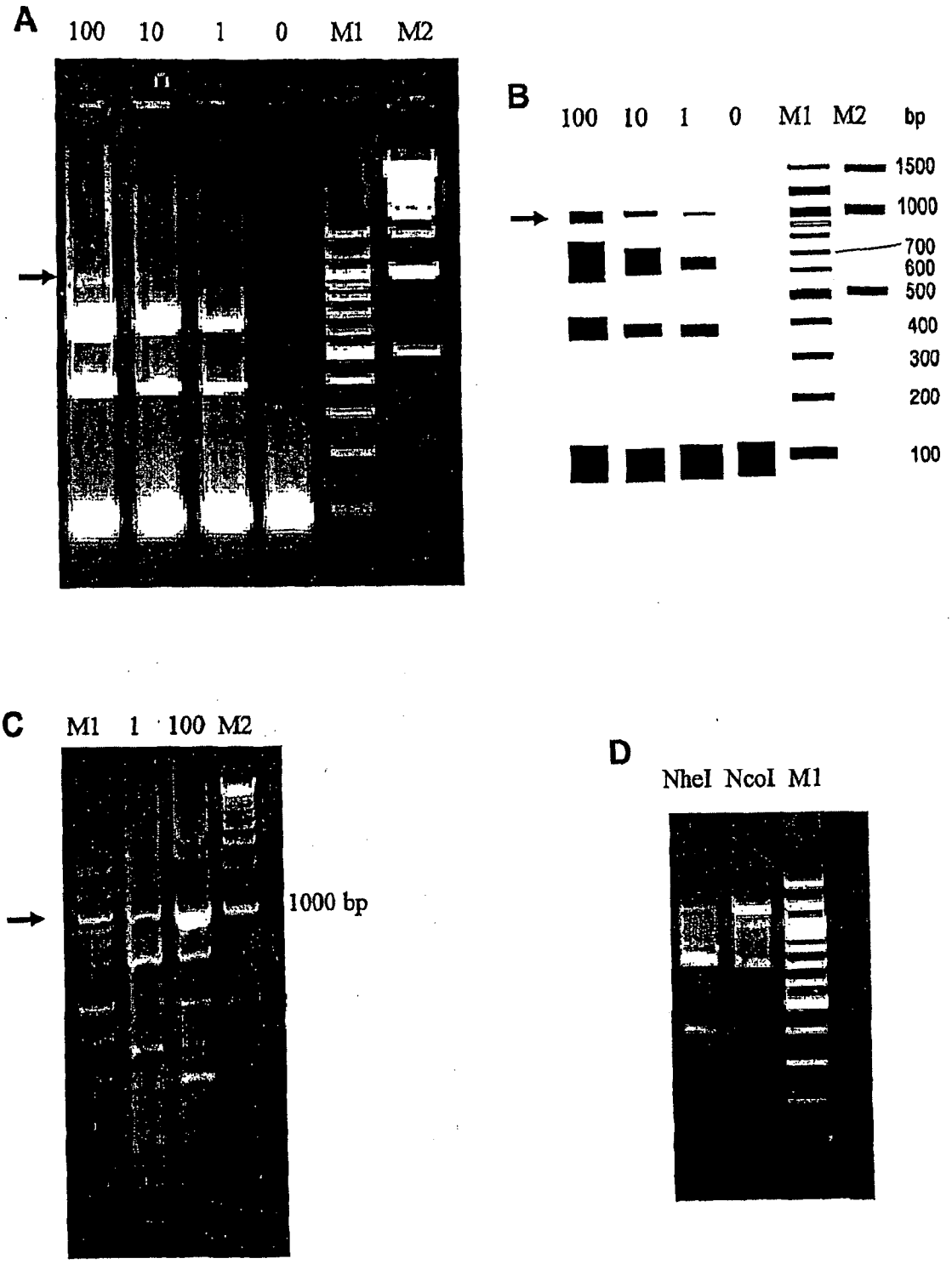

A
100
10
1
0
M1
M2
B
100
10
1
0
M1
M2
bp
1500
1000
700
600
500
400
300
200
100
C
M1
1
100
M2
1000 bp
D
NheI NcoI M1

图 6

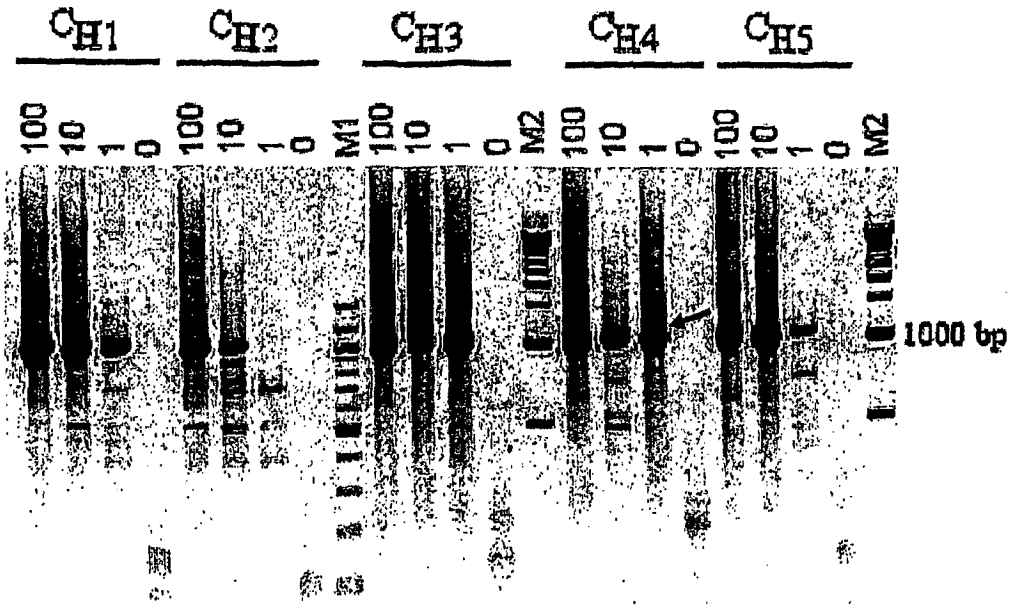

CH1
CH2
CH3
CH4
CH5
100
10
1
0
M1
M2
1000 bp

图 7

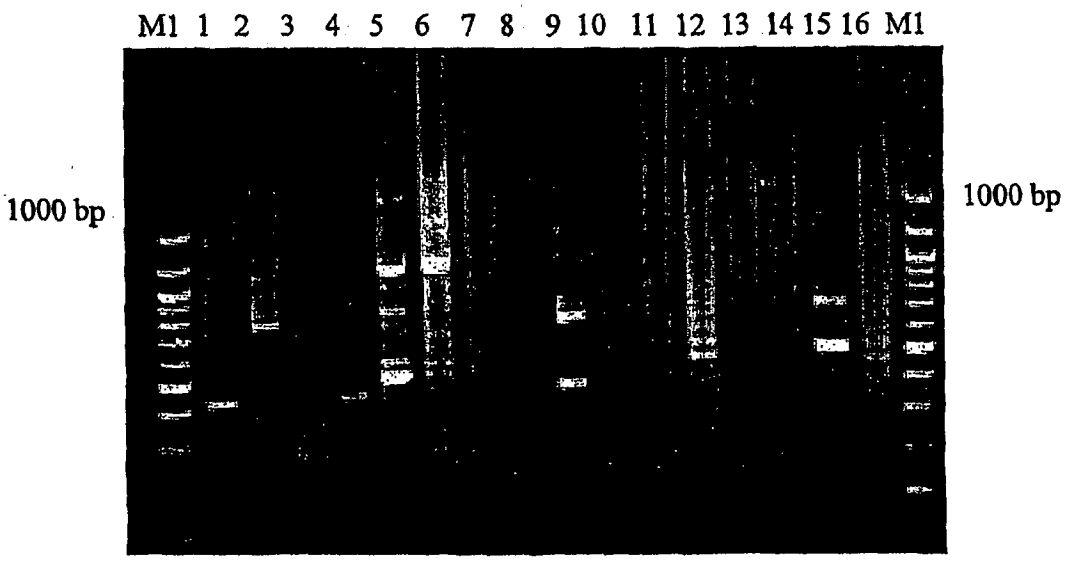

M1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M1
1000 bp
1000 bp

图 8

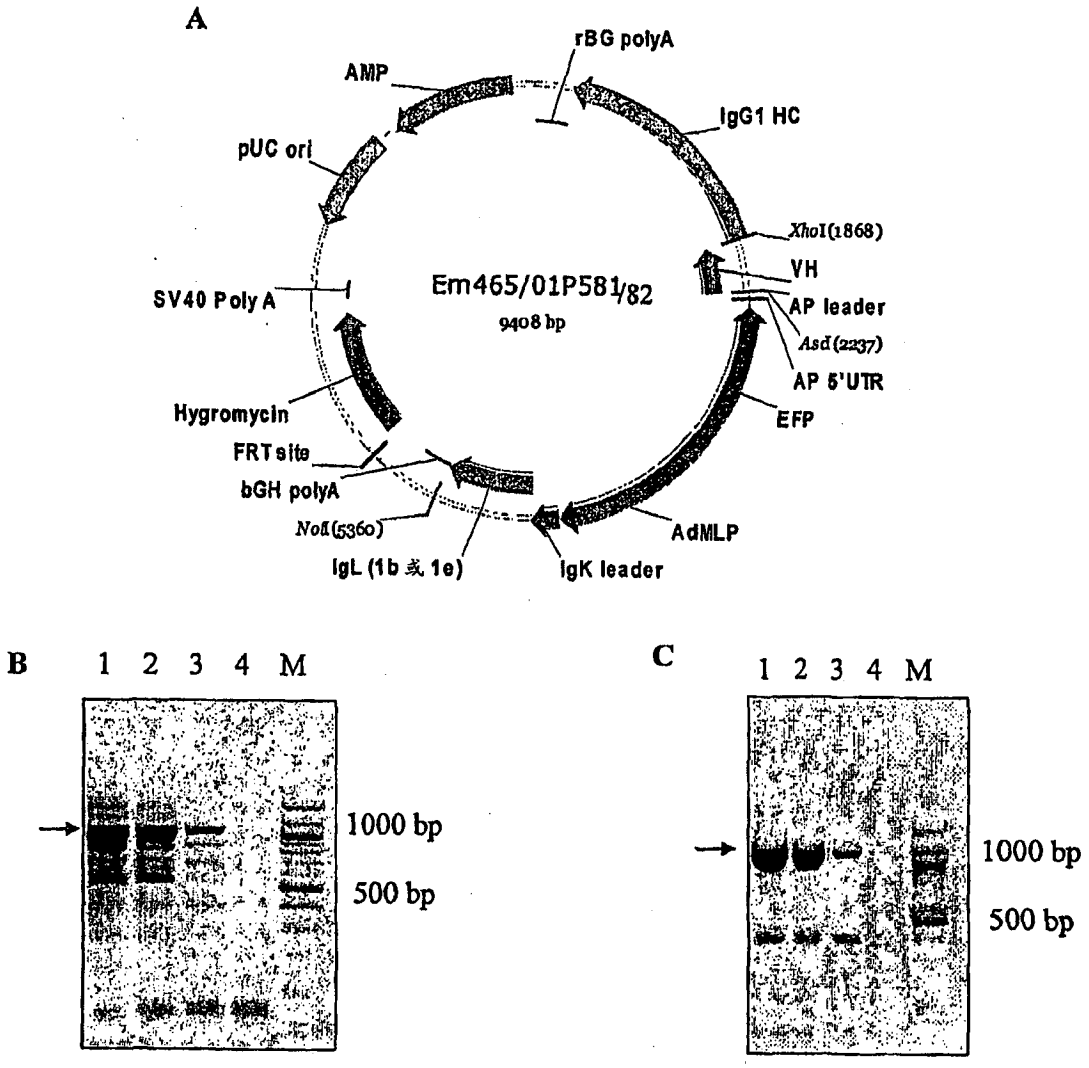

A
rBG polyA
AMP
IgG1 HC
pUC ori
XhoI(1868)
VH
AP leader
Asd(2237)
AP 5'UTR
EFP
SV40 Poly A
Em465/01P581/82
9408 bp
Hygromycin
FRT site
bGH polyA
NotI(5360)
AdMLP
IgL (1b 或 1e)
IgK leader
B
1 2 3 4 M
1000 bp
500 bp
C
1 2 3 4 M
1000 bp
500 bp

图 9

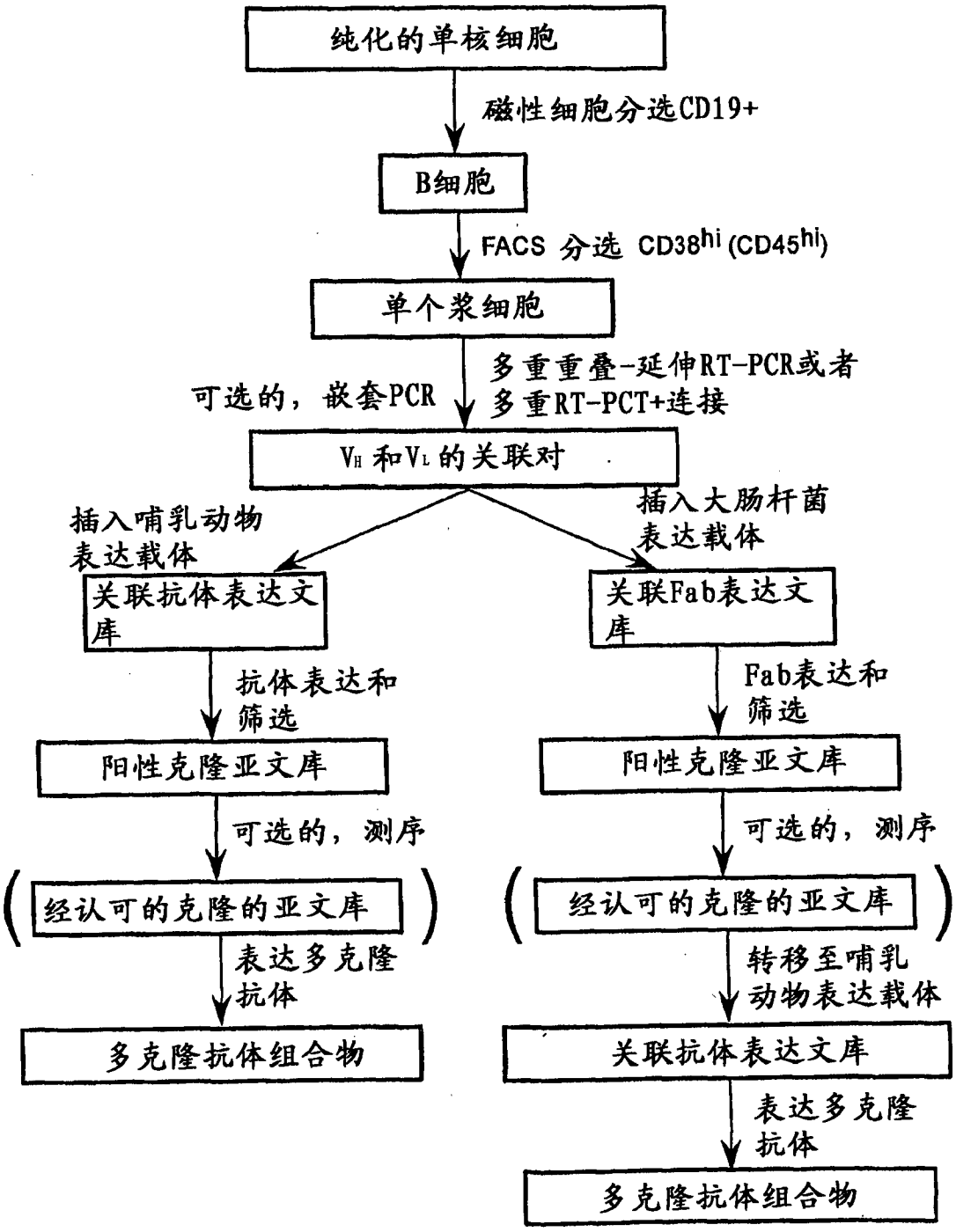

纯化的单核细胞
磁性细胞分选CD19+
B细胞
FACS 分选 CD38hi (CD45hi)
单个浆细胞
可选的，嵌套PCR
多重重叠-延伸RT-PCR或者
多重RT-PCT+连接
VH 和VL 的关联对
插入哺乳动物
表达载体
插入大肠杆菌
表达载体
关联抗体表达文库
关联Fab表达文库
抗体表达和
筛选
Fab表达和
筛选
阳性克隆亚文库
阳性克隆亚文库
可选的，测序
可选的，测序
经认可的克隆的亚文库
经认可的克隆的亚文库
表达多克隆
抗体
转移至哺乳
动物表达载体
多克隆抗体组合物
关联抗体表达文库
表达多克隆
抗体
多克隆抗体组合物

图 10

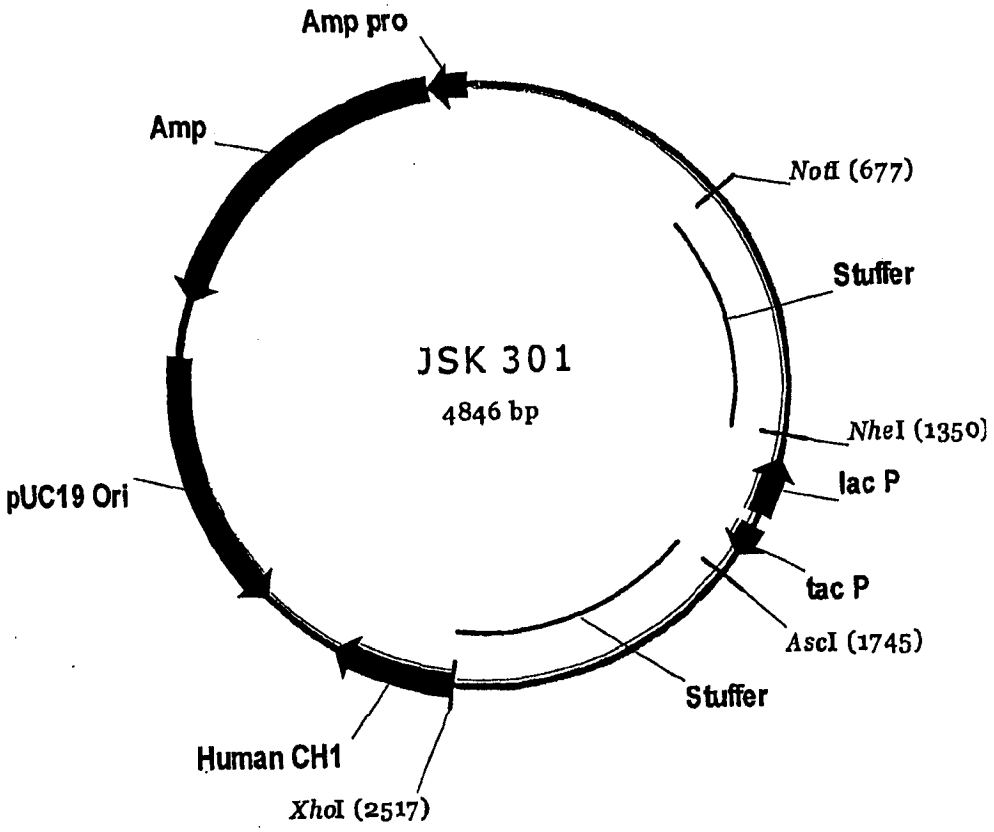

Amp pro
Amp
NotI (677)
Stuffer
JSK 301
4846 bp
NheI (1350)
lac P
pUC19 Ori
tac P
AscI (1745)
Stuffer
Human CH1
XhoI (2517)

图 11

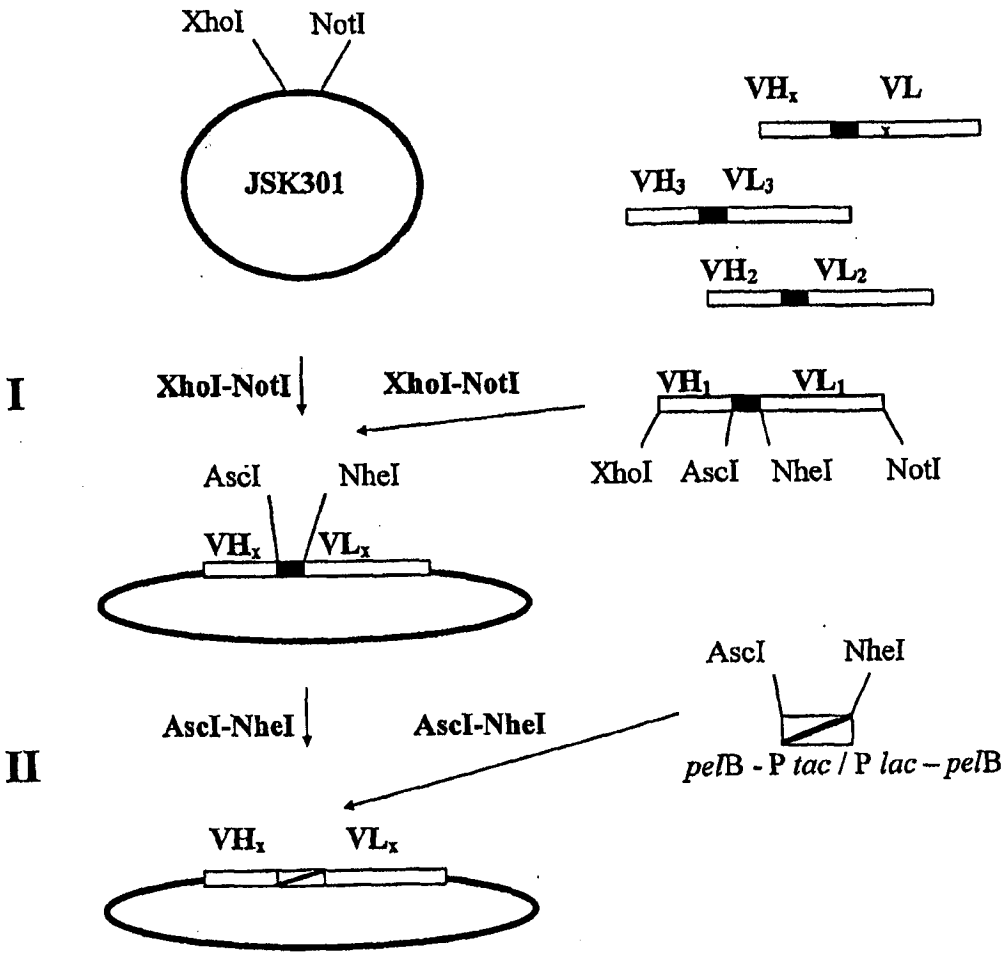

XhoI
NotI
JSK301
VHx
VL
VH3
VL3
VH2
VL2
I
XhoI-NotI
XhoI-NotI
VH1
VL1
XhoI
AscI
NheI
NotI
AscI
NheI
VHx
VLx
AscI
NheI
II
AscI-NheI
AscI-NheI
pelB - P tac / P lac – pelB
VHx
VLx

图 12

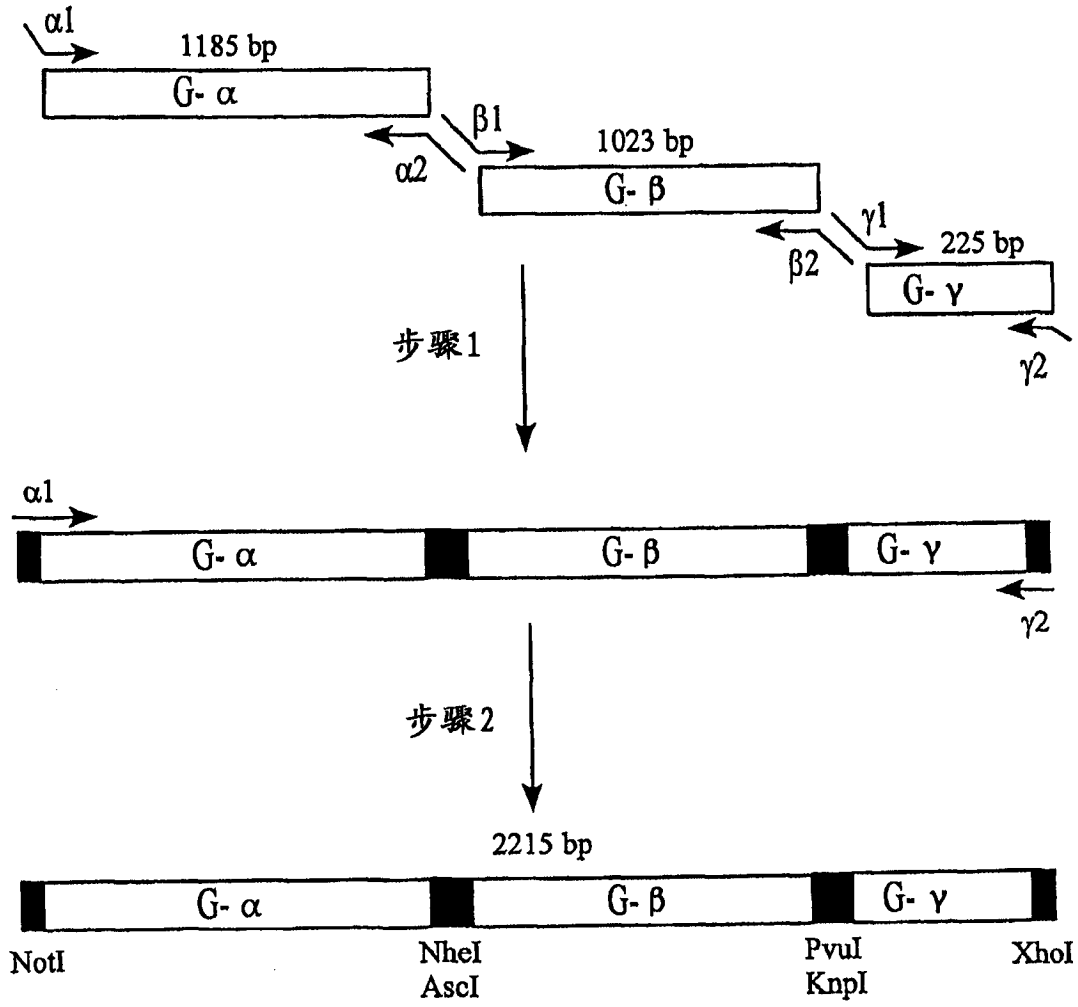

α1
1185 bp
G- α
β1
α2
1023 bp
G- β
γ1
β2
225 bp
G- γ
γ2
步骤1
α1
G- α
G- β
G- γ
γ2
步骤2
2215 bp
G- α
G- β
G- γ
NotI
NheI
AscI
PvuI
KnpI
XhoI

图 13

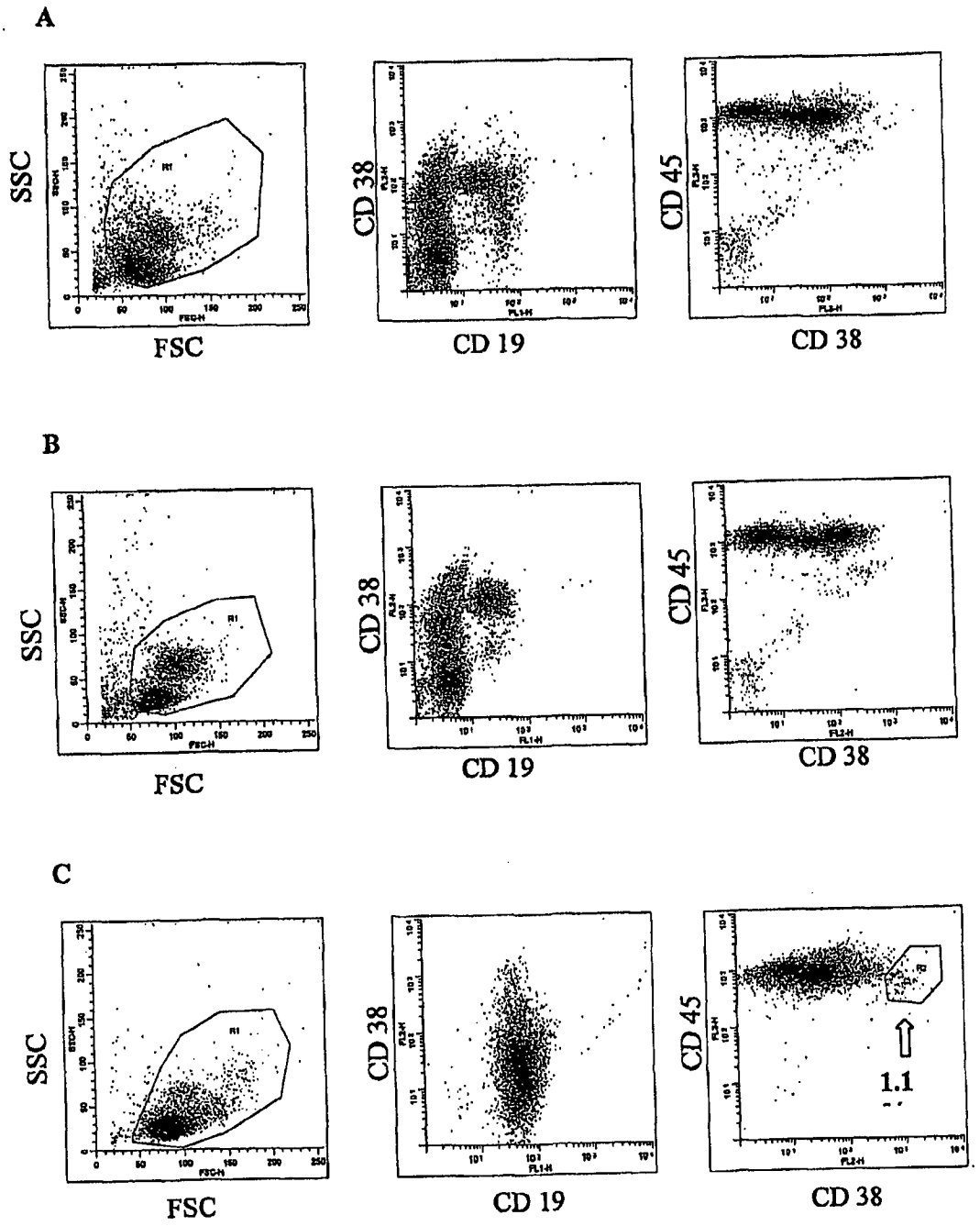

A
SSC
FSC
CD 38
CD 19
CD 45
CD 38
B
SSC
FSC
CD 38
CD 19
CD 45
CD 38
C
SSC
FSC
CD 38
CD 19
CD 45
CD 38
1.1

图 14

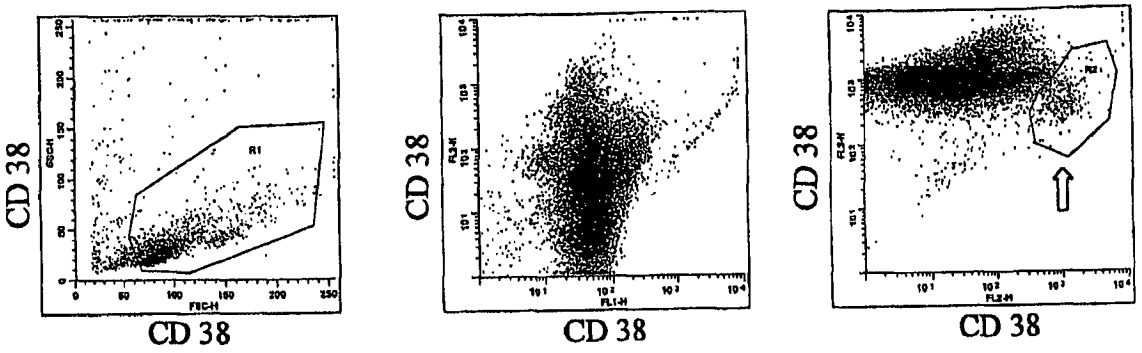


图 15

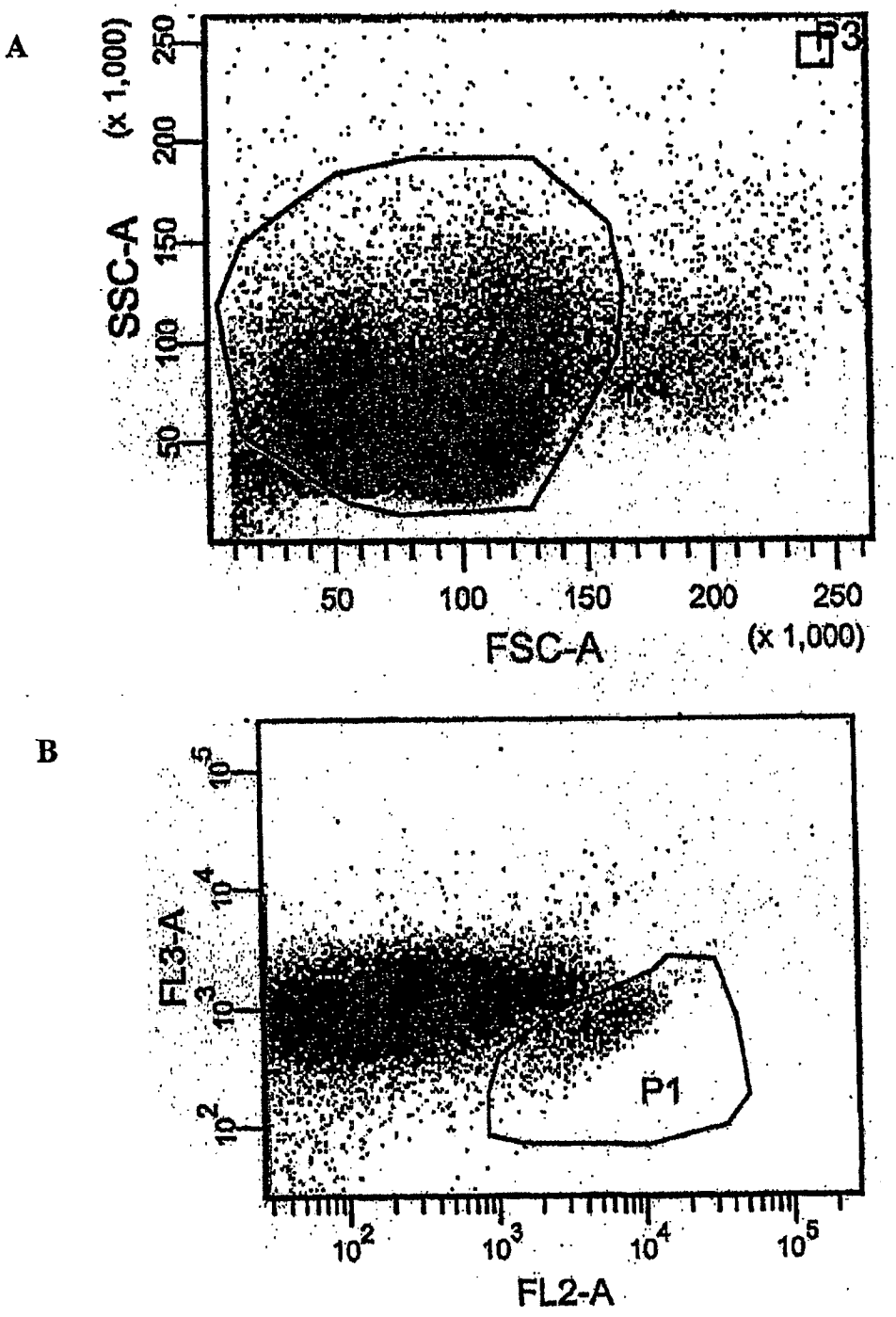

A
SSC-A (x 1,000)
250
200
150
100
50
R3
50
100
150
200
250
FSC-A (x 1,000)
B
FL3-A
10^5
10^4
10^3
10^2
P1
10^2
10^3
10^4
10^5
FL2-A

图 16

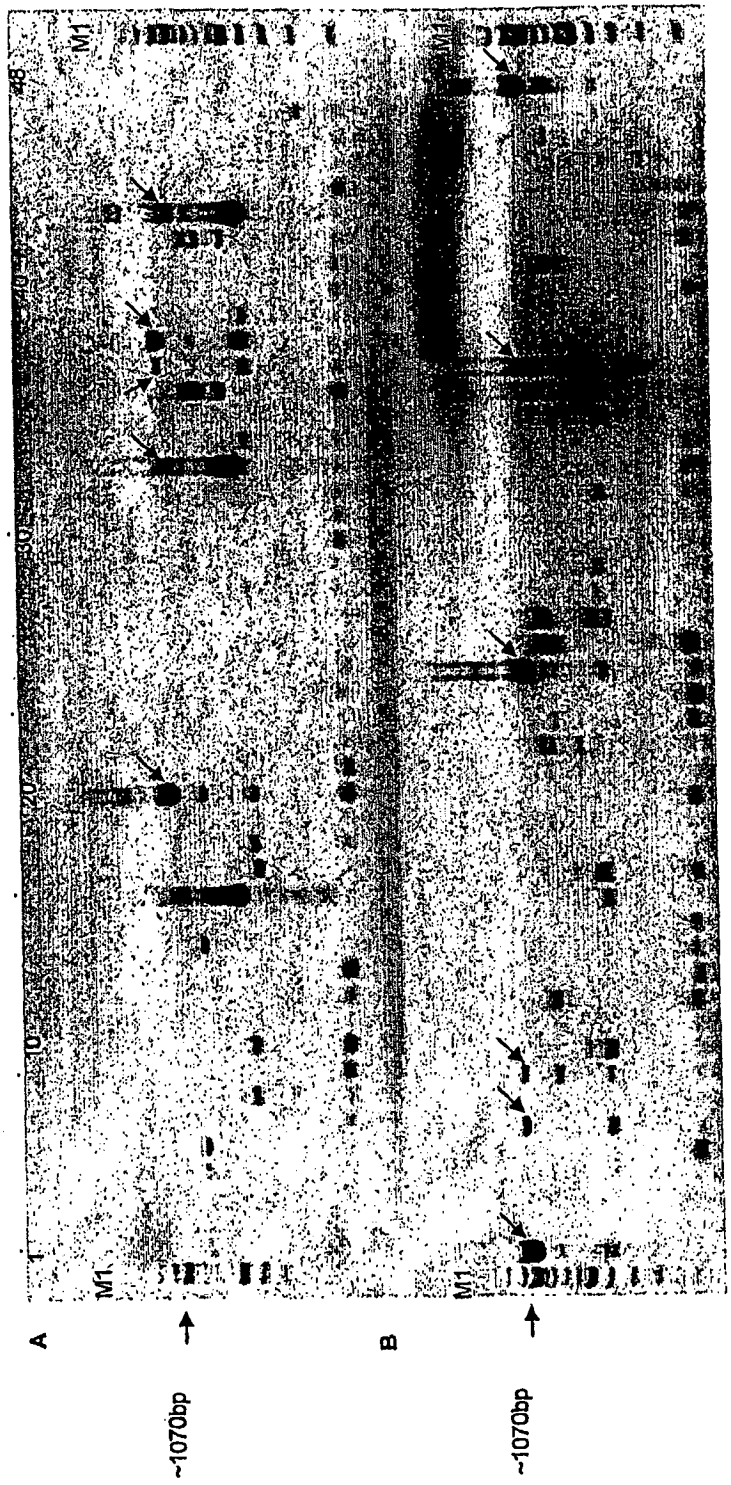


图 17

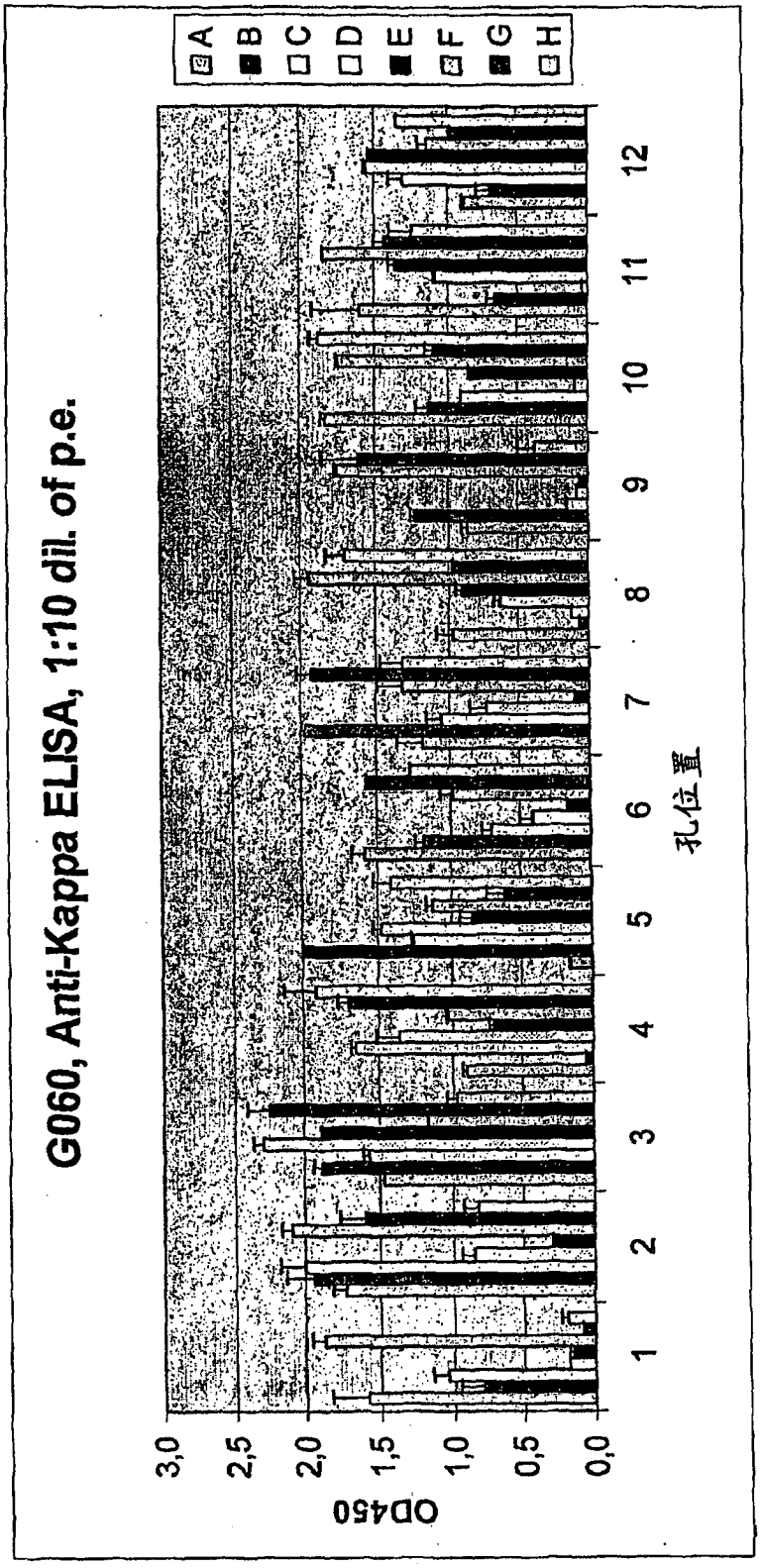

G060, Anti-Kappa ELISA, 1:10 dil. of p.e.
A
B
C
D
E
F
G
H
OD450
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
孔位置

图 18

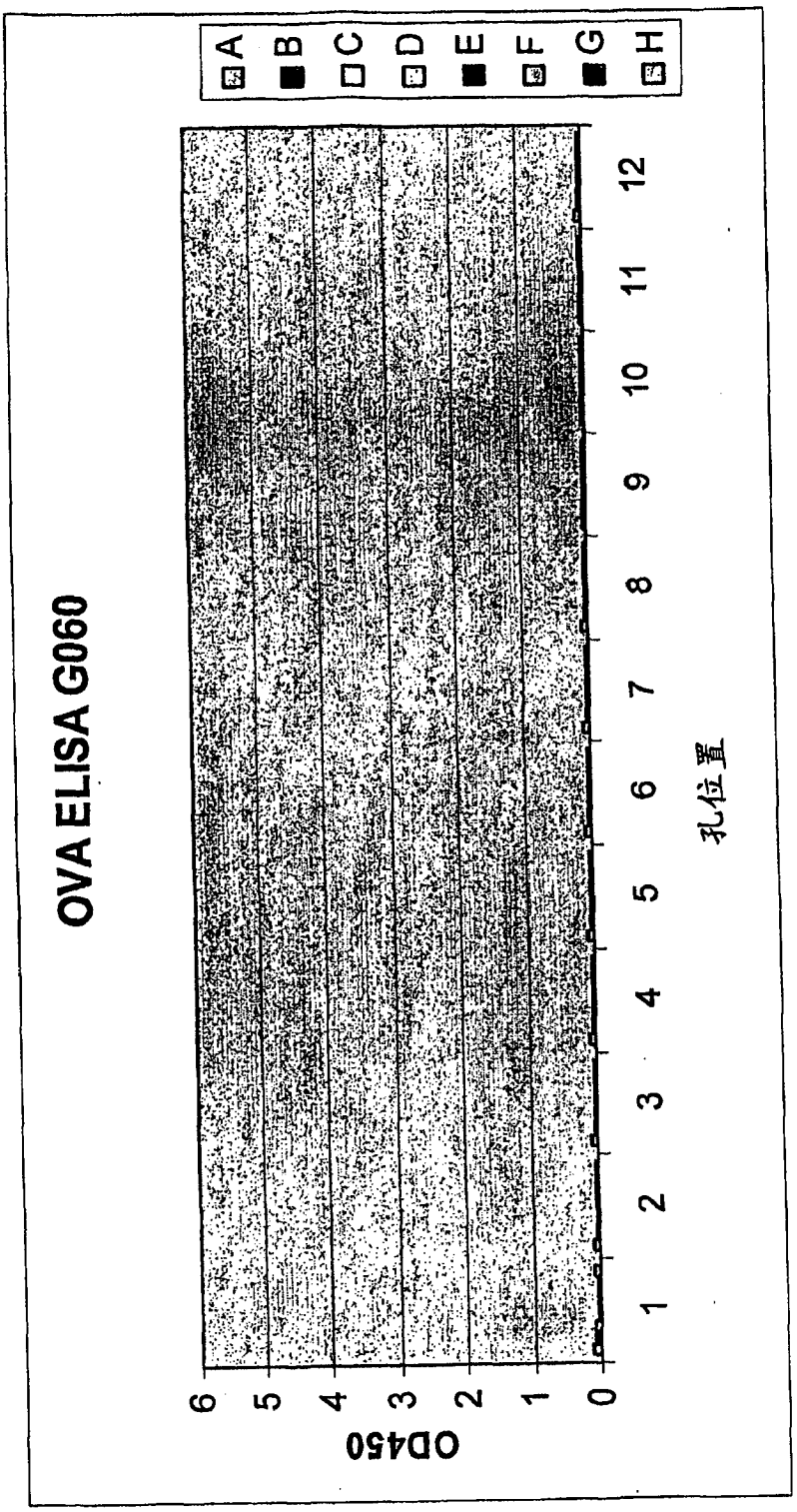

OVA ELISA G060
A
B
C
D
E
F
G
H
OD450
0
1
2
3
4
5
6
孔位置
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

图 19

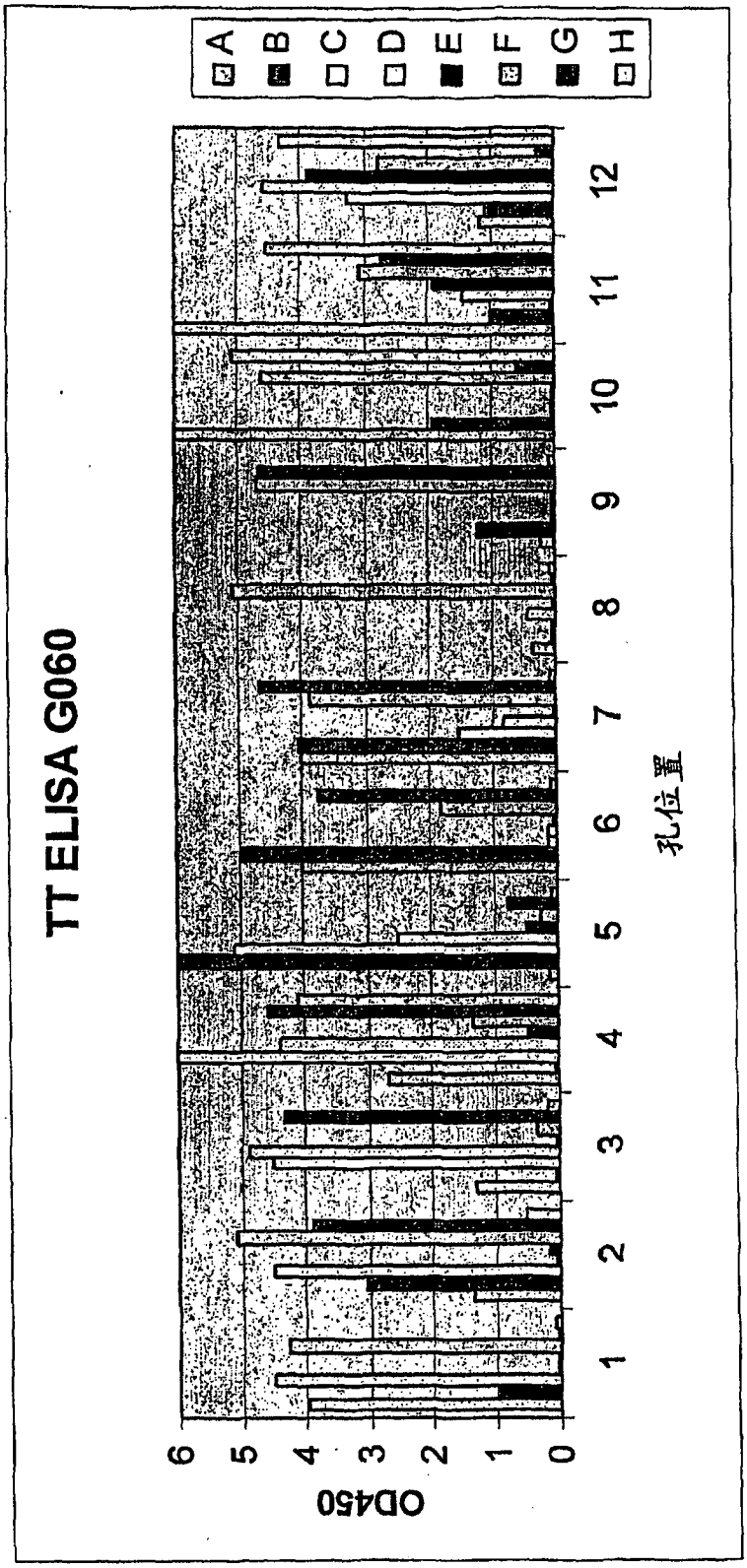


图 20

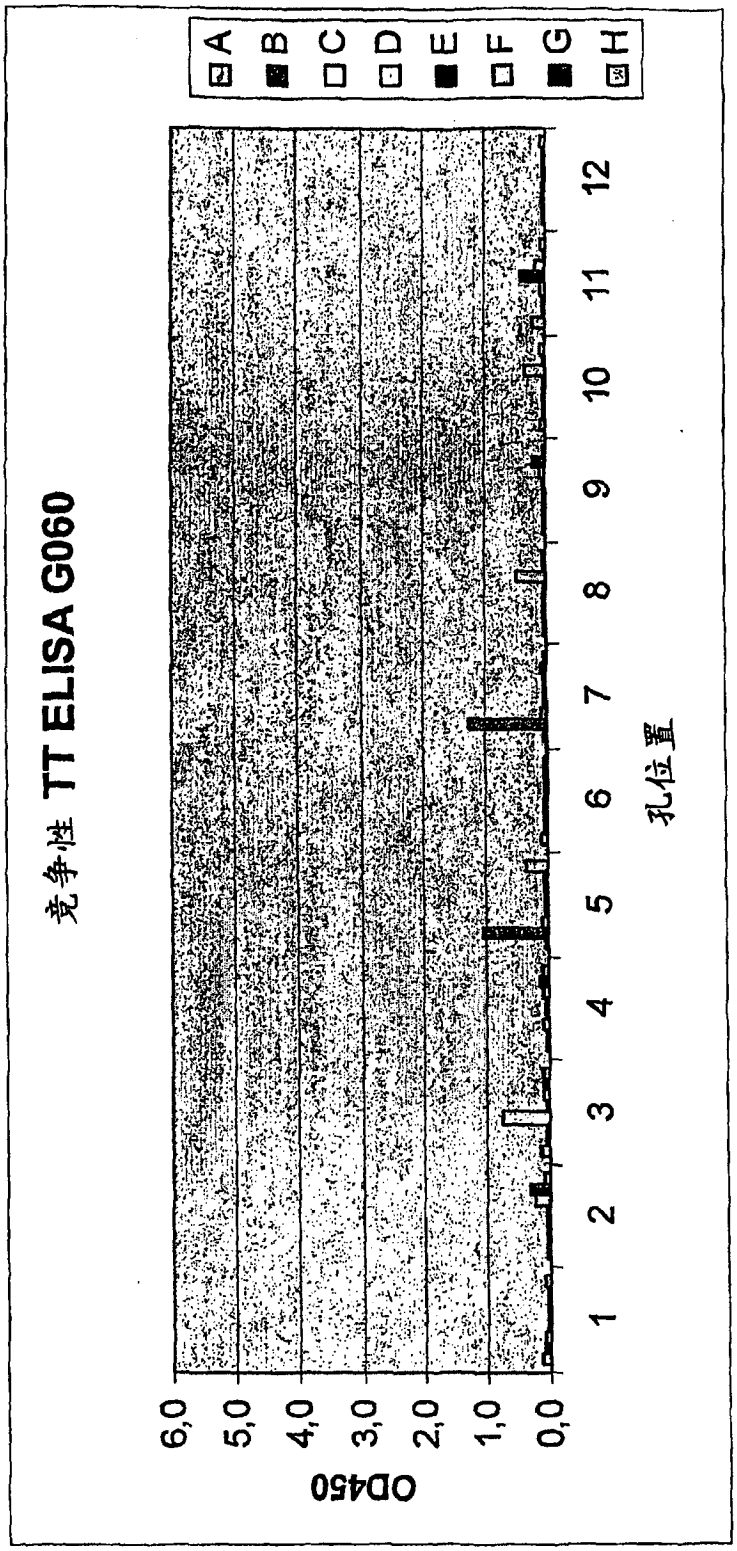

竞争性 TT ELISA G060
A
B
C
D
E
F
G
H
OD450
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
孔位置

图 21


20
g060a03.hcp :
g060g03.hcp :
g060a01.hcp :
g060b12.hcp :
g060c03.hcp :
g060d08.hcp :
g060f06.hcp :
g060d04.hcp :
g060h02.hcp :
g060h10.hcp :
g060g11.hcp :
g060d05.hcp :
g060f09.hcp :
g060c07.hcp :
g060d11.hcp :
g060g02.hcp :
g060a09.hcp :
g060g04.hcp :
g060h04.hcp :
g060a10.hcp :
g060h12.hcp :
g060b09.hcp :
g060f10.hcp :
g060f05.hcp :

图 22a

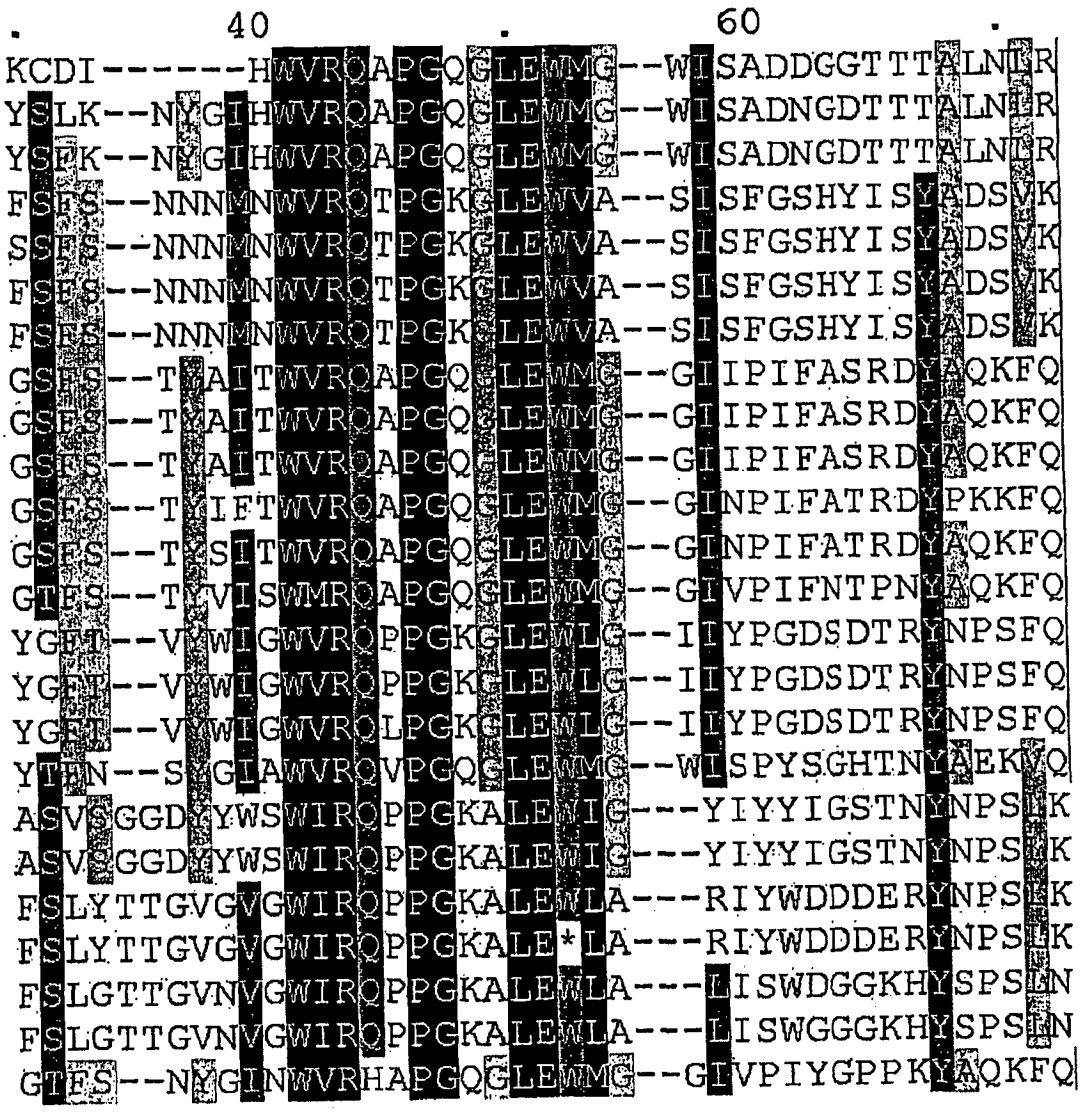

40
60
KCDI------HWVRQAPGQGLEWMG--WISADDGGTTTALNTR
YSLK--NYGIHWVRQAPGQGLEWMG--WISADNGDTTTALNTR
YSFK--NYGIHWVRQAPGQGLEWMG--WISADNGDTTTALNTR
FSFS--NNNMNWVRQTPGKGLEWVA--SISFGSHYISYADSVK
SSFS--NNNMNWVRQTPGKGLEWVA--SISFGSHYISYADSVK
FSFS--NNNMNWVRQTPGKGLEWVA--SISFGSHYISYADSVK
FSFS--NNNMNWVRQTPGKGLEWVA--SISFGSHYISYADSVK
GSFS--TYAITWVRQAPGQGLEWMG--GIIPIFASRDYAQKFQ
GSFS--TYAITWVRQAPGQGLEWMG--GIIPIFASRDYAQKFQ
GSFS--TYAITWVRQAPGQGLEWMG--GIIPIFASRDYAQKFQ
GSFS--TYIFTWVRQAPGQGLEWMG--GINPIFATRDYPKKFQ
GSFS--TYSITWVRQAPGQGLEWMG--GINPIFATRDYAQKFQ
GTFS--TYVISWMRQAPGQGLEWMG--GIVPIFNTPNYAQKFQ
YGFT--VYWIGWVRQPPGKGLEWLG--IIYPGDSDTRYNPSFQ
YGFT--VYWIGWVRQPPGKGLEWLG--IIYPGDSDTRYNPSFQ
YGFT--VYWIGWVRQLPGKGLEWLG--IIYPGDSDTRYNPSFQ
YTFN--SYGIAWVRQVPGQGLEWMG--WISPYSGHTNYAEKVQ
ASVSGGDYYWSWIRQPPGKALEWIG---YIYYIGSTNYNPSLK
ASVSGGDYYWSWIRQPPGKALEWIG---YIYYIGSTNYNPSLK
FSLYTTGVGVGWIRQPPGKALEWLA---RIYWDDDERYNPSLK
FSLYTTGVGVGWIRQPPGKALE*LA---RIYWDDDERYNPSLK
FSLGTTGVNVGWIRQPPGKALEWLA---LISWDGGKHYSPSLN
FSLGTTGVNVGWIRQPPGKALEWLA---LISWGGGKHYSPSLN
GTFS--NYGINWVRHAPGQGLEWMG--GIVPIYGPPKYAQKFQ

图 22b

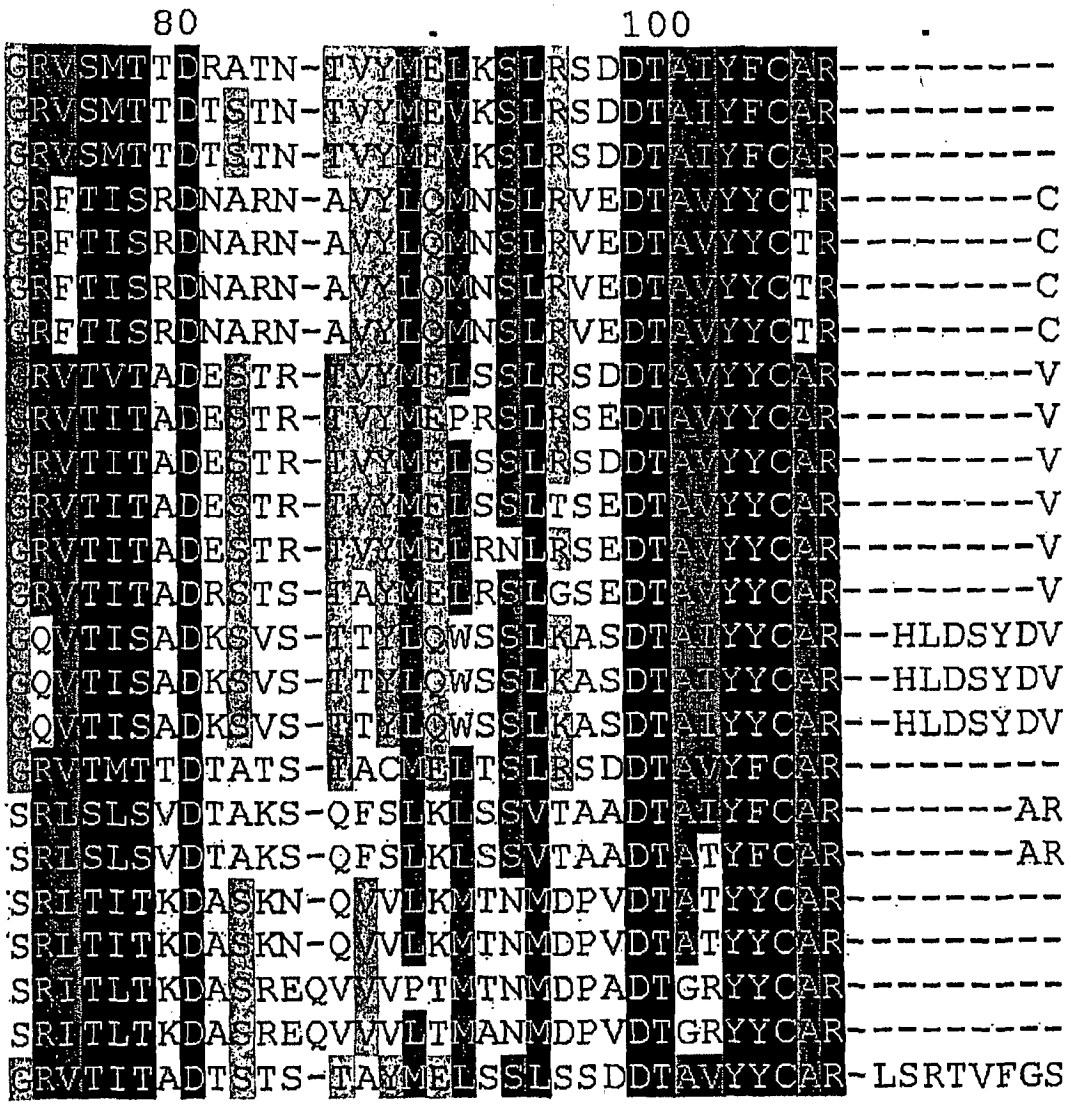


图 22c

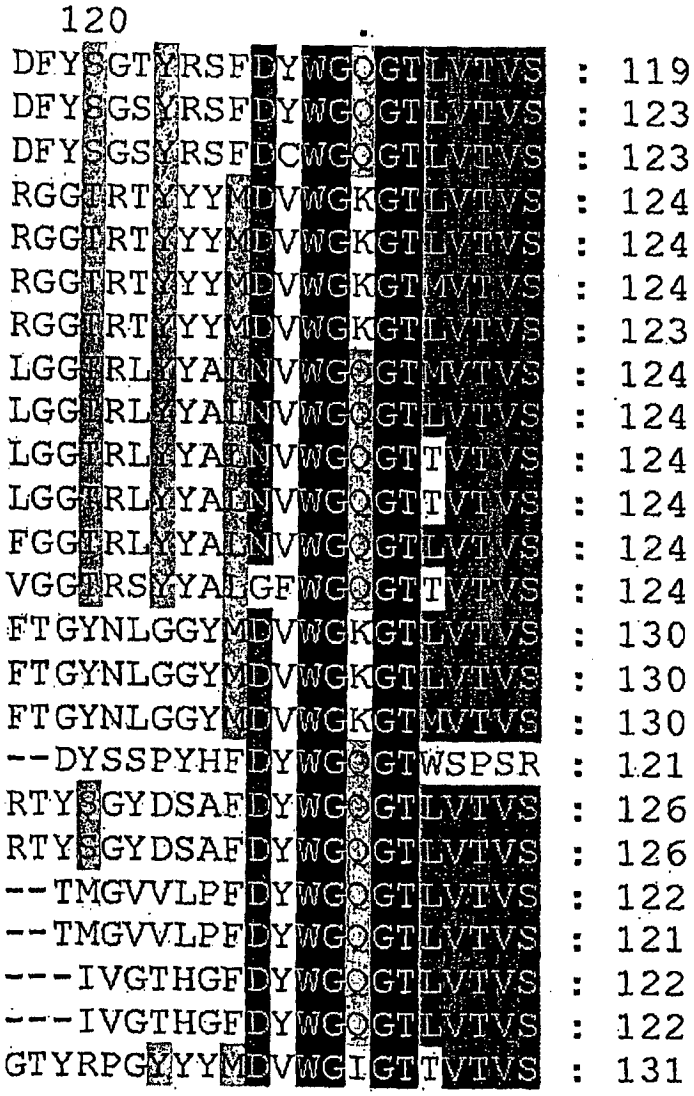

120
DFYSGTYRSFDYWGQGTLVTVS : 119
DFYSGSYRSFDYWGQGTLVTVS : 123
DFYSGSYRSFDCWGQGTLVTVS : 123
RGGTRTYYYMDVWGKGTLVTVS : 124
RGGTRTYYYMDVWGKGTLVTVS : 124
RGGTRTYYYMDVWGKGTMVTVS : 124
RGGTRTYYYMDVWGKGTLVTVS : 123
LGGTRLYYALNVWGQGTMVTVS : 124
LGGTRLYYALNVWGQGTLVTVS : 124
LGGTRLYYALNVWGQGTTVTVS : 124
LGGTRLYYALNVWGQGTTVTVS : 124
FGGTRLYYALNVWGQGTLVTVS : 124
VGGTRSYYALGFWGQGTTVTVS : 124
FTGYNLGGYMDVWGKGTLVTVS : 130
FTGYNLGGYMDVWGKGTLVTVS : 130
FTGYNLGGYMDVWGKGTMVTVS : 130
--DYSSPYHFDYWGQGTWSPSR : 121
RTYSGYDSAFDYWGQGTLVTVS : 126
RTYSGYDSAFDYWGQGTLVTVS : 126
--TMGVVLPFDYWGQGTLVTVS : 122
--TMGVVLPFDYWGQGTLVTVS : 121
---IVGTHGFDYWGQGTLVTVS : 122
---IVGTHGFDYWGQGTLVTVS : 122
GTYRPGYYYMDVWGIGTTVTVS : 131

图 22d


20
g060f11.hcp : GRAEVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAGSG
g060g12.hcp : GRAEVQLVQSGGGVVRPGGSLRLSCAGSG
g060f01.hcp : GRAQVQLQQSGGGVVQPGRSLRLSCAASG
g060a11.hcp : GRAKVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCVVSG
g060c12.hcp : GRAKV*LVQSGGGLVKPGGSLRLSCVVSG
g060f03.hcp : GRA*VQLVQSGGGLVKPGGSLRLSCAASG
g060a02.hcp : GRAQVQLQQSGGGLVKPGGSLRLSCAASG
g060d03.hcp : GRAQVQLVQSGAEVKKPGTSVRVSCKTSG
g060f08.hcp : GRAKVQLVQSGAEVKKPGTSVRVSCKTSG
g060b05.hcp : GRAQVQLVQSGAEVKKLGTSVRVSCKTPG
g060b07.hcp : GRAEVQLVESGAEVKKPGTSVRVSCKTSG
g060f04.hcp : GRAKVQLVQSGAEVKKPGTSVRVSCKTPG
g060g10.hcp : GRAEVQLVQSGAEVKKPGTSVRVSRKTPG
g060d07.hcp : GRAEVQLVQSGAEVKKPGTSVRVSCKTPG
g060e05.hcp : GRAQVQLVESGAEVKKPGSSVKVSCKSSG
g060f02.hcp : GRAKVQLVQSGAEVKKPGTSVRVSCKTSG
g060g09.hcp : GRAKVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSSG
g060c04.hcp : GRAQMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCQSSG
g060g07.hcp : GRAQVQLQQSGPGLVKPSETLPLTCTVSG
g060h11.hcp : GRAQVTLKESGPTVVKPTQTLTLTCSLSG
g060b06.hcp : GRAQVQLQESGGGVVQPGTSLRLSCVVSG
g060a04.hcp : GRAKVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCVVSG
g060b10.hcp : GRAKVQLVESGAEVKKPGATVRVSCKASG

图 22e

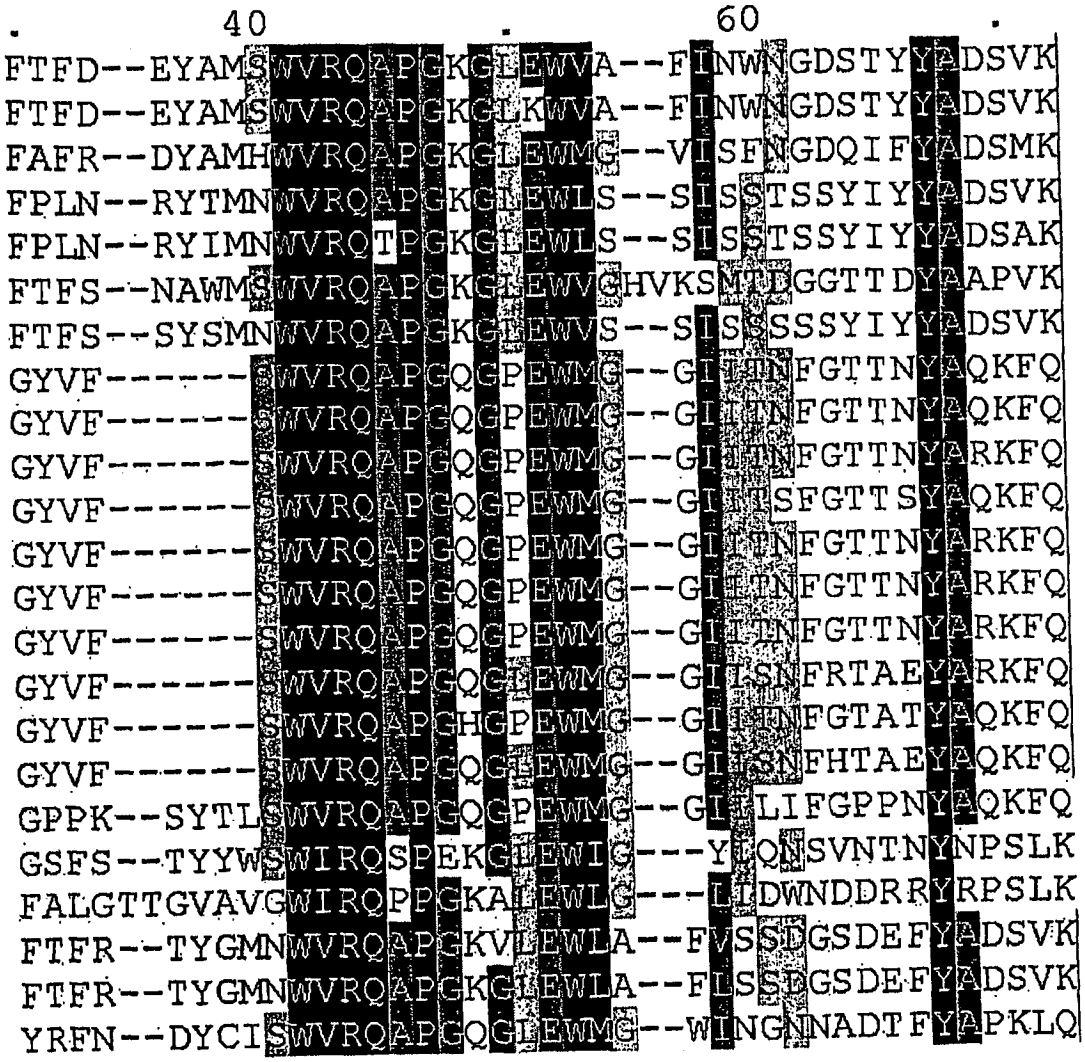

40
60
FTFD--EYAMSWVRQAPGKGLEWVA--FINWNGDSTYYADSVK
FTFD--EYAMSWVRQAPGKGLKWVA--FINWNGDSTYYADSVK
FAFR--DYAMHWVRQAPGKGLEWMG--VISFNGDQIFYADSMK
FPLN--RYTMNWVRQAPGKGLEWLS--SISSTSSYIYYADSVK
FPLN--RYIMNWVRQTPGKGLEWLS--SISSTSSYIYYADSAK
FTFS--NAWMSWVRQAPGKGLEWVGHVKSKTDGGTTDYAAPVK
FTFS--SYSMNWVRQAPGKGLEWVS--SISSSSSYIYYADSVK
GYVF------SWVRQAPGQGPEWMG--GITPNFGTTNYAQKFQ
GYVF------SWVRQAPGQGPEWMG--GITTNFGTTNYAQKFQ
GYVF------SWVRQAPGQGPEWMG--GITTNFGTTNYARKFQ
GYVF------SWVRQAPGQGPEWMG--GITTSFGTTSYAQKFQ
GYVF------SWVRQAPGQGPEWMG--GITTNFGTTNYARKFQ
GYVF------SWVRQAPGQGPEWMG--GITTNFGTTNYARKFQ
GYVF------SWVRQAPGQGPEWMG--GITTNFGTTNYARKFQ
GYVF------SWVRQAPGQGLEWMG--GILSNFRTAEYARKFQ
GYVF------SWVRQAPGHGPEWMG--GITTNFGTATYAQKFQ
GYVF------SWVRQAPGQGLEWMG--GISSNFHTAEYAQKFQ
GPPK--SYTLSWVRQAPGQGPEWMG--GILLIFGPPNYAQKFQ
GSFS--TYYWSWIRQSPEKGLEWIG---YLQNSVNTNYNPSLK
FALGTTGVAVGWIRQPPGKALEWLG---LIDWNDDRRYRPSLK
FTFR--TYGMNWVRQAPGKVLEWLA--FVSSDGSDEFYADSVK
FTFR--TYGMNWVRQAPGKGLEWLA--FLSSDGSDEFYADSVK
YRFN--DYCISWVRQAPGQGLEWMG--WINGNNADTFYAPKLQ

图 22f

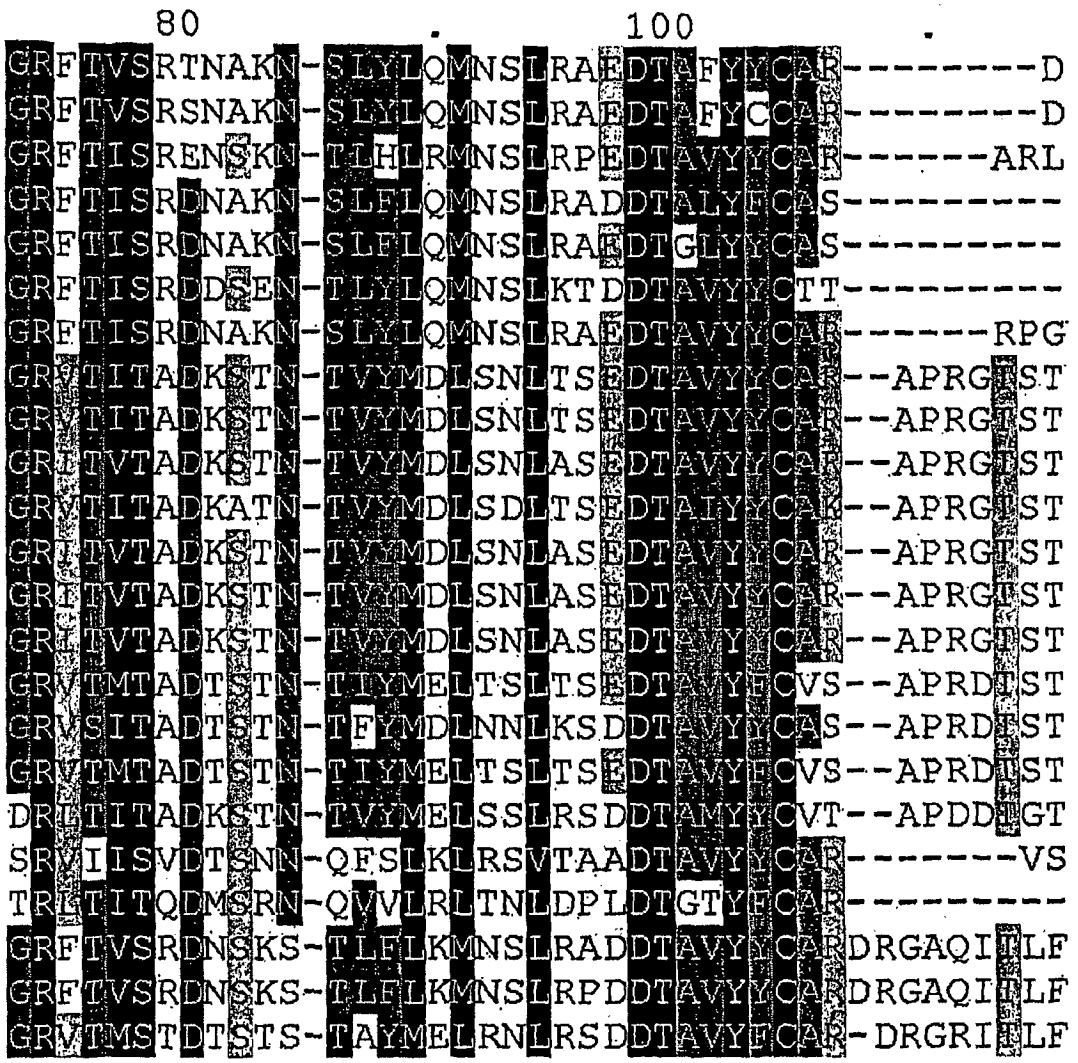


图 22g

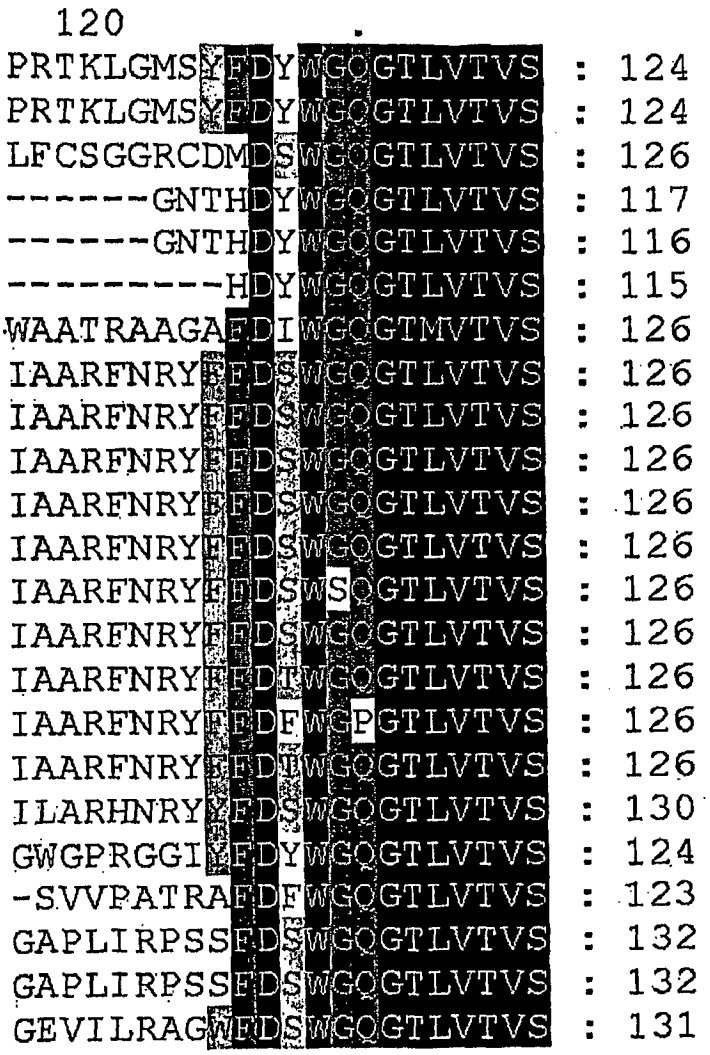

120
PRTKLGMSYFDYWGQGTLVTVS : 124
PRTKLGMSYFDYWGQGTLVTVS : 124
LFCSGGRCDMDSWGQGTLVTVS : 126
-------GNTHDYWGQGTLVTVS : 117
-------GNTHDYWGQGTLVTVS : 116
----------HDYWGQGTLVTVS : 115
WAATRAAGAFDIWGQGTMVTVS : 126
IAARFNRYFFDSWGQGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDSWGQGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDSWGQGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDSWGQGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDSWGQGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDSWSQGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDSWGQGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDIWGQGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDFWGPGTLVTVS : 126
IAARFNRYFFDIWGQGTLVTVS : 126
ILARHNRYYFDSWGQGTLVTVS : 130
GWGPRGGIYFDYWGQGTLVTVS : 124
-SVVPATRAFDFWGQGTLVTVS : 123
GAPLIRPSSFDSWGQGTLVTVS : 132
GAPLIRPSSFDSWGQGTLVTVS : 132
GEVILRAGWFDSWGQGTLVTVS : 131

图 22h

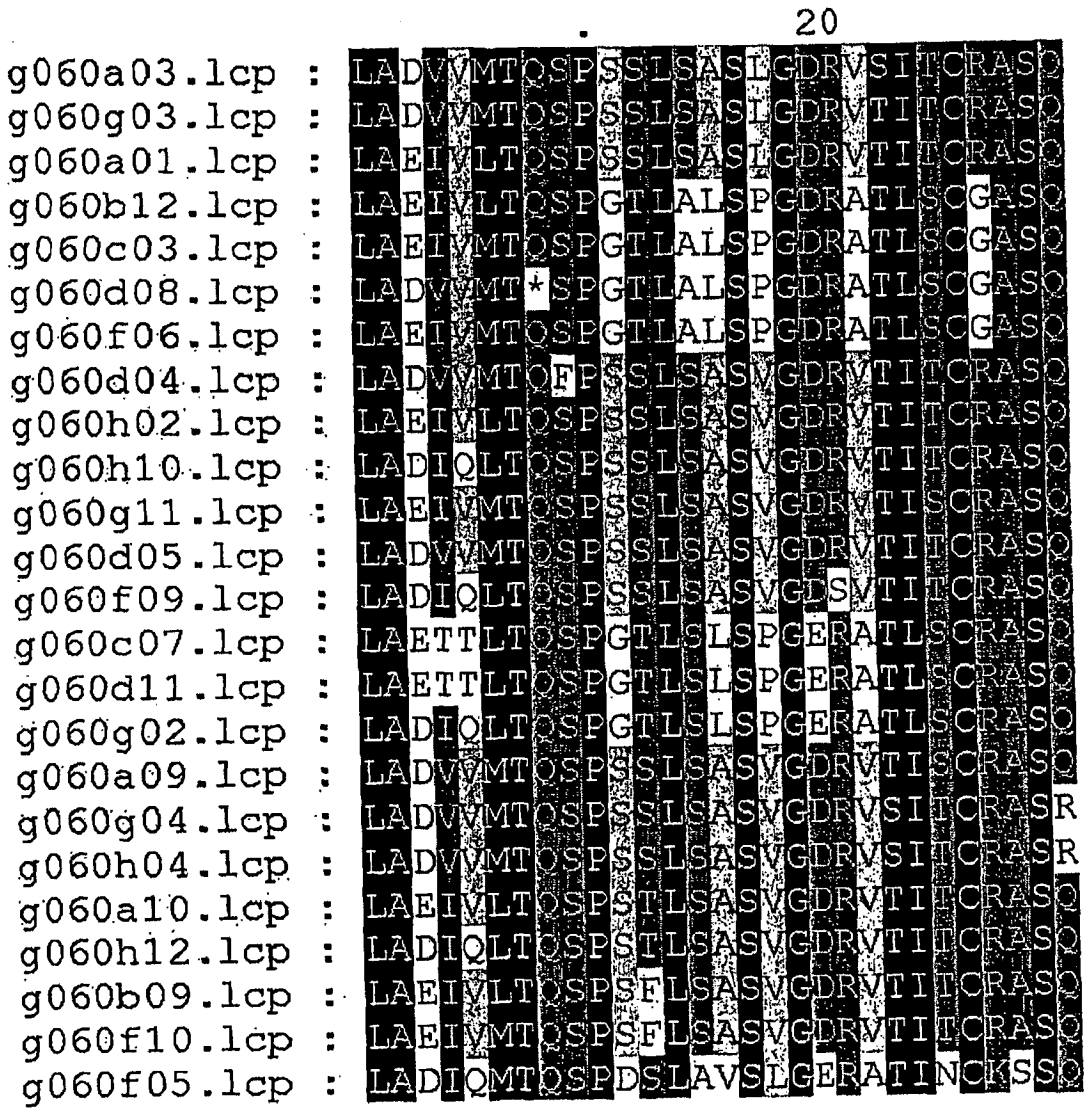

20
g060a03.lcp :
g060g03.lcp :
g060a01.lcp :
g060b12.lcp :
g060c03.lcp :
g060d08.lcp :
g060f06.lcp :
g060d04.lcp :
g060h02.lcp :
g060h10.lcp :
g060g11.lcp :
g060d05.lcp :
g060f09.lcp :
g060c07.lcp :
g060d11.lcp :
g060g02.lcp :
g060a09.lcp :
g060g04.lcp :
g060h04.lcp :
g060a10.lcp :
g060h12.lcp :
g060b09.lcp :
g060f10.lcp :
g060f05.lcp :

图 23a

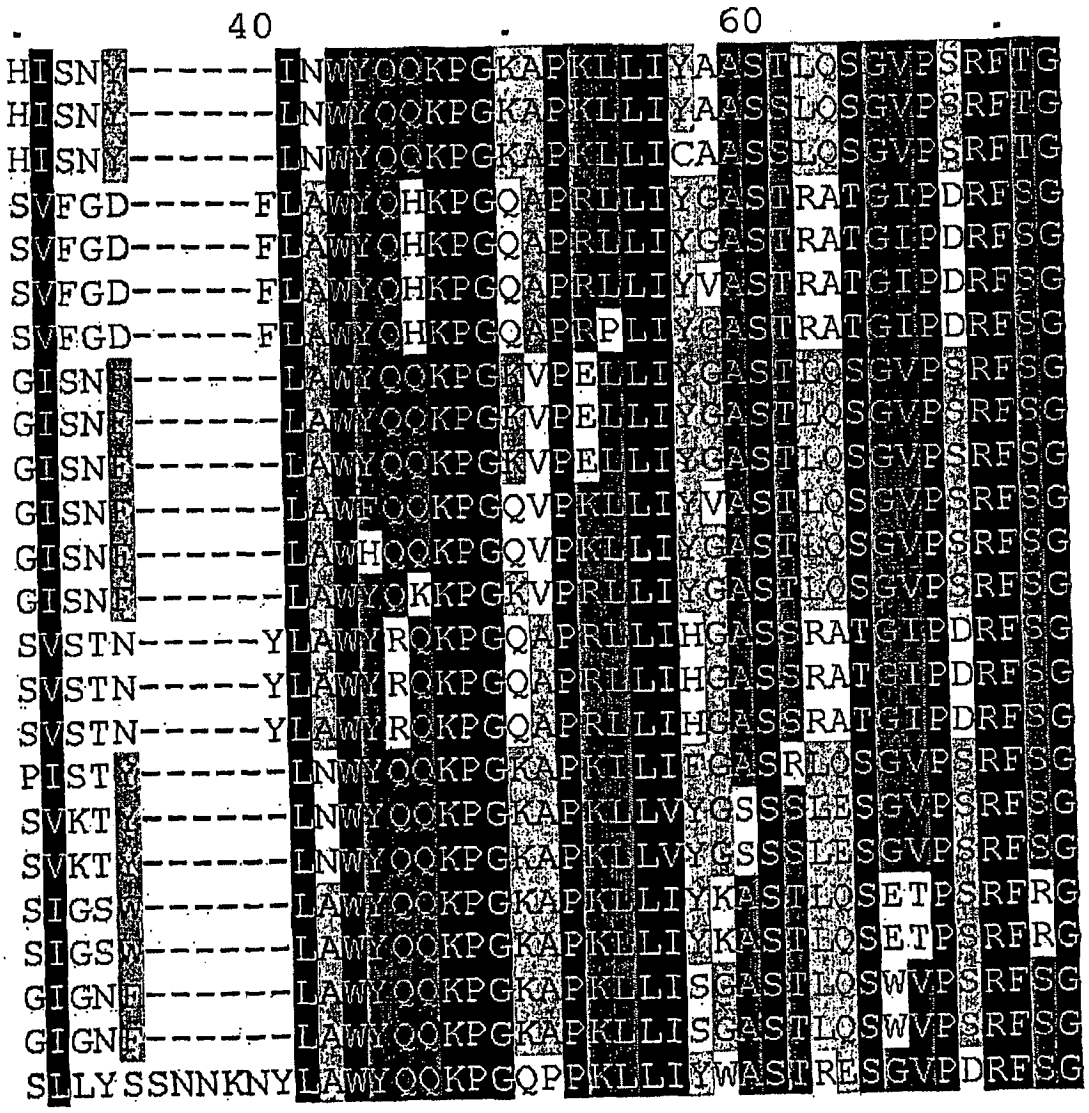


图 23b

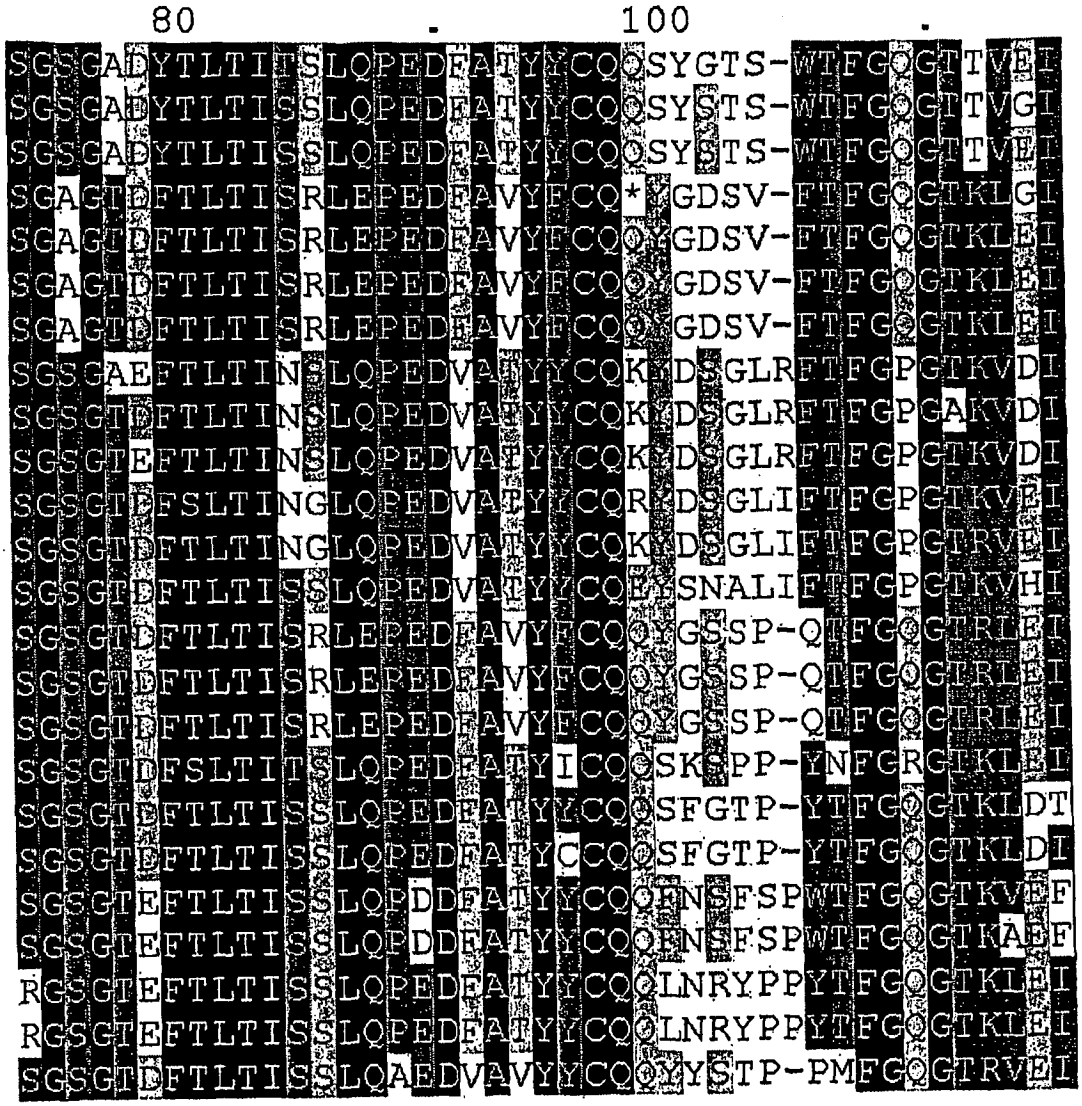


图 23c

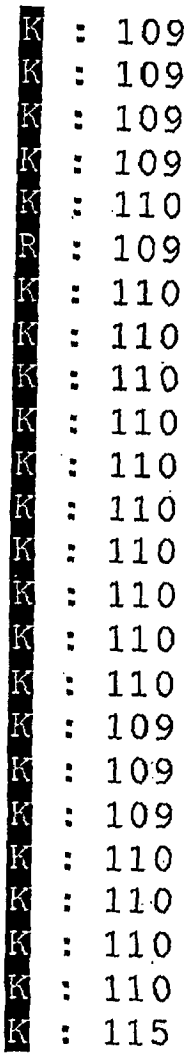

K : 109
K : 109
K : 109
K : 109
K : 110
R : 109
K : 110
K : 110
K : 110
K : 110
K : 110
K : 110
K : 110
K : 110
K : 110
K : 110
K : 109
K : 109
K : 109
K : 110
K : 110
K : 110
K : 110
K : 115

图 23d

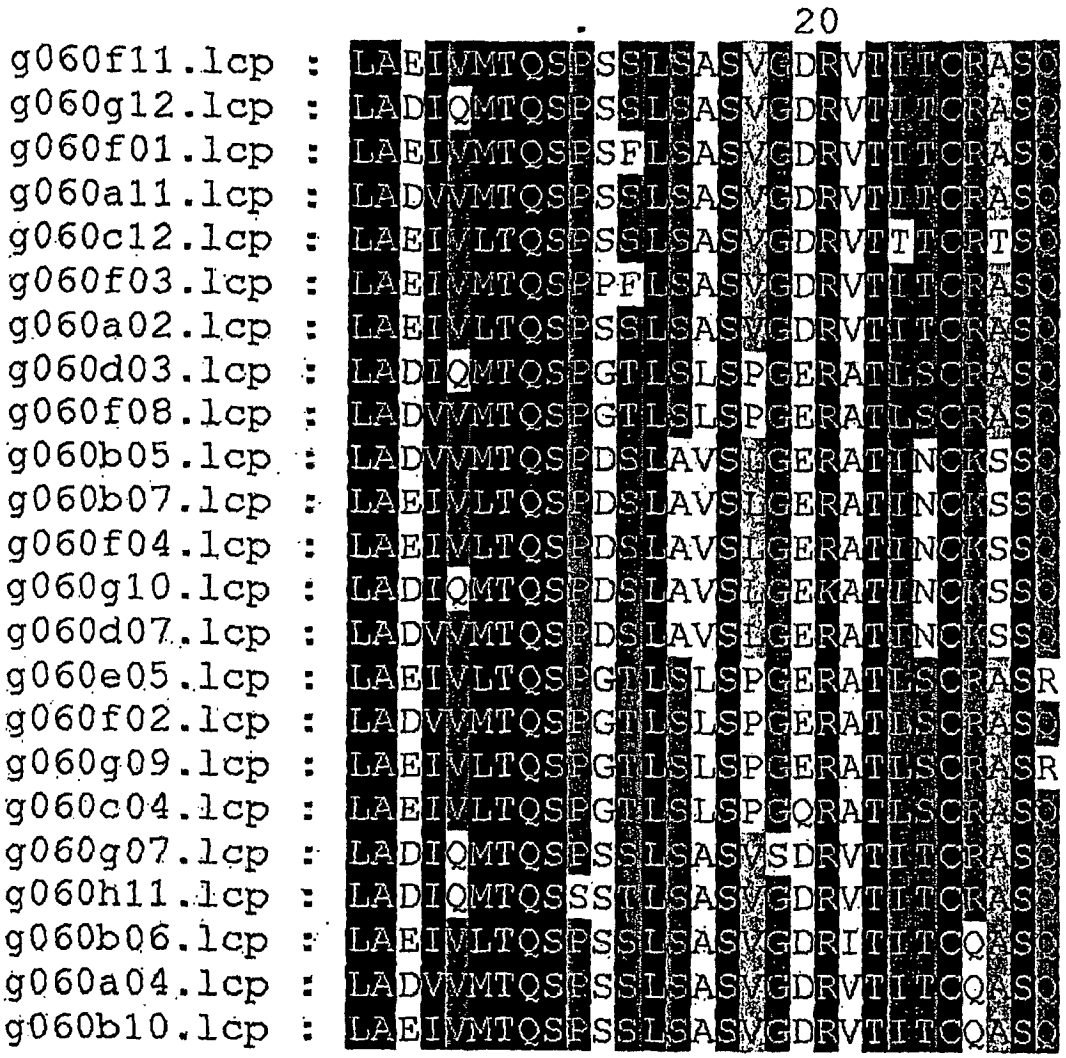

20
g060f11.lcp : LAEIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ
g060g12.lcp : LADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ
g060f01.lcp : LAEIVMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQ
g060a11.lcp : LADVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ
g060c12.lcp : LAEIVLTQSPSSLSASVGDRVTTTCRTSQ
g060f03.lcp : LAEIVMTQSPPFLSASVGDRVTITCRASQ
g060a02.lcp : LAEIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ
g060d03.lcp : LADIQMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQ
g060f08.lcp : LADVVMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQ
g060b05.lcp : LADVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ
g060b07.lcp : LAEIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ
g060f04.lcp : LAEIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ
g060g10.lcp : LADIQMTQSPDSLAVSLGEKATINCKSSQ
g060d07.lcp : LADVVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQ
g060e05.lcp : LAEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASR
g060f02.lcp : LADVVMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQ
g060g09.lcp : LAEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASR
g060c04.lcp : LAEIVLTQSPGTLSLSPGQRATLSCRASQ
g060g07.lcp : LADIQMTQSPSSLSASVSDRVTITCRASQ
g060h11.lcp : LADIQMTQSSSTLSASVGDRVTITCRASQ
g060b06.lcp : LAEIVLTQSPSSLSASVGDRITITCQASQ
g060a04.lcp : LADVVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ
g060b10.lcp : LAEIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQ

图 23e

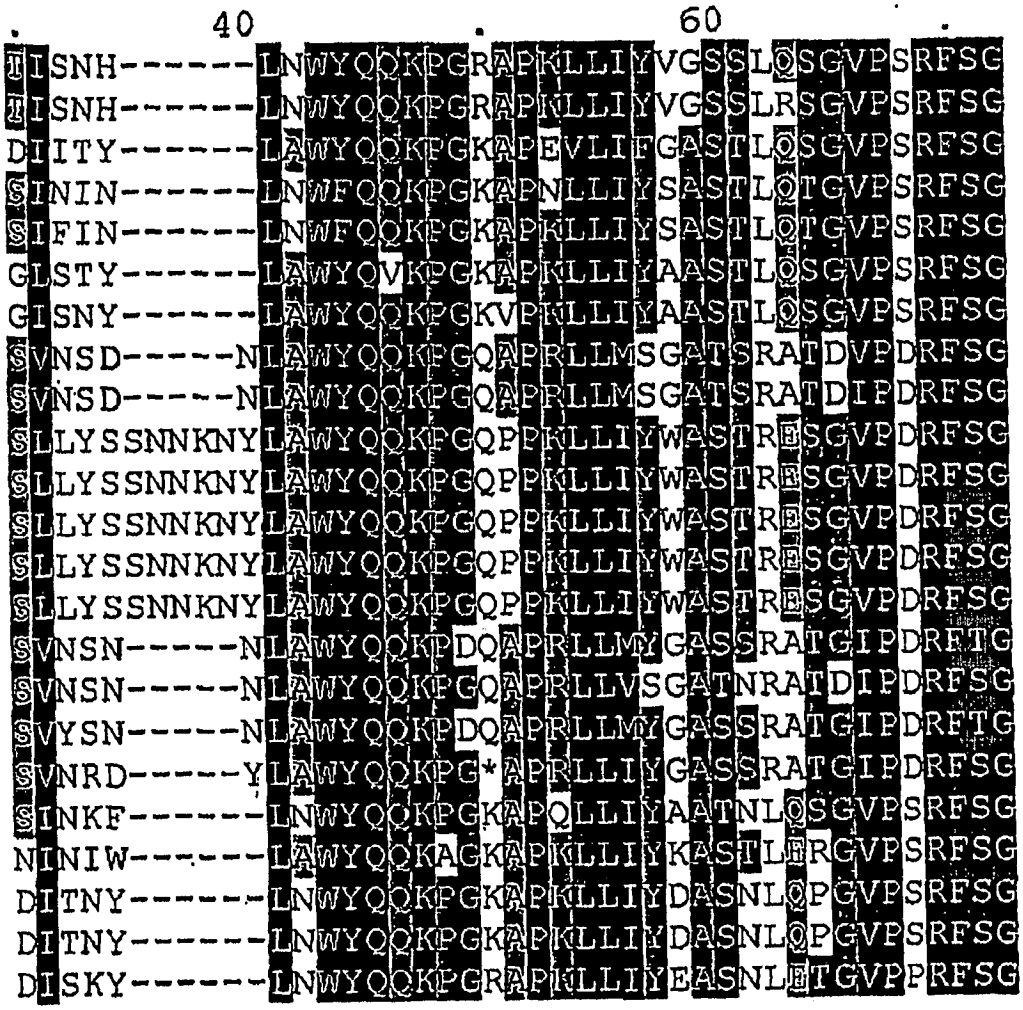

40
60
TISNH------LNWYQQKPGRAPKLLIYVGSSLQSGVPSRFSG
TISNH------LNWYQQKPGRAPKLLIYVGSSLRSGVPSRFSG
DIITY------LAWYQQKPGKAPEVLIFGASTLQSGVPSRFSG
SININ------LNWFQQKPGKAPNLLIYSASTLQTGVPSRFSG
SIFIN------LNWFQQKPGKAPKLLIYSASTLQTGVPSRFSG
GLSTY------LAWYQVKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSG
GISNY------LAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSG
SVNSD-----NLAWYQQKPGQAPRLLMSGATSRATDVPDRFSG
SVNSD-----NLAWYQQKPGQAPRLLMSGATSRATDIPDRFSG
SLLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG
SLLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG
SLLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG
SLLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG
SLLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSG
SVNSN-----NLAWYQQKPDQAPRLLMYGASSRATGIPDRFTG
SVNSN-----NLAWYQQKPGQAPRLLVSGATNRATDIPDRFSG
SVYSN-----NLAWYQQKPDQAPRLLMYGASSRATGIPDRFTG
SVNRD-----YLAWYQQKPG*APRLLIYGASSRATGIPDRFSG
SINKF------LNWYQQKPGKAPQLLIYAATNLQSGVPSRFSG
NINIW------LAWYQQKAGKAPKLLIYKASTLERGVPSRFSG
DITNY------LNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQPGVPSRFSG
DITNY------LNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLQPGVPSRFSG
DISKY------LNWYQQKPGRAPKLLIYEASNLETGVPPRFSG

图 23f

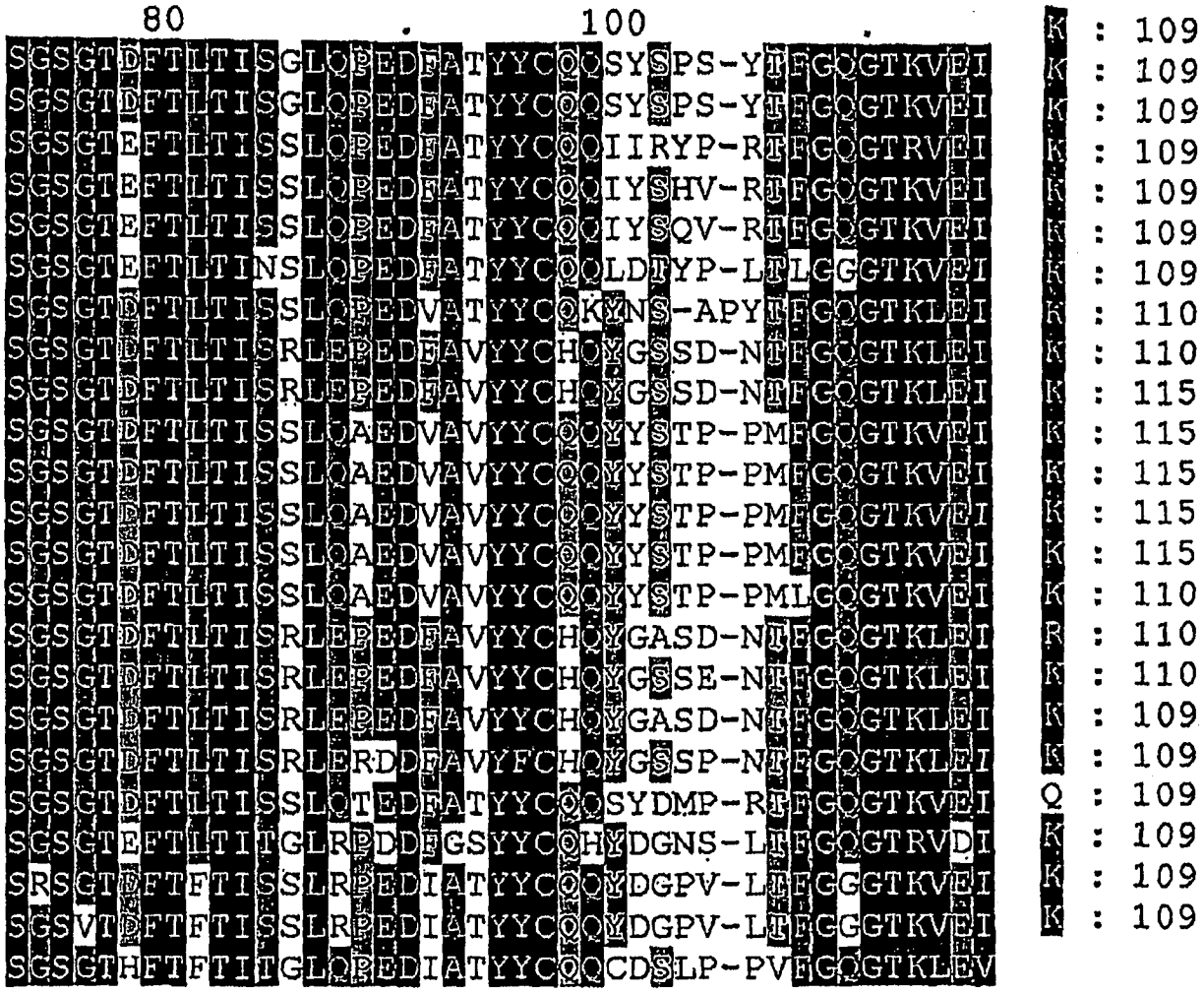

80
100
K : 109
K : 109
K : 109
K : 109
K : 109
K : 109
K : 109
K : 110
K : 110
K : 115
K : 115
K : 115
K : 115
K : 115
K : 110
R : 110
K : 110
K : 109
K : 109
Q : 109
K : 109
K : 109
K : 109

图 23h

图 23g

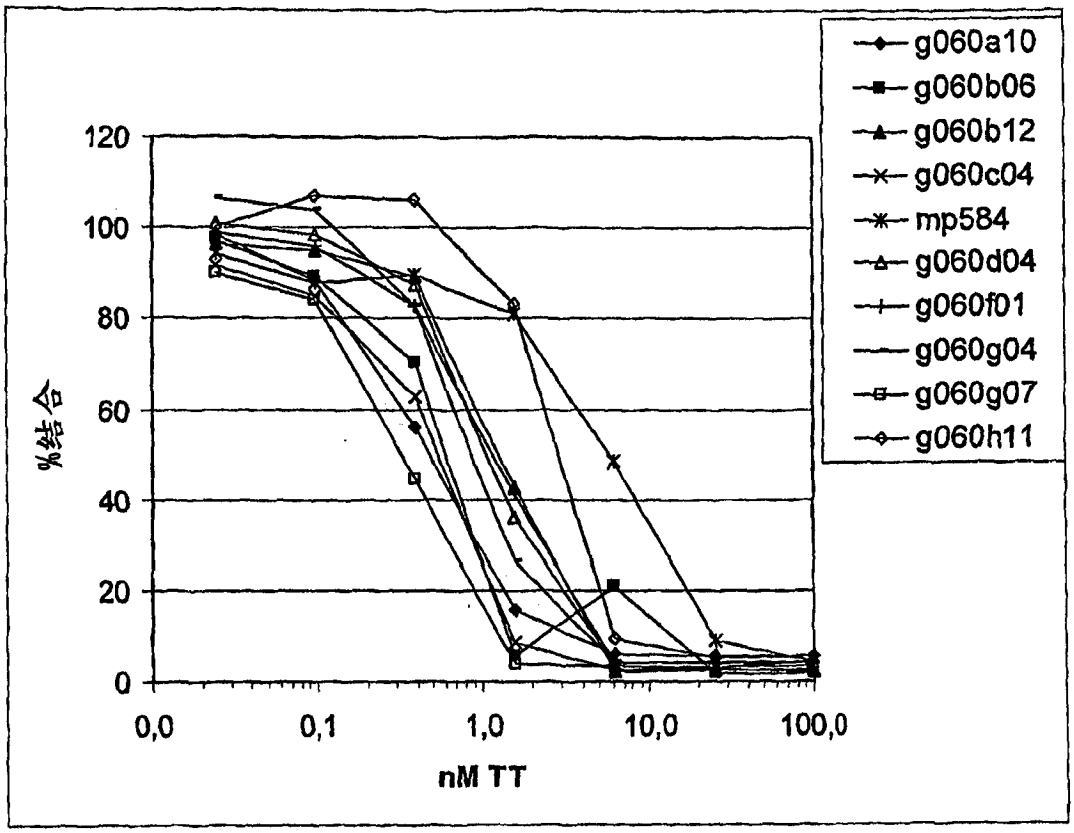

g060a10
g060b06
g060b12
g060c04
mp584
g060d04
g060f01
g060g04
g060g07
g060h11
120
100
80
60
40
20
0
%结合
0,0
0,1
1,0
10,0
100,0
nM TT

图 24

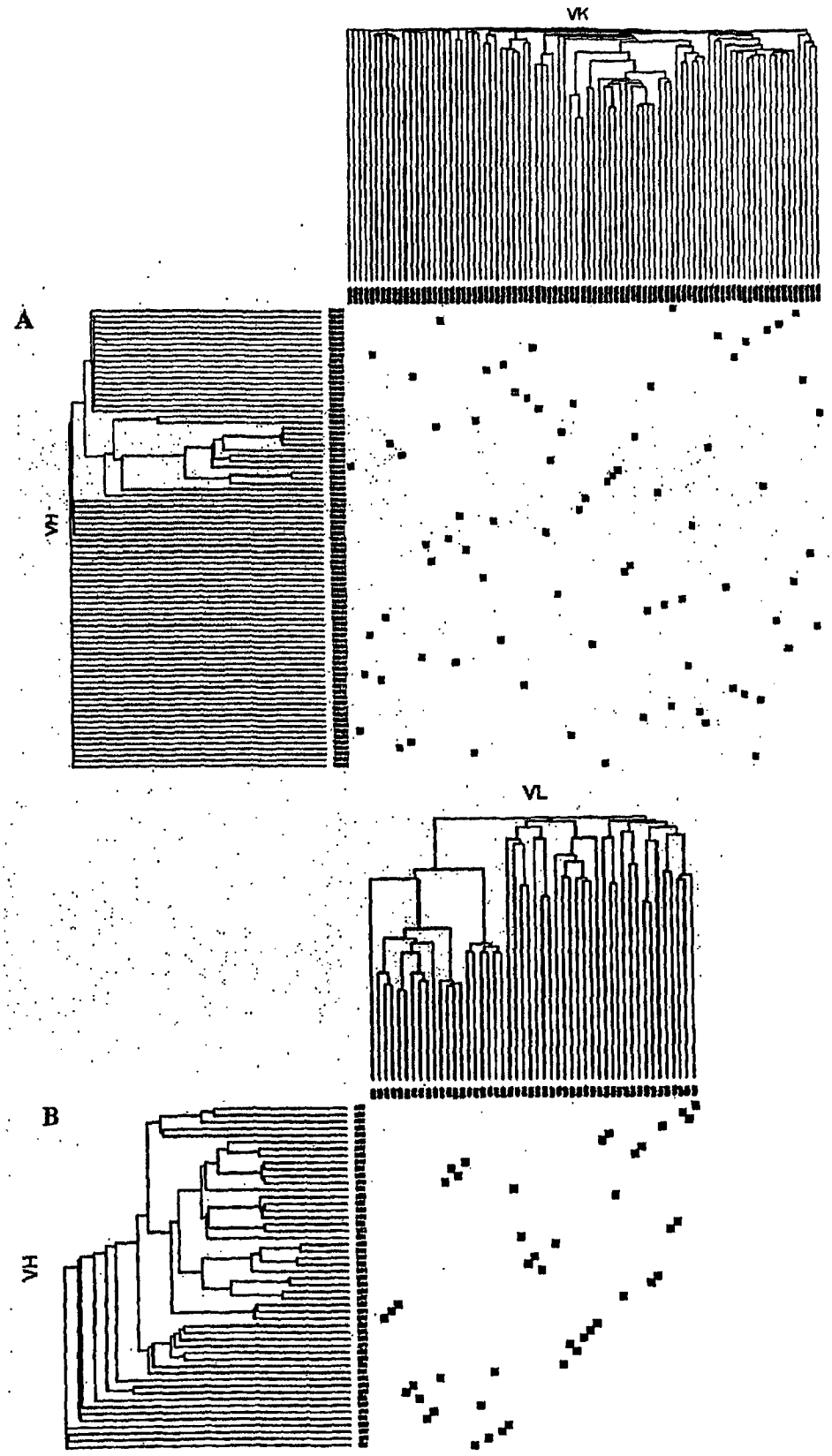


图 25