



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112625141 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 202011595864.4

C07K 1/30 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.28

C07K 1/22 (2006.01)

(71) 申请人 昆明海关技术中心

地址 650034 云南省昆明市西山区广福路
359号

(72) 发明人 李旻

(74) 专利代理机构 北京知汇林知识产权代理事
务所(普通合伙) 11794

代理人 董涛

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

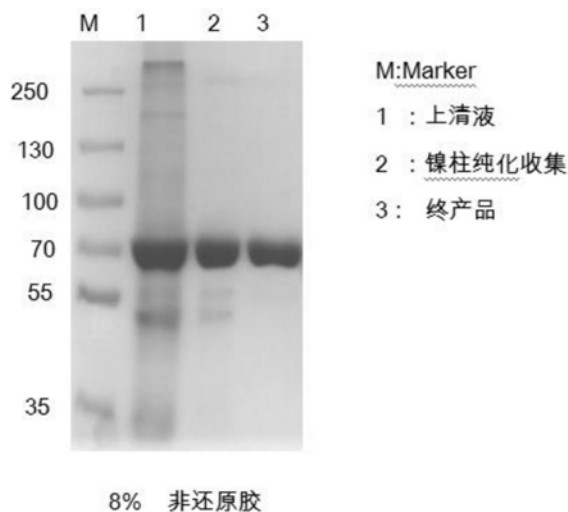
权利要求书1页 说明书4页
序列表7页 附图3页

(54) 发明名称

一种番茄斑萎属病毒的蛋白标准物质及其
应用

(57) 摘要

一种番茄斑萎属病毒的蛋白标准物质及其
应用,所述蛋白标准物质由如下步骤制得:先
获得用于番茄斑萎属病毒的全基因序列,根据序
列比较,再获取包含外壳蛋白基因和复制酶基因
的融合蛋白表达载体,即XXX-CR载体;然后将获
得外壳蛋白基因和复制酶基因的真核表达载体
转入293细胞株中,培养表达,采用冷冻低温冻
融,离心,纯化后,获得表达产物分子;接着进行
DNase I消化、纯化后,定量后获得外壳蛋白与复
制酶基因的融合表达蛋白标准物质。本发明物质
具有稳定性,无生物传染性,耐核糖核酸酶等特
性,在番茄斑萎属病毒的蛋白检测中作为标准物
质。



1. 一种番茄斑萎属病毒的蛋白标准物质,其特征在于,通过真核表达载体pcDNA3.1转入哺乳动物细胞293表达株中,经培养发酵获得表达产物分子,将获得的表达产物颗粒进行DNase I消化,离心弃沉淀,沉淀即是含有外壳蛋白和复制酶基因的表达产物,再经过His标签的亲纯化、分子筛纯化,获得含有所需组分的纯化组分,将最终纯化产物进行稀释,对融合蛋白产物进行OD值测定,依据OD值换算稀释产物,获得病毒外壳蛋白和复制酶基因融合表达的标准蛋白物质,所述pcDNA3.1-RP载体为包含番茄斑萎属病毒的外壳蛋白和复制酶融合蛋白的表达载体。

2. 根据权利要求1所述的蛋白标准物质,其特征在于,获取包含番茄斑萎属病毒的外壳蛋白和复制酶融合蛋白的表达载体,具体过程如下:

1) 根据复制酶基因序列,设计一对特异性引物,所述一对特异性引物为:

RdRp-F: 5' -ATGAACATCCAGAAAATACAAA-3'

RdRp-R: 5' -GACTTCAGATTTGATCTTTTGAG-3' ;

预期扩增产物为TSWV的复制酶蛋白N端约100氨基酸,即复制酶基因,并引入酶切位点BstXI;分别双酶切复制酶基因;

2) 根据外壳蛋白基因序列,设计一对特异性引物,所述一对特异性引物为:

CP-F: 5' -ATGTCTAAGGTTAAGCTCACTAAGGA-3'

CP-R: 5' -ACAGACAAAACCTGCAGAACTTGCT-3' ;

预期扩增产物为TSWV的外壳蛋白,即CP基因,并引入酶切位点:EcoRV,通过融合引物进行重叠PCR扩增,获得复制酶基因与外壳蛋白基因融合的DNA片段,并进行BstXI/EcoRV双酶切后回收纯化,

BstXI/EcoRV双酶切pcDNA3.1载体,并将CP基因和复制酶基因融合后连接到PET32a载体上,最终得到pcDNA3.1-RP载体;所述融合基因序列如序列表中SEQ ID NO.3所示。

3. 根据权利要求2所述的蛋白标准物质,其特征在于,用于病毒检测的外壳蛋白基因序列片段,如序列表中SEQ ID NO.1所示,所述基因为TSWV外壳蛋白基因中的一个片段。

4. 根据权利要求2所述的蛋白标准物质,其特征在于,用于病毒检测的复制酶基因序列片段,如序列表中SEQ ID NO.2所示,所述基因为TSWV复制酶基因中的一个片段。

5. 根据权利要求1所述的蛋白标准物质,其特征在于,表达产物分子进行DNase I消化,然后离心弃沉淀,保留上清;加入终浓度50%饱和硫酸铵,沉淀表达产物,离心弃上清,获得沉淀即是含有外壳蛋白和复制酶基因的表达产物,最后用PBS溶液重悬,获得含有所需粗体组分,将获得含有表达产物分子的溶液进行His标签的亲纯化,经Ni-NTA凝胶介质结合目的蛋白后,用100mM咪唑洗脱所需组分,获得含有所需组分的纯化组分。

6. 根据权利要求1所述的蛋白标准物质,其特征在于,所述分子筛纯化为经葡聚糖凝胶介质筛选目的蛋白后,用保存缓冲液换液所需组分,获得含有所需组分的纯化组分,保存缓冲液为20mM Tris、0.1M NaCl、pH8.0。

一种番茄斑萎属病毒的蛋白标准物质及其应用

技术领域

[0001] 本申请涉及蛋白标准物质领域,具体而言,涉及本发明涉及一种番茄斑萎属病毒的蛋白标准物质及其应用。

背景技术

[0002] 番茄斑萎病毒属是一类值得关注的植物病毒。病毒种类或分离物不断增加,寄主范围也在不断扩大,仅TSWV就能侵染1090种植物,涉及到番茄、辣椒、莴苣等蔬菜作物,花生、豌豆、烟草等重要经济作物及菊花、马蹄莲等许多花卉作物。该属病毒分布于亚洲和美洲大部分地区。造成的危害轻者减产,重者绝收,引起的巨大经济损失已被列为世界危害最大的十种植物病毒之一。番茄斑萎病毒属是近年来对我国蔬菜水果等生产危害上升的一类病毒,这类病毒也是国际上植物检疫比较重视的病毒。这类病毒种类繁多,基因组数据缺乏,亲缘关系复杂,对检测方法的准确性提出了极高的要求,这就需要检测实验室储备有检测用的阳性质控。本项目将通过体外转录的方式获得可用作分子生物学检测阳性质控RNA,旨在研究确定这类阳性质控的保存方式、保存条件和运输要求等,为今后病毒分子检测阳性质控的制备进行基础数据的储备,也为促进这一类病毒的检测提供有效准确的阳性质控。目前国内尚无相同类型的阳性质控提供,本项目研发这一类阳性质控可以弥补国内服务的缺失,也可以降低从国外购外的成本,同时由于这类阳性质控丧失侵染活性,也降低了有害生物引进带来的风险。

[0003] 分子生物学检测是病毒检测中必不可少的组成部分,然而检测的阳性质控却是难以获得,对方法的验证和检测的开展都极为不利。目前,实验室和研究机构想要获得植物病毒的标准样品主要有三个途径:通过从国际权威或著名生物标准品中心进行购买,比如美国标准省物品收藏中心、英国国家生物制品鉴定所和德国微生物菌种包藏中心等;与在研究刊物上发表研究文献的实验室联系索取而获得;购买商业试剂盒所配备的阳性对照,但多为血清学方法的对照。由于获得植物病毒分离物的来源信息少,本地扩繁和保存难度大,且毒株多为活体或是冷冻保存,都存在运输周期长,费用高、保存难等问题,加上检疫性植物病毒进口手续繁琐,因此想要收集病毒的阳性质控极为困难。分子生物学检测需要的仅为病毒基因组,较活性病毒的要求降低,通过基因工程的方法易获得大量的分子拷贝,较接种寄主植物等传统活性病毒繁殖的环境要求和周期都大大降低,因此均有开展的便利性。国内已有动物病毒分子生物学检测阳性质控的研发,如水中轮状病毒实时定量PCR阳性质控构建的研究,但在植物病毒领域,尤其是植物检疫病毒,都缺乏相关研究的报道和产品的面世。

发明内容

[0004] 为了填补目前产品的空白和满足植物检验检疫的需要,本发明旨在开发能够适用于番茄斑萎属病毒主要病毒分子生物学检测的阳性质控。该物质具有稳定性,无生物传染性,耐核糖核酸酶等特性,可最大程度检测病毒组分以及病毒粒子结构。

[0005] 一种番茄斑萎属病毒的蛋白标准物质,通过真核表达载体pcDNA3.1转入哺乳动物细胞293表达株中,经培养发酵获得表达产物分子,将获得的表达产物颗粒进行DNase I消化,离心弃沉淀,沉淀即是含有外壳蛋白和复制酶基因的表达产物,再经过His标签的亲纯化、分子筛纯化,获得含有所需组分的纯化组分,将最终纯化产物进行稀释,对融合蛋白产物进行OD值测定,依据OD值换算稀释产物,获得病毒外壳蛋白和复制酶基因融合表达的标准蛋白物质,所述pcDNA3.1-RP载体为包含番茄斑萎属病毒的外壳蛋白和复制酶融合蛋白的表达载体。

[0006] 获取包含番茄斑萎属病毒的外壳蛋白和复制酶融合蛋白的表达载体,具体过程如下:

[0007] 1) 根据复制酶基因序列,设计一对特异性引物,所述一对特异性引物为:

[0008] RdRp-F:5' -ATGAACATCCAGAAAATACAAA-3'

[0009] RdRp-R:5' -GACTTCAGATTTGATCTTTTGGAG-3' ;

[0010] 预期扩增产物为TSWV的复制酶蛋白N端约100氨基酸,即复制酶基因,并引入酶切位点BstXI;分别双酶切复制酶基因;

[0011] 2) 根据外壳蛋白基因序列,设计一对特异性引物,所述一对特异性引物为:

[0012] CP-F:5' -ATGTCTAAGGTTAAGCTCACTAAGGA-3'

[0013] CP-R:5' -ACAGACAAAACCTGCAGAACTTGCT-3' ;

[0014] 预期扩增产物为TSWV的外壳蛋白,即CP基因,并引入酶切位点:EcoRV,通过融合引物进行重叠PCR扩增,获得复制酶基因与外壳蛋白基因融合 DNA 片段,并进行BstXI/EcoRV双酶切后回收纯化,

[0015] BstXI/EcoRV双酶切pcDNA3.1载体,并将CP基因和复制酶基因融合后连接到PET32a载体上,最终得到pcDNA3.1-RP载体;所述融合基因序列如序列表中SEQ ID NO.3所示。

[0016] 用于病毒检测的外壳蛋白基因序列片段,如序列表中SEQ ID NO.1所示,所述基因为TSWV外壳蛋白基因中的一个片段。

[0017] 用于病毒检测的复制酶基因序列片段,如序列表中SEQ ID NO.2所示,所述基因为TSWV复制酶基因中的一个片段。

[0018] 表达产物分子进行DNase I消化,然后离心弃沉淀,保留上清;加入终浓度50%饱和硫酸铵,沉淀表达产物,离心弃上清,获得沉淀即是含有外壳蛋白和复制酶基因的表达产物,最后用PBS溶液重悬,获得含有所需粗体组分,将获得含有表达产物分子的溶液进行His标签的亲纯化,经Ni-NTA凝胶介质结合目的蛋白后,用100mM咪唑洗脱所需组分,获得含有所需组分的纯化组分。

[0019] 所述分子筛纯化为经葡聚糖凝胶介质筛选目的蛋白后,用保存缓冲液换液所需组分,获得含有所需组分的纯化组分,保存缓冲液为20mM Tris、0.1M NaCl、pH8.0。

[0020] 本发明具有如下优点:

[0021] (1) 目前,实验室和研究机构想要获得斑萎病毒属病毒的标准样品主要有三个途径:通过从国际权威或著名生物标准品中心进行购买,与在研究刊物上发表研究文献的实验室联系索取而获得;购买商业试剂盒所配备的阳性对照。由于获得植物病毒分离物的来源信息少,本地扩繁和保存难度大,且毒株多为活体或是冷冻保存,都存在运输周期长,费

用高、保存难等问题,加上检疫性植物病毒进口手续繁琐,因此想要收集病毒的阳性质控极为困难。本发明提供一种番茄斑萎属病毒的蛋白标准物质及其应用,可以解决上述难题。

[0022] (2) 采用病毒外壳蛋白与复制酶基因融合表达的策略,可以同时检测病毒两个基因组分,具有精确性和广谱性。

[0023] (3) 采用哺乳动物细胞系表达蛋白,与多采用的原核生物表达系统相比,表达产物具有空间折叠准确,蛋白修饰完整等特性。

[0024] (4) 本发明利用多步骤的蛋白纯化方法,首先用饱和硫酸铵对标准物质进行提纯。硫酸铵溶解度大、温度系数小且不易是蛋白质变性,用它对标准物质进行沉析,并可以进一步去除DNA核酸的干扰。

[0025] (5) 本发明的标准物质只含有病毒外壳蛋白和复制酶蛋白,不含有病毒的核酸,因此该标准物质无传染性,无病毒特性,易于存储与运输。

附图说明

[0026] 此处所说明的附图用来提供对本申请的进一步理解,构成本申请的一部分,本申请的示意性实施例及其说明用于解释本申请,并不构成对本申请的不当限定。在附图中:

[0027] 图1.用于真核生物表达的载体图。

[0028] 图2.本发明所示融合蛋白的结构。

[0029] 图3.本发明组分在293细胞中的表达检测。

[0030] 图4.分子筛纯化峰图。

[0031] 图5.最终纯化产物的蛋白电泳图。

具体实施方式

[0032] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。以下对至少一个示例性实施例的描述实际上仅仅是说明性的,决不作为对本发明及其应用或使用的任何限制。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0033] 实施例一、TSWV病毒外壳蛋白与复制酶基因的融合

[0034] 选取的外壳蛋白基因以及复制酶基因特定区域,用特异引物扩增,

[0035] RdRp-F:5' -ATGAACATCCAGAAAATACAAA-3' 和

[0036] RdRp-R:5' -GACTTCAGATTTGATCTTTTGAG-3' ;

[0037] CP-F:5' -ATGTCTAAGGTTAAGCTCACTAAGGA-3' 和

[0038] CP-R:5' -ACAGACAAAACCTGCAGAACTTGCT-3' 获得复制酶基因片段和外壳蛋白基因全长,按图2所示结构,设计融合蛋白引物,

[0039] RdRp-R:5' -CTCGCTGCCGCTAGAACCACCAGAAGAACCACCAGAGACTTCAGATTTGATCTTTTGAG-3' 和

[0040] CP-F:5' -TCTGGTGGTTCTTCTGGTGGTTCTAGCGGCAGCGAGATGTCTAAGGTTAAGCTCACTAAGGA-3-进行通过蛋白

[0041] linker (SGSSGGSSGSE) 进行连接,其中画线序列蛋白Linker序列。

[0042] 并用RdRp RdRp-F:5'-ATGGGTCATCATCACCATCACCATATGAACATCCAGAAAATACAAA-3'引入His Tag序列。

[0043] 采用相同方法,获得复制酶基因与外壳蛋白融合的不同结构,包括RdRp-Liner-CP,CP-Linker-RdRp,CP-Linker-RdRp-Linker-CP等。

[0044] 实施例二、融合蛋白的制备

[0045] 将表达载体转入293细胞系,经过培养发酵后,收集细胞,按照方法,破碎细胞,离心获得含表达产物的上清。

[0046] 实施例三、标准物质的检测

[0047] 将实施例1获取的标准物质经紫外分光光度计测定,依据OD值换算出标准物质病毒数值,测定出初始浓度病毒80次方,

[0048] 证明利用该标准物质可用于TSWV的定量分析。

[0049] 以上仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 昆明海关技术中心

<120> 一种番茄斑萎属病毒的蛋白标准物质及其应用

<141> 2020-12-23

<160> 3

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 777

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

```

atgtctaagg ttaagctcac taaggaaaac attgttgctt tgttgacaca aggcaaagat 60
cttgaatttg aagaagatca gaatctggtg gcatttaact tcaagacttt ttgtctggaa 120
aaccttgacc agatcaagaa gatgagcatt atttcatgtc tgacattcct gaagaatcgt 180
cagagtatag tgaaggttat taagcaaagt gattttactt ttggcaaaat cactataaag 240
aaaacttcag acaggattgg agccactgac atgaccttca gaaggcttga tagcttgatc 300
agggtcaggc ttgtcgagga aactgggaat tctgagaacc tcaatactat caaatctaag 360
attgcttctc accctctgat tcaagcctat ggattacctc ttgatgatgc aaagtctgtg 420
aggcttgcca taatgctggg aggtagctta cctcttattg cttcagttga tagctttgag 480
atgatcagtg ttgtcttggc tatatatcag gatgcaaaat acaaagacct cgggatcgat 540
ccaaagaagt atgacaccag ggaagcctta ggaaaagttt gactgtgct aaaaagcaaa 600
gcatttgaaa tgaatgaaga tcaggtgaag aaagggaaag agtatgctgc tatacttagc 660
tccagcaatc ctaatgctaa aggaagtatt gctatggaac attacagtga aactcttaac 720
aagttctatg aaatgttcgg ggttaaaaaa cagacaaaac ttgcagaact tgcttaa 777

```

<210> 2

<211> 8637

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

```

atgaacatcc agaaaataca aaaattaata gagaatggaa ctactttatt gttatctatt 60
gaggattgtg taggttctaa tcacgaccta gctttggatt tacataagag aaatagtgat 120
gagatcccag aagatgtgat tattaataat aatgcaaaaa attatgagac gatgagagag 180
ttaattgtca aaatcaactgc tgatggagaa ggactaaaca aagggatggc aactgtagac 240
gtcaagaagt taagtgatg ggtttctctg tttgagcaaa aatacctaga aacagagtta 300
gcaaggcatg atatTTTTGG agagctgac tccaggcacc tgagaataaa gcccaaaca 360
agaagtgaag tggagataga gcatgcgctc agagaatatac tggatgaact taacaaaaag 420
tctgcatta ataagctctc tgatgatgag tttgagagaa taaataaaga atatgtggca 480
actaacgcca cacctgacaa ctatgtgata tataaagaat caaaaaacag tgagctttgt 540

```

ttaatcattt atgattggaa aatatctgtc gatgccagga cagaaactaa acaatggaga 600
aatacctaca aaaatatctg gaaatctttc aaagatataa aagtgaatgg aaagccattc 660
ctggaagatc accctgtttt cgtttctata gttatattga aacctattgc tgggatgccca 720
atcactgtta ctagcagcag ggttttggag aaatttgaag attctccatc agcattgcat 780
ggagaaagaa taaagcatgc tagaaatgcc aaattgctaa atatttctca tgttgggcaa 840
atagttggaa ccacaccac agtggtgaga aactattatg caaacactca aaagatcaaa 900
tctgaagtca gaggaatact aggtgatgat tttggatcta aagatgtgtt ttttagtcac 960
tgaccagca aatacaaaaga aagaaatcct actgaaatag cctattctga agatattgaa 1020
agaataattg attcacttgt tacagatgaa ataactaaag aggaaataat acattttttg 1080
tttggaaatt tctgtttcca cattgaaaca atgaatgacc agcatatcgc tgacgaattt 1140
agagggtacc aaaactcttg tatcaattta aaaatagagc caaaagttga tttagctgat 1200
ttgaaggacc acttaatcca gaagcagcaa atatgggaat ctctgtatgg gaaacatctt 1260
gagaaaaatca tgcttagaat tagagggaaa aagaaaaag aaaaagaaat acctgacata 1320
accacagctt ttaaccagaa tgctgctgaa tatgaagaaa agtacccaa ctgttttaca 1380
aatgatctct ctgaaactaa aactaacttt tctatgactt ggtcccaag ttttgaaaa 1440
atagaattga gctcagaggt agattacaac aacgcaatta taaacaagtt tcgggaaagc 1500
ttcaaaagtt cttcaagggt tatttataat ggcccatata gtagcataaa taaccaaaca 1560
aataaagcaa gagatataac aaacttagtt agactgtgtt taacagagct aagttgtgat 1620
acaacaaaaa tggaaaagca ggagcttgag gatgaaatag atataaacac tgggagtatt 1680
aaagttgaga gaacaaaaaa atctaaagaa tggaataagc aggttctgtg ttttaaccagg 1740
aacaaaaatg aattttgcat gaaagagaca ggcagggaga acaaaactat ctatttttaa 1800
ggcttagcag taatgaatat agaatgagt tctaaaaaa gaattctaaa aaaagaagaa 1860
ataaaagaga ggatttctaa aggcttggaa tatgatacct ctgaaaggca ggctgacca 1920
aatgatgatt attcaagtat agacatgtca tctctgactc atatgaaaa actgataaga 1980
catgacaacg aggatagctt aagctggtgt gaaaggatta aggactctt tttgttctt 2040
cataatggtg atataagaga ggaaggcaag atcacatctg tttacaataa ttatgctaaa 2100
aatcctgaat gctgtacat tcaagattca gtactgaaaa ctgaattaga gacttgcaaa 2160
aagataaaca aattatgcaa tgacctagcc atttaccatt actctgaaga catgatgcaa 2220
ttctccaaag gtttaattgt ggctgacagg tacatgacca aagaaagttt caaaacta 2280
accacagcaa atacgagcat gatgctattg gcattcaaag gagatggaat gaacaccgga 2340
ggatcaggag ttcttacat agcattgcat atagtggatg aagacatgtc agatcaattt 2400
aacatatgtt aactaaaaga aatttatagc tatttccgaa atggtagtaa ttacatttat 2460
ataatgagac cacagagact caatcaggtg aggctgctaa gccttttcaa aacgcctagt 2520
aaagttcctg tatgttttgc acaattttca aagaaagcta acgaaatgga aaaatggctg 2580
aaaaacaaag atatagaaaa agtaaatgtc ttttctatga caatgactgt aaaacagata 2640
ttaataaata ttgtgttttc atctgtcatg ataggaactg tgacaaagct cagcaggatg 2700
ggaatttttg acttcatgcg gtatgcaggt tttttgccac tgtctgatta ttctaata 2760
aaagagtaca ttagagacaa atttgatcct gatataacca actgtggcag atatctattt 2820
cgtaatggaa tcaaaaagct attgttcaga atggaagatc tcaatttaag cacaaatgcc 2880

aagcctgttg ttgtagatca cgaaaatgat attataggag ggataacaga cttgaatata 2940
aaatgtccaa taacaggatc aactctactg actcttgagg atttgtataa taatgtctat 3000
ttggctattht acatgatgcc taaatcattg cacaatcacg ttcacaatct aacaagcttg 3060
ttaaagtcc ctgctgagtg ggagctaaag ttcagaaaag agttaggttt caacatatht 3120
gaggacatat accctaagaa agcaatgttt gatgacaaag acctattctc tataaatgga 3180
gctttgaacg tgaagcatt atctgattac tatctaggaa atatagaaa tgtgggtttg 3240
atgagatcag aaatagaaaa taaagaagat tttctaagcc cttgttataa aatatctact 3300
ttaaagtctt caaaaaaatg ctgcagtc aacattataa gtactgatga gacaatagag 3360
tgtctccaga atgcaaagat ccaagatata gaaaattgga aaggaaataa cctggccatt 3420
ataaaagggc ttataagaac ctacaatgag gagaaaaaca gattggtgga atthtttgaa 3480
gataattgtg tcaattcact gtatcttgta gaaaagctta aagagataat taatagtgga 3540
tcaataactg tagggaaatc cgtaacatct aaatttataa gaaataacca tcttttaaca 3600
gtagaacat atctcaaaac aaaactatat tatagaata atgtgactgt tttaaagtct 3660
aaaaagtat cagaggagct ttatgacctt gtaaacagt ttcataacat gatggaaata 3720
gacttagatt ctgttatgaa ccttgggaaa ggtacagaag gaaaaaaca cacattcttg 3780
cagatgcttg aatttgtcat gtccaaagct aaaaatgtca ccgggtctgt agathttcta 3840
gtttctgttt ttgaaaaaat gcagagaacc aaacagaca gagaaatata cttgatgagt 3900
atgaaagtga aaatgatgct ttathttata gagcacacat tcaaacatgt tgcgcagagt 3960
gatccatcag aagccatata tataagtgga gacaataaaa taaggcact ttctacatta 4020
tctttggaca caatcacgct ttacaacgac atthtaaca aaaattcaaa gaagtcaaga 4080
ttggctttcc tgtctgctga tcaatcgaat tggtcgcat cagacctac ctataaatat 4140
gttttagcta tcatatthaa tccaatttht actactggtg aagctagttt aatgatagaa 4200
tgtathttta tgtatgttht attgaagaag gttgtatata caacagatat thttttgaa 4260
ctaagaaaag ctcaaggaac tttcgggcaa atgaaactg ccataggact tttgactaaa 4320
ggtttgacga caaacacata ccctgttagc atgaaactgt tacaaggcaa thtaaatat 4380
ctgtcttctg thtatcattc ttgtgcaatg aaagcttata acaagactth agaatgctac 4440
aaagactgtg atthccaaac tagatggatt gtgactctg atgataatgc gacatcattg 4500
atagccagtg gagaggtcga taaaatgcta acagacttht caagctcata tctgccagaa 4560
atgttgthta gaagcattga agctcattc aaaagcttht gcataactth gaaccctaaa 4620
aagagthtat ctthctcact agaagtagag thtatatctg aaagaattg thaatggagc 4680
aathattcct ctctattgca gacathtagc aaathgttg acagaatctt cacatataag 4740
thathtgatg atctaatgct actaagtata catgttacga tgctthctgag aaaaggctgt 4800
cctaatgaag thatacctth tgcttatggg gctgtacagg tacaagcatt aagcatctat 4860
tcaatgctc ctggtgaagt gaatgatagc atcagaatth ttaagaagct tggagthaag 4920
thaaagtcaa acgagattcc cacaacatg ggggctggt tgactthctc tatagagcca 4980
thgtctatat taggtccatc atcgaatgat caatcactc attacaatgt gataagagat 5040
thtttgaaaca aaaaagtht agaggaagta aaagatagcg tctthcttc cagctatcta 5100
cagatgagat tcagagagct aaaaggaaag tatgaaaag gaactctgga gaaaaagat 5160
aaaaagatga ththcttat caatctgtht gagaaagcat cagtgtctga agathcagac 5220

gttctaacaa tcgggatgaa atttcaaact atgttaactc agattataaa attgcccatt 5280
tttataaatg agaatgcttt aaacaagatg tcaagttata aagatttttc aaaactttac 5340
cctaatttga aaaagaatga agatttatat aaaagtacta agaacttaaa gatagacgag 5400
gatgctattt tagaggaaga tgagttatat gagaagattg catctagctt agaaatggaa 5460
tctgttcatg acataatgat aaaaaatcct gaaacaattc tgatagcacc attgaatgat 5520
agagattttt tacttagtca gctgttcatg tacacaagcc cttctaaaag gaatcagtta 5580
tctaaccaat ctacagagaa acttgctttg gatagagtat taaggtcgaa agctagaaca 5640
ttttagacaa tttcttccac tgtgaagatg acttatgaag aaaacatgga aaagaaaatc 5700
ttggaaatgc taaaatttga ttttagattca tattgttcat ttaaacatg tgtaaacta 5760
gtgatcaagg atgttaattt cagcatgctg attccaatat tggattctgc atacccttgt 5820
gaatctagga aaagagataa ctacaatttc aggtggtttc agactgagaa gtggatacct 5880
gttgttgaag gctctccggg attagtggta atgcatgctg tctatggatc aaattatata 5940
gaaaatttag gtttaaaaaa catccttcta acagacgata gcattaatgt tttacaagc 6000
acgtttggaa caggtttaat catggaggat gtaaaatcct tagttaaagg caaagacagc 6060
ttcgaacacag aggtttcag caattctaac gaatgtcaaa gattggtgaa agcatgcaat 6120
tatatgatag cagcacaana caggctttta gcaattaaca catgctttac taggaaaagc 6180
ttccccttct attctaaatt caacctaggg agagggttta tctcaaacac attagctctc 6240
ttatccacca tctacagtaa agaagaatcc tatcattttg tttctacagc tagttataaa 6300
ttagacaaaa ctattagaac tgtgataagt gctcagcaag atatgaactt agagaaaata 6360
ctggacactg ctgtatacat atcagataaa ttgcagtcac ttttccaac aattacaaga 6420
gaggatatag ttttgatatt gcaaaatgtg tgccatagaca gcaaacctat atggcagagt 6480
ctagaagaca aaatgaaaaa gattaacaat tcaacagcaa gcggttcac agtgtcaaat 6540
gtgattctgc cacataacag tgaattgaac acaatccaga acaaattgt ctggatgtgg 6600
aacatgggtt tatgttctca tagaacatta gatthttgta tcaggtatat taggagaagt 6660
gatgtaagat atgtgaaaac tgaagaaca gacgaatcac gaaattatat ctctggaact 6720
atgtacaaaa tcgggatcat gacaagaagc tgttatgttc aattgatagc atctgatcaa 6780
gatgtagcag tttctttgag gacaccattt gagatattga atgaaagaga ttatcttttt 6840
gacacataca gagaaagtat agagaaatta ttgcagaaat ttatgtttga taaagtgaac 6900
ataataaatc aaacaaccac agattgtttt ctagaacca ggagatgctg catcagaatg 6960
accacagaca acaagatgat tgtaaagggtt aatgccat caagacaaat aagactagag 7020
aatgtgaaat tagttgtgaa gataaaatat gaaaacgtga actccgatgt gtgggatatt 7080
atagaaaagc aaaaatctct agtcttaagg ctccctgaag taggggaatg tttctctgat 7140
atgtacaaaa ctgcagactc tgaaactgaa acaatcaaaa ccataaaaa caggcttatg 7200
acttctttaa ctttcataga agcctttgga acctatcac agcagatcaa agagatcgtg 7260
gatgatgata tcagagaaac gatggatgaa ttcttaatga acatccggga tacctgctta 7320
gaaggtttg aaaactgcaa aagtgtggaa gaatatgata gctatcttga tgaaaatggg 7380
tttaaatgata cagtagaact attcgaaaac ttgttaagaa cacatgacaa ctttgcaaat 7440
gagtatagtc ctctgttttc agagattgtt gacaaagcaa aacagtatac tagagattta 7500
gaaggtttca aagaaact gctcatgctt aaatattctt tgataaatga tgcatcagga 7560

tttaaaagct atagagccac tggaatgcat gctgtcgaac taatggcaaa aaagcacata 7620
 gagatagggg aattcaactt gctaggaatg atccaactga ttaaagcttg cgaacatgc 7680
 cacaacaatg actctatatt aaacttagca agtttgagga atgttcttag caggacatat 7740
 gccacatttg ggagaagaat aagattgaat catgatctgg atttgcaaaa taacttgatg 7800
 gaaaaaagtt atgatttcaa gacactgggtt ttaccagaaa taaaattatc agaactatca 7860
 aggagatatac taaaagagaa tgggtttggtt atatctggag agaactctaaa aatggatagg 7920
 tctgatgaag aatttgaagg tcttgccagt tttaatgtgt tgaggctaga tgaggaagaa 7980
 atgtatgaag gtttgatcaa agaaatgaag attaaaagaa aaaagaaagg gtctttattc 8040
 ccggcaaata cacttttact aagtgagttg ataaagttct tgattggagg gataaaggga 8100
 accagttttg atatagagac attgttgagg aatagtttta gaccagacat attttcaact 8160
 gacagactgg gcagattaag ttccagtgt cctgcactca aagtttatgc aactgtttat 8220
 atggaatata agaattgcaa ttgtccttta aatgagatag ctgacagctt agaaggttat 8280
 ctaaaaactga caaaaagcaa gtctaaggag catttcttat ctggaagagt taagaaagct 8340
 ttgatacaat taagagatga acaatcgca actaaaaac tagaggctta taaagatatac 8400
 gcaaatttcc tttctagca cccattatgc ttatcagaaa aacattgta tggaagatac 8460
 acttactctg atatcaatga ttatatcatg caaacaagag agattatddd gagtaaaata 8520
 agtgtgttgg atgaggttgt tgaacacagat gaagacaatt tcttgcttag ttatctaaga 8580
 ggggaagaag atgccttga cgaagatgat tctgatgaag aagaagacac ggattaa 8637

<210> 3

<211> 581

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 3

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

Arg Ser Glu Val Glu Ile Glu His Ala Leu Arg Glu Tyr Leu Asp Glu
 130 135 140
 Leu Asn Lys Lys Ser Cys Ile Asn Lys Leu Ser Asp Asp Glu Phe Glu
 145 150 155 160
 Arg Ile Asn Lys Glu Tyr Val Ala Thr Asn Ala Thr Pro Asp Asn Tyr
 165 170 175
 Val Ile Tyr Lys Glu Ser Lys Asn Ser Glu Leu Cys Leu Ile Ile Tyr
 180 185 190
 Asp Trp Lys Ile Ser Val Asp Ala Arg Thr Glu Thr Lys Gln Trp Arg
 195 200 205
 Asn Thr Tyr Lys Asn Ile Trp Lys Ser Phe Lys Asp Ile Lys Val Asn
 210 215 220
 Gly Lys Pro Phe Leu Glu Asp His Pro Val Phe Val Ser Ile Val Ile
 225 230 235 240
 Leu Lys Pro Ile Ala Gly Met Pro Ile Thr Val Thr Ser Ser Arg Val
 245 250 255
 Leu Glu Lys Phe Glu Asp Ser Pro Ser Ala Leu His Gly Glu Arg Ile
 260 265 270
 Lys His Ala Arg Asn Ala Lys Leu Leu Asn Ile Ser His Val Gly Gln
 275 280 285
 Ile Val Gly Thr Thr Pro Thr Val Val Arg Asn Tyr Tyr Ala Asn Thr
 290 295 300
 Gln Lys Ile Lys Ser Glu Val Ser Gly Gly Ser Ser Gly Gly Ser Ser
 305 310 315 320
 Gly Ser Glu Met Ser Lys Val Lys Leu Thr Lys Glu Asn Ile Val Ala
 325 330 335
 Leu Leu Thr Gln Gly Lys Asp Leu Glu Phe Glu Glu Asp Gln Asn Leu
 340 345 350
 Val Ala Phe Asn Phe Lys Thr Phe Cys Leu Glu Asn Leu Asp Gln Ile
 355 360 365
 Lys Lys Met Ser Ile Ile Ser Cys Leu Thr Phe Leu Lys Asn Arg Gln
 370 375 380
 Ser Ile Val Lys Val Ile Lys Gln Ser Asp Phe Thr Phe Gly Lys Ile
 385 390 395 400
 Thr Ile Lys Lys Thr Ser Asp Arg Ile Gly Ala Thr Asp Met Thr Phe
 405 410 415
 Arg Arg Leu Asp Ser Leu Ile Arg Val Arg Leu Val Glu Glu Thr Gly
 420 425 430
 Asn Ser Glu Asn Leu Asn Thr Ile Lys Ser Lys Ile Ala Ser His Pro

| | | |
|-------------------------|-------------------------|---------------------|
| 435 | 440 | 445 |
| Leu Ile Gln Ala Tyr Gly | Leu Pro Leu Asp Asp | Ala Lys Ser Val Arg |
| 450 | 455 | 460 |
| Leu Ala Ile Met Leu Gly | Gly Ser Leu Pro Leu | Ile Ala Ser Val Asp |
| 465 | 470 | 475 |
| Ser Phe Glu Met Ile Ser | Val Val Leu Ala Ile Tyr | Gln Asp Ala Lys |
| 485 | 490 | 495 |
| Tyr Lys Asp Leu Gly Ile | Asp Pro Lys Lys Tyr Asp | Thr Arg Glu Ala |
| 500 | 505 | 510 |
| Leu Gly Lys Val Cys Thr | Val Leu Lys Ser Lys Ala | Phe Glu Met Asn |
| 515 | 520 | 525 |
| Glu Asp Gln Val Lys Lys | Gly Lys Glu Tyr Ala Ala | Ile Leu Ser Ser |
| 530 | 535 | 540 |
| Ser Asn Pro Asn Ala Lys | Gly Ser Ile Ala Met Glu | His Tyr Ser Glu |
| 545 | 550 | 555 |
| Thr Leu Asn Lys Phe Tyr | Glu Met Phe Gly Val Lys | Lys Lys Gln Thr Lys |
| 565 | 570 | 575 |
| Leu Ala Glu Leu Ala | | |
| 580 | | |

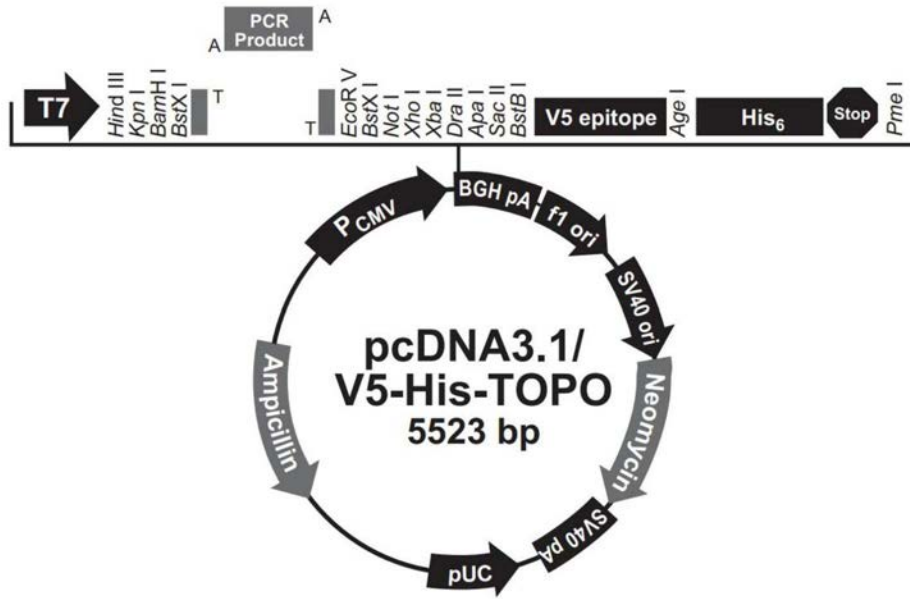


图1



图2

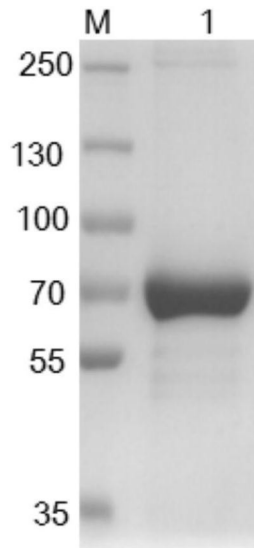


图3

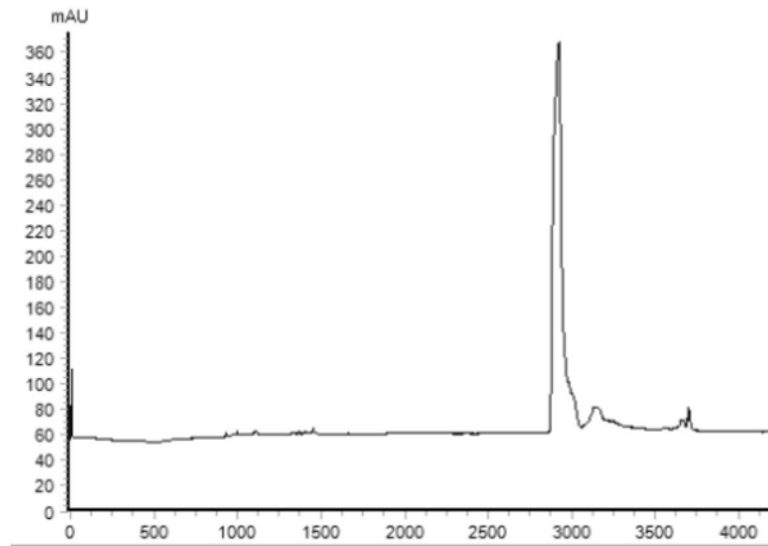


图4

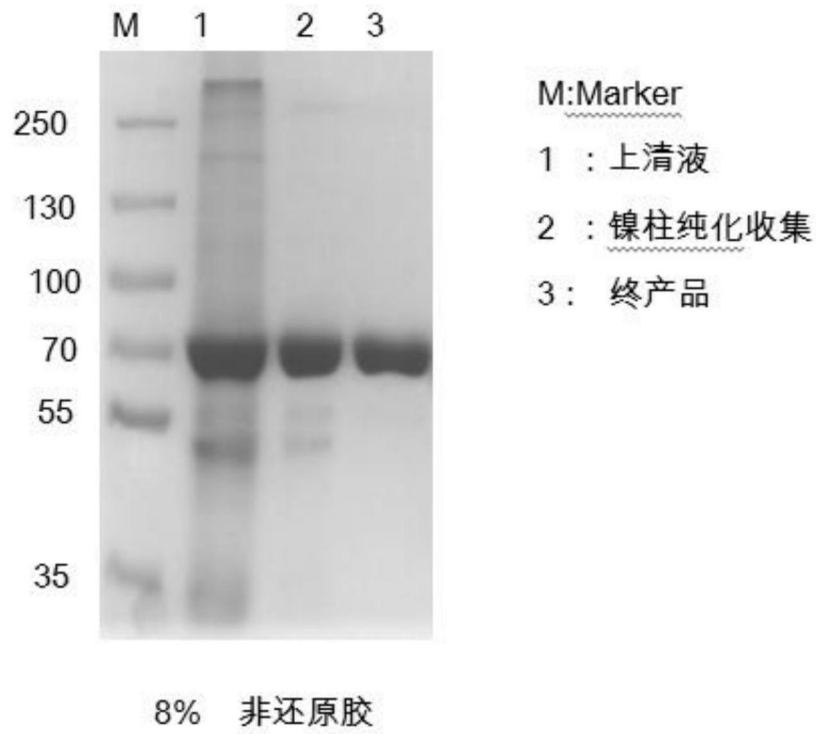


图5