



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101402688 B

(45) 授权公告日 2011.04.20

(21) 申请号 200810227012.2

A61P 19/06(2006.01)

(22) 申请日 2008.11.18

(56) 对比文件

(73) 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院
生物工程研究所

CN 1322243 A, 2001.11.14, 全文.

US 2006/0188971 A1, 2006.08.24, 全文.

CN 1690197 A, 2005.11.02, 全文.

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号军
医科院生物工程研究所

CN 101255440 A, 2008.09.03, 全文.

(72) 发明人 方宏清 李招发 戴红梅 李树龙
陈惠鹏

N.Wentzel 等.Phase diagram for a model
of urate oxidase.《THE JOURNAL OF CHEMICAL
PHYSICS》.2007, 第 127 卷第 165105-1 到
165105-5 页.

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

Yuichi Hongoh 等.Cloning sequence
analysis and expression in Eschrichia
coli of the gene encoding a uricase from
the yeast-like symbiont of the brown
planthopper, Nilaparvata lugens.《Insect
Biochemistry and Molecular Biology》.1999,
第 30 卷第 173-182 页.

代理人 关畅 任风华

吴伟力等.尿酸氧化酶的表达纯化及活性形
式鉴定.《军事医学科学院院刊》.2005, 第 29
卷(第 2 期), 摘要和第 125 页左栏 1.2.3.

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

A61K 38/44(2006.01)

A61K 38/38(2006.01)

审查员 朱晓乐

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种融合蛋白及其编码基因与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种融合蛋白及其编码基因与应用。本发明提供的融合蛋白,包括尿酸氧化酶和白蛋白,所述尿酸氧化酶为非人源的尿酸氧化酶,优选为来源于微生物的尿酸氧化酶;所述白蛋白为与人血清白蛋白具有 90% 以上同源性的蛋白,优选为人血清白蛋白。本发明的融合蛋白具有以下优点:1) 对人体而言免疫原性极低;2) 可以延长尿酸氧化酶在人体内的半衰期;3) 可以重复给药,提高疾病的治疗效果;4) 保持尿酸氧化酶原有的分解尿酸的活性;5) 减少潜在的尿酸氧化酶使用时伴随的副作用或毒性,主要是减少抗体的产生和减少过敏反应。

1. 一种融合蛋白，由尿酸氧化酶、白蛋白和连接肽组成，所述尿酸氧化酶为来源于微生物的尿酸氧化酶；所述白蛋白为人血清白蛋白。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白，其特征在于：所述融合蛋白为下述1)或2)的蛋白质：

1) 由序列表中序列2所示的氨基酸序列组成的蛋白质；

2) 由序列表中序列4所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

3. 权利要求1或2所述融合蛋白的编码基因。

4. 根据权利要求3所述的编码基因，其特征在于：所述编码基因为如下1)或2)所述的基因：

1) 其编码序列是序列表中序列1自5'末端第13-2703位脱氧核糖核苷酸；

2) 其编码序列是序列表中序列3自5'末端第10-2772位脱氧核糖核苷酸。

5. 含有权利要求3或4所述基因的重组载体。

6. 含有权利要求3或4所述基因的转基因细胞系。

7. 含有权利要求3或4所述基因的重组菌。

8. 根据权利要求6所述的转基因细胞系，其特征在于：所述出发细胞为哺乳动物、鱼、昆虫、植物或微生物细胞。

9. 根据权利要求8所述的转基因细胞系，其特征在于：所述出发细胞为微生物细胞。

10. 根据权利要求7所述的重组菌，其特征在于：所述出发菌为酿酒酵母属 (*Saccharomyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母 (*Hansenula*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、念珠菌属 (*Candida*)、孢园酵母属 (*Tarulaspora*) 或裂殖酵母属的菌株。

11. 根据权利要求10所述的重组菌，其特征在于：所述出发菌为毕赤酵母属巴斯德菌种 (*Pichia pastoris*) 的菌株。

12. 权利要求1或2所述的融合蛋白或权利要求3或4所述基因在制备治疗和/或预防高尿酸血症和痛风症药物中的应用。

一种融合蛋白及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种融合蛋白及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 尿酸氧化酶 (Uricase or Urate Oxidase, UOX EC 1.7.3.3) 是嘌呤代谢途径的一个关键酶, 能催化尿酸形成尿囊素。尿酸和尿囊素是不同生物嘌呤代谢的最终产物, 两者的溶解性差别很大, 尿酸在体内的溶解度很低, 约为 11mg/dl 水, 而尿囊素为它的 13.5 倍, 约为 147mg/dl 水。尿酸在体内的累积可引起痛风和尿酸盐肾病 (Duk-HeeKang, Takahiko Nakagawa, Lili Feng et al. A Role for Uric Acid in the Progression of Renal Disease [J]. J. Am. Soc. Nephrol., 2002, 13 : 2888-2897)。有研究表明, 尿酸在体内的积累与心、肾等组织器官的功能障碍有关, 用尿酸氧化酶抑制剂温和诱导的高尿酸小鼠模型, 出现了肾动脉病、肾损伤及高血压等症状, 去除抑制剂后症状的缓解和消失证明了尿酸是这些疾病的原因所在。研究表明, 动脉疾病可能与尿酸促进平滑肌细胞的增殖有关。

[0003] 尿酸氧化酶基因 (UOX) 是一个古老的基因, 存在于原核生物和真核生物中 (Xiangwei Wu, Cheng Chi Lee, Donna M. Muzny, et al. Urate oxidase : Primary structure and evolutionary implications [J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 86 : 9412-9416)。来源于不同生物的 UOX 基因同源性不高, 例如, 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和大豆的 UOX 之间的序列同源性为 25%, 黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和大豆的 UOX 之间的序列同源性为 29%, *B. subtilis* 和 *A. flavus* 的 UOX 之间的序列同源性为 36%, 但是构成活性位点的氨基酸残基序列在所有的物种中都是保守的。

[0004] UOX 活性的丧失在许多亲缘关系较远的种属中发现, 如鸟类、陆栖爬行动物、圆口类、除双翅目以外的昆虫和环虫类中。在人类和鸟类中缺少有活性的 UOX, 因而以尿酸作为嘌呤代谢的最终产物排出体外, 导致了高尿酸症和与之相关的痛风性关节炎 (Masako Oda, Yoko Satta, Osamu Takenaka, et al. Loss of Urate Oxidase Activity in Hoinoids and its Evolutionary Implications [J]. Mol. Biol. Evol., 2002, 19(5) : 640-653), 人血清中尿酸的浓度比其它哺乳动物高五十倍。敲除 UOX 基因的大鼠引发了严重的高尿酸症和尿酸盐肾病, 而且 50% 的大鼠在 4 周龄之前死亡。有研究表明, 从共同的祖先到现代人的 UOX 基因都存在一个单一无义突变, 使得蛋白的翻译过程提前终止, 导致了 UOX 活性的丧失。在灵长类动物中, 原猴亚目和老世界猴表现出了相对于大鼠和兔子中等水平的 UOX 活性; 与之相比, 人属和一些新世界猴则没有表现出任何可以检测到的 UOX 活性。人的 UOX 基因与老世界猴的 UOX 基因的同源性为 96%, 说明在进化中存在一个突发事件, 导致人的 UOX 基因沉默; 新世界猴与人的亲缘关系比它与老世界猴的要近, 因此新世界猴的 UOX 的失活不太可能与人的 UOX 的突变一样。

[0005] 人体内的高尿酸可能由几个原因造成, 随着年龄的增大, 人体功能衰退, 导致排尿酸能力减弱, 尿酸在肾小管及集尿管内沉积, 引起了痛风。此外, 对于肿瘤患者而言, 治疗过程中导致的肿瘤细胞的大量死亡, 使得体内的尿酸浓度急剧升高, 即所谓

的肿瘤溶解综合征 (Tumor Lysis Syndrome, TLS)。TLS 最常出现于儿童急性白血病及淋巴瘤, 成人肿瘤患者偶尔也会出现, 治疗过程中伴随着骨髓和淋巴的快速增生, 通常会导致肾衰竭和其它器官的损伤。

[0006] 临床上用于治疗高尿酸症的药物主要包括别嘌呤醇、卤化尿液、水合或透析等。通过抑制黄嘌呤氧化酶的活性, 别嘌呤醇减少了尿酸的生成, 但增加了尿酸前体 (黄嘌呤和次黄嘌呤) 对肾脏的负担, 而黄嘌呤在尿中的溶解度比尿酸更低, 因此别嘌呤醇治疗高尿酸症常常导致黄嘌呤肾病和结石, 而且体内原有的尿酸不受别嘌呤醇的影响, 只能靠病人自身排出。卤化和水合只能部分增加尿酸的排泄量, 都不是理想的方法, 可能需要不时透析。

[0007] UOX 通过酶的直接催化将尿酸氧化成尿囊素, 而后者在尿液中的溶解量相对于前者成倍增加, 应用 UOX 在临床上治疗 TLS 的高危病人被证明是防止发生 TLS 的有效方法 (Annemans, K.Moeremans, M.Lamotte, et al.Pan-European multicentre economic evaluation of recombinant urate oxidase (rasburicase) in prevention and treatment of hyperuricaemia and tumour lysis syndrome in haematological cancer patients[J]. Support Care Cancer, 2003, 11 : 249-257 ; Stanton C.Goldman, John S.Holcenberg, Jerry Z.Finklestein, et al.A randomized comparison between rasburicase and allopurinol in children with lymphoma or leukemia at high risk for tumor lysis[J]. Blood, 2001, 97(10) : 2998-3003)。在随机抽取的 TLS 高危病人中, 分别用别嘌呤醇、重组 UOX、卤化和水合进行治疗, 结果表明, 重组 UOX 可以在四个小时之内使血浆中的尿酸水平显著下降 2.6 倍, 并且保持在 8mg/L 以下; 而用别嘌呤醇治疗的病人在 96 小时之后尿酸水平会达到重组 UOX 治疗的水平, 但产生的尿酸前体 - 黄嘌呤和次黄嘌呤加重了肾脏的负担, 有时需要透析除去。

[0008] 实验表明, 重组 UOX 可以有效地防止高白血球的儿童急性白血病患者在治疗过程中出现 TLS 症状。大量的数据表明, 在防止和治疗在肿瘤患者化疗过程中出现的 TLS 症状方面, 重组 UOX 比别嘌呤醇更为有效和安全。

[0009] 注射尿酸氧化酶至少可以短暂减轻高尿酸血症及高尿酸尿。因为尿酸氧化酶是人体外源性蛋白, 重复注射重组 UOX 会产生抗 UOX 的抗体, 抑制了 UOX 的活性。可以通过应用可溶性聚合物屏蔽酶分子的表面, 降低抗原性和免疫原性, 并延长酶分子的半衰期 (Davis, Y.K.Park, A.Abochowski, F.F.Davis, Hypouricaemic effect of polyethyleneglycol modified urate oxidase, Lancet 2(1981) 281-283. 中国专利 CN1896231A)。目前 PEG 修饰的 UOX 在国外已进入 III 期临床试验。

[0010] 人血清白蛋白 (HSA) 是一种可溶性单体蛋白质, 构成血液中蛋白总量的一半。白蛋白作为一种基本载体, 携带并传递脂肪酸、类固醇和激素分子等, 其稳定的惰性性质是维持血压的一个重要因素。血清白蛋白是一种球状、非糖基化的、分子量为 65kD 的血清蛋白质。人血清白蛋白基因位于第 4 号染色体上, 有 16961 个碱基对, 分为 15 个间隔区, 经 RNA 加工拼接后形成的 mRNA 可编码一个具有 585 个氨基酸残基的蛋白质, 这一蛋白再经过高尔基体的转化加工, 去除引导多肽而分泌到细胞外。血清白蛋白有 35 个半胱氨酸残基, 在血液中是一个有 17 个二硫键的单体。利用微生物表达重组白蛋白的方法已在专利文献中公开 (EP330451 ; EP361991 ; CN1119352C)。

[0011] 白蛋白是血液中的主要成分，在人体内的含量为 40 克 / 升血液，半衰期寿命为 14-20 天。利用基因工程技术，将人血清白蛋白与人生长激素、干扰素或白介素 -2 等生物活性因子构建融合蛋白并在酵母中进行表达，已在中国专利 (CN1515591A；CN1269840C) 中公开，通过与白蛋白融合可以提高生物活性因子在血液中的半衰期。

发明内容

[0012] 本发明的目的是提供一种融合蛋白及其编码基因与应用。

[0013] 本发明所提供的融合蛋白包括尿酸氧化酶和白蛋白，所述尿酸氧化酶可以直接连接在所述白蛋白的 N 末端或 C 末端形成融合蛋白，也可以通过一个连接肽来连接所述白蛋白和所述尿酸氧化酶以形成融合蛋白。

[0014] 所述连接肽的长度为 2-100 个氨基酸，优选为 5-50 个氨基酸，更优选为 5-20 个氨基酸。连接肽的长度可短至所述白蛋白大分子对所述尿酸氧化酶形成的位阻保持最小，如 $(G_4S)_{1-4}$ 。连接肽有利于尿酸氧化酶与其底物尿酸的结合，但连接肽的加入可能使融合蛋白在作为药物使用时产生额外的免疫原性，最优选的是没有连接肽。

[0015] 上述融合蛋白既可以是分泌型表达蛋白，也可以是细胞内表达蛋白，具体可为分泌型表达蛋白。

[0016] 所述尿酸氧化酶为非人源的尿酸氧化酶，如来源于微生物（如黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、假丝酵母 (*Candida utilis*)、枯草杆菌 (*Bacillus sp.*) 等）、植物（如大豆 (*Glycine max*) 根瘤等）、无脊椎动物（如果蝇 (*Drosophila melanogaster*)）或有脊椎动物（如猪、牛、羊、狒狒）等的尿酸氧化酶，或其突变体。

[0017] 所述白蛋白为与人血清白蛋白具有 90% 以上同源性的蛋白，具体可为人血清白蛋白。

[0018] 所述融合蛋白具体可为下述 1)、2)、3) 或 4) 的蛋白质：

[0019] 1) 由序列表中序列 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；

[0020] 2) 将序列表中序列 2 的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且具有相同功能的由 1) 衍生的蛋白质；

[0021] 3) 由序列表中序列 4 所示的氨基酸序列组成的蛋白质；

[0022] 4) 将序列表中序列 4 的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和 / 或缺失和 / 或添加且具有相同功能的由 3) 衍生的蛋白质。

[0023] 上述 2) 或 4) 的融合蛋白可人工合成，也可先合成其编码基因，再进行生物表达得到。上述 2) 的融合蛋白的编码基因可通过将序列表中序列 1 的自 5' 端第 13-2703 位碱基所示的 DNA 序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子，和 / 或进行一个或几个碱基对的错义突变得得到。上述 4) 的融合蛋白的编码基因可通过将序列表中序列 3 的自 5' 端第 10-2772 位碱基所示的 DNA 序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子，和 / 或进行一个或几个碱基对的错义突变得得到。

[0024] 上述融合蛋白的编码基因也属于本发明的保护范围。

[0025] 上述融合蛋白的编码基因具体可为如下 1) — 6) 中任一所述的基因：

[0026] 1) 其编码序列是序列表中序列 1 自 5' 末端第 13-2703 位脱氧核糖核苷酸；

[0027] 2) 在严格条件下可与序列表中序列 1 限定的 DNA 序列杂交且编码所述融合蛋白

的 DNA 分子；

[0028] 3) 与 1) 的基因具有 90% 以上的同源性，且编码所述融合蛋白的 DNA 分子；

[0029] 4) 其编码序列是序列表中序列 3 自 5' 末端第 10-2772 位脱氧核糖核苷酸；

[0030] 5) 在严格条件下可与序列表中序列 3 限定的 DNA 序列杂交且编码所述融合蛋白的 DNA 分子；

[0031] 6) 与 4) 的基因具有 90% 以上的同源性，且编码所述融合蛋白的 DNA 分子。

[0032] 上述严格条件可为在 6×SSC, 0.5% SDS 的溶液中，在 65℃ 下杂交，然后用 2×SSC, 0.1% SDS 和 1×SSC, 0.1% SDS 各洗膜一次。

[0033] 扩增上述融合蛋白编码基因全长或任一片段的引物对，含有上述融合蛋白编码基因的重组载体、转基因细胞系或重组菌也属于本发明的保护范围。

[0034] 可用现有的表达载体构建含有所述融合蛋白编码基因的重组表达载体，具体可为 pPIC 质粒。

[0035] 所述宿主包括但不限于哺乳动物（如人、猴、鼠、兔等）、鱼、昆虫、植物、酵母、真菌和细菌等，优选为酵母属，包括但不限于酿酒酵母属 (*Saccharomyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、汉逊酵母 (*Hansenula*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、念珠菌属 (*Candida*)、孢园酵母属 (*Tarulaspora*) 和裂殖酵母属等；更优选地为毕赤酵母属巴斯德菌种 (*Pichia pastoris*)。

[0036] 本发明将非人源的尿酸氧化酶和人血清白蛋白融合制备成融合蛋白，实验结果表明，该融合蛋白和非人源的尿酸氧化酶具有相似的体内和体外生物活性，且免疫原性极大地降低，可以解决异源尿酸氧化酶在用于人体治疗过程中所产生的免疫原性问题，可用于制备治疗高尿酸血症和痛风症的药物。本发明的融合蛋白具有以下优点：1) 对人体而言免疫原性极低；2) 可以延长尿酸氧化酶在人体内的半衰期；3) 可以重复给药，提高疾病的治疗效果；4) 保持尿酸氧化酶原有的分解尿酸的活性；5) 减少潜在的尿酸氧化酶使用时伴随的副作用或毒性，主要是减少抗体的产生和减少过敏反应。

附图说明

[0037] 图 1 为含有融合蛋白编码基因的重组载体的构建过程

[0038] 图 2 为融合蛋白 HSA-UO 在酵母中的表达和纯化结果

[0039] 图 3 为融合蛋白 HSA-UO 和 rUO 在大鼠体内的免疫原性测定结果

具体实施方式

[0040] 实施例 1、白蛋白和尿酸氧化酶融合蛋白的制备

[0041] 1、人血清白蛋白编码基因的获得

[0042] 以人胎肝 cDNA 文库（购自 Clontech 公司，产品编号 637230）为模板，设计引物扩增不含信号肽编码序列的人血清白蛋白基因 (HSA)，具体引物如下：

[0043] HSA5：5' -TCGCTCGAGAAAAGAGATGCACACAAGAGTGAGG-3' (Xho I)，

[0044] HSA3：5' -TTGGATCCACCTCCACCGGAACCTCCACCTCCTAAGCCTAAGG CAGCTTGACTTG-3' (BamHI)。

[0045] PCR 扩增体系：人胎肝 cDNA 1.0 μ L，HSA5 引物和 HSA3 引物各 0.5 μ L，dNTP 2 μ L，KOD DNA Polymerase 0.1 μ L，10 \times KOD buffer 2 μ L，MgSO₄ 2 μ L，ddH₂O 35 μ L，总体积 50 μ L。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}$ C 30s，53 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 2min，共 30 个循环。

[0046] 对 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，结果表明，获得约 1700bp 的条带；纯化并回收该条带进行测序，测序结果表明，所获得的条带的核苷酸序列即为人血清白蛋白的编码基因，将其命名为 HSA。

[0047] 以人胎肝 cDNA 文库（购自 Clontech 公司，产品编号 637230）为模板，设计引物扩增含信号肽的人血清白蛋白基因（SHSA），具体引物如下：

[0048] SHSA5：5' -GACGGATCCACCATGAAGTGGGTAACCTTTATTTCC-3' (BamHI)，

[0049] SHSA3：5' -TTGAATTCACCTCCACCGGAACCTCCACCTCCTAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTG-3' (EcoRI)。

[0050] PCR 扩增体系：人胎肝 cDNA 1.0 μ L，SHSA5 引物和 SHSA3 引物各 0.5 μ L，dNTP 2 μ L，KOD DNA Polymerase 0.1 μ L，10 \times KOD buffer 2 μ L，MgSO₄ 2 μ L，ddH₂O 35 μ L，总体积 50 μ L。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}$ C 30s，53 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 2min，共 30 个循环。

[0051] 对 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，结果表明，获得约 1800bp 的条带；纯化并回收该条带进行测序，测序结果表明，所获得的条带的核苷酸序列即为含有信号肽的人血清白蛋白的编码基因，将其命名为 SHSA。

[0052] 2、尿酸氧化酶编码基因的获得

[0053] 以含有黄曲霉尿酸氧化酶基因的质粒 pET-UO(吴伟立，方宏清等.尿酸氧化酶的表达纯化及活性形式鉴定。军事医学科学院院刊，2005，29(2)：124-126.)为模板，设计引物扩增 UOX 基因，具体引物如下：

[0054] AFU5：5' -CGTAGATCTATGTCAGCAGTAAAAGCAGCAC-3' (BglII)

[0055] AFU3：5' -TGGAATTCTTACAATTTAGACTTCTGAGAGGAAC-3' (EcoRI)。

[0056] PCR 扩增体系：pET-UO 质粒 1.0 μ L，AFU5 引物和 AFU3 引物各 0.5 μ L，dNTP 2 μ L，KOD DNA Polymerase 0.1 μ L，10 \times KOD buffer 2 μ L，MgSO₄ 2 μ L，ddH₂O 35 μ L，总体积 50 μ L。PCR 反应条件为：94 $^{\circ}$ C 30s，53 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 1min，共 30 个循环。

[0057] 对 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，结果表明，获得约 900bp 的条带；纯化并回收该条带进行测序，测序结果表明，所获得的条带的核苷酸序列即为黄曲霉尿酸氧化酶的编码基因，将其命名为 AFUOX。

[0058] 为了提高在酵母中的表达水平，根据酵母偏爱密码子设计优化了尿酸氧化酶基因 UOA，并委托上海生工公司进行人工合成，将合成的尿酸氧化酶基因 UOA 插入到 pMD18 载体上，将得到的重组载体命名为 pMD18-UOA。

[0059] 3、重组载体 pPIC9-HSAL2UO 的构建 (HSA 和 AFUOXX 之间有两个 GGGGS)

[0060] 将上述步骤 1 获得的 HSA 经 XhoI 和 BamHI 双酶切后插入到经同样酶切的

pIB2 载体 (Irina B Sears, Jamse O' Connor, Olivia W Rossanese, Benjamin S Glick. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 14(8)783-790, 1998) 中, 将测序鉴定正确的重组载体命名为 pIB2-HSA。pIB2 载体的多克隆位点依次有 Xho I、BamHI 和 EcoR I 酶切位点。将上述步骤 2 获得的 AFUOX 基因经 Bgl II 和 EcoR I 双酶切后插入到经 BamHI 和 EcoR I 双酶切的上述构建的 pIB2-HSA 载体中, 将测序鉴定正确的重组载体命名为 pIB2-HSAL2UO。pIB2-HSAL2UO 经 XhoI 和 EcoRI 双酶切后, 得到不带信号肽但带有连接肽的人血清白蛋白和尿酸氧化酶的融合基因, 将其命名为 HSAL2UO, HSAL2UO 的脱氧核糖核苷酸序列如序列表中序列 1 所示, 其编码的融合蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 2 所示。将上述获得的融合基因 HSAL2UO 插入到经 XhoI 和 EcoRI 双酶切的 pPIC9 载体 (购自 Invitrogen 公司, 目录号 K1710-01) 中, 将获得的重组载体命名为 pPIC9-HSAL2UO。重组载体 pPIC9-HSAL2UO 的具体构建过程如图 1 所示。

[0061] 4、重组载体 pPIC9-SHSAL2UOA 的构建

[0062] 将上述步骤 1 获得的 SHSA 经 BamHI 和 EcoRI 双酶切后分别插入到经同样酶切的 pIB2 载体 (Irina B Sears, Jamse O' Connor, Olivia W Rossanese, Benjamin S Glick. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*, 14(8)783-790, 1998) 中, 将经测序鉴定正确的重组载体命名为 pIB2-SHSA。

[0063] 将上述步骤 2 获得的重组载体 pMD18-UOA 用 BglIII 和 EcoRI 双酶切后, 回收约 900bp 的 UOA 基因片段, 插入到经 BamHI 和 EcoRI 双酶切的上述步骤 3 获得的 pIB2-HSA 载体中, 将经测序鉴定正确的重组载体命名为 pIB2-HSAL2UOA。

[0064] pIB2-HSAL2UOA 经 NdeI (位于 HSA 基因中) 和 EcoRI 双酶切后回收约 1700bp 的目的片段, 插入到经 NdeI (位于 HSA 基因中) 和 EcoRI 双酶切的 pIB2-SHSA 载体中, 将经测序鉴定正确的重组载体命名为 pIB2-SHSAL2UOA。

[0065] pIB2-SHSAL2UOA 经 BamHI 和 EcoRI 双酶切, 回收约 2800bp 的小片段, 得到带有信号肽并带有连接肽的人血清白蛋白和尿酸氧化酶的融合基因, 将其命名为 SHSAL2UOA, SHSAL2UOA 的脱氧核糖核苷酸序列如序列表中序列 3 所示, 其编码的融合蛋白的氨基酸序列如序列表中序列 4 所示。将该基因插入到经 BamHI 和 EcoRI 双酶切的 pPIC9 载体 (购自 Invitrogen 公司, 目录号 K1710-01) 中, 将经测序鉴定正确的重组载体命名为 pPIC9-SHSAL2UOA。重组载体 pPIC9-SHSAL2UOA 的具体构建过程如图 1 所示。

[0066] 5、将重组质粒 pPIC9-HSAL2UO 和 pPIC9-SHSAL2UOA 分别转入毕赤酵母中表达相应的融合蛋白

[0067] 将上述步骤 3 和步骤 4 获得的重组质粒 pPIC9-HSAL2UO 和 pPIC9-SHSAL2UOA 用 SalI 进行线性化后分别电转化至毕赤酵母菌 GS115 中, 将获得的重组菌分别涂布在 MD 培养基 (1.34% 质量百分含量酵母基本氮源、 4×10^{-5} % 质量百分含量生物素、1% 质量百分含量葡萄糖和 2% 质量百分含量琼脂粉) 平板上, 30℃ 培养 2 天以上。对长出的单克隆先进行 PCR 鉴定, 然后再将所有的 PCR 阳性克隆按照 Invitrogen 公司操作手册中的要求进行表达筛选, 获得高表达的菌株。具体筛选方法如下: 取 3ml 40 μ mol/L 的尿酸溶液, 分别加入 100 μ l 上述含有重组质粒 pPIC9-HSAL2UO 或 pPIC9-SHSAL2UOA 的重组

菌的培养上清液，室温或 37℃放置 5min 后，用 0.3ml 质量百分含量为 20% 的 KOH 终止反应，测定 293nm 处吸光值的变化。吸光值变化越大，表明重组菌表达的融合蛋白中的尿酸氧化酶活性越高，相应融合蛋白的表达水平也越高。

[0068] 6、融合蛋白 HSAUOA 的表达和纯化

[0069] 将上述步骤 5 筛选得到的高表达 HSAUOA 融合蛋白的重组菌接种到装有 200mL BMG 培养基的三角瓶中进行增殖，将得到的发酵液作为种子液；将上述种子液再转接至装有 3L 基础培养基 (40g/L 甘油，18g/L K_2SO_4 ，15g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，4.13g/L KOH，0.9g/L $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ，13.3mL/L H_3PO_4) 的 5L 发酵罐中，30℃ pH5.0 的条件下进行发酵。发酵 20 小时后第 I 相结束，按 0.8ml/min 的流速流加质量百分含量为 5% 的甘油 100ml。2 小时后发酵第 II 相结束，调培养温度至 20℃，调 pH 至 6.5，再在培养基中加入 3g 大豆蛋白胨，按 0.2ml/min 的流速流加甲醇进行诱导培养，90 小时后结束发酵，离心收集上清。

[0070] 在上述上清液中加入硫酸铵至上清液中硫酸铵的摩尔浓度为 1.2M，用 25mM 磷酸缓冲液 (PH7.0)+1.2M 硫酸铵组成的混合液预平衡 Phenyl 柱，上样，然后用含有 1.2M 至 0M 硫酸铵的 25mM 磷酸缓冲液 (PH7.0) 梯度洗脱，收集活性峰，浓缩至 10-15ml。再用 25mM 磷酸缓冲液 (PH7.0)+0.15M 氯化钠组成的混合液预平衡 Superdex200 柱，将上述浓缩液上样，收集活性峰。将收集到的蛋白进行 SDS-PAGE，结果如图 2 所示。图 2 中，Marker 为蛋白分子量标准，1 为上述发酵液上清的 SDS-PAGE 结果，2、3 为疏水层析收集到的活性峰的 SDS-PAGE 结果，4 为凝胶过滤收集到的活性峰的 SDS-PAGE 结果。

[0071] 实施例 2、融合蛋白在大鼠体内的免疫原性的测定

[0072] 将雄性 SD 大鼠分为两组，分别为 HSAUOA 融合蛋白组和 rUO 蛋白组 (rUO 蛋白的制备过程参见：吴伟立，方宏清等.尿酸氧化酶的表达纯化及活性形式鉴定。军事医学科学院院刊，2005，29(2)：124-126.)，每组五只大鼠，分别静脉注射上述实施例 1 制备的 HSAUOA 融合蛋白和按照上述文献方法制备的 rUO 蛋白。HSAUOA 融合蛋白组的给药剂量为 0.9mg/kg 体重，rUO 组的给药剂量为 0.3mg/kg 体重。每周给药一次，连续给药四周。分别于第一次给药前和第一次给药后 14、21、28 和 35 天采血，分离血清，放于 4℃冰箱待测，并连续观察 2 个月。

[0073] 以 rUO 包被酶联板，采用 ELISA 法测定抗体滴度，实验设三次重复，大鼠静脉连续注射 HSAUOA 融合蛋白及 rUO 蛋白后，抗体滴度随时间变化的结果如图 3 和表 1 所示。从表 1 中可以看出，静脉注射 HSAUOA 融合蛋白后，大鼠体内产生的抗体水平明显低于静脉注射 rUO 后大鼠体内产生的抗体水平 ($P < 0.05$)，并且连续静脉注射 rUO 后，大鼠体内抗体水平呈不断升高趋势，而连续静脉注射 HSAUOA 融合蛋白后，大鼠体内的抗体水平未见明显升高。

[0074] 从图 3 中可以看出，注射上述实施例 1 制备的 HSAUOA 融合蛋白后第 14d、21d、28d 和 35d，大鼠体内产生的抗体滴度分别为 20、120、100 和 40；注射 rUO 蛋白后第 14d、21d、28d 和 35d，大鼠体内产生的抗体滴度分别为 416、1000、9600 和 32000。

[0075] 表 1 大鼠连续静脉注射 HSAUOA 及 rUO 后的抗体滴度

[0076]

| 鼠号 | 组别 | 抗体滴度 | | | |
|--------|--------|-------|--------|---------|---------|
| | | 14d | 21d | 28d | 35d |
| [0077] | | | | | |
| 1 | HSAUOA | 1:10 | 1:100 | 1:100 | 1:50 |
| 2 | HSAUOA | 1:10 | 1:100 | 1:100 | 1:50 |
| 3 | HSAUOA | 1:20 | 1:200 | 1:100 | 1:25 |
| 4 | HSAUOA | 1:20 | 1:100 | 1:100 | 1:25 |
| 5 | HSAUOA | 1:40 | 1:100 | 1:100 | 1:50 |
| 6 | rUO | 1:160 | 1:1000 | 1:4000 | 1:64000 |
| 7 | rUO | 1:320 | 1:1000 | 1:8000 | 1:32000 |
| 8 | rUO | 1:640 | 1:1000 | 1:16000 | 1:16000 |
| 9 | rUO | 1:640 | 1:1000 | 1:16000 | 1:16000 |
| 10 | rUO | 1:320 | 1:1000 | 1:4000 | 1:32000 |

[0078] 序列表

[0079] <160>4

[0080] <210>1

[0081] <211>2706

[0082] <212>DNA

[0083] <213> 人工序列

[0084] <220>

[0085] <223>

[0086] <400>1

[0087]

| | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| ctcgagaaaa | gagatgcaca | caagagtgag | gttgctcatc | ggtttaaaga | tttgggagaa | 60 |
| gaaaatttca | aagccttggt | gttgattgcc | tttgctcagt | atcttcagca | gtgtccattt | 120 |
| gaagatcatg | taaaattagt | gaatgaagta | actgaatttg | caaaaacatg | tgttgctgat | 180 |
| gagtcagctg | aaaattgtga | caaatcactt | catacccttt | ttggagacaa | attatgcaca | 240 |
| gttgcaactc | ttcgtgaaac | ctatggtgaa | atggctgact | gctgtgcaaa | acaagaacct | 300 |
| gagagaaatg | aatgcttctt | gcaacacaaa | gatgacaacc | caaacctccc | ccgattgggtg | 360 |
| agaccagagg | ttgatgtgat | gtgcactgct | tttcatgaca | atgaagagac | atTTTTGAAA | 420 |
| aaatacttat | atgaaattgc | cagaagacat | ccttactttt | atgccccgga | actccttttc | 480 |
| tttgctaaaa | ggtataaagc | tgctttttaca | gaatgttgcc | aagctgctga | taaagctgcc | 540 |
| tgctgtttgc | caaagctcga | tgaacttcgg | gatgaaggga | aggcttcgtc | tgccaaacag | 600 |
| agactcaagt | gtgccagtct | ccaaaaattt | ggagaaagag | ctttcaaagc | atgggcagta | 660 |
| gctcgcctga | gccagagatt | tcccaaagct | gagtttgcag | aagtttccaa | gttagtgaca | 720 |
| gatcttacca | aagtccacac | ggaatgctgc | catggagatc | tgcttgaatg | tgctgatgac | 780 |
| agggcggacc | ttgccaaagta | tatctgtgaa | aatcaagatt | cgatctccag | taaactgaag | 840 |
| gaatgctgtg | aaaaacctct | gttggaaaaa | tcccactgca | ttgccgaagt | ggaaaatgat | 900 |
| gagatgcctg | ctgacttgcc | ttcattagct | gctgattttg | ttgaaagtaa | ggatgtttgc | 960 |
| aaaaactatg | ctgaggcaaa | ggatgtcttc | ctgggcatgt | ttttgtatga | atatgcaaga | 1020 |
| aggcatcctg | attactctgt | cgtgctgctg | ctgagacttg | ccaagacata | tgaaccact | 1080 |
| ctagagaagt | gctgtgccgc | tgcagatcct | catgaatgct | atgccaaagt | gttcgatgaa | 1140 |
| tttaaaccctc | ttgtggaaga | gcctcagaat | ttaatcaaac | aaaattgtga | gctttttgag | 1200 |
| cagcttggag | agtacaaatt | ccagaatgcg | ctattagtct | gttacaccaa | gaaagtacc | 1260 |
| caagtgtaaa | ctccaactct | tgtagaggtc | tcaagaaacc | taggaaaagt | gggcagcaaa | 1320 |
| tgttgtaaac | atcctgaagc | aaaaagaatg | cctgtgagc | aagactatct | atccgtggtc | 1380 |
| ctgaaccagt | tatgtgtggt | gcatgagaaa | acgccagtaa | gtgacagagt | caccaaattgc | 1440 |
| tgcacagaat | ccttgggtgaa | caggcgacca | tgcttttcag | ctctggaagt | cgatgaaaca | 1500 |
| tacgttccca | aagagtttaa | tgctgaaaca | ttcaccttcc | atgcagatat | atgcacactt | 1560 |

[0088]

tctgagaagg agagacaaat caagaaacaa actgcacttg ttgagcttgt gaaacacaag 1620
 cccaaggcaa caaaagagca actgaaagct gttatggatg atttcgcagc tttttagtag 1680
 aagtgtgca aggctgacga taaggagacc tgctttgccg aggagggtaa aaaacttggt 1740
 gctgcaagtc aagctgcctt aggcttagga ggtggagggt ccggtggagg tggatctatg 1800
 tcagcagtaa aagcagcacg ctacggcaag gacaatgtcc gcgtctacaa gtttcacaag 1860
 gacgagaaga ccggtgtcca gacggtgtac gagatgaccg tctgtgtgct tctggagggt 1920
 gagattgaga cctcttacac caaggccgac aacagcgtca ttgtcgcaac cgactccatt 1980
 aagaacacca ttacatcac cgccaagcag aaccccgta ctctctccga gctgttcggc 2040
 tccatcctgg gcacacactt cattgagaag tacaaccaca tccatgccgc tcacgtcaac 2100
 attgtctgcc accgctggac ccggatggac attgacggca agccacaccc tcactccttc 2160
 atccgcgaca gcgaggagaa gcggaatgtg caggtggacg tggtcgaggg caagggcac 2220
 gatatcaagt cgtctctgtc cggcctgacc gtgctgaaga gcaccaactc gcagttctgg 2280
 ggcttcctgc gtgacgagta caccacactt aaggagacct gggaccgtat cctgagcacc 2340
 gacgtcgatg ccaacttgga gtggaagaat ttcagtggac tccaggaggt ccgctcgac 2400
 gtgcctaagt tcgatgctac ctgggccact gctcgcgagg tcaactctgaa gacttttgt 2460
 gaagataaca gtgccagcgt gcaggccact atgtacaaga tggcagagca aatcctggcg 2520
 cgccagcagc tgatcgagac tgctgagtac tcgttgccca acaagcacta tttcgaaatc 2580
 gacctgagct ggcacaaggg cctccaaaac accggcaaga acgccgaggt cttcgtcct 2640
 cagtcggacc ccaacggtct gatcaagtgt accgtcggcc gttcctctca gaagtctaaa 2700
 ttgtaa 2706

[0089] <210>2

[0090] <211>897

[0091] <212>PRT

[0092] <213> 人工序列

[0093] <220>

[0094] <223>

[0095] <400>2

[0096]

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30
 Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45
 Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60
 Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu

[0097]

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 65 | | 70 | | 75 | | 80 | | | | | | | | | |
| Arg | Glu | Thr | Tyr | Gly | Glu | Met | Ala | Asp | Cys | Cys | Ala | Lys | Gln | Glu | Pro |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Glu | Arg | Asn | Glu | Cys | Phe | Leu | Gln | His | Lys | Asp | Asp | Asn | Pro | Asn | Leu |
| | | | | 100 | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Pro | Arg | Leu | Val | Arg | Pro | Glu | Val | Asp | Val | Met | Cys | Thr | Ala | Phe | His |
| | | | | 115 | | | | 120 | | | | | 125 | | |
| Asp | Asn | Glu | Glu | Thr | Phe | Leu | Lys | Lys | Tyr | Leu | Tyr | Glu | Ile | Ala | Arg |
| | | | | 130 | | | | 135 | | | | | 140 | | |
| Arg | His | Pro | Tyr | Phe | Tyr | Ala | Pro | Glu | Leu | Leu | Phe | Phe | Ala | Lys | Arg |
| | | | | 145 | | | | 150 | | | | | 155 | | 160 |
| Tyr | Lys | Ala | Ala | Phe | Thr | Glu | Cys | Cys | Gln | Ala | Ala | Asp | Lys | Ala | Ala |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Cys | Leu | Leu | Pro | Lys | Leu | Asp | Glu | Leu | Arg | Asp | Glu | Gly | Lys | Ala | Ser |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | |
| Ser | Ala | Lys | Gln | Arg | Leu | Lys | Cys | Ala | Ser | Leu | Gln | Lys | Phe | Gly | Glu |
| | | | | 195 | | | | 200 | | | | | 205 | | |
| Arg | Ala | Phe | Lys | Ala | Trp | Ala | Val | Ala | Arg | Leu | Ser | Gln | Arg | Phe | Pro |
| | | | | 210 | | | | 215 | | | | | 220 | | |
| Lys | Ala | Glu | Phe | Ala | Glu | Val | Ser | Lys | Leu | Val | Thr | Asp | Leu | Thr | Lys |
| | | | | 225 | | | | | | | | 235 | | | 240 |
| Val | His | Thr | Glu | Cys | Cys | His | Gly | Asp | Leu | Leu | Glu | Cys | Ala | Asp | Asp |
| | | | | 245 | | | | | | | | 250 | | | 255 |
| Arg | Ala | Asp | Leu | Ala | Lys | Tyr | Ile | Cys | Glu | Asn | Gln | Asp | Ser | Ile | Ser |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | |
| Ser | Lys | Leu | Lys | Glu | Cys | Cys | Glu | Lys | Pro | Leu | Leu | Glu | Lys | Ser | His |
| | | | | 275 | | | | 280 | | | | | 285 | | |
| Cys | Ile | Ala | Glu | Val | Glu | Asn | Asp | Glu | Met | Pro | Ala | Asp | Leu | Pro | Ser |
| | | | | 290 | | | | 295 | | | | 300 | | | |
| Leu | Ala | Ala | Asp | Phe | Val | Glu | Ser | Lys | Asp | Val | Cys | Lys | Asn | Tyr | Ala |
| | | | | 305 | | | | | | | 315 | | | | 320 |
| Glu | Ala | Lys | Asp | Val | Phe | Leu | Gly | Met | Phe | Leu | Tyr | Glu | Tyr | Ala | Arg |
| | | | | 325 | | | | | | 330 | | | | 335 | |
| Arg | His | Pro | Asp | Tyr | Ser | Val | Val | Leu | Leu | Leu | Arg | Leu | Ala | Lys | Thr |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | |
| Tyr | Glu | Thr | Thr | Leu | Glu | Lys | Cys | Cys | Ala | Ala | Ala | Asp | Pro | His | Glu |
| | | | | 355 | | | | 360 | | | | | 365 | | |

[0098]

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro
 370 375 380
 Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro
 405 410 415
 Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys
 420 425 430
 Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys
 435 440 445
 Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His
 450 455 460
 Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr
 485 490 495
 Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
 500 505 510
 Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
 515 520 525
 Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
 530 535 540
 Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
 545 550 555 560
 Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
 565 570 575
 Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 580 585 590
 Gly Gly Ser Met Ser Ala Val Lys Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Asp Asn
 595 600 605
 Val Arg Val Tyr Lys Val His Lys Asp Glu Lys Thr Gly Val Gln Thr
 610 615 620
 Val Tyr Glu Met Thr Val Cys Val Leu Leu Glu Gly Glu Ile Glu Thr
 625 630 635 640
 Ser Tyr Thr Lys Ala Asp Asn Ser Val Ile Val Ala Thr Asp Ser Ile
 645 650 655
 Lys Asn Thr Ile Tyr Ile Thr Ala Lys Gln Asn Pro Val Thr Pro Pro

[0099]

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| | 660 | | 665 | | 670 | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Leu | Phe | Gly | Ser | Ile | Leu | Gly | Thr | His | Phe | Ile | Glu | Lys | Tyr | Asn | | | | |
| | 675 | | 680 | | 685 | | | | | | | | | | | | | | |
| His | Ile | His | Ala | Ala | His | Val | Asn | Ile | Val | Cys | His | Arg | Trp | Thr | Arg | | | | |
| | 690 | | 695 | | 700 | | | | | | | | | | | | | | |
| Met | Asp | Ile | Asp | Gly | Lys | Pro | His | Pro | His | Ser | Phe | Ile | Arg | Asp | Ser | | | | |
| 705 | | | 710 | | 715 | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Glu | Lys | Arg | Asn | Val | Gln | Val | Asp | Val | Val | Glu | Gly | Lys | Gly | Ile | | | | |
| | | | 725 | | 730 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | Ile | Lys | Ser | Ser | Leu | Ser | Gly | Leu | Thr | Val | Leu | Lys | Ser | Thr | Asn | | | | |
| | | | 740 | | 745 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser | Gln | Phe | Trp | Gly | Phe | Leu | Arg | Asp | Glu | Tyr | Thr | Thr | Leu | Lys | Glu | | | | |
| | | | 755 | | 760 | | | | | | | | | | | | | | |
| Thr | Trp | Asp | Arg | Ile | Leu | Ser | Thr | Asp | Val | Asp | Ala | Thr | Trp | Gln | Trp | | | | |
| | | | 770 | | 775 | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Gln | Phe | Ser | Gly | Leu | Gln | Glu | Val | Arg | Ser | His | Val | Pro | Lys | Phe | | | | |
| 785 | | | 790 | | 795 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | Ala | Thr | Trp | Ala | Thr | Ala | Arg | Glu | Val | Thr | Leu | Lys | Thr | Phe | Ala | | | | |
| | | | 805 | | 810 | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu | Asp | Asn | Ser | Ala | Ser | Val | Gln | Ala | Thr | Met | Tyr | Lys | Met | Ala | Glu | | | | |
| | | | 820 | | 825 | | | | | | | | | | | | | | |
| Gln | Ile | Leu | Ala | Arg | Gln | Gln | Leu | Ile | Glu | Thr | Val | Glu | Tyr | Ser | Leu | | | | |
| | | | 835 | | 840 | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro | Asn | Lys | His | Tyr | Phe | Glu | Ile | Asp | Leu | Ser | Trp | His | Lys | Gly | Leu | | | | |
| | | | 850 | | 855 | | | | | | | | | | | | | | |
| Gln | Asn | Thr | Gly | Lys | Asn | Ala | Glu | Val | Phe | Ala | Pro | Gln | Ser | Asp | Pro | | | | |
| 865 | | | 870 | | 875 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Gly | Leu | Ile | Lys | Cys | Thr | Val | Gly | Arg | Ser | Ser | Gln | Lys | Ser | Lys | | | | |
| | | | 885 | | 890 | | | | | | | | | | | | | | |

Leu

- [0100] <210>3
- [0101] <211>2781
- [0102] <212>DNA
- [0103] <213> 人工序列
- [0104] <220>
- [0105] <223>
- [0106] <400>3
- [0107]

ggatccacca tgaagtgggt aacctttatt tcccttcttt ttctcttttag ctcggcttat 60

tccaggggtg tgtttcgctg agatgcacac aagagtgagg ttgctcatcg gtttaaagat 120

ttgggagaag aaaatttcaa agccttgggtg ttgattgcct ttgctcagta tcttcagcag 180

tgtccatttg aagatcatgt aaaattagtg aatgaagtaa ctgaatttgc aaaaacatgt 240

gttgctgatg agtcagctga aaattgtgac aaatcacttc ataccctttt tggagacaaa 300

ttatgcacag ttgcaactct tcgtgaaacc tatggtgaaa tggctgactg ctgtgcaaaa 360

caagaacctg agagaaatga atgcttcttg caacacaaag atgacaaccc aaacctcccc 420

cgattgggta gaccagaggt tgatgtgatg tgcactgctt ttcatgacaa tgaagagaca 480

tttttgaaaa aataacttata tgaattgcc agaagacatc ctactttta tgccccggaa 540

ctccttttct ttgctaaaag gtataaagct gcttttacag aatgttgcca agctgctgat 600

aaagctgcct gcctgttgcc aaagctcgat gaacttcggg atgaaggaa ggcttcgtct 660

gccaacaga gactcaagtg tgccagtctc caaaaatttg gagaaagagc tttcaaagca 720

tgggcagtag ctcgcctgag ccagagattt cccaagctg agtttgcaga agtttccaag 780

ttagtacag atcttaccaa agtccacacg gaatgctgcc atggagatct gcttgaatgt 840

gctgatgaca gggcggacct tgccaagtat atctgtgaaa atcaagattc gatctccagt 900

aaactgaagg aatgctgtga aaaacctctg ttggaaaaat cccactgcat tgccgaagtg 960

gaaaatgatg agatgcctgc tgacttgctt tcattagctg ctgattttgt tgaagtaag 1020

gatgtttgca aaaactatgc tgaggcaaag gatgtcttcc tgggcatggt tttgtatgaa 1080

[0108]

tatgcaagaa ggcacccctga ttactctgtc gtgctgctgc tgagacttgc caagacatat 1140
gaaaccactc tagagaagtg ctgtgccgct gcagatcctc atgaatgcta tgccaaagtg 1200
ttcgatgaat ttaaaccctct tgtggaagag cctcagaatt taatcaaaca aaattgtgag 1260
ctttttgagc agcttggaga gtacaaattc cagaatgcgc tattagtctg ttacaccaag 1320
aaagtacccc aagtgtcaac tccaactctt gtagaggtct caagaaacct aggaaaagtg 1380
ggcagcaaat gttgtaaaca tcctgaagca aaaagaatgc cctgtgcaga agactatcta 1440
tccgtggctc tgaaccagtt atgtgtggtg catgagaaaa cgccagtaag tgacagagtc 1500
accaaagtct gcacagaatc cttggtgaac aggcgaccat gcttttcagc tctggaagtc 1560
gatgaaacat acgttcccaa agagttaat gctgaaacat tcaccttcca tgcagatata 1620
tgcacacttt ctgagaagga gagacaaatc aagaaacaaa ctgcacttgt tgagcttgtg 1680
aaacacaagc ccaaggcaac aaaagagcaa ctgaaagctg ttatggatga tttcgcagct 1740
tttgtagaga agtgctgcaa ggctgacgat aaggagacct gctttgccga ggagggtaaa 1800
aaacttggtg ctgcaagtca agctgcctta ggcttaggag gtggaggttc cgggtggaggt 1860
ggatctatgt ccgctgttaa ggctgctaga tacggtaagg acaacgttag agtttacaag 1920
gttcacaagg acgagaagac cgggtgtcaa accgtttacg agatgaccgt ttgtgttttg 1980
ttggaggggtg agatcgagac ctctacacc aaggctgaca actccgttat cgttgctacc 2040
gactccatca agaacaccat ctacatcacc gctaagcaaa acccagttac cccaccagag 2100
ttgttcgggtt ccactttggg taccacttc atcgagaagt acaaccacat ccacgctgct 2160
cacgttaaca tcgtttgtca cagatggacc agaattggaca tcgacggtaa gccacacca 2220
[0109]

cactccttca tcagagactc cgaggagaag agaaacgttc aagttgacgt tgttgagggt 2280
aagggtatcg acatcaagtc ctccttgtec ggtttgaccg ttttgaagtc caccaactcc 2340
caattctggg gtttcttgag agacgagtac accaccttga aggagacctg ggacagaatc 2400
ttgtccaccg acgttgacgc tacctggcaa tggaagcaat tctccggttt gcaagaggtt 2460
agatcccacg ttccaaagtt cgacgctacc tgggctaccg ctagagaggt taccttgaag 2520
accttcgctg aggacaactc cgcttccggt caagctacca tgtacaagat ggctgagcaa 2580
atcttggtta gacaacaatt gatcgagacc gttgaatact ccttgccaaa caagcactac 2640
ttcgagatcg acttgtcctg gcacaagggt ttgcaaaaca ccgtaagaa cgctgagggt 2700
ttcgtccac aatccgacc aaacggtttg atcaagtgtta ccgttggtag atcctcccaa 2760
aagtccaagt tgtaagaatt c 2781

[0110] <210>4

[0111] <211>921

[0112] <212>PRT

[0113] <213> 人工序列

[0114] <220>

[0115] <223>

[0116] <400>4

[0117]

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
20 25 30

His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
[0118]

35

40

45

Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 50 55 60

Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 65 70 75 80

Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 85 90 95

Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 100 105 110

Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 115 120 125

His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 130 135 140

Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 145 150 155 160

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175

Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190

[0119]

Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205

Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220

Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240

Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255

Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270

Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285

Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300

Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320

Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335

[0120]

Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350

Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365

Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380

Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400

Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415

Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 420 425 430

Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val
 435 440 445

Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His
 450 455 460

Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val
 465 470 475 480

[0121]

Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg
 485 490 495

Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe
 500 505 510

Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala
 515 520 525

Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu
 530 535 540

Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys
 545 550 555 560

Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala
 565 570 575

Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe
 580 585 590

Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 595 600 605

Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Met Ser Ala Val Lys
 610 615 620

Ala Ala Arg Tyr Gly Lys Asp Asn Val Arg Val Tyr Lys Val His Lys
 [0122]

| | | | |
|---|-----|-----|-----|
| 625 | 630 | 635 | 640 |
| Asp Glu Lys Thr Gly Val Gln Thr Val Tyr Glu Met Thr Val Cys Val | 645 | 650 | 655 |
| Leu Leu Glu Gly Glu Ile Glu Thr Ser Tyr Thr Lys Ala Asp Asn Ser | 660 | 665 | 670 |
| Val Ile Val Ala Thr Asp Ser Ile Lys Asn Thr Ile Tyr Ile Thr Ala | 675 | 680 | 685 |
| Lys Gln Asn Pro Val Thr Pro Pro Glu Leu Phe Gly Ser Ile Leu Gly | 690 | 695 | 700 |
| Thr His Phe Ile Glu Lys Tyr Asn His Ile His Ala Ala His Val Asn | 705 | 710 | 715 |
| Ile Val Cys His Arg Trp Thr Arg Met Asp Ile Asp Gly Lys Pro His | 725 | 730 | 735 |
| Pro His Ser Phe Ile Arg Asp Ser Glu Glu Lys Arg Asn Val Gln Val | 740 | 745 | 750 |
| Asp Val Val Glu Gly Lys Gly Ile Asp Ile Lys Ser Ser Leu Ser Gly | 755 | 760 | 765 |
| Leu Thr Val Leu Lys Ser Thr Asn Ser Gln Phe Trp Gly Phe Leu Arg | 770 | 775 | 780 |

[0123]

Asp Glu Tyr Thr Thr Leu Lys Glu Thr Trp Asp Arg Ile Leu Ser Thr
785 790 795 800

Asp Val Asp Ala Thr Trp Gln Trp Lys Gln Phe Ser Gly Leu Gln Glu
805 810 815

Val Arg Ser His Val Pro Lys Phe Asp Ala Thr Trp Ala Thr Ala Arg
820 825 830

Glu Val Thr Leu Lys Thr Phe Ala Glu Asp Asn Ser Ala Ser Val Gln
835 840 845

Ala Thr Met Tyr Lys Met Ala Glu Gln Ile Leu Ala Arg Gln Gln Leu
850 855 860

Ile Glu Thr Val Glu Tyr Ser Leu Pro Asn Lys His Tyr Phe Glu Ile
865 870 875 880

Asp Leu Ser Trp His Lys Gly Leu Gln Asn Thr Gly Lys Asn Ala Glu
885 890 895

Val Phe Ala Pro Gln Ser Asp Pro Asn Gly Leu Ile Lys Cys Thr Val
900 905 910

Gly Arg Ser Ser Gln Lys Ser Lys Leu
915 920

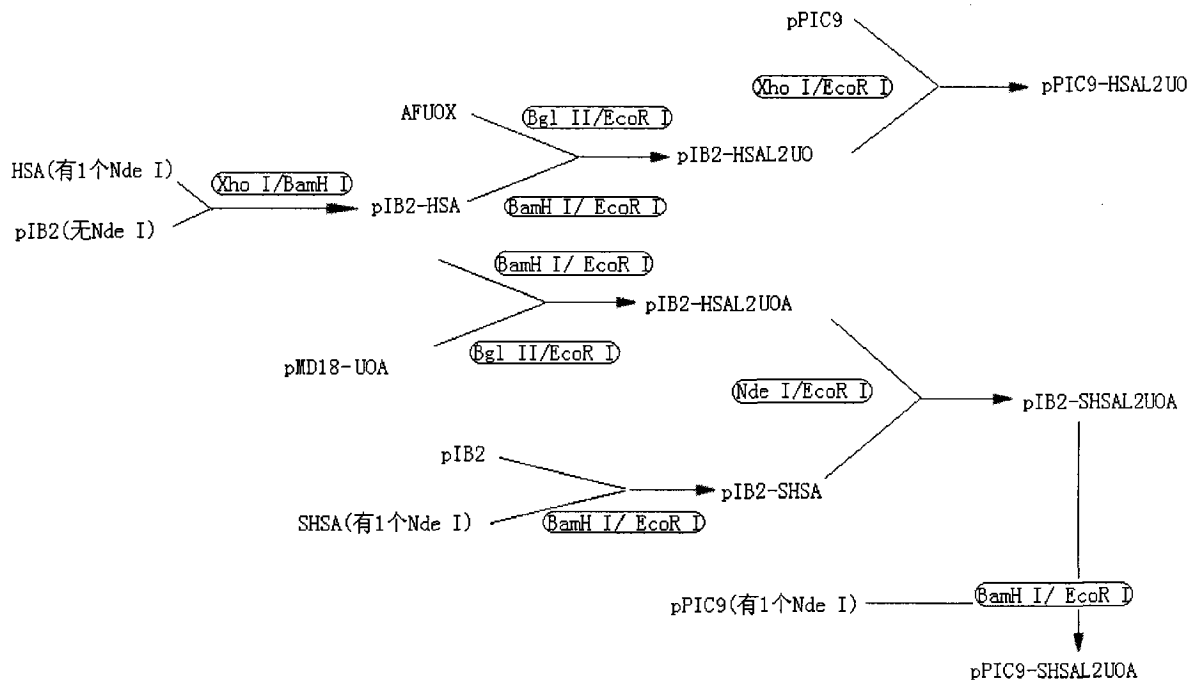


图 1

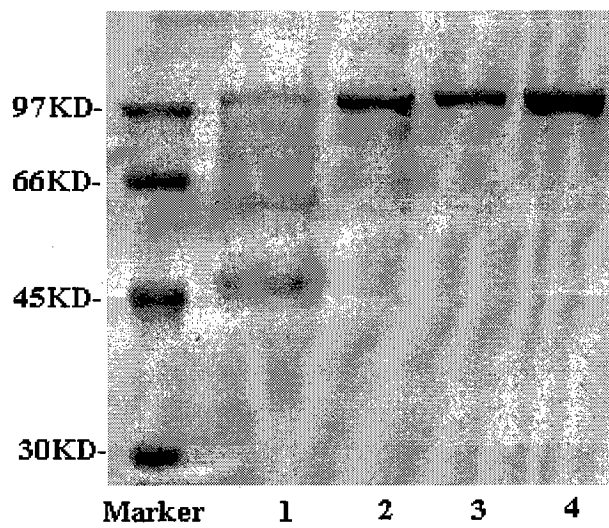


图 2

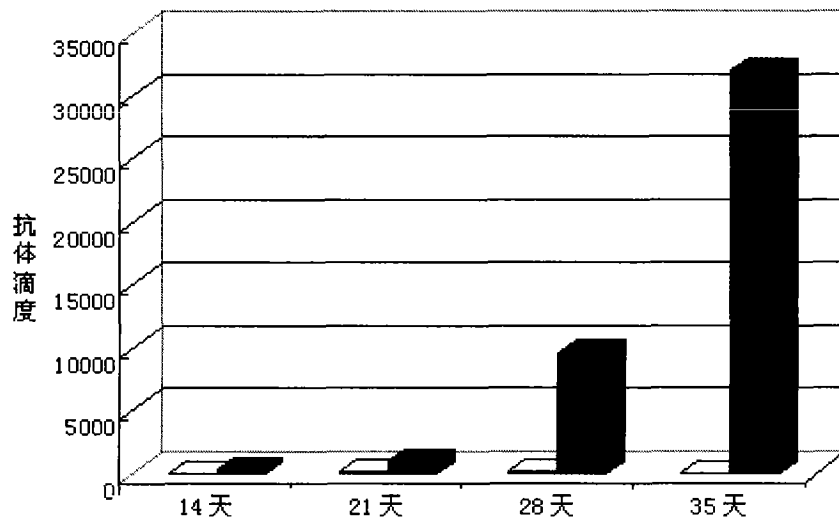


图 3