



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111655865 A

(43)申请公布日 2020.09.11

(21)申请号 201880087732.5

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2018.01.26

C12Q 1/682(2018.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2018/074364 2018.01.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/144390 EN 2019.08.01

(71)申请人 北京生命科学研究所以

地址 102206 北京市昌平区中关村生命科  
学园科学园路7号

(72)发明人 林睿 罗敏敏

(74)专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理  
有限公司 11758

代理人 张颖 王莹

权利要求书3页 说明书11页  
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

使用基于杂交链式反应的方法的多重免疫  
信号放大

(57)摘要

本发明提供了一种优化isHCR用于多重标记  
的方法,该方法将结合物-生物分子相互作用与  
杂交链式反应(HCR)相结合。

1. 一种检测多个目标生物分子的方法,所述方法将结合物-生物分子相互作用与杂交链式反应(HCR)相结合,其中将用于偶联正交引发链并靶向多个目标生物分子的正交结合物以及针对正交结合物的正交引发链分别用于HCR中以允许多个目标生物分子的HCR放大。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述正交结合物是正交抗体、正交纳米抗体或抗体的正交抗体片段。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述抗体是生物素化抗体,并且所述正交HCR引发链是用于偶联链霉亲和素的空位结合位点的生物素化引发链,其能够与所述生物素化抗体偶联以便依次放大多个目标生物分子。

4. 根据权利要求2或权利要求3所述的方法,其中使用化学接头将所述正交HCR引发链直接与所述正交抗体偶联,所述化学接头选自含有琥珀酰亚胺酯基的胺反应性接头、硫醇反应性接头或点击化学接头。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述点击化学接头选自NHS-叠氮化物接头、NHS-DBCO接头、马来酰亚胺-叠氮化物接头和马来酰亚胺-DBCO接头。

6. 根据权利要求2-5中任一项所述的方法,其中所述抗体是与分析物特异性的第一抗体发生反应的第二抗体,所述第二抗体是IgG或纳米抗体,并且所述第一抗体是IgG、纳米抗体或scFv。

7. 根据权利要求2所述的方法,其中所述正交结合物是用于标记不同目标生物分子的基因工程蛋白标签,并且所述正交HCR引发链分别与能够结合标签的标签结合配偶体偶联。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述标签具有对生物分子不起反应的化学基团,所述化学基团选自胺部分、羧基部分、硫醇部分和糖基化修饰部分。

9. 根据权利要求7或权利要求8所述的方法,其中所述HCR引发链与选自SpyCatcher、SnoopCatcher、苜蓿基鸟嘌呤(BG)和scFv的标签结合配偶体偶联,并随后用于分别检测选自SpyTag、SnoopTag、SNAP标签和GCN4标签的基因编码标签的亚细胞定位。

10. 根据权利要求7或权利要求8所述的方法,其中所述标签是CLIP-标签或Halo-标签。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述放大链或一对放大链用化学基团和/或荧光染料末端修饰或内部修饰,这允许引发更多轮的放大,所述化学基团选自生物素、洋地黄毒苷、acrydite、胺、琥珀酰亚胺酯、硫醇、叠氮化物、TCO、四嗪、炔烃和/或DBCO,并且所述荧光染料选自FITC、花青染料、Dylight fluors、Atto染料、Janelia Fluor染料、Alexa Fluoro546、Alexa Fluor 488和Alexa Fluor 647。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中将一对带荧光团标签的放大链添加到多轮式HCR的最后一轮中以进行可视化。

13. 根据权利要求11或权利要求12所述的方法,其中所述放大链在内部位置被修饰,其更易于接近链霉亲和素并充当多轮式isHCR中每个连续的分支轮的锚点。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其还包括使用氧化石墨烯(GO)以吸收未组装的HCR放大链。

15. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其还包括使用氧化石墨烯(GO)以吸收未组装的HCR放大链并猝灭荧光,其中所述放大链被荧光染料末端修饰和/或内部修饰。

16. 根据权利要求14或权利要求15所述的方法,其中GO的粒度<500nm。

17. 一种用于检测多个目标生物分子的试剂盒,所述试剂盒包含:(1)正交结合物;(2)

正交HCR引发链；和(3)HCR放大链的正交对，其中每个HCR引发链均具有与HCR放大链杂交的区域以及用于偶联结合物的区域，并且所述正交结合物分别靶向多个目标生物分子，从而允许针对多个目标生物分子的HCR放大。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒，其中所述正交结合物是正交抗体、正交纳米抗体或抗体的正交抗体片段。

19. 根据权利要求18所述的试剂盒，其中所述正交抗体是正交生物素化抗体，并且所述正交HCR引发链是用于偶联链霉亲和素的空位结合位点的生物素化引发链，其能够与所述生物素化抗体偶联以便依次放大多个目标生物分子。

20. 根据权利要求18或19所述的试剂盒，其中使用化学接头将所述正交HCR引发链直接与所述正交抗体偶联，所述化学接头选自含有琥珀酰亚胺酯基团的胺反应性接头、硫醇反应性接头或点击化学接头。

21. 根据权利要求20所述的试剂盒，其中所述点击化学接头选自NHS-叠氮化物接头、NHS-DBCO接头、马来酰亚胺-叠氮化物接头和马来酰亚胺-DBCO接头。

22. 根据权利要求18-21中任一项所述的试剂盒，其中所述抗体是与分析物特异性的第一抗体发生反应的第二抗体，所述第二抗体是IgG或纳米抗体，并且所述第一抗体是IgG、纳米抗体或scFv。

23. 根据权利要求17所述的试剂盒，其中所述正交结合物是用于标记不同目标生物分子的基因工程蛋白标签，并且所述正交HCR引发链与能够结合标签的标签结合配偶体偶联。

24. 根据权利要求23所述的试剂盒，其中所述标签具有对生物分子不起反应的化学基团，所述化学基团选自胺部分、羧基部分、硫醇部分和糖基化修饰部分。

25. 根据权利要求23或权利要求24所述的试剂盒，其中所述HCR引发链与选自SpyCatcher、SnoopCatcher、苜蓿基鸟嘌呤(BG)和scFv的标签结合配偶体偶联，并随后用于分别检测选自SpyTag、SnoopTag、SNAP标签和GCN4标签的基因编码标签的亚细胞定位。

26. 根据权利要求23或权利要求24所述的试剂盒，其中所述标签是CLIP-标签或Halo-标签。

27. 根据权利要求17-26中任一项所述的试剂盒，其中放大链或一对放大链用化学基团和/或荧光染料末端修饰或内部修饰，这允许引发更多轮的放大，所述化学基团选自生物素、洋地黄毒苷、acrydite、胺、琥珀酰亚胺酯、硫醇、叠氮化物、TCO、四嗪、炔烃和/或DBCO，并且所述荧光染料选自FITC、花青染料、Dylight fluors、Atto染料、Janelia Fluor染料、Alexa Fluoro546、Alexa Fluor 488和Alexa Fluor 647。

28. 根据权利要求27所述的试剂盒，其中将一对带荧光团标签的放大链添加到多轮式HCR的最后一轮中以进行可视化。

29. 根据权利要求27或权利要求28所述的试剂盒，其中所述放大链在内部位置被修饰，其更易于接近链霉亲和素并充当多轮式isHCR中每个连续的分支轮的锚点。

30. 根据权利要求17-29中任一项所述的试剂盒，其还包含使用氧化石墨烯(GO)以吸收未组装的HCR放大链。

31. 根据权利要求17-29中任一项所述的试剂盒，其还包含使用氧化石墨烯(GO)以吸收未组装的HCR放大链并猝灭荧光，其中所述放大链被荧光染料末端修饰和/或内部修饰。

32. 根据权利要求30或权利要求31所述的试剂盒，其中GO的粒度<500nm。

33. 权利要求1-16中任一项所述的方法或权利要求17-32中任一项所述的试剂盒在检测多个目标生物分子中的用途。

## 使用基于杂交链式反应的方法的多重免疫信号放大

### 背景技术

[0001] 由于基于抗体的免疫测定的易于使用、速度和成本效益,它们一直是检测和鉴定蛋白质和其它生物分子在生物样品中的位置的最流行的方法。这些方法使用与目标分子(抗原)选择性结合的第一抗体,并且这种抗体-抗原相互作用可通过可识别第一抗体-表位复合物并与之反应的偶联的报道分子或标记的第二抗体而被可视化(Han, K.N., Li, C.A. & Seong, G.H. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 6, 119-141 (2013))。使用免疫测定时的主要限制是样品中给定目标分子的低丰度往往需要先进行信号放大然后才可能检测。可以使用催化生色底物在目标复合物上沉积的偶联的酶例如辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶等来实现放大(Bobrow, M.N., Harris, T.D., Shaughnessy, K.J. & Litt, G.J. *J. Immunol. Methods* 125, 279-285 (1989))。已开发出荧光底物,尤其是基于HRP-酪胺反应化学的荧光底物,来支持高分辨率荧光显微术(Stack, E.C., Wang, C., Roman, K.A. & Hoyt, C.C. *Methods* 70, 46-58 (2014))。虽然现行的放大方法非常有用且被广泛采用,但它们有几个缺点:它们经常产生高本底,它们可由于染料扩散而降低空间分辨率,它们难以用于同时检测多个放大的信号(Carvajal-Hausdorf, D.E., Schalper, K.A., Neumeister, V.M. & Rimm, D.L. *Lab. Invest.* 95, 385-396 (2015)),而且它们不适合用于几种强大的新型组织扩张和透明化技术中的大体积样品。

[0002] 在本发明中,我们发现无酶放大途径能够克服这些限制中的许多种。特别是杂交链式反应(HCR)技术适于放大免疫信号。HCR,其根据在自组装为聚合物的DNA发夹寡聚体集之间发生的识别和杂交事件,迄今主要用于放大来自原位杂交样品的mRNA信号(Choi, H.M.T., Beck, V.A. & Pierce, N.A. *ACS Nano* 8, 4284-4294 (2014); Shah, S. 等人 *Development* 143, 2862-2867 (2016)),并且最近用于检测蛋白质-蛋白质相互作用(Koos, B. 等人 *Nat. Commun.* 6, 7294 (2015))。在典型的使用情况下,与目标mRNA分子互补的核酸探针被用作‘引发链’寡核苷酸。从引发链寡核苷酸开始,使用一系列聚合反应将荧光团标记的核酸‘放大链’寡核苷酸添加到目标mRNA-引发链复合物中;然后将荧光团可视化。

### 发明内容

[0003] 本发明提供了一种优化isHCR用以多重标记的方法,所述方法将结合物-生物分子相互作用与杂交链式反应(HCR)相结合,其中将isHCR中使用的引发链针对多个目标分别修饰,以允许多个目标的同时isHCR放大。本发明还提供了一种用于执行所述优化isHCR用以多重标记的方法的试剂盒。

[0004] 在第一方面,本发明提供了一种检测多个目标生物分子的方法,所述方法将结合物-生物分子相互作用与杂交链式反应(HCR)相结合,其中将用于偶联正交引发链并靶向多个目标生物分子的正交结合物以及针对正交结合物的正交引发链用于HCR中以允许多个目标生物分子的HCR放大。

[0005] 在第二方面,本发明提供了一种用于检测多个目标生物分子的试剂盒,所述试剂盒包含:(1)正交结合物;(2)正交HCR引发链;和(3)HCR放大链的正交对,其中每个HCR引发链均具有与HCR放大链杂交的区域以及用于偶联结合物的区域,并且所述正交结合物分别

靶向多个目标生物分子,从而允许针对多个目标生物分子的HCR放大。

[0006] 所述结合物可以是抗体、抗体片段或基因工程蛋白标签。如果正交结合物是正交抗体,则所述抗体可以是生物素化抗体,并且所述正交HCR引发链可以是用于偶联链霉亲和素的空位结合位点的生物素化引发链,其能够与所述生物素化抗体偶联以便依次放大多个目标生物分子。

[0007] 优选地,可以使用化学接头将所述正交HCR引发链直接与所述正交结合物偶联,从而简化多重标记程序。所述化学接头可以是胺反应性接头、硫醇反应性接头或点击化学接头。胺反应性接头可以是含有琥珀酰亚胺酯基团的接头。点击化学接头可以是含有点击化学官能团的接头,例如NHS-叠氮化物接头、NHS-DBCO接头、马来酰亚胺-叠氮化物接头或马来酰亚胺-DBCO接头。例如,所述正交HCR引发链可以通过SMCC或NHS-叠氮化物接头直接偶联到所述结合物上。这种直接偶联允许针对多个目标生物分子的同时HCR放大。

[0008] 优选地,所述抗体是与分析物特异性的第一抗体发生反应的第二抗体,所述第二抗体是IgG或纳米抗体,并且所述第一抗体是IgG、纳米抗体或scFv。

[0009] 在所述结合物是基因工程蛋白标签的情况下,所述正交HCR引发链可以与标签结合配偶体偶联,所述标签结合配偶体能够结合标记不同目标生物分子的标签。生物分子可以是细胞中诸如蛋白质、小信号分子、神经递质等的生物分子。所述标签具有与生物分子不起反应的化学基团,所述化学基团选自胺部分、羧基部分、硫醇部分和糖基化修饰部分。所述HCR引发链与标签结合配偶体偶联,随后用于HCR放大以检测标签。本领域技术人员可以根据需要容易地选择标签和标签结合配偶体。

[0010] 所述标签可以是靶向不同细胞位置并在培养细胞中表达的正交标签。在这种情况下,可将HCR引发链与标签结合配偶体(例如, SpyCatcher、SnoopCatcher、苜蓿基鸟嘌呤(BG)和scFv)偶联,随后用于检测基因编码标签(SpyTag、SnoopTag、SNAP标签和GCN4标签)的亚细胞定位。与SNAP-标签技术正交的两个化学标签,CLIP-标签和Halo-标签,也可以类似于SNAP-标签的方式用于HCR。最近,使用从头蛋白质设计开发了靶向小配体的新型微型蛋白质结合物。这些新的配体-结合物对,例如洋地黄毒苷/DIG10.3也可用于HCR。

[0011] 因此,HCR概念的这些超出生物素-链霉亲和素相互作用以及超出第一抗体和第二抗体的扩展,证明了HCR可以高度多重的方式实施。这些直接偶联策略也将减小isHCR放大复合物的尺寸。

[0012] 所述isHCR可以是多轮式isHCR,其中放大链或一对放大链经过修饰以进入分支多轮放大以便使HCR聚合物分支和生长。

[0013] 所述HCR引发链可以与几种类型的自组装型DNA HCR放大链中的任何一种杂交,所述放大链包括可用于使原始目标信号可视化的荧光团标记的放大链寡核苷酸。

[0014] 本多轮式isHCR中使用的HCR放大链(H1和H2)可以用化学基团和/或荧光染料进行末端修饰或内部修饰,从而允许引发更多轮的放大。在这种情况下,所述放大链(H1和H2)可以用生物素、洋地黄毒苷、acrydite、胺、琥珀酰亚胺酯、硫醇、叠氮化物、TCO、四嗪、炔烃和/或DBCO进行末端修饰或内部修饰。荧光染料,例如FITC、花青染料、Alexa Fluors、Dylight fluors、Atto染料或Janelia Fluor染料,也可以与生物素、洋地黄毒苷、acrydite、胺、琥珀酰亚胺酯、硫醇、叠氮化物、TCO、四嗪、炔烃和/或DBCO一起标签于所述放大链上。例如,可以用生物素基团标记放大链。一旦这些DNA-生物素放大链自组装并与正在生长的isHCR聚合

物连接,它们的生物素就可以与新添加的链霉亲和素反应(并由此可以与更多的HCR引发链等反应),从而引发更多轮的聚合物生成。可以将一对信号分子修饰的放大链(例如一对带荧光团标签的放大链)添加到isHCR<sup>n</sup>的最后一轮中以进行可视化。

[0015] 优选地,所述放大链在内部位置被修饰,其更易于接近结合配偶体,例如链霉亲和素,充当了多轮式isHCR(isHCR<sup>n</sup>)中每个连续的分支轮的锚点。

[0016] 本方法也可包括使用氧化石墨烯(GO)以吸收未组装的HCR放大链。如果所述放大链被荧光染料末端修饰和/或内部修饰,则氧化石墨烯(GO)也可猝灭荧光。因此,本发明的试剂盒也可包含氧化石墨烯。本发明中的氧化石墨烯的粒度<500nm。关键的是,除了消除HCR放大链的荧光之外,将HCR引发链与HCR放大链和GO一起添加还导致荧光的显著恢复,这很可能是因为所述引发链触发了HCR放大链形成双链带缺口的聚合物,从而保护它们免受GO的吸附活性。也就是说,GO可用来抑制本底水平,进一步提高isHCR的性能。

[0017] GO的添加降低了本底,但并未削弱信号强度,导致与未用GO的isHCR放大相比,信噪比改善。令人惊讶的是,使用抗体系列稀释实验进行进一步分析表明,与标准IHC染色方法相比,用GO的isHCR显著增加了信号强度,当第一抗体被高度稀释时达到了大于80×的放大倍数。

[0018] 本发明包括本文所列举的特定实施方式的所有组合。

## 附图说明

[0019] 图1.使用isHCR的多重标记。

[0020] 图2.使用isHCR同时检测多个目标。

## 具体实施方式

[0021] 在第一实施方式中,我们建立了两种生物素化第二抗体联合两种正交DNA HCR引发链使用的方法,这允许isHCR顺序放大同一脑切片样品中的两个目标(图1a)。

[0022] 在第二实施方式中,我们通过SMCC或NHS-叠氮化物接头将DNA HCR引发链直接与第二抗体偶联(图2a)。该修饰允许多个目标的同时isHCR放大。我们在western印迹(图2b)、培养细胞的免疫染色(图2c)和脑切片的免疫染色(图2d)中使用引发链标记的第二抗体成功地进行了多重isHCR放大。

[0023] 在第三实施方式中,以更进一步扩大isHCR平台的模块度为目标,我们测试了是否可以将多种基因工程蛋白标签添加到细胞中的目标蛋白上,以使目标能够与HCR引发链直接结合。在培养的细胞中表达了三种靶向不同细胞位置的正交标签(针对细胞核的SpyTag、针对线粒体的SNAP标签和针对细胞膜的smFP\_GCN4)。将DNA HCR引发链与标签结合配偶体(SpyCatcher、苄基鸟嘌呤(BG)和scFv)偶联,随后将它们用于isHCR放大,以检测所述基因编码标签的亚细胞定位(图2e)。对于每个标签均观察到强且正确定位的信号。

[0024] 在第四实施方式中,我们接着在脑中表达了膜结合的GFP,并证实与GFP纳米抗体22偶联的HCR引发链可直接与GFP结合,从而允许HCR放大链在脑切片中的后续聚合和检测(图1b)。

[0025] 在第五实施方式中,我们在小鼠脑中表达SNAP标签,并施加BG官能化的HCR引发链用于直接检测和放大(图1c、d)。我们注意到,用单体SNAP标签标记神经元只会在胞体处产

生弱信号(图1d的中图)。因此,我们采用串联SNAP标签来提高标记强度。这种优化极大地增加了信号强度,并允许检测标记神经元的远端轴突(图1d的下图)。

[0026] HCR是杂交链式反应(Hybridization Chain Reaction)的缩写。当将单链DNA引发链添加到反应体系后,它打开一个种类的发夹(H1放大链),暴露出新的单链区域,而该区域则打开另一个种类的发夹(H2放大链)。该过程又暴露与原始引发链一致的单链区域。由此产生的链式反应导致形成带缺口的双螺旋,该双螺旋一直生长到所述发夹供应耗尽为止。

[0027] 本发明中的isHCR将结合物-生物分子相互作用与链式反应(HCR)相结合,其中所述结合物可以是用于标记目标生物分子的抗体或基因工程蛋白标签。

[0028] 点击化学是一类生物相容性反应,主要是意欲将所选的底物与特定生物分子连接。点击化学反应不是单一的特定反应,而是描述了一种遵循自然界中的实例来生成产物的方式,其也通过连接小的模块化单元来生成物质。一般而言,点击反应通常连接生物分子和报道分子。点击化学不限于生物学条件:“点击”反应的概念已用于药理学和各种仿生应用中。然而,它们在生物分子的检测、定位和定性中特别有用。

[0029] 本发明中的抗体包括但不限于传统的IgG和纳米抗体。

[0030] 实施例

[0031] 方法和材料

[0032] 试剂和试剂制备.DNA寡核苷酸由Thermo Fisher Scientific和Sangon Biotech合成。DNA寡核苷酸的详细序列和修饰可见于表1。所有寡核苷酸均溶于ddH<sub>2</sub>O中并在-20℃下保存。苄基鸟嘌呤(BG)标记的寡核苷酸通过首先在室温下将NH<sub>2</sub>-寡核苷酸(2mM,4μL)、HEPES(200mM,8μL;pH=8.5)和BG-Gal-NHS(20mM于DMSO中,12μL;S9151S,NEB)混合30分钟,然后使用Micro Bio-Spin P-6凝胶柱(7326221,Bio-Rad)进行纯化来制备。

[0033] 抗体和荧光试剂的详细信息示于表2。硫酸葡聚糖(D8906)购自Sigma-Aldrich。氧化石墨烯(GO,XF020,粒度<500nm,C/O比=1.6)得自Nanjing XFNANO。

[0034] 质粒构建和AAV包装.根据原始报道来合成编码SNAPf、SpyCatcher和GFP纳米抗体(LaG-16-2)的基因。通过使用Gibson克隆将四个SNAPf编码序列与短肽接头融合来组装4xSNAPf序列。从pHR-scFv-GCN4-sfGFP-GB1-NLS-dWPRE(Addgene质粒#60906,来自Ron Vale的馈赠)扩增scFv-GCN4-HA-GB1序列。基于原始报告的smFPs序列来设计氨基酸序列smFP\_GCN4(表3)。为了膜靶向,通过PCR将GAP43-棕榈酰化序列添加至GFP、SNAPf和smFP\_GCN4的5'末端(以下称为mGFP、mSNAPf和msmFP\_GCN4)。通过PCR从HeLa细胞的基因组DNA中扩增来自人Cox8a的两个串联线粒体靶向序列,并通过Gibson组装将其添加到SNAPf的5'末端(以下称为mitoSNAP)。通过PCR从HeLa细胞的基因组DNA中扩增H2B和人GBP1序列。通过PCR将单个SpyTag序列添加到H2B的3'末端(以下称为H2B-SpyTag)。将mGFP、mitoSNAP、H2B-SpyTag和msmFP\_GCN4克隆到pcDNA3.1载体中。将scFv-GCN4-HA-GB1和SpyCatcher克隆到pET-21a载体中用于细菌胞质表达。将LaG-16-2克隆到pET-22b载体中用于细菌周质表达。如前所述构建AAV-DIO-mGFP。通过将编码mSNAPf或4xSNAPf的序列以反向取向插入源自于AAV-EF1α-DIO-hChR2(H134R)-mCherry的AAV-EF1α-DIO骨架(来自Karl Deisseroth的馈赠),构建AAV-DIO-mSNAPf和AAV-DIO-4xSNAPf。将AAV载体以1-5x 10<sup>12</sup>病毒粒子mL<sup>-1</sup>的滴度包装到AAV2/9血清型中。

[0035] 重组蛋白的纯化.将携带pET-21a-scFv-GCN4-HA-GB1或pET-21a-SpyCatcher的大

大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 细胞在补充有 $100\mu\text{g mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的溶菌肉汤 (LB) 培养基中生长。在 $37^\circ\text{C}$ 下用浓度为 $0.1\text{M}$ 的IPTG诱导蛋白表达3小时。

[0036] 然后通过以 $4^\circ\text{C}$ 下以 $2,000\times$ 旋转20分钟来沉淀细胞。通过超声处理裂解细胞。在 $4^\circ\text{C}$ 下通过以 $39,000\times\text{g}$ 离心1小时除去细胞碎片。将上清液与His-Select镍亲和树脂结合,用His-洗涤缓冲液( $20\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{pH } 8.0$ ,  $1\text{M NaCl}$ ,  $20\text{mM}$ 咪唑)洗涤,用His-洗脱缓冲液( $20\text{mM}$ 磷酸钠,  $\text{pH } 8.0$ ,  $0.5\text{M NaCl}$ ,  $250\text{mM}$ 咪唑)洗脱,然后将洗脱液用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 透析。

[0037] 根据原始报告表达LaG-16-2并进行纯化。简而言之,将携带pET-22b-LaG-16-2的大肠杆菌BL21 (DE3) 细胞在补充有 $100\mu\text{g mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的LB培养基中生长。用浓度为 $0.1\text{M}$ 的IPTG在 $12^\circ\text{C}$ 下诱导蛋白表达20小时。通过在 $4^\circ\text{C}$ 下以 $5,000\times\text{g}$ 离心10分钟来沉淀细胞。通过渗透压休克分离周质级分。然后将该级分结合到His-Select镍亲和树脂上,并如上所述纯化。

[0038] 蛋白-HCR DNA引发链偶联.使用马来酰亚胺-PEG2-NHS (SMCC, 746223, Sigma-Aldrich) 或NHS-叠氮化物(合成或购自Thermo Fisher Scientific, 26130) 作为接头进行偶联。对于马来酰亚胺-PEG2-NHS偶联,将蛋白(IgG、scFv、LaG-16-2和SpyCatcher) 透析到磷酸盐缓冲盐水 (PBS,  $\text{pH } 7.4$ ) 中,并在室温下与马来酰亚胺-PEG2-NHS (7.5倍摩尔过量) 反应2小时。使用Zeba离心柱 (7000MWC0) 从马来酰亚胺活化的蛋白中去除过量的交联剂。平行地,使用二硫苏糖醇 (DTT,  $100\text{mM}$ ) 在PBS ( $1\text{mM EDTA}$ ,  $\text{pH } 8.0$ ) 中于室温下将硫醇修饰的HCR引发链还原2小时,然后使用Micro Bio-Spin P-6凝胶柱进行纯化。将所述马来酰亚胺活化的蛋白和还原的引发链(相对IgG为15倍摩尔过量;相对scFv、LaG-16-2为7.5倍;相对SpyCatcher为3倍) 混合,并在室温下反应2小时。使用Amicon超滤离心过滤器 ( $50\text{kDa MWC0}$ ) 或Zeba离心柱 (7000MWC0) 纯化HCR引发链标记的蛋白。

[0039] 对于NHS-叠氮化物偶联,将蛋白透析到磷酸盐缓冲盐水 (PBS,  $\text{pH } 7.4$ ) 中,并在室温下与NHS-叠氮化物 (7.5倍摩尔过量) 反应2小时。使用Zeba离心柱 (7000MWC0) 从叠氮化物活化的蛋白中去除过量的交联剂。将所述叠氮化物活化的蛋白与DBCO标记的HCR引发链(相对IgG为15倍摩尔过量;相对scFv、LaG-16-2为7.5倍;相对SpyCatcher为3倍) 混合,然后在室温下反应12小时。使用Amicon超滤离心过滤器 ( $50\text{kDa MWC0}$ ) 或Zeba离心柱 (7000MWC0) 纯化HCR引发链标记的蛋白。

[0040] 细胞培养和细菌感染. HEK293T细胞 (ATCC CRL-3216) 和HeLa细胞 (ATCC CCL-2) 用于培养细胞染色实验。将细胞接种在 $12\text{mm}$ 的1.5号盖玻片上。使用PEI进行转染。在后续的实验之前,将细胞用低聚甲醛固定。根据以前的报道进行鼠伤寒沙门氏菌感染。

[0041] 小鼠和病毒注射. 动物的护理和使用符合北京的国家生命科学研究所 (National Institute of Biological Sciences, NIBS) 的机构准则以及中国的政府法规。

[0042] 使用任一性别的成年 (8-12周龄) SERT-Cre小鼠 [种系名: B6.Cg-Tg (Slc6a4-Cre) ET33Gsat;MMRRC;Davis, CA, USA]、CaMKIIa-Cre [种系名: B6.Cg-Tg (Camk2a-cre) T29-1St1/J]、ChAT-Cre [种系名: B6;129S6-Chatm2 (cre) Low1/J] 和C57BL/6N小鼠。将小鼠维持12/12的光周期 (在8AM开灯), 并不限量地提供食物和水。小鼠在手术前用戊巴比妥麻醉 ( $i.p.$ ,  $80\text{mg}\times\text{kg}^{-1}$ ), 然后放在小鼠立体定位仪中。通过玻璃移液器以 $50\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率将 $350\text{nL}$ 病毒 (AAV-DIO-mGFP、AAV-DIO-mSNAPf或AAV-DIO-4xSNAPf) 输注到小鼠的目标区域。所有后

续实验均在病毒注射后至少3周进行,以留出足够的时间进行转基因表达。

[0043] 组织样品制备.用过量的戊巴比妥麻醉小鼠,并用PBS、然后用低聚甲醛(PFA,在PBS中4%wt/vol)进行心内灌注。解剖出组织并在4%PFA中在室温下4小时或在4℃下1天进行后固定。将组织样品首先在30%蔗糖溶液中脱水以制备薄片(50 $\mu$ m)。薄片在冷冻切片机(Leica CM1950)上制备。

[0044] 免疫组织化学.抗体的详细信息、工作浓度和温育时间可见于表2。对于脑切片和培养细胞,将样品用含0.3%Triton X-100的PBS(PBST)透化,并在室温下在含2%BSA的PBST中封闭1小时。然后将切片与第一抗体一起温育。将样品在PBST中洗涤3次,然后与生物素化的或HCR引发链偶联的第二抗体一起温育。对于对照实验,我们使用含有等量的荧光团偶联的第二抗体和生物素化的第二抗体的混合物。然后将样品再次在PBST中洗涤3次。通过荧光团偶联的链霉亲和素或DNA-荧光团HCR放大链使生物素化的第二抗体可视化。通过DNA-荧光团HCR放大链使HCR引发链偶联的第二抗体可视化。

[0045] isHCR引发链的标记.将所有试剂溶解在HCR放大缓冲液中[5 $\times$ 柠檬酸钠氯化钠(sodium chloride citrate)(SCC缓冲液),0.1%vol/vol Tween-20,和含10%wt/vol硫酸葡聚糖的ddH<sub>2</sub>O]。用生物素化的第二抗体标记后,将样品在1 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>链霉亲和素中在室温下温育30分钟。在PBST中洗涤3次后,将样品与0.5 $\mu$ M DNA-生物素HCR引发链一起在室温下温育30分钟。然后将样品洗涤三次并保存在PBST中。

[0046] 对于使用多种生物素化第二抗体的多重放大(图1a),使用isHCR依次放大目标蛋白的免疫信号。也就是说,在用两种一抗标记后,将样品与抗第一抗体的两种生物素化第二抗体之一一起温育;然后使用基本isHCR放大方案来放大该第二抗体的信号。接下来,在施加所述两种生物素化第二抗体的第二种之前,将脑切片与链霉亲和素一起温育(0.5 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,室温下30分钟)以阻断残留在第一种第二抗体上的任何未结合的生物素单位;然后添加生物素(5ng $\cdot$ mL<sup>-1</sup>,室温下30分钟)以使链霉亲和素的生物素结合位点饱和。在阻断第一种生物素化第二抗体的反应性之后,添加第二种生物素化第二抗体,然后放大。对于使用HCR引发链偶联的第二抗体进行多重标记(图2c、2d),将快速冷却的DNA荧光团HCR放大链直接施加到引发链标记的样品,然后用基本isHCR放大方案(即,没有任何链霉亲和素步骤)进行放大。

[0047] 如下进行用HCR引发链来标记基因编码的标签(SNAP标签、SpyTag、GFP和smFP<sub>GCN4</sub>) (图2e和图1b-1d)。在膜透化后,将培养细胞或脑切片样品与合适的结合配偶体一起温育。对于SNAP标签标记,我们施加0.1 $\mu$ M BG标记的HCR引发链或0.5-1 $\mu$ M SNAP-Surface Alexa Fluor 546,并将这些样品在室温下温育1小时。对于SpyTag标记,我们施加25 $\mu$ M HCR引发链标记的SpyCatcher,并将这些样品在室温下温育2小时。对于mGFP标记的样品,我们施加了1 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>HCR引发链标记的LaG-16-2并将这些样品在4℃下温育。对于smFP<sub>GCN4</sub>标记,我们施加5 $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>HCR引发链标记的scFv-GCN4-HA-GB1并将这些样品在室温下温育1小时。PBS用作SNAP-Surface Alexa Fluor 546的温育缓冲液。HCR放大缓冲液用于所有含HCR引发链的试剂。然后将样品用PBST洗涤3次,并保存在PBST中。

[0048] isHCR放大.要注意,虽然有关isHCR引发链的实验步骤根据偶联策略而有所不同,但基本的isHCR放大过程在所有实验中都是共同的。首先,制备HCR放大缓冲液[5 $\times$ 柠檬酸钠氯化钠(SCC缓冲液),0.1%vol/vol Tween-20,和含10%wt/vol硫酸葡聚糖的ddH<sub>2</sub>O]。接

下来,通过在95℃加热90秒并在30分钟内冷却至室温,将一对DNA-荧光团HCR放大链分别在5×SSC缓冲液中快速冷却。然后将这两个放大链添加到放大缓冲液中(对于薄切片,通常终浓度为12.5nM,或对于大体积样品为150nM)。在样品于室温下与该缓冲液一起温育过夜时进行isHCR放大,然后在信号检测之前用PBST洗涤3次以除去游离的放大链。要注意,对于要求本底抑制的应用,对该基本过程增添了额外的氧化石墨烯步骤。简而言之,为了包括淬灭步骤,将GO (20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )与放大链在放大缓冲液中混合。将所述放大链/GO混合物充分涡旋并在室温下温育至少5分钟,然后添加到引发链标记的样品中。

[0049] 为了进行多轮放大,我们使用DNA-生物素HCR放大链。在使用前,对DNA-生物素HCR放大链进行快速冷却。将样品与12.5nM DNA-生物素HCR放大链一起在室温下温育过夜。充分洗涤后,再次施加链霉亲和素(1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )以开始下一轮放大。添加DNA-生物素HCR放大链以及然后添加链霉亲和素的程序重复两次或三次,以达到期望的信号强度。在最后一轮中使用DNA-荧光团放大链(12.5nM)以使信号可视化。对于对照实验,第一轮放大使用生物素和Alexa Fluor-488双标记的HCR放大链。第二轮放大使用Alexa Fluor-546标记的HCR放大链。

[0050] 荧光显微术.在使用10×0.3NA、20×0.5NA、63×1.4NA或100×1.3NA物镜的Zeiss Meta LSM510共焦扫描显微镜上、或在使用20×0.5NA或40×0.75NA物镜的Zeiss LSM880共焦扫描显微镜上进行共焦显微术。用FIJI和Matlab对图像进行处理和测量。

[0051] 为了对全脑切片进行成像,我们使用带有10×物镜的Olympus VS120虚拟显微术载玻片扫描系统进行了宽视野荧光成像。对于载玻片扫描仪成像,在同一个成像运行过程中使用相同的光强度和曝光时间对同一载玻片上来自两个组的脑切片进行成像。图像以16位采集,并直接转换为TIFF格式进行发布。

[0052] 使用t检验或Kolmogorov-Smirnov检验确定统计学显著性。 $P < 0.05$ 被认为是显著的。

[0053] 表1.寡核苷酸序列和修饰

[0054]	名称	序列 (5'至 3')	修饰

[0055]

B1 I2	ATATAgCATTCTTTCTTgAggAgggCAgCAAACgggAAgAg (SEQ ID NO: 1)	5' 生物素
B1 I2 胺	ATATAgCATTCTTTCTTgAggAgggCAgCAAACgggAAgAg (SEQ ID NO: 1)	5' 胺
B1 I2 硫醇	ATATAgCATTCTTTCTTgAggAgggCAgCAAACgggAAgAg (SEQ ID NO: 1)	5' 硫醇
B1 I2 DBCO	ATATAgCATTCTTTCTTgAggAgggCAgCAAACgggAAgAg (SEQ ID NO: 1)	5' DBCO
B1 放大链 H1 546	CgTAAAggAAgACTCTTCCCgTTTgCTgCCCTCCTCgCATTC TTTCTTgAggAgggCAgCAAACgggAAgAg (SEQ ID NO: 2)	5' Alexa Fluor 546
B1 放大链 H2 546	gAggAgggCAgCAAACgggAAgAgTCTTCCTTTACgCTCTTC CCgTTTgCTgCCCTCCTCAAgAAAgAATgC (SEQ ID NO: 3)	3' Alexa Fluor 546
B1 放大链 H1 末端生物素	CgTAAAggAAgACTCTTCCCgTTTgCTgCCCTCCTCgCATTC TTTCTTgAggAgggCAgCAAACgggAAgAg (SEQ ID NO: 2)	5' 生物素
B1 放大链 H2 末端生物素	gAggAgggCAgCAAACgggAAgAgTCTTCCTTTACgCTCTTC CCgTTTgCTgCCCTCCTCAAgAAAgAATgC (SEQ ID NO: 3)	3' 生物素
B1 放大链 H1 内部生物素	CgTAAAggAAgACTCTTCCCgTTTgCTgCCCTCCTCgCATTC TTTCTTgAggAgggCAgCAAACgggAAgAg (SEQ ID NO: 2)	内部生物素
B1 放大链 H2 内部生物素	gAggAgggCAgCAAACgggAAgAgTCTTCCTTTACgCTCTTC CCgTTTgCTgCCCTCCTCAAgAAAgAATgC (SEQ ID NO: 3)	内部生物素
B1 放大链 H1 内部生物素和 5'-488	CgTAAAggAAgACTCTTCCCgTTTgCTgCCCTCCTCgCATTC TTTCTTgAggAgggCAgCAAACgggAAgAg (SEQ ID NO: 2)	内部生物素 5' Alexa Fluor 488
B1 放大链 H2 内部生物素和 3'-488	gAggAgggCAgCAAACgggAAgAgTCTTCCTTTACgCTCTTC CCgTTTgCTgCCCTCCTCAAgAAAgAATgC (SEQ ID NO: 3)	内部生物素 3' Alexa Fluor 488
B5 I2	ATATACTTCATATCACTCACTCCCAATCTCTATCTAC CC (SEQ ID NO: 4)	5' 生物素
B5 I2 硫醇	ATATACTTCATATCACTCACTCCCAATCTCTATCTAC CC (SEQ ID NO: 4)	5' 硫醇
B5 I2 DBCO	ATATACTTCATATCACTCACTCCCAATCTCTATCTAC CC (SEQ ID NO: 4)	5' DBCO

[0056]	B5 放大链 H1 488	ATTggATTTgTAgggTAGATAgAgATTgggAgTgAgCACTTCA TATCACTCACTCCCAATCTCTATCTACCC (SEQ ID NO: 5)	5' Alexa Fluor 488
	B5 放大链 H2 488	CTCACTCCCAATCTCTATCTACCCTACAAATCCAATgggT AgATAgAgATTgggAgTgAgTgATATgAAGTg (SEQ ID NO: 6)	3' Alexa Fluor 488
	B4 I2 硫醇	ATATACACATTTACAGACCTCAACCTACCTCCAACCTCTC AC (SEQ ID NO: 4)	5' 硫醇
	B4 放大链 H1 647	gAAgCgAATATggTgAgAgTTggAggTAggTTgAggCACATTT ACAgACCTCAACCTACCTCCAACCTCTCAC (SEQ ID NO: 7)	5' Alexa Fluor 647
	B4 放大链 H2 647	CCTCAACCTACCTCCAACCTCTCACCATATTCgCTTCgTgA gAgTTggAggTAggTTgAggTCTgTAAATgTg (SEQ ID NO: 8)	3' Alexa Fluor 647

[0057] 表2. 抗体

[0058] 第一抗体:

表位	经销商	目录号	稀释度	温育时间
酪氨酸羟化酶 (TH)	Millipore	ab152	1:1000	脑切片 4°C 下过夜
胆碱乙酰基转移酶 (ChAT)	Millipore	AB144P	1:500	脑切片 4°C 下过夜
DOPA 脱羧酶 (AADC)	Abcam	ab3905	1:500	脑切片 4°C 下 24h
神经元一氧化氮合酶 (nNOS)	Sigma	N7280	1:500	脑切片 4°C 下过夜
[0059] 多巴胺转运蛋白 (DAT)	Millipore	MAB369	1:500	脑切片 4°C 下过夜
hGBP1	Santa Cruz	sc-53857	1:1000	Western 印迹室温下 1h
GFP	Thermo Fisher Scientific	A10259	1:1000	脑切片 4°C 下过夜; 培养 细胞和 western 印迹室温 下 1h
Ki67	eBioscience	14-5698-80	1:1000	培养细胞室温下 1h
Tom20	Santa Cruz	sc-11415	1:1000	培养细胞室温下 1h
HA	BioLegend	901505	1:500	Western 印迹室温下 1h

[0060] 第二抗体:

第二抗体	经销商	标记物	目录号	稀释度	温育时间
山羊抗兔	Abcam	生物素	ab6720	1:1000	脑切片室温下 2h
驴抗山羊	Jackson Immuno Research	生物素	705-065-147	1:1000	脑切片室温下 2h
驴抗小鼠	Jackson Immuno Research	生物素	715-065-151	1:1000	培养细胞室温下 1h
山羊抗兔	Thermo scientific	Fisher DNA HCR 引发链	31212	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	脑切片室温下 2h; Western 印迹和培养细胞室温下 1h
山羊抗大鼠	Thermo scientific	Fisher DNA HCR 引发链	31220	5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	脑切片室温下 2h; Western 印迹和培养细胞室温下 1h

[0062] 荧光试剂:

名称	经销商	标记物	目录号	浓度	温育时间
SNAP-Surface Alexa Fluor 546	NEB	Alexa Fluor 546	S9132S	500 $\mu\text{M}$ , 1:500-1:1000	室温下 30min

[0064] 表3.smFP\_GCIN4的蛋白序列。总共九个GCIN4标签插入到超折叠GFP (superfolder GFP) 支架中。

[0065] MEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLGGGVQCFS RYPDHMKRHDFPKSAMPEGYVQERTISFKDDGTYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIIDFKEDGNILGHKLEYNFNSH NVYITADKQKNGIKANFKIRHNVEGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSVLSKDPNEKRDHMLLEF VTAAGITHGMDELYKSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKKGSGSGEELLSKNYHLENEVARLKK (SEQ ID NO:9)

[0066] 实施例1

[0067] 使用isHCR进行多重标记。

[0068] 图1. (a) 显示了小鼠切片中背侧纹状体针对TH (绿色) 和胆碱乙酰转移酶 (ChAT, 红色) 双重免疫染色的图像。每种抗原的信号使用相应的生物素化第二抗体和isHCR依次可视化。(b) 使用SMCC作为接头将HCR引发链与GFP纳米抗体 (LaG-16-2) 偶联。使用腺相关病毒 (AAV) 载体, 在CaMKII-Cre转基因小鼠的眶额叶皮质神经元中表达mGFP蛋白。使用HCR引发链偶联的GFP纳米抗体和isHCR-546放大上丘中的GFP信号。(c) 使用基因编码的蛋白标签快

速标记的示意图。官能化的HCR引发链直接与蛋白标签结合并引发放大过程。构建带有Cre依赖性double-floxed inverse (DIO) 开放阅读框的AAV载体,该开放阅读框含有编码SNAPf标签的基因,并将所述载体包装到AAV粒子中。将AAV载体注射到Cre转基因小鼠中以实现细胞类型特异性表达。(d) 用SNAP标签标记的HEK293T细胞和小鼠脑的共聚焦图像。上图显示瞬时表达mSNAPf标签的细胞。中图显示来自注射AAV-DIO-mSNAPf的SERT-Cre小鼠的DRN。下图显示来自注射AAV-DIO-4xSNAPf的SERT-Cre小鼠的内侧隔核。标签阳性细胞用苜蓿基鸟嘌呤偶联的Alexa Fluor 546 (BG-546) 或isHCR-546标记。比例尺,50 $\mu$ m (a), 200 $\mu$ m (b), 100 $\mu$ m (d)。

[0069] 实施例2

[0070] 使用isHCR同时检测多个目标。

[0071] 图2. (a) 显示两个正交HCR引发链可以使用SMCC或点击化学基团作为接头直接偶联到第二抗体上。(b) 含有纯化的hGBP1和纯化的GFP-hGBP1蛋白的蛋白混合物的Western印迹。施加抗GFP第一抗体和抗hGBP1第一抗体。使用两种与不同HCR引发链偶联的第二抗体来检测所述两种第一抗体。(c) 使用两种HCR引发链偶联的第二抗体针对核蛋白Ki67 (红色) 和线粒体蛋白Tom20 (绿色) 免疫染色的HEK 293T细胞的图像。然后使用针对Ki67的isHCR-546和针对Tom20的isHCR-488同时放大信号。(d) 小鼠脑切片中的背侧纹状体使用两种HCR引发链偶联的第二抗体针对多巴胺转运蛋白 (DAT, 红色) 和神经元一氧化氮合酶 (nNOS, 绿色) 双重免疫染色的图像。然后使用针对DAT的isHCR-546和针对nNOS的isHCR-488同时放大信号。(e) 表达靶向不同细胞位置的三个正交蛋白标签的HEK 293T细胞的图像。使用针对mSHFP\_GC4的isHCR-488、针对mitoSNAP的isHCR-546和针对H2B-SpyTag的isHCR-647同时放大信号。比例尺,10 $\mu$ m (c,e), 50 $\mu$ m (d)。

## SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Biological Sciences, Beijing

<120> Multiplexed Immunosignal Amplification using Hybridization Chain  
Reaction-based Method

<130> AN2325BS66W0

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence

<400> 1

atatagcatt ctttcttgag gagggcagca aacgggaaga g 41

<210> 2

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence

<400> 2

cgtaaaggaa gactcttccc gtttctgcc ctctctgcat tctttcttga ggagggcagc 60  
aaacgggaag ag 72

<210> 3

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence

<400> 3

gaggaggca gcaaacggga agagtcttcc tttacgtct tccgtttgc tgccctctc 60  
aagaaagaat gc 72

<210> 4

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence  
<400> 4  
atatacactt catatcactc actcccaatc tctatctacc c 41  
<210> 5  
<211> 72  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Artificial Sequence  
<400> 5  
attggatttg taggtagat agagattggg agtgagcact tcatatcact cactcccaat 60  
ctctatctac cc 72  
<210> 6  
<211> 72  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Artificial Sequence  
<400> 6  
ctcactccca atctctatct accctacaaa tccaatgggt agatagagat tgggagtgag 60  
tgatatgaag tg 72  
<210> 7  
<211> 72  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Artificial Sequence  
<400> 7  
gaagcgaata tggtagagat tggaggtagg ttgaggcaca ttacagacc tcaacctacc 60  
tccaactctc ac 72  
<210> 8  
<211> 72  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Artificial Sequence  
<400> 8  
cctcaacctc cctccaactc tcacatatt cgcttcgtga gagttggagg taggttgagg 60  
tctgtaaagt tg 72

<210> 9  
 <211> 459  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Artificial Sequence  
 <400> 9  
 Met Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Arg Leu Lys Lys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn  
                   20                   25                   30  
 Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Gly Ser Gly Ser  
                   35                   40                   45  
 Gly Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala  
                   50                   55                   60  
 Arg Leu Lys Lys Gly Ser Gly Ser Gly Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe  
 65                   70                   75                   80  
 Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly  
                   85                   90                   95  
 His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Asn Gly  
                   100                   105                   110  
 Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro  
                   115                   120                   125  
 Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Gly Gly Val Gln Cys Phe Ser  
                   130                   135                   140  
 Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met  
 145                   150                   155                   160  
 Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly  
                   165                   170                   175  
 Thr Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val  
                   180                   185                   190  
 Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile  
                   195                   200                   205  
 Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile  
                   210                   215                   220  
 Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg  
 225                   230                   235                   240  
 His Asn Val Glu Gly Ser Gly Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn  
                   245                   250                   255

Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Gly Ser Gly Ser  
 260 265 270  
 Gly Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala  
 275 280 285  
 Arg Leu Lys Lys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn  
 290 295 300  
 Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Gly Ser Gly Ser  
 305 310 315 320  
 Gly Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro  
 325 330 335  
 Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr  
 340 345 350  
 Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val  
 355 360 365  
 Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu  
 370 375 380  
 Leu Tyr Lys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr  
 385 390 395 400  
 His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Gly Ser Gly Ser Gly  
 405 410 415  
 Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg  
 420 425 430  
 Leu Lys Lys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr  
 435 440 445  
 His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys  
 450 455

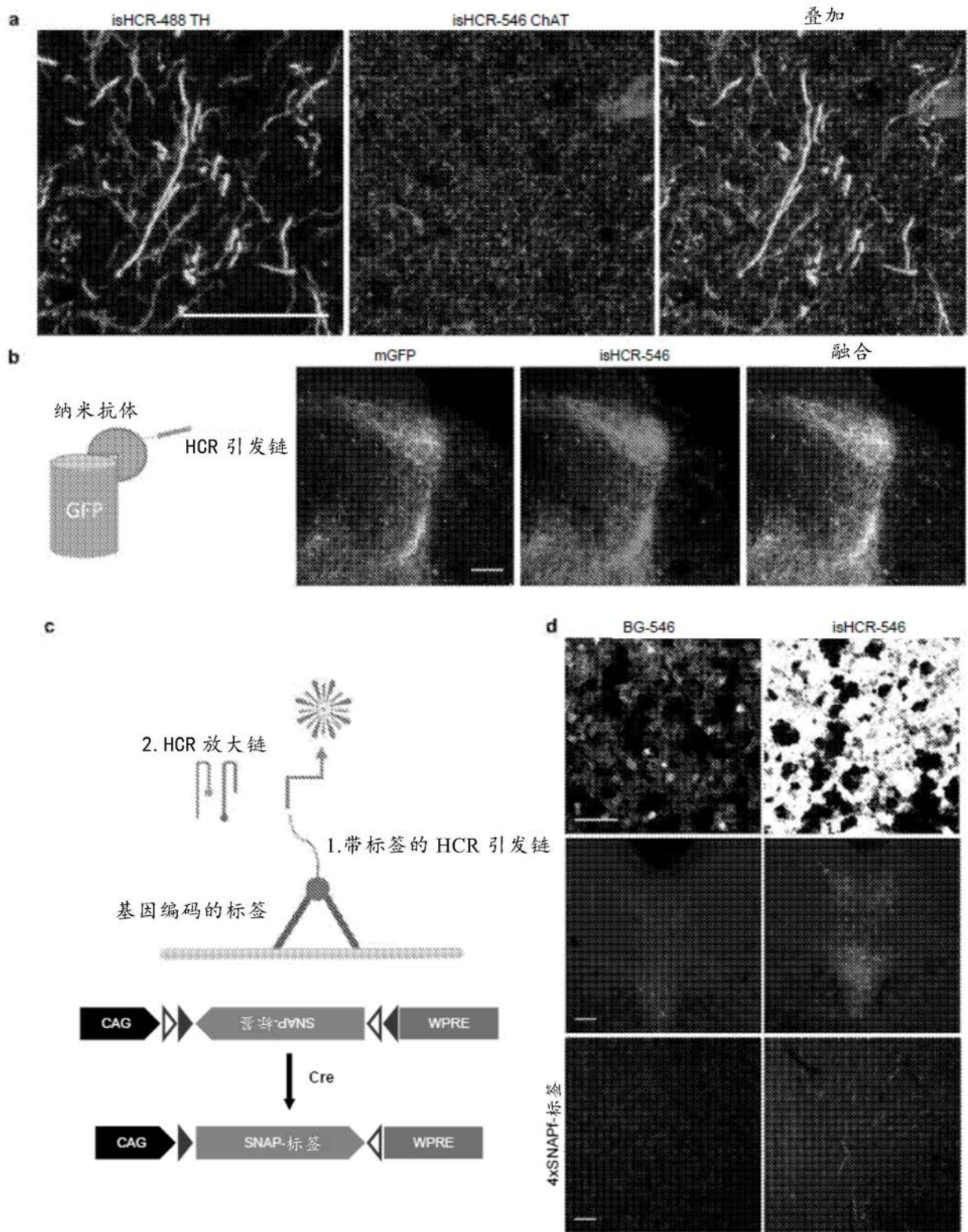


图1

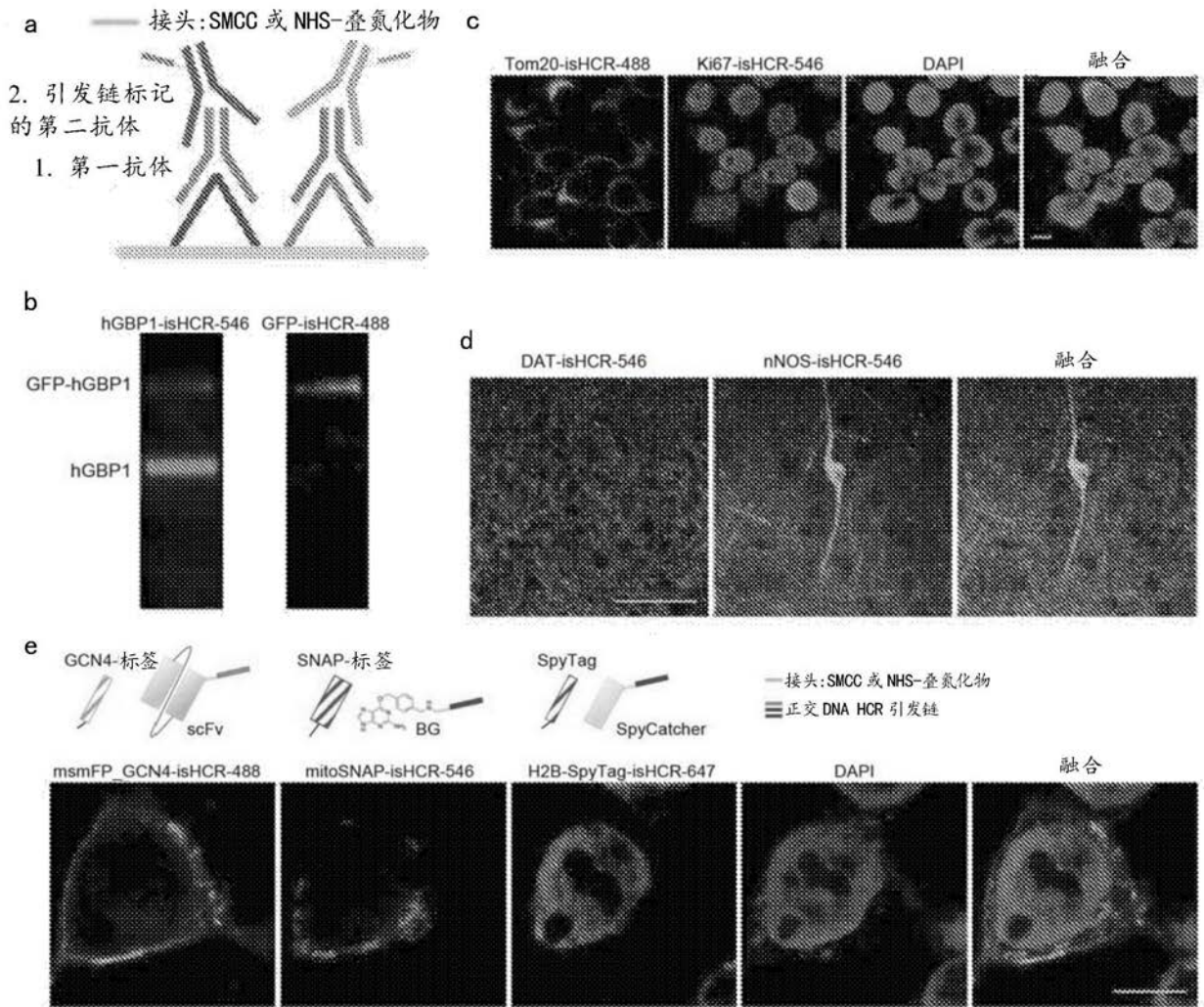


图2