



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101948534 A

(43) 申请公布日 2011.01.19

(21) 申请号 201010257365.4

(22) 申请日 2010.08.19

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 杭海英 邱俊康

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 15 页 序列表 7 页
附图 5 页

(54) 发明名称

一种筛选抗体的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种筛选抗体的方法。该方法包括如下步骤:1) 将目标蛋白展示于离体真核细胞的细胞膜表面,得到表面展示有目标蛋白的真核细胞;2) 将待筛选蛋白库中的各蛋白分别展示于细菌原生质体表面,得到表面展示有待筛选蛋白的细菌原生质体库。本发明提供了利用 APE_x 展示技术应用于以完整的人细胞为抗原筛选特异识别细胞表面抗原的抗体的一种筛选方法。APE_x 细菌展示系统拥有与噬菌体展示系统相当大小的抗体库 ($\geq 10^9$), 并且具有展示完整的 IgG 抗体的能力。此方法的建立,有助于筛选更多识别细胞表面分子标记的抗体,对疾病诊断和治疗都将起到巨大的推动作用。

1. 一种筛选与目标蛋白结合的目的蛋白的方法,包括如下步骤:

1) 将目标蛋白展示于离体真核细胞的细胞膜表面,得到表面展示有目标蛋白的真核细胞;

2) 将待筛选蛋白库中的各蛋白分别展示于细菌原生质体表面,得到表面展示有待筛选蛋白的细菌原生质体库;

3) 将步骤 1) 得到的真核细胞与步骤 2) 得到的细菌原生质体库共同孵育,使展示于所述真核细胞表面的目标蛋白和展示于所述细菌原生质体表面的蛋白之间发生特异性的相互配对,得到所述真核细胞与所述细菌原生质体的特异性结合物,将所述结合物从孵育体系中分离出来;

4) 从步骤 3) 得到的结合物中分离得到与展示于真核细胞表面的目标蛋白特异性结合的目的蛋白或目的蛋白的编码基因。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中,所述孵育的条件包括:所述孵育体系的 pH 值为 5.0-7.5。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中,所述孵育的条件包括:所述孵育体系的 pH 值为 5.0,5.3,5.5,5.8,6.0,6.3,6.5,6.8,7.0,7.3 或 7.5。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的方法,其特征在于,步骤 3) 中,所述孵育的条件是:温度为 30-37℃ 和时间为 0.5-2 小时;所述温度具体为 30℃ 或 37℃,所述时间具体为 0.5 小时或 1 小时或 2 小时。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的方法,其特征在于,步骤 3) 中,将所述结合物从孵育体系中分离出来的步骤是,首先使用平板淘选法筛选,然后使用流式分选法分选。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于,使用流式分选法的步骤为:首先从所述孵育体系中去除未同所述真核细胞形成特异性结合物的细菌原生质体,再通过流式细胞仪筛选,收集所述真核细胞与原生质体发生特异性结合的结合物。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于:从所述孵育体系中去除未同所述真核细胞形成特异性结合物的细菌原生质体的步骤为:将所述的孵育体系常温 300g 离心 1.5-3 分钟后,收集沉淀,弃去上清。

8. 根据权利要求 1-7 中任一所述的方法,其特征在于,

步骤 1) 中,所述将目标蛋白展示于真核细胞的细胞膜表面是由包括如下步骤的方法制备得到的:将含有所述目标蛋白编码基因的重组表达载体转入所述真核细胞中,得到重组真核细胞,培养该重组真核细胞并诱导所述重组载体的表达,得到所述表面展示有目标蛋白的真核细胞;

步骤 2) 中,将待筛选蛋白库中的各蛋白分别展示于细菌原生质体表面的方法包括如下步骤:将待筛选蛋白的编码基因插入细菌表达载体中,得到表达所述待筛选蛋白的重组载体,将所述表达待筛选蛋白的重组载体转入宿主细菌,得到重组细菌,培养所述重组细菌并诱导所述重组载体的表达,再提取重组细菌的原生质体,得到所述表面展示有待筛选蛋白的细菌原生质体。

9. 根据权利要求 1-8 中任一所述的方法,其特征在于,所述含有所述目标蛋白的编码基因的重组载体是受四环素调控的重组载体;所述培养该重组真核细胞并诱导所述重组载体的表达的方法为:将插入外源基因后的真核表达载体转入所述真核细胞,并用四环素诱

导所述真核细胞表达目标蛋白。

10. 根据权利要求 1-9 所述的方法,其特征在于,所述宿主细菌中还转入用于通过荧光信号筛选原生质体的荧光蛋白表达载体。所述荧光蛋白表达载体可以是在细菌中表达任何颜色荧光蛋白质的载体,优选为 pBAD30-KmR-GFPmut2。

11. 根据权利要求 1-10 中任一所述的方法,其特征在于,所述目标蛋白的编码基因是人源化的;所述真核细胞是人非小细胞肺癌细胞株 H1299;所述真核表达载体为真核细胞膜表面展示载体;所述真核细胞膜表面展示载体是核苷酸序列是 SEQ ID :6 所示的载体 pUHD10-3-display。

12. 根据权利要求 1-11 中任一所述的方法,其特征在于,所述宿主细菌为大肠杆菌,优选为 E. coli Jude-1。

13. 根据权利要求 1-12 中任一所述的方法,其特征在于,所述步骤 4) 中,所述从结合物中分离得到目的蛋白或目的蛋白的编码基因的方法包括如下步骤:从所述结合物中提取所述表达目的蛋白的重组载体,对重组载体进行测序,得到所述目的蛋白的编码基因。

14. 一种辅助鉴定蛋白是否与目标蛋白结合的方法,包括如下步骤:

1) 将目标蛋白展示于离体真核细胞的细胞膜表面,得到表面展示有目标蛋白的真核细胞;

2) 将待鉴定蛋白库中的各蛋白分别展示于细菌原生质体表面,得到表面展示有待鉴定蛋白的细菌原生质体库;

3) 将步骤 1) 得到的真核细胞与步骤 2) 得到的细菌原生质体库共同孵育,使展示于所述真核细胞表面的目标蛋白和展示于所述细菌原生质体表面的蛋白之间发生特异性的相互配对,得到所述真核细胞与所述细菌原生质体的特异性结合物,检测孵育的体系中是否含有所述特异性结合物,若含有所述特异性结合物,则所述待鉴定蛋白与所述目标蛋白结合,若不含有所述特异性结合物,则所述待鉴定蛋白不与所述目标蛋白结合。

15. 一种用于筛选与目标蛋白结合的目的蛋白的试剂盒,由真核细胞、真核细胞表达载体、用于制备原生质体的细菌、原生质体展示载体、在原生质体中表达荧光蛋白以便于筛选的载体组成。

16. 根据权利要求 15 所述的试剂盒,其特征在于,所述真核细胞为人非小细胞肺癌细胞株 H1299;所述真核细胞表达载体为 pUHD10-3-display;所述细菌为大肠杆菌菌株 Jude-1;所述表达荧光蛋白的载体为 pBAD30-KmR-GFPmut2。

17. 权利要求 15-16 所述试剂盒在筛选与目标蛋白结合的目的蛋白中的应用。

18. 细菌原生质体展示方法在筛选与目标蛋白结合的目的蛋白中的应用。

一种筛选抗体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种筛选抗体的方法。

背景技术

[0002] 借助蛋白展示技术的高通量抗体筛选已经成为现在抗体制备的主要方法之一。噬菌体展示技术、核糖体展示技术和酵母展示技术已经被广泛的应用于新抗体的筛选和抗体亲和力的改进。展示的抗体能与目的抗原结合从而被快速的从复杂的抗体文库中筛选出来。通常用于抗体筛选的抗原是已知的可溶性纯化抗原。然而许多疾病的分子标记都定位于细胞膜表面,并且具有复杂的翻译后修饰,例如糖基化 (Ohtsubo K, Marth JD:Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell 2006, 126(5):855-867.)。糖基化丢失会影响蛋白的折叠效率和稳定性 (Shental-Bechor D, Levy Y:Folding of glycoproteins:toward understanding the biophysics of the glycosylation code. Curr Opin Struct Biol 2009,19(5):524-533.)。并且许多癌细胞表面的糖基化都有明显变化 (Kim YJ, Varki A:Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. Glycoconj J 1997,14(5):569-576.)。可是通过生物工程技术进行生产和纯化的可溶性抗原通常会丢失翻译后修饰,无法真实反映天然抗原的构象 (Liat Binyamina HBaLMW:Cancer therapy with engineered monoclonal antibodies Update on Cancer Therapeutics 2006,1(2):147-157. Linenberger ML, Maloney DG, Bernstein ID:Antibody-directed therapies for hematological malignancies. Trends Mol Med 2002,8(2):69-76.)。而且有时抗原是未知的分子,无法获得纯化的抗原。因此如果能以完整细胞为抗原筛选特异结合细胞表面抗原的抗体,才有利于筛选到识别天然抗原表位的新抗体,将更加有利于临床的诊断和治疗。

[0003] 到目前为止,噬菌体展示系统和酵母展示系统都已被证明能够直接以完整的细胞作为抗原,筛选特异识别细胞表面抗原的抗体。但是噬菌体展示技术由于展示效率有限,不是所有的序列都能在噬菌体中获得很好的表达。而且在噬菌体扩增的过程中,由于插入片段性质的不同,可能呈现出生长差异,从而可能丢失文库多样性。此外,噬菌体展示系统难以展示分子量较大的蛋白,因此不能成功展示完整的 IgG 抗体分子。而酵母展示技术由于受到转化效率的影响,很难构建足够大的抗体文库。通常文库大小 $< 10^8$ 。

[0004] 细菌原生质体展示技术 (APEX) (Harvey BR, Georgiou G, Hayhurst A, Jeong KJ, Iverson BL, Rogers GK:Anchored periplasmic expression, a versatile technology for the isolation of high-affinity antibodies from Escherichia coli-expressed libraries. Proc Natl Acad Sci USA 2004,101(25):9193-9198.) 是一种高效的细菌展示技术。APEX 展示技术是将蛋白质表达定位到细菌周质空间中,蛋白质通过 N 端融合的内膜脂蛋白 NlpA 的六个氨基酸序列 (CDQSSS) 以共价酯化的方式锚定在内膜外侧,或者是通过 C 端融合的 M13 噬菌体外壳蛋白 3 (g3p) 的 N 端片段锚定在内膜中,从而将目的蛋白展示到周质空间。然后可以通过 EDTA 和溶菌酶的作用将细菌的外膜去掉,从而将内膜上锚定的蛋

白质暴露出来。暴露的抗体可以和荧光标记的抗原结合从而使细菌获得明显的荧光。通过流式分选可以将特异结合抗原的细菌分选出来,从而获得相应的抗体。

[0005] APEx 展示系统具有许多优点。(1) APEx 展示系统是一种细菌展示系统,容易构建巨大的抗体文库 ($> 10^9$)。(2) 锚定方式多样,可以选择 C 端或 N 端锚定。(3) 由于抗体展示在内膜表面,而内膜不含有 LPS 或其它复杂的多糖类外膜的成份,表面相对平整因此不会对大分子抗原与抗体的结合产生空间影响。因此, APEx 系统展示的抗体可有效的结合分子量高达 240kDa 的可溶性抗原。(4) 抗体的展示只需要穿过一层细胞膜,而不需要像酵母展示或细菌外膜展示系统那样要穿越细胞外壁,这使得抗体的展示不会受分子量和空间结构的限制,展示效果更好。因此, APEx 系统能够成功地展示完整的 IgG 抗体 (Mazor Y, Van Blarcom T, Mabry R, Iverson BL, Georgiou G: Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 2007, 25(5):563-565.)。并且完整的 IgG 抗体具有两个抗原结合位点,可以产生二价结合,这将有利于筛选单价结合亲和力较低的抗体。(5) 可以直接利用广泛使用的噬菌体展示载体来进行蛋白表达,这使得可以直接利用许多噬菌体展示的单链抗体的文库资源。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种筛选与目标蛋白结合的目的蛋白的方法。

[0007] 本发明所提供的筛选与目标蛋白结合的目的蛋白的方法,包括如下步骤:

[0008] 1) 将目标蛋白展示于真核细胞的细胞膜表面,得到表面展示有目标蛋白的真核细胞;

[0009] 2) 将待筛选蛋白库中的各蛋白分别展示于细菌原生质体表面,得到表面展示有待筛选蛋白的细菌原生质体库;

[0010] 3) 将步骤 1) 得到的真核细胞与步骤 2) 得到的细菌原生质体库共同孵育,使展示于所述真核细胞表面的目标蛋白和展示于所述细菌原生质体表面的蛋白之间发生特异性的相互配对,得到所述真核细胞与所述细菌原生质体的特异性结合物,将所述结合物从孵育体系中分离出来;

[0011] 4) 从步骤 3) 得到的结合物中分离得到与展示于真核细胞表面的目标蛋白特异性结合的目的蛋白或目的蛋白的编码基因。

[0012] 上述筛选方法中,所述待筛选蛋白库为含有与目标蛋白结合的目的蛋白的待筛选蛋白库。即该方法适合于含有与目标蛋白结合的目的蛋白的待筛选蛋白库。

[0013] 上述筛选方法中,待筛选蛋白库可以是现有的用于噬菌体展示技术的可筛选的蛋白库,也可以是现有的包含更大的抗体(例如完整的 IgG)的蛋白库。

[0014] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 3) 中,所述孵育的条件包括:所述孵育体系的 pH 值为 5.0-7.5,具体为 5.0,5.3,5.5,5.8,6.0,6.3,6.5,6.8,7.0,7.3,7.5。

[0015] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 3) 中,所述孵育的条件包括:温度为 30-37°C,具体为 30°C 或 37°C;时间为 0.5-2 小时,具体为 0.5h 或 1h 或 2h。

[0016] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 3) 中,所述将所述结合物从孵育的体系中分离出来的方法包括,首先使用平板淘选法筛选,然后使用流式分选法分选。

[0017] 上述任一所述筛选方法中,使用流式分选法的步骤为:首先从所述孵育体系中去

除未同所述真核细胞形成特异性结合物的细菌原生质体,再通过流式细胞仪筛选,收集所述真核细胞与原生质体发生特异性结合的结合物。

[0018] 上述流式细胞仪筛选方法中,所述从所述孵育体系中去未形成结合物的细菌原生质体的方法为将所述孵育的体系 300g 离心 1.5-3 分钟后,收集沉淀,弃去上清。

[0019] 上述任一所述筛选方法中,所述将所述结合物从孵育的体系中分离出来的方法中;淘选法为在平板上淘选可结合的细菌原生质体,它主要是一种定性的筛选,是把能够结合的细菌原生质体都筛选出来,而不是根据结合力强弱来进行筛选。而流式细胞分选技术是一种具有高通量,多参数定量分选能力的技术,它能够根据亲和力强弱进行定量的筛选。

[0020] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 1) 中,所述将目标蛋白展示于真核细胞的细胞膜表面是由包括如下步骤的方法制备得到的:将含有所述目标蛋白编码基因的重组载体转入所述真核细胞中,得到重组真核细胞,培养该重组真核细胞并诱导所述重组载体的表达,得到所述表面展示有目标蛋白的真核细胞;

[0021] 所述真核表达载体可以是:任何可在真核细胞膜表面展示的载体。优选是 pUHD10-3-display (SEQ ID:6),该载体是按照如下方法得到的:将 DNA 片段插入 pUHD10-3 载体中四环素调控的启动子下游的 EcoR I 和 Xba I 之间,得到中间重组载体;再将所述目标蛋白的编码基因插入所述中间重组载体的 Bgl II 和 Sal I 位点间,得到所述目标蛋白的编码基因的重组载体;

[0022] 所述 DNA 片段的序列如下所示,制备方法为以载体 pDisplay 为模板,用如下引物对进行 PCR 扩增得到的:

[0023] 上游引物:ACGCGAATTCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCT

[0024] 下游引物:AACTAGTCTAGACTAACGTGGCTTCTTCTGCCAAAGCAT。

[0025] 所述真核细胞可以是:CHO、COS1、COS7、293T、HeLa、HCT116 等,优选是 H1299 细胞株。

[0026] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 1) 中,所述目标蛋白的编码基因是人源化的。

[0027] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 2) 中,将待筛选蛋白库中的各蛋白分别展示于细菌原生质体表面的方法包括如下步骤:将待筛选蛋白的编码基因插入细菌表达载体中,得到表达所述待筛选蛋白的重组载体,将所述表达待筛选蛋白的重组载体转入宿主细菌,得到重组细菌,培养所述重组细菌并诱导所述重组载体的表达,再提取重组细菌的原生质体,得到所述表面展示有待筛选蛋白的细菌原生质体。

[0028] 所述的细菌中还可以转入用于通过荧光信号筛选原生质体的荧光蛋白表达载体,该载体可以是:在细菌中表达任何颜色荧光蛋白质的载体,优选为 pBAD30-KmR-GFPmut2。

[0029] 所述的细菌可以是:各种大肠杆菌如 DH10B, Top10, JM109, BL21 等,优选为大肠杆菌 Jude-1

[0030] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 4) 中,所述从结合物中分离得到目的蛋白或目的蛋白的编码基因的方法包括如下步骤:从所述结合物中提取所述表达目的蛋白的重组载体,将重组载体进行测序,得到所述目的蛋白的编码基因。

[0031] 实际应用中,所述目标蛋白可为抗原,所述待筛选蛋白可为抗体;所述抗体具体可为特异识别人源细胞表面抗原的抗体。

[0032] 本发明的另一个目的是提供一种使用上述方法辅助鉴定蛋白是否与目标蛋白结合的方法。

[0033] 本发明所提供的辅助鉴定蛋白是否与目标蛋白结合的方法,包括如下步骤:

[0034] 1) 将目标蛋白展示于离体真核细胞的细胞膜表面,得到表面展示有目标蛋白的真核细胞;

[0035] 2) 将待鉴定蛋白库中的各蛋白分别展示于细菌原生质体表面,得到表面展示有待鉴定蛋白的细菌原生质体库;

[0036] 3) 将步骤 1) 得到的真核细胞与步骤 2) 得到的细菌原生质体库共同孵育,使展示于所述真核细胞表面的目标蛋白和展示于所述细菌原生质体表面的蛋白之间发生特异性的相互配对,得到所述真核细胞与所述细菌原生质体的特异性结合物,检测孵育的体系中是否含有所述特异性结合物,若含有所述特异性结合物,则所述待鉴定蛋白与所述目标蛋白结合,若不含有所述特异性结合物,则所述待鉴定蛋白不与所述目标蛋白结合。

[0037] 上述鉴定方法中,所述待鉴定蛋白库为含有与目标蛋白结合的目的蛋白的待筛选蛋白库。即该方法适合于含有与目标蛋白结合的目的蛋白的待鉴定蛋白库。

[0038] 上述鉴定方法中,待鉴定蛋白库可以是现有的用于噬菌体展示技术的可筛选的蛋白库,也可以是现有的包含更大的抗体(例如完整的 IgG)的蛋白库。

[0039] 上述任一所述鉴定方法中,所述步骤 3) 中,所述孵育的条件包括:所述孵育体系的 pH 值为 5.0-7.5,具体为 5.0,5.3,5.5,5.8,6.0,6.3,6.5,6.8,7.0,7.3,7.5。

[0040] 上述任一所述鉴定方法中,所述步骤 3) 中,所述孵育的条件包括:温度为 30-37°C 和时间为 0.5-2 小时。

[0041] 上述任一所述鉴定方法中,所述步骤 3) 中,检测孵育的体系中是否含有所述特异性结合物的方法是流式细胞仪检测。

[0042] 上述任一所述鉴定方法中,所述步骤 3) 中,可将所述结合物从孵育的体系中分离出来再进行检测,分离方法包括,首先使用平板淘选法筛选,然后使用流式分选法分选。

[0043] 上述任一所述鉴定方法中,使用流式分选法的步骤为:首先从所述孵育体系中去掉未同所述真核细胞形成特异性结合物的细菌原生质体,再通过流式细胞仪筛选,收集所述真核细胞与原生质体发生特异性结合的结合物。

[0044] 上述流式细胞仪筛选方法中,所述从所述孵育体系中去掉未形成结合物的细菌原生质体的方法为将所述孵育的体系 300g 离心 1.5-3 分钟后,收集沉淀,弃去上清。

[0045] 上述任一所述筛选方法中,所述将所述结合物从孵育的体系中分离出来的方法中;淘选法为在平板上淘选可结合的细菌原生质体,它主要是一种定性的筛选,是把能够结合的细菌原生质体都筛选出来,而不是根据结合力强弱来进行筛选。而流式细胞分选技术是一种具有高通量,多参数定量分选能力的技术,它能够根据亲和力强弱进行定量的筛选。

[0046] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 1) 中,所述将目标蛋白展示于真核细胞的细胞膜表面是由包括如下步骤的方法制备得到的:将含有所述目标蛋白编码基因的重组载体转入所述真核细胞中,得到重组真核细胞,培养该重组真核细胞并诱导所述重组载体的表达,得到所述表面展示有目标蛋白的真核细胞;

[0047] 所述真核表达载体可以是:任何可在真核细胞膜表面展示的载体。优选是 pUHD10-3-display (SEQ ID :6),该载体是按照如下方法得到的:将 DNA 片段插入 pUHD10-3

载体中四环素调控的启动子下游的 EcoR I 和 Xba I 之间,得到中间重组载体;再将所述目标蛋白的编码基因插入所述中间重组载体的 Bgl II 和 Sal I 位点间,得到所述目标蛋白的编码基因的重组载体;

[0048] 所述 DNA 片段的序列如下所示,制备方法为以载体 pDisplay 为模板,用如下引物对进行 PCR 扩增得到的:

[0049] 上游引物:ACGCGAATTCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTCGCT

[0050] 下游引物:AACTAGTCTAGACTAACGTGGCTTCTTCTGCCAAAGCAT。

[0051] 所述真核细胞可以是:CHO、COS1、COS7、293T、HeLa、HCT116 等,优选是 H1299 细胞株。

[0052] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 1) 中,所述目标蛋白的编码基因是人源化的。

[0053] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 2) 中,将待筛选蛋白库中的各蛋白分别展示于细菌原生质体表面的方法包括如下步骤:将待筛选蛋白的编码基因插入细菌表达载体中,得到表达所述待筛选蛋白的重组载体,将所述表达待筛选蛋白的重组载体转入宿主细菌,得到重组细菌,培养所述重组细菌并诱导所述重组载体的表达,再提取重组细菌的原生质体,得到所述表面展示有待筛选蛋白的细菌原生质体。

[0054] 所述的细菌中还可以转入用于通过荧光信号筛选原生质体的荧光蛋白表达载体,该载体可以是:在细菌中表达任何颜色荧光蛋白质的载体,优选为 pBAD30-KmR-GFPmut2。

[0055] 所述的细菌可以是:各种大肠杆菌如 DH10B, Top10, JM109, BL21 等,优选为大肠杆菌 Jude-1。

[0056] 上述任一所述筛选方法中,所述步骤 4) 中,所述从结合物中分离得到目的蛋白或目的蛋白的编码基因的方法包括如下步骤:从所述结合物中提取所述表达目的蛋白的重组载体,将重组载体进行测序,得到所述目的蛋白的编码基因。

[0057] 实际应用中,所述目标蛋白可为抗原,所述待鉴定蛋白可为抗体;所述抗体具体可为特异识别人源细胞表面抗原的抗体。

[0058] 本发明的另一个目的是提供一种用于筛选与目标蛋白结合的目的蛋白的试剂盒。

[0059] 本发明所提供的用于筛选与目标蛋白结合的目的蛋白的试剂盒,由真核细胞、真核细胞表达载体、用于制备原生质体的细菌、原生质体展示载体、在原生质体中表达荧光蛋白以便于筛选的载体组成。

[0060] 上述试剂盒中,所述离体人源细胞为人非小细胞肺癌细胞株 H1299;所述真核细胞表达载体为 pUHD10-3-display (SEQ ID :6);所述细菌为大肠杆菌菌株 Jude-1;所述表达荧光蛋白的载体为 pBAD30-KmR-GFPmut2。

[0061] 细菌原生质体展示方法在筛选与目标蛋白结合的目的蛋白中的应用也属于本发明的保护范围。

[0062] 本发明提供了利用 APEX 展示技术应用用于以完整的人细胞为抗原筛选特异识别人细胞表面抗原的抗体的一种筛选方法。APEX 细菌展示系统拥有与噬菌体展示系统相当大小的抗体库 ($\geq 10^9$),并且具有展示完整的 IgG 抗体的能力。此外 APEX 细菌展示系统可以直接利用广泛使用的噬菌体表达载体进行蛋白展示,因此可以直接利用现有的噬菌体单链抗体文库进行筛选。此方法的建立,有助于筛选更多识别细胞表面分子标记的抗体,对疾病诊

断和治疗都将起到巨大的推动作用。

附图说明

[0063] 图 1 为荧光显微镜观察和流式细胞仪分析 H1299-tet^{on}-PAD4 细胞表面 PAD4 的表达。

[0064] 图 2 为荧光显微镜观察细菌原生质体与贴壁细胞的结合。

[0065] 图 3 为 H1299-tet^{on}-PAD4 细胞与展示抗体 M18 的细菌原生质体的特异结合。

[0066] 图 4 为 pH 值对展示抗体 M18 的细菌原生质体与 H1299-tet^{on}-PAD4 细胞结合的影响。

[0067] 图 5 为展示 M18 抗体的细菌原生质体在不同初始纯度时被平板淘选和流式分选富集效率。

[0068] 图 6 为多轮富集展示 M18 抗体的细菌原生质体。

具体实施方式

[0069] 本发明用已有的抗原-抗体对作为模型,证明展示了特定抗体的细菌原生质体,能够通过与人细胞表面展示的抗原相互作用从而结合到细胞表面。选用了炭疽杆菌保护抗原的一个片断 PA domain4 作为抗原,而对应的单链抗体为 M18 scFv。而抗地高辛标签 (DIG) 的单链抗体 26-10 scFv 作为阴性对照。将诱导后的 H1299-tet^{on}-PAD4 细胞从平板上酶解下来,然后分别和展示抗 PAD4 的单链抗体或抗 DIG 标签的单链抗体并带有 GFPmut2 荧光的细菌原生质体孵育。孵育完后,去掉未结合的细菌原生质体。将细胞重悬后在流式细胞仪上检测。由于细胞和细菌原生质体在大小上有明显差别,在流式细胞仪上可以通过前向散射光 FSC 和测向散射光 SSC 信号明显的区分开。H1299 细胞在流式细胞仪上呈现比细菌原生质体更大的 FSC 和 SSC 信号,可以准确的选取细胞群,分析细胞因为结合了有荧光的细菌原生质体而获得的 GFP 荧光。荧光的强弱就能反映出细菌原生质体结合的强弱。

[0070] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0071] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0072] 实施例 1、筛选抗体的方法

[0073] 一、将抗原 PAD4 展示于离体的动物细胞表面

[0074] 人非小细胞肺癌细胞株 H1299 细胞购自中国医学科学院肿瘤细胞库,产品目录号为 0092。

[0075] pUHD10-3 载体在文献 (Gossen M, Bujard H: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89(12):5547-5551.) 中公开过。

[0076] 人源化的抗原 PAD4 (Domain 4 of the Anthrax Protective Antigen gene) 的编码基因序列如 SEQ ID NO:5 所示。人细胞 mRNA 翻译常用的密码子与细菌有所差异,人源化该 DNA 的目的是为了人细胞的翻译机器能高效地翻译该基因转录出来的 mRNA。

[0077] pDisplay (购自 Invitrogen) 是哺乳动物细胞表达载体,专门用于将重组蛋白定位于哺乳动物细胞膜表面。通过将感兴趣的基因克隆到载体框架 (包括 N 端 Ig κ 分泌信号, C 端血小板来源的生长因子受体 (PDGFR) (Gronwald RG, Grant FJ, Haldeman BA, Hart

CE, O' Hara PJ, Hagen FS, Ross R, Bowen-Pope DF, Murray MJ: Cloning and expression of a cDNA coding for the human platelet-derived growth factor receptor: evidence for more than one receptor class. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85(10):3435-3439.) 的跨膜锚定域中,而使表达的蛋白质定向锚定于细胞表面。PAD4 通过 C 端与血小板来源的生长因子受体 (PDGFR) 的跨膜锚定域融合在 N 端分泌信号的引导下从而能够展示到 H1299 细胞膜表面。

[0078] 以 pDisplay 为模板,用引物对 (上游引物 ACGCGAATTCGCCACCATGGAGACAGACACACTC CTGCT, 下游引物 AACTAGTCTAGACTAACGTGGCTTCTTCTGCCAAAGCAT) 进行 PCR 扩增,扩增产物中包括载体上的 Ig k 链前导序列 (分泌信号)、HA 标签、多克隆位点区、c-myc 标签及 PDGFR 跨膜区。将 PCR 扩增产物插入 pUHD10-3 载体中四环素调控的启动子下游的 EcoR I 和 Xba I 之间,得到构建正确的重组质粒,记作 pUHD10-3-display 载体。该 pUHD10-3-display 载体中通过四环素来调节外源蛋白 (PAD4) 在细胞表面的表达。

[0079] 用 overlap PCR 的方法合成人源化的 PAD4 DNA 序列,具体如下:

[0080] 组装 PAD4 的引物序列

[0081] 1 TCAGagatctCGGTTCCACTATGATCGGAACAACATCGCAGTCG 34

[0082] 2 TGAGCTTCCTTCACGACGCTTTCGTCTGCGCCGACTGCGATGTTGTTCCG 50

[0083] 3 GCGTCGTGAAGGAAGCTCACCGGGAAGTGATCAACAGCAGCACTGAAGGA 50

[0084] 4 CGAATATCCTTATCGATGTTTCAGGAGGAGTCCTTCAGTGCTGCTGTTGAT 50

[0085] 5 CCTCCTGAACATCGATAAGGATATTCGGAAGATTCTGAGCGGCTACATCG 50

[0086] 6 TTTGAGTCCCTCAGTATCTTCGATCTCCACGATGTAGCCGCTCAGAATCT 50

[0087] 7 AGATCGAAGATACTGAGGGACTCAAAGAGGTCATCAACGATCGGTACGAT 50

[0088] 8 CCTGTTGCAGGCTGCTGATATTGAGCATATCGTACCGATCGTTGATGACC 50

[0089] 9 ATATCAGCAGCCTGCAACAGGACGGCAAAACTTTCATCGACTTCAAGAAA 50

[0090] 10 CAGAGGGAGCTTGTCGTTGTATTTCTTGAAGTCGATGAAAAGTTTGGCC 48

[0091] 11 TACAACGACAAGCTCCCTCTGTACATTAGCAATCCCAACTACAAGGTGAA 50

[0092] 12 GTTCTCCTTTGTGACGGCATAGACGTTACCTTGTAGTTGGGATTGCTAA 50

[0093] 13 TCTATGCCGTCACAAAGGAGAACACCATCATTAACCCAAGCGAGAACGGG 50

[0094] 14 GAGGATCCGTTTGTATCCATTTGTGGAAGTGTCCCCGTTCTCGCTTGGGT 50

[0095] 15 ACAAATGGGATCAAACGGATCCTCATTTTTCCAAAAAGGGGTACGAGAT 50

[0096] 16 GTACgtcgacCCCAATCTCGTACCCCTTTTTGGAAAAGA 29

[0097] 1. 将各条引物重悬为 100M。

[0098] 2. 制备 10X 的引物混合物:将每条引物各取 11 混合在一起,然后加 Milli-Q 水至终体积 200 μ l。

[0099] 3. 制备 50 μ l 的 PCR 反应体系

[0100] a. 8 μ l 10X 的引物混合物 +5 μ l 10X PCR 缓冲液

[0101] b. 1 μ l dNTP 底物 (2.5mM each)

[0102] c. 1 μ l pyrobest 扩增酶 (Takara)

[0103] d. 35 μ l Milli-Q 水

[0104] 4. PCR 反应条件

- [0105] a. 95°C 2min
- [0106] b. 95°C 20sec
- [0107] c. 52°C 1min
- [0108] d. 72°C 2min
- [0109] e. 重复步骤 b-d 29 次
- [0110] f. 72°C 10min
- [0111] 5. 取 1 μl PCR 产物 (不需要纯化) 作为模板用于第二次 PCR
- [0112] a. 1 μl of PCR 产物
- [0113] b. 5 μl 10X PCR 缓冲液
- [0114] c. 1 μl dNTP 底物 (2.5mM each)
- [0115] d. 0.5 μl 1 号引物 (100 μM)
- [0116] e. 0.5 μl 16 号引物 (100 μM)
- [0117] f. 1 μl pyrobest 扩增酶 (Takara)
- [0118] g. 41 μl Milli-Q 水
- [0119] h. 重复步骤 6 的 PCR 反应
- [0120] 用 Bgl II-Sal I 酶切将扩增产物并亚克隆到 pUHD10-3-display 载体中, 重组质粒进行测序验证, 结果在 pUHD10-3-display 的 Bgl II 和 Sal I 酶切位点间插入了 SEQ ID NO :5 所示 DNA, 表明构建的重组质粒正确, 记作 pUHD10-3-display-PAD4。
- [0121] 完全培养基: 含 10% 小牛血清 (Hyclone) 和 100U/ml 双抗 (青链霉素, Sigma) 的 DMEM 培养基 (Invitrogen), 用于培养 H1299 细胞。
- [0122] 在转染 24 小时前接种 H1299 细胞使其在转染时达到 60% -80% 满度, 去除完全培养基, 用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将 pTet-on (编码 rtTA 转录因子, 可于四环素响应启动子配对对基因进行 Tet on 调控) (Clontech) 和目的质粒 pUHD10-3-display-PAD4 在无血清培养基中混合并加入细胞培养盘中, 孵育 4-6 小时后, 换成完全培养基继续培养, 转染 24 小时后, 将细胞按 1 : 5 的比例接种于新的培养皿中, 并加入 450 μg/ml G418 (Amersco) 筛选抗性细胞。筛选两周后, 将 G418 抗性细胞按 5×10^5 细胞 /10cm 平皿的密度接种, 并加入 2 μg/ml doxycycline (Dox, 一种四环素的衍生物, 具有更强的诱导效果和稳定性) (Sigma) 诱导 PAD4 表达。诱导 48 小时后, 收集细胞。
- [0123] 细胞鉴定: 用 1 : 400 稀释的抗 c-myc 标签的单抗 (9E10, Calbiochem) 4 度标记细胞表面的 PAD4-c-myc 蛋白。孵育 30min 后, 再用 1 : 300 稀释的兔抗鼠的 FITC 标记的二抗 (Jackson ImmunoResearch) 4 度孵育 30min。被标记的细胞重悬于 DMEM 培养基 (Invitrogen, CA) 中。样品在 BD FACS Aria II (Becton Dickinson) 上进行无菌分选, 将约 5% 具有最强 FITC 荧光的细胞分选出来。经过三轮分选, 获得了 63% 的细胞表面展示 PAD4 的细胞, 记作 H1299-tet on PAD4 细胞。
- [0124] Dox 诱导前后的 H1299-tet on-PAD4 细胞如图 1 所示。图 1 中, (A) 荧光显微镜观察 PAD4 在 H1299 细胞表面的表达。抗 c-myc 标签抗体标记 H1299-tet on-PAD4 细胞在有无 Dox 时表面 PAD4 的表达水平。(B) 流式细胞仪检测 H1299-tet on-PAD4 细胞在有无 Dox 时表面 PAD4 的表达水平。表明, 在细胞维持的过程中, 由于没有 Dox, 细胞不会表达 PAD4 抗原, 有利于细胞的扩增。只有当在培养基中加入 Dox 时, H1299 细胞才能在短时间内在细胞

表面表达 PAD4 抗原。

[0125] 二、将待筛选抗体展示于细菌原生质体表面

[0126] 细菌表达载体 pBAD30-KmR-GFPmut2、pAK200-26-10(anti-Digoxigenin scFv) 和 pAK200-M18 在文献 (Jung ST, Jeong KJ, Iverson BL, Georgiou G: Binding and enrichment of Escherichia coli spheroplasts expressing inner membrane tethered scFv antibodies on surface immobilized antigens. *Biotechnol Bioeng* 2007, 98(1): 39-47.) 中公开过。

[0127] pAK200-M18 中含有 PAD4 的抗体 (即 M18) 的编码基因, 该基因序列如 SEQ ID NO: 1 所示。M18 抗体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

[0128] pAK200-26-10 中含有阴性对照抗体 26-10 (抗地高辛标签 (DIG) 的抗体) 的编码基因, 该基因序列如 SEQ ID NO: 3 所示。对照抗体 26-10 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4 所示。

[0129] pBAD30-KmR 载体是一个 araBAD 启动子严格调控蛋白表达的载体。

[0130] 向细菌中导入 pBAD30-KmR-GFPmut2 的目的是使细菌原生质体发荧光, 便于筛选。

[0131] pAK200 载体是一种噬菌体展示的载体, 它将外源蛋白的 C 端与 M13 噬菌体的 gp3 蛋白形成融合蛋白, 通过 gp3 锚定在细菌内膜外侧从而将外源蛋白展示在细菌周质空间。将细菌外壁去除后将能将目的蛋白展示在细菌表面。

[0132] E. coli Jude-1 在文献 (F' [Tn10(Tetr)proAB+lacIq Δ(lacZ)M15]mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG) (Jung ST, Jeong KJ, Iverson BL, Georgiou G: Binding and enrichment of Escherichia coli spheroplasts expressing inner membrane tethered scFv antibodies on surface immobilized antigens. *Biotechnol Bioeng* 2007, 98(1): 39-47.) 中公开过。

[0133] E coli Jude-1 电化学感受态细胞的制备:

[0134] A. 挑取单克隆接种于 5ml SOB 培养基中 37 度, 250rpm 培养 16 小时;

[0135] B. 将 5ml 过夜培养液接种于 500ml SOB 培养基中, 37 度, 250rpm 培养至 OD600 到 1.0;

[0136] C. 将培养液置于冰上 30 分钟, 然后 4, 500g 4 度离心 15 分钟收集细菌;

[0137] D. 弃上清, 用 500ml 冰上预冷的无菌超纯水重悬菌体

[0138] E. 4, 500g 4 度离心 15 分钟, 弃上清, 用 250ml 冰上预冷的无菌超纯水重悬菌体

[0139] F. 4, 500g 4 度离心 15 分钟, 弃上清, 用 50ml 冰上预冷的无菌超纯水重悬菌体

[0140] G. 4, 500g 4 度离心 15 分钟, 弃上清, 用 1.5ml 冰上预冷的 10% (v/v) 甘油的无菌超纯水溶液重悬菌体, 50 μl/管分装感受态细胞, 马上置于 -70 度超低温冰箱保存。

[0141] 电转化 E coli Jude-1 电化学感受态细胞:

[0142] A. 将 0.1cm 的电击杯置于冰上预冷, 同时从 -70 度超低温冰箱取出一管 E coli Jude-1 电化学感受态细胞, 置于冰上融化。

[0143] B. 将质粒溶液 (1-2 μl) 加入已溶化的 E coli Jude-1 电化学感受态细胞中, 迅速并温和混匀。

[0144] C. 马上将感受态-质粒混合物转移到 0.1cm 的电击杯中, 将电击杯置于 Gene

Pulser[®] II (Bio-Rad) 电穿孔仪上,以 1.8kv, 25 μ F, 200 Ω 的电击条件进行电击。电击常数可控制到 4-5 毫秒。

[0145] D. 迅速加入 1ml SOC 培养基 (常温) 重悬电击后的细菌,并转移到一个 15ml 离心管中,置于 37 度摇床,220rpm 培养 1 个小时。

[0146] E. 将复苏后的菌液以 300 μ l/10cm 平皿涂布于含有氯霉素和卡那霉素的 LB 固体选择培养基上筛选转化子。

[0147] 按照如上方法将 pBAD30-KmR-GFPmut2 和 pAK200-26-10 共同转入 E. coli Jude-1, 得到含有 pBAD30-KmR-GFPmut2 和 pAK200-26-10 的 E. coli Jude-1。

[0148] 按照如上方法将 pBAD30-KmR-GFPmut2 和 pAK200-M18 共同转入 E. coli Jude-1, 得到含有 pBAD30-KmR-GFPmut2 和 pAK200-M18 的 E. coli Jude-1。

[0149] 将含有 pBAD30-KmR-GFPmut2 和 pAK200-26-10 的 E. coli Jude-1 或含有 pBAD30-KmR-GFPmut2 和 pAK200-M18 的 E. coli Jude-1 在添加了 20mg/ml 葡萄糖, 40 μ g/ml 氯霉素 (Sigma) 和 50 μ g/ml 卡那霉素 (Sigma) 的 TB (Terrific Broth) 培养基中培养 37 度过夜。将过夜培养液按 1 : 100 的比例接种到新鲜的 TB 培养基中 (不含葡萄糖), 37 度培养至 OD₆₀₀ 等于 0.5。然后加入 1mM IPTG (Sigma) 和 2mg/ml L-arabinose (Sigma) 至于 16 度诱导抗体和绿色荧光蛋白的表达。

[0150] 制备细菌原生质体: 诱导 18 小时后, 离心收集菌体 (菌体浓度为 1ml 菌体的 OD₆₀₀ 值为 4.5), 用 1ml 10mM Tris-HCl (pH 8.0) 洗两次, 再重悬于 1ml STE 溶液中 (0.5M Sucrose, 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 8.0), 置于 37 度孵育 30min。12,000g 离心收集细菌, 然后用溶液 A (0.5M Sucrose, 20mM MgCl₂, 10mM MOPS, pH 6.8) 洗一次, 再重悬于 1ml 含有 1mg/ml 溶菌酶的溶液 A 中, 37 度孵育 15min。最后 12,000g 离心收集细菌原生质体, 并重悬于含有 1% BSA 和 1% 脱脂奶粉、pH6.5 的 optimal-MEM 培养基中, 至细菌原生质体的浓度为 1ml 悬液的 OD₆₀₀ 值为 10, 获得细菌原生质体悬液。

[0151] 三、抗体筛选方法的摸索

[0152] Doxycycline 购自 Sigma, 产品目录号为 D9891。optimal-MEM 培养基购自 Invitrogen, 产品目录号为 31985。

[0153] (一) 验证平板淘选法 (panning) 能否用于抗体筛选

[0154] 实验组方法 (A): 将 H1299-tet on-PAD4 细胞按 5×10^5 细胞 / 10cm 平皿接种, 并加入 2 μ g/ml doxycycline 诱导 PAD4 表达。诱导 60 小时后, 平皿用 PBS 洗一遍, 然后加入含有 1% BSA 和 1% 脱脂奶粉的 optimal-MEM pH6.5 培养基常温封闭 20min。将 10ml 细菌原生质体悬液 (10ml 细菌原生质体悬液的 OD₆₀₀ 值为 80) 加入到每个平皿中, 放置于 37 度、pH 值 6.5、水平摇床中以 50 转 / 分钟孵育 1 小时。孵育结束, 用 PBS 洗三次, 去除未结合的细菌原生质体。实验中单独加展示 M18 的细菌原生质体或展示 26-10 的细菌原生质体。

[0155] 由于细菌原生质体带有 GFP 荧光, 直接在荧光显微镜下观察细菌原生质体与细胞的结合。结果如图 2 所示。图 2A 为展示 M18 的细菌原生质体与 H1299-tet on-PAD4 孵育; 图 2B 为展示 26-10 细菌原生质体与 H1299-tet on-PAD4 孵育; 图 2C 为展示 M18 细菌原生质体与 H1299 细胞孵育; 图 2D 为展示 26-10 细菌原生质体与 H1299 细胞孵育。图 2A 显示为特异结合实验, 而图 2B、C 和 D 为对照实验。实验设 3 次重复, 结果一致。结果表明, 只有展示了抗 PAD4 的单链抗体的细菌原生质体能结合到 H1299-tet on-PAD4 细胞的表面, 而展

示抗 DIG 标签的细菌原生质体不能与 H1299-tet on-PAD4 细胞结合。两种细菌原生质体细胞均不能和普通的 H1299 细胞结合。证实 M18- 细菌原生质体能结合到贴壁的 H1299-PAD4 细胞表面。且对照抗体的非特异结合水平非常低。证明平板淘选法可以用于筛选抗体。

[0156] (二) 验证流式分选能否用于抗体筛选

[0157] 收集诱导过的 H1299-tet on-PAD4 细胞,重悬于含有 10mM EDTA 和 1% BSA optimal-MEM pH6.5 培养基中。将 10^6 H1299-tet on-PAD4 细胞与 1ml OD_{600} 值为 2 的展示 M18 的细菌原生质体或展示 26-10 的细菌原生质体悬液 (1ml 悬液的 OD_{600} 值为 2) 混合,置于静音混和器上于 37 度、pH6.5 的条件下孵育 1 小时。孵育完后,300g 离心 2 分钟以除去未结合的细菌原生质体。样品重悬于 DMEM 培养基中,用流式细胞仪 BD FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson) 进行分析。图 3A 为细菌原生质体和 H1299 细胞通过抗体 M18 和抗原 PAD4 结合在一起的示意图。H1299-tet on-PAD4 细胞明显比细菌原生质体大,在流式细胞仪上表现出更强的前向散射光和侧向散射光信号,通过散射光信号可以将细胞和残留的细菌原生质体区分开来 (图 3B)。图 3B 中 R1 区域为 H1299-tet on-PAD4 细胞及目的复合物。将该 R1 区域内的细胞和细胞-细菌原生质体可以图示为图 3C。H1299-tet on-PAD4 细胞结合展示 M18 细菌原生质体,而不结合用于阴性对照的展示 26-10 细菌原生质体。两种细菌原生质体均表达绿色荧光蛋白 GFPmut2,因此被 488nm 激光激发后发绿色荧光。由图 3C 可见,因展示 M18 细菌原生质体能特异结合 H1299-tet on-PAD4 细胞可检测到明显的 530/30nm 波长的荧光信号;而展示 26-10 细菌原生质体几乎不结合 H1299-tet on-PAD4 细胞,只能检测到非常低水平的背景荧光。样品可用流式分选仪 FACS Aria II (Becton Dickinson, 也可用别的流式分选仪) 根据荧光信号分选 H1299-tet on-PAD4 细胞与展示 M18 抗体的细菌原生质体的复合物。图 3C 中 S 区域为分选区。结果筛选到 H1299-tet on-PAD4 细胞与展示 M18 抗体的细菌原生质体的复合物,表明流式分选法也可用于抗体筛选。

[0158] (三) 孵育条件的优化

[0159] 将诱导过的 H1299-tet on-PAD4 细胞收集并重悬于含有 10mM EDTA 和 1% BSA、pH 不同的 optimal-MEM 培养基中。将 10^6 细胞与 1ml 展示 M18 细菌原生质体悬液 (1ml 悬液的 OD_{600} 值为 2) 混合,置于静音混和器上于 37 度、pH 不同的条件下孵育 1 小时。pH 值分别为 5.0, 5.3, 5.5, 5.8, 6.0, 6.3, 6.5, 6.8, 7.0, 7.3 或 7.5。

[0160] 孵育完成的样品在流式分选仪 FACS Aria II (Becton Dickinson) 上检测细菌原生质体结合信号。

[0161] 同时以展示 26-10 抗体的细菌原生质体作为对照。

[0162] 实验设 3 次重复,结果取平均数。图 4 为展示抗 PAD4 抗体 M18 细菌原生质体或阴性对照展示 26-10 抗体细菌原生质体在不同的 pH 值条件下与悬浮的 H1299-tet on-PAD4 细胞结合数目。在 pH 为 5.5 到 7.0 之间,展示 M18 的细菌原生质体与 H1299-tet on-PAD4 细胞的结合数 (在流式中以 GFP 荧光强度表示) 明显高于此 pH 值范围之外展示 M18 的细菌原生质体与 H1299-tet on-PAD4 细胞的结合数。而在 pH 为 5.5 到 7.0 之间和之外,展示阴性对照抗体 26-10 的细菌原生质体与 H1299-tet on-PAD4 细胞的结合数都处于低水平状态。例如展示特异抗体 M18 的细菌原生质体与 H1299-tet on-PAD4 细胞孵育后,当 pH 值为 5.0 时,结合信号 (荧光强度) 为 662;当 pH 值为 5.5 时,结合信号为 1136;当 pH 值为 6.0

时,结合信号为 2857;当 pH 值为 6.5 时,结合信号为 2711;当 pH 值为 7.0 时,结合信号为 839;当 pH 值为 7.5 时,结合信号为 439。以上实验说明 pH 在 5.5 到 7.0 之间有利于对展示特异抗体 M18 的细菌原生质体的富集。

[0163] 当 pH 值处于生理条件 pH7.5 时,特异结合信号非常低。而 pH 值降到弱酸性时,结合信号有明显提高。这很可能是因为在生理条件下哺乳动物细胞和细菌表面都带有负电荷,降低 pH 可以中和部分负电荷,降低两者之间的静电排斥,从而有利于抗原-抗体的结合。但 pH 值过低,结合信号也会开始下降。这可能是由于 PAD4 蛋白解折叠造成抗原表位变化的原因。综合考虑结合信号及蛋白结构稳定性的双重因素,选定在 pH6.5 作为最优条件。

[0164] 四、抗体筛选

[0165] (一) 平板淘选法 (panning)

[0166] 将展示 26-10 抗体的细菌原生质体的悬浮液与展示 M18 的细菌原生质体的悬浮液混合,得到混合悬浮液,使混合悬浮液中展示 M18 的细菌原生质体与展示 26-10 抗体的细菌原生质体的数目比为 1 : 1000 或 5 : 100,然后将混合悬浮液分别用平板淘选法进行筛选抗体。

[0167] 将 H1299-tet on-PAD4 细胞按 5×10^5 细胞 / 10cm 平皿接种,在完全培养基中加入 $2 \mu\text{g/ml}$ doxycycline,诱导 PAD4 表达。诱导 60 小时后,平皿用 PBS 洗一遍,然后加入含有 1% BSA 和 1% 脱脂奶粉的 optimal-MEM pH6.5 培养基常温封闭 20min。将 10ml 混合悬浮液 (10ml 混合悬浮液的 OD_{600} 值为 80) 加入到每个平皿中,放置于 37 度、pH 值 6.5、水平摇床中以 50 转 / 分钟孵育 1 小时。孵育结束,用 PBS 洗三次,去除未结合的细菌原生质体,保留剩余产物。

[0168] 获得抗体序列:将剩余产物用胰酶酶解,从中回收表达抗体的质粒,将回收的表达抗体的质粒电转于 E. coli Jude-1 电化学感受态细胞,将转化的细菌涂布于含有氯霉素的 LB 固体选择培养基上筛选转化子。从阳性转化子中提取质粒,进行测序,得到目的抗体的编码基因序列,序列如 SEQ ID NO :1 所示,基因序列正确,说明本发明方法能够筛选得到正确的抗体。再通过基因工程表达和纯化得到目的抗体。

[0169] 统计富集效率:将剩余产物用胰酶酶解,从中回收表达抗体的质粒,将回收的表达抗体的质粒电转于 E. coli Jude-1 电化学感受态细胞,将转化的细菌涂布于含有氯霉素的 LB 固体选择培养基上筛选转化子。随机挑取 48 个转化子,采用菌落 PCR 鉴定富集后的 M18 纯度,再统计富集效率。富集效率的计算公式:富集后的 M18 纯度 / 富集前的 M18 纯度。

[0170] 鉴定引物序列 (M18 特异引物) 如下:

[0171] 5' -ATATGCTAGCGATATTCAGATGACACAGACT-3' ;

[0172] 5' -GCGTTTGCCATCTTTTCATAATCAAATCACC-3' 。

[0173] 实验设 3 次重复,结果取平均数。

[0174] 结果如图 5 所示。当用于实验的混合悬浮液中展示 M18 细菌原生质体的纯度为 0.1% 时,富集后的 M18 纯度为 6.4%,淘选表现出好的富集效率,为 64 倍。当用于实验的混合悬浮液中展示 M18 细菌原生质体的纯度为 5% 时,富集后的 M18 纯度为 25%,淘选的富集效率为 5 倍。

[0175] 当孵育温度为 37 度、孵育时间为 0.5h 时,结果与图 5 所示结果无显著差异。

[0176] 当孵育温度为 37 度、孵育时间为 2h 时,结果与图 5 所示结果无显著差异。

[0177] 当孵育温度为 30 度、孵育时间为 0.5h 时,结果与图 5 所示结果无显著差异。

[0178] 当孵育温度为 30 度、孵育时间为 2h 时,结果与图 5 所示结果无显著差异。

[0179] (二) 流式分选法

[0180] 将展示 26-10 抗体的细菌原生质体的悬浮液与展示 M18 的细菌原生质体的悬浮液混合,得到混合悬浮液,使混合悬浮液中展示 M18 的细菌原生质体与展示 26-10 抗体的细菌原生质体的数目比为 1 : 1000 或 5 : 100,然后将混合悬浮液分别用流式分选法进行筛选抗体。

[0181] 将 H1299-tet on-PAD4 细胞按 5×10^5 细胞 /10cm 平皿接种,在完全培养基中加入 $2 \mu\text{g/ml}$ doxycycline,诱导 PAD4 表达。诱导 60 小时后,平皿用 PBS 洗一遍,酶解收集诱导过的 H1299-tet on-PAD4 细胞,并重悬于含有 10mM EDTA 和 1% BSA、pH6.5 的 optimal-MEM 培养基中。将 10^6 cells 与 1ml 混合悬浮液 (1ml 混合悬浮液的 OD_{600} 值为 2) 混合于 1.5ml 离心管中,置于静音混和器上于 37 度、pH6.5 的条件下孵育 1 小时。

[0182] 去除孵育体系中未结合的细菌原生质体:将孵育产物(将容器内的所有物质记作孵育产物)置于离心管中,300g 离心 2 分钟,吸去上层液体,再以相同方式离心 2 次。

[0183] 分离复合物:去除孵育体系中未结合的细菌原生质体后,用流式细胞仪进行分选。用 FACSaria II (Becton Dickinson) 通过绿色荧光蛋白进行分选,收集发绿色荧光的 H1299-tet on-PAD4 细胞与细菌原生质体的复合物。

[0184] 获得抗体序列:将分选出的复合物用 EasyPure Plasmid MiniPre Kit (Transgen) 按照试剂盒的操作步骤提取表达抗体的质粒,将提取的质粒电转于 E. coli Jude-1 电感受态细胞,将转化的细菌涂布于含有氯霉素的 LB 固体选择培养基上筛选转化子。从阳性转化子中提取质粒,进行测序,结果得到 SEQ ID NO :1 所示的目的抗体的编码基因序列,说明本发明方法能够筛选得到正确的抗体。再通过基因工程表达和纯化得到目的抗体。

[0185] 统计富集效率:将分选出的复合物用 EasyPure Plasmid MiniPre Kit (Transgen) 按照试剂盒的操作步骤提取表达抗体的质粒,将提取的质粒电转于 E. coli Jude-1 电感受态细胞,将转化的细菌涂布于含有氯霉素的 LB 固体选择培养基上筛选转化子。随机挑取 48 个转化子,采用菌落 PCR 鉴定富集后的 M18 纯度,再统计富集效率。富集效率的计算公式:富集后的 M18 纯度 / 富集前的 M18 纯度。

[0186] 鉴定引物序列 (M18 特异引物) 如下:

[0187] 5' -ATATGCTAGCGATATTCAGATGACACAGACT-3' ;

[0188] 5' -GCGTTTGCCATCTTTTCATAATCAAATCACC-3' 。

[0189] 实验设 3 次重复,结果取平均数。

[0190] 结果如图 5 所示。当用于实验的混合悬浮液中展示 M18 细菌原生质体的纯度为 0.1% 时,富集后的 M18 纯度为 2%,流式分选的富集效率为 20 倍。当用于实验的混合悬浮液中展示 M18 细菌原生质体的纯度为 5% 时,富集后的 M18 纯度为 65.6%,流式分选的富集效率为 13 倍。

[0191] 当孵育温度为 37 度、孵育时间为 0.5h 时,结果与图 5 所示结果无显著差异。

[0192] 当孵育温度为 37 度、孵育时间为 2h 时,结果与图 5 所示结果无显著差异。

[0193] 当孵育温度为 30 度、孵育时间为 0.5h 时,结果与图 5 所示结果无显著差异。

[0194] 当孵育温度为 30 度、孵育时间为 2h 时,结果与图 5 所示结果无显著差异。

[0195] 综合实验(一)和(二),结果表明,当用于实验的混合悬浮液中展示 M18 细菌原生质体数目占有原生质体数目的 0.1% 时,淘选表现出更好的富集效率,为 64 倍。当用于实验的混合悬浮液中展示 M18 细菌原生质体数目占有原生质体数目的 5% 时,流式分选拥有比淘选更优异的富集效率,流式分选的富集效率为 13 倍,淘选的富集效率为 5 倍。

[0196] 淘选比流式分选更容易操作,不需要进行复杂的流式分选,并且能够回收更多的编码抗体基因的质粒,不需要分选后 PCR 回首抗体基因,可以直接电转化细菌回收扩增质粒。当特异抗体比例达到一定值时,流式更容易通过亲和力的强弱将高亲和力的抗体迅速的筛选富集出来。

[0197] (三) 淘选法和流式分选法结合

[0198] 将展示 26-10 抗体的细菌原生质体的悬浮液与展示 M18 的细菌原生质体的悬浮液混合,得到混合悬浮液,使混合悬浮液中展示 M18 的细菌原生质体与展示 26-10 抗体的细菌原生质体的数目比为 1 : 1000 或 1 : 10^4 ,然后将混合悬浮液分别进行如下筛选。

[0199] (1) 一轮淘选和一轮流式分选

[0200] 步骤 1 :按照实验(一)中所述方法进行淘选筛选,从筛选产物中回收表达抗体的质粒,将回收的表达抗体的质粒电转于 E. coli Jude-1 电化学感受态细胞,将转化的细菌涂布于含有氯霉素的 LB 固体选择培养基上筛选转化子。统计富集效率。

[0201] 步骤 2 :将步骤 1 得到的阳性转化子制成细菌原生质体,再按照实验(二)中所述方法进行流式分选。将分选得到的复合物按照实验(二)中所述方法进行富集效率统计。

[0202] (2) 二轮淘选和一轮流式分选

[0203] 步骤 1 :按照实验(一)中所述方法进行淘选筛选,从筛选产物中回收表达抗体的质粒,将回收的表达抗体的质粒电转于 E. coli Jude-1 电化学感受态细胞,将转化的细菌涂布于含有氯霉素的 LB 固体选择培养基上筛选转化子。统计富集效率。

[0204] 步骤 2 :将步骤 1 得到的阳性转化子制成细菌原生质体,按照实验(一)中所述方法进行淘选筛选,从筛选产物中回收表达抗体的质粒,将回收的表达抗体的质粒电转于 E. coli Jude-1 电化学感受态细胞,将转化的细菌涂布于含有氯霉素的 LB 固体选择培养基上筛选转化子。统计富集效率。

[0205] 步骤 3 :将步骤 2 得到的阳性转化子制成细菌原生质体,再按照实验(二)中所述方法进行流式分选。将分选得到的复合物按照实验(二)中所述方法进行富集效率统计。

[0206] 实验设 3 次重复,结果如图 6 所示。

[0207] 结果表明,当样品中展示 M18 的细菌原生质体的纯度为 0.1% 时,通过一轮淘选筛选, M18 抗体的纯度为 5.1%,富集效率为 51 倍;然后通过一轮流式分选, M18 抗体的纯度能达到 65.6%;一轮淘选加上一轮流式分选,总共富集了 656 倍,达到了明显的富集效果。当样品中展示 M18 细菌原生质体的纯度为 0.01% 时,两轮淘选筛选后, M18 抗体的纯度为 6.25%,富集效率为 625 倍;富集产物接着再进行一轮流式分选,则富集产物中 M18 纯度为 72.9%,通过两轮淘选和一轮流式分选,总共获得了 > 7200 倍的富集效果。此结果充分的说明了本发明方法能够有效地筛选特异识别人细胞表面抗原的抗体。

[0208] 本发明采用了两步法的策略来富集细菌原生质体,它结合了淘选和流式分选的优点,同时又弥补了相互的缺点,可大大提高筛选效率。当特异抗体浓度 $\leq 1 : 1000$ 时,采用

淘选来富集以增加特异抗体的比例。然后利用流式的定量分选能力,将具有更高亲和力的抗体富集出来。

[0001]

序列表

<110>中国科学院生物物理研究所

<120>一种筛选抗体的方法

<160>6

<210>1

<211>741

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

```

gatattcaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc      60
gtcagttgca gggcaagtca ggacattagg aattatttaa actggtatca gcagaaacca      120
gacggaactg ttaaattcct gatctactac acatcaagat tacagccagg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattccctca ccattaacaa cctggagcag      240
gaagatattg gcacttactt ttgccaacag ggcaatacgc ctccgtggac gttcgggtgga      300
ggcaccaaac tggaataaaa acgtggtgga ggtggttctg atggtggtg ttctggcggc      360
ggcggctccg gtggtggtg atccgaggtc caactgcaac agtctggacc tgagctggtg      420
aagcctgggg ctcagtgaa gatttctctg aaagattctg gctacgcatt caatagctct      480
tgatgaact ggtgaagca gaggcctgga cagggtcttg agtggattgg acggatttat      540
cctggagatg gagattctaa ctacaatggg aaattcgagg gcaaggccat actgactgca      600
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctcagcagcc tgacctctgt ggactctgcg      660
gtctatttct gtgcaagatc ggggttgcta cgttatgcta tggactactg ggtcaagga      720
acctcagtca ccgtctctc g

```

<210>2

<211>247

<212>PRT

[0002]

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

```

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

```

<210>3

<211>867

<212>DNA

[0003]

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

```

ctggacgttc gtaccgacca caaagacctg tctgatcacc tggttctggt cgacctggct      60
cgtaacgacc tggctcgtat cgttactccc gggctctggt acgttgcgga tctggaattc      120
gatcccgaag ttcaactgca acagtctggt cctgaattgg ttaaacctgg cgcctctgtg      180
cgcattgtcct gcaaatectc tgggtacalt ttcaccgact tctacatgaa ttgggttcgc      240
cagtctcatg gtaagtctct agactacatc gggtacattt cccatactc tggggttacc      300
ggctacaacc agaagtttaa aggtaaggcg acccttactg tcgacaaatc ttcctcaact      360
gcttaccatg agctgcgttc tttgacctct gaggactccg cggataacta ttgcgcgggc      420
tcctctggta acaaatgggc catggattat tggggtcatg gtgctagcgt tactgtgagc      480
tctggtgggc gtggctcggg cggtggtggg tcgggtggcg gcggatctga cgtcgtaatg      540
accagactc cgctgtctct gccggtttct ctgggtgacc aggettctat ttcttgccgc      600
tcttcccagt ctctggtcca ttctaattgt aacacttacc tgaactggta cctgcaaag      660
gctggtcagt ctccgaaget tctgatctac aaagtcteta accgcttctc tgggtgcccg      720
gatcgtttct ctggttctgg ttctggtact gacttcaccc tgaagatctc tcgtgtcgag      780
gccgaagacc tgggtatcta cttctgctct cagactactc atgtaccgcc gacttttggc      840
ggtggcacca agctcgagat taaacgt

```

867

<210>4

<211>308

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>4

```

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Ser Leu Asp Arg Asp Leu Asp
1           5           10          15
Ser Arg Leu Asp Leu Asp Val Arg Thr Asp His Lys Asp Leu Ser Asp
                20           25           30

```

[0004]

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

[0005]

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 210 | 215 | 220 | |
| Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Ala | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser | | | |
| | 245 | 250 | 255 |
| Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr | | | |
| | 260 | 265 | 270 |
| Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys | | | |
| | 275 | 280 | 285 |
| Ser Gln Thr Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu | | | |
| | 290 | 295 | 300 |
| Glu Ile Lys Arg | | | |
| 305 | | | |

<210>5

<211>423

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>5

| | |
|--|-----|
| cggttccact atgatcgaa caacatcgca gtcggcgcag acgaaagcgt cgtgaaggaa | 60 |
| gctcaccggg aagtgatcaa cagcagcact gaaggactcc tctgaacat cgataaggat | 120 |
| attcgggaaga ttctgagcgg ctacatcgtg gagatogaag atactgaggg actcaaagag | 180 |
| gtcatcaacg atcggtagca tatgctcaat atcagcagcc tgcaacagga cggcaaaact | 240 |

[0006]

| | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| ttcatcgact | tcaagaaata | caacgacaag | ctcctctgt | acattagcaa | tcccaactac | 300 |
| aaggatgaacg | tctatgccgt | cacaaaggag | aacaccatca | ttaacccaag | cgagaacggg | 360 |
| gacacttcca | caaatgggat | caaacggatc | ctcatctttt | ccaaaaaggg | gtacgagatt | 420 |
| ggg | | | | | 423 | |

<210>6

<211>3451

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>6

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| ctcgagttha | ccactcccta | tcagtgatag | agaaaagtga | aagtcgagtt | taccactccc | 60 |
| tatcagtgat | agagaaaagt | gaaagtcgag | tttaccactc | cctatcagtg | atagagaaaa | 120 |
| gtgaaagtgc | agtttaccac | tccctatcag | tgatagagaa | aagtgaaagt | cgagtttacc | 180 |
| actccctatc | agtgatagag | aaaagtgaaa | gtcgagttha | ccactcccta | tcagtgatag | 240 |
| agaaaagtga | aagtcgagtt | taccactccc | tatcagtgat | agagaaaagt | gaaagtcgag | 300 |
| ctcggatccc | gggtcgagta | ggcgtgtaag | gtgggaggcc | tatataagca | gagctcgttt | 360 |
| agtgaaccgt | cagatcgect | ggagacgcca | tccacgctgt | tttgacctcc | atagaagaca | 420 |
| ccgggaccga | tccagccccc | gcccggccga | attcgccacc | atggagacag | acacactcct | 480 |
| gctatgggta | ctgctgctct | gggttccagg | ttccactggt | gactatccat | atgatgttcc | 540 |
| agattatgct | ggggcccagc | cggccagatc | tcccgggata | cgcgctgca | ggtcgacgaa | 600 |
| caaaaactca | tctcagaaga | ggatctgaat | gctgtgggcc | aggacacgca | ggaggtoatc | 660 |
| gtggtgccac | actccttgcc | ctttaagggtg | gtggtgatct | cagccatcct | ggccctgggtg | 720 |
| gtgctcacca | tcatctccct | tatcatctc | atcatgcttt | ggcagaagaa | gccacgttag | 780 |
| tctagaggat | ccagacatga | taagatacat | tgatgagttt | ggacaaacca | caactagaat | 840 |
| gcagtgaaaa | aaatgcttta | tttgtgaaat | ttgtgatgct | attgctttat | ttgtaacctat | 900 |
| tataagctgc | aataaacaag | ttaacaacaa | caattgcatt | cattttatgt | ttcagggttca | 960 |
| gggggagggtg | tgggagggtt | tttaaagcaa | gtaaaacctc | tacaaatgtg | gtatggctga | 1020 |
| ttatgatcct | gcaagcctcg | tcgtctggcc | ggaccacgct | atctgtgcaa | ggtccccgga | 1080 |
| cgcgcgctcc | atgagcagag | cgcccgcgc | cgaggcaaga | ctcggggcgc | gocctgccc | 1140 |
| tcccaccagc | tcaacaggcg | gtaaccggcc | tcttcacggt | gaatgcgcgc | gaccttcagc | 1200 |
| atgcgggca | tgtcccctgg | cggacgggaa | gtalcagctc | gaccaagctt | ggcgagattt | 1260 |
| tcaggagcta | aggaagctaa | aatggagaaa | aaaatcactg | gatataccac | cgttgatata | 1320 |
| tcccaatggc | atcgtaaaga | acattttgag | gcatttcagt | cagttgctca | atgtacctat | 1380 |
| aaccagaccg | ttcagctgca | ttaatgaatc | ggccaacgcg | cggggagagg | cggtttgcgt | 1440 |
| attgggcgct | cttccgcttc | ctcgctcact | gactcgctgc | gctcggctcg | tcggctgcgg | 1500 |
| cgagcggtat | cagctcactc | aaaggcggta | atacggttat | ccacagaatc | aggggataac | 1560 |
| gcaggaaaga | acatgtgagc | aaaaggccag | caaaaggcca | ggaaccgtaa | aaaggccgcg | 1620 |

[0007]

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| ttgctggcgt | ttttccatag | gctccgcccc | cctgacgagc | atcacaaaa | tgcacgctca | 1680 |
| agtcagaggt | ggcgaaacce | gacaggacta | taaagatacc | aggcgtttcc | ccctggaagc | 1740 |
| tccctcgtgc | gctctcctgt | tccgaccctg | ccgcttaccg | gatacctgtc | cgcttttctc | 1800 |
| ccttcgggaa | gcgtggcgct | ttctcaatgc | tcacgctgta | ggtatctcag | ttcgggtgtag | 1860 |
| gtcgttcgct | ccaagctggg | ctgtgtgcac | gaaccccccg | ttcagcccga | ccgctgcgcc | 1920 |
| ttatccggta | actatcgtct | tgagtccaac | ccggtaaagc | acgacttata | gccactggca | 1980 |
| gcagccactg | gtaacaggat | tagcagagcg | aggatatgtag | gcggtgctac | agagttcttg | 2040 |
| aagtgggtgc | ctaactacgg | ctacactaga | aggacagtat | ttggtatctg | cgctctgctg | 2100 |
| aagccagtta | ccttcggaaa | aagagttggg | agctcttgat | ccggcaaaaa | aaccaccgct | 2160 |
| ggtagcggtg | gtttttttgt | ttgcaagcag | cagattacgc | gcagaaaaaa | aggatctcaa | 2220 |
| gaagatcctt | tgatcttttc | tacggggtct | gacgctcagt | ggaacgaaaa | ctcacgtaa | 2280 |
| gggattttgg | tcatgagatt | atcaaaaagg | atcttcacct | agatcctttt | aaattaaaaa | 2340 |
| tgaagtttta | aatcaatcta | aagtatatat | gagtaaactt | ggtctgacag | ttaccaatgc | 2400 |
| ttaatcagtg | aggcacctat | ctcagcgatc | tgtctatttc | gttcatccat | agttgcctga | 2460 |
| ctccccgtcg | tgtagataac | tacgatacgg | gagggcttac | catctggccc | cagtgtgca | 2520 |
| atgataccgc | gagaccacag | ctcaccggct | ccagatttat | cagcaataaa | ccagccagcc | 2580 |
| ggaagggccg | agcgcagaag | tggtcctgca | actttatccg | cctccatcca | gtctattaat | 2640 |
| tgttgccggg | aagctagagt | aagtagttcg | ccagttaata | gtttgcgcaa | cgttgttgcc | 2700 |
| attgctacag | gcatcgtggg | gtcacgctcg | tcgtttggta | tggcttcatt | cagctccggt | 2760 |
| tcccaacgat | caaggcgagt | tacatgatcc | cccattgtgt | gcaaaaaagc | ggttagctcc | 2820 |
| ttcggctctc | cgatcgttgt | cagaagtaag | ttggccgcag | tgttatcact | catggttatg | 2880 |
| gcagcactgc | ataattctct | tactgtcatg | ccatccgtaa | gatgcttttc | tgtgactggt | 2940 |
| gagtactcaa | ccaagtcatt | ctgagaatag | tgtatgcggc | gaccgagttg | ctcttgcccc | 3000 |
| gcgtcaatac | gggataatac | cgcgccacat | agcagaactt | taaaagtgct | catcattgga | 3060 |
| aaacgttctt | cggggcgaaa | actctcaagg | atcttaccgc | tgttgagatc | cagttcgatg | 3120 |
| taaccactc | gtgcacccaa | ctgatcttca | gcactcttta | ctttcaccag | cgtttctggg | 3180 |
| tgagcaaaaa | caggaaggca | aaatgccgca | aaaaagggaa | taagggcgac | acggaaatgt | 3240 |
| tgaatactca | tactcttctt | ttttcaatat | tattgaagca | tttatcaggg | ttattgtctc | 3300 |
| atgagcggat | acatatttga | atgtatttag | aaaaataaac | aaataggggt | tccgcgcaca | 3360 |
| tttccccgaa | aagtgccacc | tgacgtctaa | gaaaccatta | ttatcatgac | attaacctat | 3420 |
| aaaaataggc | gtatcacgag | gccctttcgt | c | | | 3451 |

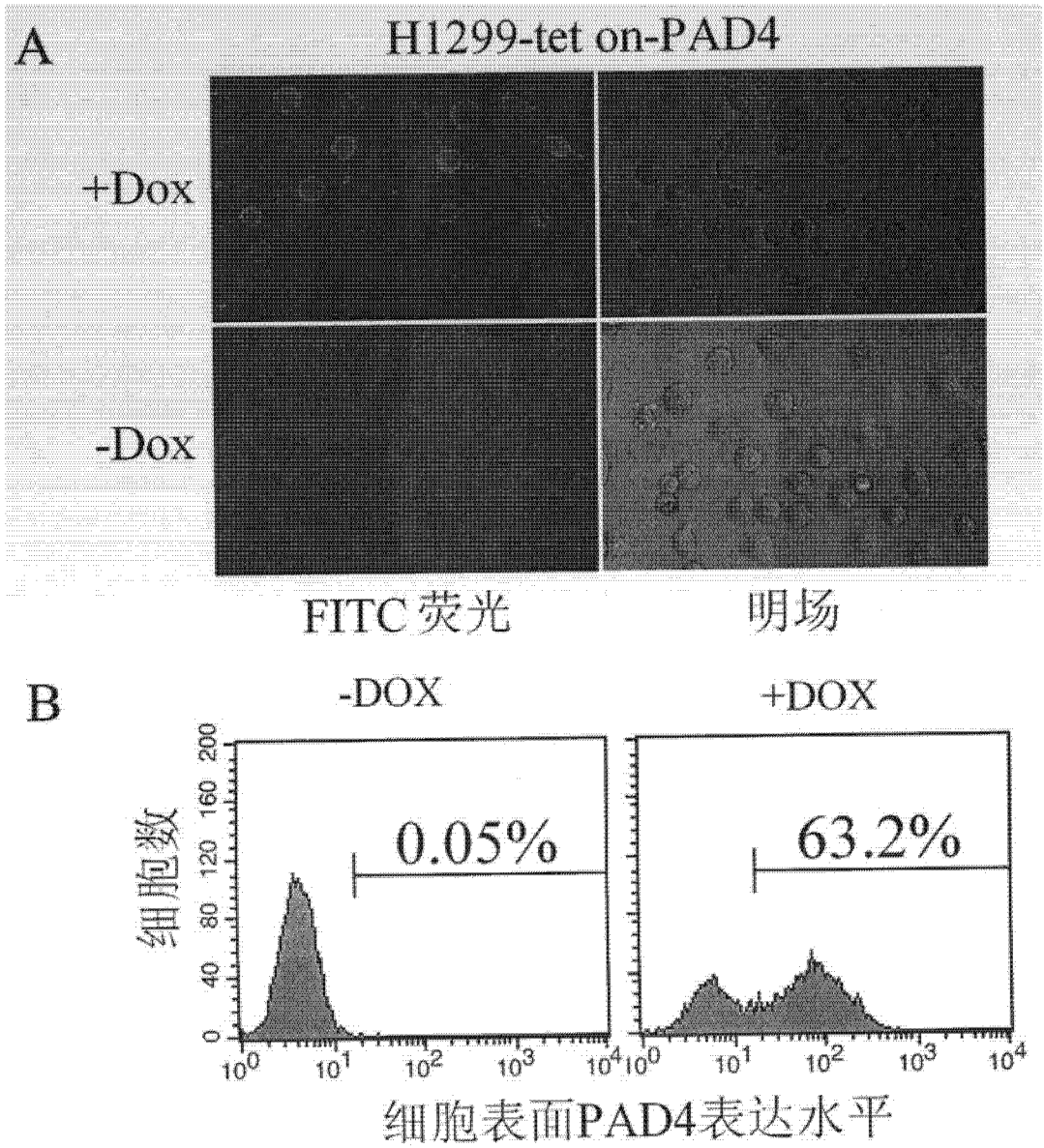


图 1

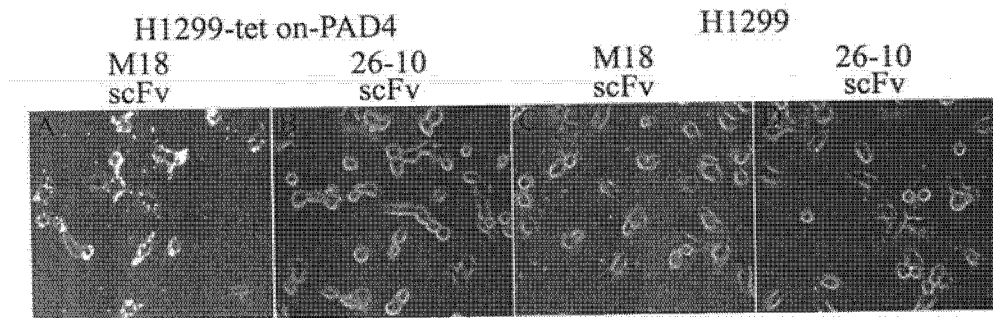


图 2

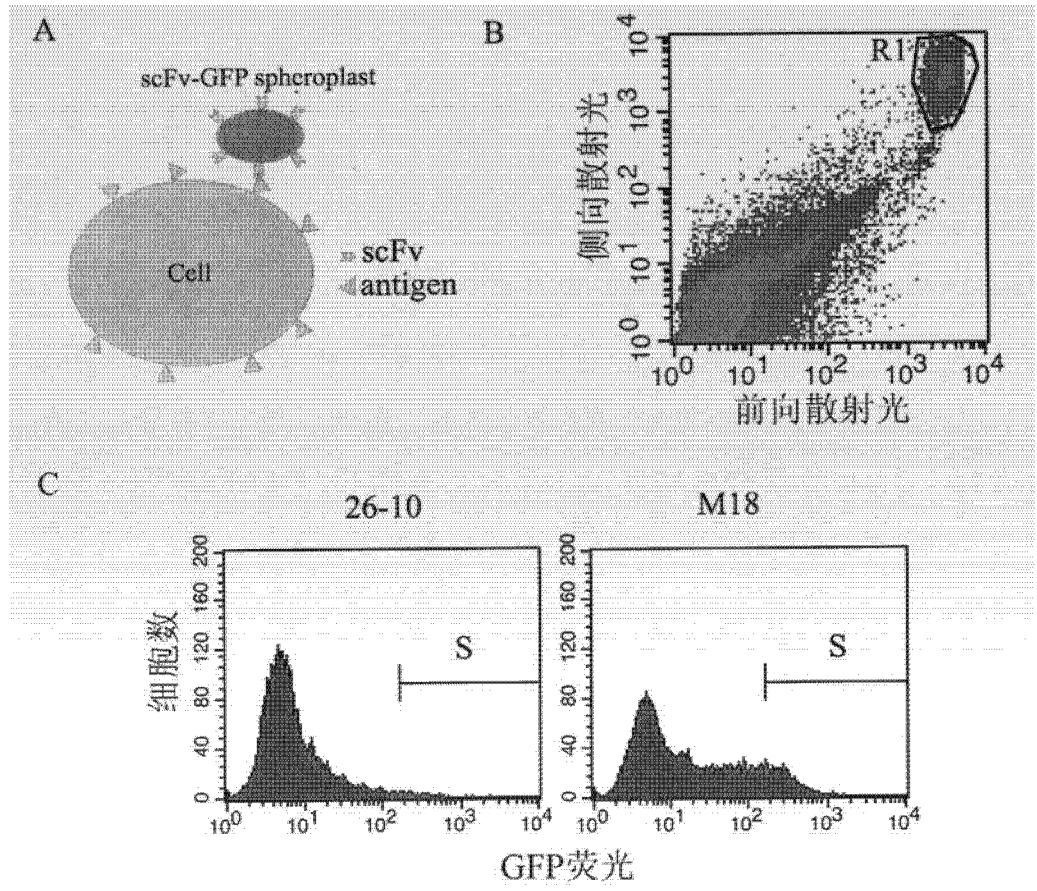


图 3

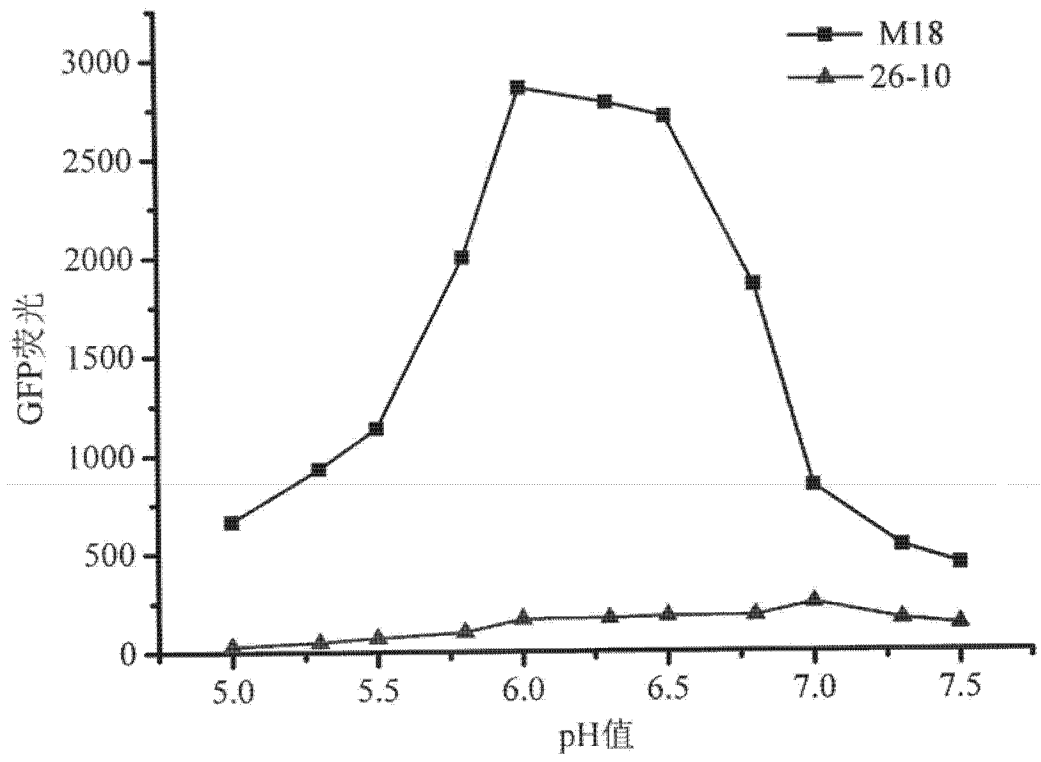


图 4

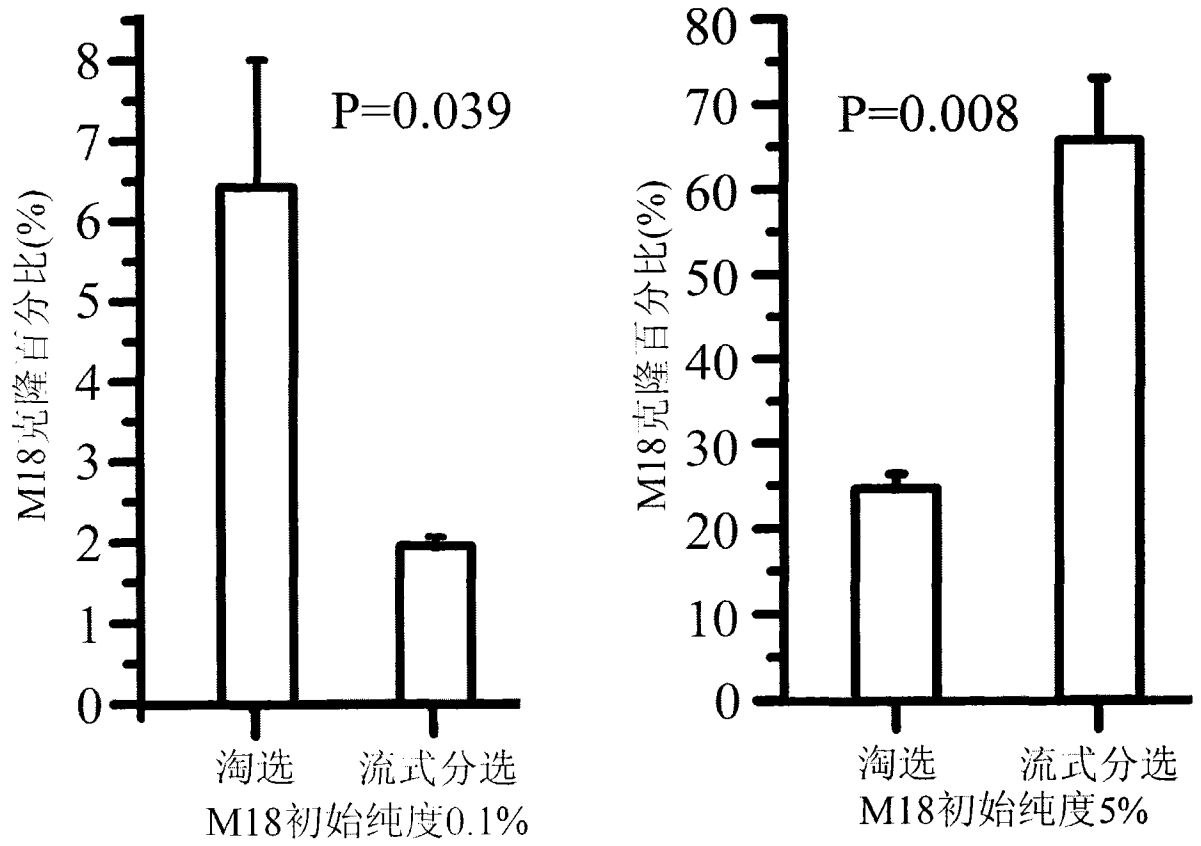


图 5

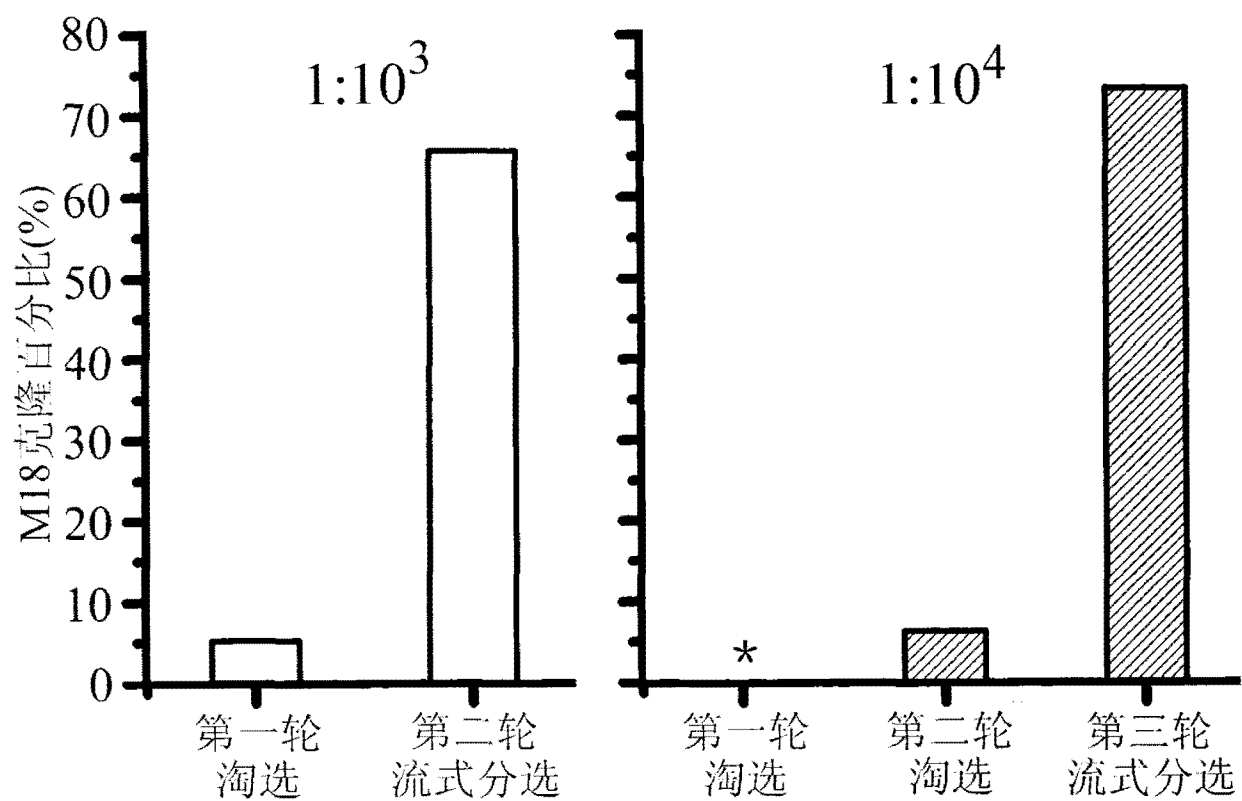


图 6