

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

# [12] 发明专利申请公开说明书

C12N 1/21  
C12N 5/16 C12N 15/12  
C12N 15/63

[21] 申请号 96199479.7

[43]公开日 1999年2月10日

[11]公开号 CN 1207768A

[22]申请日 96.11.14 [21]申请号 96199479.7

[30]优先权

[32]95.11.22 [33]US [31]08/562,114

[32]96.10.11 [33]US [31]08/729,594

[86]国际申请 PCT/US96/18295 96.11.14

[87]国际公布 WO97/19167 英 97.5.29

[85]进入国家阶段日期 98.7.1

[71]申请人 路德维格癌症研究所

地址 美国纽约州

[72]发明人 乌尔夫·埃里克松 安备雷斯·西蒙

安娜·罗默特

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 54 页 附图页数 7 页

[54]发明名称 编码 11-顺式视黄醇脱氢酶的核酸分子

[57]摘要

根据本发明,发现了 RPE 细胞膜相关蛋白,经 SDS-PAGE 测定,该蛋白质的分子量约为 32KDa,被称为“p32”的此蛋白质与以前已鉴定的 RBP 膜受体组分 p63 蛋白形成寡聚体蛋白质复合物。已分离出编码 p32 蛋白的核酸分子,序列分析表明 p32 蛋白属于短链醇脱氢酶家族,并表现出 11-顺式视黄醇脱氢酶的活性,所述酶可催化 11-顺式视黄醇转变成 11-顺式视黄醛。

## 权 利 要 求 书

---

1.编码经 SDS-PAGE 测定分子量约为 32 千道尔顿的哺乳动物蛋白质的分离的核酸分子，其中所述蛋白质与经 SDS-PAGE 测定分子量约为 63 千道尔顿的视黄醇结合受体复合，其中所述分离的核酸分子的互补序列在严格条件下能与 SEQ ID NO: 10 的核苷酸序列杂交。

2.权利要求 1 的分离的核酸分子，其中所述哺乳动物蛋白质是人蛋白质。

3.权利要求 1 的分离的核酸分子，其中所述哺乳动物蛋白质是鼠蛋白质。

4.权利要求 1 的分离的核酸分子，包括 cDNA。

5.权利要求 1 的分离的核酸分子，包括基因组 DNA。

6.权利要求 2 的分离的核酸分子，由 SEQ ID NO: 14 组成。

7.权利要求 2 的分离的核酸分子，其编码 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列。

8.权利要求 2 的分离的核酸分子，其编码 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列。

9.权利要求 3 的分离的核酸分子，其编码 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列。

10.表达载体，含有与启动子有效连接的权利要求 1 的分离的核酸分子。

11. 表达载体，含有与启动子有效连接的权利要求 2 的分离的核酸分子。

12.用权利要求 10 的表达载体转化或转染的细胞系或细菌菌株。

13.用权利要求 11 的表达载体转化或转染的细胞系或细菌菌株。

14.编码具有视黄醇脱氢酶活性之蛋白质的分离的核酸分子及其互补序列，所述核酸分子的互补序列在严格条件下能与至少一个选自 SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 23 组成之组的核酸分子杂交。

15.权利要求 14 的分离的核酸分子，选自由 SEQ ID NO: 20, 22 和 23 组成的组。

16.权利要求 14 的分离的核酸分子，其中所述分离的核酸分子选自由 SEQ ID NO: 32, 33, 34 和 35 组成的组。



# 说明书

---

编码 11—顺式视黄醇脱氢酶的核酸分子

## 相关申请

本申请是 1995 年 11 月 22 日递交的流水号 08/562,114 的部分继续申请，08/562,114 是 1995 年 1 月 20 日递交的流水号 08/375,962 的部分继续申请，08/375,962 是 1994 年 6 月 10 日递交的共同待审申请流水号 08/258,418 的部分继续申请，所有这些申请都列入本文的参考文献。

## 发明领域

本发明涉及具有 11—顺式视黄醇脱氢酶活性的蛋白质，该蛋白质与表达于例如视网膜色素上皮细胞（RPE）中的细胞质视黄醇—结合蛋白（RBP）的膜受体的特异性部分形成复合物，本发明更具体地涉及 32KDa 的具有 11—顺式视黄醇脱氢酶活性的蛋白质，该蛋白质与 63 KDa 的结合 RBP 的膜蛋白形成复合物。本发明还涉及 32KDa 蛋白质（p32）的分离，以及编码 p32 的核酸分子或与该编码序列互补的核酸分子，和这些物质的多种应用。

## 发明背景

Retinoid（维生素 A—衍生物）在多种生物学过程中具有重要的生理学功能。在胚胎生长和发育过程中，以及在成年生物体的生长和分化过程中，retinoid 行使激素的功能并参与调节多种细胞类型的基因表达，见 Lied 等人，Trends Genet., 17: 427—433（1992）。据信这些

作用是通过两类受核配体控制的转录因子介导的，它们是视黄酸受体（RAR）和 retinoid X 受体（RXR），Benbrook 等人，自然，333: 669—672（1988）；Brand 等人，自然，332: 850—853（1988）；Giguere 等人，自然，330: 624—629（1987）；Mangelsdorf 等人，自然，345: 224—229（1990）；Mangelsdorf 等人，Genes Dev. 6: 329—344（1992）；Petkovich 等人，自然，330: 440—450（1987）；和 Zelent 等人，自然，339: 714—717（1989）。

除了在细胞生长和分化中作为激素起作用以外，retinoid 也参与视觉过程，这是因为视黄醛的立体异构体 11-顺式视黄醛是视色素的色团，例见 Bridges, The Retinoids, vol.2, pp125-176, Academic Press, Orlando, Florida,（1984）。

在正常的生理状态下，大多数细胞（眼和非眼细胞）得到全反式视黄醇作为它们 retinoid 的主要来源。尽管不同的组织中发生着许多不同的代谢事件，但已知已逐渐形成了共用的视黄醇胞外转运机。具体地说，在细胞质中视黄醇由细胞质视黄醇结合蛋白（RBP）转运，见 Goodman 等人，The Retinoids, Academic Press, Orlando, Florida, vol.2, pp41—88（1984），然后，通过使用特殊机制的细胞转变产生视黄醇的活性衍生物，即非眼组织中的视黄酸和对于眼组织而言，大多为 11-顺式视黄醛。迄今为止，在分子水平上仍未完全确定任何一个这种机制，所涉及的几种酶也只是通过酶解活性得以鉴定，见 Lion 等人，Biochem. Biophys. Acta. 384: 283—292（1975）；Zimmermann 等人，Exp. Eye Res. 21: 325—332（1975）；Zimmermann 等人，Exp. Eye Res. 23: 159—164（1976）和 Posch 等人，生物化学，30: 6224—6230（1991）。

关于 retinoid 的摄取，极化的视网膜色素上皮细胞（RPE）是独





本发明的另一部分是编码如人，牛和鼠形式的哺乳动物形式蛋白质的核酸分子。本发明的另一部分是根据本文所述核苷酸序列的探针。

在以下具有附图的详细讨论中将更完整地讨论本发明的这些和其它方面。

### 附图的简述

图 1A 表示得自 RPE 膜并用抗 p63 的 mAb A52 免疫沉淀的经放射性标记的蛋白质的 SDS-PAGE 分析。

图 1B 表示与 mAb A52 免疫亲和柱结合和穿过柱洗脱下来的 RPE 膜蛋白的 SDS-PAGE 分析，在从免疫亲和柱洗脱下来的级分中存在 p32。

图 2A 表示使用寡核苷酸混合物 OM1 和 OM3 得到的 61 bp PCR 一扩增片段在琼脂糖凝胶电泳中的显示，所述两种寡核苷酸都衍生自肽 321，肽 321 是从经胰蛋白酶消化的 p32 的部分氨基酸序列测定中推导的。

图 2B 表示使用寡核苷酸混合物 OM2 和 OM3 得到的 330 bp PCR 一扩增片段在琼脂糖凝胶电泳中的显示，所述两种寡核苷酸分别衍生自肽 p323 和 p321，所述肽是从经胰蛋白酶消化的 p32 的部分氨基酸序列测定中推导的。

图 3 阐明了 p $\lambda$  321 的核苷酸序列和 p32 推导的氨基酸序列，部分氨基酸序列测定自分离自经胰蛋白酶消化的 p32 的肽。

图 4 阐明了 p32 和一些属于短链醇脱氢酶家族的相关蛋白质的氨基酸序列的排列。

图 5 阐明了 p32 氨基酸序列的分析。

图 6 阐明了体外合成的 p32 的膜相互作用。



图 7 阐明了对应于 p32 的转录本的受限制的表达。

图 8A 阐明了为了 11-顺式视黄醇脱氢酶活性的进一步的酶解活性分析，在经转染的细胞中表达 p32。

图 8B 阐明了在  $\text{NAD}^+$  的存在下，11-顺式视黄醇脱氢酶活性的表达，这种表达可由 11-顺式视黄醛的形成来表示。

图 8C 阐明了在辅因子 NADP 的存在下 11-顺式视黄醇脱氢酶活性的缺乏。

图 8D 阐明了不能表达 p32 的对照细胞，该细胞不具备将 11-顺式视黄醇氧化成 11-顺式视黄醛的能力。

图 9 表示人 11-顺式视黄醇脱氢酶基因的结构。

### 优选实施方案的详细讨论

已知细胞质视黄醇结合蛋白 (RBP) 能与视网膜色素上皮细胞膜 (RPE) 上 63 KDa 蛋白质 (p63) 受体的高分子量复合物化学交联，形成 RBP-RBP 受体复合物，该复合物具有表观分子量约为 M<sub>r</sub> 150,000-450,000 的类似大小的球状蛋白质的洗脱特性，见 Bavik 等人，生物化学杂志，266: 14978-14985 (1991) 和 Bavik 等人，生物化学杂志，267: 23035-23042 (1992)。负责结合 RBP，其表达局限于 RPE 的蛋白质已被鉴定为 63 KDa 的蛋白质 (p63)。通过产生针对 63 KDa 蛋白质的能与 RBP-RBP 受体复合物和 p63 结合的单克隆抗体 A52 (mAb 52)，并进行免疫亲和层析分析，大部分 p63 被洗脱成单体，发现蛋白质的重要部分位于对应于较高分子量类型的位置。这表明 p63 以具有其它蛋白质成分的寡聚体蛋白质复合物的形式存在。Bavik 等人，生物化学杂志，266: 14978-14985 (1991) 和 Bavik 等人，生物化学杂志，267: 23035-23042 (1992)。因此，使用下列方法研究这种寡聚体蛋白质复合物的分子特征，以及 p63 是否



剂都能与 p63 反应，而不相关的 mAb 或预免疫的兔血清不能沉淀 p63。在含有经免疫沉淀的 p63 的所有泳道中，富集了 M<sub>r</sub>32,000 蛋白质。由于针对 p63 的 mAb A52 和兔抗血清对于 p63 具有高度的特异性（例见 Bavik 等人，生物化学杂志，267：23035—23042（1992）），因此可得出结论：在前述的分析中 M<sub>r</sub>32,000 蛋白质（p32）通过与 p63 结合得以共沉淀。分析也鉴定出与 p32 和 p63 一起沉淀的 M<sub>r</sub>50,000—52,000 的双带（图 1d, e）。

## 实施例 2

然后进行实验以鉴定 p32，可利用的事实是如上文所述 p32 能与 p63 特异性地相互作用，因此，使去污剂溶解的 RPE—膜蛋白穿过含有 mAb A52 的免疫亲和柱。参照图 1B，泳道 b，洗涤步骤之后，用含有 CHAPS 的缓冲液在高 pH 下洗脱结合的蛋白质，经洗脱的级分的 SDS—PAGE 分析和考马斯染色揭示了 p63 被特异性地保留并从免疫亲和柱上被洗脱下来。另外，在得自 A52 柱的洗脱液中显示出对应于 p32 的弱染色的带。如图 1B 所示，溶解的 RPE 膜和 A52 柱经洗脱级分的总蛋白质分布图的比较表明 p32 蛋白不能在其中有效地被保留。然而，p32 在 A52 柱的经洗脱级分中出现，但不在含有不相关 Ig 的柱的经洗脱级分中出现，这表明 p32 与 p63 的特异性的相互作用。此结果与以前的免疫沉淀资料是一致的，并显示出 p32 与 p63 复合，由于此复合物的形成使 p32 被保留于免疫亲和柱上。

将 p32 鉴定为 RPE 膜中与 p63 的复合物中的成分之后，如下文实施例 3 中所述，通过得自 A52 免疫亲和柱的溶解的 RPE 膜的经洗脱级分的 SDS—PAGE 来分离 p32 蛋白自身。

### 实施例 3

如上文所述，用含有 1%CHAPS 的 PBS 溶解 RPE 膜，通过在 +4℃ 下末端-对着-末端旋转使之与偶联于 Bio-Rad poly prep 柱 (Bio-Rad) 中的被 CNBr-激活的 Sepharose 4B 珠 (Pharmacia) 上的 mAb A52 Ig 一起保温。保温 2 小时之后，使珠稳定下来，用 5 倍柱体积的含有 1%CHAPS 的 PBS 快速洗涤柱。然后用含有 1%CHAPS 的 50mM 的三乙醇胺缓冲液 (pH11.2) 洗脱结合的蛋白质。通过加入含有 1% CHAPS 的 1M Tris-HCl 缓冲液将洗脱液的 pH 快速地调节至 8.0。使经洗脱的级分经受 SDS-PAGE，然后通过考马斯蓝染色可观察到被分开的蛋白质，发现了对应于 p32 (SDS-PAGE, 32KDa) 的带。

为了测定 p32 的一级结构，首先切下对应于大约 2—5  $\mu$ g 32 KDa 蛋白质的前述考马斯蓝染色带部分，然后冻干凝胶碎片以干燥，对分离的蛋白质进行部分氨基酸序列的分析。在含有经修饰的胰蛋白酶的缓冲液中使凝胶重新水合并保温以产生多种肽供提取和分析。优选的方法列于下文实施例 4 中。

### 实施例 4

切下得自实施例 2 的含有 p32 蛋白的经考马斯蓝染色的带，并根据稍加改动的 Rosenfeld 等人, Anal. Biochem, 15: 173—179 (1992) 的方法处理此带。在 30℃ 下，用 100  $\mu$ l 含有 50% 乙腈的 0.2M 的碳酸氢铵缓冲液将凝胶碎片洗涤两次，达 30 分钟，然后在氮气气流下完全干燥。用 5  $\mu$ l 含有 0.02% 吐温 20 和 0.5  $\mu$ g 经修饰的胰蛋白酶的 0.2M 的碳酸氢铵缓冲液使凝胶碎片重新水合。加入的胰蛋白酶得自在 1mM HCl 中制备的储存液。每次加入 5  $\mu$ l 0.2M 的碳酸氢铵缓冲液以继续水合直至凝胶碎片水合至它们原来的大小。然后在 30℃ 下将经水合的





RNA, 用寡 (dT) 15 引发反应。在随后的每次 PCR 反应中使用相当于 2 μg 总 RNA 的等分试样。在 100 μl 反应液中使用终浓度为 0.5 μM 的寡核苷酸混合物进行 PCR 反应, 使用了 Taq 聚合酶, 30 轮循环 (95°C 2 分钟, 55°C 1 分钟和 72°C 2 分钟) 之后, 在含有 5 μg/ml 溴化乙锭的 4% GTG 琼脂糖凝胶电泳上分析反应液的等分试样。

如图 2A 所示, 使用都衍生自肽 p321 的寡核苷酸混合物 OM1 和 OM2 的扩增导致经扩增的 61bp 片段。使用混合物 OM3—OM4 和 OM1—OM4 的扩增不能产生任何产物。最终如图 2B 所示, 使用 OM3—OM2 的扩增导致了经扩增的 330bp 片段。

随后对 61bp 和 330bp 片段进行的序列分析进一步证实了已被扩增的 cDNA 序列与以前氨基酸序列分析中产生的肽序列是相对应的。从经扩增的 PCR 片段推导出的氨基酸序列与肽 p321 产生的氨基酸序列之间的差异显示出适于分离编码 p32 的全长 cDNA 克隆的特异性探针的产生。

为了分离全长的 cDNA 克隆, 用 330bp 片段作为探针筛选 RPE—特异性的 λ ZAP—II cDNA 文库。从大约 200,000 个克隆中分离出 5 个独立的 λ 克隆, 并通过体内切割亚克隆之。cDNA 克隆 p λ 321 含有最长的插入片段 (大约 1.1kb), 被选择用于进一步的研究。

完整地测定 p λ 321 两条链的序列, 使用排除接头在外长度为 1104bp 的插入物制备 cDNA 文库, 所用方法列于下文实施例 7 中。

### 实施例 7

用 EcoRI 消化使用 OM1—OM2 (61bp) 和 OM3—OM2 (330bp) 得到的扩增产物, 凝胶纯化并克隆到经 EcoRI 切割的载体 pBS 中, 按列入本文参考文献的 Bavik 等人, 生物化学杂志, 267: 20540—20546

(1993) 先前的描述, 使用  $^{32}\text{P}$ -标记的 330bp 片段筛选 RPE-特异性的  $\lambda$  ZAP II cDNA 文库。分离出 5 个阳性的  $\lambda$  克隆, 通过遵照厂商的说明进行体内切割将插入物亚克隆至 pBluescript 中。克隆 p $\lambda$  321 含有 1.1kb 的插入物, 使用 T3, T7 或 M13 通用引物或内部引物, 用 Sequenase 完整地测定两条链的序列。

p $\lambda$  321 的核苷酸序列和推测的 p32 氨基酸序列示于图 3 (SEQ ID NO: 10)。核苷酸数码在左边, 氨基酸残基的数码在右边, 氨基酸 1 是起始的甲硫氨酸 (“Met”)。

如图 3 所示, 1.1kbp 的插入物含有一个编码 318 个氨基酸残基的长的开放阅读框, 所述氨基酸残基经计算的质量是 35,041D。根据转录起始的 Kozak 规则来看, 第一个甲硫氨酸残基位于良好的前后序列中, 它可能是起始密码子, 见 Kozak, 细胞, 44: 283-292 (1986)。此推论得到下列事实的支持, 即如下文所述, 转录自 p $\lambda$  321 的合成的 mRNA 的体外翻译产生了 M<sub>r</sub>32,000 蛋白质 (SDS-PAGE 分析), 但在 cDNA 5' 非翻译区上游 35bp 的读框中不存在终止密码子。图 3 还显示出 100bp 的 3' 非翻译区以推断的 polyA-段终止, 在上游序列中鉴定出 polyA-信号 (bp1104-1110)。

在可用于比较的 62 个残基中, 推断出的 p $\lambda$  321 氨基酸和 5 个经胰蛋白酶处理产生的肽的氨基酸序列 (表 1) 只有 3 个位置有所不同, 所有这 3 个不同之处都发现于肽 p321 中, 但第二个 cDNA 克隆 (p $\lambda$  324) 的此区域中的核苷酸序列与 p $\lambda$  321 的相同。这表示尽管不能排除差异是由 p32 不同的等位基因的存在引起的, 但肽 p321 氨基酸序列的测定可能不正确。这些资料阐明了 p $\lambda$  321 含有 p32 完整的编码区。

再参照图 3, 在推导出的氨基酸序列的第 160-162 位可发现 N-



联糖基化的共有位点（氨基酸残基 N-I-T）。

另外，已发现 p32 显示出与短链醇脱氢酶的序列相似性，参照图 4，遍及 Swissprot 蛋白质数据库的研究揭示出 p32 与几种以前已测序的蛋白质结构相关，与之最密切相关的是线粒体基质脱氢酶，D-β-羟基丁酸脱氢酶（BDH），Churchill 等人，生物化学，31: 3793-3799（1992），p32 与其它两种蛋白质显示出较少但重要的相似性，所述蛋白质是得自大肠杆菌的 3-oxoacyl [酰基载体蛋白]还原酶（Rawlings 等人，生物化学杂志，267-5751-5754（1992））和人雌二醇 17β-脱氢酶（Peltoketo 等人，FEBS Lett, 239: 73-77（1988）和 Leu 等人，Mol. Endocrinol, 3: 1301-1309（1989））。所有的相关蛋白质都属于短链醇脱氢酶蛋白质特大家族中的成员。此蛋白质特大家族包括大约 50 个不同的蛋白质（Persson 等人，欧洲生物化学杂志，200: 537-593（1991））。p32 和 BDH 之间的整个序列同源性大约是 39%，对大肠杆菌还原酶和雌二醇 17β-脱氢酶的同源性水平较低（分别为 31%和 33%）。

最适的重复多次的序列排列鉴定出由 p32 和最密切相关的蛋白质共享的几个保守区域（图 4 中被圈的区域）。据信包括残基 63-69（使用图 4 中的计数方式），并显示出保守的基元 G-X-X-X-G-X-G 的第一个区域是辅因子 NAD, NADP 或其还原形式的结合位点。在残基 148-153 之间发现了另一个保守的区域（共有序列 L-V-N-N-A-G），但仍未发现此序列基元具有任何功能性特征。在短链醇脱氢酶中，被认为是活性位点的序列基元 Y-X-X-X-K 是最高度保守的基元，并存在于 p32 残基 175-179 中，见 Persson 等人，欧洲生物化学杂志，200: 537-593（1991）。这些类似性阐明 p32 显示出短链醇脱氢酶的几个功能性特征。

如图 5 所示，对 p32 氨基酸序列的亲水性分析显示出几段疏水性的序列，这表明 p32 是膜相关蛋白。开始的 18 个氨基酸是疏水性的，此区域具有典型的信号序列的特征，然而，不能鉴定出信号肽酶裂解的共有位点，见 Von Heijne, 核酸研究, 14: 4683—4690 (1986)。残基 130—150 之间的氨基酸是疏水性的，在蛋白质的 C—末端附近存在相对长的疏水性序列，因此，p32 显示出几个疏水性区域，该区域是潜在的膜跨越区段。根据上文所述的与短链醇脱氢酶家族成员的同源性，p32 中央的疏水区（残基 130—150）可能不被用作膜锚。实际上 N—末端和 C—末端区域都是潜在的膜锚着域。

为了测定 p32 与膜相互作用的模式，通过体外翻译以合成 p32，所述翻译使用具有由线性化的 p $\lambda$  321 转录的 mRNA 的网织红细胞裂解物系统进行，所用方法见下文实施例 8：

## 实施例 8

### 通过体外翻译表达 p32

使用 T7 RNA 聚合酶由线性化的 p $\lambda$  321 合成编码 p32 的体外转录的 mRNA，遵照厂商的说明使用经核酶处理的兔网织红细胞裂解物进行体外翻译反应，每次反应中包括加或不加狗胰微粒体的 50ng 的 mRNA。为了分离插入膜中的 p32，在 4℃ 下，以 12,000 $\times$ g 的转速离心 10 分钟以收集微粒体。将微粒体小心地重悬浮于 PBS 中，并再次离心。

如图 6 所示，在狗胰微粒体存在下进行的翻译表明 p32 几乎定量地成为膜相关的蛋白质，并在 SDS—PAGE 中作为  $M_r$  为 32,000 的蛋白质类迁移。类似地，缺乏受体膜时进行的翻译产生了  $M_r$  32,000 蛋白质。这些资料表明 N—末端疏水性序列作为信号序列起作用，但信

号肽酶不能将之除去，此现象支持以前的观察结果，即在推导的一级序列中无法鉴定出信号肽酶裂解的共有位点。

通过 Northern 印迹分析 p32 的组织表达，所述 Northern 印迹分析使用了分离自牛 RPE，肝脏，肾脏，肾上腺，肺，睾丸，脑和肌肉的总 RNA，所用方法见下文实施例 9。

### 实施例 9

#### Northern 印迹分析

在处于变性条件下的 1% 琼脂糖中电泳分离自多种组织的 20  $\mu$  g 总 RNA，并转移到 Hybond-N 尼龙滤膜上，在严格条件下使滤膜与经  $^{32}$ P-标记的编码 p32 的全长 cDNA 杂交。

总 RNA 的分离，杂交条件和洗涤方法的细节见于 Bavik 等人，生物化学杂志，267: 20540-20546 (1993) 先前的描述。

在高严格度下，用 p $\lambda$  321 的 1.1kb 插入物作为探针进行的杂交揭示出对应于 p32 的转录本仅在 RPE 中有充足的表达，而在几种其它的组织中却达不到可检测的水平。主要的转录本的大小为 1.4kb，但在 RPE 以及其它组织中，延长滤膜的暴露时间之后可以观察到其它较不丰富的转录本。

### 实施例 10

#### p32 在 COS-细胞中的表达和重组 p32 特性的酶解分析

按下述，使用真核表达载体首先在 COS-细胞中表达 p32，然后对得自经转染细胞的微粒体组分和对照细胞进行免疫印迹分析以进一步地证实 p32 在所需水平上的表达：

具体地说，将 p $\lambda$  321 的 EcoRI-插入物克隆进经 EcoRI 消化的真

核表达载体 pSG5 中，见 Green 等人，核酸研究，16: 39 (1988)。在添加有 10% 胎牛血清，2mM 谷氨酰胺和抗生素的 Dulbecco 极限必需培养基中培养 COS-1 细胞。将细胞接种于 60mm 培养皿 ( $4 \times 10^5$  个细胞/皿) 中，使用 DEAE 葡聚糖每皿用  $5 \mu\text{g}$  质粒转染细胞，仅用等量亲代载体转染对照细胞，用 10% DMSO 处理 2 分钟后，将细胞温育 72-96 小时，通过用橡皮淀帚刮擦平皿收获细胞，然后通过低速离心收集细胞，将收集到的细胞沉淀物重新悬浮于低渗缓冲液 (含有 1mM 苯甲基磺酰氟的 10mM Tris-HCl, pH7.5) 中，在冰上放置 20 分钟，然后使用 Dounce 匀浆器匀浆细胞。离心 ( $3000 \times g$ ) 15 分钟以除去未破碎的细胞和碎片，随后通过在  $100,000 \times g$  下超速离心 1 小时以收集微粒体；将膜沉淀物储存于  $-80^\circ\text{C}$  中直至进一步地分析。

通过给兔注射表达成与 GST 的融合蛋白形式的 p32 (氨基酸残基 19-318) 以产生针对 p32 的抗血清。按厂商 (Pharmacia) 的推荐，使用细菌表达载体 pGEX 2T，诱导和纯化诱导和 GST-融合蛋白。给每只兔皮下注射  $75 \mu\text{g}$  乳化于弗氏完全佐剂中的融合蛋白，每隔 2 周，用  $50 \mu\text{g}$  乳化于弗氏不完全佐剂中的融合蛋白加强免疫兔，每隔 2 周收集一次血，使免疫兔血清穿过柱，该柱含有固定于经 CNBr 激活的 Sepharose 珠上的 GST 融合蛋白。用含有 0.5M NaCl 的 0.1M 柠檬酸钠缓冲液 (pH3.0) 洗脱被结合的 Ig。为了除去融合蛋白 GST 部分上的 Ig，类似地，将经洗脱的 Ig 与 GST-偶联的 Sepharose 珠一起保温，使用未结合的 Ig 组分。为了进行过度表达的蛋白质的免疫印迹分析，Ig 的使用浓度为  $1 \mu\text{g/ml}$ 。免疫印迹方法的细节详细描述于 Bavik 等人，生物化学杂志，267: 23035-23042 (1992)，该文被列入本文参考文献。

如图 8A 所示，上述方法导致 p32 在被重组表达载体转染的细胞

中表达，但不在被模拟转染的对照细胞中表达。

接着，以类似于在 RPE 细胞的微粒体组分中研究 11-顺式视黄醇脱氢酶活性的方式测定表达于 COS-细胞中的 p32 的酶解特性，见 Saari 等人，Anal. Biochem, 213: 28-13226 (1993)。

具体地说，通过在辅因子  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}$  的存在下，将得自前述经转染细胞和缺乏 p32 的对照细胞的微粒体组分与不同立体异构的底物，即 11-顺式视黄醇或全一反式视黄醇的变换的组合一起保温即可证实 p32 的酶解活性。

为了制备底物，如 Heller 等人，生物化学杂志，248: 6308-6316 (1973) 所述使用硼氢化钠由 11-顺式视黄醛合成 11-顺式视黄醇，并在  $80^\circ\text{C}$  下置氩气中保存。HPLC 分析证实 11-顺式视黄醛定量地还原成 11-顺式视黄醇，在柔和的光照条件下进行使用 retinoid 的所有操作。

为了检测经转染细胞中 p32 的活性，保温时 11-顺式视黄醇和全一反式视黄醇（得自 Sigma Chemical Co.）的终浓度降低至  $100\ \mu\text{M}$ 。每次保温时使用  $20\ \mu\text{g}$  得自表达 p32 的 COS-细胞或对照细胞的总膜蛋白，随后在  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}$  存在或缺乏的条件下，在  $37^\circ\text{C}$  下保温 30 分钟。用 n-己烷提取反应混合物，取出有机相，在氩气中干燥，然后将干燥的有机相单独溶解于乙醇中，在普通相硅胶 HPLC 柱上分析等分试样，该柱用含有 4% 二戊烷的 n-己烷以 1ml/分钟的速度展开，见 saari 等人，生物化学杂志，257: 13329-13333 (1982)。在 330nm 下监测流出液，在这些条件下，11-顺式视黄醛和 11-顺式视黄醇分别第 7 分钟和第 22.5 分钟时被洗脱出来，全一反式视黄醛和全一反式视黄醇分别第 8 分钟和第 23 分钟时被洗脱出来。

如图 8B 所示，前述的 HPLC 分析表明得自经转染细胞的级分含

有 p32 表达的 11-顺式视黄醇脱氢酶蛋白，11-顺式视黄醛的形成表示在  $\text{NAD}^+$  存在时该蛋白具有活性。层析谱中的第二个峰是全一反式视黄醛；然而，具有 11-顺式视黄醛的对照保温在缺乏细胞膜时表现出：在所用的试验方法中，大量的 11-顺式视黄醛异构成全一反式视黄醛。这表明全一反式视黄醛的出现是由于在所用的保温过程中和提取程序中产生了全一反式视黄醛，而不是酶解反应产物。另外，全一反式视黄醇与含有 p32 的细胞一起保温证实了酶的立体特异性，因为没有检测到全一反式视黄醛的显著形成。

如图 8C 所示，在辅因子 NADP 存在下，p32 不具有酶解活性。

在图 8D 中，对不表达 p32 的对照细胞的检测表明这些细胞不能将 11-顺式视黄醇氧化成 11-顺式视黄醛。

因此，由上文所述可得出结论：p32 是立体特异性的 11-顺式视黄醇脱氢酶，它依赖  $\text{NAD}^+$  作为它的辅因子。

### 实施例 11

根据上述的工作，使用牛的材料，进行另外的实验以分离和克隆人序列。

得自人眼，位于  $\lambda$  gt11 中的 cDNA 文库购自厂商（即 Clontech），将上述文献中所述的牛 cDNA，即 SEQ ID NO: 10 用作探针，通过随机引发至高比活（约  $10^9$  cpm/ $\mu$ g DNA）用  $^{32}\text{P}$  dCTP 标记 cDNA。

然后使用经标记的牛 cDNA 探测人 cDNA 文库，条件如下：在  $68^\circ\text{C}$  下， $6\times\text{SSC}$ ， $0.5\%\text{SDS}$ ， $5\times\text{Denhardt's}$  溶液， $25\%$  甲酰胺中与  $100\mu\text{g/ml}$  的鲑精 DNA 杂交，接着在  $65^\circ\text{C}$  下，用  $2\times\text{SSC}$ ， $0.5\%\text{SDS}$  洗涤四次，每次 30 分钟，最后在  $42^\circ\text{C}$  下，用  $2\times\text{SSC}$  洗涤 30 分钟。

当发现阳性 cDNA 时，根据厂商的说明切下插入物（即 cDNA），

然后亚克隆至可商购的载体 pBluescript 中，使用熟知的方法测定插入物的序列，1128 个核苷酸的序列列于 SEQ ID NO: 14 中，相应的 318 个残基的氨基酸序列列于 SEQ ID NO: 15 中。

## 实施例 12

在进一步的实验中，使用上述实施例 11 中的资料研究和分析牛神经视网膜和鼠 10 天的胚胎，使用鼠胚胎是因为除了该系统用于研究发育生物学的一般性用途之外，在发育中视黄醇脱氢酶也十分活跃。此模型可外推至人的发育。

使用熟知的技术，从牛的神经视网膜或鼠的 10 天胚胎中分离 RNA (5-10  $\mu$ g)，在 4  $\mu$ l 5 $\times$ AMVRT 缓冲液中，将 RNA 与 4  $\mu$ l 得自 5mM 储存液的 dNTP, 2  $\mu$ l 的寡 dT(18 聚体, 终浓度为 10  $\mu$ M)，以及 0.5  $\mu$ l RNase 抑制剂, 2  $\mu$ l 禽成髓细胞瘤病毒逆转录酶 (10U) 相混合，终体积为 20  $\mu$ l。在 42 $^{\circ}$ C 下保温所得的混合物 30 分钟，然后置于冰上直至使用。

然后进行 PCR，在 PCR 中，使用了 2  $\mu$ l cDNA，根据上文列出的牛 cDNA 的推导的氨基酸序列设计引物，下文注明的是保守的氨基酸序列：

- A) Cys Asp Ser Gly Phe Gly
- B) Pro Gly Trp Asp Ala
- C) Glu Ala Phe Ser Asp
- D) His Pro Arg Thr

“A”对应于 SEQ ID NO: 12 的氨基酸 36-41，“B”见于此序列的氨基酸 283-287，“C”见于第 183-187 位，“D”位于第 276-279 位。本文所用的“保守的”是指推导出的序列和肝脏 RDH 序列





中。SEQ ID NO: 20 和 24 对应于牛序列，而所有其它的序列为鼠序列。在这些核苷酸序列中，第一个碱基（“C”）是实验的人为假象，是由限制性核酸内切酶裂解造成的。因此，测定推导的氨基酸序列时，序列从第二个核苷酸碱基开始。另外，应注意未包括正常情况下应被包括在 5' 和 3' 末端的对应于简并寡聚体的序列。

### 实施例 13

在进一步的探测实验中，使用 SEQ ID NO: 19 列出的 PCR 产物。

使用随机标记的 SEQ ID NO: 22 筛选鼠 8.5 天的 cDNA 文库（于  $\lambda$  gt10 中），其中在 42°C 下，6×SSC，0.5%SDS，5×Denhardt's 溶液，50%甲酰胺中与 100  $\mu$ g/ml 的鲑精 DNA 发生杂交，接着在 50°C 下，用 2×SSC，0.5%SDS 洗涤 1 次，时间为 30 分钟。鉴定阳性的 cDNA 克隆，亚克隆至 pBluescript 中并测定其序列。核苷酸序列和推导的氨基酸序列示于 SEQ ID NO: 28 和 29。

### 实施例 14

根据上述的工作，使用人 cDNA 探测人基因组文库，通过 PCR 制备探针，并如上文所述随机标记探针。

PCR 中所用的引物衍生自 SEQ ID NO: 11 的 cDNA 序列，引物如下：

正向引物：

5' -GCTTCGGGCGCTGTAGTA-3' (SEQ ID NO: 30) 和

反向引物：

5' -AAAACAATCTCTTGCTGGAA-3' (SEQ ID NO: 31)。

通过在 95°C 下变性，55°C 下退火，72°C 下延伸进行 PCR，使用 2



应 1 和 2 的扩增片段分别为 2.2kb 和 2.5kb, 将每个片段克隆到可购自 Invitrogen 的载体 PCR 中。

使用载体特异性的引物或内部引物对克隆片段进行的序列分析可鉴定出外显子—内含子边界。

基因的结构示于图 9。

### 实施例 15

进行研究以鉴定基因在染色体上的位置。

为此, 从人白细胞, 中国仓鼠细胞, 鼠肝脏细胞和仓鼠/人, 小鼠/人体细胞杂合细胞系中分离高分子量的 DNA, 这些杂合细胞系各保留了一个人染色体以及啮齿动物基因组。

用 HindIII 消化分离的 DNA, 通过电泳在琼脂糖凝胶上分级分离所述 DNA, 然后转移到尼龙滤膜上, 使用按上述方法标记的上述人 cDNA 探测这些 DNA。

使用本技术领域公知的技术, 从淋巴细胞培养物中制备染色体的玻片, 混合得自 3 个基因组克隆的  $\lambda$  DNA, 并通过切口平移用生物素化的 16-dUTP 标记上述  $\lambda$  DNA, 按照厂商的说明, 用荧光红-dUTP 标记人染色体 12 着丝粒 (得自 ATCC, 保藏号为 D12Z1) 的着丝粒特异性探针。探针的预退火, 玻片的预处理, 杂交条件, 信号扩增和检测遵照众所周知的技术。用 4, 6 二氨基-2-苯基-吲哚 (DAPI) 复染染色体, 使用荧光显微镜观察信号。

对所有这些资料的分析表明人 11-顺式 RDH 的基因跨越了 4 千个碱基以上, 该基因被分成 4 个编码外显子, 长度范围是 165-342 个碱基对。另外, 在 5' 非翻译区也发现了一个外显子, 最后一个编码外显子的长度仍未确定。内含子的长度范围为 250 个碱基对-1.9 千





肾脏  
睾丸

+++  
—

+++  
—

### 实施例 17

考虑到实施例 16 的结果，在本实施例描述的实验中使用鼠肝脏，使用标准方法，在  $\lambda$  ZAP 中制备鼠肝脏 cDNA 文库。使用上文实施例 16 中描述的探针筛选文库，具体地说，按照厂商的说明将文库铺平板并制备滤膜。在 42°C 下，50% 甲酰胺，6×SSPE 缓冲液，2×Denhardt's 溶液，100  $\mu$ g/ml 的鲑精 DNA 中进行预杂交，然后使用  $1 \times 10^6$  cpm/ml 的杂交溶液杂交滤膜，过夜杂交之后，用含有 0.1%SDS 的 2×SSC 洗涤滤膜两次（52°C，每次洗涤 30 分钟），接着在 52°C 下，用含有 0.1%SDS 的 0.1×SSC 再洗涤两次，每次洗涤 20 分钟。然后按上文所述暴露滤膜，重新筛选任何阳性的克隆两次直至平板上所有的噬斑皆为阳性。使用标准方法，通过体内切割将得自几个阳性克隆的插入物亚克隆至质粒 pBluescript SK (+)，测定所得的几个克隆的序列。

当 SEQ ID NO: 21 被用作探针时，鉴定了 3 个不同的 cDNA，在本文中它们被表示为 SEQ ID NO: 32, 33 和 34。当 SEQ ID NO: 22 被用作探针时，发现了 SEQ ID NO: 35。由此推导的氨基酸序列分别被表示为 SEQ ID NO: 36—39。

因此，如上所述，本发明提供了分离和鉴定新的蛋白质，即 p32 的方法，该蛋白质与 RPE 的 p63 相关。p32 的一级结构阐明它具有功能性的短链醇脱氢酶的所有关键性的特性，包括推定的辅因子结合位点和催化机制所涉及的必需的残基，即几乎不变的含有序列基元 Y-X-X-X-K 的酪氨酸（Persson 等人，欧洲生物化学杂志，200: 537—543（1991））。受限的组织表达和 RPE 中 p32 的丰度表明此蛋白质

行使的功能对 RPE 而言是独一无二的。这种可能性和下列事实表明 p32 的底物是 retinoid, 所述事实是 p32 与 p63 形成复合物, 而该复合物以前已显示出是 RPE-细胞中 retinoid 摄取机的组分 (Bavik 等人, 生物化学杂志, 267: 23035-23042 (1992))。

RPE-细胞中 retinoid 代谢的主要代谢步骤是 11-顺式视黄醇转变成 11-顺式视黄醛。根据上文得到的显示出 p32 在 RPE 中受限的表达的结果, 以及此蛋白质的特殊生化特性, 进一步的研究证实了 p32 实际上是催化此反应的 11-顺式视黄醇脱氢酶。

因此, 本发明的一个方面是产生重组的 11-顺式视黄醇脱氢酶的能力, 与使用标准生化方法学得到的产品相比, 此重组酶可被用于生产较高水平, 较纯形式的 11-顺式视黄醛。因此, 在此上下文中, 可使用本发明的包括 SEQ ID NO: 10 的分离的核酸分子, 以及在严格条件下可与 SEQ ID NO: 10 杂交的那些核酸分子。术语“严格条件”指的是在 68°C 下, 6×SSC, 0.5%SDS, 5×Denhardt's 溶液中与 100 μg/ml 的鲑精 DNA 杂交, 最后在 50°C 下, 用 0.5-1.0×SSC 洗涤。本文中使用的此术语也指至少与上文中所述条件同样严格的任何套参数。众所周知, 通过改变一个参数使之较不严格, 同时改变另一个参数以增加其严格度可产生同样的严格条件。因此, 预期满足本文所列的杂交标准的任何核酸分子编码 p32 或 p32 同系物。可在如上所述的体外系统中生产酶, 或通过用本发明的核酸分子转染或转化真核或原核细胞系, 如 CHO 和 COS 细胞或如大肠杆菌的细菌菌株或酵母菌株啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 来生产酶。在特别优选的实施方案中, 核酸分子被包含在与启动子有效连接的表达载体内。优选互补的 DNA, 或“cDNA”, 但也使用基因组 DNA 和 mRNA。

考虑到非眼组织中发生的 retinoid 代谢, 重要的是鉴定作为短链

醇脱氢酶特大家族中的成员的 p32，即 11-顺式视黄醇脱氢酶。研究表明由全-反式视黄醇产生全-反式视黄酸以两步法进行（Posch 等人，生物化学，30：6224-6230（1991）），第一步，通过膜结合的视黄醇脱氢酶将视黄醇氧化为视黄醛，第二步，视黄醛被氧化成视黄酸。因此，发生于非眼组织中的视黄醇氧化为视黄醛的过程类似于视循环中由 11-顺式视黄醇合成 11-顺式视黄醛的过程中进行的反应。根据这些相似性，可建议使用结构类似于本发明分离的 p32 11-顺式视黄醇脱氢酶的酶由全-反式视黄醇形成全-反式视黄醛。与目前持有的观点相比，这些发现是令人惊奇的，因为一般认为此代谢步骤是由中等链长的醇脱氢酶成员进行的，见 Duester, Alcohol Clin. Exp. Res, 15: 568-572（1991）；Yang 等人，Alcohol Clin. Exp. Res, 17: 496（1993）和 Zgombic-Knight 等人，生物化学杂志，269: 6790-6795（1994）。因此，由本发明提供的 p32 11-顺式视黄醇脱氢酶的鉴定和结构特征描述也提供了以前无法预期的途径，该途径可用于分离和鉴定类似的涉及非眼组织中视黄醇代谢的脱氢酶。

p32 蛋白和编码它的核酸以及本发明的其它方面还有很多其它重要的用途，例如，正如上文所述，p32 是寡聚体蛋白质复合物的一部分，该复合物在 RPE-细胞中作为 RBP 的膜受体起作用，在表型/基因型诊断分析中可使用编码 p32 的核酸序列以测定可导致色素性视网膜炎的 retinoid 积累。

另外，如上所述，p32 具有 11-顺式视黄醇脱氢酶的活性，该酶可催化 11-顺式视黄醇转变成 11-顺式视黄醛，在 RPE-细胞的 retinoid 代谢中，这是由膜结合的脱氢酶进行的主要代谢步骤。因此，retinoid 的积累直接或间接地依赖 p32 的存在和/或其激活或抑制，例如，它与 RBP 受体 p63 的复合物的形成。

在其它应用中，可检测治疗与 p32 11-顺式视黄醇脱氢酶活性有关的多种疾病的潜在的 retinoid 药物的效果，因为这种药物对酶有不利的作用，因此可测定出不同药物中的哪一种对酶活性的不利作用受到限制或哪一种没有不利的作用。

这种疾病的例子包括眼睛和皮肤的那些障碍，如牛皮癣和痤疮。通过 retinoid 药物也可检测如 T-细胞白血病的某些癌症，因此这些药物是检测 p32 活性的候选药物。

retinoid 多种已知的功能也暗示通过检测与特殊的视黄醇结合蛋白有关的 p63/p32 受体复合物的水平可诊断出多种其它的与 retinoid 有关的病理学状态。可使用本技术领域熟知的技术，如免疫测定法等来测定 p63/p32 受体复合物的水平是否太低或太高，即是否在正常水平上不符。

另外，由于 p32 与 RPE 细胞中 retinoid 摄取机制的 p63 组分复合，它也可以用于治疗，因为众所周知可溶性的受体可被用于预防蛋白质与其膜-联受体结合。因此，通过施用可溶性受体复合物或抗体即可治疗因视黄醇结合蛋白的产生水平增高而鉴定出的受试者，所施用的量应足以抑制视黄醇结合蛋白或其它相关分子与其靶，即 p32 视黄醇脱氢酶活性的抑制剂的结合。本发明的其它方面对于本领域熟练的技术人员而言是显而易见的，本文无需重复。

在另一个应用中，通过抗体与体液或组织样品的结合分析可产生针对 p32 的单克隆和多克隆抗体，所述抗体对于监测因视黄醇结合蛋白受体水平异常而鉴定出的病理学状态的病例特别有用。通过例如使用 Bavik 等人，生物化学杂志，268：20540—20546（1993）所述的产生包括 mAb A52 的针对 p63 的抗体的方法可产生针对 p32 的抗体。

所使用的术语和表达仅用于描述而不是为了限制本发明，在使用



这些术语和表达时不想排除所示和所述特征的任何等价物或其部分，我们认为多种修饰可以包括在本发明的范围之内。

(1) 一般信息

(i) 申请人: ERIKSSON 等人

(ii) 发明名称: 编码具有 11-顺式视黄醇脱氢酶活性的 32 KDa 蛋白质的分离的核酸分子, 所述蛋白质与作为视黄醇结合蛋白受体的一部分的 p63 相关

(iii) 序列数目: 39

(iv) 联系地址:

- (A) 联系人: Felfe & Lynch
- (B) 街道: 805 Third Avenue
- (C) 城市: 纽约
- (D) 州: 纽约
- (F) 邮编: 10022

(v) 计算机的可读形式:

- (A) 介质类型: 软盘, 3.5 英寸, 144kb 内存
- (B) 计算机: IBM
- (C) 操作系统: PC-DOS
- (D) 软件: Wordperfect

(vi) 本申请资料:

- (A) 申请号:
- (B) 申请日:
- (C) 分类号:

(vii) 在先申请资料:

- (A) 申请号: 08/562,114
- (B) 申请日: 1995 年 11 月 22 日

(vii) 在先申请资料:

- (A) 申请号: 08/375,962
- (B) 申请日: 1995 年 1 月 20 日

(vii) 在先申请资料:

- (A) 申请号: 08/258,418
- (B) 申请日: 1994年6月10日

(viii) 代理/代理人资料:

- (A) 姓名: Hanson, Norman D
- (B) 登记号: 30,946
- (C) 参考文献/文档号: LUD 5372.3-PCT

(ix) 电信资料:

- (A) 电话: (212) 688-9200
- (B) 电传: (212) 838-3884

SEQ ID NO: 1 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 18个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1

Leu Val Glu Ala Val Leu Ala Glu Val Leu Pro Lys Pro Ala Gln Thr  
 Val Ala 5 10 15

SEQ ID NO: 2 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 8个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2

Tyr Ser Pro Gly Trp Asp Ala Lys  
 5

SEQ ID NO: 3 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 15个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

Thr Pro Val Thr Asn Leu Glu Thr Leu Glu Asp Thr Leu Gln Ala  
 5 10 15

SEQ ID NO: 4 的资料:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 7 个氨基酸
  - (B) 类型: 氨基酸
  - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4

Asp Val Ala Pro Phe Gly Val  
5

SEQ ID NO: 5 的资料:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 14 个氨基酸
  - (B) 类型: 氨基酸
  - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5

Leu His Thr Thr Leu Leu Asp Val Thr Asp Pro Gln Ser Ile  
5 10

SEQ ID NO: 6 的资料:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 23 个碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6

ACGTGAATTC TNGTNGARGC NGT

23

SEQ ID NO: 7 的资料:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 27 个碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 核酸
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7

ACGTGAATTC ACNGTYTGNG CNGGYTT

27

SEQ ID NO: 8 的资料:



GAC	CGG	CCA	GCC	AGC	GAT	GCC	TTT	ATC	TTC	ATC	ACC	GGC	TGT	GAC	TCG	149
Cys	Leu	Pro	Ala	Ser	Asp	Ala	Phe	Ile	Phe	Ile	Thr	Gly	Cys	Asp	Ser	
	25						30					35				
GGC	TTT	GGG	CGG	CTC	CTT	GCT	CTG	AGG	CTG	GAC	CAG	AGA	GGC	TTC	CGA	197
Gly	Phe	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Asp	Gln	Arg	Gly	Phe	Arg	
	40					45					50					
GTA	CTG	GCC	AGC	TGC	CTG	ACA	CCC	TCG	GGG	GCG	GAG	GAC	CTC	CAG	CGG	245
Val	Leu	Ala	Ser	Cys	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Arg	
	55				60					65					70	
GTC	GCC	TCC	TCC	CGC	CTC	CAC	ACC	ACC	CTG	CTG	GAT	GTC	ACA	GAT	CCC	293
Val	Ala	Ser	Ser	Arg	Leu	His	Thr	Thr	Leu	Leu	Asp	Val	Thr	Asp	Pro	
				75					80					85		
CAG	AGC	ATC	CGG	CAG	GCA	GTC	AAG	TGG	GTG	GAA	ACG	CAT	GTT	GGG	GAA	341
Gln	Ser	Ile	Arg	Gln	Ala	Val	Lys	Trp	Val	Glu	Thr	His	Val	Gly	Glu	
			90					95					100			
GCA	GGG	CTT	TTT	GGT	CTG	GTG	AAT	AAT	GCT	GGT	GTG	GCT	GGC	ATC	ATT	389
Ala	Gly	Leu	Phe	Gly	Leu	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Val	Ala	Gly	Ile	Ile	
		105					110					115				
GGT	CCC	ACC	CCA	TGG	CAG	ACG	CGG	GAG	GAC	TTC	CAG	CGG	GTG	CTG	AAT	437
Gly	Pro	Thr	Pro	Trp	Gln	Thr	Arg	Glu	Asp	Phe	Gln	Arg	Val	Leu	Asn	
	120					125					130					
GTG	AAC	ACG	CTG	GGT	CCC	ATC	GGG	GTC	ACC	CTC	GCC	CTG	CTG	CCC	CTG	485
Val	Asn	Thr	Leu	Gly	Pro	Ile	Gly	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	
	135				140					145					150	
CTG	CTG	CAG	GCC	CGG	GGC	CGA	GTG	ATC	AAC	ATC	ACC	AGT	GTC	CTT	GGC	533
Leu	Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Arg	Val	Ile	Asn	Ile	Thr	Ser	Val	Leu	Gly	
				155					160					165		
CGT	CTG	GCA	GCC	AAT	GGA	GGG	GGC	TAC	TGC	GTC	TCC	AAG	TTT	GGC	CTG	581
Arg	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Gly	Gly	Tyr	Cys	Val	Ser	Lys	Phe	Gly	Leu	
			170					175					180			
GAG	GCC	TTC	TCT	GAC	AGC	CTG	AGG	CGA	GAT	GTG	GCT	CCT	TTT	GGG	GTA	629
Glu	Ala	Phe	Ser	Asp	Ser	Leu	Arg	Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	
		185					190					195				
CGG	GTC	TCT	ATC	GTG	GAA	CCT	GGC	TTC	TTC	CGA	ACC	CCT	GTG	ACA	AAC	677
Arg	Val	Ser	Ile	Val	Glu	Pro	Gly	Phe	Phe	Arg	Thr	Pro	Val	Thr	Asn	
	200					205					210					
CTG	GAA	ACT	TTG	GAG	GAC	ACC	CTG	CAG	GCC	TGC	TGG	GCA	CGG	CTG	CCT	725
Leu	Glu	Thr	Leu	Glu	Asp	Thr	Leu	Gln	Ala	Cys	Trp	Ala	Arg	Leu	Pro	
	215				220					225					230	
CCA	GCC	ACA	CAG	GCC	CTC	TAT	GGG	GAG	GCC	TTC	CTC	ACC	AAA	TAC	CTG	773
Pro	Ala	Thr	Gln	Ala	Leu	Tyr	Gly	Glu	Ala	Phe	Leu	Thr	Lys	Tyr	Leu	
				235					240					245		
AGA	GTG	CAG	CAA	CGT	ATC	ATG	AAC	ATG	ATC	TGT	GAT	CCG	GAC	CTG	GCC	821
Arg	Val	Gln	Gln	Arg	Ile	Met	Asn	Met	Ile	Cys	Asp	Pro	Asp	Leu	Ala	
			250				255						260			
AAG	GTG	AGC	AGG	TGC	CTG	GAG	CAT	GCC	CTA	ACT	GCC	CGT	CAC	CCC	AGA	869
Lys	Val	Ser	Arg	Cys	Leu	Glu	His	Ala	Leu	Thr	Ala	Arg	His	Pro	Arg	
		265					270					275				

ACC CGC TAC AGC CCA GGC TGG GAT GCC AAG CTG CTC TGG TTG CCA GCC 917  
 Thr Arg Tyr Ser Pro Gly Trp Asp Ala Lys Leu Leu Trp Leu Pro Ala  
 280 285 290

TCC TAC TTG CCA GCC AGG CTG GTG GAT GCT GTG CTC GCC TGG GTC CTT 965  
 Ser Tyr Leu Pro Ala Arg Leu Val Asp Ala Val Leu Ala Trp Val Leu  
 295 300 305 310

CCC AAG CCT GCC CAG ACA GTC TAC TAA ATCCAGCCCT CCAGCAAAAAG 1012  
 Pro Lys Pro Ala Gln Thr Val Tyr  
 315

ATGGTTGTTT AAGGCAAGGA CTCTGATTTA TTCTGTCCCC TACCCTGGTA CTGCCTGGTG 1072

TGTGGCATAA AACAGTCACT CAATAAATGT ATTATTCAAA ACAAAAAAAA 1122

SEQ ID NO: 11 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 343 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 大鼠 D-b-羟基丁酸脱氢酶 (rBDH)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 11

Met Met Leu Ala Ala Arg Leu Ser Arg Pro Leu Ser Gln Leu Pro Gly  
 5 10 15

Lys Ala Leu Ser Val Cys Asp Arg Glu Asn Gly Thr Arg His Thr Leu  
 20 25 30

Leu Phe Tyr Pro Ala Ser Phe Ser Pro Asp Thr Arg Arg Thr Tyr Thr  
 35 40 45

Ser Gln Ala Asp Ala Ala Ser Gly Lys Ala Val Leu Val Thr Gly Cys  
 50 55 60

Asp Ser Gly Phe Gly Phe Ser Leu Ala Lys His Leu His Ser Lys Gly  
 65 70 75 80

Phe Leu Val Phe Ala Gly Cys Leu Leu Lys Glu Gln Gly Asp Ala Gly  
 85 90 95

Val Arg Glu Leu Asp Ser Leu Lys Ser Asp Arg Leu Arg Thr Ile Gln  
 100 105 110

Leu Asn Val Cys Asn Ser Glu Glu Val Glu Lys Ala Val Glu Thr Val  
 115 120 125

Arg Ser Gly Leu Lys Asp Pro Glu Lys Gly Met Trp Gly Leu Val Asn  
 130 135 140

Asn Ala Gly Ile Ser Thr Phe Gly Glu Val Glu Phe Thr Ser Met Glu  
 145 150 155 160

Thr Tyr Lys Glu Val Ala Glu Val Asn Leu Trp Gly Thr Val Arg Thr  
 165 170 175

Thr Lys Ser Phe Leu Pro Leu Leu Arg Arg Ala Lys Gly Arg Val Val  
 180 185 190





```

Val Asn Val Val Gly Thr Val Arg Met Leu Gln Ala Phe Leu Pro Asp
    115                                120                                125

Met Lys Arg Arg Gly Ser Gly Arg Val Leu Val Thr Gly Ser Val Gly
    130                                135                                140

Gly Leu Met Gly Leu Pro Phe Asn Asp Val Tyr Cys Ala Ser Lys Phe
    145                                150                                155                                160

Ala Leu Glu Gly Leu Cys Glu Ser Leu Ala Val Leu Leu Leu Pro Phe
    165                                170                                175

Gly Val His Leu Ser Leu Ile Glu Cys Gly Pro Val His Thr Ala Phe
    180                                185                                190

Met Glu Lys Val Leu Gly Ser Pro Glu Glu Val Leu Asp Arg Thr Asp
    195                                200                                205

Ile His Thr Phe His Arg Phe Tyr Gln Tyr Leu Ala His Ser Lys Gln
    210                                215                                220

Val Phe Arg Glu Ala Ala Gln Asn Pro Glu Glu Val Ala Glu Val Phe
    225                                230                                235                                240

Leu Thr Ala Leu Arg Ala Pro Lys Pro Thr Leu Arg Tyr Phe Thr Thr
    245                                250                                255

Glu Arg Phe Leu Pro Leu Leu Arg Met Arg Leu Asp Asp Pro Ser Gly
    260                                265                                270

Ser Asn Tyr Val Thr Ala Met His Arg Glu Val Phe Gly Asp Val Pro
    275                                280                                285

Ala Lys Ala Glu Ala Gly Ala Glu Ala Gly Gly Gly Ala Gly Pro Gly
    290                                295                                300

Ala Glu Asp Glu Ala Gly Arg Ser Ala Val Gly Asp Pro Glu Leu Gly
    305                                310                                315                                320

Asp Pro Pro Ala Ala Pro Gln
    325

```

SEQ ID NO: 13 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 244 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: 大肠杆菌 3-oxoacyl[酰基载体蛋白]还原酶 (FABG)

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 13

```

Met Asn Phe Glu Gly Lys Ile Ala Leu Val Thr Gly Ala Ser Arg Gly
    5                                10                                15

Ile Gly Arg Ala Ile Ala Glu Thr Leu Ala Ala Arg Gly Gly Lys Val
    20                                25                                30

Ile Gly Thr Ala Thr Ser Glu Asn Gly Ala Gln Ala Ile Ser Asp Tyr
    35                                40                                45

```







- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 24 个碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 核酸
- (ix) 特征:
  - (A) 名称/关键词: PCR 引物
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 18

ACGTGAATTC GARGCNTTYT CNGA

24

SEQ ID NO: 19 的资料:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 24 个碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 核酸
- (ix) 特征:
  - (A) 名称/关键词: PCR 引物
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 19

ACGTGAATTC CGNGTNCKNG GRTG

24

SEQ ID NO: 20 的资料:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 262 个碱基对
  - (B) 类型: 核酸
  - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 核酸
- (ix) 特征:
  - (A) 名称/关键词: PCR 克隆 194
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 20

CTCTCTCAGA AGGGAGCTCT CCTACTTCGG AGTGAAGGTG GCTATGATTG AGCCTGGTTA 60  
 CTTTGTTACC AATATGACCC AAGATGAGGG TTTTATTGGA TACCTCCAGG CATTGTGGAA 120  
 CCGGGCCAGC CCAGAGCTGA AAGAACTCTA TGGAGAAAAC TTCCCTGCTG ACTTCTTGAA 180  
 GACATTGAGT TTA CTGAAAC CACGGTGGAC TCAGAATCTG TCCTTGGTGA CCGACTGCAT 240  
 GGAGCACGCC CTGACTGCCT GC

262

SEQ ID NO: 21 的资料:

- (i) 序列特征：
  - (A) 长度：262 个碱基对
  - (B) 类型：核酸
  - (D) 拓扑结构：线性
- (ii) 分子类型：核酸
- (ix) 特征：
  - (A) 名称/关键词：PCR 克隆 207
- (xi) 序列描述： SEQ ID NO: 21

```
CTCCCTCAGG AGGGGGCTCT CCTACTTTGG GGTGAAGGTG GCTATTATAG AGCCTGGCTT 60
CTTCCTGACC GGTGTGACCA GTAGTGCCAG ATTATGCTCA AATACCCAGA TGCTGTGGGA 120
CCAGACCAGC TCAGAAATCA GGGAGATCTA TGGCGAGAAG TACCTGGCAT CCTATCTGAA 180
AAGGCTAAAC GAATTGGACA AGAGGTGCAA CAAGGACCTG TCTTTGGTGA CTGACTGCAT 240
GGAGCATGCT CTGACTGCCT GC 262
```

SEQ ID NO: 22 的资料:

- (i) 序列特征：
  - (A) 长度：265 个碱基对
  - (B) 类型：核酸
  - (D) 拓扑结构：线性
- (ii) 分子类型：核酸
- (ix) 特征：
  - (A) 名称/关键词：PCR 克隆 200
- (xi) 序列描述： SEQ ID NO: 22

```
CAGCCTGAGG CGGGACATGG CTCCGTTCCG AGTACAAGTC TCCATTGTGG AGCCTGGCTT 60
CTTTCGAACC CCTGTGACCA ACCTGGAGAG TCTGGAGAGC ACCCTGAAGG CTTGTTGGGC 120
CCGGCTACCT CCAGCTATAC AGGCCCACTA CCGCCAGCCC TTCCTCGATA CTCATCTTCC 180
AGTACAGCGC CGCATCATGA ACCTGATCTG TGACCCAGAA CTAACGAAGG TGACCAGCTG 240
CCTGGAGCAT GCCCTGACTG CTCGC 265
```

SEQ ID NO: 23 的资料:

- (i) 序列特征:

- (A) 长度: 265 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 核酸
- (ix) 特征:
  - (A) 名称/关键词: PCR 克隆 215
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 23

```

CAGCCTGAGG CGAGATGTGG CTCCTTTTGG GGTACGGGTC TCTATCGTGG AACCTGGCTT   60
CTTCCGAACC CCTGTGACAA ACCTGGAAAC TTTGGAGGGC ACCCTGCAGG CCTGCTGGGC   120
ACGGCTGCCT CCAGCCACAC AGGCCCTCTA TGGGGAGGCC TTCCTCACCA AATACCTGAG   180
AGTGCAGCAA CGTATCATGA ACATGATCTG TGATCCGGAC CTGGCCAAGG TGAGCAGGTG   240
CCTGGAGCAT GCCCTAACTG CCCGT                                     265
  
```

SEQ ID NO: 24 的资料:

- (i) 序列特征:
  - (A) 长度: 87 个氨基酸
  - (B) 类型: 氨基酸
  - (D) 拓扑结构: 线性
- (ii) 分子类型: 蛋白质
- (ix) 特征:
  - (A) 名称/关键词: PCR 克隆 194
- (xi) 序列描述: SEQ ID NO: 24

```

Ser Leu Arg Arg Glu Leu Ser Tyr Phe Gly Val Lys Val Ala Met Ile
      5              10              15
Glu Pro Gly Tyr Phe Val Thr Asn Met Thr Gln Asp Glu Gly Phe Ile
      20              25              30
Gly Tyr Leu Gln Ala Leu Trp Asn Arg Ala Ser Pro Glu Leu Lys Glu
      35              40              45
Leu Tyr Gly Glu Asn Phe Pro Ala Asp Phe Leu Lys Thr Leu Ser Leu
      50              55              60
Leu Lys Pro Arg Trp Thr Gln Asn Leu Ser Leu Val Thr Asp Cys Met
      65              70              75              80
Glu His Ala Leu Thr Ala Cys
      85
  
```

SEQ ID NO: 25 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 87 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

(A) 名称/关键词: PCR 克隆 207

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 25

```

Ser Leu Arg Arg Gly Leu Ser Tyr Phe Gly Val Lys Val Ala Ile Ile
          5                10                15
Glu Pro Gly Phe Phe Leu Thr Gly Val Thr Ser Ser Ala Arg Leu Cys
          20                25                30
Ser Asn Thr Gln Met Leu Trp Asp Gln Thr Ser Ser Glu Ile Arg Glu
          35                40                45
Ile Tyr Gly Glu Lys Tyr Leu Ala Ser Tyr Leu Lys Arg Leu Asn Glu
          50                55                60
Leu Asp Lys Arg Cys Asn Lys Asp Leu Ser Leu Val Thr Asp Cys Met
          65                70                75                80
Glu His Ala Leu Thr Ala Cys
          85
    
```

SEQ ID NO: 26 的资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 88 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:





SEQ ID NO: 28 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 563 个碱基对
- (B) 类型: 核酸
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 核酸

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 克隆 ME207

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 28

```
GAGGCGTTCT CGGACTCCCT CAGGAGGGGG CTCTCCTACT TTGGGGTGAA GGTGGCTATT 60
ATAGAGCCTG GCTTCTTCCT GACCGGTGTG ACCAGTAGTG CCAGATTATG CTCAAATACC 120
CAGATGCTGT GGGACCAGAC CAGCTCAGAA ATCAGGGAGA TCTATGGCGA GAAGTACCTG 180
GCATCCTATC TGAAAAGGCT AAACGAATTG GACAAGAGGT GCAACAAGGA CCTGTCTTTG 240
GTGACTGACT GCATGGAGCA TGCTCTGACT GCCTGCCACC CTCGCACGCG ATACTCAGCT 300
GGCTGGGATG CTAAGCTCTT CTACCTCCCC TTGAGCTACC TGCCTACCTT TCTTGTGGAT 360
GCCCTTCTCT ATTGGACTTC CCTGAAGCCT GAGAAAGCCC TCTGACGTGT TCACCTATGT 420
GCATACCTGG GGAGATGTAG GTAGAGTTTG AGAGAGAGAA TATTTAGGGG AAATTTGGAG 480
GGTTGAGGGA GGGAGTTTAT TACTCTGGGG TTCAGTCAAC ACACTTCATC TCATTAATTC 540
TCCTATGACA CTA CTGAATA CTG 563
```

SEQ ID NO: 29 的资料:

(i) 序列特征:

- (A) 长度: 134 个氨基酸
- (B) 类型: 氨基酸
- (D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(ix) 特征:

- (A) 名称/关键词: 克隆 ME207

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 29

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

















图1A

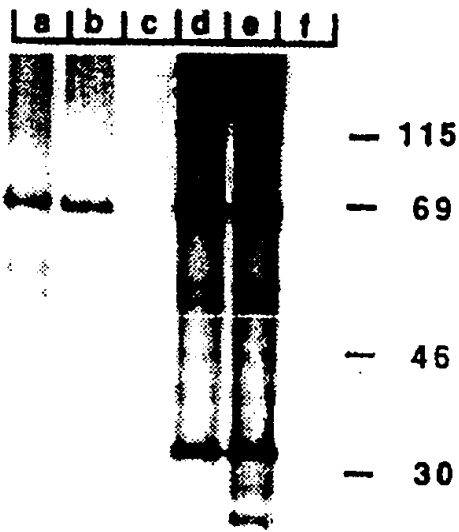


图1B

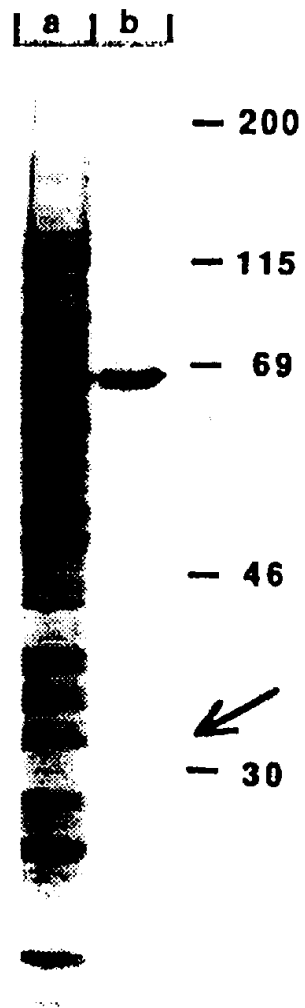
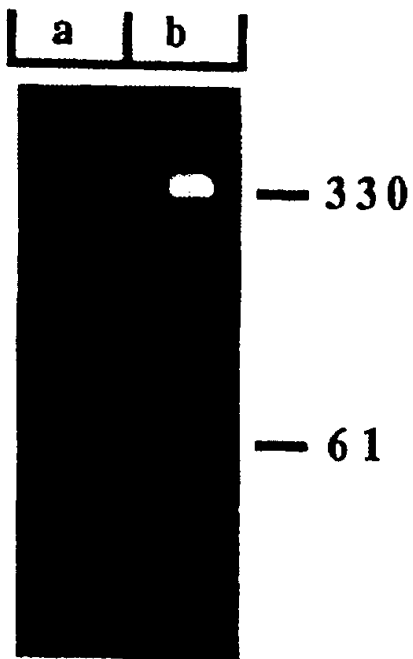


图2



# 图3

1	AGCTTTCCTGAGGAGGTCACCTGGGCTCCAGCC																	
36	Met	Trp	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Gly	Val	Leu	Leu	Trp	Ala	Ala	Leu	Trp	Leu	17
	ATG	TGG	CTG	CCT	CTG	CTG	CTG	GGT	GTC	TTG	CTC	TGG	GCA	GCA	CTG	TGG	TTG	
88	Leu	Arg	Asp	Arg	Gln	Cys	Leu	Pro	Ala	Ser	Asp	Ala	Phe	Ile	Phe	Ile	Thr	34
	CTC	AGG	GAC	CGG	CAG	TGC	CTG	CCA	GCC	AGC	GAT	GCC	TTT	ATC	TTC	ATC	ACC	
139	Gly	Cys	Asp	Ser	Gly	Phe	Gly	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Asp	Gln	Arg	51
	GGC	TGT	GAC	TCG	GGC	TTT	GGG	CGG	CTC	CTT	GCT	CTG	AGG	CTG	GAC	CAG	AGA	
190	Gly	Phe	Arg	Val	Leu	Ala	Ser	Cys	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Ala	Glu	Asp	Leu	68
	GGC	TTC	CGA	GTA	CTG	GCC	AGC	TGC	CTG	ACA	CCC	TCG	GGG	GCG	GAG	GAC	CTC	
241	Gln	Arg	Val	Ala	Ser	Ser	Arg	Leu	His	Thr	Thr	Leu	Leu	Asp	Val	Thr	Asp	85
	CAG	CGG	GTC	GCC	TCC	TCC	CGC	CTC	CAC	ACC	ACC	CTG	CTG	CAT	GTC	ACA	GAT	
292	<u>Pro</u>	<u>Gln</u>	<u>Ser</u>	<u>Ile</u>	Arg	Gln	Ala	Val	Lys	Trp	Val	Glu	Thr	His	Val	Gly	Glu	102
	CCC	CAG	AGC	ATG	CGG	CAG	GCA	GTC	AAG	TGG	GTG	GAA	ACG	CAT	GTT	GGG	GAA	
343	Ala	Gly	Leu	Phe	Gly	Leu	Val	Asn	Asn	Ala	Gly	Val	Ala	Gly	Ile	Ile	Gly	119
	GCA	GGG	CTT	TTT	GGT	CTG	GTG	AAT	AAT	GCT	GGT	GTG	GCT	GGC	ATC	ATT	GGT	
394	Pro	Thr	Pro	Trp	Gln	Thr	Arg	Glu	Asp	Phe	Gln	Arg	Val	Leu	Asn	Val	Asn	136
	CCC	ACC	CCA	TGG	CAG	ACG	CGG	GAG	GAC	TTC	CAG	CGG	GTG	CTG	AAT	GTG	AAC	
445	Thr	Leu	Gly	Pro	Ile	Gly	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Gln	153
	ACG	CTG	GGT	CCC	ATC	GGG	GTC	ACC	CTC	GCC	CTG	CTG	CCC	CTG	CTG	CTG	CAG	
496	Ala	Arg	Gly	Arg	Val	Ile	Asn	Ile	Thr	Ser	Val	Leu	Gly	Arg	Leu	Ala	Ala	170
	GCC	CGG	GGC	CGA	GTG	ATC	AAC	ATC	ACC	AGT	GTC	CTT	GGC	CGT	CTG	GCA	GCC	
547	Asn	Gly	Gly	Gly	Tyr	Cys	Val	Ser	Lys	Phe	Gly	Leu	Glu	Ala	Phe	Ser	Asp	187
	AAT	GGA	GGG	GGC	TAC	TGC	GTC	TCC	AAG	TTT	GGC	GTC	GAG	GCC	TTC	TCT	GAC	
598	Ser	Leu	Arg	Arg	<u>Asp</u>	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	<u>Pro</u>	<u>Phe</u>	<u>Gly</u>	<u>Val</u>	<u>Arg</u>	<u>Val</u>	<u>Ser</u>	<u>Ile</u>	<u>Val</u>	<u>Glu</u>	204
	AGC	CTG	AGG	CGA	GAT	GTG	GCT	CCT	TTT	GGG	GTA	CGG	GTC	TCT	ATC	GTG	GAA	
649	Pro	Gly	Phe	Phe	Arg	<u>Thr</u>	<u>Pro</u>	<u>Val</u>	<u>Thr</u>	<u>Asn</u>	<u>Leu</u>	<u>Glu</u>	<u>Thr</u>	<u>Leu</u>	<u>Glu</u>	<u>Asp</u>	<u>Thr</u>	221
	CCT	GGC	TTC	TTC	CGA	ACC	CCT	GTG	ACA	AAC	CTG	GAA	ACT	TTG	GAG	GAC	ACC	
700	<u>Leu</u>	<u>Gln</u>	<u>Ala</u>	Cys	Trp	Ala	Arg	Leu	Pro	Pro	Ala	Thr	Gln	Ala	Leu	Tyr	Gly	238
	CTG	CAG	GCC	TGC	TGG	GCA	CGG	CTG	CCT	CCA	GCC	ACA	CAG	GCC	CTC	TAT	GGG	
751	Glu	Ala	Phe	Leu	Thr	Lys	Tyr	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Arg	Ile	Met	Asn	Met	255
	GAG	GCC	TTC	CTC	ACC	AAA	TAC	CTG	AGA	GTG	CAG	CAA	CGT	ATC	ATG	AAC	ATG	
802	Ile	Cys	Asp	Pro	Asp	Leu	Ala	Lys	Val	Ser	Arg	Cys	Leu	Glu	His	Ala	Leu	272
	ATC	TGT	GAT	CCG	GAC	CTG	GCC	AAG	GTG	AGC	AGG	TGC	CTG	GAG	CAT	GCC	CTA	
853	Thr	Ala	Arg	His	Pro	Arg	Thr	Arg	<u>Tyr</u>	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	<u>Gly</u>	<u>Trp</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>	<u>Lys</u>	<u>Leu</u>	289
	ACT	GCC	CGT	CAC	CCC	AGA	ACC	CGC	TAC	AGC	CCA	GGC	TGG	GAT	GCC	AAG	CTG	
904	Leu	Trp	Leu	Pro	Ala	Ser	Tyr	Leu	Pro	Ala	Arg	<u>Leu</u>	<u>Val</u>	<u>Asp</u>	<u>Ala</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	306
	CTC	TGG	TTG	CCA	GCC	TCC	TAC	TTG	CCA	GCC	AGG	CTG	GTG	GAT	GCT	GTG	CTC	
955	<u>Ala</u>	<u>Trp</u>	<u>Val</u>	<u>Leu</u>	<u>Pro</u>	<u>Lys</u>	<u>Pro</u>	<u>Ala</u>	<u>Gln</u>	<u>Thr</u>	<u>Val</u>	<u>Tyr</u>	Stop	318				
	GCC	TGG	GTC	CTT	CCC	AAG	CCT	GCC	CAG	ACA	GTC	TAC	TAA	ATCCAGCCCTCCAGC				
1009	AAAAGATGGTTGTTCAAGGCAAGGACTCTGATTTATTCTGTCCCCTACCCTGGTACTGCCTGGTGTG																	
1076	TGGCATAAAACAGTCACTCAATAAATGTATTATTCAAACAAAAA																	

# 图 4

	1		50
p32	.....	.....MW	LPLLLGVLLW AALWLLDRQ
BDH	MMLAARLSRP	LSQLPGKALS	VCDRENGTRH TLLFYPASFS PDTRRTYTSQ
FABG	.....	.....	.....
EDH	.....	.....	.....
	51		100
p32	CLPASDAFIF	ITGCDSGFGF	LLALRFD... QRGFRMLASC L....TP...
BDH	ADAASGKAVL	VTGCDSGFGF	SLAKHLH... SKGFLMFAGC LLKEQGD...
FABG	.MNFEGKIAL	VTGASRGIGR	AIAETLA... ARGGKVIKTA ....TSE...
EDH	....ARTVVL	ITGCSSGIGL	HLAVRLASDP SQSFKVIYATL RDLKTQGRWL
	101		150
p32	SGAEDLQORVA	SSRLHTTLLD	VTDPQSIROA VKWVETHV.. GEAGLFGILVN
BDH	AGVRELDLKL	SDRLRTIQLN	MCNSEEVEKA VETVRSGLKD PEKGMWGLVN
FABG	NGAQAI SDYL	GANGKGLMLN	VTDPASIESV LEKIRAEFGE VDI....LVN
EDH	EAARALA.CP	PGSLETQLD	VRDSKSVAAA RERVTEGRVD V.....LVC
	151		200
p32	NAGVAGIIGP	TPWQTREDFQ	RVLNVNTLGP IGVTLALLPL LLQAR.GRVI
BDH	NAGIST.FGE	VEFTSMETYK	EVAEVLNWGT VRTTKSFLPL LRRAK.GRVV
FABG	NAGI.TRDNL	LMRMKDEEWN	DIETNLSSV FRLSKAVMRA MMKKRHGRII
EDH	NAGL.GLLGP	LEALGEDAVA	SVLDVNVVGT VRMLQAFLPD MKRRGSGRVL
	201		250
p32	NITSVLGRLA	ANG.GGYCVS	KFGLEAFSDS LRRDVAPFGV RVSIVEFGFF
BDH	NISSMLGRMA	NPARSPYCIT	KFGVEAFSDC LRYEMHPLGV KVSVVEFGNF
FABG	TIGSVVGTMG	NGGQANYAAA	KAGLIGFSKS LAREVASRGI TVNVVAFGFI
EDH	VTGSVGLMG	LPFNDVYCAS	KFALEGLCES LAVLLLPFGV HLSLIECGPV
	251		300
p32	..RT..PV..	TNLETLEDTL	QACWARL... .. PPATQALYGE
BDH	IAAT..SL..	YSPERIQAIA	KKMWDEL... .. PEVVRKDYGK
FABG	ETDMTRAL..	SDDQRAGILA	QVPAGRL... .. GGAQEIANAV
EDH	HTAFMEKVLG	SPEEVLDRTD	IHTFHRFYQY LAHSKQVFRE AAQNPEEVAE
	301		350
p32	AFLT KYLRVQ	QRIMMICDP	DLAKVSRCLE HALTARHPRT RYSPGWDACL
BDH	KYFDEKIAKM	ETYCN.SGST	DTSSVINAVT HALTAATPYT RYHPMDYYWW
FABG	AFLASDEAAY	ITGETLHVNG	GMYM..... ..
EDH	VFLTALRAPK	PTLRYFTTER	FLPLLRMLD DPSGSNYVTA MHREVF GDVP
	351		389
p32	LWLPA.SYLP	ARLVDAVLAW	VLPKPAQTVY .....
BDH	LRMQVMTHFP	GAISDKIYIH	.....
FABG	.....	.....	.....
EDH	AKAEAGAEAG	GGAGPGAED	AGRSVGDPE LGDPPAAPQ

图5

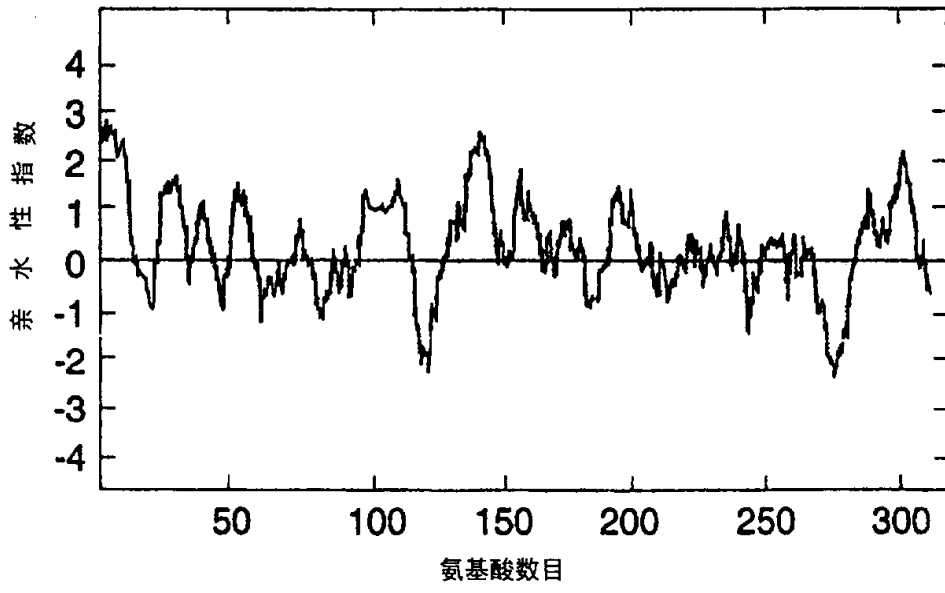


图6

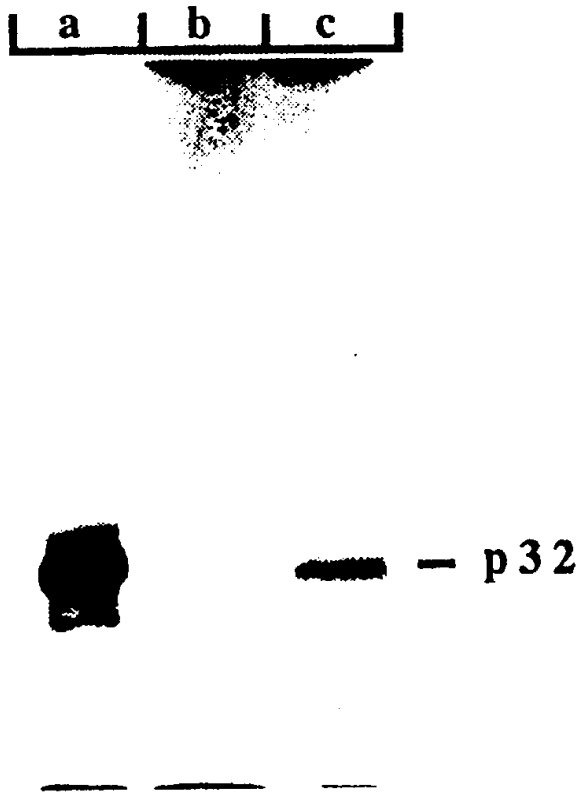


图7

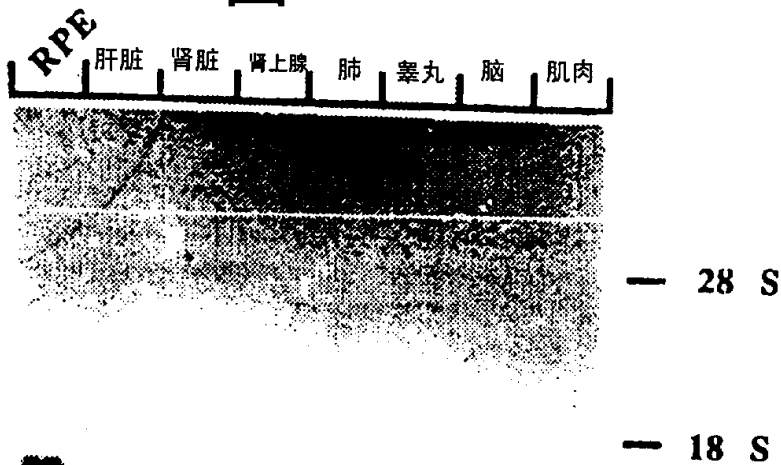
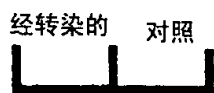


图8A



- p32

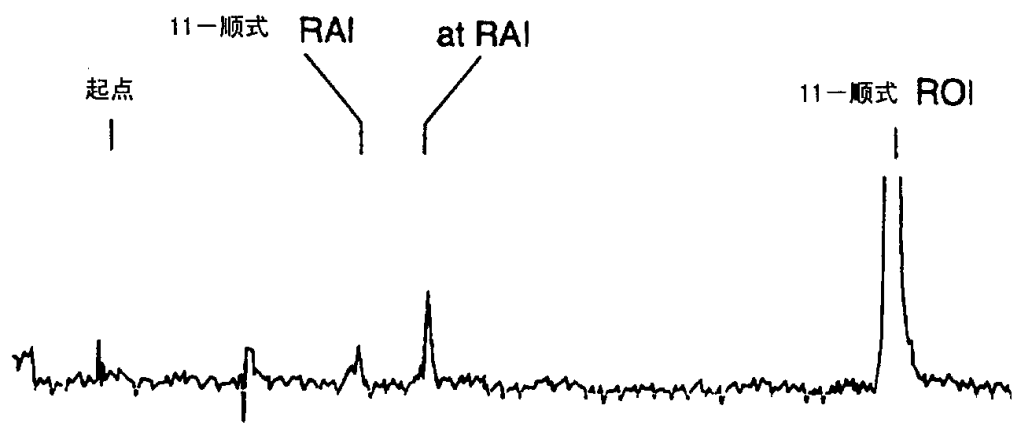


图8B

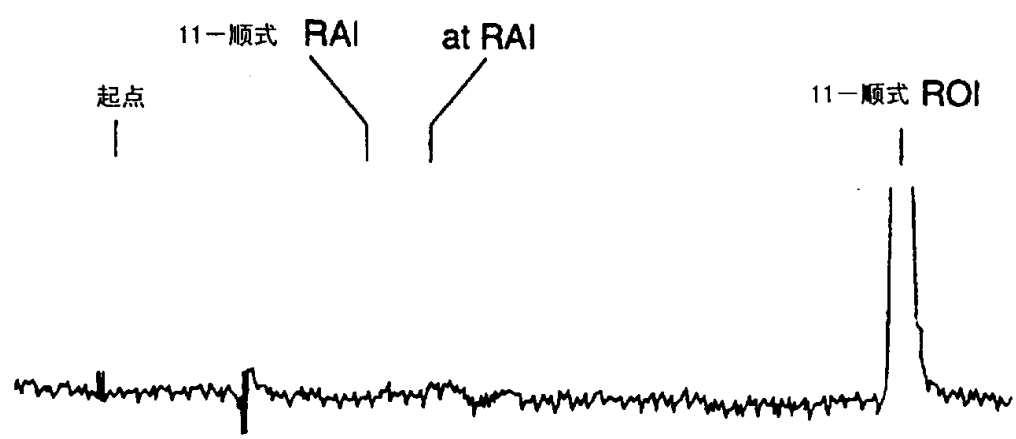


图8B

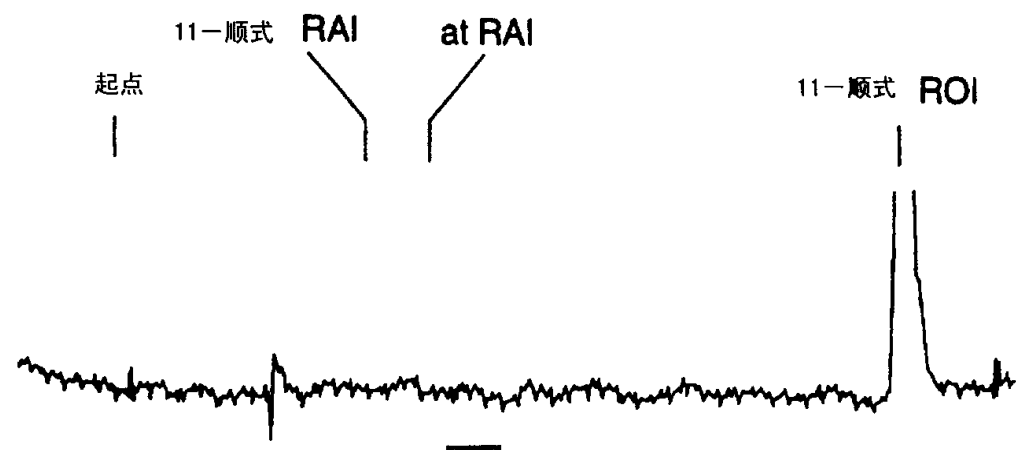


图8D

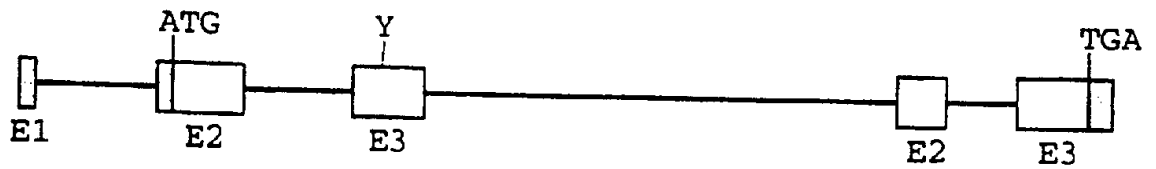


图9