



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110241134 A

(43)申请公布日 2019. 09. 17

(21)申请号 201810190466.0

(22)申请日 2018.03.08

(71)申请人 中国科学院上海高等研究院

地址 201210 上海市浦东新区海科路99号

申请人 中国科学院大学

(72)发明人 姜标 吴鹏 任培玲

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所(普通合伙) 31219

代理人 李艳 许亦琳

(51)Int.Cl.

C12N 15/85(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

C12N 15/54(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页
序列表3页 附图3页

(54)发明名称

一种改造CHO-1ec2细胞提高抗体糖链中半乳糖含量的方法

(57)摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及一种改造CHO-1ec2细胞提高抗体糖链中半乳糖含量的方法。本发明对抗体生产常用细胞株CHO-1ec2进行了研究,意外发现在此细胞株的遗传背景下过表达GT,可以显著提高CHO-1ec2细胞所表达的抗体的糖链中半乳糖含量。

1. 一种表达抗体的方法,包括如下步骤:

(1) 构建重组质粒:将GT基因插入第一表达载体中,构建GT重组质粒,将抗体重链编码基因插入到第二表达载体中,构建抗体重链重组质粒,将抗体轻链编码基因插入到第三表达载体中,构建抗体轻链重组质粒;

(2) 将步骤(1)所获得的GT重组质粒、抗体重链重组质粒及抗体轻链重组质粒共转染至CHO-1ec2细胞中,进行抗体表达,在表达产物中分离获得抗体。

2. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,所述GT基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,步骤(1)中,还包括以下特征中的任一项或多项:(1) 所述第一表达载体选自pcDNA3.1 (+) (Ampicillin)、pVAX、pCMV、pGL、pMZ;(2) 所述第二表达载体选自pLONZA、pcDNA、pVAX、pCMV、pGL、pMZ;(3) 所述第三表达载体选自pLONZA、pcDNA、pVAX、pCMV、pGL、pMZ。

4. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,步骤(1)中,还包括以下特征中的任一项或多项:(1) 所述GT基因插入到第一表达载体中的限制性酶切位点之间;(2) 所述抗体重链编码基因插入到第二表达载体中的限制性酶切位点之间;(3) 所述抗体轻链编码基因插入到第三表达载体中的限制性酶切位点之间。

5. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,步骤(1)中,还包括以下特征中的任一项或多项:(1) 所述GT基因插入到第一表达载体中的HindIII酶和XhoI酶的限制性酶切位点之间;(2) 所述抗体重链编码基因插入到第二表达载体中的BamH I和EcoRI的限制性酶切位点之间;(3) 所述抗体轻链编码基因插入到第三表达载体中的限制性酶切位点之间。

6. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,步骤(1)中,具体为:GT基因通过酶切、连接的方法插入到第一表达载体,第一连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的GT重组质粒;抗体重链编码基因通过酶切、连接的方法插入到第二表达载体,第二连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的抗体重链重组质粒;抗体轻链编码基因通过酶切、连接的方法插入到第三表达载体,第三连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的抗体轻链重组质粒。

7. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,步骤(2)中,GT重组质粒、抗体重链重组质粒及抗体轻链重组质粒之间的质量比例范围是(2-5):(50):(50)。

8. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,步骤(2)中,所述GT重组质粒、抗体重链重组质粒及抗体轻链重组质粒共转染至贴壁状态的CHO-1ec2细胞中。

9. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,步骤(2)中,共转染时,所使用的转染工具为Freestyle MAX转染试剂。

10. 根据权利要求1所述的抗体表达方法,其特征在于,所述抗体是IgG抗体。

11. 如权利要求1~10任一项所述抗体表达方法在提高抗体的半乳糖含量中的用途。

12. 根据权利要求11所述的用途,其特征在于,所述抗体表达方法用于提高抗体糖链中半乳糖含量。

13. 根据权利要求11所述的用途,其特征在于,抗体表达方法用于提高抗体糖链中G1F型半乳糖含量和/或G2F型半乳糖含量。

14. 一种提高抗体的糖链中半乳糖含量的方法,步骤中包括如权利要求1~10任一项所

述抗体表达方法中的步骤(1)和(2)。

一种改造CHO-1ec2细胞提高抗体糖链中半乳糖含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种改造CHO-1ec2细胞提高抗体糖链中半乳糖含量的方法。

背景技术

[0002] 抗体在疾病治疗方面发挥着重要的作用,ADC(抗体药物偶联)类抗体药由于其偶联抗体和小分子细胞毒性药物以高效的靶向杀伤性逐渐进入研究的焦点。通过抗体糖基化偶联实现的ADC逐渐得到人们的广泛关注。人类免疫球蛋白根据重链性质的不同分为IgG、IgM、IgA、IgE、IgD 5种,临床上最为常用的为IgG。IgG重链Fc段的CH2区域内有一个保守的N-糖基化位点Asn297。该位点的糖基化结构为核心岩藻糖基化的复杂双天线模型,在不同的糖基转移酶的作用下,糖链上分别添加岩藻糖、半乳糖、甘露糖、唾液酸等,使抗体呈现出高度的异质性。抗体糖基化的不均一性,是通过糖基偶联实现ADC的一大技术难题。

发明内容

[0003] 为了克服现有技术中所存在的问题,本发明的目的在于提供一种改造CHO-1ec2细胞提高抗体糖链中半乳糖含量的方法。

[0004] 为了实现上述目的以及其他相关目的,本发明采用如下技术方案:

[0005] 本发明的第一方面,提供一种表达抗体的方法,包括如下步骤:

[0006] (1) 构建重组质粒:将GT基因插入第一表达载体中,构建GT重组质粒,将抗体重链编码基因插入到第二表达载体中,构建抗体重链重组质粒,将抗体轻链编码基因插入到第三表达载体中,构建抗体轻链重组质粒;

[0007] (2) 将步骤(1)所获得的GT重组质粒、抗体重链重组质粒及抗体轻链重组质粒共转染至CHO-1ec2细胞中,进行抗体表达,在表达产物中分离获得抗体。

[0008] 进一步地,步骤(1)中,所述GT基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0009] 进一步地,步骤(1)中,所述第一表达载体选自pcDNA3.1(+)(Ampicillin)、pVAX、pCMV、pGL、pMZ等。

[0010] 进一步地,步骤(1)中,所述GT基因插入到第一表达载体中的限制性酶切位点之间。例如,所述GT基因插入到第一表达载体中的HindIII酶和XhoI酶的限制性酶切位点之间。

[0011] 进一步地,步骤(1)中,所述第二表达载体选自pLONZA、pcDNA、pVAX、pCMV、pGL、pMZ等。

[0012] 进一步地,步骤(1)中,所述抗体重链编码基因插入到第二表达载体中的限制性酶切位点之间。例如,所述抗体重链编码基因插入到第二表达载体中的BamH I和EcoRI的限制性酶切位点之间。

[0013] 进一步地,步骤(1)中,所述第三表达载体选自pLONZA、pcDNA、pVAX、pCMV、pGL、pMZ等。

[0014] 进一步地,步骤(1)中,所述抗体轻链编码基因插入到第三表达载体中的限制性酶切位点之间。例如,所述抗体轻链编码基因插入到第三表达载体中的BamH I和EcoRI的限制性酶切位点之间。

[0015] 进一步地,步骤(1)中,具体为:GT基因通过酶切、连接的方法插入到第一表达载体,第一连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的GT重组质粒。抗体重链编码基因通过酶切、连接的方法插入到第二表达载体,第二连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的抗体重链重组质粒。抗体轻链编码基因通过酶切、连接的方法插入到第三表达载体,第三连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的抗体轻链重组质粒。

[0016] 进一步地,步骤(2)中,GT重组质粒、抗体重链重组质粒及抗体轻链重组质粒之间的质量比例范围是(2-5):(50):(50)。

[0017] 进一步地,步骤(2)中,所述GT重组质粒、抗体重链重组质粒及抗体轻链重组质粒共转染至贴壁状态的CHO-1ec2细胞中。

[0018] 进一步地,步骤(2)中,共转染时,所使用的转染工具为Freestyle MAX转染试剂。Freestyle MAX转染试剂可通过市购途径获得。例如可以是Thermo Fisher Scientific公司的产品FreeStyle MAX(货号16447100)的。

[0019] 进一步地,所述抗体可以是IgG抗体。例如但不限于Herceptin抗体。

[0020] 本发明的第二方面,提供前述抗体表达方法在提高抗体的半乳糖含量的用途。

[0021] 进一步地,前述抗体表达方法用于提高抗体糖链中半乳糖含量。

[0022] 进一步地,前述抗体表达方法用于提高抗体糖链中G1F型半乳糖含量和

[0023] /或G2F型半乳糖含量。

[0024] 进一步地,所述抗体可以是IgG抗体。例如但不限于Herceptin抗体。

[0025] 本发明的第三方面,提供一种提高抗体的糖链中半乳糖含量的方法,步骤中包括前述抗体表达方法中的步骤(1)和(2)。

[0026] 进一步地,所述抗体可以是IgG抗体。例如但不限于Herceptin抗体。

[0027] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0028] 本发明对抗体生产常用细胞株CHO-1ec2进行了研究,意外发现在此细胞株的遗传背景下过表达GT,可以显著提高CHO-1ec2细胞所表达的抗体的糖链中半乳糖含量。

附图说明

[0029] 图1:提高CHO-LEC2-细胞表达的抗体中的半乳糖含量流程图。

[0030] 图2:GT过表达质粒图谱。

[0031] 图3:表达条件测试结果。

[0032] 图4:SDS-PAGE分析抗体表达,抗体用200mM DTT,70℃加热10分钟进行还原处理。

[0033] 图5:Lectin-blotting分析GT过表达对Herceptin重链半乳糖表达的影响。

[0034] 图6:质谱分析过表达GT对抗体糖型的影响。

具体实施方式

[0035] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下

述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,或者按照各制造商所建议的条件。

[0036] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0037] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin(P.M.Wassarman and A.P.Wolffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119,Chromatin Protocols(P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0038] 实施例1

[0039] 本实施例通过Herceptin抗体(中文意思是赫赛汀抗体)的表达实验,验证了CHO-1ec2细胞中过表达GT基因(半乳糖基转移酶基因)可以提高抗体糖链中的半乳糖含量,实验流程如图1所示,具体步骤如下:

[0040] (1) 构建重组质粒:GT过表达质粒的构建,质粒图谱如图2所示。根据中国仓鼠卵巢细胞(CHO)种属优化并突变合成GT基因,添加5'(HindIII)和3'(XhoI)酶切位点,运用重组方式将GT基因通过5'HindIII和3'XhoI酶切连接,克隆至载体pcDNA3.1(+)(Ampicillin)中,连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的GT重组质粒。需要说明的是,所述GT基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,具体为:

[0041] >Human codon optimized GT gene(1197bp)

[0042]

```
Atgcgccctgcgtgaacctctgctgagtggttagtgagccatgcctggcgcaagtctgcagcgtgcatgccgcctgct
ggtggcagtggtgtgcactgcacctgggcgtgacctgggtgtattacctggccggccgcgatttaagccgtctgccgc
agctggtttggtgtgagcaccctgttacaggcggttagtaatagtgagccgcatggccagagcagcggtgagttta
cgtaccggcgccgcacgtccccctcccccttttaggtgcaagcagccagccgcgtcctggtggcgatagtagcccggt
ggttgatagtggtccgggtccggccagtaatttaaccagcgtgccggttcgcacacaaccgccctgagtcctgccgg
cctgtccggaggaaagtccgctgttagtggtccgatgctgatcgaattcaacatgccggtggatctggaactggtg
gcaaagcagaatccgaacgtgaagatgggcggtcggttatgcaccgcgcgactgcgtgagtcgcacaaaagtggccat
cattatcccgttttcgaaccgtcaggagcacctgaagtattggctgtactacctgcatccggtgctgcagcgccagc
```

agctggactacggcattttacgtgatcaaccaggcaggcgataccatctttaaccgcgccaactgctgaacgtgggt
ttccaggaagccctgaaggactatgactatacttgctttgttttagtgatgtggacctgattccgatgaacgacca
taacgcctaccgctgcttcagccaaccgcgtcacatcagcgttgccatggacaaattcggctttagcctgccgtacg
ttcagtacttttggcggcgtgagtgactgagcaagcagcagttcctgacctcaacggcttcctaacaactattgg
ggctgggggtggcgaggatgacgacatttttaaccgcctggttttccgcggcatgagcatcagccgcccgaacgcagt
ggtgggtcggttgctgcatgattcgccacagccgcgataagaaaaacgaaccgaaccgcagcgtttgaccgcatcg
cccacaccaaggaaacctatgctgagcgatggcctgaacagcctgacctaccaggtgctggacgttcaacgttaccg
ctgtataccagatcacgttgatattggtacccccgagctaa。

[0043] Herceptin重链(HC)编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,具体为:

[0044] >Herceptin HC(1407bp)

[0045]

atggagttctggttgatcagggtctttctggtagctattcttaaggagtagctgtgaggtgcagcttgctgaatc
cgggggagggtcgtccaaccggaggatcactgcgcctttcatgctgcagcctcgggtttcaatatcaaggacacgt
atatccattgggtgcggcaggcgccaggaaaaggtttggagtggtcgcgaggatctacccaccaatgggtacaca
cgatacgccgattcgggtcaagggcggttcacaatctcggcgacacgtcgaaaaacactgcgtacttgcatgaa
tagcctccgcgcagaagatactgcggtgtattactgctcccgctggggaggtgatggcttctatgcatggactatt
ggggacaaggaacacttgtaacgggtcagctcggccagcaccaagggcgctcgtgtttccctcgccccctcgctc
aagtcaactagcggcggaacagccgcccttggttgcttggtcaaggactacttccccgaaccggtcacggtgtcatg
gaactcgggagcattgacttcgggtgtgcatacatttcccgcagtgtccagtcacagactgtatagcctctcgt
ccgtcgtaacgggtcccgctcatcgctcgtcgggaccagacatacatttgcaatgtcaaccacaaaccttcgaataca
aaggtggataagaaggtcgagccgccaagtcgtgtgacaagacgcacacatgtcctccatgccctgcgcctgagtt
gctgggaggggcgagcgtgttctcttttccccaagccgaaggacacactgatgatttcgaggacgcctgaggtaa
cttgctgtggttagtagatgtgtcccatgaggacccccgaagtaaaagttaactgggtatgtggacggtgtggaggtccac
aatgccaaaaccaaaccgcgcgaagagcaataacaacgacacatatcggggtggtgagcgtgtcacctcttgacca
ggactggctgaacgggaaagagtacaaatgtaaagtatcaaacaagcgtccccgcacccattgaaaagactatct
caaaggctaaggagacagccagagagccacaagtctacacgctcccgccctcgagagatgagttgacgaagaatcag
gtcagccttacgtgcctcgtaaaagggttttaccatccgacattgcggtggaatgggaaagcaacggacagccaga
gaacaactacaagactacaccgcctgtgctggactcggtggttcgttcttctctactcgaaattgactgtggaca
aatcccgctggcagcagggaatgtgttctcgtgtagcgtaatgcatgaagcgttgcaaatcactatacccagaaa
tcgtctctccctttcgccctggc。

[0046] Herceptin轻链(LC)编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,具体为:

[0047] >Herceptin LC(708bp)

[0048]

Atggatatgcgagtaccgcacaacttcttgggcttttgcttctgtggttgaggggagctagatgtgacatccagat
gacgcagtcgccgtcctcattgagcgcacccgtgggagacagagtcactattacatgccgggcatcccaagacgtaa
acacggccgtgcctggtaccaacagaagcccgaaaagcgcccaaactgttgatctactccgcctcatttctgtac
agcgggggtaccctcgaggttcagcggctcgaggagcgggacggatttcacgttgacaatttcgtcacttcagccgga
agattttgcgacatactattgccagcaacactataccacacccccgacgtttggccaggggaccaaagtgcagatca
agcggaccgtggccgctccgtcagttatcttcccgcgtccgatgagcaactcaagagcggaaccgcatcagtc

gtatgcttgctcaataacttctatccgcgagaggcgaaggtgcagtggaaagtggacaacgcctgcagtcggtaa
tagccaggaatcagtcacggagcaggattcaaaggattcgacctattccctctcgtcgacattgacgctgtcgaaag
cagactacgaaaaacataaagtgtacgcttgtgaagtgcacaccagggcctttcatccccggtgacaaagtcgttc
aatcgcggggagtggt。

[0049] Herceptin重链(HC)编码基因通过酶切、连接的方法插入pLONZA载体中,酶切位点为BamH I和EcoR I,连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的Herceptin重链(HC)重组质粒。Herceptin轻链(LC)编码基因通过酶切、连接的方法插入pLONZA载体中,酶切位点为BamH I和EcoR I,连接产物转化感受态细胞,筛选正确连接的载体作为构建成功的Herceptin轻链(LC)重组质粒。

[0050] (2) 表达条件测试:分别测试293Fectin、Freestyle MAX两种转染试剂和CHO-LEC2-细胞贴壁、悬浮两种转染条件,参照转染试剂说明,对CHO-lec2⁻细胞进行转染,运用流式细胞术分析GFP细胞所占比例,结果如图3所示,用Freestyle MAX转染试剂,贴壁状态下,获得最高转染效率(81.9%),从而确定转染效率最高条件:Freestyle MAX转染试剂、细胞贴壁状态。

[0051] (3) 抗体表达:

[0052] 无GT(-GT)条件下,进行Herceptin抗体的表达:应用Freestyle MAX转染试剂,将(1)中所获得的Herceptin重链(HC)重组质粒、Herceptin轻链(LC)重组质粒按照重组质粒质量比例为50:50,共转染至贴壁状态下的CHO-lec2细胞中,在无GT(-GT)条件下,进行Herceptin抗体的表达,2-4天后收样,运用protein A进行抗体的纯化。将表达并纯化的抗体在200mM DTT、70℃10分钟条件下还原,通过SDS-PAGE分析抗体表达情况。

[0053] 有GT(+GT)条件下,进行Herceptin抗体的表达:应用Freestyle MAX转染试剂,将(1)中所获得的GT重组质粒、Herceptin重链(HC)重组质粒、Herceptin轻链(LC)重组质粒按照重组质粒质量比例为5:50:50,共转染至贴壁状态下的CHO-lec2细胞中,在有GT(+GT)条件下,进行Herceptin抗体的表达,2-4天后收样,运用protein A进行抗体的纯化。将表达并纯化的抗体在200mM DTT、70℃10分钟条件下还原,通过SDS-PAGE分析抗体表达情况。结果如图4所示,过表达GT不影响Herceptin的正常表达。

[0054] 有GT(+GT)条件下,进行Herceptin抗体的表达:应用Freestyle MAX转染试剂,将(1)中所获得的GT重组质粒、Herceptin重链(HC)重组质粒、Herceptin轻链(LC)重组质粒按照重组质粒质量比例为2:50:50,共转染至贴壁状态下的CHO-lec2细胞中,在有GT(+GT)条件下,进行Herceptin抗体的表达,2-4天后收样,运用protein A进行抗体的纯化。将表达并纯化的抗体在200mM DTT、70℃10分钟条件下还原,通过SDS-PAGE分析抗体表达情况。结果同样显示,过表达GT不影响Herceptin的正常表达。

[0055] (4) 抗体Lectin-blotting分析,表达出的Herceptin抗体在200mM DTT、70℃加热条件下处理10分钟后进行SDS-PAGE,经过如下步骤进行Erythrina Cristagalli lectin (ECL) 染色:1).转膜;2).封闭;3).ECL孵育;4).Streptavidin-HRP孵育;5).显色。用Lectin-blotting分析重链(HC),鉴定半乳糖含量差异。

[0056] GT重组质粒、Herceptin重链(HC)重组质粒、Herceptin轻链(LC)重组质粒按照重组质粒质量比例为5:50:50这一组的结果如图5显示,GT过表达能提高抗体中半乳糖含量。所述提高是指与无GT表达的情况下进行比较。

[0057] GT重组质粒、Herceptin重链(HC)重组质粒、Herceptin轻链(LC)重组质粒按照重组质粒质量比例为2:50:50这一组的结果同样显示,GT过表达能提高抗体中半乳糖含量。所述提高是指与无GT表达的情况下进行比较。

[0058] (5) 抗体质谱分析,表达出的Herceptin抗体在200mM DTT、70℃加热条件下处理10分钟后进行SDS-PAGE,重链和轻链间二硫键打开,之后将重链切下进行in gel digestion及质谱分析。

[0059] GT重组质粒、Herceptin重链(HC)重组质粒、Herceptin轻链(LC)重组质粒按照重组质粒质量比例为5:50:50这一组的结果如图6表明,过表达GT能使得抗体在CHO-1ec2-细胞中表达时的半乳糖含量(G1F+G2F)提高,特别是对G2F型半乳糖含量能显著提高(从15.2%提高至43.8%)。所述提高是指与无GT表达的情况下进行比较。

[0060] GT重组质粒、Herceptin重链(HC)重组质粒、Herceptin轻链(LC)重组质粒按照重组质粒质量比例为2:50:50这一组的结果同样表明,过表达GT能使得抗体在CHO-1ec2-细胞中表达时的半乳糖含量(G1F+G2F)提高,特别是对G2F型半乳糖含量能显著提高(从15.2%提高至43.7%)。所述提高是指与无GT表达的情况下进行比较。

[0061] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化,均为本发明的等效实施例;同时,凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变,均仍属于本发明的技术方案的范围。

序列表

<110> 中国科学院上海高等研究院

中国科学院大学

<120> 一种改造CHO-1ec2-细胞提升抗体糖链中半乳糖含量的方法

<130> 181747

<160> 3

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1197

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

atgcgcctgc gtgaacctct gctgagtggg agtgcagcca tgcctggcgc aagtctgcag 60
cgtgcatgcc gcctgctggg ggagtggtgt gactgcacc tgggcgtgac cctgggtgat 120
tacctggccg gccgcgattt aagccgtctg ccgcagctgg ttggtgtgag caccctgtta 180
cagggcggtg gtaatagtgc agccgccatt ggccagagca gcggtgagtt acgtaccggc 240
ggcgcacgtc cccctcccc tttaggtgca agcagccagc cgcgtcctgg tggcgatagt 300
agcccgggtg ttgatatggg tccgggtccg gccagtaatt taaccagcgt gccggttccg 360
cacacaaccg ccctgagtct gccggcctgt ccggaggaaa gtccgctgtt agtgggtccg 420
atgctgatcg aattcaacat gccggtggat ctggaactgg tggcaaagca gaatccgaac 480
gtgaagatgg gcggtcgtta tgcaccgcgc gactgcgtga gtccgcacaa agtggccatc 540
attatcccgt ttcgcaaccg tcaggagcac ctgaagtatt ggctgtacta cctgcatccg 600
gtgctgcagc gccagcagct ggactacggc atttacgtga tcaaccaggc aggcgatacc 660
atctttaacc gcgcaaact gctgaacgtg ggtttccagg aagccctgaa ggactatgac 720
tatacttgct ttgttttttag tgatgtggac ctgattccga tgaacgacca taacgcctac 780
cgctgcttca gccaaccgcg tcacatcagc gttgccatgg acaaattcgg ctttagcctg 840
ccgtacgttc agtactttgg cggcgtgagt gactgagca agcagcagtt cctgaccatc 900
aacggcttcc ctaacaacta ttggggctgg ggtggcgagg atgacgacat ttttaaccgc 960
ctggttttcc gcggcatgag catcagccgc ccgaacgcag tgggtgggtcg ttgtcgcag 1020
attcgccaca gccgcgataa gaaaaacgaa ccgaaccgc agcgctttga ccgcatcgcc 1080
cacaccaagg aaaccatgct gagcgatggc ctgaacagcc tgacctacca ggtgctggac 1140
gttcaacgtt acccgctgta taccagatc accgttgata ttggtacccc gagctaa 1197

```

<210> 2

<211> 1407

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```

atggagttct ggtgtcatg ggtctttctg gtagctattc ttaaggagat acagtgtgag 60

```

gtgcagcttg tcgaatccgg gggagggctc gtccaacccg gaggatcact gcgcctttca 120
 tgcgcagcct cgggtttcaa tatcaaggac acgtatatcc attgggtgcg gcaggcgcca 180
 ggaaaagggt tggagtgggt cgcgaggatc taccacacca atgggtacac acgatacgcc 240
 gattcgggtca aggggscggt cacaatctcg gcggacacgt cgaaaaacac tgcgtacttg 300
 cagatgaata gcctccgcgc agaagatact gcggtgtatt actgctcccc ctggggaggt 360
 gatggcttct atgcgatgga ctattgggga caaggaacac ttgtaacggt cagctcgcc 420
 agcaccaagg ggccgtccgt gtttccccct gcccccctcg cgaagtcaac tagcggcgga 480
 acagccgccc ttggttgccct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtcac ggtgtcatgg 540
 aactcgggag cattgacttc ggggtgtgcat acatttcccc cagtgtcca gtcacagga 600
 ctgtatagcc tctcgtccgt cgtaacggtc ccgtcatcgt cgctcgggac ccagacatac 660
 atttgcaatg tcaaccacaa accttcgaat acaaagggtg ataagaagg cagcccgcca 720
 aagtcgtgtg acaagacgca cacatgtcct ccatgcctg cgctgagtt gctgggaggg 780
 ccgagcgtgt tcctctttcc tcccaagccg aaggacacac tgatgatttc gaggacgct 840
 gaggtaactt gcgtggtagt agatgtgtcc catgaggacc ccgaagtaaa gtttaactgg 900
 tatgtggacg gtgtggaggt ccacaatgcc aaaaccaaac cgcgcgaaga gcaatacaac 960
 agcacatatc ggggtggtgag cgtgctcacc gtcttgacc aggactggct gaacgggaaa 1020
 gagtacaaat gtaaagtatc aaacaaagcg ctccccgcac ccattgaaaa gactatctca 1080
 aaggctaagg gacagcccag agagccacaa gtctacacgc tccccccctc gagagatgag 1140
 ttgacgaaga atcaggtcag ccttacgtgc ctctcaaaag ggtttttacc atccgacatt 1200
 gcggtggaat gggaaagcaa cggacagcca gagaacaact acaagactac accgcctgtg 1260
 ctggactcgg atggttcgtt cttcctctac tcgaaattga ctgtggacaa atcccgtgg 1320
 cagcagggaa atgtgttctc gtgtagcgta atgcatgaag cgttgcacaa tcactatacc 1380
 cagaaatcgc tctcccttc gcctggc 1407

<210> 3

<211> 708

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

atggatatgc gactacccgc acaacttctt gggtttttgc ttctgtggtt gaggggagct 60
 agatgtgaca tccagatgac gcagtcgccc tcctcattga gcgcatccgt gggagacaga 120
 gtcactatta catgccgggc atcccaagac gtaaacacgg ccgtcgccct gtaccaacag 180
 aagcccggaa aagcgcccaa actgttgatc tactccgctt ctttctgta cagcggggta 240
 ccctcgaggt tcagcggtc gaggagcggg acggatttca cgttgacaat ttctgctact 300
 cagccggaag attttgcgac atactattgc cagcaacact ataccacacc cccgacgttt 360
 ggccagggga ccaaagtcga gatcaagcgg accgtggccg ctccgtcagt attcatcttc 420
 ccgcccgtcc atgagcaact caagagcgga accgcatcag tcgtatgctt gctcaataac 480
 ttctatccgc gagaggcgaa ggtgcagtgg aaagtggaca acgccctgca gtccggtaat 540
 agccaggaat cagtcacgga gcaggattca aaggattcga cctattccct ctctcgaca 600
 ttgacgctgt cgaaagcaga ctacgaaaaa cataaagtgt acgcttgtga agtgacacac 660

cagggccttt catccccggt gacaaagtcg ttcaatcgcg gggagtgt 708

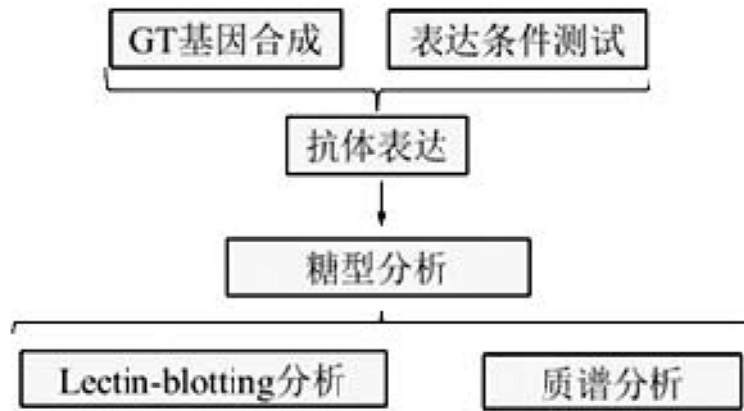


图1

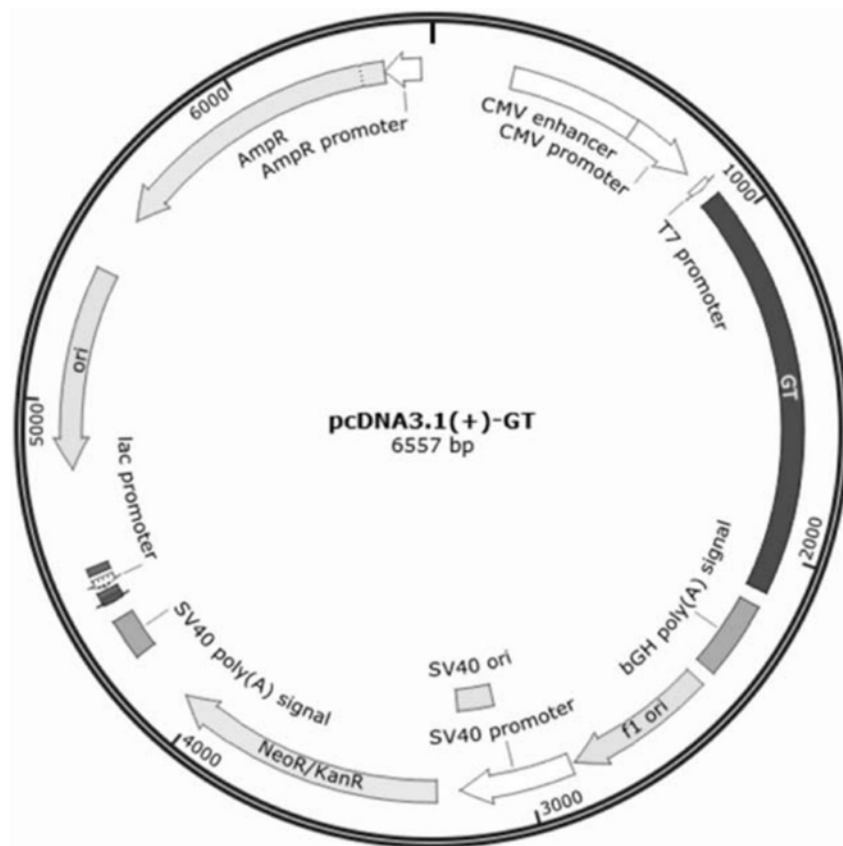


图2

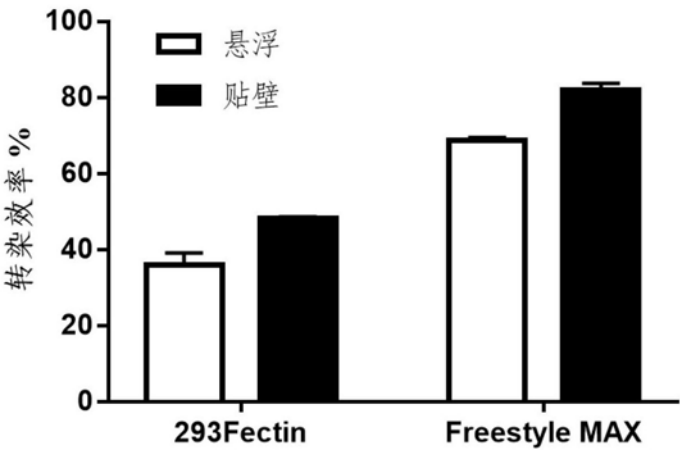


图3

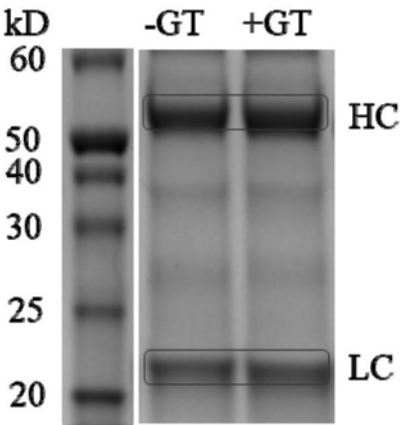


图4

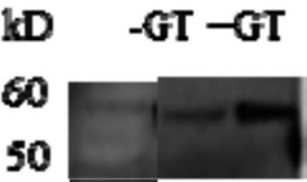


图5

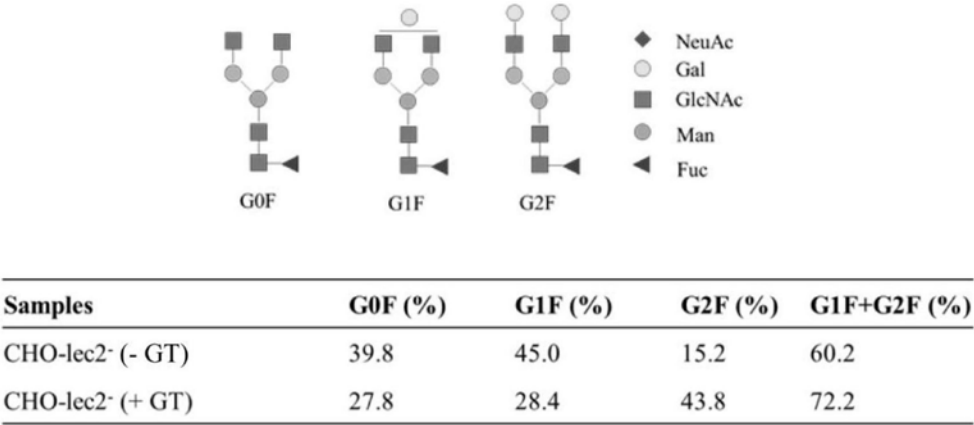


图6