



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111333704 A

(43)申请公布日 2020.06.26

(21)申请号 202010112679.9

(22)申请日 2020.02.24

(71)申请人 军事科学院军事医学研究院微生物
流行病研究所

地址 100071 北京市丰台区东大街20号

申请人 中国人民解放军军事科学院军事医
学研究院
北京昭衍生物技术有限公司(72)发明人 周育森 赵光宇 谷宏婧 孙世惠
何雷 黎燕 韩根成 郎小玲
刘杰 耿树生 盛晓丽(74)专利代理机构 北京预立生科知识产权代理
有限公司 11736

代理人 朱萍 孟祥斌

(51)Int.Cl.

C07K 14/165(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/50(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

A61K 39/215(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61P 31/14(2006.01)

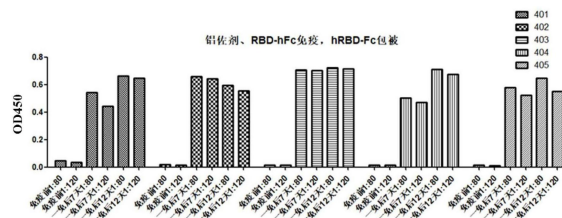
权利要求书1页 说明书6页
序列表5页 附图2页

(54)发明名称

新型冠状病毒COVID-19疫苗、制备方法及其
应用

(57)摘要

本发明涉及生物医学领域,涉及新型冠状病毒COVID-19疫苗、制备方法及其应用。本发明经筛选获得了新型冠状病毒COVID-19疫苗的优势抗原(RBD)表位,为了提高该抗原的免疫源性,将其与免疫球蛋白连接制备成RBD-Fc融合蛋白,本发明的融合蛋白可用于开发新型冠状病毒COVID-19的蛋白疫苗以及预防或治疗新型冠状病毒COVID-19的药物。



1. 新型冠状病毒COVID-19疫苗的优势抗原表位片段,其特征在于,所述抗原表位片段包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其序列衍生物。

2. 编码权利要求1所述的抗原表位片段的核酸分子,优选地,所述核酸分子包含SEQ ID NO.2所示的多核苷酸序列或其简并序列。

3. 一种融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白包含权利要求1所述的抗原表位片段,优选地,所述融合蛋白还包含免疫球蛋白Fc片段。

4. 根据权利要求3所述的融合蛋白,其特征在于,所述免疫球蛋白Fc片段来源包括人、小鼠、兔子、牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠、或豚鼠;优选地,所述免疫球蛋白Fc片段可以是IgG、IgA、IgD、IgE或IgM的Fc片段;更优选地,所述免疫球蛋白Fc包括IgG1 Fc片段、IgG2 Fc片段、IgG3 Fc片段、或IgG4 Fc片段;最优选地,所述免疫球蛋白Fc片段是人IgG Fc片段,其包含SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列或其序列衍生物。

5. 根据权利要求3或4所述的融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白包含SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列或其序列衍生物。

6. 编码权利要求3-5中任一项所述的融合蛋白的核酸分子;优选地,所述核酸分子包含SEQ ID NO.5所示的多核苷酸序列或其简并序列。

7. 包含权利要求6所述的核酸分子的载体。

8. 包含权利要求6所述的核酸分子或权利要求7所述的载体的细胞。

9. 一种制备权利要求3-5中任一项所述的融合蛋白的方法,其特征在于,所述方法包括在合适的环境下培养权利要求8所述的细胞,或

所述方法包括将权利要求1所述的抗原表位片段连接于免疫球蛋白Fc片段。

10. 一种疫苗,其特征在于,所述疫苗包含权利要求3-5中任一项所述的融合蛋白、权利要求6所述的核酸分子、或权利要求7所述的载体。

11. 一种用于在受试者中诱导针对新型冠状病毒COVID-19的抗体的方法,其特征在于,所述方法包括给所述受试者施用权利要求10所述的疫苗,权利要求1所述的抗原表位片段、权利要求3-5中任一项所述的融合蛋白、权利要求6所述的核酸分子,权利要求7所述的载体、权利要求8所述的细胞。

12. 权利要求1所述的抗原表位片段、权利要求3-5中任一项所述的融合蛋白、权利要求6所述的核酸分子、权利要求7所述的载体、或权利要求8所述的细胞在制备权利要求10所述的疫苗中的应用。

13. 权利要求3-5中任一项所述的融合蛋白在制备权利要求8所述的细胞或权利要求10所述的疫苗中的应用。

14. 权利要求6所述的核酸分子、权利要求7所述的载体在制备权利要求8所述的细胞或权利要求10所述的疫苗中的应用。

15. 权利要求1所述的抗原表位片段、权利要求3-5中任一项所述的融合蛋白、权利要求10所述的疫苗,权利要求6所述的核酸分子,权利要求7所述的载体、权利要求8所述的细胞在制备抗新型冠状病毒COVID-19感染的药物中的应用;优选地,所述药物是针对新型冠状病毒COVID-19的抗体。

新型冠状病毒COVID-19疫苗、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫治疗领域,涉及新型冠状病毒COVID-19疫苗、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒COVID-19的肆虐严重危害人们的生命健康,疫苗是有效的防护病毒感染的方法。本申请通过分析新型冠状病毒COVID-19的序列特征,筛选和优化了可以用于制备新型冠状病毒COVID-19疫苗的优势抗原表位片段,并将该蛋白片段与人Fc片段融合,制备成新型的病毒疫苗。

发明内容

[0003] 根据本发明的第一方面,本发明提供了一种新型冠状病毒COVID-19疫苗的优势抗原表位片段,所述抗原表位片段包含SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列或其序列衍生物。

[0004] 根据本发明的第二方面,本发明还提供了编码前面所述的抗原表位片段的核酸分子。

[0005] 进一步,所述核酸分子包含SEQ ID NO.2所示的多核苷酸序列或其简并序列。

[0006] 根据本发明的第三方面,本发明还提供了包含前面所述的核酸分子的载体。

[0007] 根据本发明的第四方面,本发明还提供了包含前面所述的核酸分子或前面所述的载体的细胞。

[0008] 根据本发明的第五方面,本发明提供了一种制备前面所述的抗原表位片段的方法,所述方法包括在合适的环境下培养前面所述的细胞。

[0009] 根据本发明的第六方面,本发明提供了一种疫苗,所述疫苗包含前面所述的抗原表位片段、前面所述的核酸分子、或前面所述的载体。

[0010] 根据本发明的第七方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括前面所述的抗原表位片段,前面所述的核酸分子、前面所述的载体、前面所述的细胞、或前面所述的疫苗,以及药学上可接受的载体。

[0011] 根据本发明的第八方面,本发明提供了一种融合蛋白,所述融合蛋白包含前面所述的抗原表位片段。

[0012] 进一步,所述融合蛋白还包含免疫球蛋白Fc片段。

[0013] 进一步,所述免疫球蛋白Fc片段来源包括人、小鼠、兔子、牛、山羊、猪、小鼠、兔、仓鼠、大鼠、或豚鼠等其他动物。

[0014] 所述免疫球蛋白Fc片段可以是来自IgG、IgA、IgD、IgE和IgM的Fc片段,或者通过它们的组合或杂合体制备而来的Fc片段;优选为来自IgG或IgA。

[0015] 进一步,所述免疫球蛋白Fc片段是人IgG Fc片段。

[0016] 进一步,人IgG Fc片段选自人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的Fc片段中的任一个。

[0017] 在本发明的具体实施方案中,人IgG Fc片段包含SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列或其序列衍生物。

[0018] 在本发明的具体实施方案中,所述融合蛋白包含SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列或其序列衍生物。

[0019] 根据本发明的第九方面,本发明提供了编码前面所述的融合蛋白的核酸分子。

[0020] 进一步,所述核酸分子包含SEQ ID NO.5所示的多核苷酸序列或其简并序列。

[0021] 根据本发明的第十方面,本发明提供了包含第九方面所述的核酸分子的载体。

[0022] 根据本发明的第十一方面,本发明提供了包含第九方面所述的核酸分子或第十方面所述的载体的细胞。

[0023] 根据本发明的第十二方面,本发明提供了一种制备前面所述的融合蛋白的方法,所述方法包括在合适的环境下培养第十一方面所述的细胞。

[0024] 根据本发明的第十三方面,本发明提供了一种疫苗,所述疫苗包含前面所述的融合蛋白、第九方面所述的核酸分子、或第十方面所述的载体。

[0025] 根据本发明的第十四方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括前面所述的融合蛋白、第九方面所述的核酸分子、第十方面所述的载体、第十一方面所述的细胞、或第十三方面所述的疫苗,以及药学上可接受的载体。

[0026] 根据本发明的第十五方面,本发明提供了一种用于在受试者中诱导针对新型冠状病毒COVID-19的抗体的方法,所述方法包括给所述受试者施用本发明前面所述的疫苗,本发明前面所述的抗原表位片段、本发明前面所述的融合蛋白、本发明前面所述的核酸分子,本发明前面所述的载体、本发明前面所述的细胞、或本发明前面所述的药物组合物。

[0027] 根据本发明的第十六方面,本发明提供了根据前面所述的方法制备的抗体。

[0028] 根据本发明的第十七方面,本发明提供了一种疫苗,所述疫苗包含前面所述的抗体或其功能部分。

[0029] 根据本发明的第十八方面,本发明提供了一种药物组合物,所述药物组合物包括前面所述的抗体或第十七方面所述的疫苗。

[0030] 根据本发明的第十九方面,本发明提供了一种抗新型冠状病毒COVID-19感染的方法,所述方法包括给所述受试者施用本发明前面所述的疫苗,前面所述的抗原表位片段、前面所述的融合蛋白、前面所述的核酸分子,前面所述的载体、前面所述的细胞、前面所述的药物组合物、或前面所述的抗体。

[0031] 根据本发明的第二十方面,本发明提供了一种增加前面所述的抗原表位片段的免疫原性的方法,所述方法包括将所述抗原表位片段连接于免疫球蛋白Fc片段。

[0032] 所述免疫球蛋白Fc片段同前面所描述的。

[0033] 根据本发明的第二十一方面,本发明提供了一种制备前面所述的融合蛋白的方法,所述方法包括将前面所述的抗原表位片段连接于免疫球蛋白Fc片段。

[0034] 所述免疫球蛋白Fc片段同前面所描述的。

[0035] 根据本发明的第二十二方面,本发明提供了前面所述的抗原表位片段在制备前面所述的融合蛋白、前面所述的疫苗、前面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0036] 根据本发明的第二十二方面,本发明提供了前面所述的融合蛋白在制备第十三方面或第十七方面所述的疫苗、或第十四方面或第十八方面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0037] 第二方面或第三方面所述的核酸分子、第四方面所述的载体在制备前面所述的疫

苗、前面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0038] 第五方面所述的细胞在制备前面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0039] 第九方面所述的核酸分子,第十方面所述的载体在制备第十三方面或第十七方面所述的疫苗、第十四方面或第十八方面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0040] 第十一方面所述的细胞在制备第十四方面或第十八方面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0041] 第六方面的疫苗在制备前面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0042] 第十三方面的疫苗在制备第十四方面或第十八方面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0043] 第十七方面所述的疫苗在制备第十八方面所述的药物组合物、或前面所述的抗体中的应用。

[0044] 前面所述的抗原表位片段、前面所述的融合蛋白、前面所述的疫苗,前面所述的核酸分子,前面所述的载体、前面所述的细胞、或前面所述的药物组合物在制备针对新型冠状病毒COVID-19的抗体中的应用。

[0045] 前面所述的抗原表位片段、前面所述的融合蛋白、前面所述的疫苗,前面所述的核酸分子,前面所述的载体、前面所述的细胞、或前面所述的药物组合物在制备抗新型冠状病毒COVID-19感染的药物中的应用。

[0046] 本发明的所述氨基酸序列衍生物是由于一个或多个氨基酸残基的缺失、插入、非保守性或保守性取代或它们的组合而不同于天然氨基酸序列的序列,是具有鱼天然氨基酸序列同样的生物学活性或提高了结构稳定性(如抗热、抗pH等)的衍生物。

[0047] 本发明的所述氨基酸序列衍生物与天然氨基酸序列的序列同一性至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%。

[0048] 本发明的疫苗还包括佐剂,所述佐剂包括铝胶佐剂、皂苷、油包水乳剂、水包油乳剂、水包油包水乳剂、丙烯酸或甲基丙烯酸的聚合物、顺丁烯二酸酐和链烯基(alkenyl)衍生物的共聚物、RIBI佐剂系统、Block co-polymer、SAF-M、单磷酸脂质A、Avridine脂质-胺佐剂、大肠杆菌不耐热肠毒素、霍乱毒素、IMS 1314、胞壁酰二肽或Gel佐剂中的一种或几种。

附图说明

[0049] 图1显示本发明的融合蛋白的SEC纯度检测结果图;

[0050] 图2显示本发明的融合蛋白的SDS-PAGE结果图;

[0051] 图3显示本发明的融合蛋白与hACE2受体结合的生物学活性结果图;

[0052] 图4显示RBD-Fc蛋白免疫小鼠血清ELISA结果图。

具体实施方式

[0053] 实施例1 筛选新型冠状病毒COVID-19疫苗的优势抗原(RBD)表位

[0054] 经筛选获得新型冠状病毒COVID-19疫苗的优势抗原(RBD)表位,氨基酸序列如SEQ

ID NO.1所示,优化后编码核酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0055] 实施例2 新型冠状病毒COVID-19疫苗的优势抗原表位与Fc蛋白 (RBD-Fc)的融合、表达及其鉴定

[0056] 采用的免疫球蛋白Fc片段的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示,编码核酸序列如SEQ ID NO.6所示。RBD-Fc氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,RBD-Fc氨基酸序列确定后进行编码核酸序列的优化并合成,RBD-Fc的编码核酸序列如 SEQ ID NO.5所示。为方便试验顺利操作进行,质粒构建过程中使用到的工具载体由ZY-CDMO载体(由北京昭衍生物技术有限公司自主设计合成并申请了专利,申请号为201910738072.9)将PmeI酶切位点和HindIII酶切位点位置互换,合成的RBD-Fc序列5'端带有EcoRI酶切位点,3'端带有HindIII酶切位点,将其插入到载体的EcoRI和HindIII之间,构建获得真核表达新型冠状病毒 COVID-19疫苗载体质粒。

[0057] 于125ml细胞培养摇瓶中接种30ml密度 0.5×10^6 cells/ml的HEK293细胞,当细胞密度生长至 3×10^6 cells/ml以上,细胞活率95%以上。细胞以 $1 \sim 2 \times 10^7$ vc/ml接种至摇瓶中备用,先使用转染缓冲液与质粒混合均匀,再使用转染缓冲液与一定比例的转染试剂混合均匀,将转染试剂混合液加入质粒混合液中混合均匀,室温静置10min,最后将转染复合物逐滴加入到放置有细胞悬液的摇瓶中,在37℃、5%CO₂、转速125rpm的摇床中培养5-7天,收集培养液上清进行纯化。采用AKTA (GE公司)进行RBD-Fc蛋白的分离纯化。首先收集过Protein A亲和层析柱(MabSelect SuRe) pH在3.4-3.6范围(用280nm进行监测)的洗脱液,调pH值至7.0,上样到分子筛层析柱(SUPERDEX 200),280nm进行监控和收集样品,超滤浓缩后获得RBD-FC蛋白。

[0058] 对所获得的蛋白进行SEC纯度检测结果如图1所示,SEC纯度为97.04%。

[0059] 对所得蛋白进行SDS-PAGE结果如图2所示,其中泳道1是蛋白Marker,泳道2是RBD-Fc。

[0060] 实施例3 重组RBD-Fc蛋白与hACE2受体结合的生物学活性

[0061] 通过流式细胞术的方法鉴定重组RBD-Fc蛋白结合hACE2受体的生物学活性。

[0062] 实验步骤:

[0063] 1、向96孔细胞培养板中加入经稀释的待测血清,每孔25μl。血清首孔稀释度1:5,进行四个连续等比稀释。再加入2019-nCoV RBD-Fc蛋白,RBD-Fc蛋白浓度1μg/ml,每孔25μl。室温震荡30min,然后37℃静置10min。

[0064] 2、用胰酶消化细胞,用10ml完全培养基终止消化。然后水平离心(1600rpm, 4℃, 6min)。

[0065] 3、用10ml FPBS重悬细胞,然后水平离心(1600rpm,4℃,6min)。

[0066] 4、用10ml FPBS重悬细胞,对细胞计数,估算其总数,然后水平离心(1600rpm,4℃,6min)。

[0067] 5、根据细胞总数估算值,加入适量FPBS使其浓度为 5×10^6 个/ml。将细胞加入96孔板,50μl/孔。室温震荡10min,37℃静置30min。

[0068] 6、准备相应数量的流式管,做好标记,加入1ml FPBS。将96孔板内混合物轻轻吹吸混匀,转移至相应流式管中,轻轻震荡混匀。水平离心(1600rpm,4℃, 6min)。

[0069] 7、弃上清,将流式管倒置在吸水纸上,然后立即正立在流式管架上。拍打管架侧

壁,使细胞松散。

[0070] 8、如此再洗涤两次。

[0071] 9、向流式管中加入FPBS稀释的二抗,100 μ l/管,使用锡箔纸盖住流式管。室温震荡10min,37 $^{\circ}$ C静置30min。

[0072] 10、同前述方法洗涤三次。

[0073] 11、加入200 μ l FPBS,轻轻吹吸混匀,转移200 μ l至96孔板中,上机检测。

[0074] 实验结果:

[0075] 结果如图3所示,结果表明,RBD-Fc蛋白与高表达hACE2分子的HeLa-hACE2细胞能有效结合,而与普通HeLa不结合。从而确证了重组RBD-Fc 蛋白具有与hACE2结合的生物活性。

[0076] 实施例4 新型冠状病毒COVID-19疫苗(RBD-Fc)在小鼠体内的免疫及抗体效价鉴定

[0077] RBD-Fc蛋白免疫小鼠血清ELISA鉴定

[0078] 小鼠经2019-nCoV RBD-m/hFc蛋白免疫后,对其血清进行抗体滴度检测。

[0079] 实验步骤:

[0080] 1、取96孔酶标板,分别包被相应抗原蛋白,包被浓度1 μ g/ml,每孔50 μ l。4 $^{\circ}$ C静置过夜。

[0081] 2、使用洗板机洗涤酶标板一次,拍干。

[0082] 3、加入3%BSA封闭液,每孔100 μ l。37 $^{\circ}$ C静置1h。

[0083] 4、使用洗板机洗涤酶标板一次,拍干。

[0084] 5、另取一新96孔酶标板,对小鼠血清进行连续等比稀释。

[0085] 6、将稀释的血清加到步骤1中的三块酶标板中,每孔50 μ l。37 $^{\circ}$ C静置45min。

[0086] 7、使用洗板机洗涤酶标板三次,拍干。

[0087] 8、加入稀释的山羊抗小鼠抗体(稀释度1:5000),每孔50 μ l。37 $^{\circ}$ C静置30min。

[0088] 9、使用洗板机洗涤酶标板三次,拍干。

[0089] 10、加入显色液,每孔50 μ l。显色约1min。

[0090] 11、加入终止液,每孔50 μ l。

[0091] 12、使用酶标仪读取OD450处吸光度。

[0092] 实验结果:

[0093] RBD-hFc蛋白免疫小鼠血清ELISA结果如表1和图4所示。结果表明,重组RBD-hFc蛋白具有良好的免疫原性,可以有效诱导产生针对病毒Spike蛋白 RBD的特异性抗体,可用于预防或治疗新型冠状病毒COVID-19感染。

[0094] 表1 RBD-hFc蛋白免疫小鼠血清ELISA结果统计

[0095]

包被 蛋白	小鼠 编号	免疫前		一免后 7 天		一免后 12 天		空白	
		1:80	1:120	1:80	1:120	1:80	1:120	0	0
RBD- hFc	401	0.0486	0.0365	0.5409	0.442	0.6622	0.6449	0.0111	0.0097
	402	0.0167	0.0137	0.6602	0.6414	0.5964	0.5529	0.0102	0.0098
	403	0.0134	0.0139	0.7051	0.702	0.7216	0.7158	0.0106	0.0109
	404	0.0149	0.0149	0.5012	0.4718	0.7123	0.6752	0.0109	0.0109
	405	0.0131	0.0108	0.5804	0.5224	0.6447	0.5498	0.0121	0.0109
	406	0.012	0.0102	0.4487	0.3658	0.606	0.5788	0.0101	0.0099
	407	0.0121	0.0109	0.7884	0.6683	0.7544	0.706	0.0093	0.0102
	408	0.0155	0.0149	0.5188	0.4699	0.5987	0.5906	0.0123	0.011
	409	0.0127	0.0113	0.7003	0.6196	0.744	0.6916	0.0093	0.0104
	410	0.0115	0.0122	0.5735	0.5076	0.5718	0.5944	0.0102	0.0106

[0096] (401~405为铝佐剂)。

序列表

<110> 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所
中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

北京昭衍生物技术有限公司

<120> 新型冠状病毒COVID-19 疫苗、制备方法及其应用

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 194

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

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

Thr Val

<210> 2

<211> 582

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```
aacatcacca acctgtgccc cttcggcgag gtgttcaacg ccaccagggt cgccagcgtg 60
tacgcctgga acaggaaaag gatcagtaac tgcgtggccg actactccgt gctgtacaac 120
tccgcctcct tctccacctt caaatgctat ggcgtgtccc ccaccaagct gaacgatctg 180
tgttttcacca acgtgtacgc cgactccttc gtgattaggg gcgacgaggt gcgccagatc 240
gccccctggtc agaccggcaa gatcgccgat tataactaca agctgcccga cgacttcacc 300
ggctgcgtga tcgcctggaa ctccaacaat ctggatagca aggtgggtgg aaactacaat 360
tacctgtaca gactgttccg caaatccaac ctgaagccct tcgaaaggga catctccaca 420
gagatctacc aggccggtc caccacctgc aacggagtgg agggcttcaa ctgctacttc 480
cccctgcagt cctacggctt ccagcccacc aacggcgtgg gataccagcc ctacagagtg 540
gtgggtgctgt ccttcgagct gctgcacgcc cccgccaccg tg 582
```

<210> 3

<211> 235

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

```
Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
1          5          10          15
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
          20          25          30
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
          35          40          45
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
          50          55          60
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
65          70          75          80
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
          85          90          95
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
          100          105          110
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
          115          120          125
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
          130          135          140
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
145          150          155          160
```

Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
					165				170					175	
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
			180					185					190		
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
			195				200					205			
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
			210				215					220			
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
225						230				235					
<210> 4															
<211> 429															
<212> PRT															
<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
<400> 4															
Asn	Ile	Thr	Asn	Leu	Cys	Pro	Phe	Gly	Glu	Val	Phe	Asn	Ala	Thr	Arg
1				5					10					15	
Phe	Ala	Ser	Val	Tyr	Ala	Trp	Asn	Arg	Lys	Arg	Ile	Ser	Asn	Cys	Val
			20					25					30		
Ala	Asp	Tyr	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Phe	Lys
			35				40					45			
Cys	Tyr	Gly	Val	Ser	Pro	Thr	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Phe	Thr	Asn
			50				55				60				
Val	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe	Val	Ile	Arg	Gly	Asp	Glu	Val	Arg	Gln	Ile
65					70					75				80	
Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Gly	Lys	Ile	Ala	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Leu	Pro
					85				90					95	
Asp	Asp	Phe	Thr	Gly	Cys	Val	Ile	Ala	Trp	Asn	Ser	Asn	Asn	Leu	Asp
			100					105					110		
Ser	Lys	Val	Gly	Gly	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Leu	Phe	Arg	Lys
			115				120					125			
Ser	Asn	Leu	Lys	Pro	Phe	Glu	Arg	Asp	Ile	Ser	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gln
			130				135				140				
Ala	Gly	Ser	Thr	Pro	Cys	Asn	Gly	Val	Glu	Gly	Phe	Asn	Cys	Tyr	Phe
145					150					155				160	
Pro	Leu	Gln	Ser	Tyr	Gly	Phe	Gln	Pro	Thr	Asn	Gly	Val	Gly	Tyr	Gln
					165					170				175	
Pro	Tyr	Arg	Val	Val	Val	Leu	Ser	Phe	Glu	Leu	Leu	His	Ala	Pro	Ala
			180						185				190		

Thr Val Ala Ala Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys		
195	200	205
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
210	215	220
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
225	230	235
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
	245	250
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
	260	265
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
	275	280
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
	290	295
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
305	310	315
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
	325	330
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys		
	340	345
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln		
	355	360
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		
	370	375
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln		
385	390	395
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
	405	410
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	420	425

<210> 5

<211> 1287

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

```

aacatcacca acctgtgccc cttcggcgag gtgttcaacg ccaccaggtt cgccagcgtg 60
tacgcctgga acaggaaaag gatcagtaac tgcgtggccg actactccgt gctgtacaac 120
tcgcctcct tctccacctt caaatgctat ggcgtgtccc ccaccaagct gaacgatctg 180
tgtttcacca acgtgtacgc cgactccttc gtgattaggg gcgacgaggt gcgccagatc 240

```

gcccctggtc agaccggcaa gatcgccgat tataactaca agctgcccga cgacttcacc 300
 ggctgcgtga tcgcctggaa ctccaacaat ctggatagca aggtgggtgg aaactacaat 360
 tacctgtaca gactgttccg caaatccaac ctgaagccct tcgaaaggga catctccaca 420
 gagatctacc aggccggctc caccctctgc aacggagtgg agggcttcaa ctgctacttc 480
 cccctgcagt cctacggctt ccagcccacc aacggcgtgg gataccagcc ctacagagtg 540
 gtgggtgctgt ccttcgagct gctgcacgcc cccgccaccg tggctgctgc tgaacctaaa 600
 tcctgcgaca agacacacac ctgccccccc tgccctgccc ctgaactgct gggaggcccc 660
 tccgtgttcc tgttcccccc caagcccaag gacacactga tgatctcccg gacccccgag 720
 gtgacctgcg tgggtgggga cgtgtcccac gaagatcccg aagtgaatt taattggtac 780
 gtggacggcg tggaggtgca caatgcaaag acaaaacca gggaggaaca gtacaatagt 840
 acatacaggg tggtagcgt gctgacagt ctgcatcagg attggctgaa cggaaggag 900
 tataagtga aggtgtccaa caaggccctg cccgccccca ttgagaagac catctccaaa 960
 gccaaaggcc agcccaggga gccccagggtg tacacctgc caccagcag agacgagctg 1020
 accaagaacc aggtgagcct gacctgcctg gtgaaaggct tctaccctc cgacatcgcc 1080
 gtggaatggg aatcaaacgg ccagcctgag acaactaca aaacaacacc cccgtgctg 1140
 gacagcgacg gcagcttctt cctgtactcc aagctgacag tggacaagtc caggtggcag 1200
 cagggcaacg tgttcagttg ctccgtgatg cagaggccc tgcacaacca ttacaccag 1260
 aagtcctgt ccctgtcccc cggcaag 1287

<210> 6

<211> 705

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

gctgctgctg aacctaaatc ctgcgacaag acacacacct gccccccctg ccctgcccct 60
 gaactgctgg gaggccccctc cgtgttcctg ttcccccca agcccaagga cacactgatg 120
 atctcccga ccccgagggt gacctgcgtg gtgggtggacg tgtccacga agatcccga 180
 gtgaaattta attggtacgt ggacggcgtg gaggtgcaca atgcaaagac aaaaccagg 240
 gaggaacagt acaatagtac atacagggtg gtgagcgtgc tgacagtgct gcatcaggat 300
 tggctgaacg ggaaggagta taagtgaag gtgtccaaca aggccctgcc cgccccatt 360
 gagaagacca tctccaaagc caagggccag ccagggagc ccaggtgta caccctgcc 420
 cccagcagag acgagctgac caagaaccag gtgagcctga cctgcctggt gaaaggcttc 480
 taccctccg acatcgccgt ggaatgggaa tcaaacggcc agcctgagaa caactacaaa 540
 acaacacccc cctgctgga cagcgacggc agcttcttc tgtactcaa gctgacagt 600
 gacaagtcca ggtggcagca gggcaacgtg ttcagttgct cctgatgca cgaggccctg 660
 cacaaccatt acaccagaa gtccctgtcc ctgtccccg gcaag 705

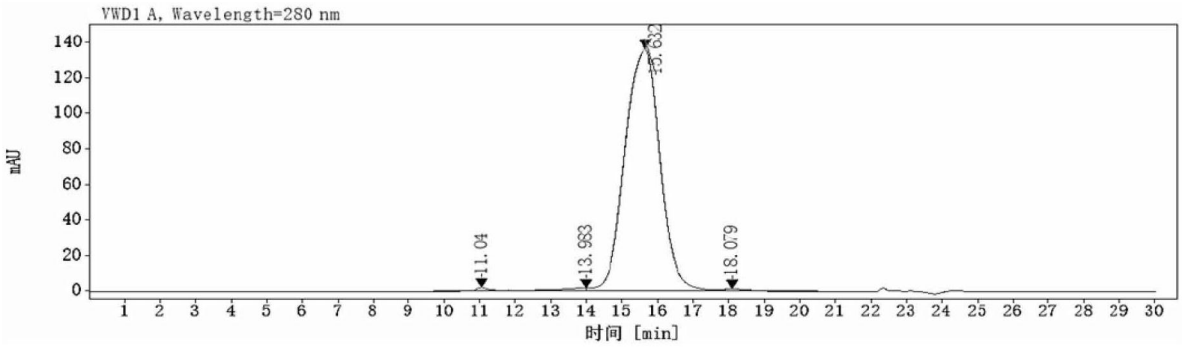


图1

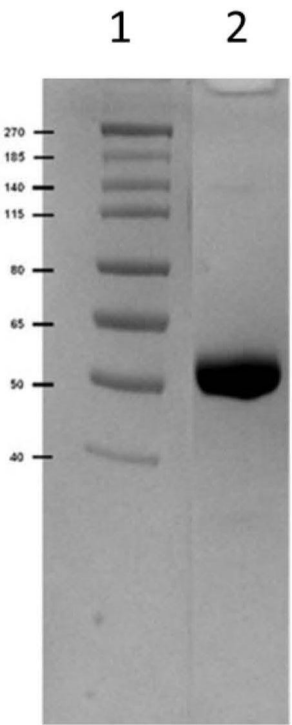


图2

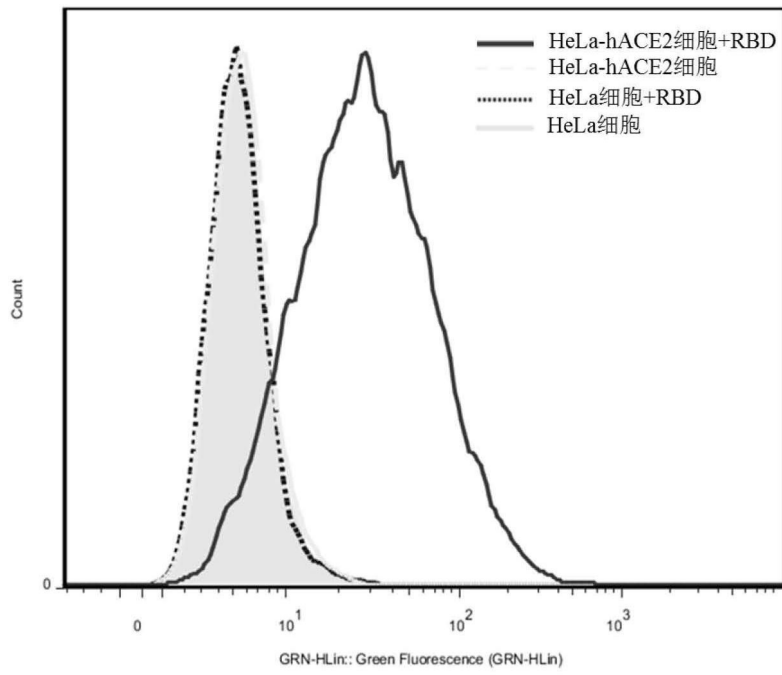


图3

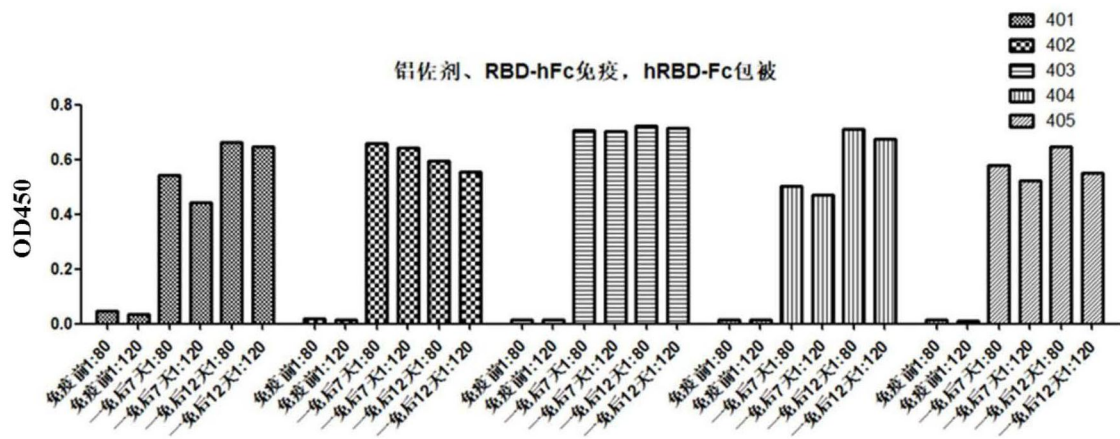


图4