



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113980146 B

(45) 授权公告日 2022.09.27

(21) 申请号 202111334524.0

(22) 申请日 2021.11.11

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113980146 A

(43) 申请公布日 2022.01.28

(73) 专利权人 扬州优邦生物药品有限公司
地址 225008 江苏省扬州市维扬经济开发
区金槐路7号

(72) 发明人 丁国伟 范娟 叶正琴 魏荣荣
李琛 荣雪路 潘晨 陈森
陈林中 日 李玉和

(74) 专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权
代理有限公司 23211
专利代理师 仇钰莹

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/866 (2006.01)
C12N 15/66 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 112680424 A, 2021.04.20
CN 108558989 A, 2018.09.21
CN 104610455 A, 2015.05.13
US 2017340724 A1, 2017.11.30
WO 2019047608 A1, 2019.03.14
CN 113621031 A, 2021.11.09
CN 104328135 A, 2015.02.04
CN 111607002 A, 2020.09.01
CN 112010984 A, 2020.12.01
CN 104211785 A, 2014.12.17
CN 104211785 A, 2014.12.17
CN 109266666 A, 2019.01.25

李晨曦等. 鸭坦布苏病毒E蛋白抗原表位的
鉴定及其表位交叉反应性分析.《中国预防兽医
学报》.2018,第40卷(第1期),

Masaru Kanekiyo等. Self-Assembling
Influenza Nanoparticle Vaccines Elicit
Broadly Neutralizing H1N1 Antibodies.
《Nature》.2013,第499卷

GenBank.envelope protein, partial
[Tembusu virus].《GenBank》.2016, (续)

审查员 程呈

权利要求书1页 说明书4页
序列表3页 附图1页

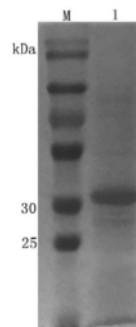
(54) 发明名称

三聚体化鸭黄病毒E蛋白domainIII、其制备
方法和运用

(57) 摘要

本发明公开了三聚体化鸭黄病毒E蛋白
domainIII、其制备方法和运用,属于兽用生物制
品领域。本发明构建并表达了三聚体化鸭坦布苏
病毒E蛋白domain III。本发明将鸭坦布苏病毒E
蛋白domain III结构域基因连接到转铁蛋白
(ferritin)氨基端;利用昆虫细胞-杆状病毒双
向表达系统构建能够共表达DTV-E3重组蛋白的
重组杆状病毒,将重组杆状病毒接种悬浮昆虫细
胞HF中高效表达抗原蛋白,经过提取纯化、BEI灭

活后加入佐剂乳化制成疫苗。所述制备方法简
单,能大量制备抗原蛋白,耗时短,表达量高,大
大降低生产成本,有利于大规模生产。



CN 113980146 B

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

王善辉等.鸭坦布苏病毒E基因在昆虫细胞中的分泌表达及免疫原性与保护性研究.《中国

畜牧兽医》.2015,(第10期),

Genbank.ferritin [Helicobacter pylori].《Genbank》.2021,

1. 一种用于预防鸭坦布苏病毒的基因工程疫苗,其特征在于,含有重组抗原蛋白;所述重组抗原蛋白是在鸭坦布苏病毒E蛋白domainⅢ结构域C-端连接转铁蛋白;所述的鸭坦布苏病毒E蛋白domainⅢ结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述的转铁蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示;

所述基因工程疫苗中重组抗原蛋白的含量为50~75μg/mL。

2. 根据权利要求1所述的基因工程疫苗,其特征在于,所述重组抗原蛋白经过BEI灭活。

3. 根据权利要求1或2所述的基因工程疫苗,其特征在于,所述基因工程疫苗中还含有佐剂。

4. 根据权利要求3所述的基因工程疫苗,其特征在于,所述佐剂为矿物油佐剂。

5. 重组抗原蛋白或权利要求1~4任一所述基因工程疫苗在制备预防和/或治疗鸭坦布苏病毒引起的相关疾病的药物中的应用;

所述重组抗原蛋白是在鸭坦布苏病毒E蛋白domainⅢ结构域C-端连接转铁蛋白;所述的鸭坦布苏病毒E蛋白domainⅢ结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述的转铁蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

三聚体化鸭黄病毒E蛋白domain III、其制备方法和运用

技术领域

[0001] 本发明涉及三聚体化鸭黄病毒E蛋白domain III、其制备方法和运用,属于兽用生物制品领域。

背景技术

[0002] 鸭坦布苏病毒(duck Tembusu virus,DTMUV)是黄病毒科黄病毒属恩塔亚病毒群的一种新型黄病毒,可引起雏鸭腹泻和神经症状,蛋鸭卵巢出血坏死、产蛋量急剧下降,严重者出现死亡的急性高度接触性传染病。病毒基因组的开放阅读框包括10230nt,编码一个大多聚蛋白,有3426个氨基酸构成,可以裂解为3个结构蛋白(C、M、E蛋白)和7个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5)。

[0003] 2010年,鸭坦布苏病毒病在我国福建、浙江、江苏等地区的蛋种鸭中首次爆发,以种鸭和蛋鸭易感性最高。目前,该病的感染宿主已扩大至肉鸭、番鸭、鹅、蛋鸡、鸽子、麻雀等多种禽类,给我国养禽业造成了巨大的经济损失,严重威胁养禽业健康发展。自2014年后,我国陆续研制出了DTMUV弱毒疫苗、灭活疫苗等多种疫苗,商业化疫苗的广泛使用让我国鸭坦布苏病毒病发病率急剧下降,仅呈现散发状态。灭活疫苗的免疫原性较差,需要多剂次加强,且在生产过程安全性要求较高,导致生产成本高。

[0004] 疫苗接种是预防、控制甚至消灭鸭坦布苏病毒的主要措施之一。亚单位疫苗不含有核酸物质,安全性较好,接种后不会产生持续感染或潜伏感染,产生的免疫应答可以与野毒感染相区分,有利于疫病的控制和消灭。

[0005] 因此研制一种生产成本低、生产效率高以及疫苗免疫效果好的鸭坦布苏病毒亚单位疫苗的生产方法具有重要的现实意义。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题,本发明提供了一种能够高效表达三聚体化的鸭坦布苏病毒E蛋白domain III结构域的重组杆状病毒,该重组杆状病毒接种昆虫细胞后能够高效表达重组蛋白。用该重组蛋白制备的基因工程疫苗具有高效、安全性好、抗体整齐度高、保护率高的优点,从而弥补现有技术的不足。

[0007] 本发明的第一个目的是提供一种重组抗原蛋白,所述重组抗原蛋白是在鸭坦布苏病毒E蛋白domain III结构域C-端连接转铁蛋白。

[0008] 在一种实施方式中,所述的鸭坦布苏病毒E蛋白domain III结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述的转铁蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0009] 在一种实施方式中,所述重组抗原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0010] 本发明的第二个目的是提供编码上述重组抗原蛋白的基因,所述基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0011] 本发明的第三个目的是提供一种用于预防鸭坦布苏病毒的基因工程疫苗,所述基因工程疫苗含有所述重组抗原蛋白。

- [0012] 在一种实施方式中,所述重组抗原蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1。
- [0013] 在一种实施方式中,所述重组抗原蛋白经过BEI灭活。
- [0014] 在一种实施方式中,所述重组抗原蛋白的含量为50~100 μ g/mL。
- [0015] 在一种实施方式中,所述基因工程疫苗中还含有佐剂。
- [0016] 在一种实施方式中,所述佐剂包括但不限于:铝盐佐剂、脂质体佐剂、纳米颗粒佐剂、皂苷佐剂。
- [0017] 在一种实施方式中,所述佐剂为矿物油佐剂。
- [0018] 本发明的第四个目的是提供了制备所述重组抗原蛋白的方法,采用昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达所述重组抗原蛋白,主要包括以下步骤:
- [0019] (1)将编码鸭坦布苏病毒E蛋白domain III结构域C-端添加转铁蛋白,构建融合基因片段DTV-E-ft;
- [0020] (2)将融合基因片段与pFastBac I载体分别进行BamH I和Hind I双酶切,并进行连接,连接产物转化T1感受态细胞;获得阳性质粒pFastBac I-DTV-E-ft;
- [0021] (3)以所述步骤(2)中获得的pFastBac I-DTV-E-ft质粒转化E.coli DH10 Bac感受态细胞,通过转座,获得重组杆粒rBacmid-DTV-E-ft;
- [0022] (4)将所述步骤(3)中获得的重组杆粒rBacmid-DTV-E-ft转染昆虫细胞sf9,获得重组杆状病毒rBac-DTV-E-ft;
- [0023] (5)培养所述步骤(4)中获得的重组杆状病毒rBac-DTV-E-ft,收获上清,得到DTV-E-ft重组蛋白。
- [0024] 在一种实施方式中,步骤(4)中制备的重组杆状病毒rBac-DTV-E-ft还可以接种至HF细胞进行大量培养,离心收集上清,即获得大量的重组蛋白。
- [0025] 在一种实施方式中,所述的鸭坦布苏病毒E蛋白domain III结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,所述的转铁蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。
- [0026] 本发明还提供了所述重组抗原蛋白或所述基因工程疫苗在制备预防和/或治疗鸭坦布苏病毒引起的相关疾病的药物中的应用。
- [0027] 有益效果:
- [0028] 本发明将表达的重组蛋白的重组杆状病毒rBac-DTV-E3,接入昆虫细胞高效的表达DTV-E3蛋白,经过离心去除细胞碎片,加入BEI灭活后,加入矿物油佐剂混合乳化制成疫苗。本发明制备的疫苗能提高免疫后的抗体水平,提高免疫后抗体的整齐度,保证疫苗的免疫效果,此疫苗具有高效、安全性好的优点。

附图说明

- [0029] 图1是SDS-PAGE检测重组杆状病毒表达产物;M:预染蛋白质Marker;1:F3代重组杆状病毒上清
- [0030] 图2是WesternBlot鉴定重组杆状病毒表达产物;M:预染蛋白质Marker;1:F3代重组杆状病毒;2:感染空杆状病毒的Sf9细胞。

具体实施方式

- [0031] 实施例1融合基因片段DTV-E-ft的构建

[0032] 1、融合基因片段的构建：利用分子生物学技术和方法，将鸭坦布苏病毒E蛋白 domainⅢ结构域基因连接到转铁蛋白 (ferritin) 氨基端，构建融合基因片段DTV-E-ft (SEQ ID NO.2)。

[0033] 2、目的基因与中转质粒连接：将昆虫表达载体pFastBacI和步骤1中的DTV-E-ft基因扩增片段用BamHI和HindI酶切后分别回收、纯化，用T4 DNA连接酶4℃连接过夜，获得连接产物。

[0034] 3、连接产物转化感受态细胞：将步骤2获得的连接产物在无菌条件下转化T1感受态细胞中，混匀，冰浴30min，42℃热激90s，立即冰浴2min，无菌条件下加入800μL LB培养基于37℃震荡培养60min。将培养物14000rpm离心1min，吸取800μL上清，将剩余培养物涂布于LB(含氨苄青霉素抗性)固体培养基中，37℃过夜培养。挑取单菌落作菌落PCR鉴定，阳性质粒送检测序。测序正确的重组质粒命名为pFastBacI-DTV-E-ft。

[0035] 4、重组杆状病毒构建：将步骤3中的重组质粒pFastBacI-DTV-E-ft转入大肠杆菌DH10Bac感受态细胞中，挑选阳性克隆用M13引物作PCR鉴定。

[0036] M13-F: TGTA AACGACGGCCAGT

[0037] M13-R: CAGGAAACAGCTATGAC

[0038] PCR反应体系为(总体积25μL):DNA模板0.5μL、M13-F和M13-R各0.5μL、DNA聚合酶12.5μL及无菌水11μL。

[0039] PCR反应条件为:95℃,5min;95℃30s,65℃30s,72℃90s,30个循环;72℃10min。

[0040] PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,结果显示,成功扩增出约3000bp的特异性条带,与预期大小相符。将阳性重组杆粒命名为rBacmid-DTV-E-ft。

[0041] 5、重组杆粒转染sf9细胞：用脂质体转染的方法将步骤4中的重组杆粒rBacmid-DTV-E-ft转染sf9细胞,具体操作方法参照赛默飞世尔科技(中国)有限公司的cellfectin转染试剂说明书进行,获得f1代重组杆状病毒rBac-DTV-E-ft。

[0042] 实施例2 DTV-E3重组蛋白的制备

[0043] 1、重组杆状病毒扩增：将实施例1中的f1代重组杆状病毒rBac-DTV-E-ft接种昆虫细胞sf9,27℃培养4天,收集培养物,离心取上清即获得f2代重组杆状病毒;

[0044] 2、表达蛋白鉴定:

[0045] (1) 将上述f2代重组杆状病毒以MOI=5~10的接种量接入昆虫细胞sf9,27℃培养4天,收集培养物,离心取上清即获得重组DTV-E3蛋白;

[0046] (2) SDS-PAGE鉴定:将上述上清液进行SDS-PAGE电泳;电泳结束后,经染色和脱色后发现,大约在31kDa位置,其分子量与理论大小相符,说明表达成功(图1)。

[0047] (2) WesternBlot鉴定:取SDS-PAGE电泳后凝胶,直接用BIO-LAB转印装置将其转印到NC膜上,转印结束后,按常规方法进行Westernblot鉴定。用辣根过氧化物酶标记的鼠抗His Tag(1μg/ml)作为酶标抗体;最后用TMB显色(碧云天生物技术研究)。结果表明,在31kDa处出现1条明显的特异性条带,而阴性对照无此特异性反应,说明该重组蛋白可被猪流行性腹泻病毒阳性血清中的抗体识别,具有良好的特异性和反应原性(图2)。

[0048] 3、DTV-E3重组蛋白的大量表达:将鉴定正确的重组病毒以MOI=1~10的接毒量接种HF细胞大量培养,离心收集培养液上清,即获得含有大量的DTV-E3重组蛋白。

[0049] 4、DTV-E3重组蛋白的纯化:蛋白纯化采用常规Ni亲和层析进行纯化,具体实验操

作参照千纯生物科技有限公司Ni-NTA Purose 6Fast Flow填料说明书。

[0050] 实施例3鸭坦布苏病毒基因工程亚单位疫苗的制备

[0051] 取实施例2中获得的DTV-E3重组蛋白,加入佐剂进行乳化,混匀,4℃保存。疫苗具体配比见表1。

[0052] 表1鸭坦布苏病毒基因工程亚单位疫苗成分分配比

	组分	疫苗 1	疫苗 2	疫苗 3
[0053]	DTV-E3 (μg)	50	75	100
	佐剂 (V/V)		1:2	

[0054] 实施例4鸭坦布苏病毒基因工程疫苗免疫原性试验

[0055] 随机抽取80只(1日龄)雏鸭,分为4组,每组20只。1~3组分别免疫实施例3中制备的疫苗1、疫苗2和疫苗3(剂量为0.2ml/只),第4组为注射相同剂量的无菌PBS的对照组。分别在免疫后7天和14天,每组各选取10只鸭子肌注DTMUV(扬州优邦生物药品有限公司分离、鉴定、保存,并命名为YB株)200ELD₅₀。连续观察15d。

[0056] 在免疫后7天时,攻毒观察15天,对照组10只鸭均出现明显的DTMUV感染临床症状,主要表现为食欲不振甚至停止采食、拉绿色粪便等症状,后期则出现瘫痪等神经症状,其中4只死亡,剖检显示病鸭内脏器官出现不同程度的出血、坏死,如肝脏出血坏死,腺胃有弥漫性出血,脾脏充血坏死,胰腺出血,脑膜出血等病变;免疫组仅疫苗1有一只雏鸭出现典型感染的临床症状,其余免疫组雏鸭均正常。

[0057] 在免疫后14天时,攻毒观察15天,对照组10只鸭均出现明显的DTMUV感染临床症状,主要表现为食欲不振甚至停止采食、拉绿色粪便等症状,后期则出现瘫痪等神经症状,其中3只死亡,剖检显示病鸭内脏器官出现不同程度的出血、坏死,如肝脏出血坏死,腺胃有弥漫性出血,脾脏充血坏死,胰腺出血,脑膜出血等病变;所有免疫组均正常。

[0058] 表2鸭坦布苏病毒基因工程亚单位疫苗免疫保护结果

分组	免疫后 7 天保护效果		免疫后 14 天保护效果	
	保护率	抗体阳性率 (%)	保护率	抗体阳性率 (%)
[0059] 疫苗 1	9/10	90%	10/10	100%
疫苗 2	10/10	100%	10/10	100%
疫苗 3	10/10	100%	10/10	100%
PBS 组	0/10	0	0/10	0

[0060] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 扬州优邦生物药品有限公司

[0003] <120> 三聚体化鸭黄病毒E蛋白domainIII、其制备方法和运用

[0004] <130> BAA211406B

[0005] <160> 4

[0006] <170> PatentIn version 3.3

[0007] <210> 1

[0008] <211> 272

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 人工序列

[0011] <400> 1

[0012] Met His His His His His His Tyr Pro Met Cys Ser Asn Thr Phe Ser

[0013] 1 5 10 15

[0014] Leu Val Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Val Glu

[0015] 20 25 30

[0016] Leu Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Arg Val Pro Ile Ser Met

[0017] 35 40 45

[0018] Ser Ala Asp Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Val

[0019] 50 55 60

[0020] Asn Pro Tyr Val Ser Thr Ser Ser Thr Gly Ala Lys Ile Met Val Glu

[0021] 65 70 75 80

[0022] Val Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Phe Ile Leu Val Gly Ser Gly Lys

[0023] 85 90 95

[0024] Gly Gln Ile Arg Tyr Gln Trp His Arg Ser Gly Ser Ser Asp Ile Ile

[0025] 100 105 110

[0026] Lys Leu Leu Asn Glu Gln Val Asn Lys Glu Met Gln Ser Ser Asn Leu

[0027] 115 120 125

[0028] Tyr Met Ser Met Ser Ser Trp Cys Tyr Thr His Ser Leu Asp Gly Ala

[0029] 130 135 140

[0030] Gly Leu Phe Leu Phe Asp His Ala Ala Glu Glu Tyr Glu His Ala Lys

[0031] 145 150 155 160

[0032] Lys Leu Ile Ile Phe Leu Asn Glu Asn Asn Val Pro Val Gln Leu Thr

[0033] 165 170 175

[0034] Ser Ile Ser Ala Pro Glu His Lys Phe Glu Gly Leu Thr Gln Ile Phe

[0035] 180 185 190

[0036] Gln Lys Ala Tyr Glu His Glu Gln His Ile Ser Glu Ser Ile Asn Asn

[0037] 195 200 205

[0038] Ile Val Asp His Ala Ile Lys Ser Lys Asp His Ala Thr Phe Asn Phe

[0039]	210	215	220	
[0040]	Leu Gln Trp Tyr Val Ala Glu Gln His Glu Glu Glu Val Leu Phe Lys			
[0041]	225	230	235	240
[0042]	Asp Ile Leu Asp Lys Ile Glu Leu Ile Gly Asn Glu Asn His Gly Leu			
[0043]		245	250	255
[0044]	Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr Val Lys Gly Ile Ala Lys Ser Arg Lys Ser			
[0045]		260	265	270
[0046]	<210> 2			
[0047]	<211> 819			
[0048]	<212> DNA			
[0049]	<213> 人工序列			
[0050]	<400> 2			
[0051]	atgcaccacc atcatcatca ttaccctatg tgtagcaata cgttctcttt ggtgaagaat	60		
[0052]	cccactgaca cggggcacgg tactgtcggt gtcgagttat cctatgcagg aaccgatggg	120		
[0053]	ccctgccgcg taccaatttc gatgtcggcg gatctcaatg acatgacacc ggttggtcga	180		
[0054]	ctgataacag tcaaccctta cgttagcacg tcttcaaccg gcgctaagat tatggtagag	240		
[0055]	gtggagccac cgttcggtga ttcattcadc ctagtggaa gtggaaaggg ccaaatacgt	300		
[0056]	taccaatggc atcggagtgg ctcgtcgcac ataatcaaac tattgaacga acaagtaaac	360		
[0057]	aaggagatgc aatcatctaa cctctatatg agcatgtctt cctggtgcta taccatagt	420		
[0058]	ctggatggtg cgggcctctt cctttttgat cacgccgcag aagagtatga acatgcaaag	480		
[0059]	aagctcataa tatttttgaa cgagaacaat gttccggtgc agttaacctc cataagcgt	540		
[0060]	cctgaacaca aatttgaggg acttactcag atttttcaga aagcctatga acacgaacag	600		
[0061]	catatcagtg agagcatcaa taatatagtg gatcacgcca tcaagtcgaa agaccacgct	660		
[0062]	acattcaatt tcttacaatg gtacgtagct gaacagcatg aagaagaggt cctgtttaaa	720		
[0063]	gacattttag acaaaattga actgatcggg aatgagaacc acggccttta tctagcagac	780		
[0064]	caatacgtaa aagggattgc gaaatcaaga aagtcttga	819		
[0065]	<210> 3			
[0066]	<211> 163			
[0067]	<212> PRT			
[0068]	<213> 人工序列			
[0069]	<400> 3			
[0070]	Asp Ile Ile Lys Leu Leu Asn Glu Gln Val Asn Lys Glu Met Gln Ser			
[0071]	1	5	10	15
[0072]	Ser Asn Leu Tyr Met Ser Met Ser Ser Trp Cys Tyr Thr His Ser Leu			
[0073]		20	25	30
[0074]	Asp Gly Ala Gly Leu Phe Leu Phe Asp His Ala Ala Glu Glu Tyr Glu			
[0075]		35	40	45
[0076]	His Ala Lys Lys Leu Ile Ile Phe Leu Asn Glu Asn Asn Val Pro Val			
[0077]		50	55	60

[0078]	Gln Leu Thr Ser Ile Ser Ala Pro Glu His Lys Phe Glu Gly Leu Thr
[0079]	65 70 75 80
[0080]	Gln Ile Phe Gln Lys Ala Tyr Glu His Glu Gln His Ile Ser Glu Ser
[0081]	85 90 95
[0082]	Ile Asn Asn Ile Val Asp His Ala Ile Lys Ser Lys Asp His Ala Thr
[0083]	100 105 110
[0084]	Phe Asn Phe Leu Gln Trp Tyr Val Ala Glu Gln His Glu Glu Glu Val
[0085]	115 120 125
[0086]	Leu Phe Lys Asp Ile Leu Asp Lys Ile Glu Leu Ile Gly Asn Glu Asn
[0087]	130 135 140
[0088]	His Gly Leu Tyr Leu Ala Asp Gln Tyr Val Lys Gly Ile Ala Lys Ser
[0089]	145 150 155 160
[0090]	Arg Lys Ser
[0091]	<210> 4
[0092]	<211> 109
[0093]	<212> PRT
[0094]	<213> 人工序列
[0095]	<400> 4
[0096]	Met His His His His His His Tyr Pro Met Cys Ser Asn Thr Phe Ser
[0097]	1 5 10 15
[0098]	Leu Val Lys Asn Pro Thr Asp Thr Gly His Gly Thr Val Val Val Glu
[0099]	20 25 30
[0100]	Leu Ser Tyr Ala Gly Thr Asp Gly Pro Cys Arg Val Pro Ile Ser Met
[0101]	35 40 45
[0102]	Ser Ala Asp Leu Asn Asp Met Thr Pro Val Gly Arg Leu Ile Thr Val
[0103]	50 55 60
[0104]	Asn Pro Tyr Val Ser Thr Ser Ser Thr Gly Ala Lys Ile Met Val Glu
[0105]	65 70 75 80
[0106]	Val Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Phe Ile Leu Val Gly Ser Gly Lys
[0107]	85 90 95
[0108]	Gly Gln Ile Arg Tyr Gln Trp His Arg Ser Gly Ser Ser
[0109]	100 105

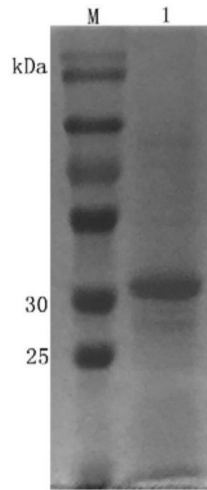


图1

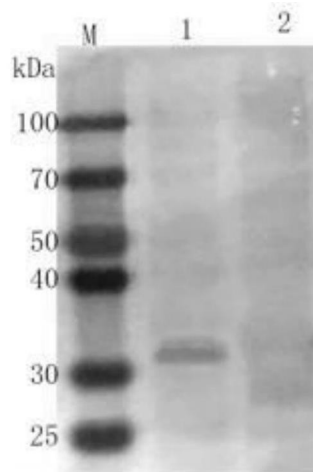


图2