



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112512310 A

(43) 申请公布日 2021.03.16

(21) 申请号 201980050543.5

(22) 申请日 2019.06.07

(30) 优先权数据

10-2018-0065394 2018.06.07 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2019/006912 2019.06.07

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/235895 KO 2019.12.12

(71) 申请人 韩国生命工学研究院

地址 韩国大田广域市

(72) 发明人 金龙三 高正宪 李兰伊 金仙姬

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 张福誉

(51) Int.Cl.

A01K 67/027(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书21页

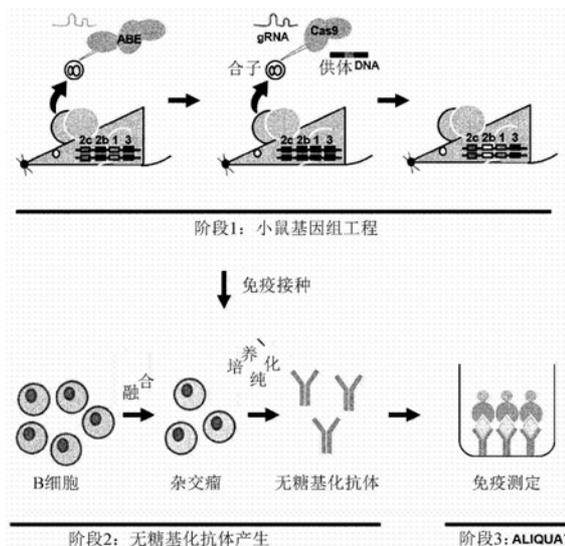
序列表11页 附图19页

(54) 发明名称

用于无糖基化抗体产生的转基因小鼠和由此产生的无糖基化抗体的用途

(57) 摘要

本发明涉及用于无糖基化抗体产生的转基因小鼠和由此产生的无糖基化抗体的用途。本发明的转基因小鼠可用于容易地产生针对多种靶抗原的无糖基化抗体,并且由此产生的无糖基化抗体可精确地检测糖蛋白生物标志物,从而实现疾病诊断的准确性。



1. 重组表达载体或由所述重组表达载体产生的RNA,所述重组表达载体包含:
编码至少一个指导RNA (gRNA) 的核苷酸序列,所述指导RNA (gRNA) 与编码免疫球蛋白G (IgG) 蛋白的DNA杂交;
编码Cas9蛋白的核苷酸序列;
编码腺嘌呤碱基编辑器 (ABE) 的核苷酸序列;和
与所述核苷酸序列可操作地连接的启动子。
2. 权利要求1所述的重组表达载体或RNA,其中所述IgG是选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的至少一个IgG亚类。
3. 权利要求1所述的重组表达载体或RNA,其中所述gRNA包含与选自SEQ ID NO:2至5的任一个序列互补的核苷酸序列。
4. 用于产生无糖基化抗体产生动物模型的转基因细胞系或胚胎,所述转基因细胞系或胚胎包含权利要求1所述的重组表达载体或RNA。
5. 用于产生无糖基化抗体产生动物模型的方法,所述方法包括将权利要求4所述的胚胎移植到非人代孕母体动物的输卵管中。
6. 权利要求5所述的方法,其中所述动物是兔、山羊或小鼠。
7. 权利要求5所述的方法,其中所述无糖基化抗体的产生包括对选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的至少一个IgG亚类的修饰。
8. 权利要求7所述的方法,其中所述修饰包含选自以下的至少一个替换:
用SEQ ID NO:40的序列替换对应于SEQ ID NO:2的序列;
用SEQ ID NO:37的序列替换对应于SEQ ID NO:3的序列;
用SEQ ID NO:38的序列替换对应于SEQ ID NO:4的序列;以及
用SEQ ID NO:39的序列替换对应于SEQ ID NO:5的序列。
9. 无糖基化抗体产生动物模型,其通过对免疫球蛋白G (IgG) 基因进行修饰来获得。
10. 权利要求9所述的无糖基化抗体产生动物模型,其中所述修饰包含选自以下的至少一个替换:
用除N之外的氨基酸替换IgG1重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N,或者用P替换S,或者用除S之外的氨基酸替换T;
用除N之外的氨基酸替换IgG2b重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N,或者用P替换S,或者用除S之外的氨基酸替换T;
用除N之外的氨基酸替换IgG2c重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N,或者用P替换S,或者用除S之外的氨基酸替换T;以及
用除N之外的氨基酸替换IgG3重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N,或者用P替换S,或者用除S之外的氨基酸替换T。
11. 权利要求10所述的无糖基化抗体产生动物模型,其中所述N-S-T序列是由选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的任一个的IgG重链中第297至第299位氨基酸组成的序列。
12. 权利要求9所述的无糖基化抗体产生动物模型,其中所述修饰包含选自以下的至少一个替换:
用SEQ ID NO:40的序列替换对应于SEQ ID NO:2的序列;

用SEQ ID NO:37的序列替换对应于SEQ ID NO:3的序列;

用SEQ ID NO:38的序列替换对应于SEQ ID NO:4的序列;以及

用SEQ ID NO:39的序列替换对应于SEQ ID NO:5的序列。

13. 权利要求9所述的无糖基化抗体产生动物模型,其中所述动物是兔、山羊或小鼠。

14. 用于产生针对抗原的无糖基化抗体的方法,所述方法包括向权利要求9所述的动物模型施用待检测的抗原。

15. 无糖基化抗体,其通过权利要求14所述的方法产生。

16. 免疫测定试剂盒,其包含:

权利要求15所述的无糖基化抗体;和
糖蛋白生物标志物。

17. 权利要求16所述的免疫测定试剂盒,其中所述糖蛋白生物标志物通过凝集素来检测。

18. 权利要求17所述的免疫测定试剂盒,其中所述凝集素能够特异性检测所述糖蛋白生物标志物。

19. 权利要求16所述的免疫测定试剂盒,其中所述糖蛋白是AFP-L3。

用于无糖基化抗体产生的转基因小鼠和由此产生的无糖基化抗体的用途

技术领域

[0001] 本公开内容涉及无糖基化抗体产生转基因小鼠,由此产生的靶抗原特异性无糖基化抗体,以及使用所产生的无糖基化抗体通过分析糖蛋白生物标志物来诊断疾病的方法。

[0002] 本公开内容是在韩国政府的支持下,在由科学和ICT部授予的基金号1711064732 (“通过基因编辑开发无糖基化抗体产生系统(유전자 편집을 통한 무당쇄 항체 생산시스템 개발)”)下进行的。

[0003] 此外,本公开内容是在韩国政府的支持下,在由国家科学与技术研究委员会授予的基金号NTM2371813 (“用于非临床测试的人糖链模拟模型小鼠的开发(비임상시험용인간당쇄모사모델마우스개발)”)下进行的。

[0004] 另外,本公开内容是在韩国政府的支持下,在由科学和ICT部授予的基金号KGM5181813 (“主要项目(2015-2018)”)下进行的。

背景技术

[0005] 已经使用了作为用于疾病诊断的标志物的糖蛋白和疾病特异性抗原。例如,这些标志物包括前列腺癌的前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen,PSA)、结直肠癌的癌胚抗原(carcinoembryogenic antigen,CEA)和用于诊断睾丸癌和肝癌的甲胎蛋白(alpha-fetoprotein,AFP)等。已知的是,这些标志物在疾病进展期间在数量上提高,并且与蛋白质结合的糖链也发生变化。

[0006] 免疫球蛋白(Ig,抗体)是在疾病诊断领域中广泛使用的试剂,并且IgG型抗体占据了诊断市场的最大份额。IgG由通过二硫键连接的两条重链和两条轻链构成。IgG在重链CH2恒定结构域中的Asn297处被糖基化(N-糖基化)。N-糖基化发生在共有序列Asn-X(Pro除外)-Ser/Thr中。在靶向糖蛋白的疾病诊断领域中,IgG的糖链是干扰诊断结果的一个重要因素。作为一个实例,凝集素用于鉴定糖链例如糖蛋白,但其可示出与IgG的糖链的交叉反应,从而混淆了分析结果。为了克服该问题,已经作出了从抗体去除糖链部分的努力,并且已经进行了PNGase消化方法、胃蛋白酶消化方法、交联剂方法等。然而,这些方法的局限性在于酶促反应和化学反应的效率不理想,并且在处理之后难以回收IgG。因此,需要从根本上解决抗体的糖链问题。

[0007] 本发明人已通过编辑小鼠基因组DNA中的IgG基因,将抗体的N-糖基化序列修饰为无糖基化序列。另外,本发明人已从如此产生的小鼠产生了抗体,已发现所产生的抗体是无糖基化抗体,并且已表明可使用所产生的无糖基抗体通过ELISA和CLIA方法定量分析AFP-L3,从而完成了本公开内容。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 本公开内容的一个目的是提供重组表达载体或由所述重组表达载体产生的RNA, 所述重组表达载体包含: 编码至少一个指导RNA (guide RNA, gRNA) 的核苷酸序列, 所述指导RNA (gRNA) 与编码免疫球蛋白G (IgG) 蛋白的DNA杂交; 编码Cas9蛋白的核苷酸序列; 编码腺嘌呤碱基编辑器 (adenine base editor, ABE) 的核苷酸序列; 和与所述核苷酸序列可操作地连接的启动子。

[0010] 本公开内容的另一个目的是提供用于产生无糖基化抗体产生动物模型的转基因细胞系或胚胎, 所述转基因细胞系或胚胎包含重组表达载体或RNA。

[0011] 本公开内容的另一个目的是提供用于产生无糖基化抗体产生动物模型的方法, 所述方法包括将胚胎移植到非人代孕母体动物的输卵管中的步骤。

[0012] 本公开内容的另一个目的是提供通过对免疫球蛋白G (IgG) 基因进行修饰获得的无糖基化抗体产生动物模型。

[0013] 本公开内容的另一个目的是提供用于产生针对抗原的无糖基化抗体的方法, 所述方法包括向所述动物模型施用待检测的抗原的步骤。

[0014] 本公开内容的另一个目的是提供通过用于产生无糖基化抗体的方法所产生的无糖基化抗体。

[0015] 本公开内容的另一个目的是提供免疫测定试剂盒, 其包含: 无糖基化抗体; 和糖蛋白生物标志物。

[0016] 技术方案

[0017] 本公开内容的一个方面提供了重组表达载体或由所述重组表达载体产生的RNA, 所述重组表达载体包含: 编码至少一个指导RNA (gRNA) 的核苷酸序列, 所述指导RNA (gRNA) 与编码免疫球蛋白G (IgG) 蛋白的DNA杂交; 编码Cas9蛋白的核苷酸序列; 编码腺嘌呤碱基编辑器 (ABE) 的核苷酸序列; 和与所述核苷酸序列可操作地连接的启动子。

[0018] 根据本公开内容的一个实施方案, IgG可以是选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的至少一个IgG亚类。

[0019] 根据本公开内容的一个实施方案, 所述gRNA可包含与选自SEQ ID NO:2至5的任一个序列互补的核苷酸序列。

[0020] 本公开内容的另一个方面提供了用于产生无糖基化抗体产生动物模型的转基因细胞系或胚胎, 所述转基因细胞系或胚胎包含所述重组表达载体或RNA。

[0021] 本公开内容的另一个方面提供了用于产生无糖基化抗体产生动物模型的方法, 所述方法包括将胚胎移植到非人代孕母体动物的输卵管中的步骤。

[0022] 根据本公开内容的一个实施方案, 动物可以是兔、山羊或小鼠。

[0023] 根据本公开内容的一个实施方案, 无糖基化抗体的产生可包括对选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的至少一个IgG亚类的修饰。

[0024] 根据本公开内容的一个实施方案, 所述修饰可包含选自以下的至少一个替换: 用SEQ ID NO:40的序列替换对应于SEQ ID NO:2的序列; 用SEQ ID NO:37的序列替换对应于SEQ ID NO:3的序列; 用SEQ ID NO:38的序列替换对应于SEQ ID NO:4的序列; 以及用SEQ ID NO:39的序列替换对应于SEQ ID NO:5的序列。

[0025] 本公开内容的另一个方面提供了通过对免疫球蛋白G (IgG) 基因进行修饰获得的无糖基化抗体产生动物模型。

[0026] 根据本公开内容的一个实施方案,所述修饰可包含选自以下的至少一个替换:用另一个氨基酸替换IgG1重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N;用另一个氨基酸替换IgG2a重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N;用另一个氨基酸替换IgG2b重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N;用另一个氨基酸替换IgG2c重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N;以及用另一个氨基酸替换IgG3重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N。

[0027] 根据本公开内容的一个实施方案,N-S-T序列可以是由选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的任一个的IgG重链的第297至第299位氨基酸组成的序列。

[0028] 根据本公开内容的一个实施方案,所述修饰包含选自以下的至少一个替换:用SEQ ID NO:40的序列替换对应于SEQ ID NO:2的序列;用SEQ ID NO:37的序列替换对应于SEQ ID NO:3的序列;用SEQ ID NO:38的序列替换对应于SEQ ID NO:4的序列;以及用SEQ ID NO:39的序列替换对应于SEQ ID NO:5的序列。

[0029] 根据本公开内容的一个实施方案,所述动物不仅可以是兔、山羊或小鼠,而且可以是能够产生抗体的任何动物。

[0030] 本公开内容的另一个方面提供了用于产生针对抗原的无糖基化抗体的方法,所述方法包括向所述动物模型施用待检测的抗原的步骤。

[0031] 本公开内容的另一个方面提供了通过用于产生无糖基化抗体的方法所产生的无糖基化抗体。

[0032] 本公开内容的另一个方面提供了免疫测定试剂盒,其包含:无糖基化抗体;和糖蛋白生物标志物。

[0033] 根据本公开内容的一个实施方案,糖蛋白生物标志物可通过凝集素来检测。

[0034] 根据本公开内容的一个实施方案,凝集素可以是L4-PHA (phytohemagglutinin-L4,植物凝集素-L4)、LCA (lens culinaris agglutinin,小扁豆凝集素)、DSA (Datura stramonium agglutinin,曼陀罗凝集素)、AAL (Aleuria aurantia agglutinin,橙黄网胞盘菌凝集素)、选择素 (Selectin)、Con A (concanavalin-A,伴刀豆球蛋白-A)、WGA (wheat germ agglutinin,麦胚凝集素)、木菠萝素 (jacalin)、SNA (Sambucus Nigra agglutinin,黑接骨木凝集素) 或半乳凝素。

[0035] 根据本公开内容的一个实施方案,糖蛋白可以是AFP-L3。

[0036] 有利效果

[0037] 使用本公开内容的转基因小鼠,可容易地产生针对多种靶抗原的无糖基化抗体,并且可通过使用所产生的无糖基化抗体检测糖蛋白生物标志物来精确地诊断疾病。

附图说明

[0038] 图1是示出了即使在不存在分析物的情况下凝集素也可与捕获抗体结合的示意图。

[0039] 图2是示出了通过ALIQAT (Aglycosylated antibody-Lectin coupled Immunoassay for the QUAntification of Tumor marker,用于肿瘤标志物定量的无糖基化抗体-凝集素偶联免疫测定),即使用合适的凝集素和无糖基化抗体的免疫测定平台,分析特定糖形 (glycoform) 的方法的示意图。

[0040] 图3示出了通常存在于IgG2c、IgG2b、IgG1和IgG3中的N-S-T序列。

[0041] 图4示出了使用ARMS (amplification refractory mutation system, 扩增受阻突变系统) 和PCR筛选经编辑的突变的过程的示意图。

[0042] 图5示出了在腺嘌呤碱基编辑过程之后出生的9只幼仔 (pup) 中IgG2c基因的Sanger测序的结果。

[0043] 图6示出了在腺嘌呤碱基编辑过程之后出生的9只幼仔中IgG2b基因的Sanger测序的结果。

[0044] 图7示出了在腺嘌呤碱基编辑过程之后出生的9只幼仔中IgG3基因的Sanger测序的结果。

[0045] 图8示出了根据腺嘌呤碱基编辑经编辑的IgG2c的核苷酸序列。

[0046] 图9示出了根据腺嘌呤碱基编辑经编辑的IgG2b的核苷酸序列。

[0047] 图10示出了根据腺嘌呤碱基编辑经编辑的IgG3的核苷酸序列。

[0048] 图11示出了幼仔 (#11) 中IgG2c和IgG3的Sanger测序的结果。

[0049] 图12示出了分析IgG的结构以选择中间建立者 (intermediate founder) 的结果。在图12 (a) 中, 野生型IgG蛋白结构示出了具有针对Asn残基的N-糖基化的N-S-T的保守基序。图12 (b) 示出了不具有N-糖基化的突变体D-S-T和G-S-T抗体的假设的IgG2结构, 其中G-S-T基序导致 β -夹心折叠的结构改变。

[0050] 图13示出了根据腺嘌呤碱基编辑经编辑的IgG1的核苷酸序列。

[0051] 图14示出了分别在基因组经编辑小鼠和野生型小鼠中产生的抗体显示出相同的IgG表达谱, 而具有IgG2b和IgG3基因的敲除的小鼠在相应亚类的产生中显示出缺陷。

[0052] 图15示出了具有IgG2b基因敲除的小鼠中相应亚类的基因的缺陷。

[0053] 图16示出了具有IgG3基因敲除的小鼠中相应亚类的基因的缺陷。

[0054] 图17是示出了作为以下的结果, 随时间反应性提高的图: 在将作为模型抗原的人AFP (其是肝细胞癌的肿瘤标志物) 施用到无糖基化抗体产生动物中之后, 针对在各免疫接种步骤中收集的血清中的hAFP, 进行直接的ELISA测定。

[0055] 图18示出了产生对hAFP具有高度特异性的抗体的杂交瘤克隆。

[0056] 图19示出了1E5、2A2和3A5克隆分泌IgG1亚类和 κ 轻链的单克隆抗体。

[0057] 图20示出了1E5抗体的重链不具有N-聚糖。

[0058] 图21示出了1E5、2A2和3A5克隆的无糖基化。

[0059] 图22示出了具有移码的无义突变的每个FUT8^{-/-}突变体细胞系克隆的基因型。

[0060] 图23示出了FUT8^{-/-} HEK293-T细胞对PhoSL结合具有抗性。

[0061] 图24示出了使用抗hAFP抗体进行免疫印迹分析以使AFP的不同糖形可视化的结果。

[0062] 图25示出了质量分析结果, 其表明FUT8^{-/-}细胞中不存在AFP-L3并且野生型细胞中产生的AFP-L3百分比为99.5%。

[0063] 图26示出了在0至20ng/ml AFP的范围内, 与经验证的商业抗体相比, 显示出良好线性的无糖基化抗体的标准曲线分析结果。

[0064] 图27是示出了使用AAL和无糖基化抗体进行的凝集素-ELISA测定产生了对于L3阳性AFP样品具有良好灵敏度和线性的标准曲线的图。

[0065] 图28是示出了当将AFP-L3标准分子加入到示出低于1.0ng/mL的AFP水平的正常血

清中时获得的,在0至100ng/mL范围内具有良好线性的标准曲线的图。

[0066] 图29是示出了通过使用无糖基化抗体进行的凝集素-ELISA hAFP测试和 μ -TAS分析获得的%AFP-L3值相对于AFP浓度的图。

[0067] 图30示出了无糖基化抗体对热条件的稳定性。

[0068] 图31示出了无糖基化抗体对pH条件的稳定性。

[0069] 图32示出了无糖基化抗体对氧化条件的稳定性。

具体实施方式

[0070] 本公开内容的一个方面提供了重组表达载体或由所述重组表达载体产生的RNA,所述重组表达载体包含:编码至少一个指导RNA(gRNA)的核苷酸序列,所述指导RNA(gRNA)与编码免疫球蛋白G(IgG)蛋白的DNA杂交;编码Cas9蛋白的核苷酸序列;编码腺嘌呤碱基编辑器(ABE)的核苷酸序列;和与所述核苷酸序列可操作地连接的启动子。

[0071] 本说明书提供了:用于产生无糖基化抗体产生动物模型的方法,所述方法包括使用腺嘌呤碱基编辑系统对细胞系或胚胎的IgG基因进行特异性修饰或通过应用转基因体细胞克隆技术将胚胎移植到非人代孕母体动物的输卵管中的步骤;用于产生无糖基化抗体产生转基因动物的方法;以及由所述转基因动物产生的无糖基化抗体的用途。

[0072] 本文中使用的术语“腺嘌呤碱基编辑系统”是指由切口酶Cas9-假设的脱氧腺苷脱氨酶融合蛋白(腺嘌呤碱基编辑器;ABE)和gRNA(指导RNA)构成的单碱基编辑诱导系统,其是被设计成如下的基因组编辑系统:使用CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat,成簇规则间隔短回文重复序列)和假设的脱氧腺苷脱氨酶系统(已知为微生物免疫系统),用鸟嘌呤替代期望的基因核苷酸序列的腺嘌呤而不切割DNA。

[0073] 本文中使用的术语“腺嘌呤碱基编辑器(ABE)”是腺嘌呤碱基编辑系统中的必需蛋白质元件,并且是可通过与gRNA形成复合体而诱导单碱基编辑的切口酶-Cas9假设的脱氧腺苷脱氨酶融合蛋白。ABE蛋白可以是David R.Liu在2017年开发的一种蛋白质。

[0074] 本文中使用的术语“碱基编辑器”是指比现有CRISPR/Cas9系统更有效地介导基因组DNA中的修饰的蛋白质,并且特定地用于能够进行‘G-C至A-T’或‘A-T至G-C’转换的碱基编辑系统。在本公开内容中,使用特别诱导‘A-T至G-C’转换的腺嘌呤碱基编辑器来诱导尤其是IgG基因的修饰。

[0075] 本文中使用的术语“gRNA”是指包含能够与靶DNA互补结合的核苷酸序列的RNA。特别地,gRNA是指可与Cas9蛋白或切口酶-Cas9蛋白形成复合体并且可将Cas9蛋白或腺嘌呤碱基编辑器蛋白引导至靶DNA的单链RNA。

[0076] 当用本公开内容的重组表达载体或RNA转化胚胎或细胞时,gRNA片段可被递送到细胞中,并且所递送的gRNA片段可识别IgG基因。因此,当用重组表达载体或RNA转化胚胎或细胞时,gRNA可被递送到细胞中,并且所递送的gRNA可用于形成可被腺嘌呤碱基编辑器或Cas9蛋白复合体识别的结构。

[0077] 本文中使用的术语“修饰”是指将编码特定氨基酸的核苷酸序列的一部分转换为编码另一种氨基酸的序列。

[0078] 本文中使用的术语“重组表达载体”是指包含期望的编码序列和用于在特定宿主生物体中表达可操作地连接的编码序列所必需的合适核酸序列的重组DNA分子。可在真核

细胞中使用的启动子、增强子以及终止和多腺苷酸化信号是已知的。

[0079] 本文中使用的术语“可操作地连接”是指基因表达控制序列与另一个核苷酸序列之间的功能性连接。基因表达控制序列可以是选自复制起点、启动子和转录终止序列(终止子)的至少一种。转录终止序列可以是多腺苷酸化序列(pA),并且复制起点可以是f1复制起点、SV40复制起点、pMB1复制起点、腺复制起点、AAV复制起点或BBV复制起点,但不限于此。

[0080] 本文中使用的术语“启动子”意指从结构基因起上游的DNA区域,并且是指与RNA聚合酶结合以起始转录的DNA分子。

[0081] 根据本公开内容的一个实施方案的启动子是转录控制序列之一,其调节特定基因的转录起始,并且可以是长度为约100至约2,500bp的多核苷酸片段。启动子可不受限制地使用,只要其可在细胞中调节转录起始即可,所述细胞例如真核细胞(例如,植物细胞或动物细胞(例如哺乳动物细胞,例如人或小鼠细胞))。例如,启动子可选自巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)启动子(例如,人或小鼠CMV立即早期启动子)、U6启动子、EF1- α (elongation factor 1-a,延伸因子1-a)启动子、EF1- α 短(EF1-alpha short,EFS)启动子、SV40启动子、腺病毒启动子(主要晚期启动子)、pL λ 启动子、trp启动子、lac启动子、tac启动子、T7启动子、牛痘病毒7.5K启动子、HSV tk启动子、SV40E1启动子、呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus,RSV)启动子、金属硫蛋白启动子、 β -肌动蛋白启动子、泛素C启动子、人白介素2(IL-2)基因启动子、人淋巴毒素基因启动子和人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor,GM-CSF)基因启动子,但不限于此。

[0082] 根据本公开内容的一个实施方案的重组表达载体可选自质粒载体、黏粒载体和病毒载体,例如噬菌体载体、腺病毒载体、逆转录病毒载体和腺相关病毒载体。可用作重组表达载体的载体可基于但不限于本领域中使用的以下来构建:质粒(例如,pcDNA系列,pSC101、pGV1106、pACYC177、ColE1、pKT230、pME290、pBR322、pUC8/9、pUC6、pBD9、pHC79、pIJ61、pLAFR1、pHV14、pGEX系列,pET系列,pUC19等),噬菌体(例如, λ gt4 λ B、 λ -Charon、 λ Δ z1、M13等),病毒载体(例如,腺相关病毒(AAV)载体等),等等。

[0083] 本公开内容的重组表达载体可还包含至少一种选择标志物。标志物通常是具有通过一般化学方法而选择的特性的核酸序列,并且包括能够将经转染的细胞与未经转染的细胞区分开的任何基因。标志物的一些实例包括但不限于对除草剂(例如草甘膦(glyphosate)、草铵膦(glufosinate ammonium)或草丁膦(phosphinothricin))具有抗性的基因和对抗生素(例如氨苄青霉素(ampicillin)、卡那霉素(kanamycin)、G418、博来霉素(Bleomycin)、潮霉素(hygromycin)或氯霉素(chloramphenicol))具有抗性的基因。

[0084] 本公开内容的重组表达载体可使用本领域公知的基因重组技术来构建,并且可使用本领域通常已知的酶来进行位点特异性的DNA切割和连接。

[0085] 从本公开内容的重组表达载体产生的“RNA”是指使用重组表达载体作为模板体外合成的mRNA。

[0086] 根据本公开内容的一个实施方案,IgG可以是选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的至少一个IgG亚类。

[0087] 可通过对小鼠IgG基因,特别是IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和/或IgG3进行修饰,优选对所有IgG1、IgG2b、IgG2c和IgG3进行修饰来从小鼠产生无糖基化抗体。另外,可通过小

鼠的反复的回交 (back cross) 固定经修饰的IgG基因来建立无糖基化抗体产生小鼠系统。

[0088] 根据本公开内容的一个实施方案,所述gRNA可包含与选自SEQ ID NO:2至5的任一一个序列互补的核苷酸序列。

[0089] 本公开内容的另一个方面提供了用于产生无糖基化抗体产生动物模型的转基因细胞系或胚胎,所述转基因细胞系或胚胎包含所述重组表达载体或RNA。

[0090] 为了产生根据本公开内容一个实施方案的包含重组表达载体或RNA的转基因胚胎,通过使野生型C57BL/6小鼠杂交来获得胚胎,但不限于此。可使用本领域已知的用于将核酸分子引入到受精卵或胚胎中的方法,并且如本领域已知的,可选择并执行合适的标准技术。该方法的一些实例包括但不限于电穿孔、显微注射等。

[0091] 为了产生根据本公开内容一个实施方案的包含重组表达载体或RNA的转基因细胞系,可使用本领域已知的用于将核酸分子引入到生物体、细胞、组织或器官中的方法,并且如本领域已知的,可根据宿主细胞选择合适的标准技术并使用。该方法的一些实例包括但不限于电穿孔、磷酸钙 (CaPO₄) 沉淀、氯化钙 (CaCl₂) 沉淀、显微注射、聚乙二醇 (PEG) 方法、DEAE-右旋糖酐方法、阳离子脂质体方法和乙酸锂-DMSO方法。

[0092] 待用作转基因细胞系的细胞类型可以是动物细胞或来源于动物细胞,优选哺乳动物,优选用于抗体产生的动物(例如小鼠、兔和山羊)的细胞、或者来源于这些动物,最优选小鼠的体细胞或受精卵和胚胎,或者来源于小鼠的体细胞或受精卵或胚胎。当将小鼠来源的体细胞用作转基因细胞系时,可克服小鼠出生之后立即死亡的问题。

[0093] 本公开内容的另一个方面提供了用于产生无糖基化抗体产生动物模型的方法,所述方法包括将胚胎移植到非人代孕母体动物的输卵管中的步骤。

[0094] 用于产生无糖基化抗体产生动物模型的方法可通过体细胞核移植 (somatic cell nuclear transfer, SCNT) 来进行。“体细胞核移植”是一种能够在不通过通常在生殖过程中发生的减数分裂和单倍体生殖细胞的情况下产生后代的基因操纵技术,并且是一种包括将成体的多倍体体细胞移植到去核卵母细胞中以产生胚胎,以及将胚胎移植到活体中以产生新个体的方法。

[0095] 本文中使用的术语“核移植胚胎”是指通过核供体细胞的插入或融合产生的卵母细胞,并且“融合”是指核供体细胞与卵母细胞的脂质膜部分的组合。例如,脂质膜可以是细胞的质膜或核膜。当将核供体细胞和受体卵母细胞彼此邻近放置时或者当将核供体细胞置于受体卵母细胞的卵周隙中时,在核供体细胞与受体卵母细胞之间施加电刺激时可发生融合。术语“转基因细胞系”是指移植至核受体卵母细胞的核供体细胞,或细胞的核。术语“卵母细胞”优选地是指已经达到减数分裂中期II的成熟卵母细胞,优选小鼠卵母细胞。

[0096] 根据本公开内容的一个实施方案,动物可以是兔、山羊或小鼠,但不限于此。

[0097] 已将小鼠用于对多种疾病的病理机制和治疗的研究中,并且特别地,小鼠长期以来一直被认为是经济动物,并且因此其的使用可避免伦理问题,与当将其他中等/大型动物用作疾病模型时不同。另外,由于已经建立了用于小鼠的稳定的繁育系统,因此有利地易于在实验动物模型的开发期间对小鼠进行维护和控制。另外,兔和山羊已经以多种方式用于抗体产生,并因此可容易地用于本公开内容的无糖基化抗体的产生。也可使用可产生抗体的其他动物,例如鸡、马等。

[0098] 根据本公开内容的一个实施方案,无糖基化抗体的产生可包括对选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的至少一个IgG亚类的修饰。

[0099] 无糖基化抗体产生动物模型可通过对构成IgG基因的核苷酸的一部分的替换来修饰IgG而产生。

[0100] 根据本公开内容的一个实施方案,所述修饰可包含选自以下的至少一个替换:用SEQ ID NO:40的序列替换对应于SEQ ID NO:2的序列;用SEQ ID NO:37的序列替换对应于SEQ ID NO:3的序列;用SEQ ID NO:38的序列替换对应于SEQ ID NO:4的序列;以及用SEQ ID NO:39的序列替换对应于SEQ ID NO:5的序列。

[0101] 本公开内容的另一个方面提供了通过对免疫球蛋白G(IgG)基因进行修饰获得的无糖基化抗体产生动物模型。

[0102] 在本公开内容的无糖基化抗体产生动物模型中,可以以与上述相同的意义使用与上述描述重叠的内容。

[0103] 根据本公开内容的一个实施方案,所述修饰可包含选自以下的至少一个替换:用另一个氨基酸替换IgG1重链的氨基酸序列中N-S-T序列的至少一个氨基酸;用另一个氨基酸替换IgG2b重链的氨基酸序列中N-S-T序列的至少一个氨基酸;用另一个氨基酸替换IgG2c重链的氨基酸序列中N-S-T序列的至少一个氨基酸;以及用另一个氨基酸替换IgG3重链的氨基酸序列中N-S-T序列的至少一个氨基酸。

[0104] 更优选地,所述修饰可包含选自以下的至少一个替换:用除N之外的氨基酸替换IgG1重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N,或者用P替换S,或者用除S之外的氨基酸替换T;用除N之外的氨基酸替换IgG2b重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N,或者用P替换S,或者用除S之外的氨基酸替换T;用除N之外的氨基酸替换IgG2c重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N,或者用P替换S,或者用除S之外的氨基酸替换T;以及用除N之外的氨基酸替换IgG3重链的氨基酸序列中N-S-T序列的氨基酸N,或者用P替换S,或者用除S之外的氨基酸替换T。

[0105] N-S-T突变为D-S-T比突变为D-G-T或G-S-T更优选。这是因为N-糖基化天冬酰胺残基位于免疫球蛋白 β -夹心折叠的两条链之间的暴露环处,并且因此与甘氨酸(GST)不同,表现出与天冬酰胺相同的几何学的天冬氨酸可避免潜在的几何不稳定性,即使其具有带电荷的侧链也如此。

[0106] 根据本公开内容的一个实施方案,N-S-T序列可以是由选自IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG2c和IgG3的任一个的IgG重链的第297至第299位氨基酸组成的序列。

[0107] 根据本公开内容的一个实施方案,所述修饰可包含选自以下的至少一个替换:用SEQ ID NO:40的序列替换对应于SEQ ID NO:2的序列;用SEQ ID NO:37的序列替换对应于SEQ ID NO:3的序列;用SEQ ID NO:38的序列替换对应于SEQ ID NO:4的序列;以及用SEQ ID NO:39的序列替换对应于SEQ ID NO:5的序列。

[0108] 根据本公开内容的一个实施方案,动物可以是兔、山羊或小鼠,但不限于此。

[0109] 本公开内容的另一个方面提供了用于产生针对抗原的无糖基化抗体的方法,所述方法包括向动物模型施用待检测的抗原的步骤。

[0110] 根据本公开内容的一个实施方案,用于产生无糖基化抗体的方法可包括在施用抗原之后从转基因小鼠分离和纯化无糖基化抗体的过程。抗体的分离和纯化可使用本领域已

知的方法进行,例如使用柱进行的分离或使用蛋白G琼脂糖珠进行的分离,但不限于此。

[0111] 本公开内容的另一个方面提供了通过用于产生无糖基化抗体的方法所产生的无糖基化抗体。

[0112] 通过本公开内容的方法所产生的无糖基化抗体是其中糖链未添加至抗体重链的抗体,即,未经历糖基化反应的抗体。因此,可排除抗体与糖链部分的交联,并且因此该抗体可有效地用在用于糖链研究的多种分子生物学测定和用于疾病诊断的试剂盒中。

[0113] 本公开内容的另一个方面提供了免疫测定试剂盒,其包含:无糖基化抗体;和糖蛋白生物标志物。

[0114] 本公开内容的免疫测定试剂盒可包含例如免疫诊断条状物(면역진단용스트립)。所述条状物可包含但不限于:样品垫,其被配置为吸收生物样品;缀合垫,其包含与生物样品中存在的待检测疾病抗原特异性结合的无糖基化抗体;测试膜,其包含测试线和对照线,在测试线上固定有与待检测疾病抗原特异性结合的无糖基化抗体,在对照线上固定有对照抗体;以及吸收垫,其被配置为吸收在生物样品与各抗体之间的反应之后剩余的样品。另外,该条状物可还包含本领域免疫诊断中常用的试剂。

[0115] 术语“糖蛋白”是指其中2至6种类型的单糖与蛋白质共价连接的复合体蛋白质。糖蛋白存在于体内几乎所有细胞中。已知糖蛋白检测并识别胞外信号,发挥携带化学物质的作用,以及参与多种炎症和疾病。因此,可通过分析糖蛋白来诊断多种疾病。

[0116] 本文中使用的术语“免疫测定”是指基于特异性抗原-抗体反应来检测疾病感染、疾病发作、疾病进展等的方法。免疫测定的一些实例包括但不限于酶免疫测定、荧光免疫测定等。

[0117] 根据本公开内容的一个实施方案,糖蛋白生物标志物可通过凝集素来检测。

[0118] 本文中使用的术语“凝集素”是指与特定糖分子特异性结合的蛋白质。凝集素可以是用于在分子诊断领域中鉴定被糖链修饰的蛋白质的一种凝集素。

[0119] 根据本公开内容的一个实施方案,凝集素可以是L4-PHA(植物凝集素-L4)、LCA(小扁豆凝集素)、DSA(曼陀罗凝集素)、AAL(橙黄网胞盘菌凝集素)、选择素、ConA(伴刀豆球蛋白-A)、WGA(麦胚凝集素)、木菠萝素、SNA(黑接骨木凝集素)或半乳凝素,但不限于此。

[0120] 根据本公开内容的一个实施方案,糖蛋白可以是AFP-L3,但是也可包括对诊断特定疾病特别有效的生物标志物。

[0121] 已知在肝癌患者中AFP-L3的水平提高,并且在肝硬化患者和卵巢癌患者中CA-125(黏蛋白16,MUC16)的水平提高。由于凝集素不能与无糖基化抗体结合,因此可使用本公开内容的试剂盒来准确地测量生物样品中包含的糖蛋白的存在和量。具体地,在本公开内容中,特别地确定了通过使用AAL作为由本公开内容的无糖基化抗体产生动物模型产生的无糖基化抗体来测量AFP-L3的量,可以可靠地诊断肝癌。

[0122] 根据本公开内容的一个实施方案,使用本公开内容的免疫测定试剂盒分析糖蛋白的方法可进行本领域已知的另外的蛋白质分析方法,并且该另外的方法的一些实例包括但不限于Western印迹测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、放射免疫测定(otA)、辐射免疫扩散、电泳、免疫沉淀测定、FACS和蛋白质芯片测定。

[0123] 发明实施方式

[0124] 在下文中,将参考一个或多个实施例来更详细地描述本公开内容。然而,这些实

施例用于通过举例的方式来解释本公开内容,并且本公开内容的范围不限于这些实施例。

[0125] 实施例1.用于产生和评价无糖基化抗体产生小鼠的方法

[0126] 1-1.动物制备

[0127] 动物的使用和护理程序由KRIBB的机构动物护理和使用委员会(IACUC)审查和批准。从C57BL/6J小鼠获得合子,并使用ICR雌性小鼠作为接受体。使基因经编辑的C57BL/6J小鼠与Balb/c小鼠回交。使所有动物均在无病原体的设施中繁殖,该设施具有24℃的恒定温度、40%的湿度以及12小时光照/12小时黑暗的周期。

[0128] 1-2.ABE(腺嘌呤碱基编辑器)mRNA的制备

[0129] pCMV-ABE7.10(Addgene,#102919)和xCas9(3.7)-ABE(7.10)(Addgene,#108382)质粒载体均购自Addgene。将质粒用AgeI(NEB)在37℃下消化2小时,并使用PCR纯化试剂盒(Qiagen)对经线性化载体进行纯化。将1μg经纯化的载体用作模板以使用mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra试剂盒(Thermo Fisher Scientific)进行mRNA合成。使用MEGAclear试剂盒(Thermo Fisher Scientific)分离mRNA,并将其在冷存管小瓶中等分,并随后储存在液氮中。所使用的ABE的核苷酸序列示于下表1中。

[0130] [表1]

ABE; SEQ ID NO: 1	
[0131]	ggaaaatattatccatttgttactcttaccacactcggcgctccagccgattcaagtatttggacacaacgatagatcgcaaacgatacacttctaccaaggagggtgctagacgcgacactgattcaccaatccatcacgggattatatgaaactcggatagattgtcacagcttgggggtgactctggtggttctcccaagaagaagaggaaagtctaa

[0132] 1-3.通过显微注射和电穿孔进行的基因组编辑和合子移植

[0133] 在PMSG激素(5IU,Merck)注射之后,以48小时的间隔将hCG激素(5IU)注射到C57BL/6J雌性小鼠(5周龄)的腹膜腔中。使雌性小鼠与9周龄的C57BL/6J雄性小鼠交配,并从雌性小鼠的输卵管壶腹收集单细胞合子。通过在包含3mg/ml透明质酸酶(Merck)的M2培养基中孵育来去除卵丘细胞。使用Femtojet显微注射器(Eppendorf,Germany)与LEICA DMIRB操纵仪(Leica Microsystems)将包含具有实施例1-2的表1中所示核苷酸序列的3μg/μl ABE mRNA和用于与靶DNA结合的3μg/μl sgRNA(Toolgen,Korea)的混合物显微注射到合子的胞质中。

[0134] [表2]

[0135]	名称	CRISPR靶向核苷酸序列(5'→3')	SEQ ID NO
	Ighg1	TCAACAGCACTTCCGTTC AGT	SEQ ID NO:2
	Ighg2b	TACAACAGTACTATCCGGG TGG	SEQ ID NO:3
	Ighg2c	TACAACAGTACTCTCCGGG TGG	SEQ ID NO:4
	Ighg3	TACAACAGTACCTTCCGAG TGG	SEQ ID NO:5

[0136] 同时,对于基因组编辑,通过将500ng/μl sgRNA和400ng/μl ABE mRNA(在实施例1-2中制备)溶解在opti-MEM(Gibco)中来制备电穿孔混合物。将合子悬浮在电穿孔混合物中,并使用NEPA 21电穿孔器(NEPA GENE)根据制造商的方案进行电穿孔。

[0137] 在显微注射或电穿孔之后,将合子在KSOM+AA培养基(Millipore)中,在补充有5% CO₂的培养箱中于37℃下孵育,并培养直至二细胞期。然后,将活细胞移植到假孕接受体小

鼠的输卵管中。

[0138] 1-4. 基因型分型

[0139] 从1周龄的幼仔对趾进行解剖以分离基因组DNA。

[0140] [表3]

[0141]

引物	引物核苷酸序列 (5'→3')	PCR产物尺寸 (bp)			SEQ ID NO
		对照	A	G	
Ighg 1_ARMS_外_F	TCCCAGAAGTATCA TCTGTC	321	203	147	SEQ ID NO: 6
Ighg 1_ABE+G-ARMS F_14+G	GGAGGAGCAGATC AG				SEQ ID NO: 7
Ighg 1_ABE-A-ARMS R_15	AACGGAAAGTGCT GT				SEQ ID NO: 8
Ighg 1_ARMS_外_R	CTTTGGTTTTGGAG ATGGTT				SEQ ID NO: 9
Ighg 2b_ARMS_外 F	CTAACCTCGAGGGT GG	476	209	296	SEQ ID NO: 10
Ighg 2b_ABE+G-ARMS R_14+G	ATAGAGAGGATTA CG				SEQ ID NO: 11

[0142]	Ighg 2b_ABE-A-ARMS R 15	CCGGATAGTACTGT T				SEQ ID NO: 12
	Ighg 2b_ARMS_外_R	GGCGGCAAGATGT ATAC				SEQ ID NO: 13
	Ighg 2c_ARMS_外 F	CATGCGCAGGTAA GTC	403	330	102	SEQ ID NO: 14
	Ighg 2c_ABE+G-ARMS F _14+G	ATAGAGAGGATTA CG				SEQ ID NO: 15
	Ighg 2c_ABE-A-ARMS R_15	CCGGAGAGTACTGT T				SEQ ID NO: 16
	Ighg 2c_ARMS_外_R	TGTTGTTGACCTTG CATTG				SEQ ID NO: 17
	Ighg 3_ARMS_外_F	CTGGTAACATCTTG GGTGGA	506	212	323	SEQ ID NO: 18
	Ighg 3_ABE+G-ARMS F_14+G	GTGAAGCTCAGTAC G				SEQ ID NO: 19
	Ighg 3_ABE-A-R_15	TCGGAAGGTACTGT T				SEQ ID NO: 20
	Ighg 3_ARMS_外_R	TTCTTCTTGGACAT TTGTT				SEQ ID NO: 21

[0143] 对于单碱基编辑,使用H-Taq (Biofact) 通过ARMS (扩增受阻突变系统) 使用上表3中所示的引物进行基因型的预筛选,并且对在靶位点处仅具有鸟嘌呤带的样品进行Sanger测序分析。使用Pfu和特定引物(表4)对靶基因座进行PCR扩增,并通过对PCR产物进行Sanger测序来确定最终突变。

[0144] [表4]

[0145]

引物		引物核苷酸序列 (5'→3')	SEQ ID NO
IgG 亚类_Ighg1	正向	GCAGCACCAAGGTGGAC AAG	SEQ ID NO: 22
	反向	GTGCTGGGTGTGGCAGTG TA	SEQ ID NO: 23
IgG 亚类_Ighg2b	正向	CTCCTAACTCCGAGGGTG GA	SEQ ID NO: 24
	反向	GAGATGGTTCTTCCGATG GG	SEQ ID NO: 25
IgG 亚类_Ighg2c	正向	ACCATCCGTCTTCATCTT CC	SEQ ID NO: 26
	反向	TGTTGTTGACCTTGCATT TG	SEQ ID NO: 27
IgG 亚类_Ighg3	正向	CTGGTAACATCTTGGGTG GA	SEQ ID NO: 28
	反向	TGAGATGGTTCTCTCGAT GG	SEQ ID NO: 29
Fut8_外显子 9	正向	ACCAGTGTC AATGCGAGC AT	SEQ ID NO: 30
	反向	TTTCAAGGGCCAGGAAG ACT	SEQ ID NO: 31

[0146]	Fut8_外显子 11	正向	GTGAAAGGTGGGAGGAG GGT	SEQ ID NO: 32
		反向	TCCAGATGATTCTCATGC ATGCT	SEQ ID NO: 33

[0147] 1-5. 杂交瘤细胞的制备

[0148] 通过将50μg的人AFP (Mybiosource) 溶解于100μl的TiterMax Gold佐剂 (Merck) 中来制备抗原溶液, 并以1周的间隔将其注射到基因组编辑小鼠 (6周龄) 的足垫中4次。在最后注射之后, 解剖淋巴结, 收集B细胞, 并随后根据常规方法将其与骨髓瘤FO细胞融合。将单融合细胞置于培养皿中, 并将其在补充有20%FBS、1×HAT (100μM次黄嘌呤、0.4μM氨基蝶呤和16μM胸苷) (Merck) 以及1×抗生素-抗真菌溶液 (100单位/ml青霉素、100μg/ml硫酸链霉素和0.25μg/ml两性霉素B) (Welgene, Korea) 的培养基中培养2周。使用间接ELISA测试来筛选产生针对hAFP的抗体的阳性克隆。通过将hAFP以1μg/ml的浓度溶解于PBS中来制备人AFP溶液。使用抗原溶液 (100ul) 来包被96孔板 (Thermo Fisher Scientific) 的表面。在封闭之后, 将条件培养基稀释100倍, 添加至经包被孔板的孔, 并随后在其中孵育。在用TBS-吐温-20 (0.02%) 洗涤3次之后, 进行用与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗小鼠二抗 (Cell Signaling Technology, 以1:2000稀释) 进行的处理, 随后是用TMB-ultra溶液 (Thermo Fisher Scientific) 进行的处理。通过添加100μl的0.2N H₂SO₄来终止化学反应, 并随后使用VERSA max微板读取仪 (Molecular Devices) 测量在450nm处的吸光度。将阳性克隆在无血清培养基 (Gibco) 中培养以产生无糖基化单克隆抗体。

[0149] 1-6. 单克隆抗体的产生

[0150] 将实施例1-5中制备的杂交瘤细胞在无血清培养基 (Gibco) 中, 在补充有5%CO₂的室中, 以100RPM在搅拌下培养72小时。收集条件培养基, 并通过在13,000g下离心30分钟去除细胞碎片。剩余的碎片通过经由0.22μm注射器过滤器 (Millipore) 进行的过滤来去除。使用FPLC系统 (AKTA纯化器, GE Healthcare Life Sciences), 用HiTrapTM Protein G HP柱 (GE Healthcare Life Sciences) 对滤液进行纯化。将柱用PBS (磷酸盐缓冲盐水) 平衡, 并且使滤液以1分钟/ml的流量通过柱, 并将结合的蛋白质用50mM甘氨酸-HCl (pH 2.5) 以3ml/分钟的流量洗脱。将洗脱的级分用1M Tris-HCl (pH 8.0) 中和, 并随后与稳定蛋白质的混合物溶液 (Thermo Fisher Scientific) 混合, 随后在-20°C下储存。

[0151] 1-7. FUT8敲除细胞的制备

[0152] 通过将杂交的寡核苷酸对克隆到pSpCas9 (BB) -2A-Puro (PX459) 载体 (Addgene质粒#48139) 中来产生靶向FUT8的指导RNA构建体 (表5)。

[0153] [表5]

名称	CRISPR靶向核苷酸序列 (5' → 3')	SEQ ID NO
Fut8-e9-sgRNA#1	TACTACCTCAGTCAGACAGA	SEQ ID NO:34
Fut8-e9-sgRNA#2	AACCAGTTCTGTCAGATCTT	SEQ ID NO:35
Fut8-e11-sgRNA#1	CACCCAGCGAACACTCATCT	SEQ ID NO:36

[0155] 具体地,将10 μ g载体用50单位的BbsI消化1小时,并使用凝胶提取试剂盒(Solgent)对经消化载体进行凝胶提取,并随后将配对的gRNA(10pmol)克隆到经线性化载体中。通过Sanger测序确定靶序列。使用电穿孔器(Neon,Invitrogen)在以下参数的情况下将载体构建体(10 μ g)用于转染HEK293-T细胞(8×10^5 个细胞):电压1300V,脉冲宽度10ms和脉冲数3。将单细胞置于每个孔中以形成克隆,并且通过Sanger测序进行每个克隆的基因型分型以筛选FUT8^{-/-}克隆。

[0156] 1-8. μ -Tas分析

[0157] 在自动分析仪(mTAS Wako i30,Wako Pure Chemical Industries,Osaka,Japan)上使用微芯片毛细管电泳和液相结合测定在剩余血清样品中测量甲胎蛋白AFP-L3。对于AFP,测量范围为0.3至2000ng/ml,并且在AFP水平超过0.3ng/ml的血清中计算AFP-L3水平。如果样品的AFP水平为2000ng/ml或更高,则将样品基于先前的结果根据制造商的说明手动稀释。所有测试均在釜山国立大学梁山医院进行,并且在测试之前未提供有关对象的信息。

[0158] 1-9.免疫荧光测定

[0159] 使经编辑的HEK293-T细胞(2×10^4)在DMEM培养基中于18mm \times 18mm盖玻片上生长1天。将细胞用BD cytofix/cytoperm溶液(BD Bioscience)固定12小时。然后将细胞在存在9ng/ μ l PhoSL-Alexa 488的情况下于室温下孵育2小时。在用PBS洗涤3次之后,将盖玻片密封在包含1.5 μ g/ml DAPI的Vectashield装片介质(Vector Laboratories)中。在Zeiss LSM510 Meta显微镜(Carl Zeiss MicroImaging)上监测荧光。

[0160] 1-10.夹心凝集素-ELISA

[0161] 将ELISA孔板用溶解在0.1M碳酸氢钠缓冲液(pH 7.4)中的0.5 μ g的抗-hAFP小鼠单克隆抗体(#ab54745,Abcam)或抗-hAFP无糖基化抗体于4 $^{\circ}$ C下包被过夜。将板用TBS-0.1%吐温-20洗涤两次,并用无蛋白质封闭缓冲液(Thermo Fisher Scientific)和0.5%聚乙烯醇加0.1%吐温-20在室温下封闭1小时。将临床样品或培养基(100 μ l)分配到每个孔中。将每个孔用RIPA缓冲液(25mM Tris-HCl 7.6、150mM NaCl、1%NP40、1%脱氧胆酸钠、0.1%SDS)洗涤至少5次,并用TBS-T再次洗涤。然后,将每个孔用以1:2000稀释的抗hAFP兔多克隆抗体(#ab8201,Abcam)或以1:1000稀释的经生物素标记的AAL(橙黄网胞盘菌凝集素)(#B-1395,VECTOR Laboratories)在室温下处理1小时。在充分洗涤之后,将每个孔用1:2000稀释的抗兔二抗(Cell Signaling)或链霉亲和素(其各自均与HRP缀合)在室温下处理1小时。在用TBS-T简单洗涤之后,将100 μ l的TMP底物溶液(Thermo Fisher Scientific)添加到每个孔中,并用2N硫酸终止反应。然后,测量在450nm处的吸光度。

[0162] 1-11.稳定性测试

[0163] 通过将10 μ g的市售抗hAFP抗体(#MIA1305,Thermo Fisher Scientific)与100单位的PNGase-F(NEB)在快速PNGase-F(非还原形式)缓冲液中于50 $^{\circ}$ C下孵育15分钟来制备去糖基化抗体。通过将糖基化、去糖基化或无糖基化抗体在PBS缓冲液中于4 $^{\circ}$ C或37 $^{\circ}$ C下孵育多至14天来测量时间和温度依赖性的蛋白质稳定性。使经孵育的抗体在4%至20%的Mini-Protein TGXTM凝胶(Bio-Rad)上进行电泳,并通过考马斯蓝染色使其可视化。蛋白质稳定性还可通过将抗体在调节至pH 3.0、7.0或10.0的0.1M磷酸盐缓冲液中孵育0至14天来监测。或者,将每种抗体在包含0至3% H_2O_2 的PBS缓冲液中在培养箱中于37 $^{\circ}$ C下孵育5小时。通过上述ELISA测定来测量抗体的完整性。

[0164] 1-12. 统计学分析

[0165] 通过双尾Student's t检验在Sigma Plot中进行插失(indel)效率的统计学检验。P值<0.05被认为是显著的。

[0166] 实施例2. 通过基因组编辑进行的无糖基化抗体产生小鼠的建立

[0167] 免疫球蛋白(IgG)是在聚糖结构中显示出不均一性的N-连接的糖蛋白,如糖蛋白通常表现的那样。该分子性质限制了常规免疫测定(例如ELISA或CLIA)在使用聚糖特异性探针(包括凝集素)检测疾病特异性糖蛋白生物标志物中的用途。同时,即使在不存在分析物的情况下,凝集素也可与捕获抗体结合(图1),并且聚糖结构难以预测以及受制于批次间的变化,从而产生不可控制的饱和和空白值。该问题可通过使用合适的凝集素和无糖基化抗体,通过免疫测定平台ALIQUT(用于肿瘤标志物定量的无糖基化抗体-凝集素偶联免疫测定)通过特定的糖形测定来克服(图2)。因此,在该实施例中,通过基因组编辑建立了产生无糖基化抗体的小鼠。

[0168] 2-1. 小鼠合子中基因组编辑的确定

[0169] 已经开发了数种方法来提高HDR效率,但是与基于非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)的敲除效率相比, HDR效率仍然保持显著较低。最近,已经开发了碱基编辑系统,其中可进行‘C-G至T-A’和‘A-T至G-C’的转换而无双链DNA断裂,但是胞嘧啶或腺嘌呤碱基编辑器的效率高。C57BL/6小鼠的IgG基因的序列分析揭示了在碱基编辑窗内, IgG2b、IgG2c和IgG3在N-糖基化天冬酰胺编码序列(AAC)处共享可编辑的腺嘌呤(图3)。一个或两个腺嘌呤向鸟嘌呤的转换产生了非天冬酰胺编码序列,从而从IgG中消除了N-聚糖。

[0170] 因此,为了建立无糖基化抗体产生小鼠,根据实施例1-3,将ABE7.10mRNA以及靶向IgG2b、IgG2c和IgG3的指导RNA注射到C57BL/6小鼠的合子中,以诱导对相应基因的修饰。此后,根据实施例1-4进行基因型分型。通过扩增受阻突变系统(ARMS)对出生的幼仔(n=24)进行基因型分型,其中如箭头所示设计引物以在进行A至G转换时产生不同尺寸的另外的PCR产物(图4)。

[0171] 测定结果表明,对于所有IgG基因均观察到高度有效的A至G转换。转换率(至少一个基因座的转换)为79.1%(19/24)(对于IgG2c)、87.5%(21/24)(对于IgG2b)以及62.5%(15/24)(对于IgG3)。对基因型筛选结果的比较确定了显示出在3个基因处显示同时的转换的15只幼仔,使其中9只单独进行了Sanger测序分析。作为结果,确认了所有9只幼仔均被确定为在3个基因基因座(IgG2c(图5)、IgG2b(图6)和IgG3(图7))处携带突变,如果嵌合突变包括在的话。

[0172] 2-2. 具有经编辑的IgG2b、IgG2c、和IgG3基因的中间建立者小鼠的建立

[0173] 在实施例2-1中筛选的9只幼仔中,选择了一只幼仔(#11)用于在IgG1基因座处进行基因组编辑,因为其在IgG2c(图8)、IgG2b(图9)和IgG3(图10)基因中具有比其他幼仔更高的双等位基因“A至G”转换率。该幼仔在IgG2b处示出纯合突变,并且在IgG2c和IgG3处示出嵌合突变(图11)。

[0174] [表6]

[0175]

基因	经编辑的靶核苷酸序列(5' → 3')	SEQ ID NO
IgG2b	TACGACAGTACTCTCCGGGTGG	SEQ ID NO:37

IgG2c	TAC <u>G</u> ACAGTACTCTCCGGGTGG	SEQ ID NO:38
IgG3	TAC <u>G</u> ACAGTACCTTCCGAGTGG	SEQ ID NO:39

[0176] 使通过使基因组经编辑的幼仔与野生型C57BL/6小鼠杂交而产生的幼仔与杂合的突变体幼仔进行数轮的杂交并进行繁殖,以使得最终产生的幼仔携带突变体氨基酸基序D-S-T、D-G-T、G-S-T和G-G-T之一。出于以下原因,选择D-S-T突变体幼仔作为中间建立者:N-糖基化天冬酰胺残基位于免疫球蛋白β-夹心折叠的两条链之间的暴露环处,并且因此与甘氨酸(GST)不同,表现出与天冬酰胺相同的几何学的天冬氨酸可避免潜在的几何不稳定性,即使其具有带电荷的侧链也如此。排除两个突变,例如D-G-T或G-S-T的引入以使结构的修饰最小化(图12)。使该中间建立者繁殖并将其用于IgG1基因编辑。

[0177] 2-3. 具有经编辑的IgG1、IgG2b、IgG2c和IgG3基因的建立者小鼠的建立

[0178] IgG1的靶位点不包含典型(canonical) (NGG),但是靶标的两条链仅包含NG PAM序列。因此,使用靶向可能的邻近位点的供体DNA进行HDR介导的基因编辑,但无法产生具有经编辑IgG1基因的幼仔。因此,对于IgG1基因编辑,使用对NG序列表现出基因靶向活性的实施例1-2的xCas9-ABE,根据实施例1-3对IgG1基因进行编辑。

[0179] 作为结果,异质转换出现在两只幼仔中,在其中,一个等位基因被转换成丝氨酸编码序列(TCA G CAGCACTTTCGGTTCAGT;IgG1;SEQ ID NO:40) (图13)。使经编辑的幼仔进行数轮的杂交和繁殖,直至获得纯合的IgG1突变。所有突变均显示出种系传递,并且成功地建立了在IgG1、IgG2b、IgG2c和IgG3处具有堆叠的无糖基化突变的建立者。通过Sanger测序再次确定了4个等位基因处的突变。有关基因组编辑程序的详细信息示于下表7中。

[0180] [表7]

亚类	方法	效应蛋白	效应物 /gRNA	氨基酸修饰	合子的数目			出生的幼仔	突变体 (单等位基因 /双等位基因)
					收集的	注射的	移植的		
[0181] IgG1	腺嘌呤 碱基编 辑	xCas9-AB E7.10	mRNA/RN A	NST→SST	211	196	32	10	7/0
IgG2b		ABE7.10							10/11
IgG2c				NST→DST	405	317	112	24	12/7
IgG3									5/10

[0182] 实施例3. 基因组经编辑小鼠中针对人AFP的无糖基化单克隆抗体的产生的确定

[0183] 3-1. 产生免疫球蛋白的每种亚类的能力的确定

[0184] 免疫球蛋白G (IgG) 的N-糖基化在高等真核生物体(包括小鼠、兔和人)中是高度保守的。尽管有报道称IgG N-糖基化赋予稳定性或参与免疫应答调节,但高等生物体是否采用IgG的N-糖基化由于进化压力仍不清楚。

[0185] 因此,为了检查是否产生缺陷型IgG,使用免疫球蛋白同种型分型试剂盒对来源于

实施例2中建立的基因组经编辑小鼠的IgG进行IgG谱分析。

[0186] 作为结果,确定了基因组经编辑小鼠显示出与野生型小鼠相同的谱(图14),而具有IgG2b(图15)和IgG3(图16)基因的敲除的小鼠在相应亚类的产生中显示出缺陷。

[0187] 该结果确定了基因组经编辑小鼠保留了产生免疫球蛋白的每个亚类的能力。

[0188] 3-2. 无糖基化抗体产生的确定

[0189] 检查由基因组经编辑小鼠产生的抗体是否为无糖基化抗体。

[0190] 具体地,使用作为肝细胞癌的最佳表征的肿瘤标志物之一的人AFP作为模型抗原。将用等量的佐剂乳化的hAFP以1周的间隔注射到6周龄基因组经编辑小鼠(n=5)的后足垫中5次。在每个免疫接种步骤收集血清,并将其用于针对hAFP的直接ELISA分析。

[0191] 作为结果,确定了反应性随时间提高(图17),表明发生了免疫接种。

[0192] 在免疫接种完成之后,根据实施例1-5,从小鼠收集脾淋巴结细胞并将其与F0骨髓瘤细胞融合。使杂交瘤细胞在含次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸苷(hypoxanthine-aminopterin-thymidine, HAT)的板上形成集落,从而获得666个杂交瘤克隆。

[0193] 作为结果,确定了在杂交瘤克隆中,93个克隆(13.9%)分泌对hAFP具有高度反应性的抗体(图18)。

[0194] 3-3. 具有优异单克隆抗体产生率的杂交瘤克隆的选择

[0195] 由于抗-hAFP抗体可显示出针对人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)中存在的表位的交叉反应性,因此检查了对HSA的反应性并排除了反应性克隆。另外,排除了显示出随时间抗体产生降低的克隆,并选择了显示出连续抗体产生的3个克隆,并且将其分别命名为1E5、2A2和3A5。确定了这3个克隆均分泌IgG1亚类和 κ 轻链的单克隆抗体(图19)。另外,MS分析确定了在新形成的突变区域中无翻译后修饰,例如O-连接的糖基化。

[0196] 3-4. 在所选择的杂交瘤克隆中产生的抗体的无糖基化的确定

[0197] 为了进一步确定所产生的抗体是完全无糖基化的,进行了使用伴刀豆球蛋白-A(Con-A)的凝集素印迹分析和使用抗小鼠IgG抗体的免疫印迹分析。

[0198] 作为结果,确定了不同于如箭头所示的与Con-A反应的商购抗体,抗体(1E5)的重链不具有N-聚糖(图20)。尽管IgG允许N-聚糖转移至CH2区的外部,但是确定了在实施例3-3中所选择的3个克隆未显示出N-糖基化的痕迹(图21)。

[0199] 实施例4. 通过凝集素偶联的ELISA对无糖基化抗体进行的可行性测试

[0200] 4-1. 产生L3-Nu11 AFP标准品的FUT8^{-/-} 夹变体克隆的制备

[0201] HEK293-T细胞表达 α -(1,6)-岩藻糖基转移酶(FUT8),其催化GDP-岩藻糖向核心N-聚糖的转移。FUT8基因存在3个剪接变体,并且外显子9和11属于糖基转移酶家族23,其与催化活性相关,并且由所有变体共享。

[0202] 为了建立ALIQAT(用于肿瘤标志物定量的无糖基化抗体-凝集素偶联免疫测定)系统,在根据实施例1-10的夹心ELISA平台中测试所产生的无糖基化抗体的可行性之前,根据实施例1-7使用CRISPR-Cas9分别靶向外显子9和11以产生L3-null AFP,因为其对于获得AFP-L3缺陷型hAFP标准品而言是重要的。

[0203] 作为结果,获得了显示出移码的无义突变的每个FUT8^{-/-} 突变体克隆(图22)。

[0204] 4-2. FUT8^{-/-} 细胞是否产生AFP-L3的检查

[0205] 为了研究由于FUT8基因消融而引起的功能损失,使用已知对核心-岩藻糖基化N-

聚糖显示出特异性结合特性的、来源于蕈菌翘鳞环锈伞 (mushroom *Pholiota squarrosa*) (PhoSL) 的凝集素根据实施例1-9测试凝集素结合。免疫荧光分析结果表明, FUT8^{-/-} HEK293-T细胞对PhoSL结合具有抗性 (图23)。

[0206] 同时, hAFP在野生型和FUT8^{-/-} HEK293-T细胞二者中均过表达, 并且收集条件培养基用于凝集素亲和电泳。蛋白质的电泳在包含LCA的琼脂糖凝胶上进行, 在所述琼脂糖凝胶上AFP-L3和AFP-L1显示出不同的迁移率。使用抗-hAFP抗体通过免疫印迹使AFP的不同糖形可视化 (图24)。确定了AFP-L3包含从野生型HEK293-T细胞获得的大部分AFP糖形, 而FUT8^{-/-} 细胞不产生AFP-L3。另外, 质量分析确定了在FUT8^{-/-} 细胞中不存在AFP-L3形式, 并且在野生型细胞中产生的AFP-L3百分比为99.5% (图25)。在 μ -Tas分析中也获得了相似的结果。

[0207] 4-3. 在ALIQAT系统中的无糖基化抗体的可行性测试

[0208] 通过典型夹心ELISA和AAL凝集素偶联ELISA二者来产生标准曲线。

[0209] 具体地, 对于典型夹心ELISA, 使用无糖基化抗体 (1E5) 或商业抗体作为捕获抗体。从市售抗体选择检测抗体对, 已知其与捕获抗体一起成为匹配对。对标准曲线的分析表明, 尽管灵敏度比经验证的商业抗体低, 但是无糖基化抗体在0至20ng/ml AFP的范围内显示出良好线性 (图26)。

[0210] 使用AAL凝集素通过AFP-L3测试表明了无糖基化抗体的可行性 (图27)。使用商业抗体的凝集素ELISA显示出相当大的空白值, 并且L3阳性AFP浓度的提高并未反映出光密度的线性提高, 从而导致高的标准误差。对于L3阳性和L3阴性的AFP样品二者, 也类似地观察到该模式。然而, 对于L3阳性AFP样品, 使用无糖基化抗体进行的凝集素-ELISA测试产生了具有良好线性的标准曲线。在0至1,000ng/ml的范围内未观察到干扰, 并且确定了使用凝集素与无糖基化抗体的组合进行的测定为特定糖形的测定提供了有效的分析平台。

[0211] 实施例5. 基于无糖基化抗体的凝集素-ELISA hAFP测试代替 μ -TAS分析的可能性的确定

[0212] μ -TAS是一种分析AFP-L3在包含LCA的毛细管中电泳迁移率的体外诊断免疫分析仪。该分析仪的高灵敏度和稳健性以及AFP-L3测定的临床效用使 μ -TAS获得了FDA批准以用于体外评估HCC发展风险。尽管具有分析效度和临床效用, 但 μ -TAS分析在临床使用中仍具有数个限制。即, 其是一种高成本的测定, 这限制了其用于癌症筛查的常规临床用途。此外, μ -TAS已被开发用于AFP-L3测试, 并且其难以用于其他糖形分析。

[0213] 在另一方面, ALIQAT方法可提供用于检测广泛的疾病特异性糖形的全能且通用的平台。然而, 仅当糖形特异性探针和无糖基化抗体可用时, ALIQAT平台才可容易地应用于其他疾病特异性糖形的测试。对肿瘤特异性生物标志物具有特异性的多种凝集素已经是可用的。因此, 为了确定可由本公开内容的基因组经编辑小鼠容易地产生的无糖基化抗体是否可应用于ALIQAT方法, 通过将临床样品施加于化学发光免疫测定 (chemiluminescent immunoassay, CLIA) 平台来检查分析的效度, 在所述平台中, 无糖基化抗体 (1E5) 与磁珠缀合以检测血清中的hAFP, 并且岩藻糖基化的形式通过AAL来追踪。

[0214] 具体地, 将AFP-L3标准分子加入到AFP水平小于1ng/ml的正常血清中。标准曲线在0至100ng/ml的范围内显示出良好线性 (图28)。接下来, 从正常志愿者以及患有肝炎、肝硬化和HCC的患者中收集血清 (n=19)。将显示出高于100ng/mL的AFP水平的血清稀释, 以使得浓度在标准曲线范围内。将每种血清分成相等的体积, 并通过ALIQAT方法和根据实施例1-

8的 μ -TAS分析进行测量。

[0215] 将测量值绘制为在X轴上的AFP水平和在Y轴上的百分比AFP-L3。作为将从两个平台获得的值进行比较的结果,确定了比较分析显示 p 值 >0.05 ,表明两种测试基本上显示出相同的结果(图29)。

[0216] 实施例6.无糖基化抗体的保留的蛋白质稳定性

[0217] 已知蛋白质糖基化表现出多种作用,例如蛋白质功能、蛋白质-蛋白质相互作用和宿主细胞识别。另外,已知蛋白质聚糖在体内和体外赋予蛋白质稳定性(Bowden 2012)。因此,根据实施例1-11,检查了在储存和测试期间,通过去糖基化,抗体是否损失了蛋白质稳定性。

[0218] 具体地,为了研究在多种条件下抗体的稳定性,使用市售糖基化抗体和通过PNGase-F处理产生的去糖基化抗体形式作为对照。

[0219] 6-1.蛋白质的热稳定性的检查

[0220] 使不同形式的抗体在PBS缓冲液中在 4°C 和 37°C 下静置多至14天。确定了去糖基化抗体显示出两种不同的降解片段,如箭头所示(图30)。片段之一(分子量为约35kDa)被认为是由PNGase-F处理引起的,因为该片段是从早期孵育时间开始观察到的。在 37°C 时,分子量为约50kDa的片段随时间增多。然而,在所研究的条件下,原始的糖基化形式未显示出任何降解产物。类似地,本发明人在凝胶上无法检测到无糖基化抗体的降解产物的任何痕迹。

[0221] 这些结果表明,去糖基化反应的条件是稳定性损失的原因,而不是聚糖本身的缺乏。

[0222] 6-2.蛋白质的pH稳定性的检查

[0223] 根据多种反应条件或在纯化期间,抗体可暴露于pH变化。因此,检查了在不同pH条件下抗体的不同糖形的稳定性。

[0224] 具体地,在将抗体在pH 3.0、7.0和10.0的缓冲液中于 37°C 下孵育14天之后,将抗体用作hAFP测量中的捕获抗体。测量测试中的光密度值,并评价蛋白质的亲合力。作为结果,发现糖基化和无糖基化抗体显示出相似的稳定性(图31)。这两种抗体在中性(pH 7.0)下显示出14天的高稳定性,并且在碱性(pH 10.0)条件下显示出高抗性,而其稳定性在pH 3.0下以时间依赖性方式降低。相比之下,去糖基化形式显示出完整性的显著损失,即使在中性pH下也如此。在pH 7.0下孵育14天的抗体的约50%损失了其亲合力,并且该损失在于pH 10.0下孵育时更为明显。特别地,在于pH 3.0下孵育4天之后,去糖基化形式显示出亲合力的完全损失。

[0225] 6-3.在氧化条件下蛋白质稳定性的检查

[0226] 在氧化条件下检查抗体的完整性,并且作为结果,确定了糖基化和无糖基化抗体二者均显示出对这样的条件的抗性,这与去糖基化形式的物理特性形成显著对比(图32)。当在包含3.0% H_2O_2 的PBS缓冲液中孵育1小时时,无糖基化抗体显示出小于10%的稳定性损失。然而,确定了在这些条件下,去糖基化抗体损失了其亲合力的约50%。从这些结果,确定了无糖基化抗体的稳定性未变得低于糖基化免疫球蛋白G的稳定性。

[0227] 至此,已经参考一些实施方案描述了本公开内容。本公开内容所属领域的普通技术人员将理解,在不脱离本公开内容的基本特征的情况下,可以以修改的形式来实现本公开内容。因此,应当从举例说明性的角度而不是从限制性的角度考虑所公开的一些实施方

案。本公开内容的范围由权利要求书而不是前述描述来限定,并且在与其等效的范围内的所有差异都应被解释为被包含在本公开内容中。

<110>	Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology	
<120>	用于无糖基化抗体产生的转基因小鼠和由此产生的无糖基化抗体的用途	
<130>	PN180123-P1	
<160>	40	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	5328	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	ABE	
<400>	1	
	atgtccgaag tcgagttttc ccatgagtac tggatgagac acgcattgac tctcgcaaag	60
	agggcttggg atgaacgcga ggtgccccgtg ggggcagtac tcgtgcataa caatcgcgta	120
	atcggcgaag gttggaatag gccgatcgga cgccacgacc cactgcaca tgcggaaatc	180
	atggcccttc gacagggagg gcttgtgatg cagaattatc gacttatcga tgcgacgctg	240
	tacgtcacgc ttgaacctg cgtaatgtgc gcgggagcta tgattcactc ccgattgga	300
	cgagttgtat tcggtgcccc cgacgccaag acgggtgccg caggttact gatggacgtg	360
	ctgcatcacc caggcatgaa ccaccgggta gaaatcacag aaggcatatt ggcggacgaa	420
	tgtgcggcgc tgttgtccga cttttttcgc atgcggaggc aggagatcaa ggcccagaaa	480
	aaagcacaat cctctactga ctctggtggt tcttctggtg gttctagcgg cagcgagact	540
	cccgggacct cagagtccgc cacacccgaa agttctggtg gttcttctgg tggttcttcc	600
	gaagtcgagt tttcccatga gtactggatg agacacgcat tgactctcgc aaagagggct	660
	cgagatgaac gcgaggtgcc cgtgggggca gtactcgtgc tcaacaatcg cgtaatcggc	720
	gaaggttggga atagggcaat cggactccac gacccactg cacatgcgga aatcatggcc	780
	cttcgacagg gagggcttgt gatgcagaat tatcgactta tcgatgcgac gctgtacgtc	840
	acgtttgaac cttgcgtaat gtgcgcggga gctatgattc actcccgcac tggacgagtt	900
	gtattcgggtg ttcgcaacgc caagacgggt gccgcaggtt cactgatgga cgtgctgcat	960
	tacccaggca tgaaccaccg gtagaaaatc acagaaggca tattggcgga cgaatgtgcg	1020
	gcgctgttgt gttacttttt tcgcatgcc aggcaggtct ttaacgcca gaaaaagca	1080
	caatcctcta ctgactctgg tggttcttct ggtggttcta gcggcagcga gactcccggg	1140
	acctcagagt ccgccacacc cgaaagttct ggtggttctt ctggtggttc tgataaaaag	1200
	tattctattg gtttagccat cggcactaat tccgttggat gggctgtcat aaccgatgaa	1260
	tacaaagtac cttcaaagaa atttaaggtg ttggggaaca cagaccgtca ttcgattaaa	1320
	aagaatctta tcggtgcctt cctattcgat agtggcgaaa cggcagaggc gactcgctg	1380
	aaacgaaccg ctcggagaag gtatacacgt cgcaagaacc gaatatgtta cttacaagaa	1440
	atTTTTAGCA atgagatggc caaagttgac gattctttct ttcaccgttt ggaagagtcc	1500
	ttccttgtcg aagaggacaa gaaacatgaa cggcacccca tctttgaaa catagtagat	1560

gaggtggcat	atcatgaaaa	gtaccaacg	atttatcacc	tcagaaaaaa	gctagttgac	1620
tcaactgata	aagcggacct	gaggttaatc	tacttggctc	ttgcccatat	gataaagttc	1680
cgtgggcact	ttctcattga	gggtgatcta	aatccggaca	actcggatgt	cgacaaactg	1740
ttcatccagt	tagtacaaac	ctataatcag	ttgtttgaag	agaaccctat	aaatgcaagt	1800
ggcgtggatg	cgaaggctat	tcttagcgcc	cgctctcta	aatcccgcag	gctagaaaac	1860
ctgatcgcac	aattaccggg	agagaagaaa	aatgggttgt	tcggtaacct	tatagcgctc	1920
tcactaggcc	tgacacccaa	ttttaagtcg	aacttcgact	tagctgaaga	tgccaaattg	1980
cagcttagta	aggacacgta	cgatgacgat	ctcgacaatc	tactggcaca	aattggagat	2040
cagtatgcgg	acttattttt	ggctgceaaa	aaccttagcg	atgcaatcct	cctatctgac	2100
atactgagag	ttaatactga	gattaccaag	gcgccgttat	ccgcttcaat	gatcaaaagg	2160
tacgatgaac	atcaccaaga	cttgacactt	ctcaaggccc	tagtccgtca	gcaactgcct	2220
gagaaatata	aggaaatatt	ctttgatcag	tcgaaaaacg	ggtacgcagg	ttatattgac	2280
ggcggagcga	gtcaagagga	attctacaag	tttatcaaac	ccatattaga	gaagatggat	2340
gggacggaag	agttgcttgt	aaaactcaat	cgccaagatc	tactgcgaaa	gcagcggact	2400
ttcgacaacg	gtagcattcc	acatcaaate	cacttaggcg	aattgcatgc	tatacttaga	2460
aggcaggagg	atTTTTatcc	gttctcaaaa	gacaatcgtg	aaaagattga	gaaaatccta	2520
acctttcgca	taccttacta	tgtgggaccc	ctggcccag	ggaactctcg	gttcgcatgg	2580
atgacaagaa	agtccgaaga	aacgattact	ccatggaatt	ttgaggaagt	tgtcgataaa	2640
ggtgcgtcag	ctcaatcgtt	catcgagagg	atgaccaact	ttgacaagaa	tttaccgaac	2700
gaaaaagtat	tgcttaagca	cagtttactt	tacgagtatt	tcacagtgtg	caatgaactc	2760
acgaaagtta	agtatgtcac	tgagggcatg	cgtaaaccgg	cctttctaag	cggagaacag	2820
aagaaagcaa	tagtagatct	gttattcaag	accaaccgca	aagtgacagt	taagcaattg	2880
aaagaggact	actttaagaa	aattgaaatg	ttcgattctg	tcgagatctc	cggggtagaa	2940
gatcgattta	atgcgtcact	tggtagtat	catgacctcc	taaagataat	taaagataag	3000
gacttcttgg	ataacgaaga	gaatgaagat	atcttagaag	atatagtgtt	gactcttacc	3060
ctctttgaag	atcgggaaat	gattgaggaa	agactaaaaa	catacgctca	cctgttcgac	3120
gataaggtta	tgaaacagtt	aaagaggcgt	cgctatacgg	gctggggacg	attgtcgcgg	3180
aaacttatca	acgggataag	agacaagcaa	agtggtaaaa	ctattctcga	ttttctaaag	3240
agcgacggct	tcgccaatag	gaactttatg	cagctgatcc	atgatgactc	tttaaccttc	3300
aaagaggata	tacaaaaggc	acaggtttcc	ggacaagggg	actcattgca	cgaacatatt	3360
gcgaatcttg	ctggttcgcc	agccatcaaa	aagggcatac	tccagacagt	caaagtagtg	3420
gatgagctag	ttaaggtcat	gggacgtcac	aaaccggaaa	acattgtaat	cgagatggca	3480
cgcgaaaaatc	aaacgactca	gaaggggcaa	aaaaacagtc	gagagcggat	gaagagaata	3540
gaagagggta	ttaaagaact	gggcagccag	atcttaaagg	agcatcctgt	ggaaaatacc	3600
caattgcaga	acgagaaact	ttacctctat	tacctacaaa	atggaaggga	catgtatgtt	3660
gatcaggaac	tggacataaa	ccgtttatct	gattacgacg	tcgatcacat	tgtaccccaa	3720
tcctttttga	aggacgattc	aatcgacaat	aaagtgttta	cacgctcgga	taagaaccga	3780
gggaaaagtg	acaatgttcc	aagcgaggaa	gtcgtaaaga	aaatgaagaa	ctattggcgg	3840
cagctcctaa	atgcgaaact	gataacgcaa	agaaagttcg	ataacttaac	taaagctgag	3900

aggggtggct tgtctgaact tgacaaggcc ggatttatta aacgtcagct cgtggaacc	3960
cgccaaatca caaagcatgt tgacagata ctagattccc gaatgaatac gaaatacgac	4020
gagaacgata agctgattcg ggaagtcaaa gtaatcactt taaagtcaaa attggtgtcg	4080
gacttcagaa aggatthtca attctataaa gttagggaga taaataacta ccaccatgcg	4140
cacgacgctt atcttaatgc cgtcgtagg accgcactca ttaagaaata cccgaagcta	4200
gaaagtgagt ttgtgtatgg tgattacaaa gtttatgacg tccgtaagat gatcgcgaaa	4260
agcgaacagg agataggcaa ggctacagcc aaatacttct tttattctaa cattatgaat	4320
ttctttaaga cggaaatcac tctggcaaac ggagagatac gcaaacgacc ttttaattgaa	4380
accaatgggg agacaggatga aatcgtatgg gataaggcc gggacttcgc gacggtgaga	4440
aaagttttgt ccatgcccc aagcaacata gtaaagaaaa ctgaggtgca gaccggaggg	4500
ttttcaaagg aatcgattct tccaaaaagg aatagtgata agctcatcgc tcgtaaaaag	4560
gactgggacc cgaaaaagta cgggtgcttc gatagcccta cagttgcta ttctgtccta	4620
gtagtggcaa aagttgagaa gggaaaatcc aagaaactga agtcagtcaa agaattattg	4680
gggataacga ttatggagcg ctctctttt gaaaagaacc ccatcgactt ccttgaggcg	4740
aaaggttaca aggaagtaaa aaaggatctc ataattaaac taccaaagta tagtctgttt	4800
gagttagaaa atggccgaaa acggatgttg gctagcggc gagagcttca aaaggggaac	4860
gaactcgcac taccgtctaa atacgtgaat ttctgtatt tagcgtcca ttacgagaag	4920
ttgaaagggt cacctgaaga taacgaacag aagcaacttt ttgttgagca gcacaaacat	4980
tatctcgacg aaatcataga gcaaatttcg gaattcagta agagagtcac cctagctgat	5040
gccaatctgg acaaagtatt aagcgcatac aacaagcaca gggataaacc catacgtgag	5100
caggcggaaa atattatcca ttgtttact cttaccaacc tcggcgctcc agccgcattc	5160
aagtatthtg acacaacgat agatcgaaa cgatacactt ctaccaagga ggtgctagac	5220
gcgacactga ttcaccaatc catcacggga ttatatgaaa ctcgataga tttgtcacag	5280
cttgggggtg actctggtgg ttctccaag aagaagagga aagtctaa	5328
<210> 2	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Ighg1	
<400> 2	
tcaacagcac tttccgttca gt	22
<210> 3	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Ighg2b	
<400> 3	

tacaacagta ctatccgggt gg	22
<210> 4	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Ighg2c	
<400> 4	
tacaacagta ctctccgggt gg	22
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Ighg3	
<400> 5	
tacaacagta ccttccgagt gg	22
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Ighg 1_ARMS_外_F	
<400> 6	
tcccagaagt atcatctgtc	20
<210> 7	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Ighg 1_ABE+G-ARMS F_14+G	
<400> 7	
ggaggagcag atcag	15
<210> 8	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> Ighg 1_ABE-A-ARMS R_15	

<400>	8	
	aacggaaagt gctgt	15
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 1_ARMS_外_R	
<400>	9	
	ctttggtttt ggagatggtt	20
<210>	10	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 2b_ARMS_外F	
<400>	10	
	ctaacctcga gggtagg	16
<210>	11	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 2b_ABE+G-ARMS R_14+G	
<400>	11	
	atagagagga ttacg	15
<210>	12	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 2b_ABE-A-ARMS R 15	
<400>	12	
	ccgatagta ctggt	15
<210>	13	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	Ighg 2b_ARMS_外_R	
<400>	13	
	ggcggcaaga tgtatac	17
<210>	14	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 2c_ARMS_外F	
<400>	14	
	catgcgcagg taagtc	16
<210>	15	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 2c_ABE+G-ARMS F _14+G	
<400>	15	
	atagagagga ttacg	15
<210>	16	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 2c_ABE-A-ARMS R_15	
<400>	16	
	ccggagagta ctggtt	15
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 2c_ARMS_外_R	
<400>	17	
	tgttggtgac cttgcatttg	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	Ighg 3_ARMS_外_F	
<400>	18	
	ctggtaacat cttgggtgga	20
<210>	19	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 3_ABE+G-ARMS F_14+G	
<400>	19	
	gtgaagctca gtacg	15
<210>	20	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 3_ABE-A-R_15	
<400>	20	
	tcggaaggta ctggt	15
<210>	21	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Ighg 3_ARMS_外_R	
<400>	21	
	ttcttcttgg acatttggt	19
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG亚类_Ighg1_F	
<400>	22	
	gcagcaccaa ggtggacaag	20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG亚类_Ighg1_R	
<400>	23	
	gtgctgggtg tggcagtgtg	20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG亚类_Ighg2b_F	
<400>	24	
	ctcctaactc cgagggtgga	20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG亚类_Ighg2b_R	
<400>	25	
	gagatggttc ttccgatggg	20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG亚类_Ighg2c_F	
<400>	26	
	accatccgtc ttcattcttc	20
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG亚类_Ighg2c_R	
<400>	27	
	tgttgttgac cttgcatttg	20
<210>	28	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG亚类_Ighg3_F	
<400>	28	
	ctggtaacat cttgggtgga	20
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG亚类_Ighg3_R	
<400>	29	
	tgagatggtt ctctcgatgg	20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fut8_外显子9_F	
<400>	30	
	accagtgtca atgcgagcat	20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fut8_外显子9_R	
<400>	31	
	tttcaagggc caggaagact	20
<210>	32	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fut8_外显子11_F	
<400>	32	
	gtgaaagggtg ggaggagggt	20
<210>	33	

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fut8_外显子11_R	
<400>	33	
	tccagatgat tctcatgcat gct	23
<210>	34	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fut8-e9-sgRNA#1	
<400>	34	
	tactacctca gtcagacaga	20
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fut8-e9-sgRNA#2	
<400>	35	
	aaccagttct gtcagatctt	20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Fut8-e11-sgRNA#1	
<400>	36	
	cacccagcga aactcatct	20
<210>	37	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG2b	
<400>	37	
	tacgacagta ctctccgggt gg	22

<210>	38	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG2c	
<400>	38	
tacgacagta ctctccgggt gg		22
<210>	39	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG3	
<400>	39	
tacgacagta ccttccgagt gg		22
<210>	40	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	IgG1	
<400>	40	
tcagcagcac tttccgttca gt		22

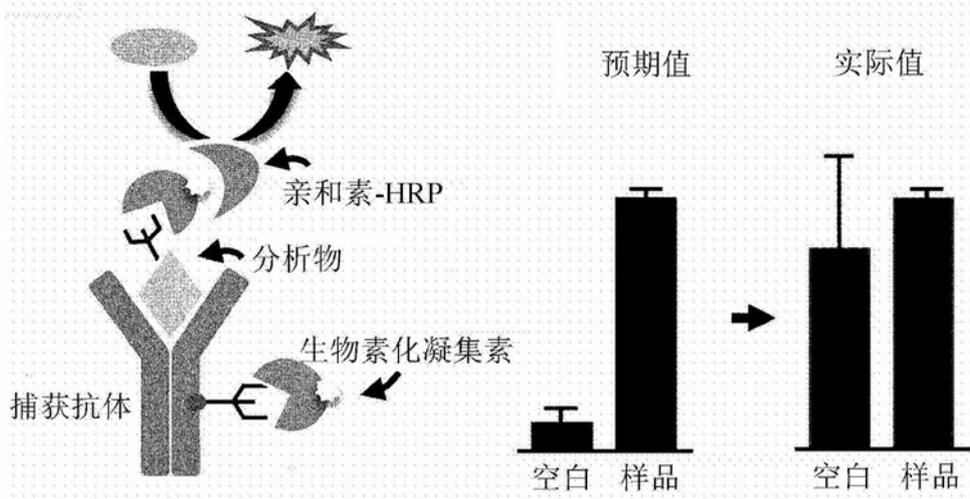


图1

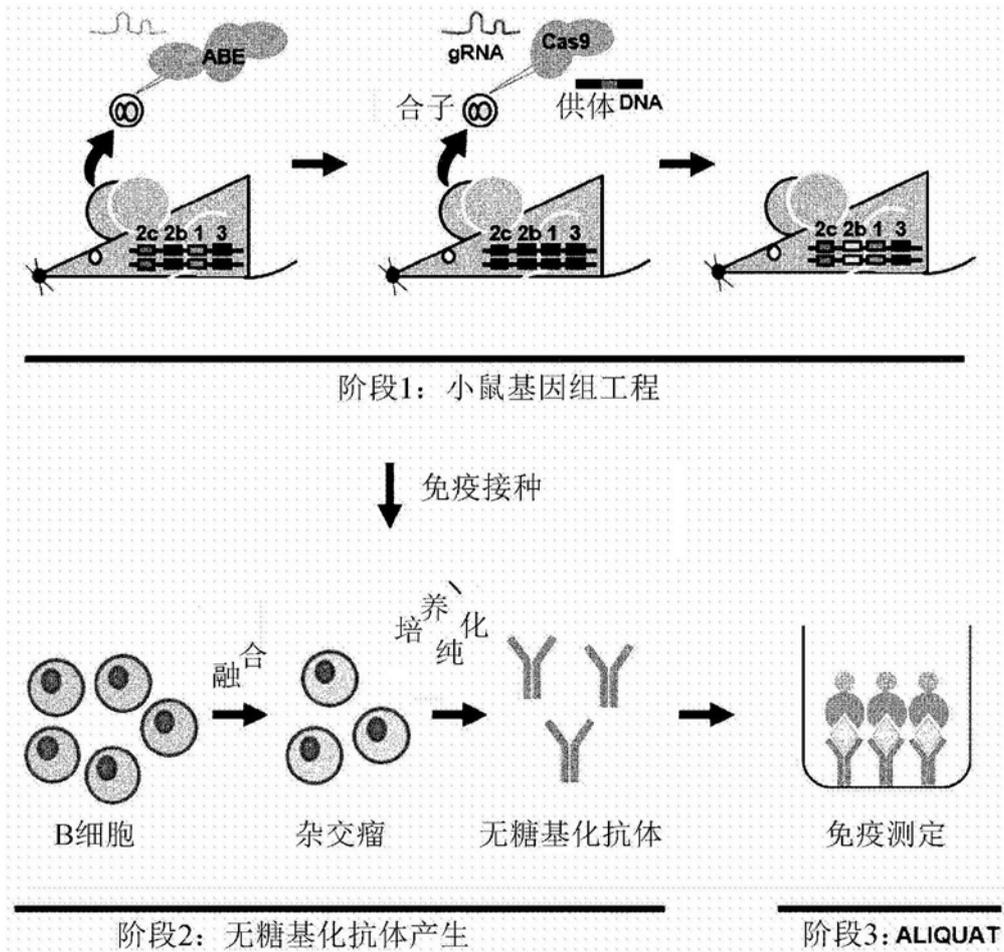


图2

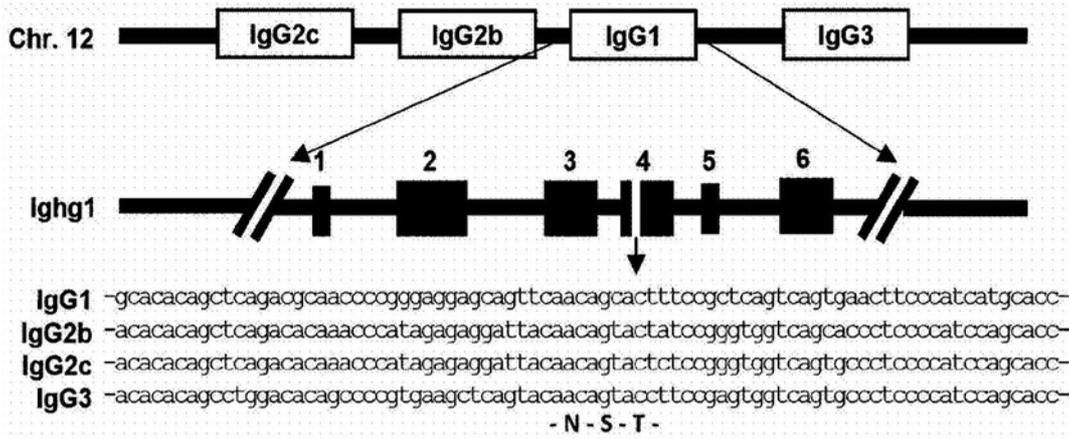


图3

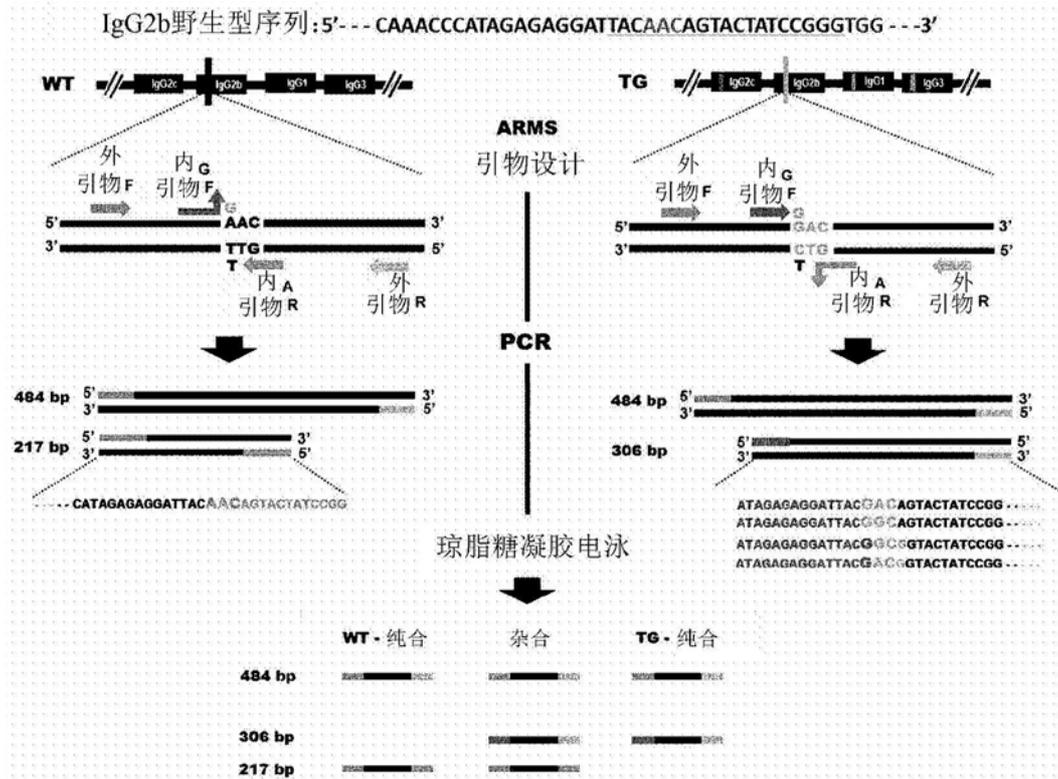


图4

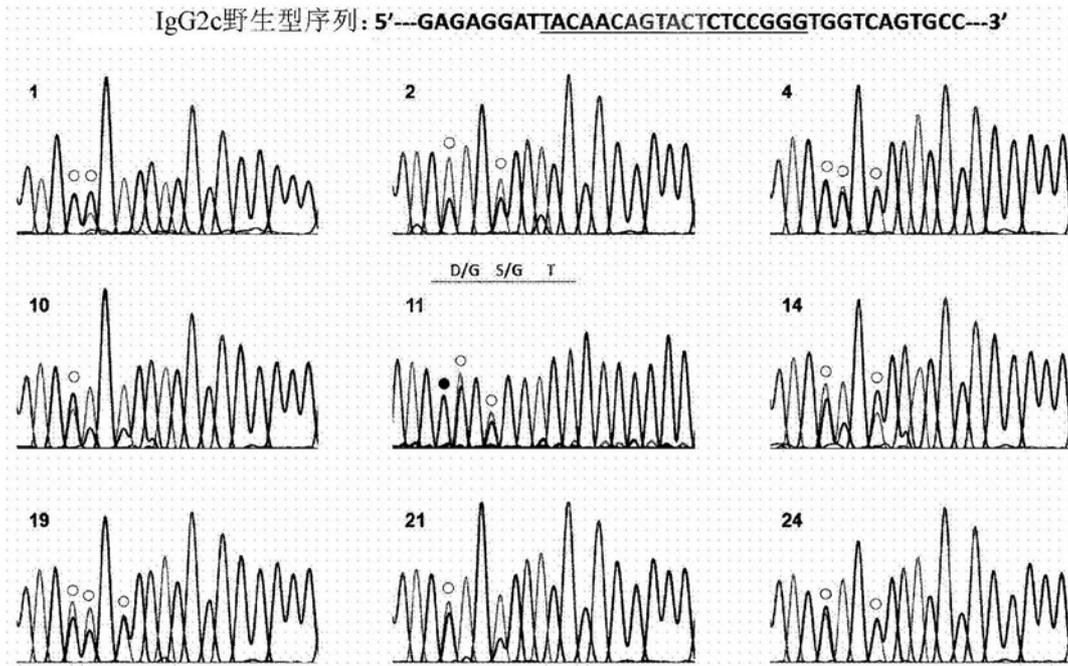


图5

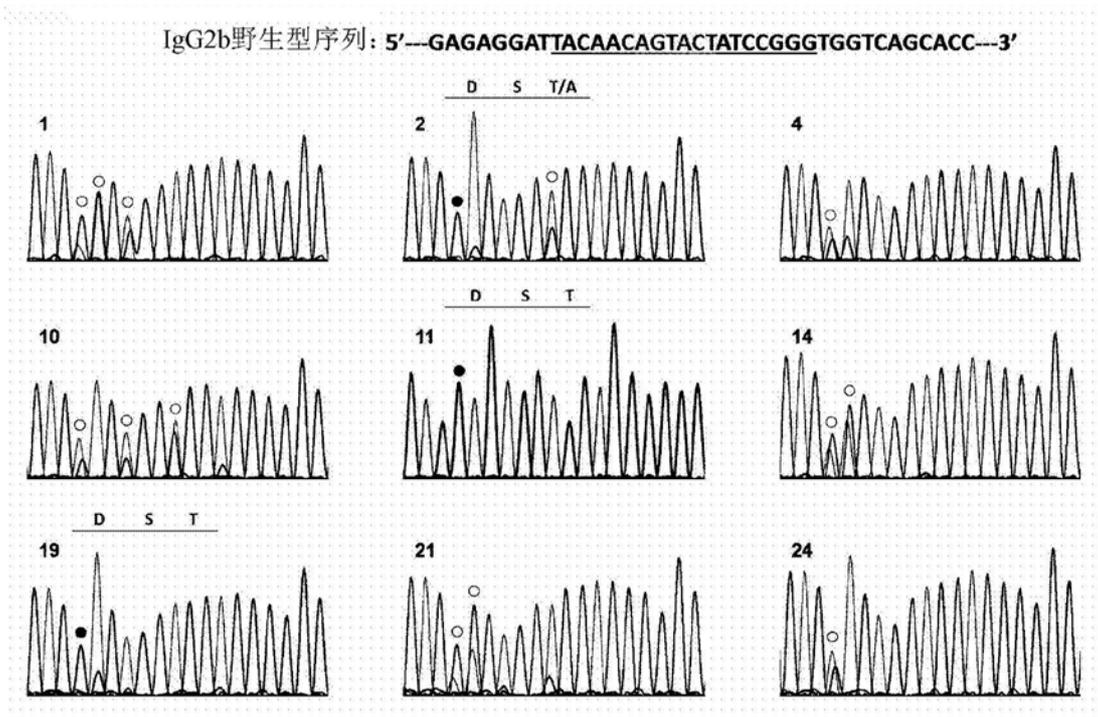


图6

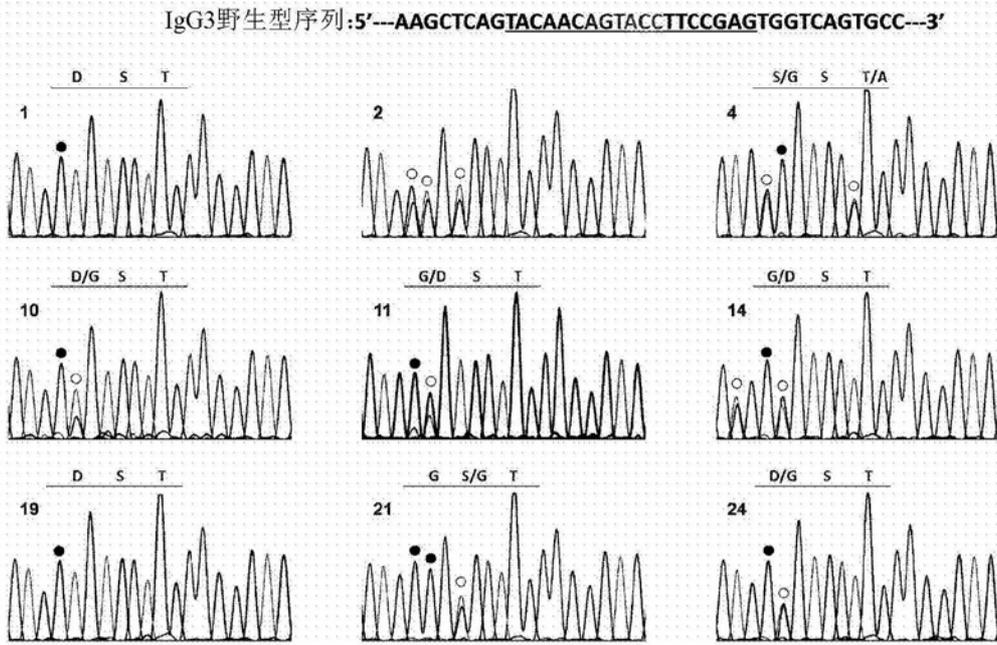


图7

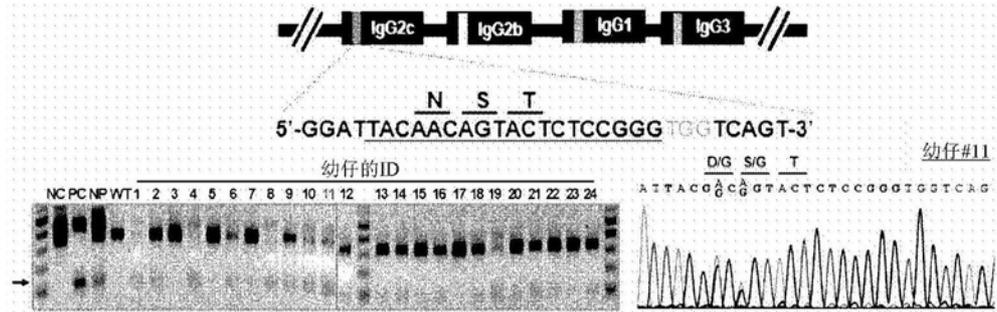


图8

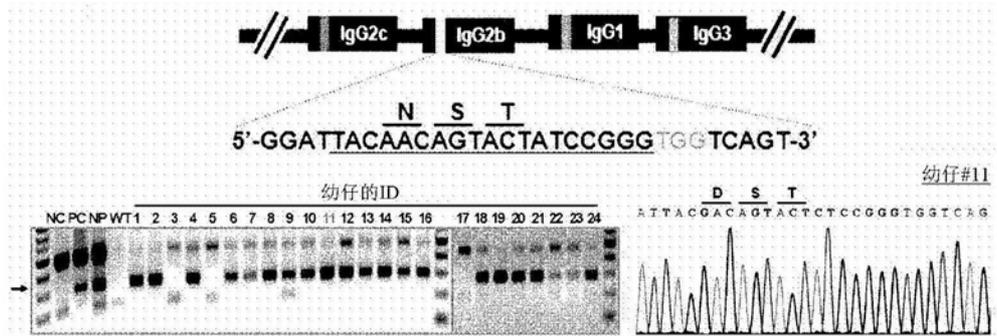


图9

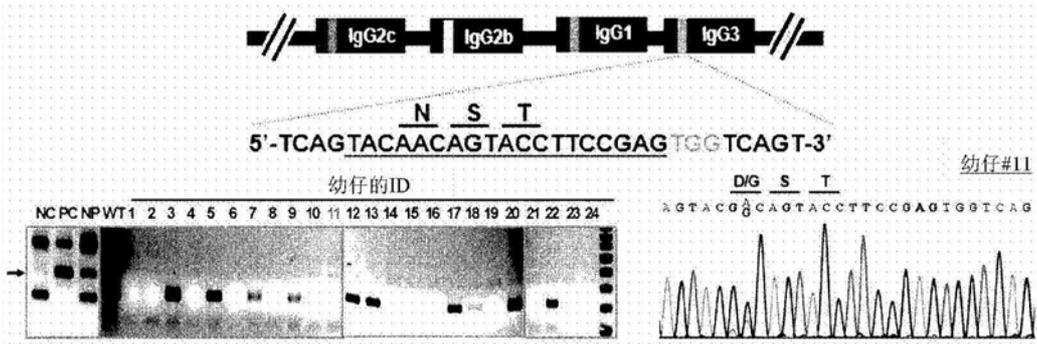


图10

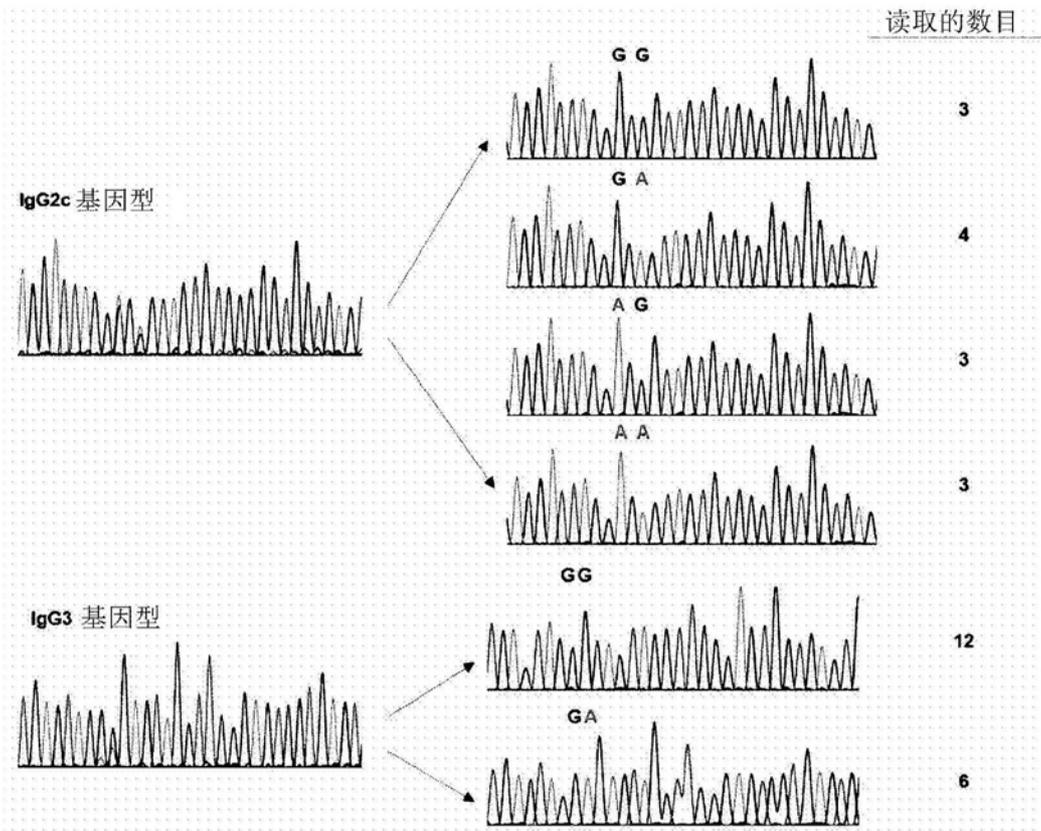


图11

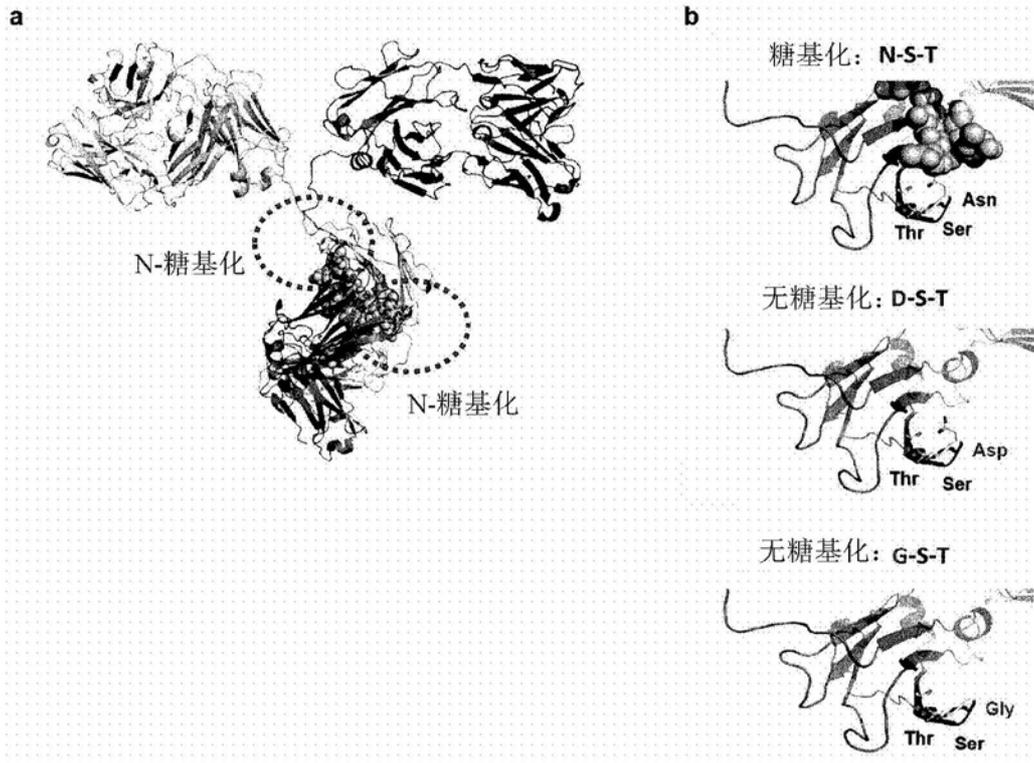


图12

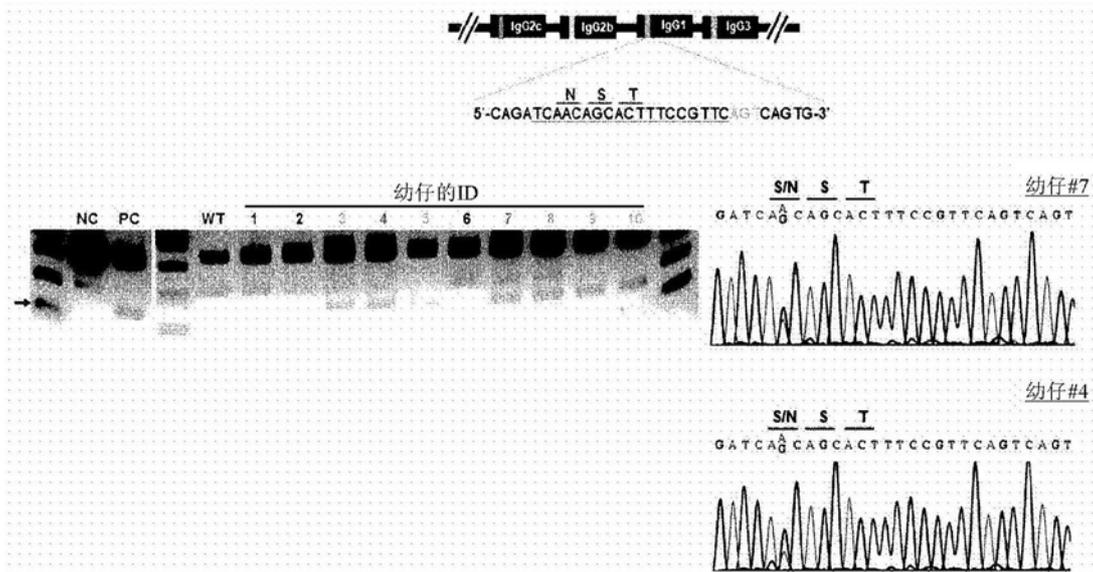


图13

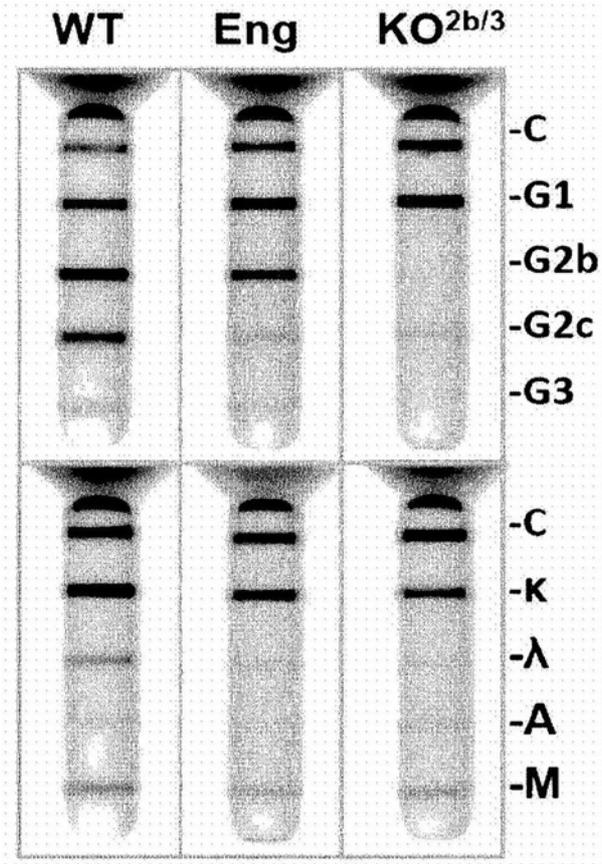


图14

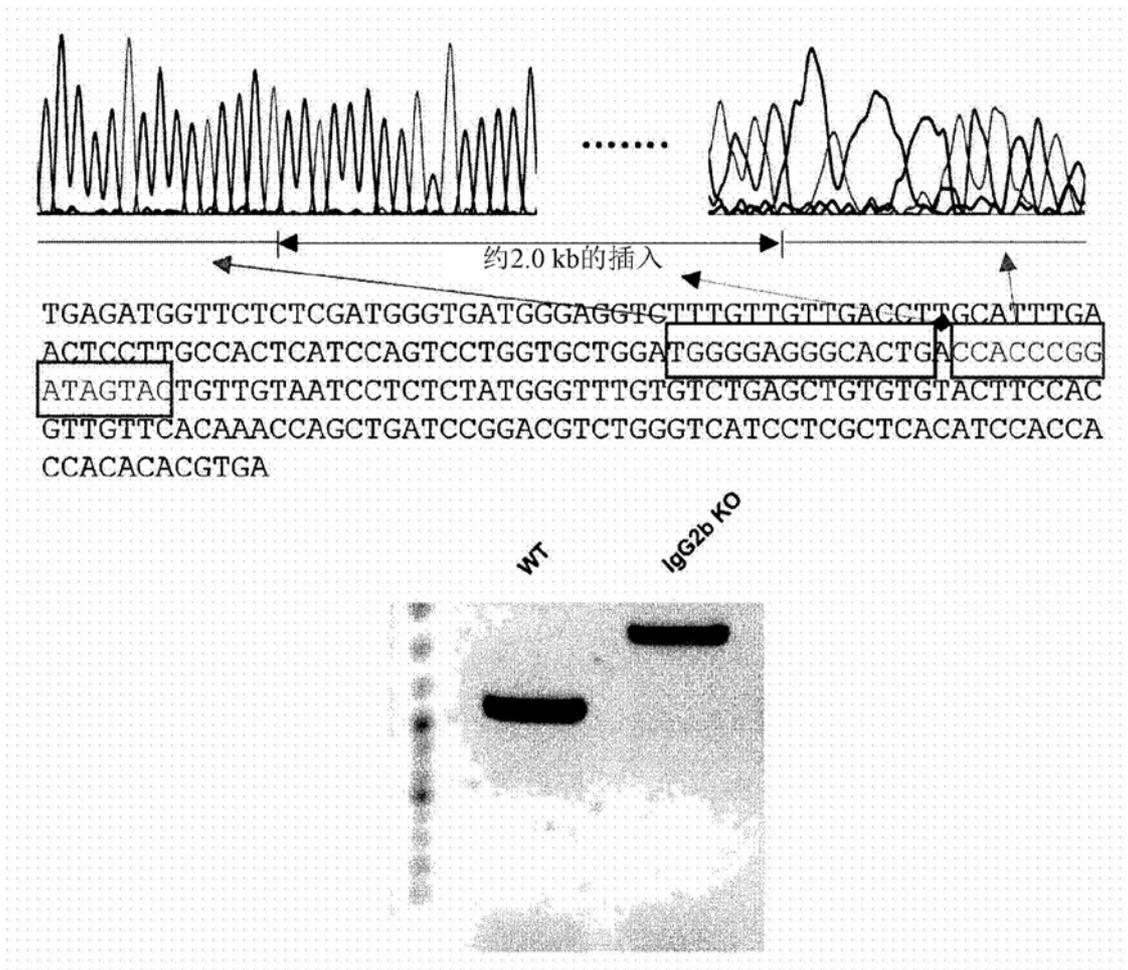


图15

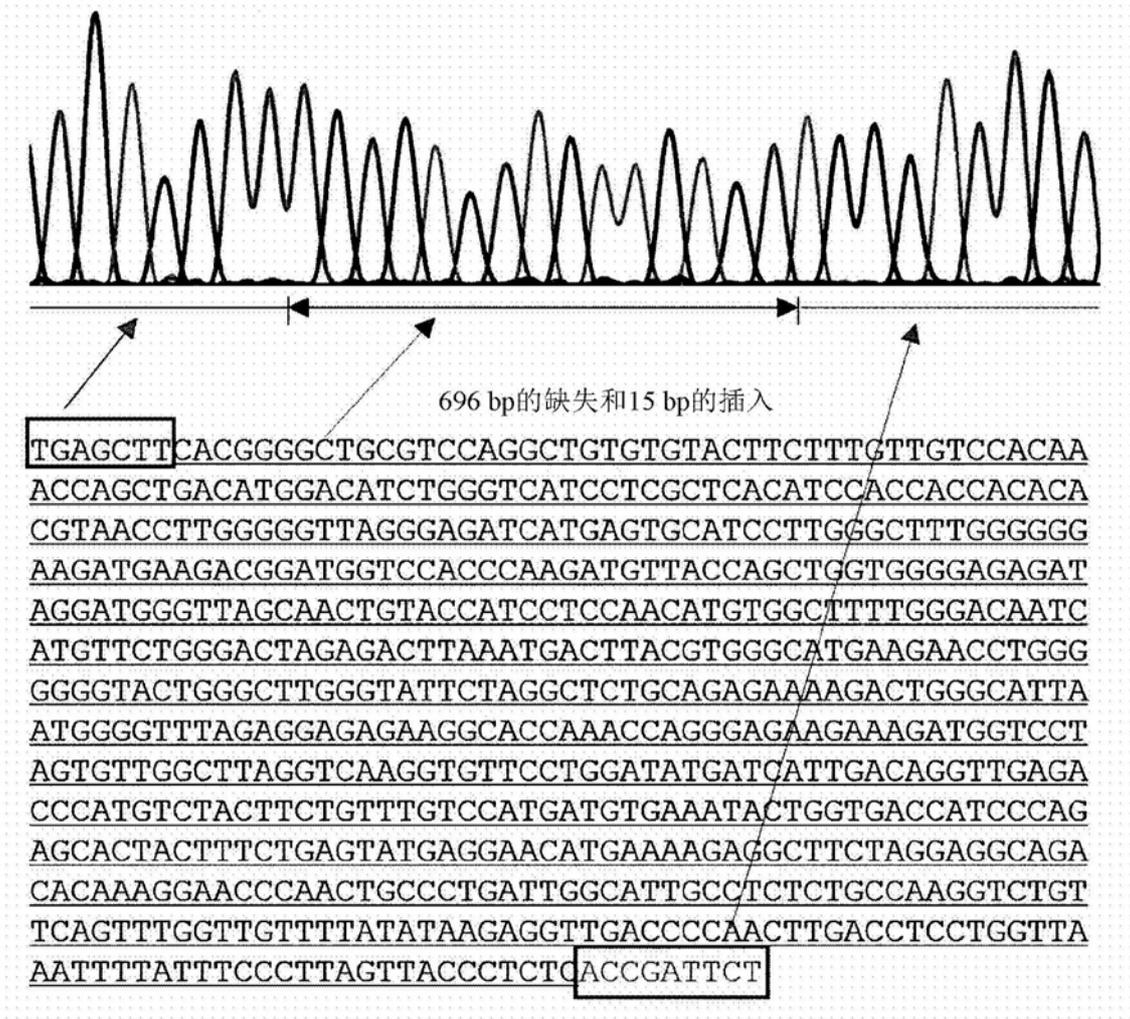


图16

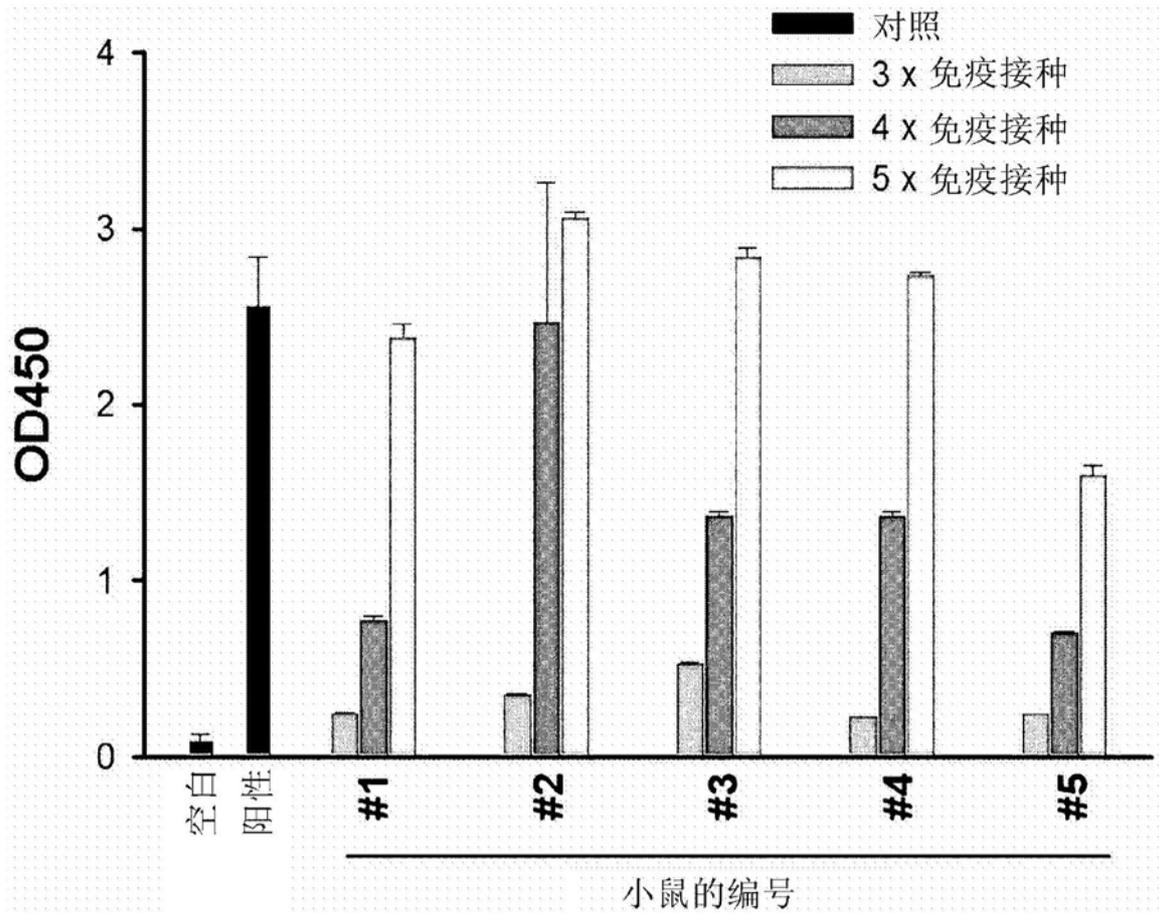


图17

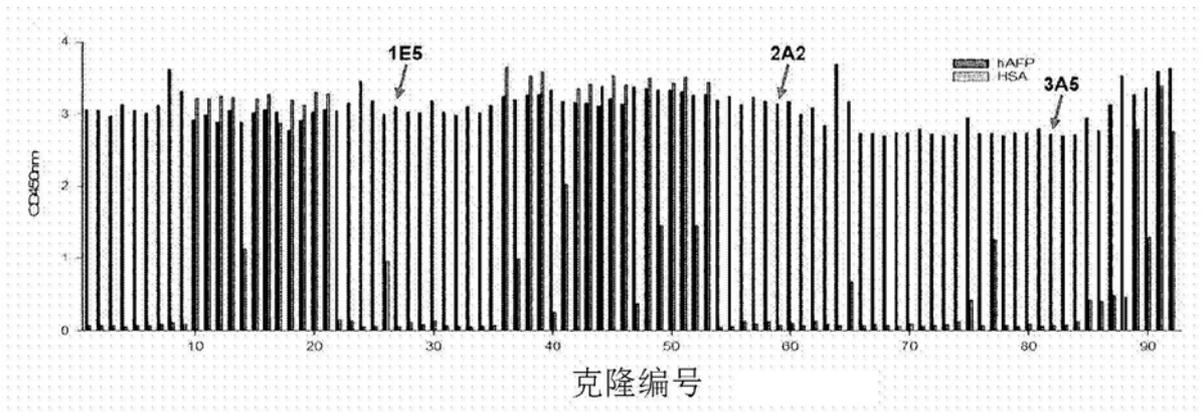


图18

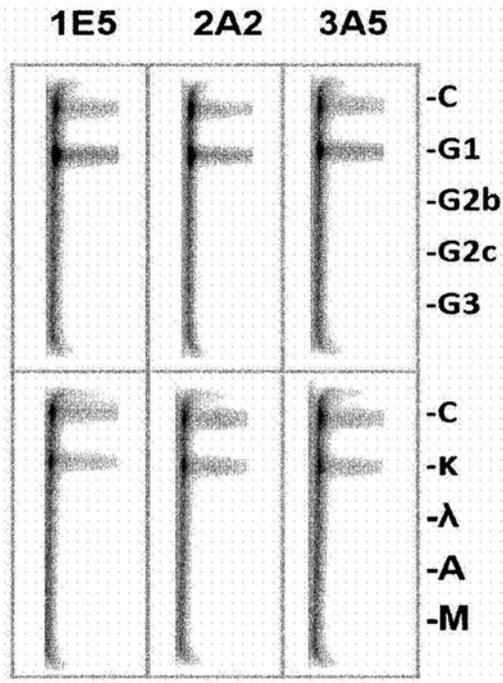


图19

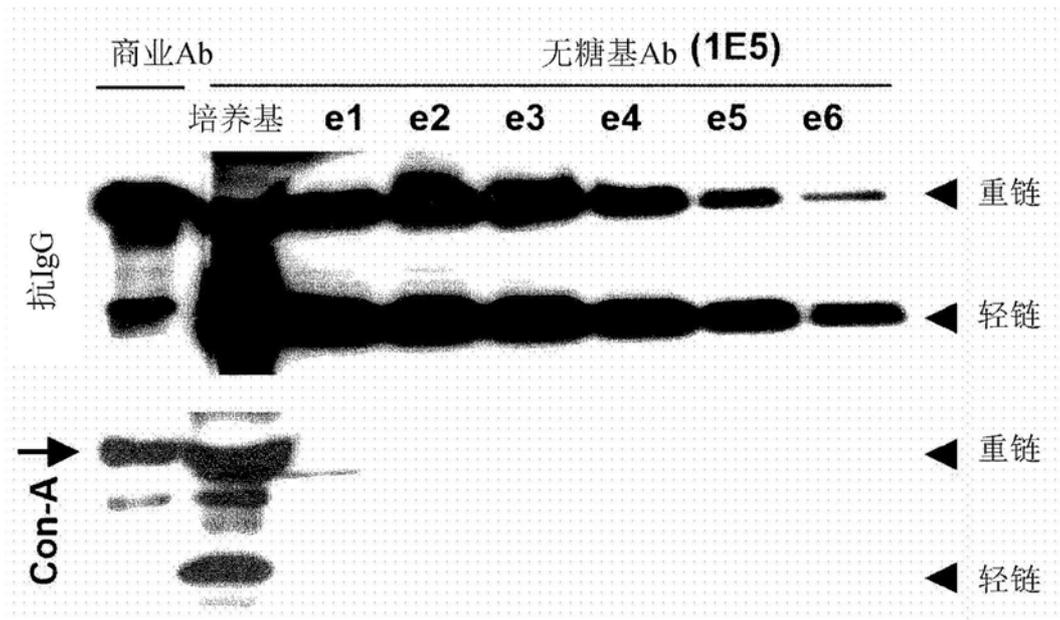


图20

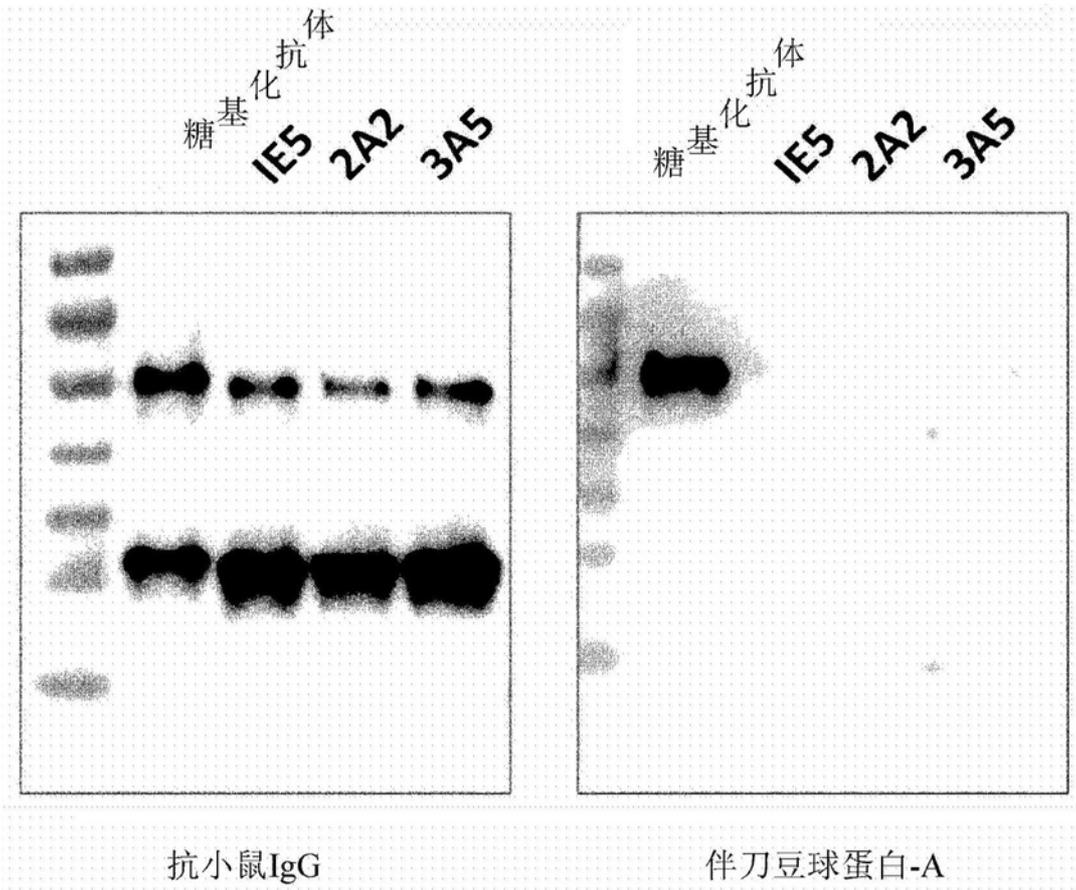


图21

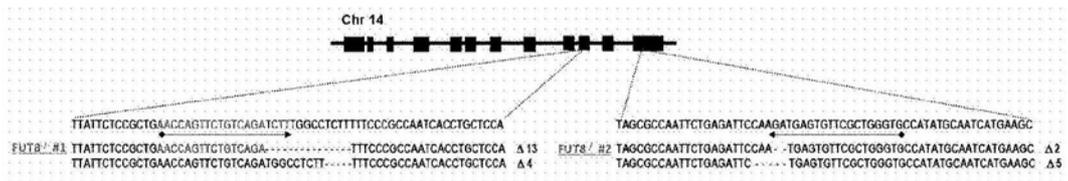


图22

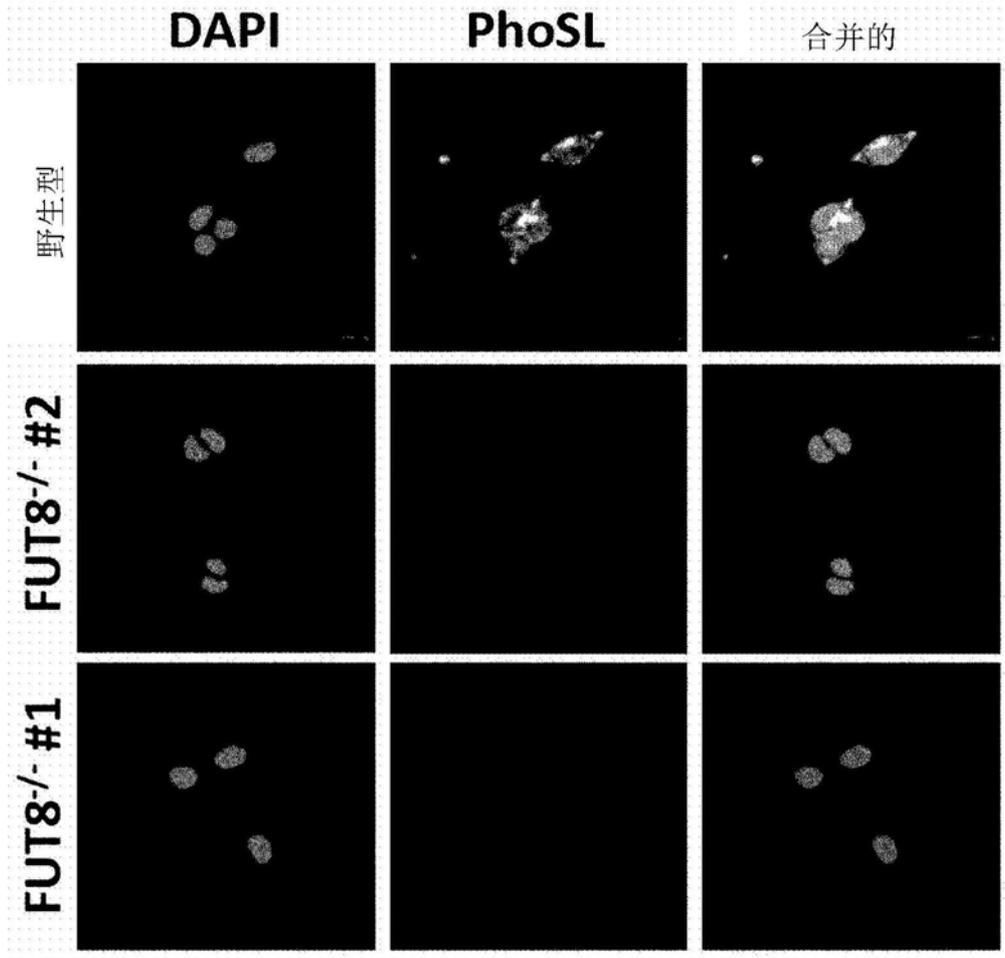


图23

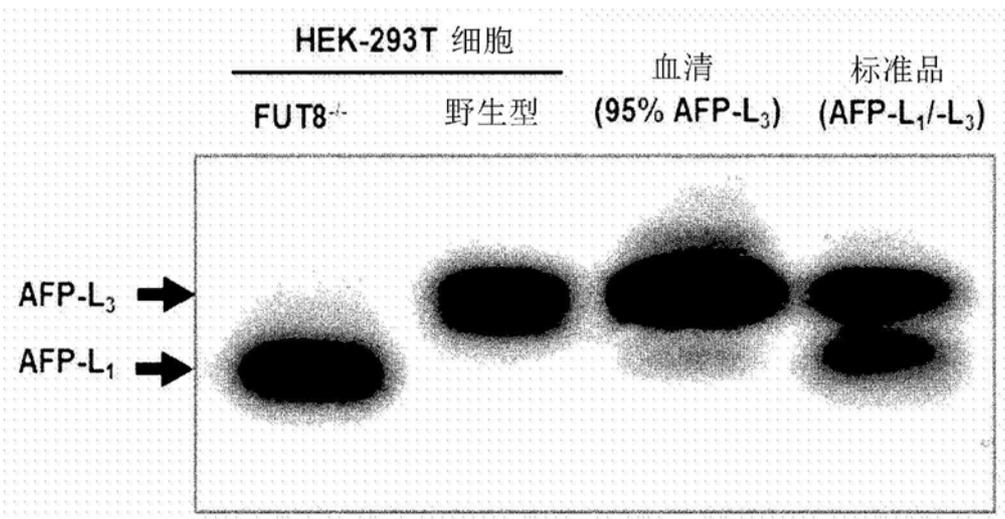


图24

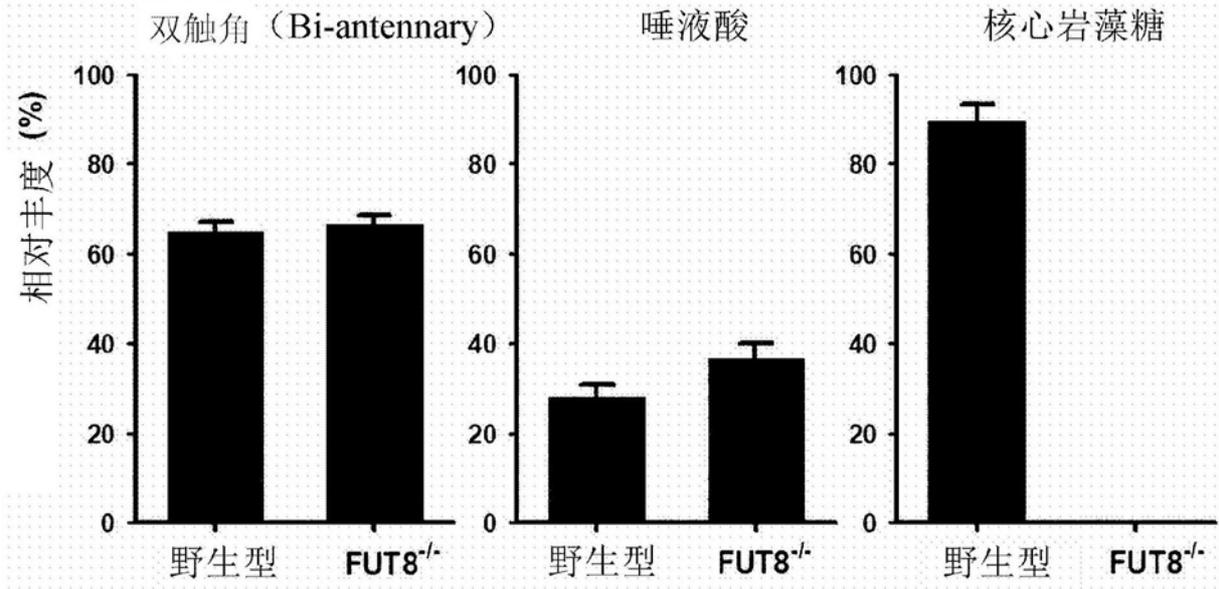


图25

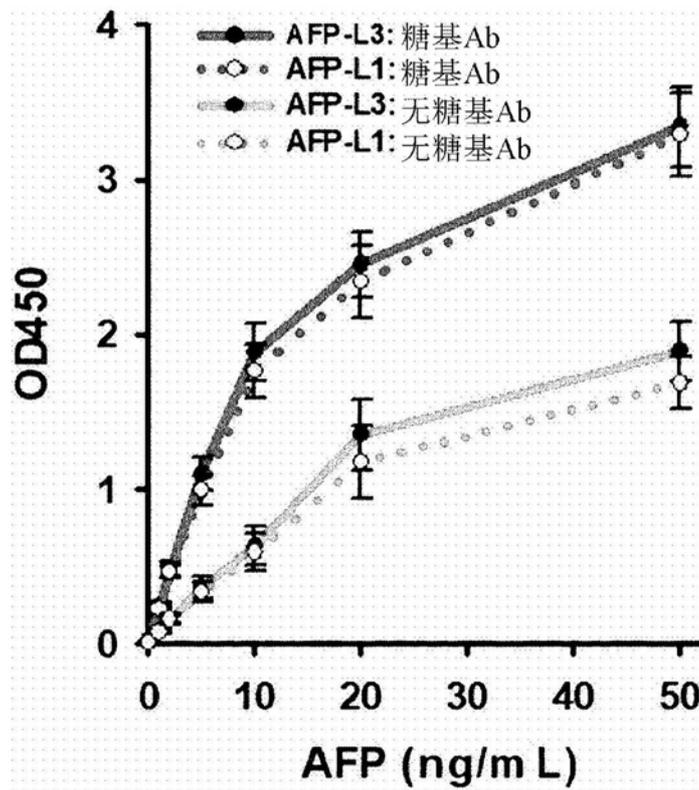


图26

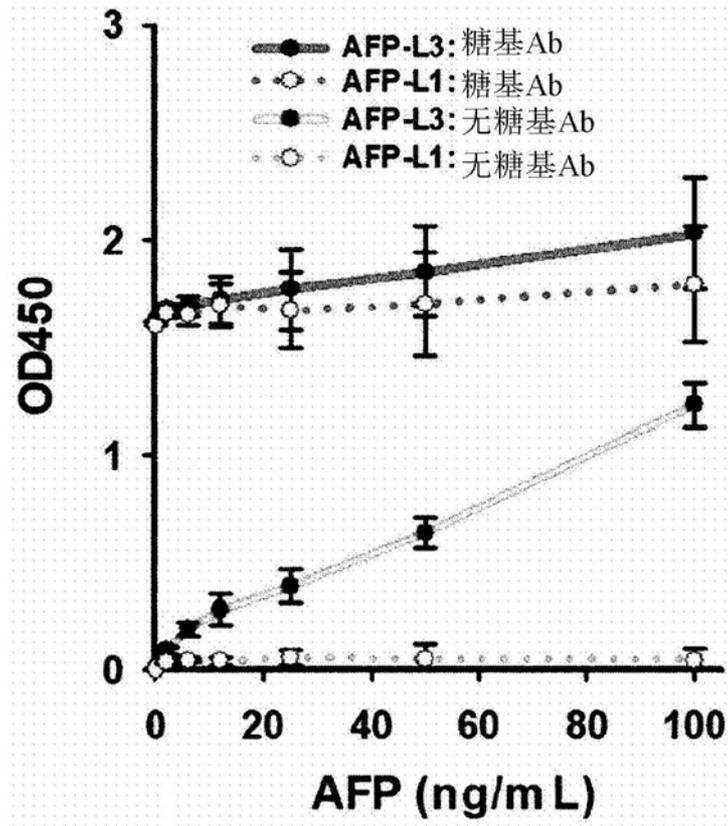


图27

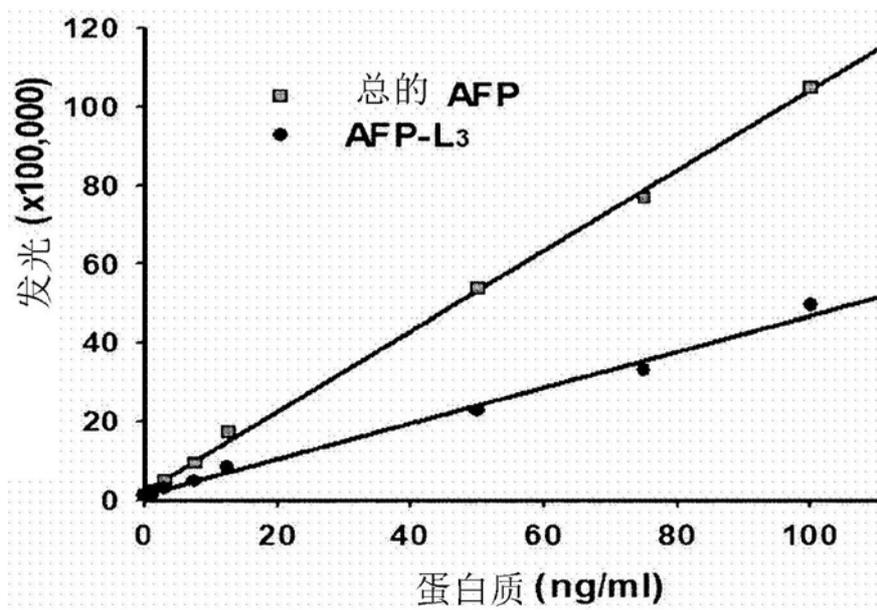


图28

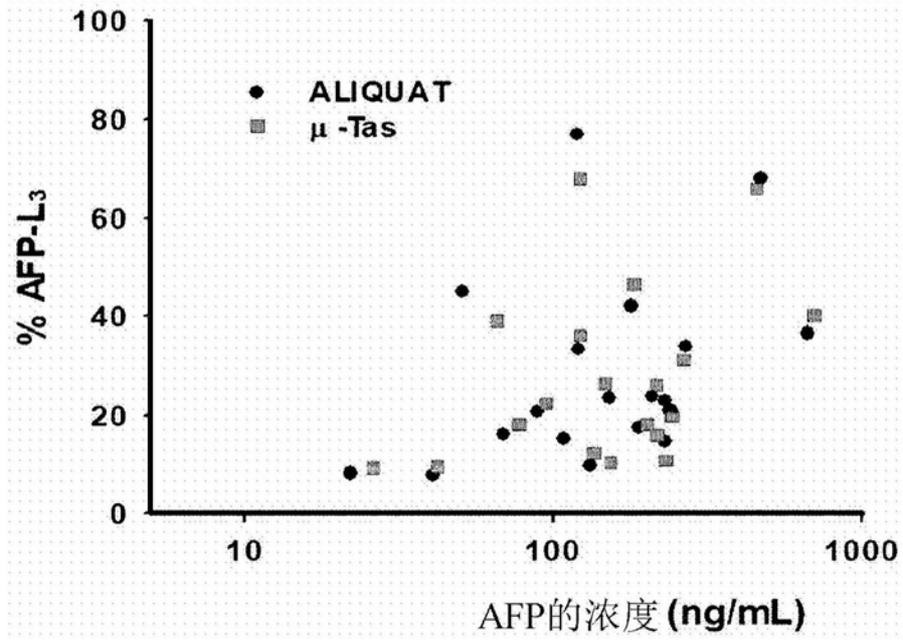


图29

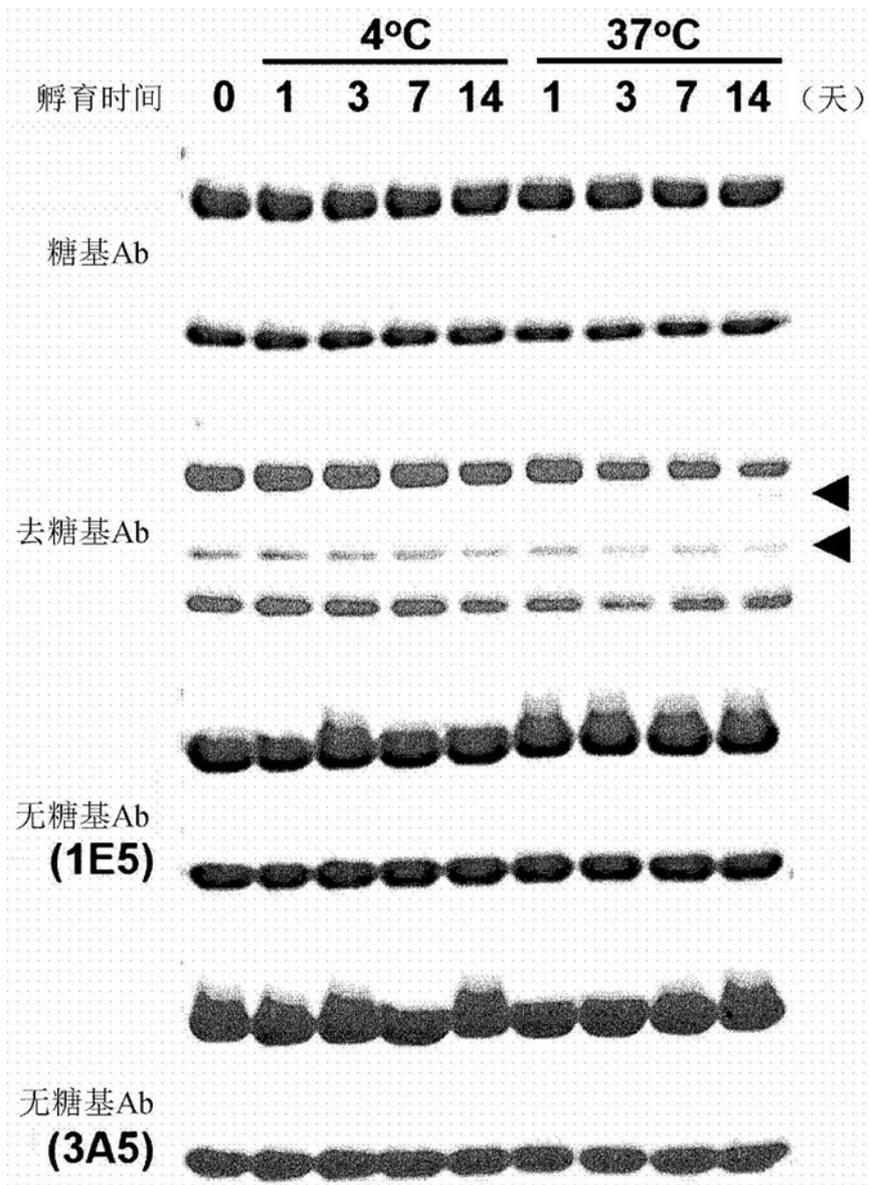


图30

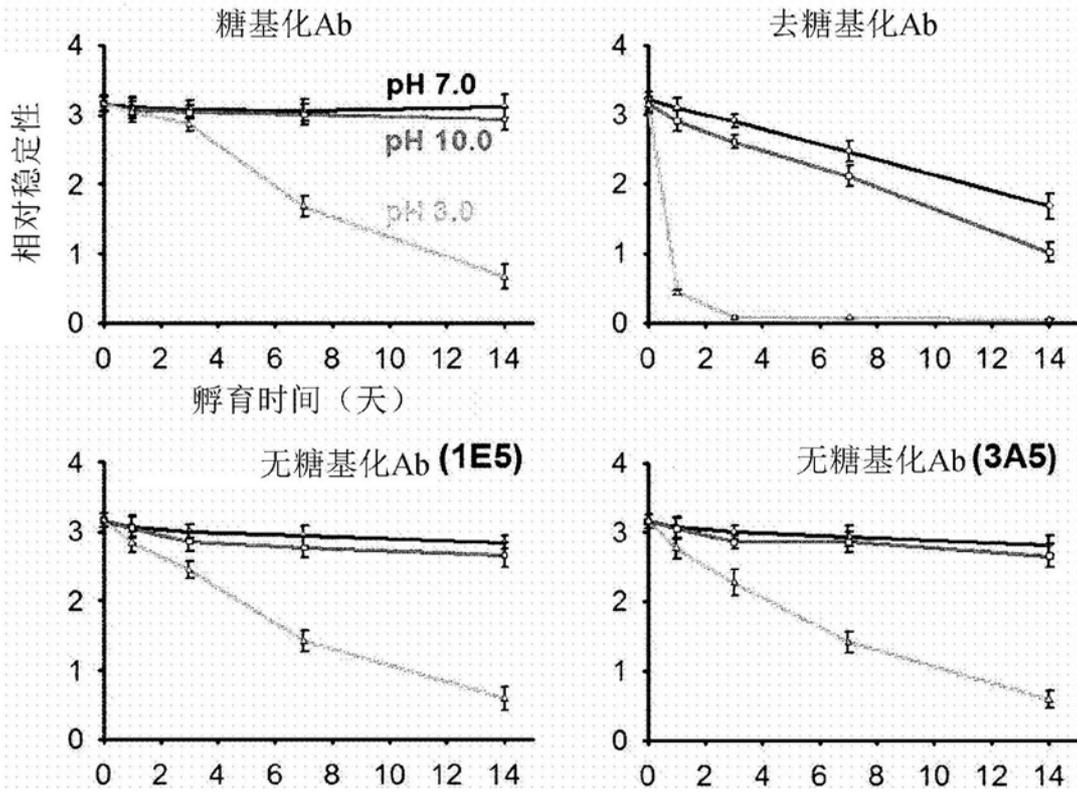


图31

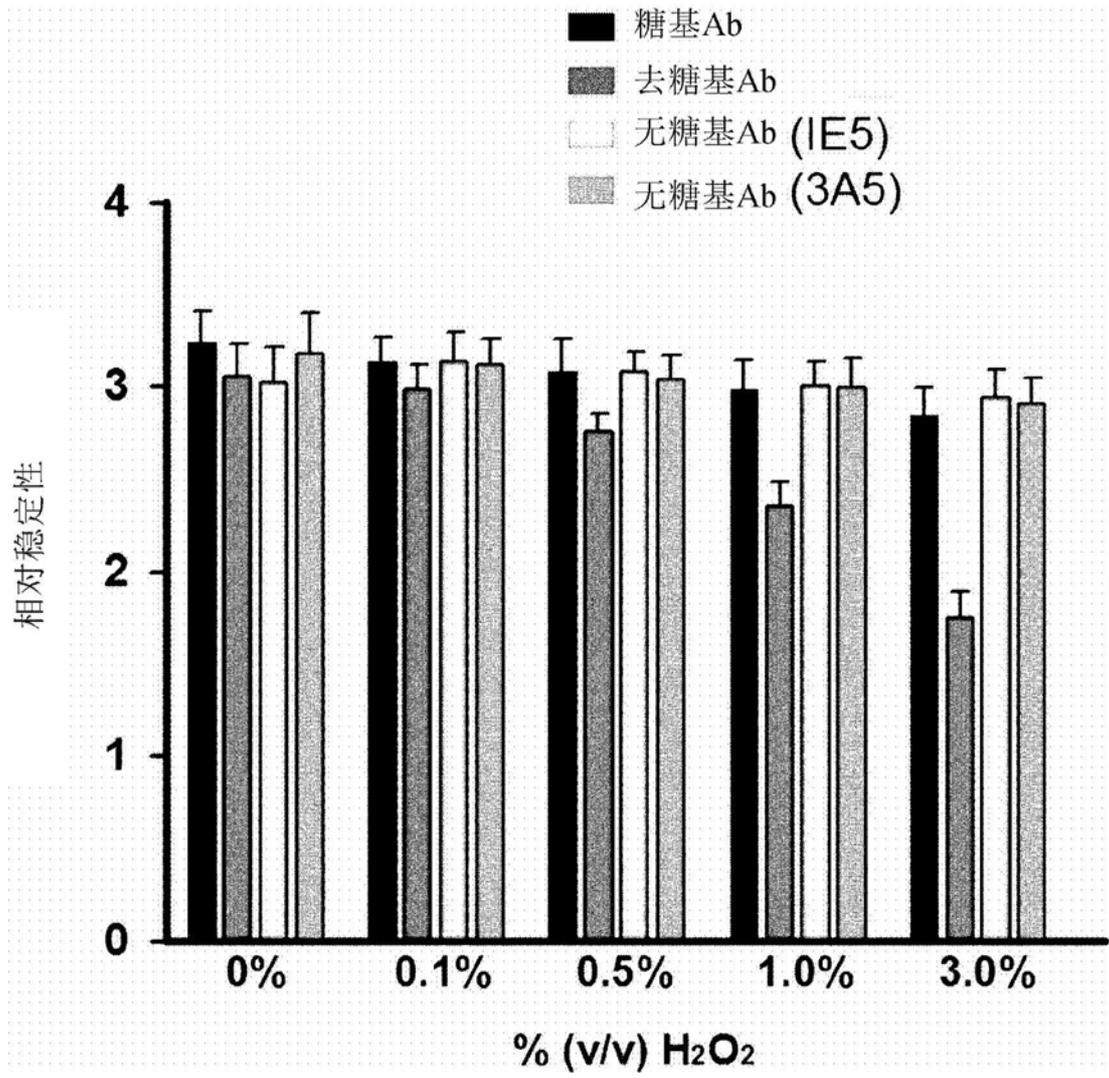


图32