

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410067157.2

[51] Int. Cl.
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 1319988C

[22] 申请日 2004.10.14

[21] 申请号 200410067157.2

[73] 专利权人 上海润龙生物科技有限公司

地址 200065 上海市普陀区延长西路 25 号

[72] 发明人 潘 卫 徐 容 王金华 谢天培
李云华 王德贵 沈毅珺 扬 华
王锦红 许浩坤

[56] 参考文献

WO03093306 A2 2003.11.13

Protein LA, a novel hybrid proein with unique single - chain Fvantibody - and Fab - binding properties Henrik G. SVENSSON 等, Eur. J. Biochem. ,Vol. 258 1998

审查员 汪波莉

[74] 专利代理机构 上海光华专利事务所
代理人 余明伟 沈锡英

权利要求书 2 页 说明书 56 页 附图 6 页

[54] 发明名称

一种高亲和力免疫球蛋白结合分子及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种重组免疫球蛋白结合分子文库、其制备方法及其应用。 本发明是以来自不同种属免疫球蛋白结合分子葡萄球菌 A 蛋白 protein A 的 A、B、C、D、E 结构域、大消化链球菌 proteinL 的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域、C 和 G 群链球菌蛋白 G protein G 的 G1、G2 为结构单元，将上述结构单元随机连接，构建重组 Ig 结合分子文库，将该文库展示在噬菌体表面；以免疫球蛋白对噬菌体展示重组 Ig 结合分子文库进行 3 - 4 轮亲和筛选，获得系列高亲和力免疫球蛋白结合分子噬菌体文库。 上述文库可用于筛选高亲和力 Ig 结合分子。



1. 一种重组 Ig 结合分子文库，其特征在于：所述文库是由以不同的 Ig 结合分子葡萄球菌 A 蛋白的 A、B、C、D、E 结构域，大消化链球菌 L 蛋白的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域，G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的 G1、G2 结构域的单个体结合结构域为结构单元，以结构单元随机 DNA 重排形成的 Ig 结合分子组成，其中上述结构域的核苷酸序列分别为：SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 12，单个结构域之间以核苷酸 GAGCTC 连接，结构单元随机 DNA 重排形成的 Ig 结合分子通过如下方法获得：
 - (1) 将 Ig 结合分子葡萄球菌 A 蛋白的 A、B、C、D、E 结构域，大消化链球菌 L 蛋白的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域，G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的 G1、G2 结构域的单个体结合结构域分别经 PCR 扩增引入 Sac I 酶切位点作为连接点；
 - (2) 将 PCR 回收产物分别经 Sac I 酶切消化；
 - (3) 将步骤 (2) 获得的 Sac I 酶切消化产物混合，用 T4 连接酶将各单结构域进行随机连接重组。
2. 如权利要求 1 所述文库的制备方法，包括下列步骤：
 - (1) 以 Ig 结合分子葡萄球菌 A 蛋白的 A、B、C、D、E 结构域，大消化链球菌 L 蛋白的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域，G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的 G1、G2 结构域的单个体结合结构域为结构单元，分别经 PCR 扩增引入 Sac I 酶切位点作为连接点，其中所述结构域的核苷酸序列为：SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 12；
 - (2) PCR 回收产物分别经 Sac I 酶切消化；
 - (3) 将步骤 (2) 获得的 Sac I 酶切消化产物混合，再用 T4 连接酶将各单结构域进行随机连接重组。
3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，步骤 (3) 后还包括将不同时间的连接产物混合起来获得重组 Ig 结合分子文库。
4. 一种重组 Ig 结合分子文库的噬菌体展示方法，其特征在于将权利要求 1 所述的 Ig 结合分子文库克隆于噬菌体载体 pCANTAB5S 中，以该载体进行 3+3 形式的噬菌体展示。
5. 采用权利要求 4 的方法所获得的重组 Ig 结合分子噬菌体文库。
6. 一种获得高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库的方法，其特征在于：用 Ig 包板，利用权利要求 5 所述的重组 Ig 结合分子噬菌体文库经 3-4 轮体外定向进化 IgG 亲和筛选获得高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库。

7. 用权利要求 6 的方法所获得的高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库。
8. 如权利要求 7 所述的高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库，其特征在于：被噬菌体展示的高亲和力 Ig 结合分子是以葡萄球菌 A 蛋白的单个结构域、大消化链球菌 protein L 的单个结构域及 G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的单个结构域为结构单元，间隔排列连接而成的 Ig 结合分子中的任意一种或多种。
9. 如权利要求 8 所述的高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库，以 ML、MA、MG 分别代表大消化链球菌 L 蛋白的单个结构域、葡萄球菌 A 蛋白的单个结构域、G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的单个结构域，其特征在于：所述结构单元间隔排列连接方式为 $(ML-MA)_n$ 或 $(ML-MG)_n$ 或 $(ML-MA-MG)_n$ 或 $(ML-MG-MA)_n$ 或 $ML-(MA-ML)_n$ 或 $ML-(MG-ML)_n$ ，其中 n 为该序列的重复次数。
10. 如权利要求 9 所述的高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库，其特征在于：被噬菌体展示的高亲和力 Ig 结合分子的序列排列方式为 B3-G1-B2-G2-B5, B2-D-G1-B5-C-G1, B5-A-B2-G1-B1, B3-D-B3, B3-D-B3-D-B3, B2-G2-A-B3-D-G1, B1-G1-B3-G1, B2-D-B3-D-B1, B2-C-B4-E-G1, B2-C-G2-B1-D-G1 的 Ig 结合分子中的任意一种或多种。
11. 重组 Ig 结合分子文库的应用，其特征在于：用权利要求 1 或 5 或 7 至 10 中任一权利要求所述的文库筛选高亲和力 Ig 结合分子。

一种高亲和力免疫球蛋白结合分子及其制备方法

技术领域

本发明涉及分子生物学及免疫诊断学领域，尤其涉及一种重组免疫球蛋白结合分子文库、其制备与应用。

背景技术

酶联免疫吸附试验（ELISA 法）检测抗体已广泛用于各种临床疾病的诊断，尤其是传染病如肝炎、HIV 感染的免疫诊断、献血者筛选和流行病学调查。但目前 ELISA 法检测敏感度不高，往往造成漏检而影响疾病的早期诊断，贻误病情或者引起输血后丙型肝炎及 HIV 感染，严重危害着人们的健康。从用于献血员筛选抗-HCV 及抗-HIV ELISA 试剂来看，目前最新的检测试剂（第三代试剂），仍然存在漏检。其中，这些漏检很大一部分是检测系统中另一个关键物质—酶结合物与被抗原捕获的抗体的结合数量不足引起的。因此，提高酶结合物与捕获抗体的结合是提高 ELISA 抗体检测试剂敏感度关键因素之一。

目前用于检测的酶结合物主要是辣根过氧化物酶（HRP）标记的抗人免疫球蛋白（Immunoglobulin, Ig）的多克隆抗体或单克隆抗体、金黄色葡萄球菌蛋白 A（protein A）、C 和 G 群链球菌蛋白 G（protein G）和大消化链球菌属蛋白 L（protein L）。

研究发现，一些细菌表面蛋白能与 Ig 结合且不影响抗体结合抗原的活性，因此被作为酶结合物应用于酶联等免疫学检测。这些 Ig 结合分子主要是金黄色葡萄球菌蛋白 A（protein A）、C 和 G 群链球菌蛋白 G（protein G）和大消化链球菌属蛋白 L（protein L）。protein A 主要与 Ig 的 Fc 段结合，与人以及几乎所有哺乳动物的 IgG 的 Fc 段都有很强的结合，但只结合其中的 IgG₁、IgG₂ 和 IgG₄ 亚类，不能结合 IgG₃ 亚类，与其他类型 Ig 的结合活性很弱，其与 IgM 的结合效果不佳。与 protein A 结合特性相似，protein G 也可与人及几乎所有哺乳动物的 IgG 的 Fc 段结合，其结合力比 protein A 略强，不同的是，protein G 不能结合除 IgG 以外的其他类型的免疫球蛋白，因此，不是很适合用作免疫检测。另一种抗体结合蛋白—厌氧菌大消化链球菌属 protein L 与 protein A 及 protein G 的结合特性完全不同，它主要与 Ig 的 κ 轻链可变区结合，能结合不同类型 Ig 的 Fab 片段，且不影响抗原结合位点，与人以及几乎所有哺乳动物的各类及各亚型的 Ig 都有较强的结合，并且亲和力相当，适合用作免疫检测。

1992 年，瑞典学者 Kihlberg 等构建了 protein L 和 protein G 的融合蛋白 Protein LG，

发现 Protein LG 有广泛的抗体结合活性能结合大多数 Ig 的 Fc、Fab 段和 Ig 轻链。与单一的 protein L 或 protein G 相比,其抗体结合特性更完全;除人类 Ig 外,还可用于鼠源性抗体的检测。1998 年,瑞典学者 Svensson 等将 protein L 的四个结合 Ig κ 轻链的结构域与 protein A 四个结合 IgG 的结构域融合,构建出一种新型融合蛋白 Protein LA,结合谱广,不仅能结合人及一些哺乳动物的不同类型 Ig 和 IgG 所有亚类,还能结合基因工程单链抗体 Fv (ScFv) 片段而不影响抗体的抗原结合能力,可用于免疫检测及亲和色谱纯化各类 Ig 及 Fv (ScFv) 片段。证明 Protein LA 是一种多功能的抗体结合分子。目前,Protein LA 可溶的、HRP 标记、或结合琼脂糖形式的多种制剂已被 CLONTECH 公司开发成商品。国内至今未有类似产品出现。

蛋白质分子体外定向进化是近几年发展起来的一种蛋白质改造新策略,通过对编码基因的随机突变、重组和定向筛选,借以改变、优化生物大分子特性,获得具有改进功能或全新功能的蛋白质,使几百万年的自然进化过程在短期内得以实现,是改造生物活性分子的重要方法。DNA 重排是目前为止最简便、最有效的体外定向分子进化技术,它将一组紧密相关的核酸序列随机片段化,再重新组装成全长核酸序列,通过序列迅速进化,可获得功能更强的新的蛋白分子。DNA 重排技术在医药方面已得到广泛应用并在许多酶、抗体及重要蛋白的改造、新型毒素分子及蛋白类药物的制备上取得成功。

protein A、protein L 和 protein G 的抗体结合区各自由多个序列高度重复的结构域组成,protein A 的 Ig 结合区由 5 个(A、B、C、D、E)58-62 个氨基酸残基序列高度同源的结构域串联而成;各单结构域间仅有少量的氨基酸序列差异,如 A 与 B、B 与 C 结构域各有 5 个氨基酸不同。protein L 的 Ig 结合区也由 5 个(B1、B2、B3、B4、B5)72-76 氨基酸残基序列高度同源的抗体结合结构域重复串联而成,各结构域氨基酸组成大多相同,仅有某些位点不同,如 B2 与 B3 结构域只有 4 个氨基酸不同。protein G 的 Ig 结合活性被定位于 2 个高度重复的 B 结构域(G1、G2),每个结构域由 55 个氨基酸残基组成。其中 protein L 的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域分别具有如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 所示的基因序列;protein A 的 A、B、C、D、E 结构域分别具有如 SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 所示的基因序列;protein G 的 G1、G2 结构域分别具有如 SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 所示的基因序列。实验证明上述蛋白的单个的抗体结合结构域也同样具有 Ig 结合能力。本发明利用 DNA 重排技术将 12 种 protein L, protein A 和 Protein G 单结合域(B1、B2、B3、B4、B5、A、B、C、D、E、G1、G2 依次代表三种蛋白 protein L, protein A 和 Protein G 的不同抗体结合结构域,共 12 种)为结构单位进行重新随机排列组合,构建重组 Ig 结合分子文库。利用该文库进行 DNA 重排可形成多种不同的 Ig

结合分子，从中可以筛选出与 Ig 结合能力更强的高亲和力免疫球蛋白 (Ig) 结合分子 (high affinity immunoglobulin binding molecules HAIBMs)，实现本发明的蛋白质分子体外定向进化。

噬菌体展示技术作为高通量的筛选方法，使得大容量组合基因文库建立后目的分子的体外筛选成为可能。噬菌体展示技术是 1985 年建立的一种将外源多肽基因插入噬菌体外壳蛋白 PIII 或 PVIII 基因中，将外源多肽展示于噬菌体颗粒表面的方法。它外源多肽的基因型和表型巧妙的结合起来，展示在噬菌体表面的外源蛋白直接与其编码基因相关联，通过噬菌体繁殖扩增可直接进行外源蛋白的活性鉴定与序列分析。经特定配基的筛选，可获得特异结合的目的分子，而且通过“吸附”—“洗脱”—“扩增”的重复过程使含有目的蛋白的噬菌体得到上万倍乃至 10^8 倍的富集，是一种高效分子进化研究的高通量筛选体系。我们应用的噬菌体展示载体 pCANTAB5S，在《新型噬菌体展示载体 pCANTAB5S 的构建》，安徽医科大学学报，2004 年第 39 卷第 2 期第 83~86 页中，以及中国专利文献—文献号 1508254 中具有详细描述，这里简单的说，是在引物中加入 Sac I 酶切位点，将用该引物扩增的 IFN- α A-2b 衔接片段 PCR 产物克隆到 pMD-18T 中，再将该片段插入 pCANTAB5L 中，经 Sac I 酶切，回收线性载体片段，再连接形成新型噬菌体展示载体 pCANTAB5S。pCANTAB5S 校正了 pCANTAB5L 克隆位点的读框并引入了新的限制酶切位点 SacI。重组噬菌粒 pCANTAB5S 的结构示意图 12。pCANTAB5S 可以对重组 Ig 结合分子文库进行展示，并可以通过 Ig 对噬菌体展示重组 Ig 结合分子文库进行亲和筛选，获得系列 HAIBMs。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种重组 Ig 结合分子文库及其制备方法。

本发明的另一个目的是提供一种重组 Ig 结合分子文库的噬菌体展示方法。

本发明的另一个目的是提供一种获得高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库的方法。

本发明的另一个目的是提供本发明的重组 Ig 结合分子文库应用于筛选高亲和力 Ig 结合分子。

在本发明的第一方面，本发明涉及一种重组 Ig 结合分子文库，该文库以不同的 Ig 结合分子葡萄球菌 A 蛋白的 A、B、C、D、E 结构域，大消化链球菌 L 蛋白的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域，G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的 G1、G2 结构域的单个体结合结构域为结构单元，以结构单元随机 DNA 重排形成 Ig 结合分子组成，其中上述结构域的核苷酸序列分别为：SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 12，单个结构域之间以核苷酸 GAGCTC 连接，结构单元随机 DNA 重排形成的 Ig 结合分子通过如下方法获得：

- 将 Ig 结合分子葡萄球菌 A 蛋白的 A、B、C、D、E 结构域，大消化链球菌 L 蛋白的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域，G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的 G1、G2 结构域的单个体结合结构域分别经 PCR 扩增引入 Sac I 酶切位点作为连接点；
- 将 PCR 回收产物分别经 Sac I 酶切消化；
- 将步骤 (2) 获得的 Sac I 酶切消化产物混合，用 T4 连接酶将各单结构域进行随机连

接重组。

在本发明的第二方面，本发明涉及上述文库的制备方法，包括下列步骤：

- a) 以 Ig 结合分子葡萄球菌 A 蛋白的 A、B、C、D、E 结构域，大消化链球菌 L 蛋白的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域，G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的 G1、G2 结构域的单个体结合结构域为结构单元，分别经 PCR 扩增引入 Sac I 酶切位点作为连接点，其中所述结构域的核苷酸序列为：SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO: 12；
- b) PCR 回收产物分别经 Sac I 酶切消化；
- c) 将步骤 (2) 获得的 Sac I 酶切消化产物混合，再用 T4 连接酶将各单结构域进行随机连接重组。

在本发明的第三方面，本发明涉及一种重组 Ig 结合分子文库的噬菌体展示方法及该方法所获得的重组 Ig 结合分子噬菌体文库，该方法将按所述 Ig 结合分子文库克隆于噬菌粒载体 pCANTAB5S 中，以该载体进行 3+3 形式的噬菌体展示。

在本发明的第四方面，本发明涉及一种获得高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库的方法，该方法用 Ig 包板，利用上述重组 Ig 结合分子噬菌体文库经 3-4 轮体外定向进化 IgG 亲和筛选获得高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库。

在本发明的第五方面，本发明涉及上述方法获得的高亲和力 Ig 结合分子噬菌体文库，被噬菌体展示的高亲和力 Ig 结合分子的是以葡萄球菌 A 蛋白的单个结构域、大消化链球菌 protein L 的单个结构域及 G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的单个结构域为结构单元，间隔排列连接而成的 Ig 结合分子中的任意一种或多种。

更佳地，以 ML、MA、MG 分别代表大消化链球菌 L 蛋白的单个结构域、葡萄球菌 A 蛋白的单个结构域、G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的单个结构域，则上述高亲和力 Ig 结合分子的序列的排列方式为 (ML-MA)_n 或 (ML-MG)_n 或 (ML-MA-MG)_n 或 (ML-MG-MA)_n 或 ML-(MA-ML)_n 或 ML-(MG-ML)_n，其中 n 为该序列的重复次数。

更佳地，上述高亲和力 Ig 结合分子序列的排列方式为 B3-G1-B2-G2-B5，B2-D-G1-B5-C-G1，B5-A-B2-G1-B1，B3-D-B3，B3-D-B3-D-B3，B2-G2-A-B3-D-G1，B1-G1-B3-G1，B2-D-B3-D-B1，B2-C-B4-E-G1，B2-C-G2-B1-D-G1 之任一种。

更佳地，上述高亲和力 Ig 结合分子具有 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32 任一所示的序列特征。

在本发明的第六方面，本发明提供的重组 Ig 结合分子文库可用于筛选高亲和力 Ig 结合分子。筛选获得的高亲和力 Ig 结合分子可应用于免疫学诊断或抗体的检测和纯化。尤其是应用于酶联免疫吸附试验或免疫层析检测或免疫组化。

本发明的技术路线是采用分子生物学技术构建重组 Ig 结合分子文库；将该文库以 3+3 的方式展示丝状噬菌体上；用 Ig 对噬菌体展示文库进行 3-4 轮亲和筛选，获得系列高亲和力 Ig 结合分子 (HAIBMs)；序列分析测定所获 HAIBM 的 DNA 序列，并确知其氨基酸序列，分析其

分子的构成特点；原核表达、纯化 HAIBM 分子，测定其与 Ig 的结合能力；测定展示有 HAIBM 分子噬菌体与 Ig 的结合能力及在 ELISA 抗体检测中的作用。

本发明的优点是利用蛋白质分子体外定向进化的策略，通过构建重组 Ig 结合分子基因文库筛选到与免疫球蛋白高亲和力结合的一系列 Ig 结合分子 (HAIBMs)，HAIBMs 作为具有高亲和力的新的 Ig 结合分子可以广泛用于酶联免疫吸附试验、免疫层析检测、免疫组化等免疫学诊断及抗体的检测和纯化。

附图说明

图 1 Protein A 的 A、B、C 结构域基因片段的 PCR 扩增产物电泳示意图，其中：

m: DL2000 Marker

1-4: Mu-Protein A A 结构域基因片段 PCR 扩增产物

5-6: Mu-Protein A B 结构域基因片段 PCR 扩增产物

7-8: Mu-Protein A C 结构域基因片段 PCR 扩增产物

C: 空白对照

图 2 Protein A 的 D 结构域基因片段的 PCR 扩增产物电泳示意图，其中：

m: DL2000 Marker

1-4: Mu-Protein A D 结构域基因片段 PCR 扩增产物

C: 空白对照

图 3 Protein A 的 E 结构域基因片段的 PCR 扩增产物电泳示意图，其中：

m: DL2000 Marker

1-4: Mu-Protein A E 结构域基因片段 PCR 扩增产物

C: 空白对照

图 4 Protein L B1-B5 结构域基因片段的 PCR 扩增产物电泳示意图，其中：

1: Protein L B1 结构域基因片段的 PCR 扩增产物

2: Protein L B2 结构域基因片段的 PCR 扩增产物

3: Protein L B3 结构域基因片段的 PCR 扩增产物

4: Protein L B4 结构域基因片段的 PCR 扩增产物

5: Protein L B5 结构域基因片段的 PCR 扩增产物

C: 空白对照

m:DL2000Marker

图5 Protein G G1-G2 结构域基因片段的 PCR 扩增产物电泳示意图，其中：

- 1: Protein G G1 结构域基因片段的 PCR 扩增产物
- 2: Protein G G2 结构域基因片段的 PCR 扩增产物
- C: 空白对照
- m:DL2000Marker

图6 Protein A 单结构域 + Protein L 单结构域 +Protein G 单结构域连接反应产物电泳示意图，其中：

- 1: 连接前 2: 连接 30' 3: 连接 1h
- 4: 连接 2h 5: 连接 4h 6: 连接 24h
- m: DL2000 Marker

图7 PALGn/phage 文库 Ig 筛选 F1 代文库中单克隆噬菌体插入片段的 PCR 扩增

1—8:单克隆 1-16# ; C:阳性对照 LT/pCANTAB5L ; m:DL2000Marker; n:阴性对照 pCANTAB5S

图8 PALGn/phage 文库 Ig 筛选 F2 代文库中单克隆噬菌体插入片段的 PCR 扩增

1—8:单克隆 1-16# ; C:阳性对照 LT/pCANTAB5L ; m:DL2000Marker; n:阴性对照 pCANTAB5S

图9 PALGn/phage 文库 Ig 筛选 F3 代文库中单克隆噬菌体插入片段的 PCR 扩增

1—8:单克隆 1-16# ; C:阳性对照 LT/pCANTAB5L ; m:DL2000Marker; n:阴性对照 pCANTAB5S

图10 PALGn/phage 文库 Ig 筛选 F4 代文库中单克隆噬菌体插入片段的 PCR 扩增

1—8:单克隆 1-16# ; C:阳性对照 LT/pCANTAB5L ; m:DL2000Marker; n:阴性对照 pCANTAB5S

图11 各筛选轮次 IgG 结合分子文库中 HAIBM 分子中的单结构域 (domain) 组成分布的比例

图12 重组噬菌粒 pCANTAB5S 的结构示意图

具体实施方式

一、重组 Ig 结合分子基因文库的构建

与传统的 DNA 重排—将目的片段 DnaseI 随机消化后重组实现体外定向进化的方式不同, 本发明以不同种属的 Ig 结合分子的单个抗体结合结构域作为结构单位 (protein A 的 A、B、C、D、E 结构域, protein L 的 B1、B2、B3、B4、B5 结构域和 protein G 的 G1、G2 结构域) 经 PCR 扩增引入相同的限制酶切位点作为 Linker, 经酶切消化后, 再用 T4 连接酶将各单结构域进行随机连接重组, 构成重组 Ig 结合分子文库。在该文库中 DNA 重排可形成不同长度 (2-5 个结构域或更多) 以 55-76 个氨基酸残基组成的抗体结合结构域为最小单位的重组 Ig 结合分子, 其随机重复串联可产生 12^n 以上种的不同 Ig 结合分子 (n 为重复串联的最小功能单位个数); 与 Protein LA 分子相比, 其多样的排列形式可用 $P(L/A/G)_n$ 来表示, P 为多肽, (L/A/G) 为 5 种 Protein L、5 种 Protein A 及 2 种 Protein G 单结构域中的任何一种, n 为重复串联的单结构域的个数。与 Protein LA (LLL-AAAA) 及 Protein LG 单一的结构形式相比, 分子库中 L 与 A/G 距离的多样性、(L/A/G) 重复串联数的多样性以及各种 L/A/G 氨基酸差异产生的序列多样性使得产生出与 Ig 结合能力更强的高亲和力 Ig 结合分子。该分子文库中各单结构域是具有一定结构的有序多肽, 本身具有 Ig 结合能力, 在新的蛋白中其基本的构架结构得以继续保存, 从而保证了组合分子的 Ig 结合能力得到提高和优化。另外因各单结构域自身具有二级结构 (α 螺旋或 β 折叠), 重组分子的空间结构比随机片段重组分子有更高的稳定性, 有利于新的蛋白空间构象的维持。为了保证重组分子的多样性, 发明人通过调整各片段的浓度, 使各片段比例相当, 同时控制连接反应条件, 将不同时间的连接产物混合, 得到不同长度的各种排列的重组 Ig 结合分子基因文库, 说明书附图图 1—图 6 即分别显示了 Protein A 的 A、B、C 片段的 PCR 扩增产物电泳示意图, Protein A 的 D 片段的 PCR 扩增产物电泳示意图, Protein A 的 E 片段的 PCR 扩增产物电泳示意图, Protein L 的 B1-B5 片段的 PCR 扩增产物电泳示意图, Protein G 的 G1-G2 片段的 PCR 扩增产物电泳示意图, Protein A 单结构域 + Protein L 单结构域 + Protein G 单结构域连接反应产物电泳示意图。

二、重组 Ig 结合分子文库的噬菌体展示

将重组 Ig 结合分子文库克隆于噬菌粒载体 pCANTAB5S 中, 以噬菌粒为载体进行 3+3 形式的展示。外源基因插入噬菌粒的 III 基因中, 转化大肠杆菌 TG1, M13K07 辅助噬菌体拯救, 构建展示 Ig 结合分子噬菌体文库。所建的库容量为 3.4×10^7 个菌落形成, 噬菌体的滴度为 4.1×10^{12} 单位转化单位/毫升 (transformation unit/ml, TU/ml)。pCANTAB5S 噬菌粒载体不仅保留原 pCANTAB5L 载体的多克隆位点和 [G4S]3 接头, 保证了大分子量 (>300 个氨基酸) 重组 Ig 结合分子的功能维持和活性展示, 还增加了 SacI 克隆位点, 能更方便, 有效地展示外源基因文库, 有利于扩大库容量。

三、Ig 体外定向分子进化筛选高亲和力 Ig 结合分子 (HAIBMs)

利用噬菌体展示技术建立的高通量筛选结合 Ig 体外定向分子进化筛选。用 Ig 包板, 噬菌体展示 Ig 结合分子文库经 3—4 轮 Ig 亲和筛选获得 HAIBMs。我们在每轮库筛选中选用了 IgG 结合实验菌落计数、插入片段 PCR 阳性克隆数等指标直观评价筛选的效果, 结果见表 1, 表 2, 图 7, 图 8, 图 9, 图 10, 图 11。

四、高亲和力 Ig 结合分子 (HAIBMs) 的分子结构特点及序列

制备筛选后单克隆的重组噬菌体, 提取噬菌粒 DNA, 用 pCANTAB5S 的上下游引物 pCANTAB5-S1 和 pCANTAB5-S6 双向测定其 DNA 序列, 所测序列用 DNASTAR 软件分析其序列特征。高亲和力 Ig 结合分子序列分析显示其结构域组成的多样性: 由来自不同 Ig 结合分子的单个抗体结合结构域—protein A 的 A/B/C/D/E、protein L 的 B1/B2/B3/B4/B5、protein G 的 G1/G2 重组连接形成 (B1-B5 代表 protein L 的 B1-B5 结构域, A、B、C、D、E 代表 protein A 的 A、B、C、D、E 结构域, G1、G2 代表 protein G 的 B1、B2 结构域), 如 B1-B2-G1-A、B3-D-B3、B1-B3-B1、G1-B2-A-B1、B1-G2-B1、D-B2-B-B3、B3-D-B3-D-B3、B-G1-B2-D-B1 等。以 ML、MA、MG 分别代表大消化链球菌 L 蛋白的单个结构域、葡萄球菌 A 蛋白的单个结构域、G 群或 C 群链球菌 G 蛋白的单个结构域, 则 HAIBMs 所具备的分子结构特征为: $(ML-MA)_n$ 或 $(ML-MG)_n$ 或 $(ML-MA-MG)_n$ 或 $(ML-MG-MA)_n$ 或 $ML-(MA-ML)_n$ 或 $ML-(MG-ML)_n$ 结构, HAIBMs 均由 protein L 的单结构域 (ML)、protein A 的单结构域 (MA) 或 protein G 的单结构域 (MG) 间隔排列连接而成 (n 为该序列的重复次数)。其中的代表序列的连接方式为: B3-G1-B2-G2-B5, B2-D-G1-B5-C-G1, B5-A-B2-G1-B1, B3-D-B3, B3-D-B3-D-B3, B2-G2-A-B3-D-G1, B1-G1-B3-G1, B2-D-B3-D-B1, B2-C-B4-E-G1, B2-C-G2-B1-D-G1。在代表序列 protein L、protein A、protein G 的单结构域之间以核苷酸以 GAGCTC 连接。本发明特别揭示了具有 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:32 任一所示的序列的高亲和力 Ig 结合分子。

五、HAIBM 重组噬菌体的 Ig 结合活性测定

用 Ig 包板分别对各单克隆 HAIBM 重组噬菌体进行 Ig 结合活性测定。以两种方式检测重组噬菌体与 Ig 的结合, 第一种在重组噬菌体与抗体结合后的样孔中加入大肠杆菌 TG1 使其感染, 将单克隆重组噬菌体感染菌液涂布于氨苄青霉素抗性平皿上计数, 以辅助噬菌体为阴性对照, 菌落数的多少表示噬菌体与 Ig 结合能力的大小; 第二种在重组噬菌体 Ig 结合后的样孔中加入酶标抗噬菌体抗体 (HRP/Anti-M13 conjugate), TMB 显色, 测 OD_{450nm} 值, 直接检测被人 Ig 特异吸附的重组噬菌体的数量, 结果见表 3。

六、高亲和力 Ig 结合分子(HAIBMs)的功能

将 HAIBMs 克隆于原核表达载体 pET32(a), IPTG 诱导表达 HAIBMs 蛋白, 用 Ni 亲和层析柱纯化 HAIBMs 蛋白。用纯化的 HAIBMs 包被 96 孔酶标板, 同时设 SPA 阳性对照, LT 阴性对照, 加入 IgG HRP 酶标抗体, 可以检测 HAIBMs 与 Ig 的结合活性, 结果见表 4。

七、高亲和力 Ig 结合分子(HAIBMs)的应用

将 HCV 抗原包被于酶标排条板上, 洗涤后, 加入丙型肝炎病毒感染阳性病人的血清, 作用后洗去未结合的抗体, 加入不同的 HAIBM 单克隆重组噬菌体 (各滴度调至同一水平), 设噬菌体阴性对照, 将反应后的样品分成两组, 第一组每孔加入大肠杆菌 TG1 使其感染, 将单克隆重组噬菌体感染的菌液涂布于氨苄青霉素抗性平皿上计数, 以辅助噬菌体为阴性对照; 第二组每孔加入噬菌体抗体 HRP/Anti-M13 conjugate, TMB 显色, 测 OD_{450nm} 值, 用于检测被病人血清特异吸附的重组噬菌体的数量, 结果见表 4、表 5、表 6。

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1 重组 Ig 结合分子文库的构建

1. 合成引物

1.1 用于 protein A、protein L、protein G 单结构域基因扩增

(1) 从 Mu-protein A/ pGEM-T easy 质粒上扩增 Protein A-A、Protein A-B/C、Protein A-D、Protein A-E 序列的上游引物分别为:

PA-uA: 5' -cacgagctcGCTGACAACAATTTCAAC-3'

PA-uB: 5' -cgcgagctcGCGGATAACAAATTCAAC-3'

PA-uC : 5' -cgcgagctc GCTGACAACAAATTCAAC-3'

PA-uD : 5' -tccgagctcGCTGATGCGCAACAAAAT-3'

PA-uE : 5' -cgcgagctcGCTCAACAAAATGCTTTT-3'

下游引物分别为:

PA-dA: 5' -tctgagctcTTTCGGTGCTTGAGATTC-3'

PA-dB: 5' -tctgagctcTTTTGGTGCTTGTGCATC-3'

PA-dC: 5' -acggagctcTTTTGGTGCTTGAGCATC-3'

PA-dD: 5' -tcggagctcAAAGCCACGAACTCTAAG-3'

PA-dE: 5' -agagagctcTTTTGGAGCTTGAGAGTC-3'

(2) 从 Protein L/pGEM-T easy 质粒上扩增 Protein L 的 B1-B5 序列的上游引物分别为:

pLB1-u: 5' -tctgagctcAAAGAAGAAACACCAGAA-3'

pLB2-u: 5' -acggagctcAAAGAAAAACCCCGGAA-3'

pLB3-u: 5' -cgtagactCAAAGAAAAACACCAGAA-3'

pLB4-u: 5' -cgtagactcAAAGAAAAACACCAGAA-3'

pLB5-u: 5' -cgcagactcAAGAAAGTTGACGAAAAA-3'

下游引物分别为:

pLB1-d: 5' - cgcagactcTCCAGCAAATTTAATATT-3'

pLB2-d: 5' - cgcagactcTCCAGCAAATTTAATATT-3'

pLB3-d: 5' -tgcgagctcACCAGCGAATTTGATGTT-3'

pLB4-d: 5' --cgcagactcACCTGCAAATCTAATATT-3'

pLB5-d: 5' --cgtagactcTCCAGCAAATCTAATGTT-3'

(3) 从 Protein G/pGEM-T easy 质粒上扩增 Protein G B1-B2 序列的上游引物分别为:

pG1-u: 5' -tctgagctcACTTACAAATTAATCCTT-3'

pG2-u: 5' -tctgagctcACTTACAACTTGTTATT-3'

下游引物分别为:

pG1-d: 5' -tatgagctcTTCAGTTACCGTAAAGGT-3'

pG2-d: 5' -tctgagctcTTCAGTAACTGTAAAGGT-3'

上述引物均引入了 Sac I (-GAGCTC-) 酶切位点。

1.2 用于 PCR 扩增检测阳性克隆插入片段的引物序列, 为 pCANTAB5S 克隆位点上、下游序列上游引物为:

pCANTAB5-S1: 5' -CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3'

下游引物为:

pCANTAB5-NOT2: 5' -GCCCAGCCGCC-3'

1.3 用于阳性克隆 DNA 测序的引物序列, 为 pCANTAB5E 的上、下游序列上游引物为:

pCANTAB5-S1: 5' -CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3'

下游引物为:

pCANTAB5-S6: 5' -GTAAATGAATTTTCTGTATGAGG-3'

2 各抗体结合结构域的 PCR 扩增

所使用的模板 protein A 序列见 GenBank AB050857, protein L 序列见 GenBank M86697, protein G 见 GenBank Y00428。以含葡萄球菌 A 蛋白的 5 个抗体结合结构域 (A-E) 的 protein A/pGEM-T easy 质粒为模板, 用 PA-uA/PA-d A、PA-u B/PA-d B、PA-u C/PA-d C、PA-u D/PA-d D、PA-u E/PA-d E 分别扩增 Protein A 的 A、B、C、D 及 E 片段; 以 Protein L/pGEM-T easy 质粒为模板, 用 pL B1-u/pL B1-d、pL B2-u/pL B2-d、pL B3-u/pL B3-d、pL B4-u/pL B4-d 和 pL B5-u/pL B5-d 为引物, PCR 分别扩增 Protein L 的 B1, B2, B3, B4 及 B5 片段; 以 Protein G/pGEM-T easy 质粒为模板, 用 pG1-u/pG1-d 和 pG2-u/pG2-d 为引物, PCR 分别扩增 Protein G 的 B1, B2 片段。PCR 反应体积 50 μ l, 加质粒模板 5ng, 上、下游引物各 1 μ mol, dNTP 100 μ mol, Mg⁺⁺ 2mmol, 1U Taq 酶。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 sec; 60 $^{\circ}$ C 30 sec; 72 $^{\circ}$ C 30 sec; 35 个循环。各 PCR 产物用申能博彩公司的胶试剂盒纯化, 按说明书进行。相应的 PCR 扩增产物电泳图见图 1-图 5。

3 PCR 回收产物的酶切

各 PCR 回收产物取 40 μ l 作 Sac I 酶切, 反应体积 80 μ l。Sac I 4 μ l (40 U)、10 \times buffer 8 μ l, 分 80 μ l / 支, 37 $^{\circ}$ C 酶切过夜, 1% 琼脂糖电泳后, 用手术刀片割下目的条带, 用申能博彩公司的胶试剂盒回收 PA-A、PA-B、PA-C、PA-D、PA-E, PL B1、PL B2、PL B3、PL B4、PL B5 及 PG1、PG2 酶切片段。

4 Ig 结合分子文库的构建

上述各酶切回收片段取 5 μ l (1 μ g), 10 \times 连接缓冲液 8 μ l, T4 DNA 连接酶 4 μ l (20 U), 反应体积 100 μ l。先将 DNA 片段与水一起加入管中于 65 $^{\circ}$ C 温育 5 分钟, 在连接反应试剂加入之前, 将 DNA 溶液于 0 $^{\circ}$ C 预冷 5 分钟, 加入 T4 DNA 连接酶, 连接混合物分 5 支, 20 μ l/支, 16 $^{\circ}$ C 分别连接 30min、1h、2h、4h、24h, 再将不同时间的连接产物混合起来用于与 pCANTAB5S DNA 的连接。图 6 显示连接成功。

实施例 2、重组 Ig 结合分子文库的噬菌体展示

1. 噬菌粒载体 pCANTAB5S DNA 的制备及线性化:

pCANTAB5S 噬菌粒 DNA 用申能博彩公司质粒回收试剂盒抽提, 按说明书进行。琼脂糖电泳定量。

Sac I 酶切后碱性磷酸酶 (CIAP) 去磷酸化处理, 试剂盒从溶液中回收线性化载体, 琼脂糖电泳定量。

2. Ig 结合分子文库与噬菌粒载体连接:

将 12 种回收的 protein A 的 A、B、C、D、E 单结合域酶切片段, protein L 的 B1、B2、B3、B4、B 单结合域酶切片段, Protein G 的 G1、G2 单结合域酶切片段的混合物 $80\ \mu\text{l}$ ($5\ \mu\text{g}$) 加 T4 DNA 连接酶 $5\ \mu\text{l}$ (25 U), $10\times\text{Buffer}$ $1.5\ \mu\text{l}$, 反应总体积 $100\ \mu\text{l}$ 。将 $100\ \mu\text{l}$ 分为 $20\ \mu\text{l}$ /支, 共 5 支, 16°C 连接, 分别连接 30min、60min、90min、120min、150min 后合并, 加入载体 $2\ \mu\text{l}$ ($2\ \mu\text{g}$), 65°C 处理 10min 冷却至室温, 再加入 T4 DNA 连接酶 $5\ \mu\text{l}$ (25U), $10\times\text{Buffer}$ $2\ \mu\text{l}$, 反应总体积 $120\ \mu\text{l}$, 分 6 支 16°C 分别连接 30min、60min、90min、120min、150min 和 180min 后合并。

3. 感受态细胞的制备:

原始 TG1 菌划线 LB 平板, 37°C 温箱中培养过夜, 挑取活化平板上单克隆菌落接种于 2ml Psi 培养基的试管中, 37°C 250rpm 摇床振荡培养过夜; 再将培养细菌 1: 50 转接于 Psi 培养基中, 37°C 250rpm, 振荡培养至 OD 值 0.4。将菌液 1ml/支分装于 1.5 ml 离心管中, 冰水浴 15 分钟, 4000rpm, 4°C 离心 10min; 去除上清, 用 1ml 0.1M CaCl_2 小心将细菌悬浮起来; 冰水浴 15min, 3500rpm, 4°C 离心 10min; 去除上清, 沉淀用 $200\ \mu\text{l}$ 0.1 M CaCl_2 将细菌小心复悬, 冰浴备用。

4. 重组噬菌体的制备:

$120\ \mu\text{l}$ 连接产物加入 2ml 感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰水浴 30min, 42°C 水浴 60s, 冰水浴 2min, 加 8ml SOC 培养基, 37°C 150 rpm, 摇床振荡培养 1h, 取 $100\ \mu\text{l}$ 均匀涂布 LB 氨卞青霉素 (100ng/ml) 平板 37°C 培养过夜, 计数菌落数以计算库容量, 其余液体 37°C 150 rpm 摇床振荡培养过夜。第二天, 转化培养物用 100ml $2\times\text{YT}$ (1.6%胰蛋白胨, 1%酵母膏, 0.5%氯化钠) 活化培养 1 小时, 加入 10ml $4\times 10^{10}\text{TU/ml}$ 的 M13K07 辅助噬菌体拯救, 37°C , 250rpm 振荡培养 1 小时, 加卡那霉素至浓度 50ng/ml , 37°C , 250rpm 振荡培养过夜。培养物 5000rpm 离心 10 分钟, 取上清经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 获得原代 (F_0 代) 重组噬菌体 PALGn 库。其转化效率为 3.4×10^7 (自连对照为 0)。因此, 所建文库容量为 3.4×10^7 个菌落形成单位。分子文库由 12 种构成元件组成: protein A 的 A-E domain、protein L 的 B1-B5 domain 和 protein G 的 G1, G2 domain, 如按最长可形成 5 个 domain 的 PAL 分子算, 每个 domain 均有正反两种方式插入, 该库应含 $24+24^2+24^3+24^4+24^5$ 即 8.3×10^6 种不同排列组合方式的外源 PALGn 分子, 因此, 我们构建的 PALGn-pCANTAB5S 组合文库完全能较好地包含所有的随机组合 PALGn 分子。

5. 重组噬菌体滴度测定

将重组噬菌体 10 倍系列稀释,各取重组噬菌体 10 μ l 感染对数生长期的大肠杆菌 TG1 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 培养 1 小时后涂 LB(含氨卞青霉素 100ng/ml) 平板, 置 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。计数不同稀释度平皿上的菌落数, 生长菌落数的稀释倍数乘以 100 即为每毫升噬菌体的转化单位数 (transformation unit, TU)。检测结果展示 F₀代 Ig 结合分子 PALGn 库的重组噬菌体的滴度为 4.1 \times 10¹²TU/ml, 用相同的方法在含卡那霉素抗性的平板上计数检测的 M13K07 野生型噬菌体的滴度为 6.1 \times 10¹²TU/ml, 重组噬菌体的滴度与野生型噬菌体的滴度水平基本一致。

实施例 3、Ig 体外定向分子进化筛选高亲和力 Ig 结合分子

1. 重组噬菌体库的 Ig 亲和筛选:

用 PH 9.6 的碳酸盐缓冲液 200 μ l 包被 Ig (终浓度为 10 μ g/ml) 于酶标排条板上 37 $^{\circ}$ C, 2 小时, 用 150 μ l 封闭液 (PBS+10%脱脂奶) 封闭排条板 1 小时, 4 $^{\circ}$ C 保存。用洗液 (PBS+0.05%Tween20) 洗 5 遍后用于噬菌体文库的亲和力筛选。排条板每孔加 100 μ l 封闭液和 100 μ l PALGn 重组噬菌体, 37 $^{\circ}$ C 反应 3 小时, 洗液 (0.25%Tris+0.05% Tween20) 洗涤 30 遍, 加 100 μ l 对数生长期的大肠杆菌 TG1, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时, 收集后取 10 μ l、1 μ l、0.1 μ l 涂 LB(含氨卞青霉素 100ng/ml) 平板 37 $^{\circ}$ C 过夜培养计数, 用以评估噬菌体文库与 Ig 分子的结合情况。其余菌液加入 5ml 2 \times YT 中, 37 $^{\circ}$ C, 250rpm 振荡培养 1 小时, 加入氨卞青霉素至 100ng/ml, 加 1ml 4 \times 10¹⁰TU/ml 的 M13K07 辅助噬菌体, 37 $^{\circ}$ C, 250rpm 振荡培养 1 小时, 加卡那霉素至 50ng/ml, 37 $^{\circ}$ C, 250rpm 振荡培养过夜。培养物 5000rpm 离心 10 分钟, 上清经 0.22 μ m 滤膜过滤, 即为 Ig 亲和筛选后的 PALGn 重组噬菌体文库。设阳性对照 Protein A/phage 两条作 IgG 同步筛选 (Protein A/phage 的制备: 取 Protein A/pCANTAB5L 质粒 600ng 转化 TG1 感受态细胞, 其余过程同 PALGn/phage)。按上述过程, Ig 亲和筛选重复 4 轮, 同时进行每轮筛选库的滴度测定。每轮筛选均设阴性对照 LT/phage 两孔 (LT/phage 制备过程同 Protein A/phage), 空白对照两孔 (不加 phage), 作 IgG 结合实验, 各取 10 μ l、1 μ l、0.1 μ l 涂 LB(含 Amp 100ng/ μ l) 平板 37 $^{\circ}$ C 过夜培养计数。每轮的 Ig 结合实验菌落计数 (空白对照均为 0) 及滴度测定结果如表 1。由表可见 PALGn/phage 文库与 Ig 的结合能力随着筛选轮次的增加而不断提高, 反应了筛选过程能有效地使文库地 Ig 的结合能力不断进化。

表 1 每轮 Ig 筛选过程中噬菌体文库的 Ig 结合菌落计数

大肠杆菌 TG1 感染菌落 phage	10 μ l	1 μ l	0.1 μ l	滴度
LT/phage	F	13	5	3.5×10^{12}
F ₀ 代 PA/phage	F	F	110	5×10^{12}
PALGn/phage	F	F	47	4.1×10^{12}
LT/phage	5	0	0	1.5×10^{12}
F ₁ 代 PA/phage	F	F	73	4×10^{12}
PALGn/phage	F	F	9	5.4×10^{12}
LT/phage	1	0	0	1.5×10^{12}
F ₂ 代 PA/phage	F	F	21	2.1×10^{12}
PALGn/phage	F	F	12	9×10^{12}
LT/phage	2	0	0	1.5×10^{12}
F ₃ 代 PA/phage	F	F	31	2×10^{12}
PALGn/phage	F	F	11	1.1×10^{12}
LT/phage	5	0	0	1.5×10^{12}
F ₄ 代 PA/phage	F	F	35	2×10^{12}
PALGn/phage	F	F	51	1.6×10^{12}

注：F 表示菌落数 > 300 个。

2. 插入片段的 PCR 鉴定：噬菌体原始库及每一轮噬菌体筛选库随机挑取 PALGn/phage Ig 结合试验平板上单克隆菌落 48 个至 0.5ml 离心管中培养 5h，以培养菌液为模板，pCANTAB5-S1 为上游引物，pCANTAB5-NOT1 为下游引物，进行 PCR 扩增以检测插入片段的大小。PCR 扩增条件为 94℃ 30 sec；53℃ 30 sec；72℃ 45sec；35 个循环。设阳性对照 LT/pCANTAB5L，阴性对照 pCANTAB5S。该实验用以了解筛选过程中噬菌体文库中所展示的 Ig 结合分子分子量大小的变化情况。表 2 与图 7-11 的结果显示，随着筛选轮次的不断增加，文库中大分子量的 HAIBM 分子的比例不断增加，反应了筛选过程使文库中的分子不断向有利于 Ig 结合的方向进化。

表 2 各筛选轮次文库中 48 个随机挑选 HAIBM 分子中的单结构域组成的分布情况

单结构域组成	F ₀	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄
0 domain	8	8	8	5	4
1 domain	5	5	2	1	0
2 domain	35	35	37	26	23
3 domain	0	0	1	7	12
>3 domain	0	0	0	9	9
总计	48	48	48	48	48

以上结果表明每轮筛选库的 IgG 结合实验菌落计数、插入片段 PCR 阳性克隆数能迅速直观地反应体外定向进化的效果。从 IgG 结合条件实验菌落计数看，随着筛选轮次的增加，PALGn/phage IgG 结合活性接近 (F₃代) 并高于 (F₄代) 阳性对照 IgG 结合活性；插入片段 PCR 鉴定结果显示阳性克隆数随着筛选轮次增加而增加并趋于稳定，阳性克隆组成也有明显变化：随着筛选轮次增加，大片段 (≥2 个 domain) 数目及其阳性百分率增加，小片段数目及其阳性百分率降低。说明经过 IgG 筛选，与 IgG 亲和力低的短片段被淘汰，而与 IgG 亲和力高的较长片段被筛选出来。IgG 结合实验结果与插入片段 PCR 鉴定结果一致，均与理论相符，体现了噬菌体展示技术中利用亲和力选择的强大功效。

实施例 4、高亲和力 Ig 结合分子(HAIBMs)的分子结构特点

从第 4 轮筛选所得到的噬菌体文库中，挑选插入片段较大的阳性克隆进行序列分析，阳性克隆的重组噬菌粒用 DNA 抽提试剂盒纯化，委托上海申能博彩公司进行序列测定，测序引物为 pCANTAB5E 的上、下游引物 pCANTAB5-S1 和 pCANTAB5-S6，测序结果用 DNASTAR 软件分析。结果见表 3-6。序列分析显示其结构域组成的多样性：(1)被选择出的分子包括由来自不同种属 Ig 结合分子的单个抗体结合结构域—protein A 的 A/B/C/D/E、protein L 的 B1/B2/B3/B4/B5 和 protein G 的 G1/G2 重组连接形成；(2)文库中单个分子中的单结合结构域的排列方式多样，包括：B1-B2-G1-A、B3-D-B3、B1-B3-B1、G1-B2-A-B1、B1-G2-B1、D-B2-B-B3、B3-D-B3-D-B3、B-G1-B2-D-B1 等等。比较各 HAIBMs 分子结构发现他们具有一定的排列特征：(ML-MA)_n 或 (ML-MG)_n 或 (ML-MA-MG)_n 或 (ML-MG-MA)_n 或 ML-(MA-ML)_n 或 ML-(MG-ML)_n 结构，由 protein L 的单结构域(ML)、protein A 的单结构域(MA)或 protein G 的单结构域(MG)间隔排列连接而成

(n 为该序列的重复次数)。其中的代表序列的排列方式为: B3-G1-B2-G2-B5, B2-D-G1-B5-C-G1, B5-A-B2-G1-B1, B3-D-B3, B3-D-B3-D-B3, B2-G2-A-B3-D-G1, B1-G1-B3-G1, B2-D-B3-D-B1, B2-C-B4-E-G1, B2-C-G2-B1-D-G1。在代表序列 protein L、protein A、protein G 的单结构域之间以核苷酸 GAGCTC 连接。核苷酸 GAGCTC 可编码接头肽 EL (氨基酸单字母表示)

代表序列的核苷酸序列如下:

1、代表序列 B3-G1-B2-G2-B5 (SEQ ID NO:13):

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAAC
AGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATAACAGATATGCTGACTTATTAGCAAAAAGAAAATGGTA
AATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCACTTACAAATTAATCCTT
AATGGTAAAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATACGC
TAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAAGAGCTCAAAGAAA
AAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAACAGCAGAA
TTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATAACAGATATGCAGATGCATTAAGAAGGACAATGGAGAATATAC
AGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCACTTACAAACTTGTTATTAATGGTA
AAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTAAAGCAGTAGACGCAGAACTGCAGAAAAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGAC
AACGCTGTTGATGGTGTGTTGGACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTACGGTAACTGAAGAGCTCAAGAAAGTTGACGA
AAAACCAGAAGAAAAAGAACAAGTAACAATTAAGAAAAATATATATTTTGAAGATGGAACAGTACAACTGCAACATTTA
AAGGAACATTTGCAGAAGCGACAGCAGAAGCATAACAGATATGCAGATTTGTTATCAAAGAACATGGTAAATACACAGCA
GACTTGGAAGATGGTGGATACACTATCAACATTAGATTTGCTGGA

2、代表序列 B2-D-G1-B5-C-G1 (SEQ ID NO:15):

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAAC
AGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATAACAGATATGCAGATGCATTAAGAAGGACAATGGAG
AATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGATGCGCAACAAAAT
AACTTCAACAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCAACGCAATGGTTT
CATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAACGAATCTCAAGCAC
CGAAAGAGCTCACTTACAAATTAATCCTTAATGGTAAAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCT
ACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATCGACTAAGAC
CTTTACAGTTACTGAAGAGCTCAAGAAAGTTGACGAAAAACCAGAAGAAAAAGAACAAGTAACAATTAAGAAAAATATAT
ATTTTGAAGATGGAACAGTACAACTGCAACATTTAAAGGAACATTTGCAGAAGCGACAGCAGAAGCATAACAGATATGCA

GATTTGTTATCAAAAAGAACATGGTAAATACACAGCAGACTTGGAAAGATGGTGGATACACTATCAACATTAGATTTGCTGG
 AGAGCTCGCTGACAACAAATTCACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTTACATTTACCTAACTTAACTGAAG
 AACAAACGTAACGGCTTCATCCAAAGCCTTAAAGACGATCCTTCAGTGAGCAAAGAAATTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTA
 AACGATGCTCAAGCACCAAAAGAGCTCACTTACAAATTAATCCTTAATGGTAAAAACATTGAAAGGCGAAAACACTACTGA
 AGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACG
 ACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAA

3、代表序列 B5-A-B2-G1-B1 (SEQ ID NO:17):

AAGAAAGTTGACGAAAAACCAGAAGAAAAAGAACAAGTAACAATTAAGAAAAATATATATTTTGAAGATGGAACAGTACA
 AACTGCAACATTTAAAGGAACATTTGCAGAAGCGACAGCAGAAGCATACAGATATGCAGATTTGTTATCAAAAAGAACATG
 GTAAATACACAGCAGACTTGGAAAGATGGTGGATACACTATCAACATTAGATTTGCTGGAGAGCTCGCTGACAACAATTTTC
 AACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATCTTGAACATGCCTAACTTGAACGAAGAACAACGCAATGGTTTCATCCA
 AAGCTTAAAAAGATGACCCAAGTCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGCTAAAAAGTTAAATGAATCTCAAGCACCGAAAG
 AGCTCAAAGAAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTTAATCTATGCAGATGGAAAAACA
 CAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCAGATGCATTAAAGAAGGACAA
 TGGAGAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCACTTACAAATTA
 TCCTTAATGGTAAAAACATTGAAAGGCGAAAACACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAA
 TACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAAGAGCTCAA
 AGAAGAAACACCAGAAACACCAGAAACTGATTCAGAAGAAGAAGTAACAATCAAAGCTAACCTAATCTTTGCAAATGGAA
 GCACACAAACTGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAAAAGCAACATCAGAAGCTTATGCGTATGCAGATACTTTGAAGAAA
 GACAATGGAGAATATACTGTAGATGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGA

4、代表序列 B3-D-B3 (SEQ ID NO:19):

AAAGAAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAAC
 AGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCTGACTTATTAGCAAAAAGAAAATGGTA
 AATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGATGCGCAACAAAAT
 AACTTCAACAAAAGATCAACAAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCAACGCAATGGTTT
 CATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAACGAATCTCAAGCAC
 CGAAAGAGCTCAAAGAAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTTAATCTATGCAGATGGA
 AAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCTGACTTATTAGCAAA
 AGAAAATGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGA

5、代表序列 B3-D-B3-D-B3 (SEQ ID NO:21):

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAAC
 AGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCTGACTTATTAGCAAAAGAAAATGGTA
 AATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGATGCGCAACAAAAT
 AACTTCAACAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCAACGCAATGGTTT
 CATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAATTAACGAATCTCAAGCAC
 CGAAAGAGCTCAAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGA
 AAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCTGACTTATTAGCAA
 AGAAAATGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGAT
 CGCAACAAAATAACTTCAACAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCAA
 CGCAATGGTTTCATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAATTAACGA
 ATCTCAAGCACCGAAAGAGCTCAAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTAATCT
 ATGCAGATGGAAAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCTGAC
 TTATTAGCAAAAGAAAATGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGA

6、代表序列 B2-G2-A-B3-D-G1 (SEQ ID NO:23):

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAAC
 AGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCAGATGCATTAAGAAGGACAATGGAG
 AATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCACTTACAACTTGTTATT
 AATGGTAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTAAAGCAGTAGACGCAGAACTGCAGAAAAAGCCTTCAAACAATACGC
 TAACGACAACGCTGTTGATGGTGTGGACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTACGGTAACTGAAGAGCTCGCTGACA
 ACAATTTCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATCTTGAACATGCCTAACTTGAACGAAGAACAACGCAATGGT
 TTCATCCAAAGCTTAAAGATGACCCAAGTCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGCTAAAAAGTTAAATGAATCTCAAGC
 ACCGAAAGAGCTCAAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAGAAGAAGTTACTATTAAGCAAACCTAATCTATGCAGATG
 GAAAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCTGACTTATTAGCA
 AAAGAAAATGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGA
 TCGCAACAAAATAACTTCAACAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGC
 AACGCAATGGTTTCATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAATTAAC
 GAATCTCAAGCACCGAAAGAGCTCACTTACAAATTAATCCTTAATGGTAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTGAAGC
 GTTGTGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACG
 ATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAA

7、代表序列 B1-G1-B3-G1 (SEQ ID NO:25):

AAAGAAGAAACACCAGAAACACCAGAACTGATTGAGAAGAAGAAGTAACAATCAAAGCTAACCTAATCTTTGCAAATGG
 AAGCACACAACTGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAAAAGCAACATCAGAAGCTTATGCGTATGCAGATACTTTGAAGA
 AAGACAATGGAGAATATACTGTAGATGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTTAAATTTGCTGGAGAGCTCACTTAC
 AAATTAATCCTTAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTT
 CAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAAG
 AGCTCAAAGAAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGTACTATTTAAAGCAAACCTTAATCTATGCAGATGGAAAAACA
 CAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATAACAGATATGCTGACTTATTAGCAAAAAGAAAA
 TGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTTAAATTTGCTGGAGAGCTCACTTACAAATTA
 TCCTTAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAA
 TACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAA

8、代表序列 B2-D-B3-D-B1 (SEQ ID NO:27):

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGTACTATTTAAAGCAAACCTTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAAC
 AGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATAACAGATATGCAGATGCATTAAGAAGGACAATGGAG
 AATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTTAAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGATGCGCAACAAAAT
 AACTTCAACAAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCAACGCAATGGTTT
 CATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAACGAATCTCAAGCAC
 CGAAAGAGCTCAAAGAAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGTACTATTTAAAGCAAACCTTAATCTATGCAGATGGA
 AAAACACAAACAGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATAACAGATATGCTGACTTATTAGCAAA
 AGAAAAATGGTAAATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTTAAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGATG
 CGCAACAAAATAACTTCAACAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTTGAACATGCCTAACTTAAACGAAGCGCAA
 CGCAATGGTTTCATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAACGA
 ATCTCAAGCACCGAAAGAGCTCAAAGAAGAAAACACCAGAAACACCAGAACTGATTCAGAAGAAGAAGTAACAATCAAAG
 CTAACCTAATCTTTGCAAATGGAAGCACACAACTGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAAAAGCAACATCAGAAGCTTAT
 GCGTATGCAGATACTTTGAAGAAAGACAATGGAGAATATACTGTAGATGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTTAA
 ATTTGCTGGA

9、代表序列 B2-C-B4-E-G1 (SEQ ID NO:29):

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAAAGAAGTACTATTTAAAGCAAACCTTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAAC
 AGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATAACAGATATGCAGATGCATTAAGAAGGACAATGGAG
 AATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTTAAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGACAACAAATTC AAC
 AAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTTACATTTACCTAACTTAACTGAAGAACAACGTAACGGCTTCATCAAAG

CCTTAAAGACGATCCTTCAGTGAGCAAAGAAATTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAACGATGCTCAAGCACCAAAGAGC
 TCAAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAGAAGAAGTACTATTTAAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAACTCAA
 ACAGCAGAGTTCAAAGGAACATTTGCAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATACGCTGACTTATTAGCAAAAAGAAATGG
 TAAATATACAGCAGACTTAGAAGATGGTGGATACACTATTAATATTAGATTTGCAGGTGAGCTCGCTCAACAAAATGCTT
 TTTATCAAGTCTTAAATATGCCTAACTTAAATGCTGATCAACGCAATGGTTTTATCCAAAGCCTTAAAGATGATCCAAGC
 CAAAGTGCTAACGTTTTAGGTGAAGCTAAAAGATTAACGAATTTCAAGCACCGAAAGAGCTCACTTACAAATTAATCCT
 TAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATACG
 CTAACGACAACGGTGTGACGGTGAATGGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAA

10、代表序列 B2-C-G2-B1-D-G1 (SEQ ID NO:31):

AAAGAAAAACACCAGAAGAACCAAAGAAGAAGTACTATTTAAAGCAAACCTAATCTATGCAGATGGAAAAACACAAAC
 AGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAGAAGCAACAGCAGAAGCATACAGATATGCAGATGCATTAAGAAGGACAATGGAG
 AATATACAGTAGACGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAAATTTGCTGGAGAGCTCGCTGACAACAAATTC AAC
 AAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTTACATTTACCTAACTTAACTGAAGAACAACGTAACGGCTTCATCCAAAG
 CCTTAAAGACGATCCTTCAGTGAGCAAAGAAATTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAACGATGCTCAAGCACCAAAGAGC
 TCACTTACAACTTGTTATTAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAACAACACTACTAAAGCAGTAGACGCAGAAACTGCAGAA
 AAAGCCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGCTGTTGATGGTGTGGACTTATGATGATGCGACTAAGACCTTTACGGT
 AACTGAAGAGCTCAAAGAAGAAACACCAGAAACACCAGAACTGATTCAGAAGAAGAAGTAACAATCAAAGCTAACCTAA
 TCTTTGCAAAATGGAAGCACACAAACTGCAGAATTCAAAGGAACATTTGAAAAAGCAACATCAGAAGCTTATGCGTATGCA
 GATACTTTGAAGAAAGACAATGGAGAATATACTGTAGATGTTGCAGATAAAGGTTATACTTTAAATATTAAATTTGCTGG
 AGAGCTCGCTGATGCGCAACAAAATAACTTCAACAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATTTGAACATGCCTAACT
 TAAACGAAGCGCAACGCAATGGTTTCATTCAAAGTCTTAAAGACGATCCAAGCCAAAGCACTAACGTTTTAGGTGAAGCT
 AAAAAATTAACGAATCTCAAGCACCGAAAGAGCTCACTTACAAATTAATCCTTAATGGTAAAACATTGAAAGGCGAAAC
 AACTACTGAAGCTGTTGATGCTGCTACTGCAGAAAAAGTCTTCAAACAATACGCTAACGACAACGGTGTGACGGTGAAT
 GGACTTACGACGATGCGACTAAGACCTTTACAGTTACTGAA

代表序列的氨基酸序列 (氨基酸单字母表示) 如下:

1、代表序列 B3-G1-B2-G2-B5 (SEQ ID NO:14):

KEKTPPEPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENKYTVDVADKGYTLNIKFAGELTYKLIL
 NGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKFTVTEELKEKTPPEPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAE
 FKGTFFEEATAEAYRYADALKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYAND

NAVDGVWVWYDDATKTFTVTEELKKVDEKPEEKEQVTIKENIYFEDGTVQTATFKGTFAEATAEAYRYADLLSKEHGKYTA
DLEDGGYTINIRFAG

2、代表序列 B2-D-G1-B5-C-G1 (SEQ ID NO:16):

KEKTPEEPKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADALKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQN
NFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKELTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAA
TAEKVFQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEELKKVDEKPEEKEQVTIKENIYFEDGTVQTATFKGTFAEATAEAYRYA
DLLSKEHGKYTADLEDGGYTINIRFAGELADNKNFKEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKL
NDAQAPKELTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTE

3、代表序列 B5-A-B2-G1-B1 (SEQ ID NO:18):

KKVDEKPEEKEQVTIKENIYFEDGTVQTATFKGTFAEATAEAYRYADLLSKEHGKYTADLEDGGYTINIRFAGELADNNF
NKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKELKEKTPEEPKEEVTIKANLIYADGKT
QTAEFKGTFFEEATAEAYRYADALKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFQ
YANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEELKEETPETPETDSEEEVTIKANLIFANGSTQTAEFKGTFEKATSEAYAYADTLKK
DNGEYTVDVADKGYTLNIKFAG

4、代表序列 B3-D-B3 (SEQ ID NO:20):

KEKTPEEPKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQN
NFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKELKEKTPEEPKEEVTIKANLIYADG
KTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAG

5、代表序列 B3-D-B3-D-B3 (SEQ ID NO:22):

KEKTPEEPKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQN
NFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKELKEKTPEEPKEEVTIKANLIYADG
KTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQN
NFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKELKEKTPEEPKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYAD
LLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAG

6、代表序列 B2-G2-A-B3-D-G1 (SEQ ID NO:24):

KEKTPEEPKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADALKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELTYKLVI
NGKTLKGETTTKAVDAETAEKAFKQYANDNAVDGVWVWYDDATKTFTVTEELADNNFNKEQQNAFYEILNMPNLNEEQRNG
FIQSLKDDPSQSANLLSEAKKLNESQAPKELKEKTPEEPKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLA
KENGKYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQN
NFNKDQQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLN
ESQAPKELTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTE

7、代表序列 B1-G1-B3-G1 (SEQ ID NO:26):

KEETPETPETDSEEEVTIKANLIFANGSTQTAEFKGTFEKATSEAYAYADTLKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELTY
 KLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTEELKEKTPEEPKKEEVTIKANLIYADGKT
 QTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAGELTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQ
 YANDNGVDGEWYDDATKTFTVTE

8、代表序列 B2-D-B3-D-B1 (SEQ ID NO:28):

KEKTPEEPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADALKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQN
 NFNKDDQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKELKEKTPEEPKKEEVTIKANLIYADG
 KTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADLLAKENGKYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQNFFNKDDQSAFYEILNMPNLNEAQ
 RNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPKELKEETPETPETDSEEEVTIKANLIFANGSTQTAEFKGTFEKATSEAY
 AYADTLKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAG

9、代表序列 B2-C-B4-E-G1 (SEQ ID NO:30):

KEKTPEEPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADALKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELADNKNF
 KEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAAQAPKELKEKTPEEPKKEEVTIKANLIYADGKTQ
 TAEFKGTFAEATAEAYRYADLLAKENGKYTADLEDGGYTINIRFAGELAQQNAFYQVLNMPNLNADQRNGFIQSLKDDPS
 QSANVLGEAKRLNEFQAPKELTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTE

10、代表序列 B2-C-G2-B1-D-G1 (SEQ ID NO:32):

KEKTPEEPKKEEVTIKANLIYADGKTQTAEFKGTFFEEATAEAYRYADALKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELADNKNF
 KEQQNAFYEILHLPNLTEEQRNGFIQSLKDDPSVSKEILAEAKKLNDAAQAPKELTYKLVINGKTLKGETTTKAVDAETA
 KAFKQYANDNAVGVWYDDATKTFTVTEELKEETPETPETDSEEEVTIKANLIFANGSTQTAEFKGTFEKATSEAYAYA
 DTLKKDNGEYTVDVADKGYTLNIKFAGELADAQQNFFNKDDQSAFYEILNMPNLNEAQRNGFIQSLKDDPSQSTNVLGEA
 KKLNESQAPKELTYKLILNGKTLKGETTTEAVDAATAEKVFKQYANDNGVDGEWYDDATKTFTVTE

实施例 5、展示 HAIBM 的重组噬菌体的抗体结合活性测定

为了测定重组噬菌体所展示的 HAIBM 与抗体的结合能力，将阳性单克隆重组噬菌粒转化 TG1，制成单克隆 HAIBM 重组噬菌体（噬菌体制备方法同前），将各单克隆重组噬菌体和 M13K07 辅助噬菌体用 2×YT 培养基调整至相同滴度 (1.0×10^{12} TU/ml)，分别取各单克隆噬菌体 100 μ l 加入人 Ig 抗体包板的反应孔中，37℃ 孵育 3 小时后洗涤 50 次。将反应后的样品分成两组，第一组在重组噬菌体和 M13K07 与抗体结合后的样孔中每孔加入 100 μ l 大肠杆菌 TG1

($OD_{600}=0.2$), 37°C 孵育 1 小时后, 取 $1\mu\text{l}$ 单克隆重组噬菌体感染菌液涂布于氨苄青霉素抗性平皿上计数, 对照的 M13K07 辅助噬菌体感染菌液涂布于氨苄青霉素抗性平皿上计数, 用于检测被人 Ig 特异吸附的重组噬菌体的数量, 检测结果见表 3。第二组在重组噬菌体和 M13K07 与抗体结合后的样孔中每孔加入噬菌体抗体 HRP/Anti-M13 conjugate (Amersham pharmacia biotech 公司, 工作浓度为 1: 5000 稀释), 37°C 孵育 45 分钟后加入 TMB 显色, 测 $OD_{450\text{nm}}$ 值, 用于检测被人 IgG 特异吸附的重组噬菌体的数量, 检测结果见表 3。

表 3 各 HAIBM 单克隆噬菌体的人 IgG 抗体结合试验

	单克隆噬菌体中的分子组成	大肠杆菌 TG1 感染菌落数	HRP 抗噬菌体 $OD_{450\text{NM}}$ 检
1	SPA	415	1.538
2	LB3-G1-LB2-G2-LB5	>500	2.251
3	LB1-A-LB3	328	1.247
4	LB1-A-LB4-B-G1	453	1.626
5	LB2-D-G1-LB5-C-G1	>500	2.119
6	LB3-B-LB3-A	272	1.372
7	LB5-A-LB2-G1-LB1	>500	1.931
8	LB3-D-LB3	>500	2.043
9	LB3-D-LB3-D-LB3	>500	2.251
10	LB2-G2-A-LB3-D-G1	>500	2.017
11	LB1-G1-LB3-G1	>500	1.943
12	LB4-G2-LB2	398	1.485
13	LB2-D-LB3-D-LB1	>500	2.196
14	LB2-C-LB4-E-G1	>500	2.005
15	LB2-C-G2-LB1-D-G1	>500	2.113
16	LB1-C-LB1	413	1.434
17	M13K07	56	0.233

注: 各噬菌体滴度均为 1.0×10^{12} TU/ml

从表 3 的大肠杆菌 TG1 感染菌落数测定结果可见, 展示有单克隆 HAIBM 分子的噬菌体能被人 IgG 结合固定, 并在投入噬菌体滴度在 1.0×10^{12} 时存在高低不同的 IgG 结合活性。而对照野生型噬菌体 M13K07 滴度在 1.0×10^{12} 时检测不到与人 IgG 结合的噬菌体。酶联检测显色的检测结果与上述大肠杆菌 TG1 感染菌落数测定结果基本一致。该结果说明融合在 PIII 蛋白 N 端的 HAIBM 分子具有 Ig 结合活性, 展示具有序列 B3-G1-B2-G2-B5, B2-D-G1-B5-C-G1, B5-A-B2-G1-B1, B3-D-B3, B3-D-B3-D-B3, B2-G2-A-B3-D-G1, B1-G1-B3-G1, B2-D-B3-D-B1, B2-C-B4-E-G1, B2-C-G2-B1-D-G1 阳性噬菌体与人 Ig 结合活性都高于展示葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 的噬菌体。

实施例 6 高亲和力 Ig 结合分子(HAIBMs)的功能

设计引物, 上游引物引入 Nco I 位点, 下游引物引入 Sal I 位点, PCR 扩增阳性克隆序列, 酶切回收后将 HAIBMs 克隆于 pET32a 载体中的 Nco I 和 Sal I 位点中, IPTG 诱导表达 HAIBMs 蛋白, Ni-NTA 柱纯化获得纯化蛋白 HAIBMs, ELISA 检测纯化蛋白 HAIBMs 的活性, 用碳酸盐缓冲液包被各种纯化 HAIBM 蛋白 (1:100) 包被于排条板上, 设阳性对照 SPA (1:100), 阴性对照 LT (1:100) 37°C 2h 后 4°C 过夜, 加入不同稀释度的浓度为 1mg/ml 的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的人免疫球蛋白分子 (HRP-人 Ig), 37°C 孵育 45 分钟, PBS 洗液洗涤 4 次, OPD 显色, 酶联检测仪读取 492nm 处 OD 值。由表 4 的结果显示各种纯化 HAIBM 蛋白与人 Ig 有特异的结合活性, 其中编码序列具有 B3-G1-B2-G2-B5, B2-D-G1-B5-C-G1, B5-A-B2-G1-B1, B3-D-B3, B3-D-B3-D-B3, B2-G2-A-B3-D-G1, B1-G1-B3-G1, B2-D-B3-D-B1, B2-C-B4-E-G1, B2-C-G2-B1-D-G1 连接方式的融合基因编码的分子结合活性高于 SPA。

表 4 HAIBM 纯化蛋白与人 Ig 结合活性检测

纯化 HAIBM	HRP-人 Ig 稀释度 (1MG/ML)							
	1:100	1:200	1:400	1:800	1:160	1:320	1:640	1:128
					0	0	0	00
阴性对照 LT	0.289	0.146	0.076	0.056	0.027	0.029	0.010	0.001
阳性对照 SPA	2.073	2.055	1.429	0.820	0.430	0.224	0.172	0.090
LB3-G1-LB2-G2-LB5	2.255	2.117	1.956	1.862	1.342	0.955	0.515	0.323
LB1-A-LB3	1.873	1.704	1.331	0.680	0.318	0.180	0.092	0.072
LB1-A-LB4-B-G1	1.953	1.937	1.618	1.425	0.820	0.525	0.380	0.257
LB2-D-G1-LB5-C-G1	2.110	1.998	1.730	1.632	0.926	0.530	0.316	0.240
LB3-B-LB3-A	1.924	1.757	1.424	0.756	0.320	0.224	0.136	0.009
LB5-A-LB2-G1-LB1	2.123	1.996	1.755	1.628	0.910	0.572	0.328	0.225
LB3-D-LB3	2.080	2.069	1.613	1.580	0.877	0.448	0.346	0.112
LB3-D-LB3-D-LB3	2.366	2.359	2.018	1.912	1.765	1.230	0.856	0.512
LB2-G2-A-LB3-D-G1	2.271	2.150	1.978	1.794	1.216	0.874	0.530	0.251
LB1-G1-LB3-G1	2.045	1.923	1.767	1.673	1.065	0.654	0.320	0.203
LB4-G2-LB2	2.083	2.020	1.413	0.806	0.410	0.212	0.214	0.088
							3	
LB2-D-LB3-D-LB1	2.296	2.175	2.010	1.991	1.659	1.180	0.784	0.464
LB2-C-LB4-E-G1	2.225	2.151	1.910	1.712	1.218	0.717	0.528	0.336

LB2-C-G2-LB1-D-G 1	2.013	2.007	1.873	1.716	1.115	0.719	0.551	0.313
LB1-C-LB1	1.930	2.073	1.660	0.911	0.525	0.340	0.275	0.118

实施例7 高亲和力 Ig 结合分子(HAIBMs)的应用

将 HCV 抗原包被于酶标排条板上, 洗涤后, 加入 10 μ l 丙肝病人的血清和 90 μ l PBS, 37 $^{\circ}$ C 1h 作用后用洗液 (PBS+0.05%Tween20) 洗 5 遍, 去除未结合的抗体, 加入 100 μ l 滴度为 1.0×10^{10} TU/ml 的各种 HAIBM 单克隆重组噬菌体 37 $^{\circ}$ C 1h, 设阴性对照 LT/Phage, 阳性对照 PA/phage。再用洗液 (PBS+0.05%Tween20) 洗 5 遍, 去除重组噬菌体。实验分成两组检测酶标排条板上所结合的重组噬菌体, 第一组每孔加入 100 μ l 的大肠杆菌 TG1, 感染 1h 后, 取单克隆重组噬菌体感染菌液 100 μ l 涂布于氨苄青霉素抗性平皿上计数; 第二组每孔加 100 μ l 噬菌体抗体 HRP/Anti-M13 conjugate, 37 $^{\circ}$ C 反应 1h 后 TMB 显色, 450nm 处 OD 值检测。HCV 抗原包被浓度为 (2 μ g/ml), 结果见表 5, 表 6。

表 5 应用 HAIBM 单克隆噬菌体检测抗-HCV 试验 (感染菌落数计数法)

单克隆 HAIBM	大肠杆菌 TG1 感染菌落数							
	HCV 阳性血清样品				HCV 阴性血清样品			
	1#	2#	3#	4#	1#	2#	3#	4#
1 阴性对照 LT	5	2	0	4	3	3	2	0
2 阳性对照 SPA	79	86	53	92	5	3	3	0
3 LB3-G1-LB2-G2-LB5	126	113	111	127	2	0	5	1
4 LB1-A-LB3	39	78	50	64	11	8	5	0
5 LB1-A-LB4-B-G1	93	49	39	65	3	2	0	0
6 LB2-D-G1-LB5-C-G1	102	117	97	72	4	5	1	0
7 LB3-B-LB3-A	74	98	50	65	0	13	0	18
8 LB5-A-LB2-G1-LB1	93	76	134	128	9	6	14	3
9 LB3-D-LB3	97	94	114	98	3	2	0	1
10 LB3-D-LB3-D-LB3	171	144	128	167	1	2	3	0
11 LB2-G2-A-LB3-D-G1	123	128	160	141	1	0	3	0
12 LB1-G1-LB3-G1	111	131	125	96	12	4	10	9
13 LB4-G2-LB2	64	32	56	73	3	2	0	0
14 LB2-D-LB3-D-LB1	136	167	118	121	2	1	3	1
15 LB2-C-LB4-E-G1	118	142	131	116	17	8	0	7
16 LB2-C-G2-LB1-D-G1	117	124	119	158	3	0	5	1
17 LB1-C-LB1	76	110	63	94	2	0	6	0

注：各噬菌体滴度均为 1.0×10^{10} TU/ml

表 6 应用 HAIBM 单克隆噬菌体检测抗-HCV 试验（酶联检测显色法）

单克隆 HAIBM	HCV 阳性血清样品 (OD _{450nm})				HCV 阴性血清样品 (OD _{450nm})			
	1#	2#	3#	4#	1#	2#	3#	4#
1 阴性对照 LT	0.069	0.046	0.076	0.056	0.037	0.044	0.010	0.053
2 阳性对照 SPA	1.133	1.218	0.891	1.096	0.022	0.036	0.045	0.039
3 <u>LB3-G1-LB2-G2-LB5</u>	1.855	1.317	1.356	1.662	0.042	0.036	0.055	0.051
4 <u>LB1-A-LB3</u>	0.873	1.104	0.710	1.280	0.038	0.032	0.022	0.035
5 <u>LB1-A-LB4-B-G1</u>	1.223	0.837	1.018	1.125	0.023	0.025	0.040	0.011
6 <u>LB2-D-G1-LB5-C-G1</u>	1.710	1.698	1.430	1.230	0.031	0.043	0.036	0.031
7 <u>LB3-B-LB3-A</u>	0.924	0.457	0.524	0.756	0.024	0.022	0.036	0.019
8 <u>LB5-A-LB2-G1-LB1</u>	1.523	1.185	1.792	1.328	0.033	0.072	0.058	0.046
9 <u>LB3-D-LB3</u>	1.673	1.359	1.313	1.583	0.073	0.064	0.051	0.074
10 <u>LB3-D-LB3-D-LB3</u>	1.921	1.759	1.718	1.812	0.065	0.047	0.073	0.047
11 <u>LB2-G2-A-LB3-D-G1</u>	1.671	1.550	1.478	1.794	0.056	0.030	0.037	0.040
12 <u>LB1-G1-LB3-G1</u>	1.545	1.633	1.567	1.373	0.045	0.024	0.022	0.054
13 <u>LB4-G2-LB2</u>	1.083	0.420	0.913	1.006	0.015	0.022	0.043	0.038
14 <u>LB2-D-LB3-D-LB1</u>	1.796	1.615	1.578	1.761	0.059	0.014	0.065	0.074
15 <u>LB2-C-LB4-E-G1</u>	1.625	1.851	1.510	1.712	0.118	0.071	0.062	0.056
16 <u>LB2-C-G2-LB1-D-G1</u>	1.813	1.601	1.573	1.816	0.115	0.079	0.062	0.073
17 <u>LB1-C-LB1</u>	1.030	1.073	0.960	1.011	0.025	0.040	0.075	0.068

注：各噬菌体滴度均为 1.0×10^{12} TU/ml

由表 5 和表 6 可见，展示有单克隆 HAIBM 的噬菌体能与抗-HCV 阳性抗体反应，并在投入噬菌体滴度在 1.0×10^{12} 时存在高低不同的抗体结合活性。而对照 LT 滴度在 1.0×10^{12} 时基本无抗体结合活性。酶联检测显色的检测结果与上述大肠杆菌 TG1 感染菌落数测定结果基本一致。该结果证实了 HAIBMs 分子具有很好的人 Ig 结合功能，并具有可应用于酶联免疫吸附试验（ELISA 法）、免疫层析检测、免疫组化等免疫学诊断及抗体的检测和纯化中的用途。

序列表

<110> 上海润龙生物科技有限公司
 <120> 一种高亲和力免疫球蛋白结合分子及其制备方法
 <130> 040183
 <160> 32
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 228
 <212> DNA
 <213> *Peptostreptococcus magnus*
 <400> 1
 aaagaagaaa caccagaaac accagaaact gattcagaag aagaagtaac aatcaaagct 60
 aacctaatct ttgcaaatgg aagcacacaa actgcagaat tcaaaggaac atttgaaaaa 120
 gcaacatcag aagcittatgc gtatgcagat actttgaaga aagacaatgg agaataact 180
 gtagatgttg cagataaagg ttatacttta aatattaat ttgctgga 228

<210> 2
 <211> 216
 <212> DNA
 <213> *Peptostreptococcus magnus*
 <400> 2
 aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat 60
 gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa 120
 gcatacagat atgcagatgc attaaagaag gacaatggag aatatacagt agacgttgca 180
 gataaaggtt atactttaa tattaattt gctgga 216

<210> 3
 <211> 216
 <212> DNA

<213> Peptostreptococcus magnus

<400> 3

```
aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat    60
gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa    120
gcatacagat atgctgactt attagcaaaa gaaaatggta aatatacagt agacgttgca    180
gataaaggtt atactttaaa tattaatitt gctgga                                216
```

<210> 4

<211> 216

<212> DNA

<213> Peptostreptococcus magnus

<400> 4

```
aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat    60
gcagatggaa aaactcaaac agcagagttc aaaggaacat ttgcagaagc aacagcagaa    120
gcatacagat acgctgactt attagcaaaa gaaaatggta aatatacagc agacttagaa    180
gatggtggat aactattaa tattagattt gcaggt                                216
```

<210> 5

<211> 219

<212> DNA

<213> Peptostreptococcus magnus

<400> 5

```
aagaaagttg acgaaaaacc agaagaaaaa gaacaagtaa caattaaaga aaatatatat    60
tttgaagatg gaacagtaca aactgcaaca tttaaaggaa catttgcaga agcgacagca    120
gaagcataka gatatgcaga ttgttatca aaagaacatg gtaaatacac agcagacttg    180
gaagatggtg gatacactat caacattaga tttgctgga                                219
```

<210> 6

<211> 174

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus	
<400> 6	
gctgacaaca atttcaaca agaacaaca aatgctttct atgaaatctt gaacatgcct	60
aacttgaacg aagaacaacg caatggtttc atccaaagct taaaagatga cccaagtcaa	120
agtgctaacc tattgtcaga agctaaaaag ttaaatgaat ctcaagcacc gaaa	174
<210> 7	
<211> 174	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 7	
gcggataaca aattcaaca agaacaaca aatgctttct atgaaatctt acatttacct	60
aacttaaacg aagaacaacg caatggtttc atccaaagct taaaagatga cccaagccaa	120
agcgctaacc ttttagcaga agctaaaaag ctaaagatg cacaagcacc aaaa	174
<210> 8	
<211> 174	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 8	
gctgacaaca aattcaaca agaacaaca aatgctttct atgaaatctt acatttacct	60
aacttaactg aagaacaacg taacggcttc atccaaagcc ttaaagacga tccttcagtg	120
agcaaagaaa ttttagcaga agctaaaaag ctaaacgatg ctcaagcacc aaaa	174
<210> 9	
<211> 183	
<212> DNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 9	
gctgatgcgc aacaaaataa cttcaacaaa gatcaacaaa gcgccttcta tgaattttg	60

aacatgccta acttaaacga agcgcaacgc aatggtttca ttcaaagtct taaagacgat 120
 ccaagccaaa gcactaacgt tttaggtgaa gctaaaaaat taaacgaatc tcaagcaccg 180
 aaa 183

<210> 10

<211> 153

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 10

gctcaacaaa atgcttttta tcaagtctta aatatgccta acttaaagtc tgatcaacgc 60
 aatggtttta tccaaagcct taaagatgat ccaagccaaa gtgctaacgt tttaggtgaa 120
 gctaaaagat taaacgaatt tcaagcaccg aaa 153

<210> 11

<211> 165

<212> DNA

<213> Streptococcus sp.

<400> 11

acttacaat taatccttaa tggtaaaaca ttgaaaggcg aaacaactac tgaagctggt 60
 gatgctgcta ctgcagaaaa agtcttcaaa caatacgcta acgacaacgg tgttgacggt 120
 gaatggactt acgacgatgc gactaagacc tttacagtta ctgaa 165

<210> 12

<211> 165

<212> DNA

<213> Streptococcus sp.

<400> 12

acttacaac ttgttattaa tggtaaaaca ttgaaaggcg aaacaactac taaagcagta 60
 gacgcagaaa ctgcagaaaa agccttcaaa caatacgcta acgacaacgc tgttgatggt 120

gtttggactt atgatgatgc gactaagacc tttacggtaa ctgaa 165

<210> 13

<211> 1005

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 其编码蛋白能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合基因

<400> 13

aaagaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat 60
gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa 120
gcatacagat atgctgactt attagcaaaa gaaaatggta aatatacagt agacgttgca 180
gataaaggtt atactttaaa tattaattt gctggagagc tcacttacia attaateett 240
aatggtaaaa cattgaaagg cgaacaact actgaagctg ttgatgctgc tactgcagaa 300
aaagtcttca aacaatacgc taacgacaac ggtggtgacg gtgaatggac ttacgacgat 360
gcgactaaga cttttacagt tactgaagag ctcaaagaaa aaacaccaga agaacaaaa 420
gaagaagtta ctattaaagc aaacttaatc tatgcagatg gaaaaacaca aacagcagaa 480
ttcaaaggaa catttgaaga agcaacagca gaagcataca gatatgcaga tgcattaaag 540
aaggacaatg gagaatatac agtagacgtt gcagataaag gttatacttt aatattaaa 600
tttgctggag agctcactta caaacttggtt attaatggta aacattgaa aggcgaaaca 660
actactaaag cagtagacgc agaaactgca gaaaaagcct tcaaacaata cgctaacgac 720
aacgctgttg atggtgtttg gacttatgat gatgcgacta agacctttac ggtaactgaa 780
gagctcaaga aagttgacga aaaaccagaa gaaaaagaac aagtaacaat taaagaaaat 840
atatattttg aagatggaac agtacaact gcaacattta aaggaacatt tgcagaagcg 900
acagcagaag catacagata tgcagatttg ttatcaaaag aacatggtaa atacacagca 960
gacttgggaag atggtggata cactatcaac attagatttg ctgga 1005

<210> 14

<211> 335

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 14

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

	180	185	190
Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Glu Leu Thr Tyr Lys			
	195	200	205
Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala			
	210	215	220
Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp			
225	230	235	240
Asn Ala Val Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe			
	245	250	255
Thr Val Thr Glu Glu Leu Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu Glu Lys			
	260	265	270
Glu Gln Val Thr Ile Lys Glu Asn Ile Tyr Phe Glu Asp Gly Thr Val			
	275	280	285
Gln Thr Ala Thr Phe Lys Gly Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala Glu Ala			
	290	295	300
Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu Leu Ser Lys Glu His Gly Lys Tyr Thr Ala			
305	310	315	320
Asp Leu Glu Asp Gly Gly Tyr Thr Ile Asn Ile Arg Phe Ala Gly			
	325	330	335

<210> 15

<211> 1152

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 其编码蛋白是能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合基因

<400> 15

```

aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat    60
gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa    120

```

```

gcatacagat atgcagatgc attaaagaag gacaatggag aatatacagt agacgttgca 180
gataaagggtt atactttaaa tattaaatit gctggagagc tcgctgatgc gcaacaaaat 240
aacttcaaca aagatcaaca aagcgccttc tatgaaatit tgaacatgcc taacttaaac 300
gaagcgcaac gcaatggttt cattcaaagt cttaaagacg atccaagcca aagcactaac 360
gttttaggtg aagctaaaaa attaaacgaa tctcaagcac cgaaagagct cacttacaaa 420
ttaatcctta atggtaaaac attgaaaggc gaaacaacta ctgaagctgt tgatgctgct 480
actgcagaaa aagtcttcaa acaatacgtc aacgacaacg gtgttgacgg tgaatggact 540
tacgacgatg cgactaagac ctttacagtt actgaagagc tcaagaaagt tgacgaaaaa 600
ccagaagaaa aagaacaagt aacaattaa gaaaatatat attttgaaga tggaacagta 660
caaaactgcaa catttaaaagg aacatttgca gaagcgacag cagaagcata cagatatgca 720
gatttgttat caaaagaaca tggtaaatac acagcagact tggaagatgg tggatacact 780
atcaacatta gatttgctgg agagctcgtc gacaacaaat tcaacaaaga acaacaaaat 840
gctttctatg aaattttaca ttacctaac ttaactgaag aacaacgtaa cggcttcac 900
caaagcctta aagacgatcc ttcagtgagc aaagaaatit tagcagaagc taaaaagcta 960
aacgatgctc aagcaccaaa agagctcact tacaattaa tccttaatgg taaaacattg 1020
aaaggcgaaa caactactga agctgttgat gctgctactg cagaaaaagt cttcaaaaa 1080
tacgctaacg acaacgggtg tgacggtgaa tggacttacg acgatgacgac taagacctit 1140
acagttactg aa 1152

```

<210> 16

<211> 384

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 16

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala

1

5

10

15

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
 20 25 30
 Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
 35 40 45
 Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
 50 55 60
 Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Glu Leu Ala Asp Ala Gln Gln Asn
 65 70 75 80
 Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met
 85 90 95
 Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys
 100 105 110
 Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu
 115 120 125
 Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Glu Leu Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn
 130 135 140
 Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala
 145 150 155 160
 Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp
 165 170 175
 Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
 180 185 190
 Glu Leu Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu Glu Lys Glu Gln Val Thr
 195 200 205
 Ile Lys Glu Asn Ile Tyr Phe Glu Asp Gly Thr Val Gln Thr Ala Thr
 210 215 220
 Phe Lys Gly Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala
 225 230 235 240
 Asp Leu Leu Ser Lys Glu His Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp
 245 250 255


```

caacgcaatg gtttcatcca aagcttaaaa gatgacccaa gtcaaagtgc taacctattg 360
tcagaagcta aaaagttaaa tgaatctcaa gcaccgaaag agctcaaaga aaaaacacca 420
gaagaaccaa aagaagaagt tactattaaa gcaaacttaa tctatgcaga tggaaaaaca 480
caaacagcag aattcaaagg aacatttgaa gaagcaacag cagaagcata cagatatgca 540
gatgcattaa agaaggacaa tggagaatat acagtagacg ttgcagataa aggttatact 600
ttaaataatta aatttgctgg agagctcact tacaaattaa tccttaatgg taaaacattg 660
aaaggcgaaa caactactga agctgttgat gctgctactg cagaaaaagt cttcaaacaa 720
tacgctaacg acaacgggtg tgacggtgaa tggacttacg acgatgcgac taagaccttt 780
acagttactg aagagctcaa agaagaaaca ccagaaacac cagaaactga ttcagaagaa 840
gaagtaacaa tcaaagctaa cctaactttt gcaaatggaa gcacacaaac tgcagaattc 900
aaaggaacat ttgaaaaagc aacatcagaa gcttatgcgt atgcagatac tttgaagaaa 960
gacaatggag aatatactgt agatgttgca gataaagggtt atactttaa tattaattt 1020
gctgga 1026

```

<210> 18

<211> 342

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 18

```

Lys Lys Val Asp Glu Lys Pro Glu Glu Lys Glu Gln Val Thr Ile Lys
1           5           10           15
Glu Asn Ile Tyr Phe Glu Asp Gly Thr Val Gln Thr Ala Thr Phe Lys
           20           25           30
Gly Thr Phe Ala Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu
           35           40           45
Leu Ser Lys Glu His Gly Lys Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly
           50           55           60

```


Glu Lys Ala Thr Ser Glu Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys
 305 310 315 320
 Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu
 325 330 335
 Asn Ile Lys Phe Ala Gly
 340

<210> 19

<211> 627

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 其编码蛋白是能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合基因

<400> 19

```

aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat      60
gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa      120
gcatacagat atgctgactt attagcaaaa gaaaatggta aatatacagt agacgttgca      180
gataaagggtt atactttaa tattaattt gctggagagc tcgctgatgc gcaacaaaat      240
aacttcaaca aagatcaaca aagcgccttc tatgaaattt tgaacatgcc taacttaaac      300
gaagcgcaac gcaatggttt cattcaaagt cttaaagacg atccaagcca aagcactaac      360
gttttaggtg aagctaaaaa attaaacgaa tctcaagcac cgaaagagct caaagaaaaa      420
acaccagaag aacccaaaaga agaagttact attaaagcaa acttaactta tgcagatgga      480
aaaacacaaa cagcagaatt caaaggaaca tttgaagaag caacagcaga agcatacaga      540
tatgctgact tattagcaaa agaaaatggt aaatatacag tagacgttgc agataaaggt      600
tatactttaa atattaaatt tgctgga                                     627

```

<210> 20

<211> 209

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 20

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

Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala

195

200

205

Gly

<210> 21

<211> 1038

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 其编码蛋白是能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合基因

<400> 21

```

aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat    60
gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa    120
gcatacagat atgctgactt attagcaaaa gaaaatggta aatatacagt agacgttgca    180
gataaagggtt atacctttaa tattaaatTT gctggagagc tcgctgatgc gcaacaaaat    240
aacttcaaca aagatcaaca aagcgccttc tatgaaatTT tgaacatgcc taacttaaac    300
gaagcgcac gcaatggTTT cattcaaagt cttaaagacg atccaagcca aagcactaac    360
gttttaggtg aagctaaaaa attaaacgaa tctcaagcac cgaaagagct caaagaaaaa    420
acaccagaag aacaaaaaga agaagttact attaaagcaa acttaactta tgcagatgga    480
aaaacacaaa cagcagaatt caaaggaaca tttgaagaag caacagcaga agcatacaga    540
tatgctgact tattagcaaa agaaaatggT aaatatacag tagacgTTgc agataaaggT    600
tatactttaa atattaaatt tgctggagag ctgctgatg cgcaacaaaa taacttcaac    660
aaagatcaac aaagcgcctt ctatgaaatt ttgaacatgc ctaacttaa cgaagcgcac    720
cgcaatggTT tcattcaaag tcttaaagac gatccaagcc aaagcactaa cgttttaggt    780
gaagctaaaa aattaaacga atctcaagca ccgaaagagc tcaaagaaaa aacaccagaa    840
gaaccaaaaag aagaagttac tattaagca aacttaactt atgcagatgg aaaaacacaa    900
acagcagaat tcaaaggaac atttgaagaa gcaacagcag aagcatacag atatgctgac    960
ttattagcaa aagaaaatgg taaatataca gtagacgTTg cagataaagg ttatacttta   1020

```

aatattaaat ttgctgga

1038

<210> 22

<211> 346

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 22

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

<221> misc_feature

<223> 其编码蛋白是能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合基因

<400> 23

```

aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat    60
gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa    120
gcatacagat atgcagatgc attaaagaag gacaatggag aatatacagt agacgttgca    180
gataaagggtt atactttaaa tattaaattt gctggagagc tcacttaciaa acttggttatt    240
aatggtaaaa cattgaaagg cgaacaact actaaagcag tagacgcaga aactgcagaa    300
aaagccttca aacaatacgc taacgacaac gctgttgatg gtgtttggac ttatgatgat    360
gcgactaaga cttttacggt aactgaagag ctcgctgaca acaatttcaa caaagaacaa    420
caaatgctt tctatgaaat cttgaacatg cctaactga acgaagaaca acgcaatggt    480
ttcatcaaaa gcttaaaaga tgaccaagt caaagtgcta acctattgtc agaagctaaa    540
aagttaaatg aatctcaagc accgaaagag ctcaaagaaa aaacaccaga agaaccacaaa    600
gaagaagtta ctattaaagc aaacttaatc tatgcagatg gaaaaacaca aacagcagaa    660
ttcaaaggaa catttgaaga agcaacagca gaagcataca gatatgctga cttattagca    720
aaagaaaatg gtaaatac agtagacgtt gcagataaag gttatacttt aaatattaaa    780
tttgctggag agctcgtga tgcgcaacaa aataacttca acaaagatca acaaagcgcc    840
ttctatgaaa ttttgaacat gcctaacta aacgaagcgc aacgcaatgg tttcattcaa    900
agtcttaaag acgatccaag ccaaagcact aacgttttag gtgaagctaa aaaattaaac    960
gaatctcaag caccgaaaga gctcacttac aaattaatcc ttaatggtaa aacattgaaa   1020
ggcgaacaaa ctactgaagc tgttgatgct gctactgcag aaaaagtctt caacaatac   1080
gctaacgaca acggtgttga cggatgaatgg acttacgacg atgcgactaa gacctttaca   1140
gttactgaa                                     1149

```

<210> 24

<211> 383

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 24

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


```

aacctaactct ttgcaaatgg aagcacacaa actgcagaat tcaaaggaac atttgaaaaa 120
gcaacatcag aagcttatgc gtatgcagat actttgaaga aagacaatgg agaataact 180
gtagatgttg cagataaagg ttatacttta aatattaaat ttgctggaga gctcacttac 240
aaattaatcc ttaatggtaa aacattgaaa ggcgaaacaa ctactgaagc tgttgatgct 300
gctactgcag aaaaagtctt caacaatac gctaacgaca acggtgttga cggatgaatgg 360
acttacgacg atgcgactaa gacctttaca gttactgaag agctcaaaga aaaaacacca 420
gaagaaccaa aagaagaagt tactattaaa gcaaacttaa tctatgcaga tggaaaaaca 480
caaacagcag aattcaaagg aacatttgaa gaagcaacag cagaagcata cagatatgct 540
gacttattag caaaagaaaa tggtaaatat acagtagacg ttgcagataa aggttatact 600
ttaaataatta aatttctctg agagctcact tacaattaa tccttaatgg taaaacattg 660
aaaggcgaaa caactactga agctgttgat gctgctactg cagaaaaagt cttcaacaa 720
tacgctaacg acaacggtgt tgacggtgaa tggacttacg acgatgacgac taagaccttt 780
acagttactg aa 792

```

<210> 26

<211> 264

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 26

```

Lys Glu Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Thr Asp Ser Glu Glu Glu Val
1           5           10           15
Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly Ser Thr Gln Thr Ala
           20           25           30
Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser Glu Ala Tyr Ala Tyr
           35           40           45
Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala
           50           55           60

```


<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 其编码蛋白是能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合基因

<400> 27

```

aaagaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat      60
gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa      120
gcatacagat atgcagatgc attaaagaag gacaatggag aatatacagt agacgttgca      180
gataaagggtt atactttaa tattaattt gctggagagc tcgctgatgc gcaacaaaat      240
aacttcaaca aagatcaaca aagcgccttc tatgaaattt tgaacatgcc taacttaaac      300
gaagcgcaac gcaatggttt cattcaaagt cttaaagacg atccaagcca aagcactaac      360
gttttaggtg aagctaaaa attaaacgaa tctcaagcac cgaaagagct caaagaaaaa      420
acaccagaag aaccaaaga agaagttact attaaagcaa acttaatcta tgcagatgga      480
aaaacacaaa cagcagaatt caaaggaaca tttgaagaag caacagcaga agcatacaga      540
tatgctgact tattagcaaa agaaaatggt aaatatacag tagacgttgc agataaagggt      600
tatactttaa atattaaatt tgctggagag ctgctgatg cgcaacaaaa taacttcaac      660
aaagatcaac aaagcgcctt ctatgaaatt ttgaacatgc ctaacttaa cgaagcgcaa      720
cgcaatggtt tcattcaaag tcttaaagac gatccaagcc aaagcactaa cgtttttaggt      780
gaagctaaaa aattaaacga atctcaagca ccgaaagagc tcaaagaaga aacaccagaa      840
acaccagaaa ctgattcaga agaagaagta acaatcaaag ctaaccta atctttgcaaat      900
ggaagcacac aaactgcaga attcaaagga acatttgaaa aagcaacatc agaagcttat      960
gcgtatgcag atactttgaa gaaagacaat ggagaatata ctgtagatgt tgcagataaa     1020
ggttatactt taaatattaa atttgctgga                                     1050

```

<210> 28

<211> 350

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 28

```

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

```

Gly Glu Leu Ala Asp Ala Gln Gln Asn Asn Phe Asn Lys Asp Gln Gln
 210 215 220
 Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Ala Gln
 225 230 235 240
 Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr
 245 250 255
 Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys
 260 265 270
 Glu Leu Lys Glu Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Thr Asp Ser Glu Glu
 275 280 285
 Glu Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asn Gly Ser Thr Gln
 290 295 300
 Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Lys Ala Thr Ser Glu Ala Tyr
 305 310 315 320
 Ala Tyr Ala Asp Thr Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp
 325 330 335
 Val Ala Asp Lys Gly Tyr Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly
 340 345 350

<210> 29

<211> 948

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 其编码蛋白是能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合基因

<400> 29

aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat 60
 gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa 120
 gcatacagat atgcagatgc attaaagaag gacaatggag aatatacagt agacgttgca 180

gataaagggtt atactttaa tattaatttt gctggagagc tcgctgacaa caaattcaac 240
 aaagaacaac aaaatgcttt ctatgaaatt ttacatttac ctaacttaac tgaagaacaa 300
 cgtaacggct tcatccaaag ccttaaagac gatccttcag tgagcaaaga aatttttagca 360
 gaagctaaaa agctaaacga tgctcaagca ccaaaagagc tcaaagaaaa aacaccagaa 420
 gaaccaaaaag aagaagttac tattaagca aacttaatct atgcagatgg aaaaactcaa 480
 acagcagagt tcaaaggaac atttgcagaa gcaacagcag aagcatacag atacgctgac 540
 ttattagcaa aagaaaatgg taaatataca gcagacttag aagatggtgg atacactatt 600
 aatattagat ttgcaggtga gctcgetcaa caaatgctt tttatcaagt cttaaataatg 660
 cctaacttaa atgctgatca acgcaatggt tttatccaaa gccttaaaga tgatccaagc 720
 caaagtgcta acgttttagg tgaagctaaa agattaaacg aatttcaagc accgaaagag 780
 ctcacttaca aattaatcct taatggtaaa acattgaaag gcgaaacaac tactgaagct 840
 gttgatgctg ctactgcaga aaaagtcttc aaacaatagc ctaacgacaa cgggtgttgac 900
 ggtgaatgga cttacgacga tgcgactaag acctttacag ttactgaa 948

<210> 30

<211> 316

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 30

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala
 1 5 10 15
 Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly
 20 25 30
 Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu
 35 40 45
 Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val Ala Asp Lys Gly Tyr
 50 55 60

Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu

305

310

315

<210> 31

<211> 1161

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> misc_feature

<223> 其编码蛋白是能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合基因

<400> 31

```

aaagaaaaaa caccagaaga accaaaagaa gaagttacta ttaaagcaaa cttaatctat      60
gcagatggaa aaacacaaac agcagaattc aaaggaacat ttgaagaagc aacagcagaa      120
gcatacagat atgcagatgc attaaagaag gacaatggag aatatacagt agacgttgca      180
gataaagggtt atacttttaa tattaaatth gctggagagc tcgctgacaa caaattcaac      240
aaagaacaac aaaatgcttt ctatgaaatt ttacatttac ctaacttaac tgaagaacaa      300
cgtaacggct tcatccaaag ccttaaagac gatccttcag tgagcaaaga aattttagca      360
gaagctaaaa agctaaacga tgctcaagca caaaagagc tcaacttaca acttggttatt      420
aatggtaaaa cattgaaagg cgaacaact actaaagcag tagacgcaga aactgcagaa      480
aaagccttca aacaatacgc taacgacaac gctgttgatg gtgtttgac ttatgatgat      540
gcgactaaga cttttacggt aactgaagag ctcaaagaag aaacaccaga aacaccagaa      600
actgattcag aagaagaagt aacaatcaaa gctaacctaa tctttgcaaa tggaagcaca      660
caaactgcag aattcaaagg aacatttgaa aaagcaacat cagaagctta tgcgtatgca      720
gatactttga agaaagacaa tggagaatat actgtagatg ttgcagataa aggttatact      780
ttaaataatta aatttgctgg agagctcgct gatgcgcaac aaaataactt caacaaagat      840
caacaaagcg ctttctatga aattttgaac atgcctaact taaacgaagc gcaacgcaat      900
ggtttcattc aaagtcttaa agacgatcca agccaaagca ctaacgtttt aggtgaagct      960
aaaaaattaa acgaatctca agcaccgaaa gagctcactt acaaattaat ctttaatggt     1020
aaaacattga aaggcgaaac aactactgaa gctgttgatg ctgctactgc agaaaaagtc     1080
ttcaacaat acgctaacga caacggtggt gacggtgaat ggacttacga cgatgcgact     1140

```

aagaccttta cagttactga a

1161

<210> 32

<211> 387

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 能与免疫球蛋白高亲和力结合的融合蛋白

<400> 32

Lys Glu Lys Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Ala

1 5 10 15

Asn Leu Ile Tyr Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly

20 25 30

Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Ala Leu

35 40 45

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

50 55 60

Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Glu Leu Ala Asp Asn Lys Phe Asn

65 70 75 80

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu

85 90 95

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro

100 105 110

Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala

115 120 125

Gln Ala Pro Lys Glu Leu Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr

130 135 140

Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala Glu Thr Ala Glu

145 150 155 160

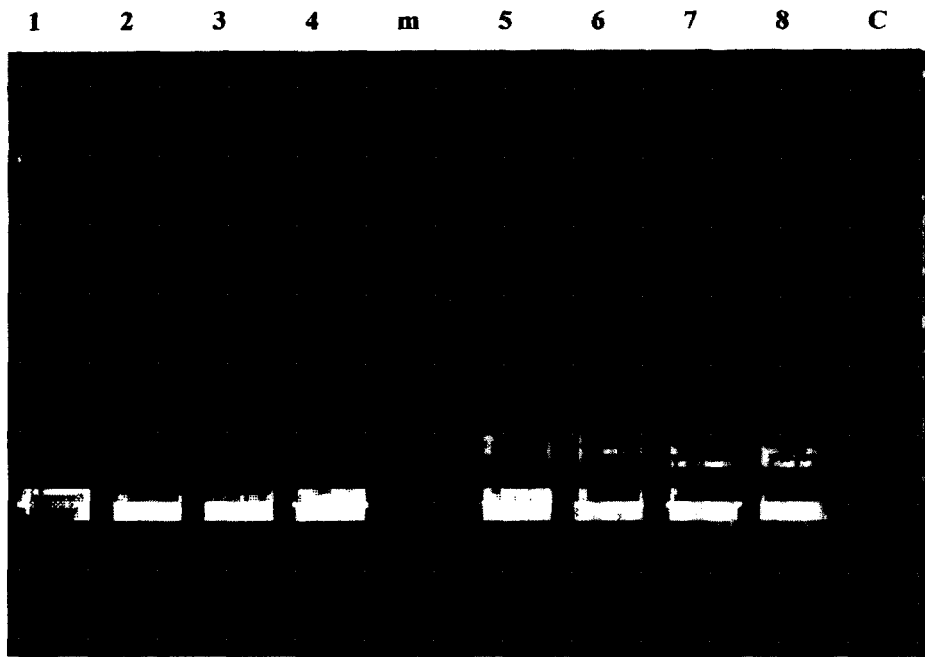


图 1

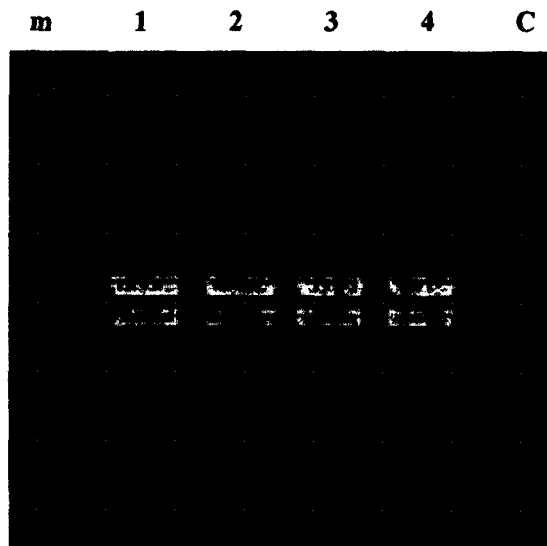


图 2

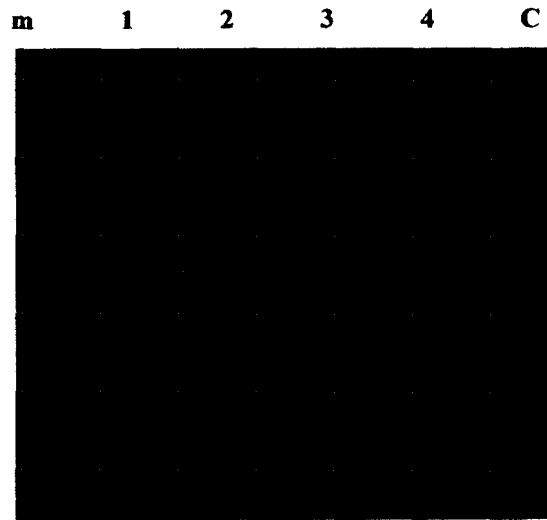


图 3

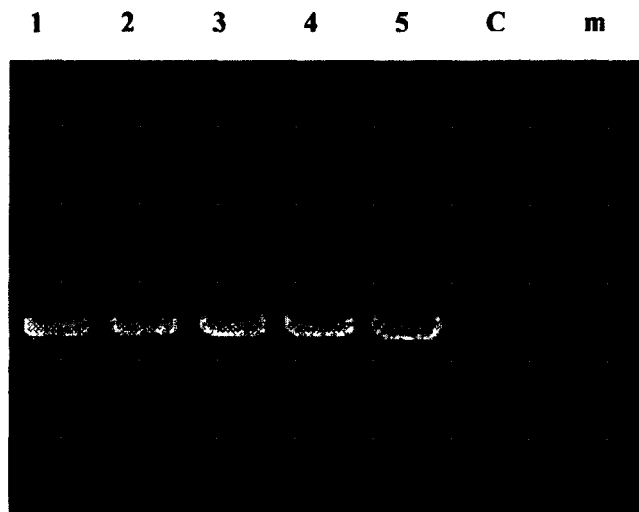


图 4



图 5

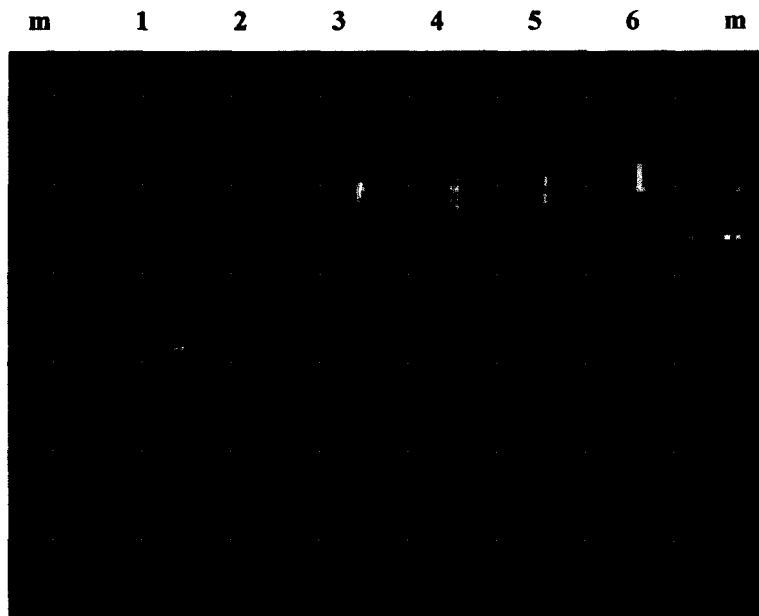


图 6

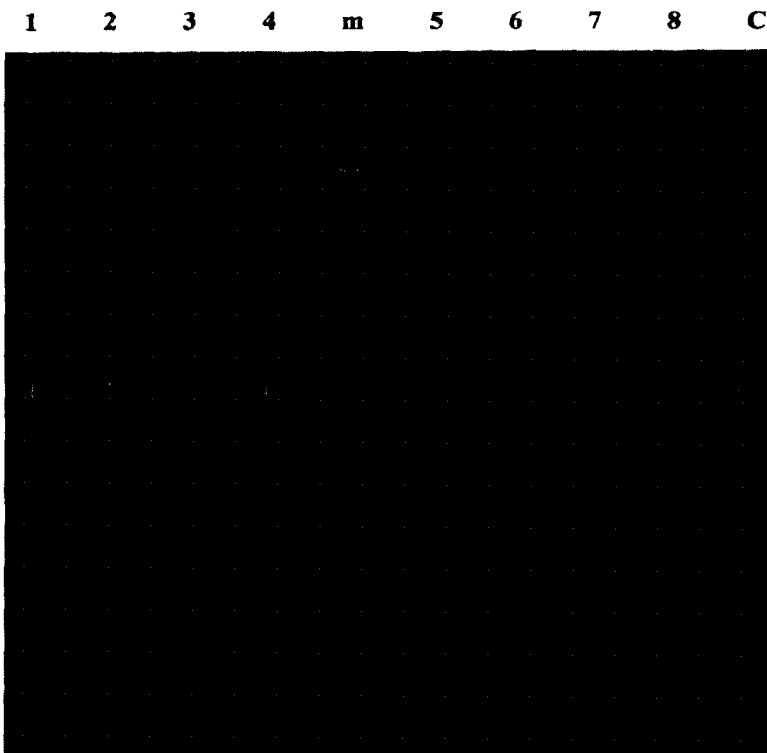


图7

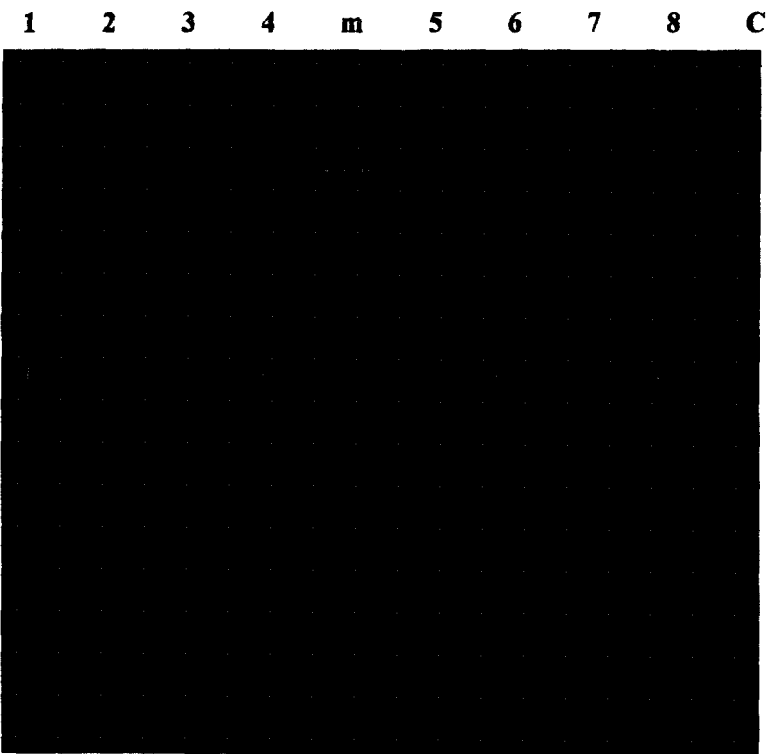


图8

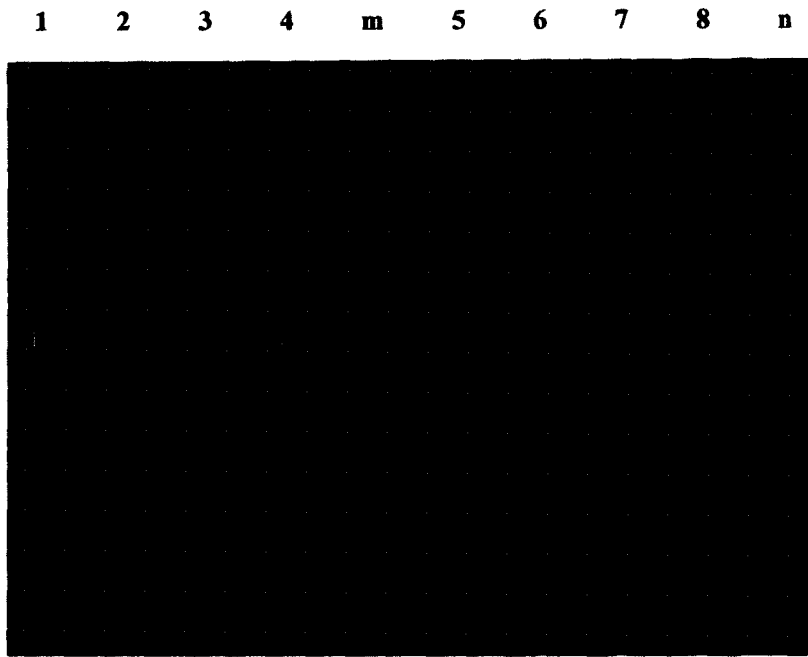


图9

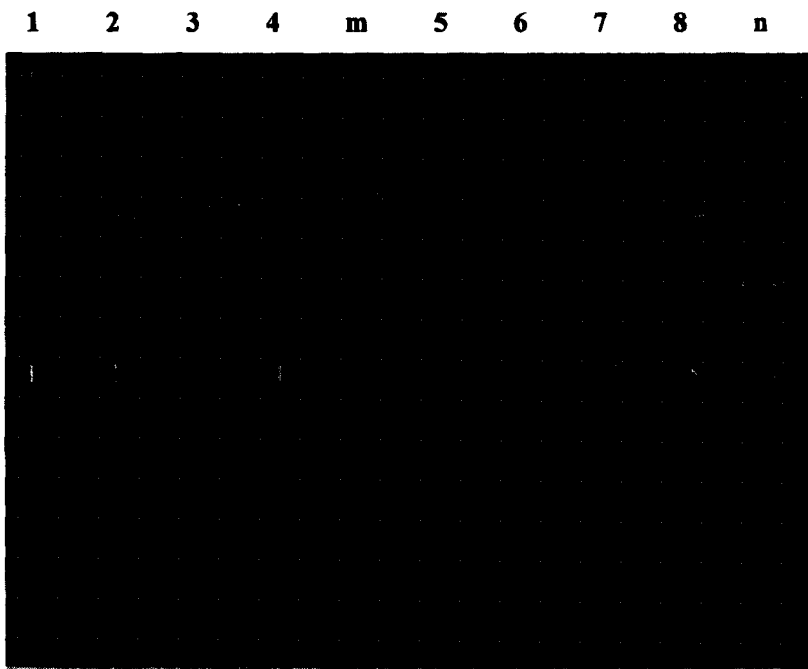


图10

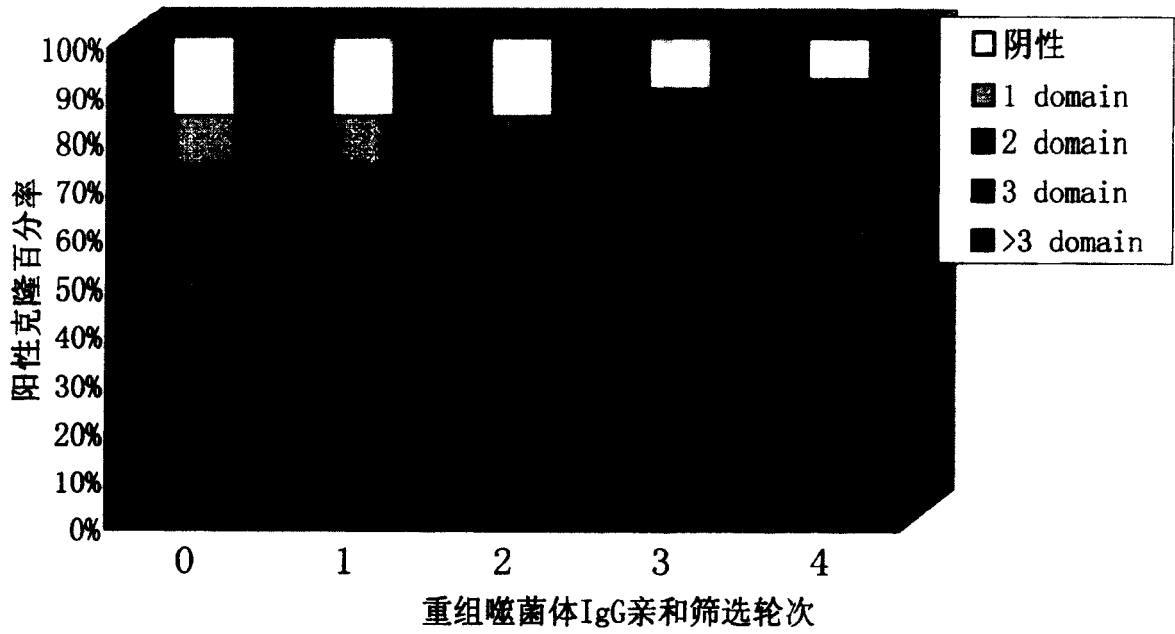


图 11

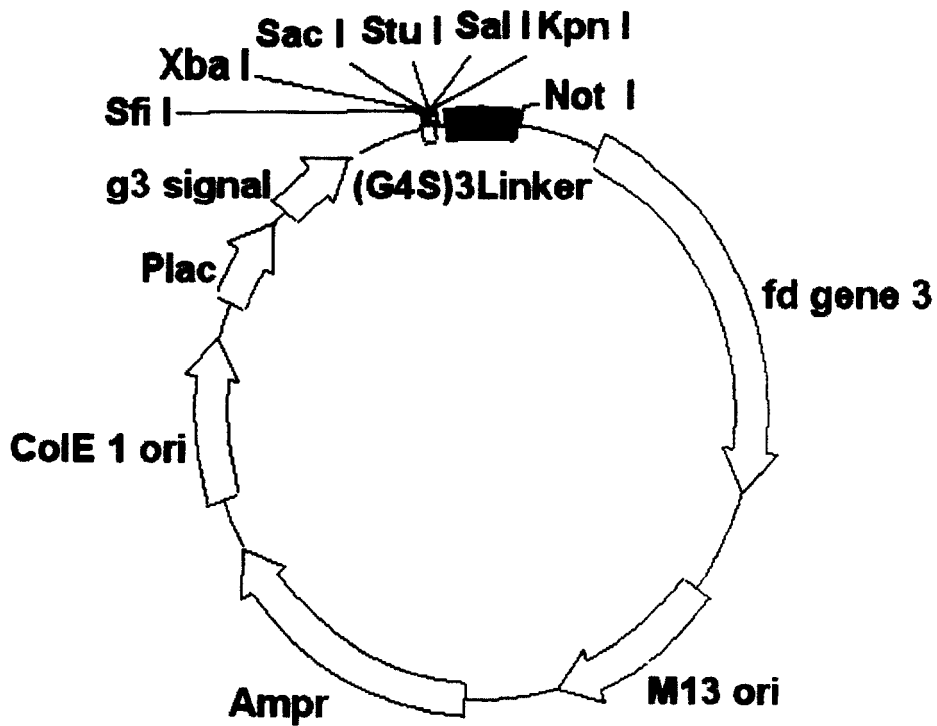


图 12

专利名称(译)	一种高亲和力免疫球蛋白结合分子及其制备方法		
公开(公告)号	CN1319988C	公开(公告)日	2007-06-06
申请号	CN200410067157.2	申请日	2004-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	上海润龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海润龙生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海润龙生物科技有限公司		
[标]发明人	潘卫 徐容 王金华 谢天培 李云华 王德贵 沈毅璐 扬华 王锦红 许浩坤		
发明人	潘卫 徐容 王金华 谢天培 李云华 王德贵 沈毅璐 扬华 王锦红 许浩坤		
IPC分类号	C07K14/00 C07K14/31 C07K14/315 C12N15/62 G01N33/535 G01N33/53 C07K16/16 C12N15/12		
代理人(译)	余明伟		
其他公开文献	CN1634990A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种重组免疫球蛋白结合分子文库、其制备方法及其应用。本发明是以来自不同种属免疫球蛋白结合分子葡萄球菌A蛋白protein A的A、B、C、D、E结构域、大消化链球菌proteinL的B1、B2、B3、B4、B5结构域、C和G群链球菌蛋白G protein G的G1、G2为结构单元，将上述结构单元随机连接，构建重组Ig结合分子文库，将该文库展示在噬菌体表面；以免疫球蛋白对噬菌体展示重组Ig结合分子文库进行3-4轮亲和筛选，获得系列高亲和力免疫球蛋白结合分子噬菌体文库。上述文库可用于筛选高亲和力Ig结合分子。

