



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103191444 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201310111951. 1

C12N 7/01 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 02

C12N 15/37 (2006. 01)

(71) 申请人 北京工业大学

地址 100124 北京市朝阳区平乐园 100 号

(72) 发明人 周玉柏 曾毅 郭艳涛 李泽琳
李劲涛

(74) 专利代理机构 北京思海天达知识产权代理
有限公司 11203

代理人 刘萍

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006. 01)

A61K 39/12 (2006. 01)

A61P 31/20 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

C12N 15/861 (2006. 01)

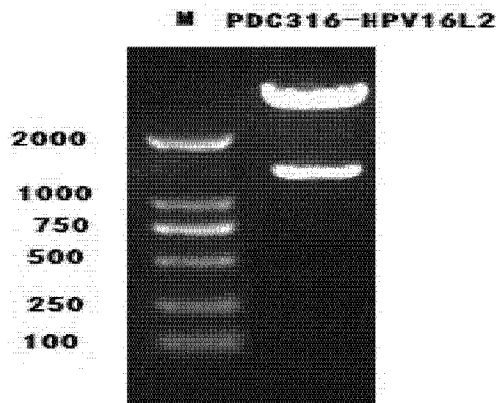
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

HPV16L2 重组腺病毒疫苗的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及 HPV16L2 重组腺病毒疫苗的制备方法。其特征在于,所述腺病毒含有密码子优化型 HPV16L2 的核苷酸序列 SEQ ID No :1,包括如下步骤:使用限制性内切酶 EcoRI 和 HindIII 消化重组腺病毒穿梭质粒 pDC316,然后将回收片段和同样用内切酶 EcoRI 和 HindIII 双酶切的 SEQ ID No :1 所示的核苷酸片段连接,得到重组腺病毒穿梭质粒 pDC316-HPV16L2 ;用制备的重组腺病毒穿梭质粒和重组腺病毒骨架质粒共转染腺病毒包装细胞,得到携带有 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的复制缺陷型重组腺病毒。所述病毒应用于制备预防和治疗 HPV 病毒引起的子宫颈癌以及食管癌的药物制剂。本发明产生良好的细胞免疫和体液免疫,得到良好的预防效果。



1. HPV16L2 重组腺病毒疫苗的制备方法,其特征在于,所述腺病毒含有密码子优化型 HPV16L2 的核苷酸序列 SEQ ID No :1,包括如下步骤:

(1) 使用限制性内切酶 EcoRI 和 HindIII 消化重组腺病毒穿梭质粒 pDC316,然后将回收片段和同样用内切酶 EcoRI 和 HindIII 双酶切的 SEQ ID No :1 所示的核苷酸片段连接,得到重组腺病毒穿梭质粒 pDC316-HPV16L2;

(2) 用步骤(1)制备的重组腺病毒穿梭质粒和重组腺病毒骨架质粒共转染腺病毒包装细胞,得到携带有 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的 HPV16L2 重组腺病毒疫苗。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述的腺病毒骨架质粒是质粒 pBHGlox Δ E1, 3Cre。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述的腺病毒包装细胞是质 293 细胞。

4. 根据权利要求 1 所述的方法制备的 HPV16L2 重组腺病毒疫苗的应用,其特征在于,所述复制缺陷型重组 HPV16L2 腺病毒应用于制备预防和治疗有一种或多种 HPV 病毒引起的子宫颈癌以及食管癌的药物制剂,所述一种或多种 HPV 病毒选自 16、18、31 和 45 型。

HPV16L2 重组腺病毒疫苗的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及含 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的复制缺陷型重组腺病毒的制备方法。

背景技术

[0002] 人乳头状瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)属乳多空病毒科,是无包膜的闭环双链 DNA 病毒。现已明确,高危型 HPV 如 HPV16、18 的持续感染与宫颈癌的发生密切相关,被确定为导致宫颈癌的主要病因,其中又以 HPV16 型最为常见(Bosch F X, J Natl Cancer Inst, 1995, 87:796 - 802.)。基于 HPV 的宫颈癌预防和治疗性疫苗已经开展了很长时间,其中又以 HPV 的主要衣壳蛋白 L1 为重点研究对象,目前临床上已经有了比较成功的疫苗诞生,分别是默克公司的四价疫苗和葛兰素史克公司的两价疫苗。

[0003] 不同型别的 HPV L1VLP 在空间构想上存在差异,导致了其不可以产生很好的交叉保护,但只是简单的增加 L1VLP 的价位而谋求增加交叉保护的效果又会增加疫苗的安全风险和副作用,严重制约着基于 L1 的疫苗的研究。大量的实验证实, HPV16 的次要衣壳蛋白 L2 的 N 端具有中和多种 HPV 基因型的交叉中和表位,是很有前景的候选宫颈癌疫苗(Kawana K, Virology, 1998, 245:353-359)。针对于 L2 的蛋白疫苗目前已经有报道,并且已经取得了一些阶段性的成果,但是蛋白疫苗纯化工艺繁琐,成本高昂,不利于在发展中国家进行推广,同时其免疫原性较差也严重制约了进一步研究。

[0004] 本发明试图构建一种成本低廉,同时可有效激发机体产生特异性免疫反应的疫苗。研究表明,复制缺陷型重组腺病毒嗜性广泛,能够感染包括粘膜上皮细胞在内的多种细胞,介导外源基因在细胞内的稳定表达并刺激机体产生特异性体液及细胞免疫反应,重组腺病毒还可将抗原呈递给免疫系统,有效激发局部和远端粘膜表面的特异性免疫反应,被认为是最为理想的免疫载体之一(Xiang Z Q, J Immunol, 1999, 162:6716-6723)。与此同时,复制缺陷型重组腺病毒基因不与受体细胞基因组发生整合,具有良好的生物安全性(McConnell M J, Human Gene Therapy, 2004, 15(11):1022-1033.)。此外,重组腺病毒还具有便于大规模培养制备、成本低廉等优点,因此是理想的 HPV 候选预防性疫苗之一。所以我们确定以重组腺病毒作为 HPV16L2 基因的病毒载体。

发明内容

[0005] 为了使 SEQ ID No :1 序列能够获得高效表达和呈递,本发明提供一种 HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒疫苗。

[0006] 本发明的技术方案如下:

[0007] 本发明提供一种 HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒疫苗,含有 SEQ ID No :1 所示核酸序列。

[0008] 本发明还提供制备上述 HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒疫苗的方法,包括如下步骤:

[0009] (1)将 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列克隆到腺病毒穿梭质粒中,得到重组腺病毒穿梭质粒。

[0010] (2)用步骤(1)制备的重组腺病毒穿梭质粒和 pBHGlox Δ E1, 3Cre 质粒共转染腺病毒包装细胞,得到含有 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒。

[0011] 所述腺病毒穿梭质粒是质粒 pDC316,所述腺病毒包装细胞是 293 细胞。

[0012] 本发明更进一步提供一种 HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒疫苗,其有效成分为上述 HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒。

[0013] 本发明提供的 HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒疫苗可用于制备预防和治疗子宫颈癌和食管癌的药物。所述复制缺陷型重组 HPV16L2 腺病毒应用于制备预防和治疗有一种或多种 HPV 病毒引起的子宫颈癌以及食管癌的药物制剂,所述一种或多种 HPV 病毒选自 16、18、31 和 45 型。

[0014] 本发明实现的技术效果如下:

[0015] 本发明提供的 HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒,用于制备 HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒疫苗,产生良好的细胞免疫和体液免疫,得到良好的预防效果。

附图说明

[0016] 图 1 :pDC316-HPV16L2 重组穿梭质粒酶切验证结果图;

[0017] 图 2 :HPV16L2 细胞内蛋白表达 Western 印迹分析结果图;

[0018] 图 3 :HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒疫苗细胞免疫结果图;

[0019] 图 4 :HPV16L2 复制缺陷型重组腺病毒疫苗体液免疫结果图。

具体实施方式

[0020] 实施例 1 :含 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒的构建

[0021] 1. 含 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒穿梭质粒的构建(1)大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞的制备:

[0022] 从 37 $^{\circ}$ C 培养 16 ~ 20h 的新鲜平板上挑取 DH5 α 单菌落,接种于 5ml 不含抗菌素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养过夜(12 ~ 16h)。次日从上述培养物中吸取 0.5ml 按 1:100 转入 50ml LB 培养基中继续培养约 3h,至菌液的 OD600 值为 3 时,在无菌条件下将细菌转移到一个无菌、用冰预冷的 50ml 离心管中,冰浴 30min。在 4 $^{\circ}$ C 条件下,4000rpm 离心 10min,弃上清,将管倒置 1min,使残留培养液流尽,以 10ml 用冰预冷的 100mmol/L CaCl₂ 溶液重悬细菌沉淀,冰浴 30min。4 $^{\circ}$ C, 4000rpm 离心 10min,弃上清,每 50ml 初始培养物用 2ml 预冷的含 15%甘油的 100mmol/L CaCl₂ 溶液重悬细菌沉淀,分装成 200 μ l 每管,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0023] (2)SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的获得:

[0024] 以含 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的 p16L2H(provided by Prof. John Schiller) 质粒为模板进行 PCR 扩增,PCR 体系:模板质粒 1 μ l,上游引物 1 μ l,下游引物 1 μ l,10 \times Pfu Buffer 10 μ l,dNTP 8 μ l,Pfu 2 μ l,DMSO 5 μ l,ddH₂O 72 μ l,总体积 100 μ l。经过 30 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 30s,56 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s)获得 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列片段,PCR 反应产物通过切胶回收进行纯化,具体操作参见试剂盒说明书。

[0025] (3) pDC316 腺病毒穿梭质粒及 pBHGlox ΔE1, 3Cre 腺病毒腺病毒骨架质粒的小量制备

[0026] 分别挑取 pDC316 或 pBHGlox ΔE1, 3Cre 质粒转化单菌落分别接种于 5ml 含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养过夜。将培养物移入 1.5ml Eppendorf 管中, 12000rpm 离心 60s, 弃上清, 用 100 μl 预冷的溶液 I [50mmol/L Glucose, 25mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0)] 重悬菌体, 剧烈振荡混匀; 加入 200 μl 新鲜配制的溶液 II (0.2mol/L NaOH, 1%SDS), 温和混匀, 冰浴 3min, 至液体清亮; 加入 150 μl 预冷的溶液 III (100ml 中含 5mol/L KAc60ml, 冰乙酸 11.5ml, 水 28.5ml) 温和混匀, 冰浴 10min, 12000rpm 离心 10min, 小心吸取上清, 将上清转移至另一离心管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇室温沉淀 30min, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗一次, 室温晾干后, 用 30 μl 含 RNaseA (100 μg/ml) 的 TE (pH8.0) 溶解沉淀, 37°C 水浴 30min 后置 -20°C 保存备用。

[0027] (4) 含 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒穿梭质粒的构建

[0028] 上述实施例 1. (2) 中经过纯化的 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列片段用内切酶 EcoRI 和 HindIII 进行双酶切; 使用 EcoRI 和 HindIII 对实施例 1. (3) 中小量制备的腺病毒穿梭质粒 pDC316 进行双酶切。酶切体系: SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列片段 (或 pDC316) 20 μl, BSA0.5 μl, 10×buffer45 μl, 内切酶 EcoRI2 μl, HindIII2 μl, ddH₂O20.5 μl, 总的酶切体系 50 μl, 37°C 消化 3h。双酶切反应产物分别使用凝胶回收试剂盒进行纯化, 具体操作参见试剂盒说明书。建立连接反应体系, 将含 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列片段与 pDC316 片段进行连接, 连接反应体系: 含 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列 7 μl, pDC3161 μl, 10×连接 buffer1 μl, T4 连接酶 1 μl。16°C 连接过夜。将过夜连接产物分别加入 100 μl DH5 α 感受态细胞中, 轻轻旋转混匀, 冰浴 30min。将管移入 42°C 水浴箱中水浴 90s, 然后将管快速转移到冰浴中, 使细胞冷却 1~2min。每管加入 500 μl 不含抗生素的 LB 培养基, 将管转移至 37°C 摇床上, 温育 45min (转速 <150rpm)。取 50 μl 已转化的感受态细胞, 用一个无菌的弯头玻璃涂布棒轻轻涂到含相应抗生素的琼脂平板表面, 将平板置于室温至液体被吸收, 倒置平皿, 于 37°C 培养 12~16h。分别挑取相应重组质粒转化单菌落接种于 5ml 含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养过夜。将培养物移入 1.5ml Eppendorf 管中, 12000rpm 离心 60s, 弃上清, 用 100 μl 预冷的溶液 I [50mmol/L Glucose, 25mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10mmol/L EDTA (pH8.0)] 重悬菌体, 剧烈振荡混匀; 加入 200 μl 新鲜配制的溶液 II (0.2mol/L NaOH, 1%SDS), 温和混匀, 冰浴 3min, 至液体清亮; 加入 150 μl 预冷的溶液 III (100ml 中含 5mol/L KAc60ml, 冰乙酸 11.5ml, 水 28.5ml) 温和混匀, 冰浴 10min, 12000rpm 离心 10min, 小心吸取上清, 将上清转移至另一离心管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇室温沉淀 30min, 12000rpm 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 70% 乙醇洗一次, 室温晾干后, 用 30 μl 含 RNaseA (100 μg/ml) 的 TE (pH8.0) 溶解沉淀, 37°C 水浴 30min 后置 -20°C 保存备用, 重组穿梭质粒命名为 pDC316-HPV16L2。

[0029] (5) 含 SEQ ID No :1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒穿梭质粒的鉴定

[0030] 建立酶切反应体系, 分别双酶切小量制备的 pDC316-HPV16L2 腺病毒穿梭质粒, 酶切体系为: 重组穿梭质粒 5 μl, BSA0.2 μl, 10×buffer42 μl, 内切酶 EcoRI1 μl, HindIII1 μl, ddH₂O10.8 μl, 总的酶切体系 20 μl, 37°C 消化 2h。酶切产物用 1% 琼脂糖凝

胶电泳分离,结果显示,重组质粒可以双酶切下 1422bp 左右特异性条带(参见图 1)。酶切鉴定阳性菌落送北京六合华大基因科技股份有限公司测序,测序结果显示核酸序列正确。

[0031] 实施例 2:含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒的构建和纯化

[0032] (1) 含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒质粒和骨架质粒的制备

[0033] 使用 QIAGEN Plasmid Giga Kits 质粒大量提取试剂盒分别提取重组腺病毒骨架质粒 pBHGlox Δ E1, 3Cre 及重组腺病毒穿梭质粒 pDC316-HPV16L2。具体实验步骤见 QIAGEN Plasmid Giga Kits 使用手册。

[0034] (2) 含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒的包装:

[0035] 将新鲜消化的 293 细胞接种到 75cm² 细胞培养瓶中,加入 15ml 完全培养基,根据康碧泉 QuickShuttle-293 转染试剂说明进行转染:将 40 μg 的 pDC316-HPV16L2 质粒、pBHGlox Δ E1, 3Cre 质粒和 100 μl 转染试剂分别稀释到 400 μl 生理盐水中。合并上述两溶液并混匀。将上述复合物直接加入到细胞培养基中,轻摇细胞培养瓶以混匀。将细胞培养瓶移至 37℃ 5%CO₂ 孵箱中进行培养。转染后 7~10 天,用细胞刮将细胞刮下,800rpm 离心 5min,弃上清,用 2ml 无菌 PBS 重悬细胞沉淀;-20℃ 和 37℃ 反复冻融 4 次;3000rpm 离心 10min,吸取上清,即为原代病毒,命名为 rAd-HPV16L2,-70℃ 保存备用。用 1ml 上清接种 293 细胞,37℃ 5%CO₂ 孵育 1h,然后加入含 2% 小牛血清的 DMEM 维持液(6ml)并观察细胞病变。观察结果显示,被转染的 293 细胞出现细胞肿胀、圆缩等典型的细胞病变。

[0036] (3) 含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒的纯化:

[0037] 使用 Biomiga ViraTrap™ Adenovirus Purification Miniprep Kit 腺病毒纯化试剂盒对重组腺病毒进行纯化。具体实验步骤见 Biomiga ViraTrap™ Adenovirus Purification Miniprep Kit 使用手册。

[0038] 实施例 3:含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒的鉴定及滴度分析:

[0039] (1) 含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒中 HPV16L2 基因的表达:

[0040] 分别以 10 个 MOI 的 rAd-HPV16L2 重组腺病毒和 rAd-GFP 病毒感染 1×10⁶293 细胞,48h 后将细胞刮下,预冷 PBS 洗 2 遍,按照 TRIzol 试剂说明提取细胞总蛋白,溶于 1%SDS 溶液中,0.1%SDS 透析 3 次,4℃ 10000g 离心 10min,收集上清,进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,用鼠抗 HPV16L2 单克隆抗体为一抗,辣根酶标记羊抗鼠 IgG 抗体为二抗,进行 Western 印迹分析(参见图 2)。结果显示,rAd-HPV16L2 可见明显的特异性条带,而细胞对照和 rAd-EGFP 对照看不见条带。

[0041] (2) 含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒滴度测定:

[0042] TCID₅₀ 实验的基础是应用极限稀释法使 293 细胞出现病变从而估计滴度。细胞的准备:准备 10ml 含 2% 胎牛血清的 DMEM 重悬细胞,将细胞浓度调至 1×10⁵/ml,接种于 96 孔细胞培养板,每孔加入 100 μl。细胞贴壁后将上清弃去。病毒的稀释:第一管中加入 0.9ml 含 2% 胎牛血清的 DEME,其余则加入 1.8ml。第一管中加入 0.1ml 病毒原液。上下抽吸 5 次使他们混匀。每一次稀释后都更换吸头。从第一管中吸取 0.2ml 加入第二管。重复这个稀释步骤直到最高稀释度。96 孔板的每一排 10 孔作为一个稀释度。11, 12 列不加病毒作为阴性对照。实验孔每孔加入 0.1ml 不同稀释度病毒。把 96 孔板放在 37℃ 孵箱培养 10 天,观察病变。只要有一个小病变此孔即作为阳性对待,如果不易判断可跟阴性对照做比较。最后按公式 $T=10^{1+d(s-0.5)}$ 计算病毒的滴度(d 为稀释度的对数值, s 为病变比例的和)。结果显

示,重组腺病毒的滴度达到 1×10^9 PFU/ml。

[0043] 实施例 4:含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒免疫原性的研究:

[0044] (1) 动物免疫:

[0045] 4-6 周龄,雌性 BALB/c 小鼠。共分 3 组,每组各 10 只小鼠,分别为 PBS 对照组、rAd-EGFP 对照组和重组腺病毒 rAd-HPV16L2。使用剂量为 1×10^8 PFU/只,肌肉注射,初次免疫后 2 周进行加强免疫。于加强免疫后 2 周摘取小鼠的脾脏并收集各组小鼠血清。

[0046] (2) 血清标本和脾细胞的收集:

[0047] 免疫前以眼眶取血方式分别采集各组小鼠血清,加强免疫 2 周后以摘眼球方式采集各组小鼠血清。室温静置 30min 后,5000rpm 离心 5min,收集血清,分装小份置 -20°C 保存。在超净台中取出小鼠脾脏。在 35mm 培养皿中放入 4ml EZ-Sep Mouse1 \times 淋巴细胞分离液。研磨小鼠脾脏,把悬有脾脏细胞的分离液立即转移到 15ml 离心管中,覆盖 400 μL 的 1640 培养基(保持液面分界明显)。室温,800g 离心 30min。吸出淋巴细胞层,再加入 10ml 1640 培养基,颠倒洗涤。室温,250g 离心 10min 收集细胞。倾倒入上清液,用无血清培养基重悬细胞,细胞计数。

[0048] (3) ELISPOT 检测细胞免疫

[0049] 向预包被的 ELISPOT 的板子中每孔加入 200 μl EZ-Culture 无血清培养基,室温静置 5-10min 后将其扣出,加入细胞悬液,每孔 100 μl ,细胞浓度为 3×10^5 cells/well,并设置好正负对照。每孔中选择好的预测好的刺激物 10 μl ,所有样品和刺激物加完后,盖好板盖。放入 37°C ,5% CO_2 培养箱培养 16-20hr。结果显示,含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒免疫诱导产生了良好的细胞免疫效果,每 1×10^6 细胞可以产生 870 个免疫斑点,参见图 3。

[0050] (4) 抗 HPV 交叉中和抗体的检测

[0051] 按文献报道的方法(Buck, C. B., D. V. Pastrana, D. R. Lowy, et, al. J. Virol. 2004, 78:751 - 757.) 制备 HPV16、18、33、45 假病毒颗粒。在检测前 6h 接种 3×10^4 cells/well 293FT 细胞于 96 孔细胞培养板中,将 HPV16、18、33、45 假病毒颗粒与系列稀释的血清孵育 1h,将假病毒颗粒-待测血清混合液加入接种有 293FT 细胞的 96 孔板上,继续孵育 72h,取 40 μl 细胞培养上清,按顺序加入新的 96 孔板中,加入 20 μl 0.05%CHAPS,加入 200 μl 显色底物,室温避光孵育 2h,Bio-Rad550 型酶标仪测定 405nm 波长下的 OD 值。结果判定:中和抗体的滴度定义为 SEAP 活性较阴性对照组降低 50% 的血清最大稀释度。结果显示,含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒免疫诱导的血清中和抗体平均滴度可达 1:80 ($P < 0.01$),参见图 4。

[0052] 本发明提供如上限定的含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒作为预防和治疗宫颈癌以及食管癌疫苗的应用。根据本发明含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒的一个优选实施方案,含 SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列的重组腺病毒疫苗可诱导产生良好的细胞免疫,通过 ELISPOT 检测特异性斑点数不低于 $870/10^6$ 细胞,同时可在免疫小鼠体内诱导不小于 1:40 的抗 HPV 血清交叉中和抗体。

[0053] 1. 序列 1

[0054] SEQ ID No:1 所示的核苷酸序列:

[0055] latgaggcaca agaggagcgc caagaggacc aagagggccca gcgccacca gctgtacaag

[0056] 61acctgcaagc aggccggcac ctgcccccc gacatcatcc ccaaggtgga gggcaagacc
[0057] 12latcgccgacc agatcctgca gtacggcagc atggggcgtgt tcttcggcgg cctgggcate
[0058] 18lggcaccggca gcggcaccgg cggcaggacc ggctacatcc ccctgggcac caggcccccc
[0059] 24laccgccaccg acaccctggc ccccgtaggg cccccctga ccgtggacc cgtgggcccc
[0060] 30lagcgaccca gcategtgag cctggtggag gagaccagct tcacgacgc cggcgcccc
[0061] 36laccagegtgc ccagcatecc ccccgacgtg agcggcttca gcatcaccac cagcaccgac
[0062] 42laccacccccg ccatectgga catcaacaac accgtgacca ccgtgaccac ccacaacaac
[0063] 48lcccaccttea ccgacccag cgtgctgcag cccccaccc ccgccgagac cggcggccac
[0064] 54lttcacctga gcagcagcac catcagcacc cacaactacg aggagatccc catggacacc
[0065] 60lttcategtga gaccaaccc caacaccgtg accagcagca cccccatccc cggcagcagg
[0066] 66lcccgtggcca ggctgggcct gtacagcagg accaccacgc aggtgaaggt ggtggacccc
[0067] 72lgecttctgta cccccccac caagctgac acctacgaca accccgcta cgaggcctc
[0068] 78lgacgtggaca acaccctgta cttcagcagc aacgacaaca gcatcaacat ccccccgac
[0069] 84lcccgacttec tggacatgt ggccctgcac agggccgccc tgaccagcag gaggaccgga
[0070] 90latcaggtaca gcaggatgg caacaagcag accttgagga ccaggagcgg caagagcctc
[0071] 96lggcgccaagg tgcactacta ctacgacttg agcaccatcg accccgccga ggagatcgag
[0072] 102lctgcagacca tcacccccag cacttacacc accaccagcc acgccgccag ccccaccagc
[0073] 108latcaacaacg gcctgtacga catctacgcc gacgacttca tcaccgacac cagcaccacc
[0074] 114lcccgtgcca gcgtgcccag caccagcctg agcggctaca tccccgcaa caccaccatc
[0075] 120lcccttcggtg gcgcctacaa cateccccctg gtgagcggcc ccgacatccc catcaacatc
[0076] 126laccgaccagg cccccagcct gateccccatc gtgcccggca gccccagta caccatcctc
[0077] 132lgccgacgccg gcgactteta cctgcacccc agctactaca tgctgaggaa gaggaggaag
[0078] 138laggetgcct acttcttcag cgacgtgagc ctggccgcct ga
[0079] 2. 序列 2
[0080] 上游引物：
[0081] tatagaattcatgaggcacaagaggagcgc
[0082] 下游引物：
[0083] tatcaagctttcaggcggccaggctcacgt

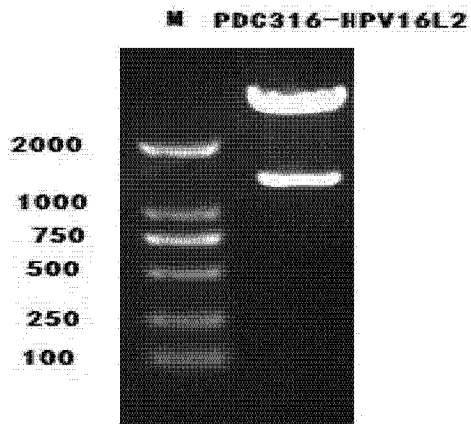


图 1

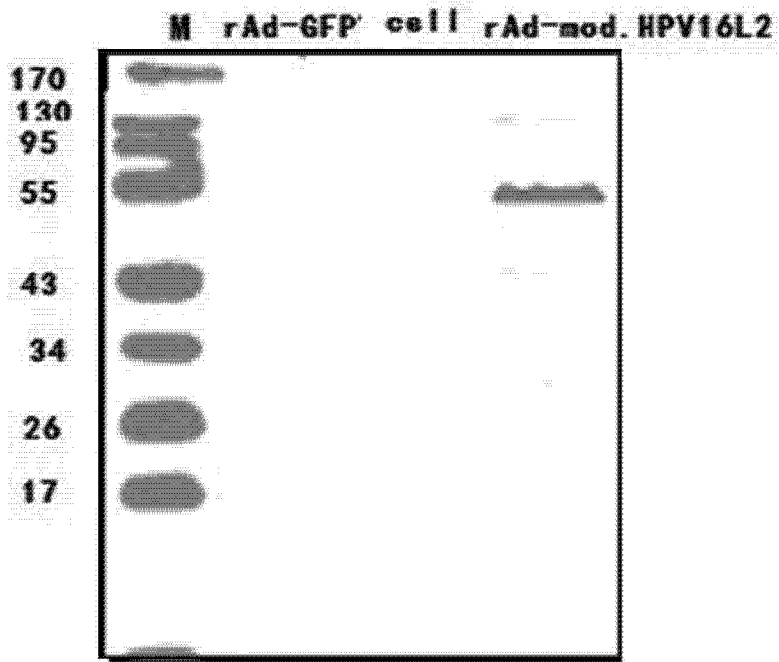


图 2

细胞免疫反应

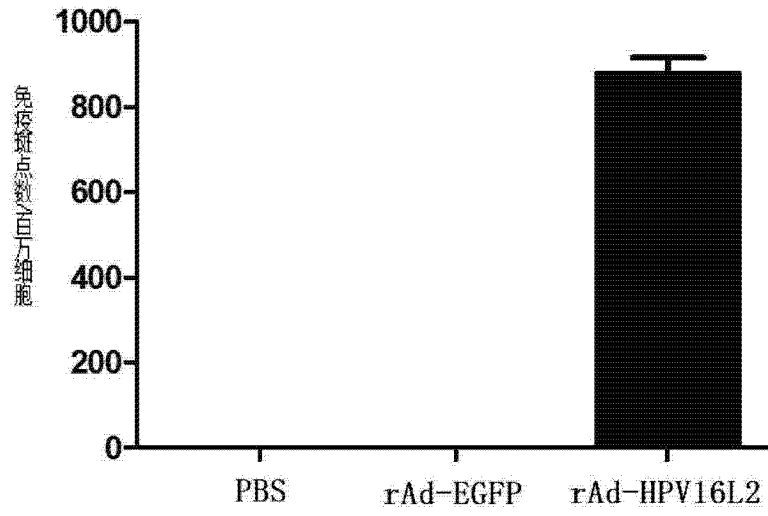


图 3

体液免疫

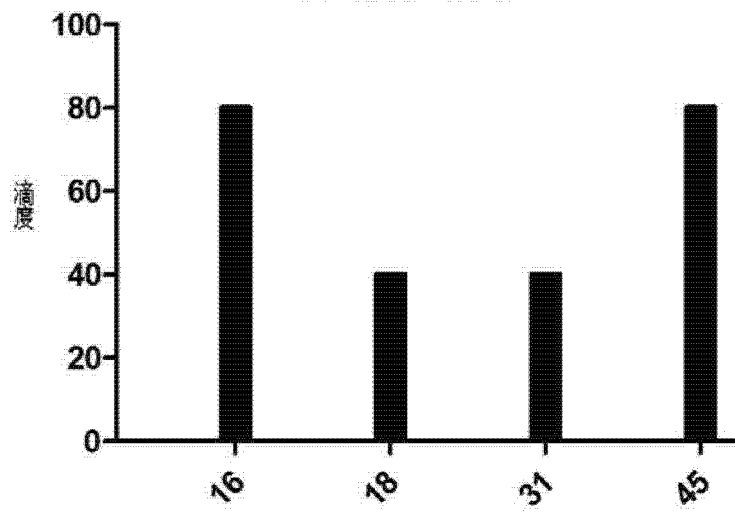


图 4