

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103060250 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201210525750. 1

(22) 申请日 2012. 12. 07

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO :M 2012355 2012. 09. 16

(71) 申请人 山东信得科技股份有限公司

地址 262233 山东省潍坊市诸城市开发区舜  
耕路信得工业园

(72) 发明人 李朝阳 李明义 石乔

(74) 专利代理机构 北京恒都律师事务所 11395

代理人 邸建凯

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 15/50 (2006. 01)

C07K 14/17 (2006. 01)

C12R 1/46 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

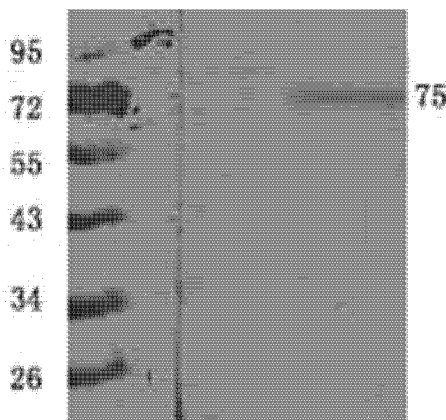
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

一种表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种

(57) 摘要

本发明公开了一种表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种,它是保藏在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为乳酸乳球菌 MG1363/pMG36e-S CCTCC M 2012355。乳酸乳球菌是人和大多数动物肠道内的常见细菌,本身具有抑菌抗菌、抗腹泻等特点,可以广泛开展活菌口服疫苗研究。本发明构建成的重组乳酸乳球菌 MG1363/pMG36e-S 能稳定可靠的表达具有活性的 TGEV 的 S 蛋白;该重组菌可用来生产基因工程亚单位疫苗和基因工程活载体疫苗,用于 TGE 的预防提供一个新方法;生产成本较低。



1. 一种表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种,其特征在于,它是保藏在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为乳酸乳球菌 MG1363/pMG36e-S CCTCC M 2012355。

## 一种表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种。

### 背景技术

[0002] 猪传染性胃肠炎 (Transmissible gastroenteritis, TGE) 是由冠状病毒科猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 引起的以仔猪呕吐、严重腹泻和高致死率为特征的消化道传染病。该病是我国及世界各养猪国家仔猪早期死亡的重要疫病之一。疫苗免疫接种是预防本病的主要措施。实践证明, 肠道粘膜免疫所产生的分泌型抗体 (sIgA) 是抵抗 TGEV 感染的有效抗体, 而非经口免疫所产生的其它血清抗体, 如 IgG、IgM 对本病的免疫保护效果并不理想。因此选择安全无毒, 能够在肠道中存活并能表达和传递抗原物质的载体系统, 有效的刺激粘膜免疫系统所产生的粘膜免疫应答对本病的防治具有重要意义。

然而, 现有的疫苗一般需要注射, 常规注射疫苗会产生应激及疫苗吸收的问题, 而通过口服免疫时, 免疫原在到达小肠粘膜之前会存在被降解或灭活的可能, 虽然以细菌病毒为活载体可达到这一目的, 但细菌病毒对体会有一定的伤害性, 且不能在肠道粘膜定居。

### 发明内容

[0003] 本发明的主要目的在于提供一种安全无毒, 能在肠道粘膜定居的表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种。

本发明采用如下技术方案:

它是保藏在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为乳酸乳球菌 MG1363/pMG36e-S CCTCC M 2012355; 保藏名称: 一种表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌: 乳酸乳球菌 MG1363/pMG36e-S; 保藏日期 2012. 9. 16。

本发明表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种的有益效果是: 可以口服, 口服免疫的优点是可有效刺激肠道局部免疫细胞产生分泌型 IgA, 这尤其适应于肠道粘膜传染病, 避免了常规注射疫苗所引起的应激及疫苗吸收问题, 但口服免疫需要克服免疫原在到达小肠粘膜之前被降解或灭活的可能, 满足这一要求的必须是活的载体系统来传递完整无损的抗原成分。以细菌病毒为活载体均可达到这一目的, 但作为安全无毒, 能在肠道粘膜定居的活载体系统, 乳酸乳球菌是最合适的载体系统。口服疫苗通过胃肠黏膜进行抗原递呈, 可经不同的免疫通路产生与常规注射类似的免疫反应。

### 附图说明

[0004] 图 1 为 Western blot 分析结果图。

### 具体实施方式

[0005] 请参阅图 1 所示, 本发明的一种猪流行性腹泻病毒基因工程亚单位口服疫苗的制

备方法,包括以下步骤:

### 1. 总 RNA 的提取

取已处理的 TGEV 细胞毒悬液 250  $\mu$ l 分别加入到无菌无 RNA 酶的离心管,再加入 750  $\mu$ l TRIzol LS Reagent,颠倒混匀后于 4 $^{\circ}$ C 静置 5 分钟。加入 200  $\mu$ l 预冷的氯仿(4 $^{\circ}$ C 保存),振荡至充分乳化均匀,4 $^{\circ}$ C 静置 15 分钟。于 4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 15 分钟,取出离心管,轻轻吸取上层水相约 450  $\mu$ l 移入另一离心管。加入等体积冷异丙醇(-20 $^{\circ}$ C 保存),颠倒混匀后置 -20 $^{\circ}$ C 30 分钟。4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 10 分钟,取出离心管,弃去上清液,加入 1 毫升 75%的冷乙醇(-20 $^{\circ}$ C 保存),颠倒数次洗涤核酸。于 4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 5 分钟,取出离心管,弃去上清液,倒置 EP 管干燥核酸,然后用 DEPC 水 20  $\mu$ l 溶解,离心管中的溶液就是 TGEV 的总 RNA。

### 2. S 基因的克隆

根据 TGEV S 基因 5'和 3'末端的保守区序列合成寡聚核苷酸引物,每个引物的 5'端包含一个方便将基因克隆到载体上的限制酶切位点。

序列 1:5'-cgttgtcgcacccatgaaaaactgttcggttctggttgtaat-3'

序列 2:5'-agaagcttttaatcgtgcacaccactattatcagacggtacaccc-3'

这对引物(序列 1 和序列 2)被用来进行 RT-PCR 扩增产生 cDNA。取总 RNA 液 8  $\mu$ l,加入 1  $\mu$ l 40  $\mu$ mol/L 反向引物(序列 2)70~80 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟,立即冰浴 3 分钟。随后依次加入 4  $\mu$ l M-MLV 5 $\times$ RT buffer,5  $\mu$ l 4mmol/L dNTPs,40u Rnasin,200u M-MLV,混合,离心,加入 DEPC 水使总体系达 20  $\mu$ l,离心数秒种后,37 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时,95 $^{\circ}$ C 10 分钟灭活 RT 酶。

cDNA 的 PCR 扩增:10  $\mu$ l cDNA 液,5  $\mu$ l 10 $\times$ Ex Taq 缓冲液,4 单位 EX Taq (一种高保真 DNA 聚合酶,同时能在扩增产物末端给出一个额外 A 用于 T 载体连接,两种 40  $\mu$ mol 引物(序列 1 和序列 2)各 0.5  $\mu$ l。4  $\mu$ l dNTP 混合液(每管 2.5mM),总体积为 50  $\mu$ l。PCR 温度循环程序为:95 $^{\circ}$ C 5 分钟;(94 $^{\circ}$ C 50 秒,50 $^{\circ}$ C 50 秒,72 $^{\circ}$ C 1 分钟)循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离扩增片段,将相应的核酸带切下,并用小量胶提取试剂盒纯化。分离的 S 片段被连接到 pMD18-T 载体上。连接的 DNA 质粒转化 E. coli DH5 $\alpha$ ,生长在含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 板上的白色菌株被分离出来。提取质粒 DNA,用限制性内切酶(Sal I 和 Hind III)和 PCR 法分析的存在和连接方向。

### 3. 表达载体的构建

将含有正确方向和序列的 S 基因片段用限制性内切酶切下,经酶切、胶回收纯化后与载体质粒 pMG36e 回收纯化后进行 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。将连接产物与电转化感受态细胞(乳酸乳球菌)MG1363 (本实验室保存)轻柔混匀后,置冰上放 5 分钟,将其转入 2 毫米的预冷电转化杯中,迅速电击,电击参数为电压 2.5 千伏,电击时间为 5 毫秒,电击后加入 900  $\mu$ l 冰预冷的 SGM17 恢复培养基,混匀,将菌液转移至 1.5 毫升离心管中,冰上放置 10 分钟,30 $^{\circ}$ C 厌氧培养 2 小时,取适量菌液涂布于含有 5  $\mu$ g/ml 红霉素的 GM17 琼脂培养基上,28 $^{\circ}$ C 厌氧培养 2~3 天,由平板上挑取单个菌落,分别接种于含有 5  $\mu$ g/ml 红霉素的 GM17 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C 厌氧培养过夜后,从 MG1363 中提取质粒。重组质粒进行酶切鉴定及序列测定分析正确的为阳性菌,命名为 MG1363/pMG36e-S。

### 4、蛋白的诱导表达

从阳性菌株(组乳酸乳球菌 MG1363/pMG36e-S)的琼脂板上挑取单个菌落接入含红霉素的 GM17 培养基中,同时以携带空质粒株 MG1363/pMG36e 作为阴性对照,28℃ 非振荡培养至达 OD600=1.0,加入 nisin 至终浓度为 10ng/ml,继续培养 10h 后离心收集菌体,用灭菌 PBS 洗涤细胞 1 次,离心收集菌体,最后用灭菌的 PBS 悬浮细胞,进行 SDS-PAGE 蛋白检测实验。结果表明所表达的重组蛋白大小约为 70Kda。

#### 5. 表达产物免疫原性的验证

SDS-PAGE 电泳结束后,将未染色的聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白转移到醋酸纤维素膜上,用 1% 的 BSA 封闭,以免抗 TGEV 血清为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG 的二抗与之反应,最后用 DAB 显色。Western 鉴定(见图 1) 重组蛋白具有与 TGE 全病毒制备的抗血清发生反应的能力,证明重组蛋白具有了良好的反应原性。

#### 6. 重组菌株的冻存实验

从表达重组蛋白菌株的培养液中取 200  $\mu$  l,接种于含红霉素的 100ml GM17 培养基中。28℃ 非振荡培养至 OD600=1.0,与 100ml 含 3% 蔗糖的 10% 脱脂牛奶混合液混合均匀,分装为 2ml/ 管,冻干。冻干后分别经过 7 天、14 天、21 天、1 个月、2 个月及 3 个月进行菌体复苏并计数,结果显示菌数均在 10<sup>8</sup>CFU/ml 以上。

结果列表 1(附在最后),用具体数据表示。

表 1 重组菌保存实验

保存时间	溶剂	温度(℃)	菌数(CFU/ml)
7 天	生理盐水	-20	$2.2 \times 10^8$
14 天	生理盐水	-20	$2.1 \times 10^8$
21 天	生理盐水	-20	$2.1 \times 10^8$
1 月	生理盐水	-20	$1.7 \times 10^8$
2 月	生理盐水	-20	$1.6 \times 10^8$
3 月	生理盐水	-20	$1.0 \times 10^8$

### 疫苗的安全性试验

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 仔猪由山东某猪场提供。

##### 1.1.2 试验药品

实验室制备的 3 批重组疫苗产品,120310,120317,120324,产品经各项检测均合格。稀释后检测活菌数为  $1.0 \times 10^9$ /ml。

##### 1.2 试验方法

本试验共采用了三批实验室制品,由于试验条件和场地限制,以下所有试验都是不同时间分别独立进行。

##### 1.2.1 单剂量安全性试验

21 日龄仔猪 80 头,分为 4 组,每组 20 头。试验组 3 组(注射三批重组乳酸菌制品),生理盐水对照 1 组。试验组每头灌服稀释后的重组乳酸菌 1ml,对照组灌服等剂量无菌生理盐水,灌服一次后,连续 14 天观察仔猪精神状态,有无腹泻、采食量下降等不良症状出现,并对成活率、增重、饲料利用率等生产性能进行统计。

##### 1.2.2 单剂量重复安全性试验

21 日龄仔猪 80 头,分为 4 组,每组 20 头。试验组 3 组(灌服三批重组乳酸菌产品),

生理盐水对照 1 组。试验组每头灌服重组乳酸菌 1ml, 对照组灌服等剂量无菌生理盐水, 每天 1 次, 连用 7 天, 用药后连续 14 天观察仔猪精神状态, 有无腹泻、采食量下降等不良症状出现, 并对成活率、增重、饲料利用率等生产性能进行统计。

### 1.2.3 超剂量安全性试验

21 日龄仔猪 80 头, 分为 4 组, 每组 20 只。试验组 3 组 (灌服三批乳酸菌产品), 生理盐水对照 1 组。试验组每头灌服重组乳酸菌 2ml, 对照组灌服无菌生理盐水 2ml, 灌服 1 次后, 连续 14 天观察仔猪精神状态, 有无腹泻、采食量下降等不良症状出现, 并对成活率、增重、饲料利用率等生产性能进行统计。

## 2 结果

2.1 仔猪单剂量试验, 观察 14 天后结果见表 2。

表 2 重组制品对 21 日龄仔猪单剂量使用的安全性试验结果

产品批号	组别	仔猪数 (头)	平均日增重 (g)	平均日耗料量 (g)	料肉比
120310	1	20	475	570	1.2:1
120317	2	20	440	660	1.5:1
120324	3	20	468	608	1.3:1
对照组	4	20	459	642	1.4:1

2.2 仔猪单剂量重复试验结果见表。

表 3 重组制品对 21 日龄仔猪单剂量重复使用的安全性试验结果

产品批号	组别	仔猪数 (头)	平均日增重 (g)	平均日耗料量 (g)	料肉比
120310	1	20	489	586	1.2:1
120317	2	20	496	595	1.2:1
120324	3	20	500	550	1.1:1
对照组	4	20	478	573	1.2:1

2.3 仔猪超剂量注射试验试验结果见表 4。

表 4 重组制品对 21 日龄仔猪超剂量使用的安全性试验结果

## 3 结论

各试验组仔猪在灌服重组乳酸菌后, 连续 14 天观察仔猪的反应, 仔猪无腹泻、采食量下降等不良症状, 所有试验仔猪均健康存活, 体重增加。试验结束后随机挑选 4 头剖杀, 观察剖检变化, 各组仔猪剖检的组织和器官与生理盐水对照组基本无差别。

### 疫苗的效力试验

#### 1.1 试验药品

实验室制备的 3 批重组疫苗产品, 120310, 120317, 120324, 产品经各项检测均合格。稀释后检测活菌数为  $1.0 \times 10^9$ /ml。

#### 1.2 试验方法

本试验共采用了三批实验室制品,由于试验条件和场地限制,以下所有试验都是在不同时间分别独立进行。

### 1.2.1 免疫接种试验

21 日龄仔猪 40 头,分为 4 组,每组 10 头。试验组 3 组(注射三批重组乳酸菌制品),生理盐水对照 1 组。试验组每头灌服稀释后的重组乳酸菌 1ml,对照组灌服等剂量无菌生理盐水,灌服一次后,连续 14 天观察仔猪精神状态,有无腹泻、采食量下降等不良症状出现,并对成活率、增重、饲料利用率等生产性能进行统计。

### 1.2.2 血清抗体检测以及粪便活菌检测

免疫后分别在 7、14、22、28 日采集猪血清,用 ELISA 试剂盒检测抗体含量。

免疫后分别在 7、14、22、28 日采集猪粪便,进行活菌分离鉴定。

### 1.2.3 攻毒试验

免疫后 28 天,用 TGEV 的传统毒株进行攻击。将病毒含量为  $10^{5.9}$ TCID<sub>50</sub>/ml 的病毒培养液按 1ml 每头的剂量进行喷鼻接种。继续饲养观察各组动物的反应,仔猪有无腹泻、采食量下降等不良症状。对病死猪和 21 天时扑杀的试验猪,进行活菌分离鉴定以及 RT-PCR 检测。

## 2 试验结果

### 2.1 血清抗体检测

猪免疫实验分组及免疫接种

分组	抗体				临床症状				
	7d	14d	21d	28d	食欲	精神	被毛状况	粪便	体温
免疫组	0.34	0.55	0.90	0.89	正常	正常	正常	正常	正常
对照组	0.07	0.07	0.08	0.05	正常	正常	正常	正常	正常

### 2.2 活菌分离检测

分别于 7d、14d、21d、28d 进行粪便中活菌的分离鉴定,用红霉素 LB 板进行细菌增殖培养,革兰氏染色可以看到在粪便中有重组乳酸菌的存在。

### 2.3 攻毒实验结果

对照组猪攻毒后全部发病,死亡 1 头。病猪病变表现为:仔猪出现水样腹泻,粪便呈黄色,体重迅速下降,脱水严重;食欲不振,部分仔猪出现发烧症状。

### 2.4 剖检及 PCR 检测

对照组猪剖检结果为:小肠充气扩张,肠壁呈透明状,肠内容物稀薄,呈黄色泡沫状,部分病例肠道充血,有粘液。胃有胀气并且内容为呈鲜黄色。脾脏以及淋巴结肿大,PCR 检测结果显示呈阳性。

本发明表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种的有益效果是:可以口服,口服免疫的优点是可有效刺激肠道局部免疫细胞产生分泌型 IgA,这尤其适应于肠道粘膜传染病,

避免了常规注射疫苗所引起的应激及疫苗吸收问题,但口服免疫需要克服免疫原在到达小肠粘膜之前被降解或灭活的可能,满足这一要求的必须是活的载体系统来传递完整无损的抗原成分。以细菌病毒为活载体均可达到这一目的,但作为安全无毒,能在肠道粘膜定居的活载体系统,乳酸乳球菌是最合适的载体系统。口服疫苗通过胃肠黏膜进行抗原递呈,可经不同的免疫通路产生与常规注射类似的免疫反应。

以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何不经过创造性劳动想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应该以权利要求书所限定的保护范围为准。



[0001]

## 序 列 表

申请人名称：山东信得科技股份有限公司

发明名称：一种表达猪传染性胃肠炎病毒基因工程菌菌种

序列表中序列的个数：1

序列标识符：1

序列的长度：2028

序列的类型：(DNA)

该序列来源的生物名称：TGEV

核苷酸序列和/或氨基酸序列：

```

1      ATGAAAAAACTGTTTCGTTGTTCTGGTTGTAATGCCATTGATTTATGGAGACAATTTTCCT
1      M K K L F V V L V V M P L I Y G D N F P

61     TGTTCTAAATTGACTAATAGAACTATAGCAACCAGTGAATCTCGTTGAAACCTTCCTT
21     C S K L T N R T I G N Q W N L V E T F L

121    CTAAACTATAGTAGTAGGTTACCACCTAATTCAGATGTGGTGTAGGTGATTATTTTCCT
41     L N Y S S R L P P N S D V V L G D Y F P

181    ACTGTACAACCTTGGTTTAATTGCATTGCAATGATAGTAATGACCTTTATGTTACACTG
61     T V Q P W F N C I R N D S N D L Y V T L

241    GAAAATCTTAAAGCATTGTATTGGGATTATGCTACAGAAAATATCACTTTGAATCACAGA
81     E N L K A L Y W D Y A T E N I T L N H R

301    CAACGGTTAAACGTAGTCGTTAATGGATACCCATACTCCATCACAGTTACAACAACCCGC
101    Q R L N V V V N G Y P Y S I T V T T T R

361    AATTTTAATTCTGCTGAAGGTGCTATTATATGCATTTGTAAGGGCTCACCACCTACTACC
121    N F N S A E G A I I C I C K G S P P T T

421    ACCACAGAATCTAGTTTGACTTGCAATTGGGGTAGTGAGTGCAGGTTAAACCATAAGCTC
141    T T E S S L T C N W G S E C R L N H K L

481    CCTATATGTCCTTCTAATTCAGAGGCCAAATTGTGGTAATATGCTGTATGGCCTACAATGG
161    P I C P S N S E A N C G N M L Y G L Q W

541    TTTGCAGATGAGGTTGTTGCTTATTTACGTGGTGTAGTTACCGTATTGGTTTTGAAAAT
181    F A D E V V A Y L R G A S Y R I G F E N

601    CAATGGTCTGGCACTGTCACATTTGGTGATATGCGTGCGACAACATTAGAAGTCGCTGGC

```

[0002]

201 Q W S G T V T F G D M R A T T L E V A G  
661 ACGCTTG TAGACCTTGGTGGTTAATCCTGTTATGATGTCAGTTATTATAGGGTTAAT  
221 T L V D L W W F N P V Y D V S Y Y R V N  
721 AATAAAAATGGTACTACCGTAGTTCCAATTGCACTGATCAATGTGCTAGTTATGTGGCT  
241 N K N G T T V V S N C T D Q C A S Y V A  
781 AATGTTTTACTACACAGCCAGGAGGTTTTATACCATCAGATTTTAGTTTTAATAATTGG  
261 N V F T T Q P G G F I P S D F S F N N W  
841 TTCCTTCTAACTAATAGCTCCACGTTGGTTAGTGGTAAATTAGTTACCAAACAGCCGTTA  
281 F L L T N S S T L V S G K L V T K Q P L  
901 TTAGTTAATTGCTTATGGCCAGTCCCTAGCTTTGAAGAAGCAGCTTCTACATTTTGT  
301 L V N C L W P V P S F E E A A S T F C F  
961 GAGGGTGCTGGCTTTGATCAATGTAATGGTGCTGTTTTAAATAAATACTGTAGACGTCATT  
321 E G A G F D Q C N G A V L N N T V D V I  
1021 AGGTTCAACCTTAATTTTACTACAAAATGTACAATCAGGTAAGGGTGCCACAGTGT  
341 R F N L N F T T N V Q S G K G A T V F S  
1081 TTGAACACAACGGGTGGTGTCACTCTTGAAATTTTCATGTTATACAGTGAGTGACTCGAGC  
361 L N T T G G V T L E I S C Y T V S D S S  
1141 TTTTTCAGTTACGGTGAAATTCGGTTCGGCGTAACTGATGGACCACGGTACTGTCACGTA  
381 F F S Y G E I P F G V T D G P R Y C H V  
1201 CACTATAATGGCACAGCTCTTAAGTATTTAGGAACATTACCACCTAGTGTC AAGGAGATT  
401 H Y N G T A L K Y L G T L P P S V K E I  
1261 GCTGTTAGTAAGTGGGGCCATTTTTATATTAATGGTTACAATTTCTTTAGCACATTTCCCT  
421 A V S K W G H F Y I N G Y N F F S T F P  
1321 ATTGATTGTATATCTTTTAATTTGACCCTGGTGATAGTGACGTTTCTGGACAATAGCT  
441 I D C I S F N L T T G D S D V F W T I A  
1381 TACACATCGTACACTGAAGCATTAGTACAAGTTGAAAACACAGCTATTACAAAGGTGACG  
461 Y T S Y T E A L V Q V E N T A I T K V T  
1441 TATTGTAATAGTCACGTTAATAACATTAATGCTCTCAAATTACTGCTAATTTGAATAAT  
481 Y C N S H V N N I K C S Q I T A N L N N  
1501 GGATTTTATCCTGTTTCTTCAAGTGAAGTTGGTCTTGTC AATAAGAGTGTCGTTACTA  
501 G F Y P V S S S E V G L V N K S V V L L

[0003]

1561 CCTAGCTTTTACACACATACCATTGTTAACATAACTATTGGTCTTGGTATGAAGCGTAGT  
521 P S F Y T H T I V N I T I G L G M K R S

1621 GGTTATGGTCAACCCATAGCCTCAACATTAAGTAACATCACACTACCAATGCAGGGTCAC  
541 G Y G Q P I A S T L S N I T L P M Q G H

1681 AACACCGATGTGTACTGTATTGTTCTGACCAATTTTCAGTTTATGTTTCATTCTACTTGC  
561 N T D V Y C I R S D Q F S V Y V H S T C

1741 AAAAGTGCTTTATGGGACAATATTTTAAAGCGAAACTGCACGGACGTTTTAGATGCCACA  
581 K S A L W D N I F K R N C T D V L D A T

1801 GCTGTTATAAAAACCTGGTACTTGTCTCTTCATTTGATAAAATTGAACAATTACTTAACT  
601 A V I K T G T C P F S F D K L N N Y L T

1861 TTTAACAAGTTCTGTTTGTCTGTTGAGTCCTGTTGGTGCTAATTGTAAGTTTGATGTAGCT  
621 F N K F C L S L S P V G A N C K F D V A

1921 GCCCGTACAAGAACCAATGAGCAGGTTGTTAGAAGTTTGTATGTAATATATGAAGAAGGA  
641 A R T R T N E Q V V R S L Y V I Y E E G

1981 GACAACATAGTGGGTGTACCGTCTGATAATAGTGGTGTGCACGATTAA  
661 D N I V G V P S D N S G V H D

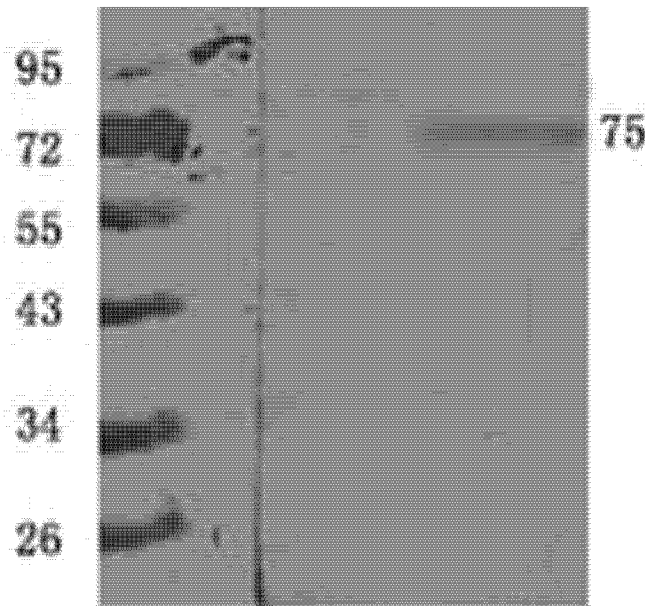


图 1