



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106496330 B

(45)授权公告日 2018.07.03

(21)申请号 201610975397.5

C12N 1/21(2006.01)

(22)申请日 2016.11.07

G01N 33/82(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106496330 A

(56)对比文件

CN 105473147 A, 2016.04.06, 参见全文.

CN 1596115 A, 2005.03.16, 参见全文.

(43)申请公布日 2017.03.15

NCBI.vitamin D3 receptor isoform

(73)专利权人 陕西理工学院

VDRB1 [Homo sapiens].《NCBI Reference

地址 723000 陕西省汉中市汉台区东关小
关子

Sequence: NP_001017536.1》.2015, 参见

COMMENT, ORIGIN.

(72)发明人 程佳 王永吉

杨祎琦等.SD大鼠维生素D受体真核过表达

(74)专利代理机构 西安亿诺专利代理有限公司

载体构建及功能分析.《生物技术》.2016, 第26卷
(第2期), 参见摘要、第109-112页.

61220

刘桂林等.原核双基因共表达载体的构建策
略.《畜牧与兽医》.2012, 第44卷参见第92页.

代理人 熊雁

审查员 王金凤

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

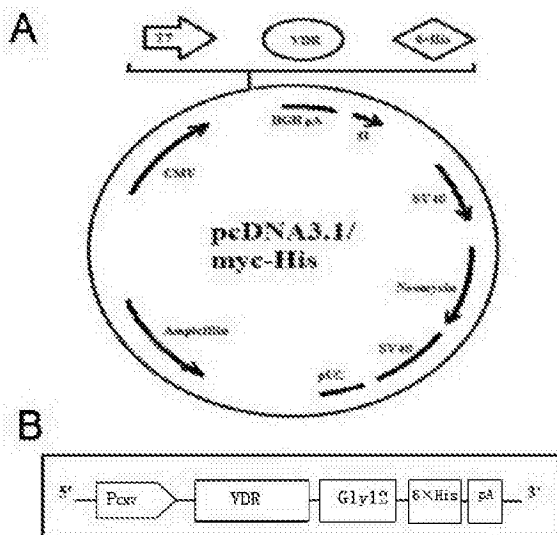
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

一种VDR-His融合蛋白及其DNA序列、表达方
法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种维生素D受体(vitamin D
receptor, VDR)与组氨酸标签肽(6×His tag)融
合蛋白(VDR-His), 简称VDR-His融合蛋白, 其氨
基酸序列如SEQ ID No.2所示, DNA序列如SEQ ID
No.1所示, 本发明还公开了该融合蛋白的表达系
统、表达方法和应用。该VDR-His融合蛋白中的
His标签肽有镍离子结合活性, 可实现快速分离
与制备, 该VDR-His融合蛋白还具有维生素D药物
诱导的基因转录活性, 可用于研究维生素D类药
物与VDR受体蛋白的相互作用研究, 进而应用于
维生素D药物筛选和活性的评估方面。



1. 一种VDR-His融合蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。
2. 包含编码权利要求1所述VDR-His融合蛋白的DNA,其序列如SEQ ID No.1 所示。
3. 一种含有权利要求2所述DNA的表达载体。
4. 根据权利要求3所述的表达载体,其特征在于:所述表达载体为真核表达载体。
5. 一种含有权利要求2所述DNA或权利要求3所述表达载体的宿主菌。
6. 根据权利要求5所述的宿主菌,其特征在于:所述宿主菌为大肠杆菌。
7. 一种权利要求1所述的VDR-His融合蛋白在维生素D药物的筛选、鉴定以及活性评估的应用。

一种VDR-His融合蛋白及其DNA序列、表达方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和蛋白质工程领域,具体涉及一种VDR-His融合蛋白及其DNA序列、表达和应用。

背景技术

[0002] 维生素D(vitamin D)是人体重要的健康元素,可促进钙磷的吸收,影响骨骼的生长和代谢,特别适于中老年人缓解和预防骨质疏松症。同时,维生素D还能调节机体的免疫功能,预防和缓解免疫疾病的症状,对细胞生长也有抑制作用,因而能防癌抗癌。维生素D还可以防治心脑血管疾病的发生。因此,维生素D是机体不可缺少的活性调节因子,一般情况下,机体中维生素D的生理浓度范围应该在 30-60 ng/mL,即75-150 nmol/L。

[0003] 机体内的维生素D在细胞微粒体中受25-羟化酶系统催化生成骨化二醇,经肾近曲小管细胞1-羟化酶系统催化,生成具有生物活性的骨化三醇(1, 25(OH)VD₃)。活性的骨化三醇可以通过与机体细胞内的一个特殊蛋白质结合才能控制基因的表达,这个蛋白质叫做维生素D受体(vitamin D receptor,简称VDR)。因此,针对靶蛋白VDR开发了一系列维生素D类药物。这些药物用于治疗多种骨疾病如何偻病、软骨症和骨质疏松症。近年来,这些药物也用于治疗各类甲状旁腺功能亢奋症,疗效显著。

[0004] 另外,维生素D药物筛选模型是以VDR为靶点,通过药物与VDR蛋白的结合力判断药物的活力大小。目前,VDR蛋白在哺乳动物细胞内生产,通过免疫沉淀技术分离获得,这一方法产量有限,且依赖于抗体的质量,操作复杂,分离效率较低。

[0005] 多聚组氨酸亲和标签肽(6×His tag)的分子量相对较小且带有电荷,几乎不影响目的蛋白的活性,其纯化产物可直接用于蛋白功能的研究。目前,我国对维生素D类药物产品的需求与维生素D类药物的研发之间存在迟缓的矛盾,加上VDR蛋白与维生素D药物的结合力可以判断药物的活性大小。因此,提供一种维生素D受体(VDR)与组氨酸标签肽(6×His tag)融合蛋白及其表达在维生素D类药物研发过程中具有重要应用价值。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种维生素D受体(VDR)与组氨酸标签肽(6×His tag)融合蛋白,简称VDR-His融合蛋白,可以用于维生素D药物的筛选和维生素D活性的评估,同时,本发明还提供所述融合蛋白的DNA序列及其表达系统和表达方法,可以实现体外快速分离和纯化该融合蛋白。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0008] 一种VDR-His融合蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。其中,本发明中所述的VDR-His融合蛋白的氨基酸序列为SEQ ID No.2所示的氨基酸序列或者在SEQ ID No.2所述氨基酸序列中经突变或同义氨基酸取代后的序列,且这些序列与SEQ ID No.2所示的序列有相同功能,即实现VDR-His融合蛋白的表达。

[0009] 上述VDR-His融合蛋白的DNA序列,其DNA序列如SEQ ID No.1所示。其中,本发明中

所述的VDR-His融合蛋白DNA序列指上述SEQ ID No.1所述整个DNA 序列,或者是不包含扩增引物的序列,或者所述VDR-His融合蛋白在SEQ ID No.1所示DNA序列中添加、取代、插入或缺失一个或一个以上核苷酸生成的突变体或等位基因或衍生物,且这些序列是与SEQ ID No.1所示的序列具有编码相同功能蛋白的DNA序列。

[0010] 一种含有上述VDR-His融合蛋白的DNA序列的表达载体。

[0011] 优选地,上述表达载体为真核表达载体。

[0012] 更优选地,上述真核表达载体为pcDNA3.1/His质粒。

[0013] 一种含有上述VDR-His融合蛋白的DNA序列或含有上述表达载体的宿主菌。

[0014] 优选地,上述宿主菌为大肠杆菌。

[0015] 一种上述的VDR-His融合蛋白的表达方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 设计扩增人VDR的 cDNA序列的上、下游引物,通过PCR扩增程序获得人VDR的cDNA片段;

[0017] (2) 利用重组技术将人VDR的cDNA片段与6×His tag的cDNA实现连接,其间插入12个甘氨酸cDNA序列,构建真核表达载体;

[0018] (3) 将步骤(2)得到的表达载体转染到真核细胞中进行表达、纯化。

[0019] 上述VDR-His融合蛋白的表达方法中步骤(2)所述的表达载体为pcDNA3.1/His质粒。

[0020] 一种上述VDR-His融合蛋白在维生素D药物的筛选、活性评估的应用。因为本发明所制备的VDR-His融合蛋白具有维生素D药物诱导的基因转录活性,可以用于研究维生素D类药物与受体蛋白的相互作用,进而应用于维生素D药物筛选和活性评估方面的应用。

[0021] 本发明的优点:

[0022] 本发明提供的表达系统及VDR-His融合蛋白的表达方法能够成功实现VDR-His融合蛋白的表达,并利用His标签肽与镍离子的结合特性,在体外可以快速分离和制备VDR-His融合蛋白。同时,本发明所制备的VDR-His融合蛋白具有维生素D药物诱导的基因转录活性,可以用于研究维生素D类药物与受体蛋白的相互作用,进而应用于维生素D药物筛选和研发领域,以及保健品或食物、药物中维生素D活性的评估方面,在实际中有较好的应用价值。

附图说明

[0023] 图1 VDR-His融合蛋白序列连接于pcDNA3.1/His质粒中的示意图。A为pcDNA3.1/VDR-His的示意图,B为VDR-His融合蛋白表达盒(expression cassette)的示意图,其中明示出了VDR与His标签肽的相关位置(从左至右依次为CMV 启动子(P_{CMV})、维生素D受体(VDR)、12个甘氨酸序列(Gly12)、组氨酸标签肽(6×His tag)、PolyA结构(PolyA))。

[0024] 图2 对本发明的pcDNA3.1/VDR-His真核表达载体进行PCR和双酶切验证的结果示意图。A,菌液PCR鉴定结果(M:DL2000;1和2是阴性克隆;3为阳性克隆);B,载体双酶切鉴定结果(M:DL2000;1为Hind III单酶切;2为Hind III和EcoR I双酶切;3为EcoR I单酶切)。

[0025] 图3 VDR融合蛋白表达效率检测。

[0026] 图4 表达VDR-His融合蛋白的HEK293细胞经活性1, 25(OH)VD₃处理后的qPCR分析图。

[0027] 图5 利用稳定表达VDR-His融合蛋白的HEK293细胞测定两种维生素D药物中的维生素D生物活性的分析结果图(横坐标1~5分别为0、0.01、0.1、1、10 nM的药物处理浓度;纵坐标是CYP24A1的相对表达量)。

具体实施方式

[0028] 下面结合实施例对本发明进行详细地说明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为现有技术中的常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0029] 实施例1

[0030] 1. 获得人VDR的cDNA片段

[0031] (1) 设计扩增人VDR的cDNA序列的上、下游引物

[0032] 上游引物:(带有 *Hind* III 酶切位点以及 Kozak 序列) 5' - CGATGCAAGCTTCGCCACCATGGAGTGGAGGAATAAGAAAAGGAG-3', 其中,斜体加粗部分为 *Hind* III 酶切位点,有下划线的部分为Kozak序列;

[0033] 下游引物:(带有 *EcoR* I 酶切位点,为了与His序列融合表达,VDR去掉终止密码子,加入12个甘氨酸残基序列(Gly12),以保护VDR的功能不受影响) 5' - ATATTAGAAATTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCGGAGATCTCATTGCCAAACACTTC-3', 其中,斜体加粗部分为 *EcoR* I 酶切位点,有下划线的部分为12个甘氨酸残基序列;

[0034] (2) 通过PCR扩增程序获得人VDR的cDNA片段

[0035] PCR扩增程序为:95℃预变性10 min,95℃变性30 s,60℃退火60 s,55℃延伸2 min,循环30次,72℃延伸10 min,16℃保存。

[0036] 得到人VDR的cDNA片段,产物长度约为1480 bp。

[0037] 2. pcDNA3.1/VDR-His真核表达载体的构建

[0038] 利用重组技术将人VDR的cDNA片段与6×His tag的cDNA实现连接,其间插入12个甘氨酸cDNA序列,构建pcDNA3.1/VDR-His真核表达载体,具体操作如下:

[0039] (1) 线性化pcDNA 3.1/His载体:对pcDNA 3.1/His载体进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,并将酶切产物进行胶回收,备用;

[0040] (2) 双酶切人VDR的cDNA序列:对PCR扩增获得的人VDRcDNA片段进行 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,并将酶切产物进行胶回收,备用;

[0041] (3) 连接:将(1)和(2)得到的产物按照1:5的比例混合后,在16℃的条件下,过夜连接;

[0042] (4) 转化:将(3)获得的连接产物转化DH5α感受态,转化的菌液均匀涂布于含100 mg/L氨苄霉素的LB平板上进行筛选,挑取单克隆,经菌液PCR及质粒双酶切鉴定后,委托Invitrogen公司测序。

[0043] 验证正确的克隆即为所要获得的pcDNA3.1/VDR-His真核表达载体。只有经过真核细胞表达,能得到VDR-His融合蛋白的载体,才能说明其是能够产生VDR-His融合蛋白的真核表达载体。

[0044] 其中,图1为VDR-His融合蛋白DNA序列连接于pcDNA3.1/His质粒中的示意图。A为pcDNA3.1/VDR-His的示意图,B为VDR-His融合蛋白表达盒的示意图,其中明示出了VDR与

His标签肽的相关位置:从左至右依次为CMV 启动子(P_{CMV})、维生素D受体(VDR)、12个甘氨酸序列(Gly12)、组氨酸标签肽(6×His tag)、PolyA结构(PolyA)。

[0045] 图2为对本实施例的pcDNA3.1/VDR-His真核表达载体进行双酶切验证的结果示意图。A, 菌液PCR鉴定结果(M:DL2000;1和2是阴性克隆;3为阳性克隆);B, 载体双酶切鉴定结果(M:DL2000;1为Hind III单酶切;2为Hind III和EcoRI双酶切;3为EcoRI单酶切)。

[0046] 由图1、图2可以看出,本发明提供的pcDNA3.1/VDR-His真核表达载体构建成功。

[0047] 本发明还提供一种宿主菌,即含有上述真核表达载体pcDNA3.1/VDR-His的大肠杆菌。用于外源DNA序列,比如本实施例中VDR-His融合蛋白的DNA序列的保存、分子克隆、质粒提取和蛋白质表达等方面。

[0048] 实施例2

[0049] VDR-His融合蛋白具有镍离子结合活性的验证实验

[0050] (1) 传代培养真核细胞12 h,本实施例选用HEK293细胞,用质粒转染技术将实施例1构建好的真核表达载体pcDNA3.1/VDR-His转入HEK293细胞内;

[0051] (2) 用含G418的培养液培养步骤(1)所得的细胞48 h,至细胞密度达到培养瓶的90%;

[0052] (3) 配制细胞裂解液,各成分及含量为:2 M HEPES(pH 7.0) 200 μl, 4 M NaCl 500 μl, DTT 3 μl, Brij 100 μl, PMSF 200 μl, H₂O 19 ml, 混合即可。取配制好的该细胞裂解液2mL,加入步骤(2)的培养瓶中,用超声波破碎细胞,超声时每次10 s,共20次;离心,收集上清液,因为碱性有利于His标签肽与镍离子的结合,所以再加入100 μL细胞蛋白提取液,即100 μL pH=8.0的1M Tris-HCl Buffer到上清液中;

[0053] (4) 分离纯化:在空镍柱中缓慢滴加300 μL Ni-NTA Agarose的镍填料,待其完全沉淀后,再用2 ml的AT Buffer 平衡柱子1 h,加2 ml细胞蛋白提取液,即2 mL pH=8.0的1M Tris-HCl Buffer 到镍柱中,待样液流过柱子后,用2 ml 的AT buffer清洗柱子。随后用1 ml的Salt Washing Buffer清洗柱子,去除非特异性结合蛋白。最后,用300 μl的Elution Buffer洗脱特异性结合的VDR-His融合蛋白;

[0054] (5) 纯化目标蛋白的鉴定:用SDS-PAGE分离细胞蛋白提取液和纯化的融合蛋白样品,按蛋白质免疫印迹技术鉴定融合蛋白上的VDR蛋白和His标签肽。VDR蛋白的鉴定使用VDR抗体,His标签肽的鉴定使用His标签肽抗体。

[0055] 结果如图3所示,说明该表达系统成功生产了VDR-His融合蛋白。经表达后产生的VDR-His融合蛋白的DNA序列如SEQ ID No.1所示,氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。也说明了实施例1构建的pcDNA3.1/VDR-His真核表达载体含有VDR-His融合蛋白的DNA序列,转染到真核细胞中进行表达后可以产生VDR-His融合蛋白。同时,利用融合蛋白的镍离子结合活性,可以实现VDR-His融合蛋白的快速分离与纯化。

[0056] 图3为VDR-His融合蛋白的表达效率检测结果图。在转染质粒48 h后收集HEK293的总蛋白,验证了VDR融合蛋白的表达效率。结果显示,在经His和VDR抗体孵育后,可分别检测出VDR和His蛋白的表达。同时,在pcDNA3.1/VDR-His转染组中VDR蛋白表达显著增加(P<0.05)。说明该真核表达载体pcDNA3.1/VDR-His可增强VDR融合蛋白的表达量。同时,利用His标签肽的镍离子结合作用,可对VDR-His融合蛋白进行快速有效的分离和纯化。

[0057] 实施例3

[0058] VDR-His融合蛋白具有维生素D药物诱导的基因转录活性的验证实验

[0059] (1) 传代培养真核细胞12 h, 本实施例选用HEK293细胞, 用质粒转染技术将实施例1构建好的真核表达载体pcDNA3.1/VDR-His转入HEK293细胞内;

[0060] (2) 用含G418的培养液培养步骤(1)所得的细胞48 h, 至细胞密度达到培养瓶90%;

[0061] (3) 用含有0、0.01、0.1、1、10 nM的活性1, 25(OH)VD₃培养基处理稳定表达VDR-His融合蛋白的HEK293细胞, 连续孵育12 h后收集总mRNA, 进行qPCR分析。

[0062] 结果如图4所示, 1 nM的活性1, 25(OH)VD₃能显著增加VDR下游基因CYP24A1基因的表达量(P<0.05), 说明VDR-His融合蛋白能够有效应答活性1, 25(OH)VD₃的处理, 激活下游靶基因CYP24A1基因的表达, 证明VDR-His融合蛋白具有维生素D药物的基因转录活性。

[0063] 实施例4

[0064] VDR-His融合蛋白可用于维生素D类药物的筛选的验证实验

[0065] (1) 传代培养真核细胞12 h, 本实施例选用HEK293细胞, 用质粒转染技术将实施例1构建好的真核表达载体pcDNA3.1/VDR-His转入HEK293细胞内;

[0066] (2) 用含G418的培养液培养步骤(1)所得的细胞48 h, 至细胞密度达到培养瓶90%;

[0067] (3) 用活性1, 25(OH)VD₃和两种维生素D药物(药物A为O₂C₃, 药物B为MART-10)处理稳定表达VDR-His融合蛋白的细胞, 连续孵育12 h后收集总mRNA, 进行qPCR分析, 以活性1, 25(OH)VD₃的处理为阳性对照。

[0068] 结果如图5所示, 可以看出, 含有真核表达载体pcDNA3.1/VDR-His的细胞模型能够响应活性1, 25(OH)VD₃的药物处理, 并在一定的药物浓度范围内, CYP24A1的表达呈上升趋势。由实施例3已经证明该VDR-His融合蛋白具有维生素D药物的基因转录活性, 因此根据VDR靶基因CYP24A1的相对表达量可以反映出维生素D药物的生物活性, 可用于维生素D药物的筛选和鉴别工作。从结果可知, 两种维生素D药物的处理结果略有差异, 说明不同药物中维生素D的活性与药物种类有关。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 陕西理工学院

[0003] <120> 一种VDR-His融合蛋白及其DNA序列、表达方法和应用

[0004] <130> 2016

[0005] <160> 2

[0006] <170> PatentIn version 3.3

[0007] <210> 1

[0008] <211> 1641

[0009] <212> DNA

[0010] <213> 人工序列

[0011] <400> 1

[0012] aagcttcgcc accatggagt ggaggaataa gaaaaggagc gattggctgt cgatggtgct 60

[0013] cagaactgct ggagtggagg aagcctttgg gtctgaagtg tctgtgagac ctcacagaag 120

[0014] agcacccttg ggtccactt acctgcccc tgctccttca gggatggagg caatggcggc 180

[0015] cagcaattcc ctgctgacc ctggagactt tgaccggaac gtgccccgga tctgtggggt 240

[0016] gtgtggagac cgagccactg gctttcactt caatgctatg acctgtgaag gctgcaaagg 300

[0017] cttcttcagg cgaagcatga agcggaaggc actattcacc tgccccttca acggggactg 360

[0018] ccgcatcacc aaggacaacc gacgccactg ccaggcctgc cggtcaaac gctgtgtgga 420

[0019] catcgcatg atgaaggagt tcattctgac agatgaggaa gtgcagagga agcgggagat 480

[0020] gatcctgaag cggaaggagg aggaggcctt gaaggacagt ctgcggccca agctgtctga 540

[0021] ggagcagcag cgcattctg ccatactgct ggacgcccac cataagacct acgacccac 600

[0022] ctactccgac ttctgccagt tccggcctcc agttctgtg aatgatggtg gagggagcca 660

[0023] tccttcagg cccaactcca gacacactcc cagcttctct ggggactcct cctcctcctg 720

[0024] ctcagatcac tgtatcacct ctccagacat gatggacteg tccagcttct ccaatctgga 780

[0025] tctgagtga gaagattcag atgacccttc tgtgacccta gagctgtccc agctctccat 840

[0026] gctgccccac ctggctgacc tggtcagtta cagcatccaa aaggtcattg gctttgctaa 900

[0027] gatgatacca ggattcagag acctcacctc tgaggaccag atcgtactgc tgaagtcaag 960

[0028] tgccattgag gtcatcatgt tgcgctccaa tgagtccttc accatggacg acatgtcctg
1020

[0029] gacctgtggc aaccaagact acaagtaccg cgtcagtgac gtgaccaaag ccggacacag
1080

[0030] cctggagctg attgagcccc tcatcaagtt ccagggtggga ctgaagaagc tgaacttgca
1140

[0031] tgaggaggag catgtcctgc tcatggccat ctgcategtc tccccagatc gtcttggggt
1200

[0032] gcaggacgcc gcgctgattg aggccatcca ggaccgctg tccaacacac tgcagacgta
1260

[0033] catccgctgc cgccaccgc ccccgggcag ccacctgctc tatgccaaga tgatccagaa

1320
 [0034] gctagccgac ctgcgcagcc tcaatgagga gcaactccaag cagtaccgct gcctctcctt
 1380
 [0035] ccagcctgag tgcagcatga agctaacgcc cttgtgctc gaagtgtttg gcaatgagat
 1440
 [0036] ctccggagga ggaggaggag gaggaggagg aggaggagga gaattctgca gatatccagc
 1500
 [0037] acagtggcgg ccgctcgagt ctagagggcc cttcgaacaa aaactcatct cagaagagga
 1560
 [0038] tcattctgaat atgcataaccg gtcatcatca ceatcacat tgagttttaa cccgctgate
 1620
 [0039] agcctcgact gtgcctteta g 1641
 [0040] <210> 2
 [0041] <211> 529
 [0042] <212> PRT
 [0043] <213> 人工序列
 [0044] <400> 2
 [0045] Met Glu Trp Arg Asn Lys Lys Arg Ser Asp Trp Leu Ser Met Val Leu
 [0046] 1 5 10 15
 [0047] Arg Thr Ala Gly Val Glu Glu Ala Phe Gly Ser Glu Val Ser Val Arg
 [0048] 20 25 30
 [0049] Pro His Arg Arg Ala Pro Leu Gly Ser Thr Tyr Leu Pro Pro Ala Pro
 [0050] 35 40 45
 [0051] Ser Gly Met Glu Ala Met Ala Ala Ser Thr Ser Leu Pro Asp Pro Gly
 [0052] 50 55 60
 [0053] Asp Phe Asp Arg Asn Val Pro Arg Ile Cys Gly Val Cys Gly Asp Arg
 [0054] 65 70 75 80
 [0055] Ala Thr Gly Phe His Phe Asn Ala Met Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly
 [0056] 85 90 95
 [0057] Phe Phe Arg Arg Ser Met Lys Arg Lys Ala Leu Phe Thr Cys Pro Phe
 [0058] 100 105 110
 [0059] Asn Gly Asp Cys Arg Ile Thr Lys Asp Asn Arg Arg His Cys Gln Ala
 [0060] 115 120 125
 [0061] Cys Arg Leu Lys Arg Cys Val Asp Ile Gly Met Met Lys Glu Phe Ile
 [0062] 130 135 140
 [0063] Leu Thr Asp Glu Glu Val Gln Arg Lys Arg Glu Met Ile Leu Lys Arg
 [0064] 145 150 155 160
 [0065] Lys Glu Glu Glu Ala Leu Lys Asp Ser Leu Arg Pro Lys Leu Ser Glu
 [0066] 165 170 175

[0067]	Glu Gln Gln Arg Ile Ile Ala Ile Leu Leu Asp Ala His His Lys Thr
[0068]	180 185 190
[0069]	Tyr Asp Pro Thr Tyr Ser Asp Phe Cys Gln Phe Arg Pro Pro Val Arg
[0070]	195 200 205
[0071]	Val Asn Asp Gly Gly Gly Ser His Pro Ser Arg Pro Asn Ser Arg His
[0072]	210 215 220
[0073]	Thr Pro Ser Phe Ser Gly Asp Ser Ser Ser Ser Cys Ser Asp His Cys
[0074]	225 230 235 240
[0075]	Ile Thr Ser Ser Asp Met Met Asp Ser Ser Ser Phe Ser Asn Leu Asp
[0076]	245 250 255
[0077]	Leu Ser Glu Glu Asp Ser Asp Asp Pro Ser Val Thr Leu Glu Leu Ser
[0078]	260 265 270
[0079]	Gln Leu Ser Met Leu Pro His Leu Ala Asp Leu Val Ser Tyr Ser Ile
[0080]	275 280 285
[0081]	Gln Lys Val Ile Gly Phe Ala Lys Met Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu
[0082]	290 295 300
[0083]	Thr Ser Glu Asp Gln Ile Val Leu Leu Lys Ser Ser Ala Ile Glu Val
[0084]	305 310 315 320
[0085]	Ile Met Leu Arg Ser Asn Glu Ser Phe Thr Met Asp Asp Met Ser Trp
[0086]	325 330 335
[0087]	Thr Cys Gly Asn Gln Asp Tyr Lys Tyr Arg Val Ser Asp Val Thr Lys
[0088]	340 345 350
[0089]	Ala Gly His Ser Leu Glu Leu Ile Glu Pro Leu Ile Lys Phe Gln Val
[0090]	355 360 365
[0091]	Gly Leu Lys Lys Leu Asn Leu His Glu Glu Glu His Val Leu Leu Met
[0092]	370 375 380
[0093]	Ala Ile Cys Ile Val Ser Pro Asp Arg Pro Gly Val Gln Asp Ala Ala
[0094]	385 390 395 400
[0095]	Leu Ile Glu Ala Ile Gln Asp Arg Leu Ser Asn Thr Leu Gln Thr Tyr
[0096]	405 410 415
[0097]	Ile Arg Cys Arg His Pro Pro Pro Gly Ser His Leu Leu Tyr Ala Lys
[0098]	420 425 430
[0099]	Met Ile Gln Lys Leu Ala Asp Leu Arg Ser Leu Asn Glu Glu His Ser
[0100]	435 440 445
[0101]	Lys Gln Tyr Arg Cys Leu Ser Phe Gln Pro Glu Cys Ser Met Lys Leu
[0102]	450 455 460
[0103]	Thr Pro Leu Val Leu Glu Val Phe Gly Asn Glu Ile Ser Gly Gly Gly
[0104]	465 470 475 480
[0105]	Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Phe Cys Arg Tyr Pro Ala

[0106]		485		490		495
[0107]	Gln Trp Arg Pro Leu Glu Ser Arg Gly Pro Phe Glu Gln Lys Leu Ile					
[0108]		500		505		510
[0109]	Ser Glu Glu Asp His Leu Asn Met His Thr Gly His His His His His					
[0110]		515		520		525
[0111]	His					

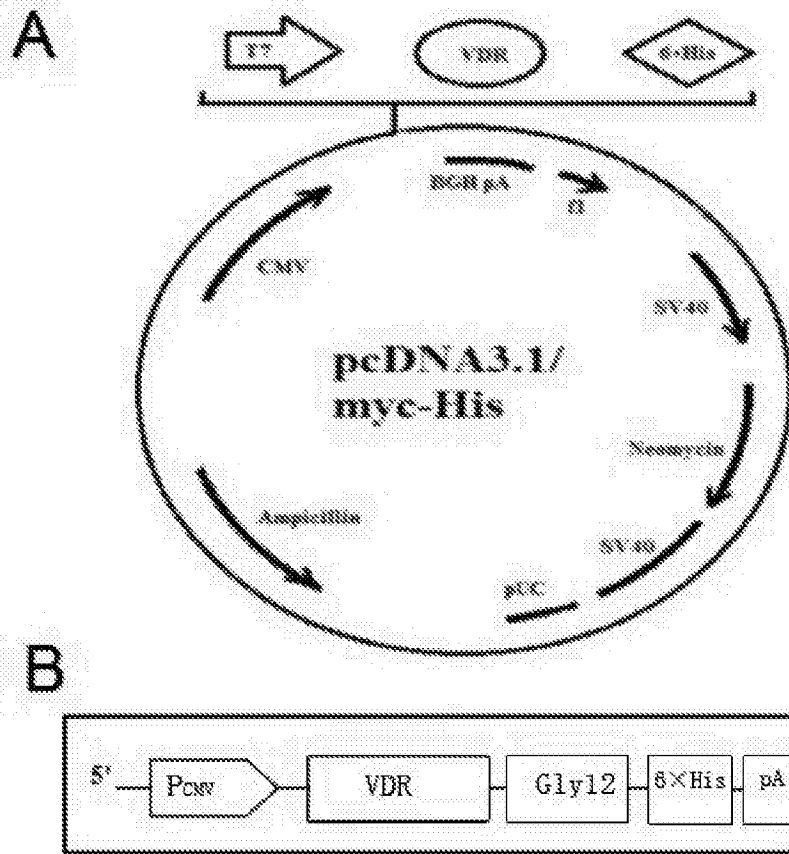


图1

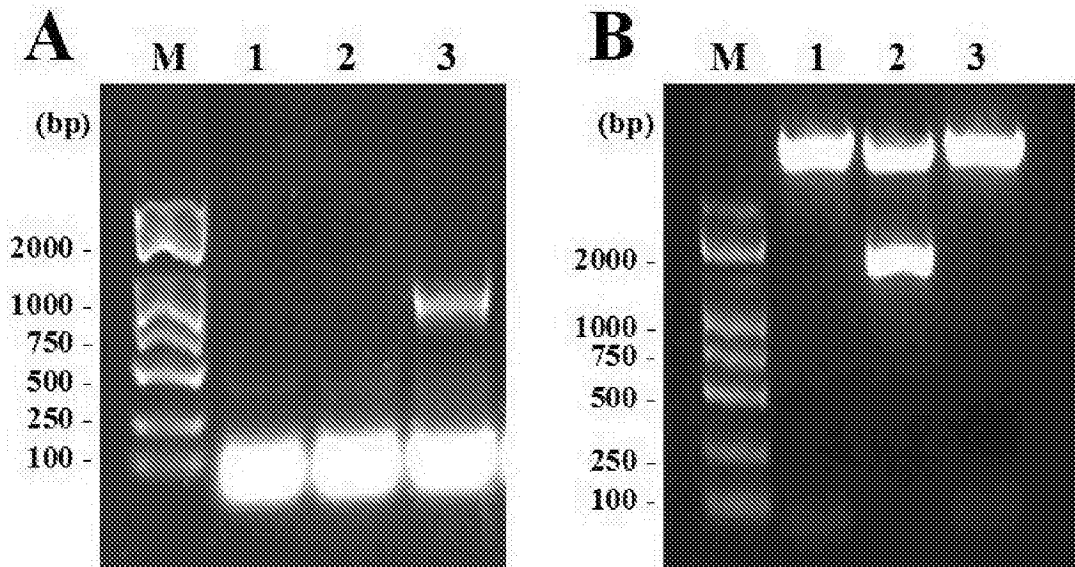


图2

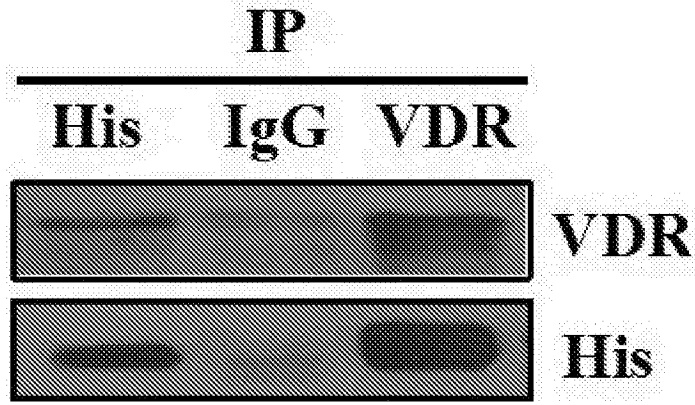


图3

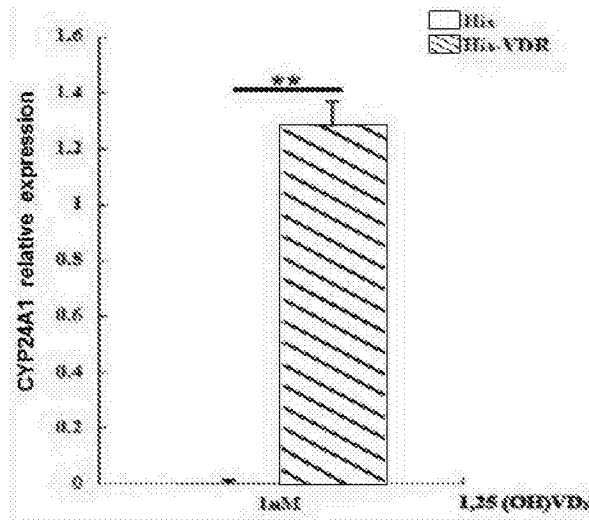


图4

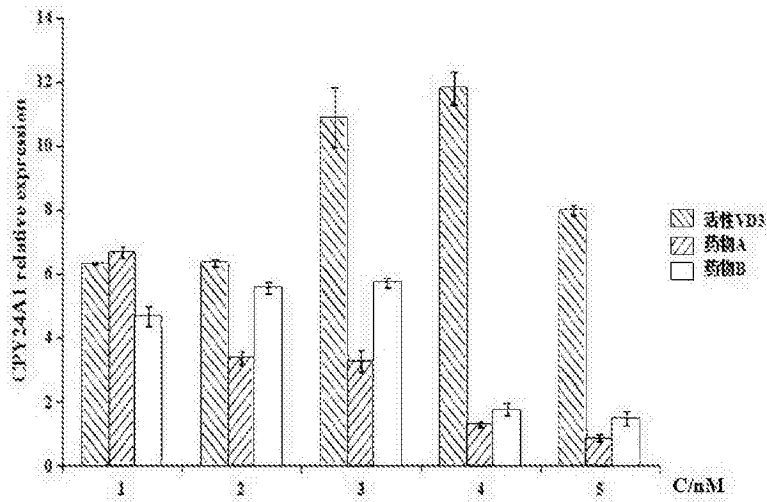


图5