



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105294849 A
(43) 申请公布日 2016. 02. 03

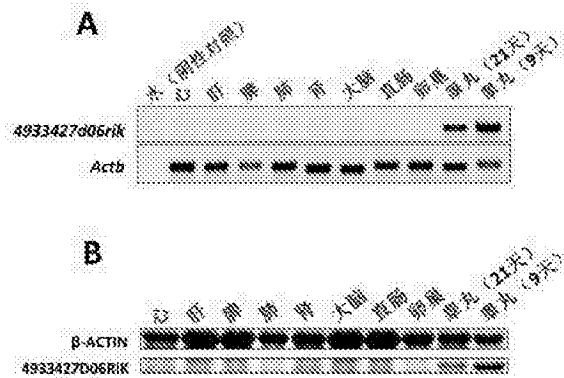
(21) 申请号 201510641728. 7
(22) 申请日 2015. 09. 29
(71) 申请人 中山大学
地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路
135 号
(72) 发明人 黄军就 松阳洲 林卓桁
(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102
代理人 陈卫

(51) Int. Cl.
C07K 14/47(2006. 01)
C12N 15/12(2006. 01)
G01N 33/53(2006. 01)
C07K 16/28(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称
小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK
及其抗体和应用

(57) 摘要
本发明公开了一种小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK 及其抗体和应用。所述抗原 4933427D06RIK 由 4933427d06rik 基因(序列如 SEQ ID NO. 1 所示) 编码得到, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示, 并特异性表达于睾丸中精原干细胞表面。本发明所述 4933427D06RIK 蛋白特异性的表达于睾丸中精原干细胞表面, 利用该蛋白制备出相应的抗体, 可成功定位精原干细胞, 进而可利用流式细胞术等方法高效分离出表达 4933427D06RIK 蛋白的 SSCs 细胞, 从而实现 SSCs 细胞的识别、分离和纯化, 为 SSCs 细胞的培养、诱导分化、移植等科研或临床应用提供支持。



1. 一种 *4933427d06rik* 基因, 其特征在于, 该基因特异性表达于小鼠睾丸中精原干细胞表面, 该基因的序列如 SEQ ID NO. 1 所示。
2. 一种小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK, 其特征在于, 所述抗原 4933427D06RIK 由权利要求 1 所述 *4933427d06rik* 基因编码得到, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。
3. 根据权利要求 2 所述小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK, 其特征在于, 所述抗原 4933427D06RIK 特异性表达于睾丸中精原干细胞表面。
4. 权利要求 2 或 3 所述抗原 4933427D06RIK 在作为精原干细胞的标示物中的应用。
5. 根据权利要求 4 所述应用, 其特征在于, 具体是所述抗原 4933427D06RIK 在特异性识别、分离和 / 或纯化精原干细胞方面的应用。
6. 一种精原干细胞特异性识别抗体 4933427D06RIK, 其特征在于, 是利用权利要求 2 或 3 所述抗原 4933427D06RIK 制备得到。
7. 根据权利要求 6 所述精原干细胞特异性识别抗体 4933427D06RIK, 其特征在于, 所述抗体为多克隆抗体。
8. 根据权利要求 7 所述精原干细胞特异性识别抗体 4933427D06RIK, 其特征在于, 其制备方法包括如下步骤:
 - S1. 原核表达和纯化 4933427D06RIK 蛋白;
 - S2. 免疫家兔, 获得含小鼠 4933427D06RIK 蛋白多克隆抗体的血清;
 - S3. 纯化血清, 获得纯化的小鼠 4933427D06RIK 蛋白多克隆抗体。
9. 权利要求 6 ~ 8 任一所述精原干细胞特异性识别抗体 4933427D06RIK 在特异性的识别、分离和 / 或纯化精原干细胞方面的应用。
10. 根据权利要求 9 所述应用, 其特征在于, 所述应用的方法为: 利用所述精原干细胞特异性识别抗体 4933427D06RIK, 通过流式细胞术分离出表达 4933427D06RIK 蛋白的精原干细胞。

小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK 及其抗体和应用

技术领域

[0001] 本发明属于细胞分离纯化技术领域。更具体地,涉及小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK 及其抗体和应用。

背景技术

[0002] 男性不育症的发生率为 14%左右,是目前生殖医学面临的重要问题之一,精原干细胞 (Spermatogonial stem cells, SSCs) 是雄性动物体内一类具有自我更新和分化产生精子能力的细胞群;SSCs 的研究发展为治疗男性不育提供了新的策略和方法。精原干细胞是维持精子发生的基础,也是成体哺乳动物体内唯一一种被证明能够将遗传信息传递给下一代的细胞。

[0003] 成功识别、分离、纯化精原干细胞是进行细胞培养、诱导分化、移植等科研或临床应用的前提。利用抗体通过流式细胞术可以高效分离出表达某种蛋白的细胞,而该方法的关键与核心是蛋白的选择及其抗体的制备。

[0004] 现有的研究显示,小鼠精原干细胞能够表达 THY1、GFRa1、CD9 等细胞表面蛋白,细胞表面分子是 SSCs 分选理想的标记物,但是,这些已知的分子并非在 SSCs 特异性表达;比如,THY1 是熟知的淋巴细胞标记物,因此会严重影响 SSCs 的分离纯化效果。由于目前缺乏对精原干细胞的特异性分子标记物的认识,无法对 SSCs 进行准确鉴别、分离和纯化。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服上述现有技术的缺陷和不足,提供一种小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK,该蛋白特异性的表达于睾丸中的精原干细胞表面,利用该蛋白制备出相应的抗体,可成功定位精原干细胞,进而可利用流式细胞术等方法高效分离表达 4933427D06RIK 蛋白的 SSCs 细胞,从而实现 SSCs 细胞的识别、分离和纯化,为 SSCs 细胞的培养、诱导分化、移植等科研或临床应用提供支持。

[0006] 本发明的目的是提供一种小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK。

[0007] 本发明另一目的是提供利用所述抗原 4933427D06RIK 制备的精原干细胞特异性识别抗体。

[0008] 本发明的再一目的是提供所述小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK 及其抗体在小鼠精原干细胞的特异性识别、分离、纯化中的应用。

[0009] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0010] 一种 4933427d06rik 基因,该基因特异性表达于小鼠睾丸中精原干细胞表面,该基因的序列如 SEQ ID NO.1 所示。

[0011] 一种小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK,由上述 4933427d06rik 基因编码得到,其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示,并特异性表达于睾丸中精原干细胞表面。

[0012] 所述 4933427D06RIK 特异性的表达于睾丸中精原干细胞表面,因此可作为精原干

细胞的标示物,应用于精原干细胞的识别、分离和 / 或纯化。

[0013] 因此,所述抗原 4933427D06RIK 在作为精原干细胞的标示物中的应用,即所述抗原 4933427D06RIK 在特异性识别、分离和 / 或纯化精原干细胞方面的应用,均在本发明的保护范围之内。

[0014] 另外,利用上述抗原 4933427D06RIK 制备得到的精原干细胞特异性识别抗体 4933427D06RIK,也在本发明的保护范围之内。

[0015] 具体优选地,所述精原干细胞特异性识别抗体 4933427D06RIK 为多克隆抗体。

[0016] 作为一种可实施的优选方案,该抗体的制备方法包括如下步骤:

[0017] S1. 原核表达和纯化 4933427D06RIK 蛋白;

[0018] S2. 免疫家兔,获得含小鼠 4933427D06RIK 蛋白多克隆抗体的血清;

[0019] S3. 纯化血清,获得纯化的小鼠 4933427D06RIK 蛋白多克隆抗体。

[0020] 更具体地,制备方法如下:

[0021] S1. 将 4933427d06rik 基因编码区克隆进 pDEST17 载体,转化 BL21 感受态细菌;待细菌生长至对数生长期前期,以 0.5mM IPTG 诱导表达 6×His-4933427D06RIK 融合蛋白,37℃ 诱导 4 小时后离心收集菌体;

[0022] S2. 以 PBS 将菌体重悬,超声裂解 BL21 细菌,离心取裂解液上清。通过镍柱纯化 6×His-4933427D06RIK 融合蛋白,以咪唑溶液洗脱蛋白;以 SDS-PAGE 确定蛋白浓度与纯度;将纯度高于 80% 的蛋白用于下一步实验;

[0023] S3. 纯化后的蛋白用于免疫家兔,多次免疫一个半月后,获得含小鼠 4933427D06RIK 蛋白多克隆抗体的血清;

[0024] S4. 将 6×His-4933427D06RIK 融合蛋白共价偶联于 AminoLink Plus Coupling Resin;以等体积 TBS 稀释血清与抗原柱孵育纯化血清,最后以 pH2.50.2M 甘氨酸洗脱得到抗体。

[0025] 得到的抗体立刻以 1M Tris-HCl pH9.0 中和至 pH8.0;浓缩并添加等体积甘油于 -20℃ 保存。

[0026] 另外,取上述获得的纯化后的 6×His-4933427D06RIK 融合蛋白进行 SDS-PAGE,转印至 NC 膜;用 S4 中得到的纯化抗体进行孵育,以 IRDye 680 驴抗兔 IgG(H+L) 抗体作为二抗,用 Odyssey 双色红外激发光成像系统检测并记录。

[0027] 本发明利用该抗体,通过流式细胞术等方法,可分离出表达 4933427D06RIK 蛋白的精原干细胞(该阳性细胞类群高表达精原干细胞自我更新的标志基因,而低丰度表达精原干细胞分化的标志基因)。

[0028] 因此,所述精原干细胞特异性识别抗体 4933427D06RIK 在特异性的识别、分离和 / 或纯化精原干细胞方面的应用,也都在本发明的保护范围之内。

[0029] 本发明具有以下有益效果:

[0030] 本发明公开了一种小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK 及其抗体和应用。所述抗原 4933427D06RIK 由 4933427d06rik 基因(序列如 SEQ ID NO.1 所示)编码得到,其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示,并特异性表达于睾丸中精原干细胞表面。

[0031] 本发明提供的 4933427D06RIK 蛋白特异性的表达于睾丸中精原干细胞表面,利用该蛋白制备出相应的抗体,可成功定位精原干细胞,进而可利用流式细胞术等方法,可高效

分离表达 4933427D06RIK 蛋白的 SSCs 细胞,分离得到的 SSCs 细胞类群可以用于培养、扩增等,从而实现 SSCs 细胞的识别、分离和纯化,为 SSCs 细胞的培养、诱导分化、移植等科研或临床应用提供支持,进而 SSCs 的研究发展为治疗男性不育提供新的策略和方法。

附图说明

[0032] 图 1 为 4933427d06rik 基因 (A) 及其蛋白的表达情况;图中,A 为 4933427d06rik 基因在各个组织的表达情况,B 为蛋白在各个组织的表达情况。

[0033] 图 2 为 4933427d06rik 基因和 plzf 基因的表达随小鼠日龄增长的变化趋势;图中。

[0034] 图 3 为 4933427D06RIK 蛋白、PLZF 蛋白、GFRa1 蛋白、GATA4 蛋白阳性细胞在曲细精管上的定位;图中,A 为 4933427D06RIK 以及 PLZF 蛋白、B 为 GFRa1 蛋白、C 为 GATA4 蛋白,D 为其细胞重叠性统计。

[0035] 图 4 为利用 4933427D06RIK 抗体进行流式细胞分选 4933427D06RIK 阳性细胞的结果。

[0036] 图 5 为 4933427D06RIK 阳性细胞类群的 plzf, bcl6b, etv5 等精原干细胞自我更新相关基因表达情况。

[0037] 图 6 为 4933427D06RIK 阳性细胞类群的 c-kit, sohlh1, sohlh2 等精原细胞分化基因表达情况。

[0038] 图 7 为 4933427D06RIK 阳性细胞类群在体外培养体系中的生长情况。

[0039] 图 8 为抗体用 Odyssey 双色红外激发光成像系统检测的记录图。

具体实施方式

[0040] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0041] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0042] 实施例 1 4933427d06rik 基因及其蛋白的表达情况

[0043] 1、实验方法

[0044] 取小鼠睾丸组织于 Trizol 中,苯-氯仿法提取 RNA,反转录为 cDNA。设计上下游引物进行 PCR,产物进行凝胶电泳分析。

[0045] 取小鼠睾丸组织于蛋白裂解中裂解,离心后取上清,加入上样缓冲液,进行 SDS-PAGE 电泳。随后将蛋白质样品转印至 NC 膜上,孵育对应的一抗、二抗,用 Odyssey 双色红外激发光成像系统检测并记录。

[0046] 2、结果如图 1 和 2 所示,4933427d06rik 基因及其蛋白在睾丸中特异性表达,4933427d06rik 基因和 plzf 基因的表达随小鼠日龄增长的变化趋势近似。

[0047] 实施例 2 免疫荧光实验

[0048] 1、利用免疫荧光实验检测 4933427D06RIK 阳性细胞在曲细精管上的定位,以及该细胞类群与其他标志蛋白的关系。

[0049] 免疫荧光实验的方法如下:

[0050] 将小鼠睾丸组织——曲细精管片段置于 4% 多聚甲醛中固定 15min, 再用 PBS 洗两次, 置于水平摇床 5min, 加入 10% FBS 封闭 1h; 孵一抗 4℃ 过夜, 实验第二天用封闭液清洗三次, 每次 10min, 再在室温下孵育二抗 1-2h; PBST 洗一次, 置于水平摇床 5min, Hoechst33343 染色 5min, PBS 洗一次, 置于水平摇床 5min; 加封片液, 涂指甲油封片, 荧光显微镜检测。

[0051] 2、结果如附图 3 所示, 所述的 4933427D06RIK 蛋白, 其标记的细胞类群, 与小鼠精原干细胞标记蛋白 PLZF, 在不同发育时期均高度重叠。

[0052] 4933427D06RIK 蛋白标记的细胞类群, 与 As、Apr 精原细胞标记蛋白 GFRa1, 随小鼠周龄增大而重叠比例下降

[0053] 4933427D06RIK 蛋白标记的细胞类群, 与睾丸体细胞标记蛋白 GATA4, 几乎没有重叠。

[0054] 实施例 3 制备 4933427D06RIK 多克隆抗体

[0055] 制备方法

[0056] S1. 将 4933427d06rik 基因编码区克隆进 pDEST17 载体, 转化 BL21 感受态细菌。待细菌生长至对数生长期前期, 以 0.5mM IPTG 诱导表达 6×His-4933427D06RIK 融合蛋白, 37℃ 诱导 4 小时后离心收集菌体。

[0057] S2. 以 PBS 将菌体重悬, 超声裂解 BL21 细菌, 离心取裂解液上清。通过镍柱纯化 6×His-4933427D06RIK 融合蛋白, 以咪唑溶液洗脱蛋白。以 SDS-PAGE 确定蛋白浓度与纯度。将纯度高于 80% 的蛋白用于下一步实验。

[0058] S3. 纯化后的蛋白用于免疫家兔, 多次免疫一个半月后, 获得含小鼠 4933427D06RIK 蛋白多克隆抗体的血清。

[0059] S4. 将 6×His-4933427D06RIK 融合蛋白共价偶联于 AminoLink Plus Coupling Resin。以等体积 TBS 稀释血清与抗原柱孵育纯化血清, 最后以 pH2.50.2M 甘氨酸洗脱得到抗体。得到的抗体立刻以 1M Tris-HCl pH9.0 中和至 pH8.0。浓缩并添加等体积甘油于 -20℃ 保存。

[0060] S5. 取纯化后的 6×His-4933427D06RIK 融合蛋白进行 SDS-PAGE, 转印至 NC 膜; 用 S4 中得到的纯化抗体进行孵育, 以 IRDye 680 驴抗兔 IgG (H+L) 抗体作为二抗, 用 Odyssey 双色红外激发光成像系统检测并记录。得到的图如附图 8 所示。

[0061] 实施例 4 流式细胞术分离 4933427D06RIK 阳性细胞

[0062] 1. 利用流式细胞术, 分离 4933427D06RIK 阳性细胞, 表达各种精原干细胞标志基因, 而不表达分化精原细胞的标志基因。

[0063] 流式细胞分选实验方法如下:

[0064] (1) 用 0.25% 胰酶和 DNaseI 将小鼠睾丸组织消化成单细胞悬液, 10% FBS 终止消化;

[0065] (2) 离心去除上清, 在冰上孵育一抗 30min;

[0066] (3) 10% FBS 洗两次, 冰上孵育二抗 30min;

[0067] (4) 10% FBS 洗两次;

[0068] (5) 流式检测前 5min 加入 Hoechst33343, 进行流式检测;

[0069] (6) 流式分选时, 以 SSC/FSC 设门, 去除细胞碎片和部分死细胞; 以 Hoechst33343

通道设门,去除死细胞;以 PE-A 通道设门,分离 4933427D06RIK 阳性或阴性细胞类群。

[0070] 2、结果如附图 4 所示,利用 4933427D06RIK 抗体进行流式细胞分选,分离出 4933427D06RIK 阳性细胞。

[0071] 3、对分离出的 4933427D06RIK 阳性细胞类群的相关基因表达情况进行检测。结果如附图 5 和 6 所示,分离得到的 4933427D06RIK 阳性细胞类群表达 *plzf*, *bcl6b*, *etv5* 等精原干细胞自我更新相关基因(图 5),而低表达 *c-kit*, *sohlh1*, *sohlh2* 等精原细胞分化基因(图 6)。

[0072] 实施例 5 4933427D06RIK 阳性细胞类群的体外培养

[0073] 1、检测 4933427D06RIK 阳性细胞类群在体外培养体系中的生长情况。具体方法如下:

[0074] (1) 按照下表配制 SSCs 无血清培养基:

[0075]

试剂	浓度
基础培养基 MEMa	-
牛血清白蛋白	0.2%
HEPES	10mM
L-谷氨酰胺	2mM
青霉素/链霉素	1×
β -巯基乙醇	50 μ M
转铁蛋白	10 μ g/ml

[0076]

腐胺	60 μ M
胰岛素	5 μ g/ml
亚麻酸	425.6 μ M
十八烯酸	1018.4 μ M
棕榈油酸	212.8 μ M
亚油酸	2705.6 μ M
软脂酸	2356.0 μ M
硬脂酸	5844.4 μ M
亚硒酸钠	30nM
GDNF	20ng/ml
GFRa1	150ng/ml
bFGF	10ng/ml

[0077] (2) 选择对数生长期的 MEF, 在培养基中加入丝裂霉素 C 处理 2 ~ 3h。处理结束后, 用 PBS 清洗细胞两次后, 加入 4933427D06RIK 阳性细胞群, 以 SSCs 无血清培养基培养。

[0078] 2、结果如附图 7 所示, 该细胞类群可以在体外培养体系中形成克隆。

[0079] 综上所述研究表明, 4933427D06RIK 蛋白特异性的表达于睾丸中的精原干细胞表面, 利用该蛋白制备出相应的抗体, 可成功定位精原干细胞, 进而可利用流式细胞术等方法, 可高效分离表达 4933427D06RIK 蛋白的 SSCs 细胞, 从而实现 SSCs 细胞的识别、分离和纯化, 为 SSCs 细胞的培养、诱导分化、移植等科研或临床应用提供支持。

SEQUENCE LISTING

- <110> 中山大学
 <120> 小鼠精原干细胞特异性抗原 4933427D06RIK 及其抗体和应用
 <130>
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 2621
 <212> DNA
 <213> 4933427d06rik 基因序列

<400> 1

```

gaatcccgc tctcttgca gaggacttc ctttctgcta gggcagactc accggaagct    60
cactcaggca caagttctct ctagctgagc tgccgctgct cctctctctc ctcttcccag    120
gtgattgatt ccagcttggt tcaagttgac agacagacaa acaaacaaaa acaggagaga    180
agaatctgac ggagacctca tggcagaagg cccaagtcca agtcagcttc cctctgagat    240
gcccgatcaa gactcagatg agcgacctgg agagcaaggt gatccctgtg tggacaaca    300
agaccagtg gaagtagacg agcctaaaga gtcaggccag cctgccagac ccattgctta    360
tgtacgttcg cagaggtctg agcccacaga gcccacagag ccagccggag ctgcaggacg    420
tcatgctggt agaggaaacg atgaagaaca aagagcttac cctggaaggc agagacggag    480
gtggaggcag aggcagaggc agaggcagtg ggcagagaca ggcagccact cacaggcagc    540
cttccaggag tggcaggaac cctctgagga actggttcta cagacatact tcagccacag    600
tgaagaaaca ggggctgcca tgaacctgta tcccaccttg actccagtag tccctgtgcc    660
agcagggatg gcccagtggc cacctatagt ttatgggtac tgggctgcca tggctaccta    720
cccctatgtt accttcatcc ctgtggccaa catagtcccg tgcttcatgt cattcagggc    780
ccccatgttc ttagcctaca tcccttggtg actggtatcc cttggtgctg gccctccctg    840
gctatgtttg tttcccctga ggaggaggaa agcttacagt tgaaaagggt tattctttct    900
catagttagt gttccagttc atcccagcca ggaaaccagg taccagcac ttacagctgg    960
tcttgacaca ccccaaatca gaagcacgaa tgcctcctag gtcccagat ggcttagat    1020
ttggtgacat tgacagttaa cactaaccat tagactatct gtccctcctg ggtttattat    1080
ttgaaaaaaa atatttttat ggtccagtg ccccttaaca ctcccccttc ccacttctc    1140
tctctattct attttttta aaatctgtca tacagcctca aatgcatgac tctgggatca    1200
tccactagag tatggataac taatactgca gaaaaatgac tctattctat ttttttaaaa    1260
atctgtcata cagcctcaaa tgcatgactc tgggatcatc cactagagta tggataacta    1320
atactgcaga aaaatgactc ttctcccta gcaaccatca ttcaccacca gcaacttagc    1380
tgggggtgga gcctcatgag cccctcccc atccatgctg caatgggtgac tggcttgaac    1440
ttgcagcata aggttttccc aggaatctta taccctcagg gaaatggagt gatgctgtac    1500
ccctgaaatc gtgtatttgt gtatagaaag agcaagttac agagctcagg tggaaattggg    1560
atgcaagatt acagatttga accaacaacg gatgggactg aacatctgat agccccgact    1620

```

```

atcacagagg ggagccagga aggaagcaaa cggccccaga agccgaccca gccgtgccta 1680
gagctgggga ggatgagtgt atgtatgtat gaagttctct gaagcaggat atcctgatgt 1740
ggacccttat agtttggagg cagcagtagc tgttctgtaa tagtagtagt agtagtagta 1800
gtagtagtag tagtagtagt agtactagtt gttgttgttg tttttactat gatatcttat 1860
tgtgtgtatc tgtgtgggca tgtatgtggc acagtctgtc tatggaggtc agaggacaac 1920
ttgcagagac agctcttaat tttaccctg tgcagacccg agccttgaac ccaggcctgt 1980
aggcttggca gaacgttttt accggaagca ctgtcccacc agcccaggat ccccaagtga 2040
gttgaaaggc actagaagtt cagactagat tgaaaatgag taagtcaaag aaaattggac 2100
aaattgaaca aaaggcacgg gggtttatga aaggaaacaa agagagttag ccacatttaa 2160
aacaccgagt aagaggctgg gcgatagtgg cgcacacctt taatcccagc acttgtgagg 2220
cagaggcagg tggatctttg ttaattctat gccaacctgg tctgcagagt tacatgatga 2280
gacctgtctc aacagaaggc taagtgtgga atagtttggg aataatagcc ttttggcctc 2340
agtgagaata ttttaaagt cttctctctc tttttttttt ttttaattatc attaatggga 2400
atttcctgtc agttttctca tggatgtctc tgatcaagtt aaaatagttc ctgtcttcag 2460
tactcctaaa ggtgaattat aaattggatt ttgtatttat gaagtttgta tttgtttcta 2520
agaaaaatgt ccaagaagag tttttatcat gaatctttgt atgtgtgtgt gtgtgtgtag 2580
ttaactatcc ttttaaataa atcctcctct tgggctttgg t 2621

```

<210> 2

<211> 203

<212> PRT

<213> 4933427D06RIK 蛋白氨基酸序列

<400> 2

```

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

```

130	135	140													
Pro	Thr	Leu	Thr	Pro	Val	Val	Pro	Val	Pro	Ala	Gly	Met	Ala	Gln	Trp
145					150					155					160
Pro	Pro	Ile	Val	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Ala	Ala	Met	Ala	Thr	Tyr	Pro	Tyr
				165						170					175
Val	Thr	Phe	Ile	Pro	Val	Ala	Asn	Ile	Val	Pro	Cys	Phe	Met	Ser	Phe
				180						185					190
Arg	Ala	Pro	Met	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Trp					
			195							200					

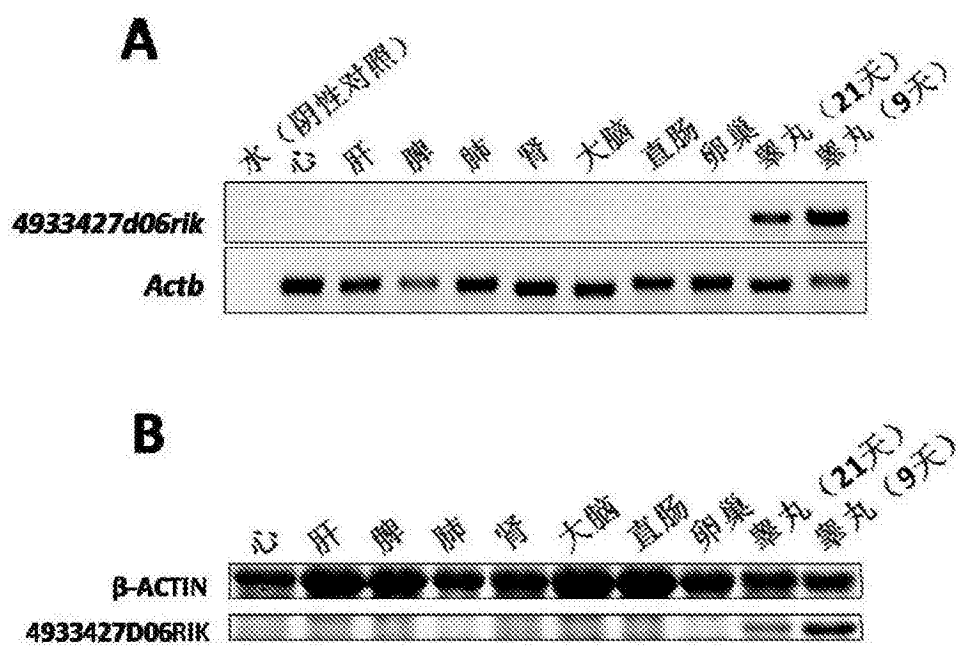


图 1

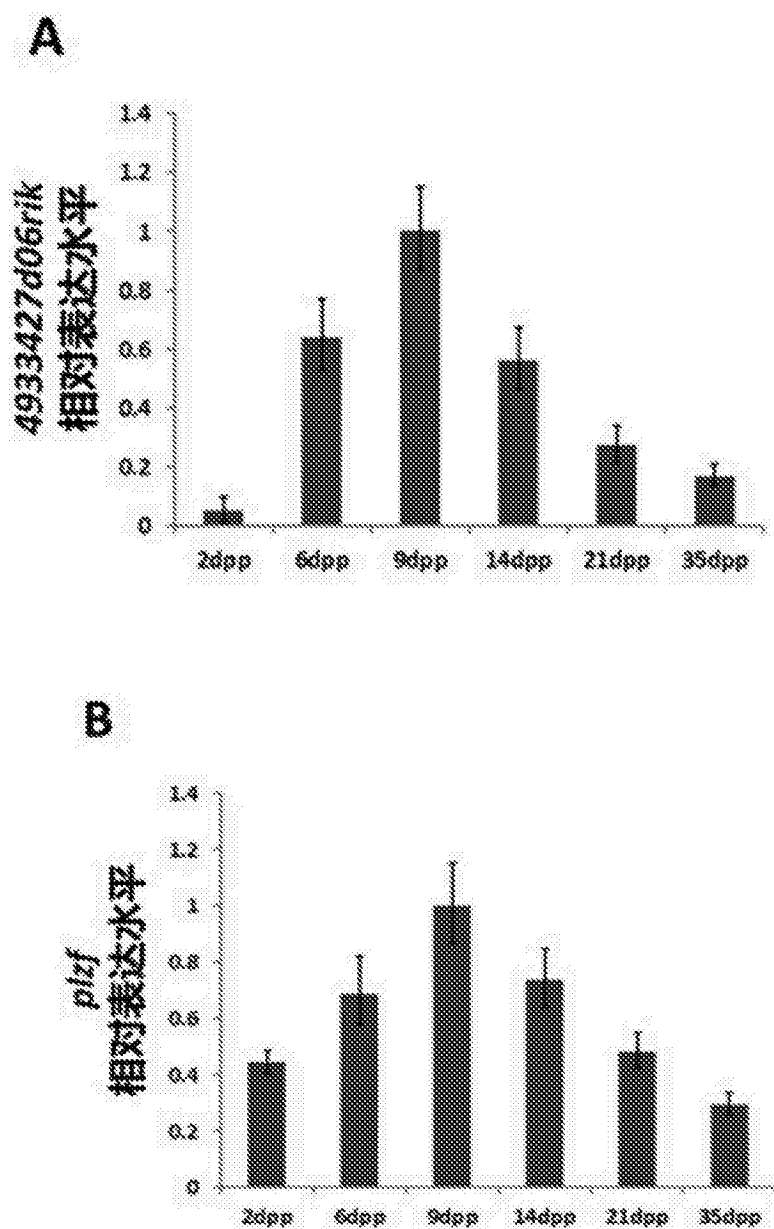


图 2

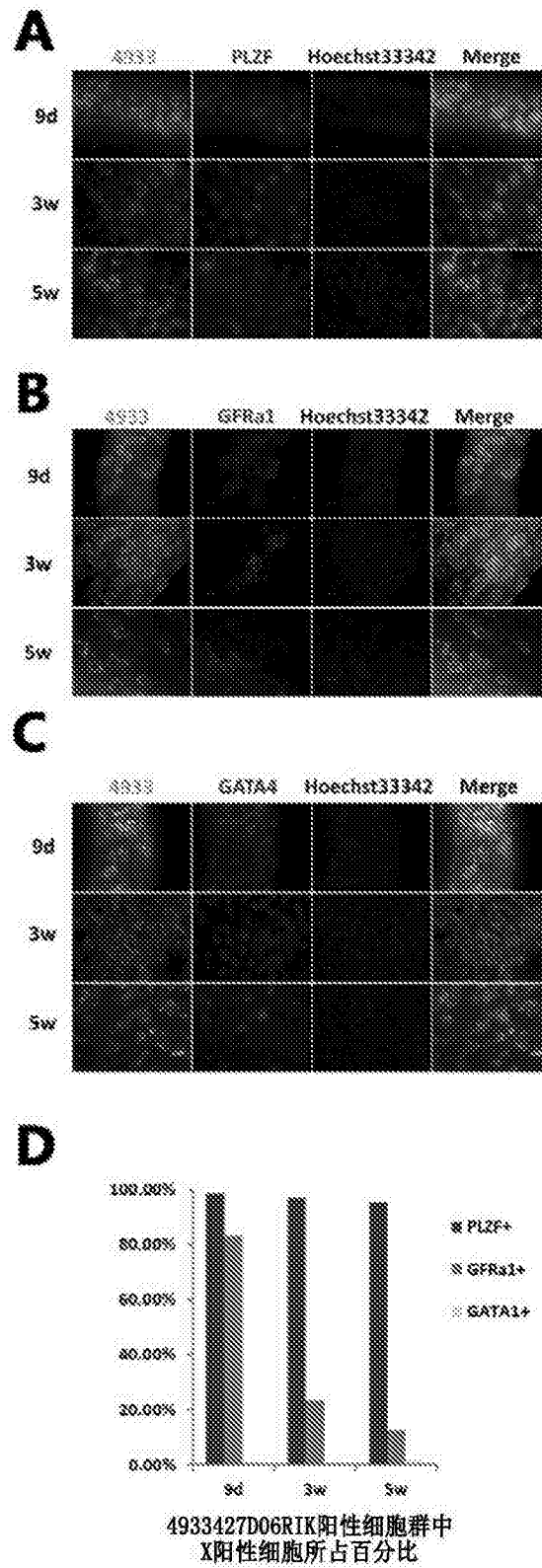


图 3

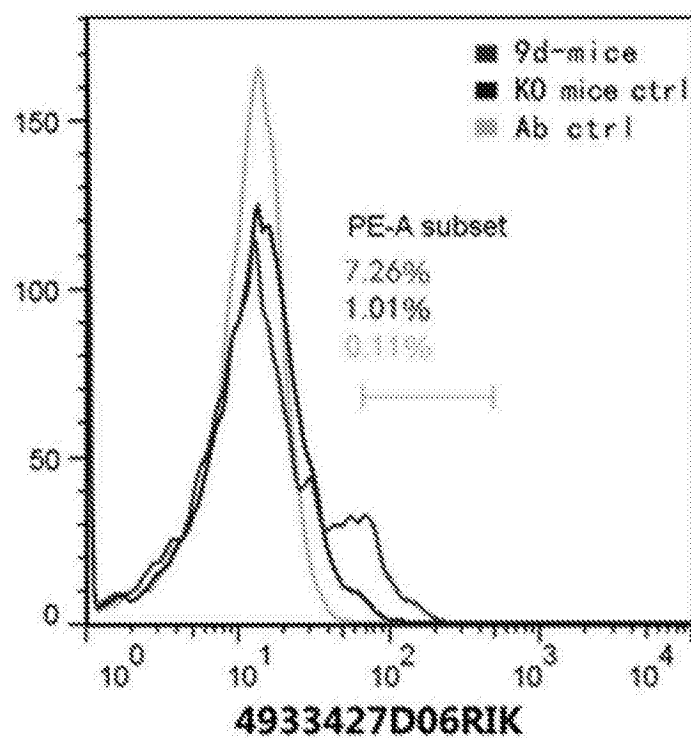


图 4

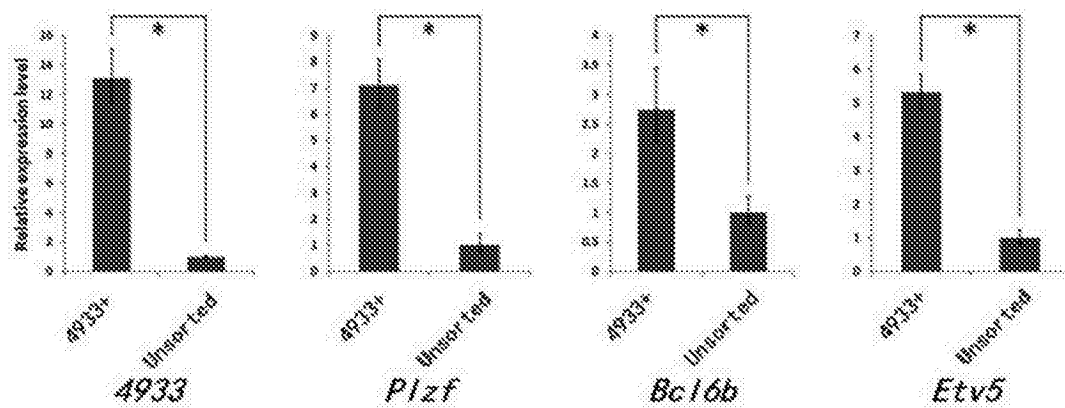


图 5

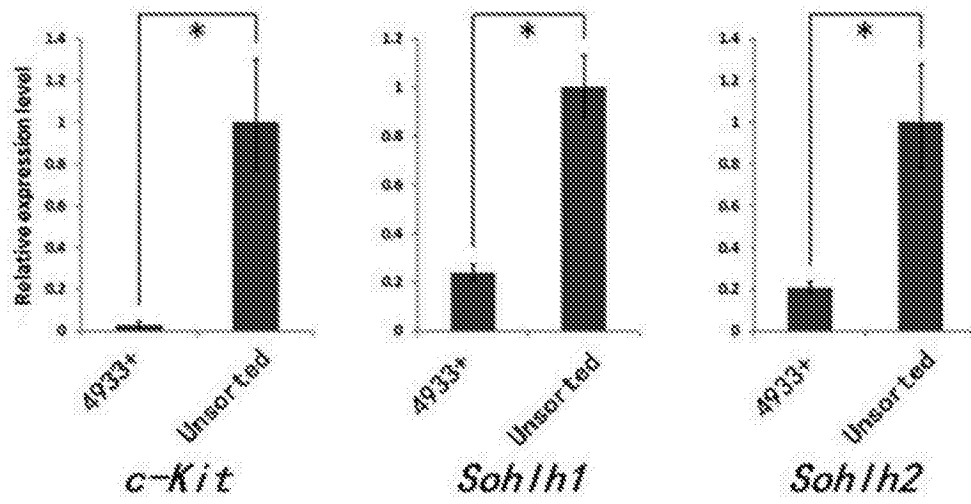


图 6

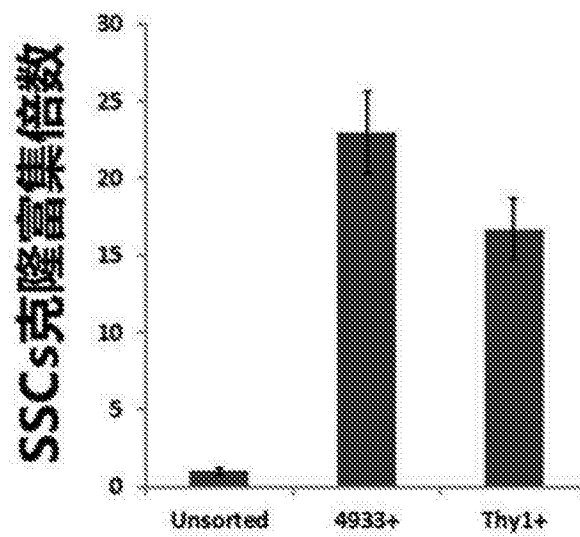
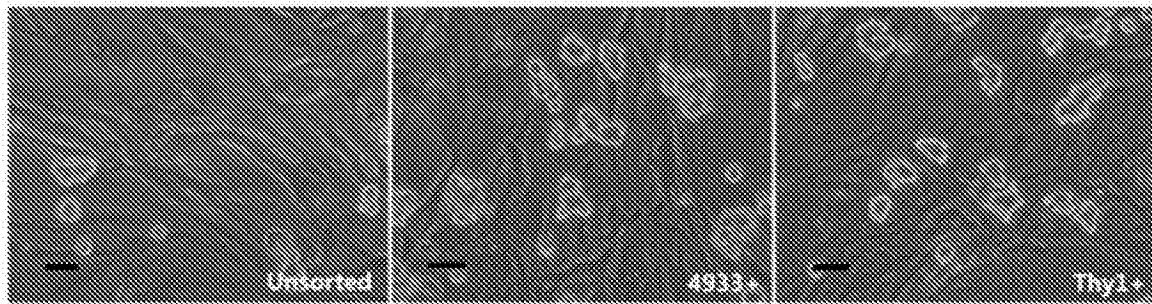


图 7

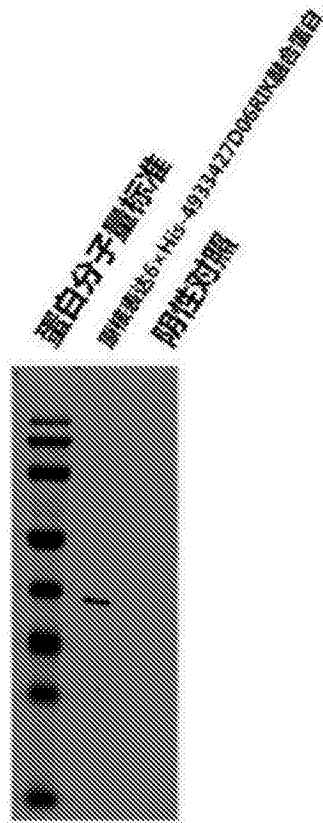


图 8

专利名称(译)	小鼠精原干细胞特异性抗原4933427D06RIK及其抗体和应用		
公开(公告)号	CN105294849A	公开(公告)日	2016-02-03
申请号	CN201510641728.7	申请日	2015-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学		
申请(专利权)人(译)	中山大学		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学		
[标]发明人	黄军就 松阳洲 林卓桁		
发明人	黄军就 松阳洲 林卓桁		
IPC分类号	C07K14/47 C12N15/12 G01N33/53 C07K16/28		
代理人(译)	陈卫		
其他公开文献	CN105294849B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种小鼠精原干细胞特异性抗原4933427D06RIK及其抗体和应用。所述抗原4933427D06RIK由4933427d06rik基因（序列如SEQ ? ID ? NO.1所示）编码得到，其氨基酸序列如SEQ ? ID ? NO.2所示，并特异性表达于睾丸中精原干细胞表面。本发明所述4933427D06RIK蛋白特异性的表达于睾丸中精原干细胞表面，利用该蛋白制备出相应的抗体，可成功定位精原干细胞，进而可利用流式细胞术等方法高效分离出表达4933427D06RIK蛋白的SSCs细胞，从而实现SSCs细胞的识别、分离和纯化，为SSCs细胞的培养、诱导分化、移植等科研或临床应用提供支持。

