



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109553689 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201811399622.0

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.11.22

G01N 33/58(2006.01)

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号华中农业大学

申请人 广州天宝颂原生物科技开发有限公司

(72)发明人 周明 夏坤 付卫雷 吴明  
陈彦蓉

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 谭英强

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页  
序列表18页 附图2页

(54)发明名称

一种含有ApcE2突变体的融合蛋白及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种融合蛋白,其特征在于:所述融合蛋白的氨基酸序列为:F1多肽—连接保护肽1—F2多肽—连接保护肽2—F1多肽,其中F1多肽为序列为SEQ ID No.1和SEQ ID No.2中的任意一种,F2多肽序列为SEQ ID No.3~SEQ ID No.14中的任意一种。本发明中通过将ApcE2突变体与经过基因工程改造的别藻蓝蛋白亚基BDFP1.1或BDFP1.2进行融合得到一种融合蛋白,提高了ApcE2突变体在哺乳动物细胞中标记的荧光较弱的问题。并且发现在荧光标记过程中体外添加光敏色素PΦB,可有效提高融合蛋白进行细胞标记时的亮度。

1. 一种融合蛋白,其特征在于:所述融合蛋白的氨基酸序列为:F1多肽—连接保护肽1—F2多肽—连接保护肽2—F1多肽,其中F1多肽为序列为SEQ ID No.1和SEQ ID No.2中的任意一种,F2多肽序列为SEQ ID No.3~SEQ ID No.14中的任意一种。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于:F2多肽序列为SEQ ID No.8~SEQ ID No.13中的任意一种。

3. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于:连接保护肽1的长度为10~20个氨基酸。

4. 根据权利要求3所述的融合蛋白,其特征在于:连接保护肽1的序列为:GHGTGSTGSGS (SEQ ID No.15)。

5. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其特征在于:连接保护肽2的长度为5~10个氨基酸。

6. 根据权利要求5所述的融合蛋白,其特征在于:连接保护肽2的序列为:GHGTGST (SEQ ID No.16)。

7. 编码权利要求1~6任一项所述的融合蛋白的序列。

8. 权利要求1~6任一项所述的融合蛋白的制备方法:将权利要求1~6任一项所述的融合蛋白的编码序列导入微生物进行表达,之后纯化得到。

9. 权利要求1~6任一项所述的融合蛋白在对细胞进行荧光标记中的应用,优选地,细胞为哺乳动物细胞。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于:在荧光标记中还包括体外添加光敏色素PΦB。

## 一种含有ApcE2突变体的融合蛋白及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种含有ApcE2突变体的融合蛋白及其应用。

### 背景技术

[0002] 现代生物学的发展越来越依赖光学技术,例如荧光成像、光学检测及光诱导操纵等等。在活体中对深层组织进行成像定位,最好选用650nm-900nm波段的荧光。因为这个波段的光自发荧光较小、光散射小且对组织损伤较小。近年来,作为荧光探针研究较多的两类蛋白为绿色荧光蛋白家族和细菌光敏色素蛋白(BphP)。

[0003] 少数蓝细菌为了更适应环境、从环境中捕获更多的能量,慢慢进化出能利用远红光的藻胆体。这些藻胆体中通常存在不同于传统的核膜连接蛋白和一到三个别藻蓝蛋白亚基,其荧光发光机制类似于细菌光敏色素蛋白(BphP),发色团为非共价结合的藻蓝胆素PCB。

[0004] 另有研究,对来自蓝细菌*Chroococcidiopsis thermalis* sp. PCC7203的别藻蓝蛋白亚基ApcF2进行基因工程改造,得到一系列远红光和近红外光的荧光蛋白,其被命名为BDFP荧光蛋白。其中的BDFP1.1,共价结合胆绿素BV后,最大吸收波长为682nm,荧光波长707nm;BDFP1.2,最大吸收波长为642nm,荧光波长668nm。BDFP系列荧光蛋白具有较小的分子量,能与色素共价结合,性能稳定,耐受极端环境;可用于对人类细胞系、线虫细胞等活体细胞进行标记,也适用于标记乳酸杆菌、质体、线粒体等。

[0005] 最新的研究发现,ApcE2(1-273),来自蓝细菌*Synechococcus* sp. PCC7335,由S7335\_3294编码,其序列中保守的半胱氨酸被缬氨酸替代,因此与色素是以非共价方式连接,其光谱均比共价连接色素的ApcE1红移近40nm。它与藻红胆素PEB重组,最大吸收峰在614nm,最大荧光峰在628nm;与藻蓝胆素PCB重组,最大吸收峰在700nm,最大荧光峰在714nm;还可以连接光敏色素PΦB,吸收进一步红移至714nm,荧光在726nm,为目前荧光标记所能达到的最长荧光发射波长。

[0006] 由于ApcE2是膜蛋白,需要在含高浓度变性剂(3.5mol/L尿素)的条件下溶解;在室温下不够稳定,故而会影响标记。已有文献(缪丹.红移藻胆蛋白和光敏色素的研究及分子进化[D].2017.)报道:对蛋白N端、C端的截短及loop环(77-161)的部分缺失改造,并没有提高蛋白的可溶性。

[0007] 申请人在研究中以ApcE2(24-245)为模板进行基因改造后,得到的BDFP3等系列蛋白,解决了可溶性问题,结合光敏色素PΦB后,可以对大肠杆菌细胞进行荧光标记,但是在哺乳动物细胞中标记的荧光较弱。

### 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种含有ApcE2突变体的融合蛋白及其应用,解决ApcE2突变体在哺乳动物细胞中标记的荧光较弱的问题。

[0009] 本发明所采取的技术方案是:

- [0010] 一种融合蛋白,其氨基酸序列为:F1多肽—连接保护肽1—F2多肽—连接保护肽2—F1多肽,其中F1多肽为序列为SEQ ID No.1和SEQ ID No.2中的任意一种,F2多肽序列为SEQ ID No.3~SEQ ID No.14中的任意一种。
- [0011] 进一步地,F2多肽序列为SEQ ID No.8~SEQ ID No.13中的任意一种。
- [0012] 进一步地,连接保护肽1的长度为10~20个氨基酸。
- [0013] 进一步地,连接保护肽1的序列为:GHGTGSTGSGS (SEQ ID No.15)。
- [0014] 进一步地,连接保护肽2的长度为5~10个氨基酸。
- [0015] 进一步地,连接保护肽2的序列为:GHGTGST (SEQ ID No.16)。
- [0016] 编码上述的融合蛋白的序列。
- [0017] 上述的融合蛋白的制备方法:将上述融合蛋白的编码序列导入微生物进行表达,之后纯化得到。
- [0018] 上述的融合蛋白在对细胞进行荧光标记中的应用,优选地,细胞为哺乳动物细胞。
- [0019] 进一步地,在荧光标记中还包括体外添加光敏色素PΦB。
- [0020] 本发明的有益效果是:本发明中通过将ApcE2突变体与经过基因工程改造的别藻蓝蛋白亚基BDFP1.1或BDFP1.2进行融合得到一种融合蛋白,提高了ApcE2突变体在哺乳动物细胞中标记的荧光较弱的问题。并且发现在荧光标记过程中体外添加光敏色素PΦB,可有效提高融合蛋白进行细胞标记时的亮度。

#### 附图说明

- [0021] 图1为BV-BDFP1.1/1.2的荧光发射光谱与PΦB-BDFP3的吸收光谱重叠图;
- [0022] 图2为色素蛋白在大肠杆菌中的荧光显微镜成像;
- [0023] 图3为BDFP3与融合蛋白有效亮度对比图;
- [0024] 图4为细胞中重组表达生成色素蛋白后的荧光显微镜成像。

#### 具体实施方式

- [0025] 本发明中通过将ApcE2突变体 (SEQ ID No.3~SEQ ID No.14所示的任意一种) 通过连接保护肽 (SEQ ID No.15、SEQ ID No.16) 与经过基因工程改造的别藻蓝蛋白亚基BDFP1.1 (SEQ ID No.1) 或BDFP1.2 (SEQ ID No.2) 进行融合得到一种融合蛋白,以提高ApcE2突变体在哺乳动物细胞中标记的荧光较弱的问题。

[0026]

名称	SEQ ID No.	氨基酸序列
BDFP1. 1	1	NREVVETLKEFLADGEKRVQVAGVIGTNAAEVVKTAVSLLFQEYPELVSPGGCAYTTRRYNMCV RDMNYFLRMCSYAIVAGDASVLDERLLAGLRDTFNSLGIPLGPTARSIQLMKKIVKEKLVTAGMT NITFVDEPFDYIAREISETEI
BDFP1. 2	2	NREVVETLKELLADGEKRVQVAGVIGTNAAEVVKTAVSLLFQEYPELVSPGGCAYTTRRYNMCV RDMNYFLRMCSYAIVAGGASVLDERLLAGFRDTFNSLGIPLCPTARSIQLMKKIVKEKLATAGMT NIAFVDEPFDYIAREISETEI
ApcE2 突变体	3	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFLRTGLQR LEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQPEELVG MPGSGYFVAE DYLSPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAW LKGLFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFPP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	4	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFLRTGNQR LEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQPEELVG MPGSGYFVAE DYLSPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAW LKGLFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFPP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	5	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFLRTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQPEELVG MPGSGYFVAE DYLSPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAW LKGLFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFPP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	6	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQPEELVG MPGSGYFVAE DYLSPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAW LKGLFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFPP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	7	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQPEETSG MPGSGYFVAE DYLSPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAW LKGLFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK RSMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFPP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	8	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQPEELVG MPGSGYFVAE DYLSPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAW EKGDFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFPP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV

[0027]

	9	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQPEELVG MPGSGYFVAE DYLSPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAY EKGDFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFFP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	10	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQPEELVG MPGSGYFVAE DYLSPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAV ERGDFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFFP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	11	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQ SPKSRRQ TGNHGSVQNS SSSITNPVAY EKGDFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFFP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	12	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQ GNGHGSVQNS SSSITNPVAY EKGDFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFFP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	13	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQ QNS SSSITNPVAY EKGDFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFFP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
	14	VINGAHQRDR YPNHSEMQLT STFERTGNQR TEIAQTLAQH ANEIVAAGGK RIFVGGNPMA YFEQ VAY EKGDFFSGKP SVPSRFQAIN IADYGAVRMK KAMRDLGWFL RYITYAVVAG DTSIITVNTR GLRGIIPEDV TVATTVALQE MQWKSLSFFP VDSAAAALVR RYFDVLIADY QV
连接保 护肽 1	15	GHGTGSTGSGS
连接保 护肽 2	16	GHGTGST

[0028] 本发明中使用的实验方法如下：

[0029] 1. 克隆

[0030] 荧光蛋白基因编码序列克隆至载体pET28或者pcDNA3.1 (Novagen)，得到pET-fp或者pcDNA3.1-fp:ires:egfp。序列可根据需要，直接进行基因合成。fp序列克隆进入pET28载体时，可采用酶切位点BamHI和HindIII。

[0031] 为了在大肠杆菌体内产生结合光敏色素P $\Phi$ B的荧光蛋白，质粒pET-fp通过转化操作进入含有质粒pACYC-ho1-hy2的大肠杆菌BL21细胞中。质粒pACYC-ho1-hy2用于表达生成光敏色素，ho1为血红素氧化还原酶基因，hy2为光敏色素合成酶基因。

[0032] 2. 大肠杆菌体内表达及蛋白纯化

[0033] 将经转化的BL21细胞在18℃，培养在补充有卡那霉素(20 $\mu$ g/ml)和氯霉素(17 $\mu$ g/

ml) LB培养基中。当OD值达到0.4~0.6时,使用1mM异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达5~16小时,然后在4℃,12,000×g离心3min,收集细胞,经水冲洗2次,短期保存在4℃或者置于-20℃长期保存。

[0034] 在上述诱导表达的细胞中加入5mL预冷的上样缓冲液充分重悬,利用超声的方式进行破碎,细胞的重悬液必须放置在冰水混合物中。超声功率设置为300W,时长1s,间隔2s,共240次。超声结束后,放置4℃,12000r/min,离心40min后,即可取上清过镍柱提纯。

[0035] 镍离子金属螯合亲和层析具体步骤如下:首先向Ni柱中加入2倍柱体积的200mM氯化镍,待溶液流尽以后加单蒸水直至留下来的溶液不再含氯化镍(绿色)为止,然后用5倍柱体积的上样缓冲液平衡Ni柱,之后就可以上样。上样后依次用5倍柱体积的上样缓冲液和10倍柱体积的去杂蛋白液清洗柱子,最后用1mL的目的蛋白洗脱液将目的蛋白洗脱下来。Ni柱使用完毕后需要用Elution Buffer洗脱掉Ni离子,最后用5倍柱体积单蒸水处理。层析柱料于4℃用20%乙醇封存。洗脱下来的目的蛋白需要在4℃,不含咪唑的上样缓冲液中过夜透析。

[0036] 3. 哺乳动物细胞体内表达

[0037] 将HEK 293T HeLa或U-20S细胞培养在含10%胎牛血清的DMEM培养基(Invitrogen)中,将CHO-K1细胞培养在含10%胎牛血清的F-12K培养基中。使用Lipofectamine®2000(Invitrogen)进行转染。转染时,Lipofectamine®2000与DNA以3:1( $\mu$ l: $\mu$ g)的比率在无血清培养基Opti-MEM®中混合10分钟后,立即加入到要转染的细胞中。5~6h后,更换新鲜的DMEM培养基。

[0038] 4. 广域和超分辨率显微镜成像

[0039] 成像要求使用individual模式,和配有100×1.49NA油浸物镜的ECLIPSE Ti-E倒置尼康显微镜上的尼康结构化照明系统,来获取广域和结构化照明显微镜(SIM)照片。使用640nm的半导体激光器(100mW,CUBE 640-100C,COHERENT)激发FR荧光。使用受NIS-Elements AR软件(尼康)控制的电子倍增CCD相机(Andor iXon3DU897)进行数据采集。使用NIS-Elements AR对图像进行处理。

[0040] 5. 蛋白定量和结构模拟分析

[0041] 蛋白浓度检测使用Bradford法,参照物为牛血清白蛋白。

[0042] BDFP荧光蛋白结构比对,在SWISS-MODEL远程服务器上完成。采用的模板序列为钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)的藻胆蛋白ApcB(pdb code:1ALL),对比软件为Swiss-PDBViewer,版本4.1。采用PyMOL(<http://www.pymol.org/>)创建蛋白结构图。

[0043] 6. 光谱分析

[0044] 通过分光光度计(DU800,Beckman-Coulter)来检测色素蛋白的紫外-可见吸收光谱。共价结合的胆色素BV,在390nm处的吸收系数 $\epsilon = 39,900\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;非共价结合的光敏色素P $\Phi$ B(溶于尿素溶液,pH2),在702nm处的吸收系数 $\epsilon = 38,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

[0045] 通过荧光分光光度计(F320,天津港东科技发展股份有限公司)来检测荧光光谱。

[0046] 下面将结合实施例进一步阐述本发明,应理解,以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的保护范围。

[0047] 实施例1

[0048] 本实施例中使用的ApcE2突变体为BDFP3及BDFP3( $\Delta$ 88-106),氨基酸序列如SEQ

ID No.9、SEQ ID No.11所示。图1为BV-BDFP1.1/1.2的荧光发射光谱与PΦB-BDFP3的吸收光谱重叠图,可见用于融合的BDFP1.1、BDFP1.2,其吸收荧光光谱交叉重叠,有利于荧光能量共振转移,能有效地将能量传递到BDFP3系列蛋白。

[0049] 一种融合蛋白BDFP1.1:3:1.1,其氨基酸序列如SEQ ID No.17所示。

[0050] 一种融合蛋白BDFP1.2:3:1.2,其氨基酸序列如SEQ ID No.18所示。

[0051] 一种融合蛋白BDFP1.2:3(Δ88-106):1.2,其氨基酸序列如SEQ ID No.19所示。

[0052]

名称	SEQ ID No.	氨基酸序列
BDFP1.1:3:1.1	17	NREVVETLKEFLADGEKRVQVAGVIGTNAAEVVKTAVSLLFQEYPELV SPGGCAYTTRRYNMCVRDMNYFLRMCSYAIVAGDASVLDERLLAGLR DTFNSLGIPLGPTARSIQLMKKIVKEKLVTAGMTNITFVDEPFDYIAREIS ETEIGHGTGSTGSGSVINGAHQRDRYPNHSEMQTLSTFERTGNQRTEIA QTLAQHANEIVAAGGKRIFVGGNPMAVFEQPEELVGMPSGYFVAED YLSPKSRRQTGNHGSVQNSSSITNPVAYEKGDFFSGKPSVPSRFQAINI ADYGAVRMKKAMRDLGWFLRYITYAVVAGDTSIITVNTRGLRGIIPED VTVATTVALQEMQWKSLSFFPVDSAAAALVRRYFDVLIADYQVGHGT GSTNREVVETLKEFLADGEKRVQVAGVIGTNAAEVVKTAVSLLFQEYP ELVSPGGCAYTTRRYNMCVRDMNYFLRMCSYAIVAGDASVLDERLLA GLRDTFNSLGIPLGPTARSIQLMKKIVKEKLVTAGMTNITFVDEPFDYIA REISETEI



[0053]

BDFP1.2:3:1.2	18	NREVVETLKELLADGEKRVQVAGVIGTNAAEVVKTAVSLLFQEYPELV SPGGCAYTTRRYNMCVRDMNYFLRMCSYAIVAGGASVLDERLLAGFR DTFNSLGIPLCPTARSIQLMKKIVKEKLATAGMTNIAFVDEPFDYIAREIS ETEIGHGTGSTGSGSVINGAHQRDRYPNHSEMQLSTFERTGNQRTEIA QTLAQHANEIVAAGGKRIFVGGNPMAYFEQPEELVGMPSGSGYFVAED YLSPKSRRQTGNHGSVQNSSSITNPVAYEKGDFFSGKPSVPSRFQAINI ADYGAVRMKKAMRDLGWFLRYITYAVVAGDTSIITVNTRGLRGIIPED VTVATTVALQEMQWKSLSFFPVDSDAAAALVRRYFDVLIADYQVGHGT GSTNREVVETLKELLADGEKRVQVAGVIGTNAAEVVKTAVSLLFQEYPELV ELVSPGGCAYTTRRYNMCVRDMNYFLRMCSYAIVAGGASVLDERLLA GFRDTFNSLGIPLCPTARSIQLMKKIVKEKLATAGMTNIAFVDEPFDYIA REISETEI
BDFP1.1:3( $\Delta$ 8-106):1.1	19	NREVVETLKEFLADGEKRVQVAGVIGTNAAEVVKTAVSLLFQEYPELV SPGGCAYTTRRYNMCVRDMNYFLRMCSYAIVAGDASVLDERLLAGLR DTFNSLGIPLGPTARSIQLMKKIVKEKLVTAGMTNITFVDEPFDYIAREIS ETEIGHGTGSTGSGSVINGAHQRDRYPNHSEMQLSTFERTGNQRTEIA QTLAQHANEIVAAGGKRIFVGGNPMAYFEQSPKSRRQTGNHGSVQNSS SSITNPVAYEKGDFFSGKPSVPSRFQAINIADYGAVRMKKAMRDLGWF LRYITYAVVAGDTSIITVNTRGLRGIIPEDVTVATTVALQEMQWKSLSFF PVDSDAAAALVRRYFDVLIADYQVGHGTGSTNREVVETLKEFLADGEKR VQVAGVIGTNAAEVVKTAVSLLFQEYPELVSPGGCAYTTRRYNMCVR DMNYFLRMCSYAIVAGDASVLDERLLAGLRDTFNSLGIPLGPTARSIQL MKKIVKEKLVTAGMTNITFVDEPFDYIAREISETEI

[0054] 将编码上述融合蛋白的基因序列克隆进入大肠杆菌,与光敏色素P $\Phi$ B进行体内表达重组,生成色素蛋白。图2为色素蛋白在大肠杆菌中的荧光显微镜成像,a为色素蛋白BDFP1.1:3-P $\Phi$ B:1.1,b为色素蛋白BDFP1.2:3-P $\Phi$ B:1.2。

[0055] 提取纯化后得到融合蛋白,进行光谱分析;然后继续体外添加光敏色素P $\Phi$ B,再次进行光谱分析,结果如下表所示:

[0056]

Fusants	Absorption $\lambda_{\max}$ (nm)	Emission $\lambda_{\max}$ (nm)	Extinction coefficient $\epsilon$ ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Quantum yield $\Phi_F$ (%)	Molecular brightness (vs. IFP2.0,%)	Yield in <i>E. coli</i> (mg/L)
BDFP1.1:3:1.1 <sup>a</sup>	677	707	52000	5.0	35	31.2
BDFP1.1:3:1.1 <sup>b</sup>	694	722	63000	2.8	23	
BDFP1.1:3( $\Delta$ 88-106):1.1 <sup>a</sup>	684	711	62000	3.2	26	16.05
BDFP1.1:3( $\Delta$ 88-106):1.1 <sup>b</sup>	690	721	79000	2.3	24	
BDFP1.2:3:1.2 <sup>a</sup>	643	671	56000	12.7	95	29.6
BDFP1.2:3:1.2 <sup>b</sup>	708	722	128000	5.1	87	

[0057] 荧光发射光谱的激发波长在620nm。色素蛋白的分子亮度,是通过参比IFP2.0 ( $\epsilon \cdot \Phi_{f1} = 7.5 \cdot 7.5mM^{-1}cm^{-1}$ ) 得到。

[0058] a样品通过纯化后,在20mM KPB,0.5M NaCl,pH5.6缓冲环境下进行光谱分析。

[0059] b样品通过纯化后,加体外添加光敏色素P $\Phi$ B。

[0060] 图3为BDFP3与融合蛋白有效亮度对比图,

[0061] A:BDFP1.1/1.2:3:1.1/1.2:IRES:eGFP不添加光敏色素PΦB;

[0062] B:BDFP1.1/1.2:3:1.1/1.2:IRES:eGFP添加光敏色素PΦB (5μM);

[0063] C:BDFP1.1/1.2:IRES:eGFP添加光敏色素PΦB;

[0064] D:BDFP3:IRES:eGFP添加光敏色素PΦB;

[0065] E:iRFP720:IRES:eGFP。

[0066] 将编码上述融合蛋白的基因序列克隆进入HEK 293T HeLa细胞,重组表达生成色素蛋白;体外添加光敏色素PΦB,荧光显微镜成像如图4所示,(c) BDFP1.1:3:1.1在HEK293T细胞中表达后的荧光成像图;(d) BDFP1.2:3:1.2在HEK293T细胞中表达后的荧光成像图;(e) BDFP1.1:3:1.1在HEK293T细胞中表达并添加光敏色素PΦB后的荧光成像图;(f) BDFP1.2:3:1.2在HEK293T细胞中表达并添加光敏色素PΦB后的荧光成像图。

[0067] 荧光成像图下角的数字表示亮度,用平均eGFP荧光强度修正表达水平后,再参比IFP2.0得到。BDFP1.1:3:1.1,BDFP1.1:3-PΦB:1.1和iRFP720成像参数为 $\lambda_{ex}=650/45$ , $\lambda_{em}=720/40nm$ ;BDFP1.2:3:1.2和BDFP1.2:3-PΦB:1.2成像参数为 $\lambda_{ex}=630/20$ , $\lambda_{em}=720/40nm$ 。比例尺50μm。



1	5	10	15
Lys Arg Val Gln Val Ala Gly Val Ile Gly Thr Asn Ala Ala Glu Val			
	20	25	30
Val Lys Thr Ala Val Ser Leu Leu Phe Gln Glu Tyr Pro Glu Leu Val			
	35	40	45
Ser Pro Gly Gly Cys Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Tyr Asn Met Cys Val			
	50	55	60
Arg Asp Met Asn Tyr Phe Leu Arg Met Cys Ser Tyr Ala Ile Val Ala			
65	70	75	80
Gly Gly Ala Ser Val Leu Asp Glu Arg Leu Leu Ala Gly Phe Arg Asp			
	85	90	95
Thr Phe Asn Ser Leu Gly Ile Pro Leu Cys Pro Thr Ala Arg Ser Ile			
	100	105	110
Gln Leu Met Lys Lys Ile Val Lys Glu Lys Leu Ala Thr Ala Gly Met			
	115	120	125
Thr Asn Ile Ala Phe Val Asp Glu Pro Phe Asp Tyr Ile Ala Arg Glu			
	130	135	140
Ile Ser Glu Thr Glu Ile			
145	150		
<210> 3			
<211> 222			
<212> PRT			
<213> 人工合成			
<400> 3			
Val Ile Asn Gly Ala His Gln Arg Asp Arg Tyr Pro Asn His Ser Glu			
1	5	10	15
Met Gln Thr Leu Ser Thr Phe Leu Arg Thr Gly Leu Gln Arg Leu Glu			
	20	25	30
Ile Ala Gln Thr Leu Ala Gln His Ala Asn Glu Ile Val Ala Ala Gly			
	35	40	45
Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln			
	50	55	60
Pro Glu Glu Leu Val Gly Met Pro Gly Ser Gly Tyr Phe Val Ala Glu			
65	70	75	80
Asp Tyr Leu Ser Pro Lys Ser Arg Arg Gln Thr Gly Asn Gly His Ser			
	85	90	95
Val Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro Val Ala Trp Leu Lys			
	100	105	110
Gly Leu Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro Ser Arg Phe Gln Ala			

115	120	125
Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly	Ala Val Arg Met Lys	Lys Ala Met Arg
130	135	140
Asp Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr Ala Val Val Ala Gly		
145	150	155
Asp Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly Leu Arg Gly Ile Ile		
165	170	175
Pro Glu Asp Val Thr Val Ala Thr Thr Val Ala Leu Gln Glu Met Gln		
180	185	190
Trp Lys Ser Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu		
195	200	205
Val Arg Arg Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp Tyr Gln Val		
210	215	220
<210> 4		
<211> 222		
<212> PRT		
<213> 人工合成		
<400> 4		
Val Ile Asn Gly Ala His Gln Arg Asp Arg Tyr Pro Asn His Ser Glu		
1	5	10
Met Gln Thr Leu Ser Thr Phe Leu Arg Thr Gly Asn Gln Arg Leu Glu		
20	25	30
Ile Ala Gln Thr Leu Ala Gln His Ala Asn Glu Ile Val Ala Ala Gly		
35	40	45
Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln		
50	55	60
Pro Glu Glu Leu Val Gly Met Pro Gly Ser Gly Tyr Phe Val Ala Glu		
65	70	75
Asp Tyr Leu Ser Pro Lys Ser Arg Arg Gln Thr Gly Asn Gly His Ser		
85	90	95
Val Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro Val Ala Trp Leu Lys		
100	105	110
Gly Leu Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro Ser Arg Phe Gln Ala		
115	120	125
Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met Lys Lys Ala Met Arg		
130	135	140
Asp Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr Ala Val Val Ala Gly		
145	150	155
Asp Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly Leu Arg Gly Ile Ile		

	165		170		175										
Pro	Glu	Asp	Val	Thr	Val	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Leu	Gln	Glu	Met	Gln
	180		185		190										
Trp	Lys	Ser	Leu	Ser	Phe	Phe	Pro	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu
	195		200		205										
Val	Arg	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Leu	Ile	Ala	Asp	Tyr	Gln	Val		
	210		215		220										
<210>	5														
<211>	222														
<212>	PRT														
<213>	人工合成														
<400>	5														
Val	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Gln	Arg	Asp	Arg	Tyr	Pro	Asn	His	Ser	Glu
1			5						10					15	
Met	Gln	Thr	Leu	Ser	Thr	Phe	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Gln	Arg	Thr	Glu
	20							25						30	
Ile	Ala	Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	His	Ala	Asn	Glu	Ile	Val	Ala	Ala	Gly
	35						40							45	
Gly	Lys	Arg	Ile	Phe	Val	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Ala	Tyr	Phe	Glu	Gln
	50					55					60				
Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Gly	Met	Pro	Gly	Ser	Gly	Tyr	Phe	Val	Ala	Glu
65					70					75					80
Asp	Tyr	Leu	Ser	Pro	Lys	Ser	Arg	Arg	Gln	Thr	Gly	Asn	Gly	His	Ser
			85						90					95	
Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Trp	Leu	Lys
	100								105					110	
Gly	Leu	Phe	Phe	Ser	Gly	Lys	Pro	Ser	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Gln	Ala
	115								120					125	
Ile	Asn	Ile	Ala	Asp	Tyr	Gly	Ala	Val	Arg	Met	Lys	Lys	Ala	Met	Arg
	130					135					140				
Asp	Leu	Gly	Trp	Phe	Leu	Arg	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Ala	Val	Val	Ala	Gly
145					150					155					160
Asp	Thr	Ser	Ile	Ile	Thr	Val	Asn	Thr	Arg	Gly	Leu	Arg	Gly	Ile	Ile
			165						170					175	
Pro	Glu	Asp	Val	Thr	Val	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Leu	Gln	Glu	Met	Gln
	180								185					190	
Trp	Lys	Ser	Leu	Ser	Phe	Phe	Pro	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu
	195								200					205	
Val	Arg	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Leu	Ile	Ala	Asp	Tyr	Gln	Val		

210	215	220
<210> 6		
<211> 222		
<212> PRT		
<213> 人工合成		
<400> 6		
Val Ile Asn Gly Ala His Gln Arg Asp Arg Tyr Pro Asn His Ser Glu		
1	5	10
Met Gln Thr Leu Ser Thr Phe Glu Arg Thr Gly Asn Gln Arg Thr Glu		
	20	30
Ile Ala Gln Thr Leu Ala Gln His Ala Asn Glu Ile Val Ala Ala Gly		
	35	45
Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln		
	50	60
Pro Glu Glu Leu Val Gly Met Pro Gly Ser Gly Tyr Phe Val Ala Glu		
65	70	80
Asp Tyr Leu Ser Pro Lys Ser Arg Arg Gln Thr Gly Asn Gly His Ser		
	85	95
Val Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro Val Ala Trp Leu Lys		
	100	110
Gly Leu Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro Ser Arg Phe Gln Ala		
	115	125
Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met Lys Lys Ala Met Arg		
	130	140
Asp Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr Ala Val Val Ala Gly		
145	150	160
Asp Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly Leu Arg Gly Ile Ile		
	165	175
Pro Glu Asp Val Thr Val Ala Thr Thr Val Ala Leu Gln Glu Met Gln		
	180	190
Trp Lys Ser Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu		
	195	205
Val Arg Arg Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp Tyr Gln Val		
	210	220
<210> 7		
<211> 222		
<212> PRT		
<213> 人工合成		
<400> 7		

Val Ile Asn Gly Ala His Gln Arg Asp Arg Tyr Pro Asn His Ser Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Met Gln Thr Leu Ser Thr Phe Glu Arg Thr Gly Asn Gln Arg Thr Glu  
                   20                    25                    30  
 Ile Ala Gln Thr Leu Ala Gln His Ala Asn Glu Ile Val Ala Ala Gly  
                   35                    40                    45  
 Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln  
                   50                    55                    60  
 Pro Glu Glu Thr Ser Gly Met Pro Gly Ser Gly Tyr Phe Val Ala Glu  
 65                    70                    75                    80  
 Asp Tyr Leu Ser Pro Lys Ser Arg Arg Gln Thr Gly Asn Gly His Ser  
                   85                    90                    95  
 Val Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro Val Ala Trp Leu Lys  
                   100                    105                    110  
 Gly Leu Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro Ser Arg Phe Gln Ala  
                   115                    120                    125  
 Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met Lys Arg Ser Met Arg  
                   130                    135                    140  
 Asp Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr Ala Val Val Ala Gly  
 145                    150                    155                    160  
 Asp Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly Leu Arg Gly Ile Ile  
                   165                    170                    175  
 Pro Glu Asp Val Thr Val Ala Thr Thr Val Ala Leu Gln Glu Met Gln  
                   180                    185                    190  
 Trp Lys Ser Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu  
                   195                    200                    205  
 Val Arg Arg Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp Tyr Gln Val  
                   210                    215                    220

<210> 8

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 8

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



Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln  
 50 55 60  
 Pro Glu Glu Leu Val Gly Met Pro Gly Ser Gly Tyr Phe Val Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Tyr Leu Ser Pro Lys Ser Arg Arg Gln Thr Gly Asn Gly His Ser  
 85 90 95  
 Val Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro Val Ala Trp Glu Lys  
 100 105 110  
 Gly Asp Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro Ser Arg Phe Gln Ala  
 115 120 125  
 Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met Lys Lys Ala Met Arg  
 130 135 140  
 Asp Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr Ala Val Val Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Asp Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly Leu Arg Gly Ile Ile  
 165 170 175  
 Pro Glu Asp Val Thr Val Ala Thr Thr Val Ala Leu Gln Glu Met Gln  
 180 185 190  
 Trp Lys Ser Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu  
 195 200 205  
 Val Arg Arg Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp Tyr Gln Val  
 210 215 220

<210> 9

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 9

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

Val Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro Val Ala Tyr Glu Lys  
 100 105 110  
 Gly Asp Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro Ser Arg Phe Gln Ala  
 115 120 125  
 Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met Lys Lys Ala Met Arg  
 130 135 140  
 Asp Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr Ala Val Val Ala Gly  
 145 150 155 160  
 Asp Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly Leu Arg Gly Ile Ile  
 165 170 175  
 Pro Glu Asp Val Thr Val Ala Thr Thr Val Ala Leu Gln Glu Met Gln  
 180 185 190  
 Trp Lys Ser Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu  
 195 200 205  
 Val Arg Arg Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp Tyr Gln Val  
 210 215 220  
 <210> 10  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 10  
 Val Ile Asn Gly Ala His Gln Arg Asp Arg Tyr Pro Asn His Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Met Gln Thr Leu Ser Thr Phe Glu Arg Thr Gly Asn Gln Arg Thr Glu  
 20 25 30  
 Ile Ala Gln Thr Leu Ala Gln His Ala Asn Glu Ile Val Ala Ala Gly  
 35 40 45  
 Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln  
 50 55 60  
 Pro Glu Glu Leu Val Gly Met Pro Gly Ser Gly Tyr Phe Val Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Tyr Leu Ser Pro Lys Ser Arg Arg Gln Thr Gly Asn Gly His Ser  
 85 90 95  
 Val Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro Val Ala Trp Glu Arg  
 100 105 110  
 Gly Asp Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro Ser Arg Phe Gln Ala  
 115 120 125  
 Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met Lys Lys Ala Met Arg  
 130 135 140



Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp Tyr Gln Val  
 195 200  
 <210> 12  
 <211> 195  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 12  
 Val Ile Asn Gly Ala His Gln Arg Asp Arg Tyr Pro Asn His Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Met Gln Thr Leu Ser Thr Phe Glu Arg Thr Gly Asn Gln Arg Thr Glu  
 20 25 30  
 Ile Ala Gln Thr Leu Ala Gln His Ala Asn Glu Ile Val Ala Ala Gly  
 35 40 45  
 Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln  
 50 55 60  
 Gly Asn Gly His Ser Val Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro  
 65 70 75 80  
 Val Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro  
 85 90 95  
 Ser Arg Phe Gln Ala Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met  
 100 105 110  
 Lys Lys Ala Met Arg Asp Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr  
 115 120 125  
 Ala Val Val Ala Gly Asp Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly  
 130 135 140  
 Leu Arg Gly Ile Ile Pro Glu Asp Val Thr Val Ala Thr Thr Val Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Gln Glu Met Gln Trp Lys Ser Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Ser  
 165 170 175  
 Ala Ala Ala Ala Leu Val Arg Arg Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp  
 180 185 190  
 Tyr Gln Val  
 195  
 <210> 13  
 <211> 189  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 13  
 Val Ile Asn Gly Ala His Gln Arg Asp Arg Tyr Pro Asn His Ser Glu

1	5	10	15
Met Gln Thr Leu Ser Thr Phe Glu Arg Thr Gly Asn Gln Arg Thr Glu			
	20	25	30
Ile Ala Gln Thr Leu Ala Gln His Ala Asn Glu Ile Val Ala Ala Gly			
	35	40	45
Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln			
	50	55	60
Gln Asn Ser Ser Ser Ser Ile Thr Asn Pro Val Ala Tyr Glu Lys Gly			
65	70	75	80
Asp Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro Ser Arg Phe Gln Ala Ile			
	85	90	95
Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met Lys Lys Ala Met Arg Asp			
	100	105	110
Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr Ala Val Val Ala Gly Asp			
	115	120	125
Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly Leu Arg Gly Ile Ile Pro			
	130	135	140
Glu Asp Val Thr Val Ala Thr Thr Val Ala Leu Gln Glu Met Gln Trp			
145	150	155	160
Lys Ser Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Ser Ala Ala Ala Ala Leu Val			
	165	170	175
Arg Arg Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp Tyr Gln Val			
	180	185	

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 179

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;400&gt; 14

Val Ile Asn Gly Ala His Gln Arg Asp Arg Tyr Pro Asn His Ser Glu			
1	5	10	15
Met Gln Thr Leu Ser Thr Phe Glu Arg Thr Gly Asn Gln Arg Thr Glu			
	20	25	30
Ile Ala Gln Thr Leu Ala Gln His Ala Asn Glu Ile Val Ala Ala Gly			
	35	40	45
Gly Lys Arg Ile Phe Val Gly Gly Asn Pro Met Ala Tyr Phe Glu Gln			
	50	55	60
Val Ala Tyr Glu Lys Gly Asp Phe Phe Ser Gly Lys Pro Ser Val Pro			
65	70	75	80
Ser Arg Phe Gln Ala Ile Asn Ile Ala Asp Tyr Gly Ala Val Arg Met			

	85		90		95
Lys Lys Ala Met Arg Asp Leu Gly Trp Phe Leu Arg Tyr Ile Thr Tyr					
	100		105		110
Ala Val Val Ala Gly Asp Thr Ser Ile Ile Thr Val Asn Thr Arg Gly					
	115		120		125
Leu Arg Gly Ile Ile Pro Glu Asp Val Thr Val Ala Thr Thr Val Ala					
	130		135		140
Leu Gln Glu Met Gln Trp Lys Ser Leu Ser Phe Phe Pro Val Asp Ser					
145		150		155	160
Ala Ala Ala Ala Leu Val Arg Arg Tyr Phe Asp Val Leu Ile Ala Asp					
	165		170		175

Tyr Gln Val  
 <210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 15

Gly His Gly Thr Gly Ser Thr Gly Ser Gly Ser			
1	5		10

<210> 16  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 16

Gly His Gly Thr Gly Ser Thr		
1	5	

<210> 17  
 <211> 540  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 17

Asn Arg Glu Val Val Glu Thr Leu Lys Glu Phe Leu Ala Asp Gly Glu					
1	5		10		15

Lys Arg Val Gln Val Ala Gly Val Ile Gly Thr Asn Ala Ala Glu Val					
	20		25		30

Val Lys Thr Ala Val Ser Leu Leu Phe Gln Glu Tyr Pro Glu Leu Val					
	35		40		45

Ser Pro Gly Gly Cys Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Tyr Asn Met Cys Val					
50		55		60	







	100		105		110										
Gln	Leu	Met	Lys	Lys	Ile	Val	Lys	Glu	Lys	Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	Met
	115		120		125										
Thr	Asn	Ile	Ala	Phe	Val	Asp	Glu	Pro	Phe	Asp	Tyr	Ile	Ala	Arg	Glu
	130		135		140										
Ile	Ser	Glu	Thr	Glu	Ile	Gly	His	Gly	Thr	Gly	Ser	Thr	Gly	Ser	Gly
145			150		155										160
Ser	Val	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Gln	Arg	Asp	Arg	Tyr	Pro	Asn	His	Ser
			165		170										175
Glu	Met	Gln	Thr	Leu	Ser	Thr	Phe	Glu	Arg	Thr	Gly	Asn	Gln	Arg	Thr
			180		185										190
Glu	Ile	Ala	Gln	Thr	Leu	Ala	Gln	His	Ala	Asn	Glu	Ile	Val	Ala	Ala
	195		200		205										
Gly	Gly	Lys	Arg	Ile	Phe	Val	Gly	Gly	Asn	Pro	Met	Ala	Tyr	Phe	Glu
	210		215		220										
Gln	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Gly	Met	Pro	Gly	Ser	Gly	Tyr	Phe	Val	Ala
225			230		235										240
Glu	Asp	Tyr	Leu	Ser	Pro	Lys	Ser	Arg	Arg	Gln	Thr	Gly	Asn	Gly	His
			245		250										255
Ser	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Tyr	Glu
			260		265										270
Lys	Gly	Asp	Phe	Phe	Ser	Gly	Lys	Pro	Ser	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Gln
	275		280		285										
Ala	Ile	Asn	Ile	Ala	Asp	Tyr	Gly	Ala	Val	Arg	Met	Lys	Lys	Ala	Met
	290		295		300										
Arg	Asp	Leu	Gly	Trp	Phe	Leu	Arg	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Ala	Val	Val	Ala
305			310		315										320
Gly	Asp	Thr	Ser	Ile	Ile	Thr	Val	Asn	Thr	Arg	Gly	Leu	Arg	Gly	Ile
			325		330										335
Ile	Pro	Glu	Asp	Val	Thr	Val	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Leu	Gln	Glu	Met
			340		345										350
Gln	Trp	Lys	Ser	Leu	Ser	Phe	Phe	Pro	Val	Asp	Ser	Ala	Ala	Ala	Ala
			355		360										365
Leu	Val	Arg	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Leu	Ile	Ala	Asp	Tyr	Gln	Val	Gly
			370		375										380
His	Gly	Thr	Gly	Ser	Thr	Asn	Arg	Glu	Val	Val	Glu	Thr	Leu	Lys	Glu
385			390		395										400
Leu	Leu	Ala	Asp	Gly	Glu	Lys	Arg	Val	Gln	Val	Ala	Gly	Val	Ile	Gly
			405		410										415

Thr Asn Ala Ala Glu Val Val Lys Thr Ala Val Ser Leu Leu Phe Gln  
 420 425 430  
 Glu Tyr Pro Glu Leu Val Ser Pro Gly Gly Cys Ala Tyr Thr Thr Arg  
 435 440 445  
 Arg Tyr Asn Met Cys Val Arg Asp Met Asn Tyr Phe Leu Arg Met Cys  
 450 455 460  
 Ser Tyr Ala Ile Val Ala Gly Gly Ala Ser Val Leu Asp Glu Arg Leu  
 465 470 475 480  
 Leu Ala Gly Phe Arg Asp Thr Phe Asn Ser Leu Gly Ile Pro Leu Cys  
 485 490 495  
 Pro Thr Ala Arg Ser Ile Gln Leu Met Lys Lys Ile Val Lys Glu Lys  
 500 505 510  
 Leu Ala Thr Ala Gly Met Thr Asn Ile Ala Phe Val Asp Glu Pro Phe  
 515 520 525  
 Asp Tyr Ile Ala Arg Glu Ile Ser Glu Thr Glu Ile  
 530 535 540  
 <210> 19  
 <211> 521  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成  
 <400> 19  
 Asn Arg Glu Val Val Glu Thr Leu Lys Glu Phe Leu Ala Asp Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Lys Arg Val Gln Val Ala Gly Val Ile Gly Thr Asn Ala Ala Glu Val  
 20 25 30  
 Val Lys Thr Ala Val Ser Leu Leu Phe Gln Glu Tyr Pro Glu Leu Val  
 35 40 45  
 Ser Pro Gly Gly Cys Ala Tyr Thr Thr Arg Arg Tyr Asn Met Cys Val  
 50 55 60  
 Arg Asp Met Asn Tyr Phe Leu Arg Met Cys Ser Tyr Ala Ile Val Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Asp Ala Ser Val Leu Asp Glu Arg Leu Leu Ala Gly Leu Arg Asp  
 85 90 95  
 Thr Phe Asn Ser Leu Gly Ile Pro Leu Gly Pro Thr Ala Arg Ser Ile  
 100 105 110  
 Gln Leu Met Lys Lys Ile Val Lys Glu Lys Leu Val Thr Ala Gly Met  
 115 120 125  
 Thr Asn Ile Thr Phe Val Asp Glu Pro Phe Asp Tyr Ile Ala Arg Glu  
 130 135 140





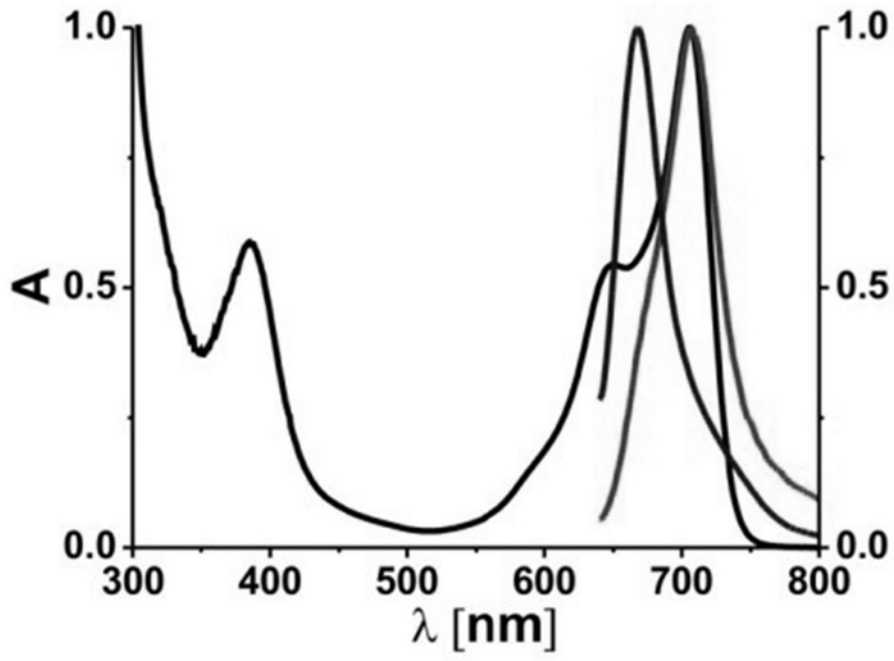


图1

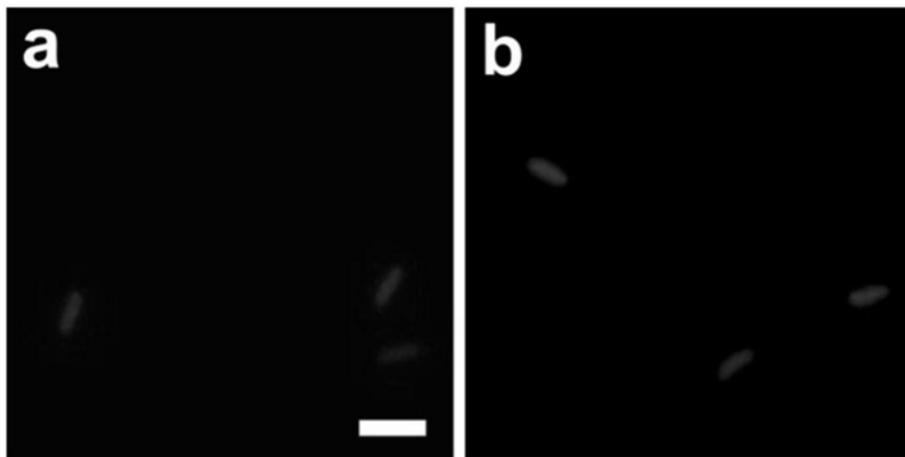


图2

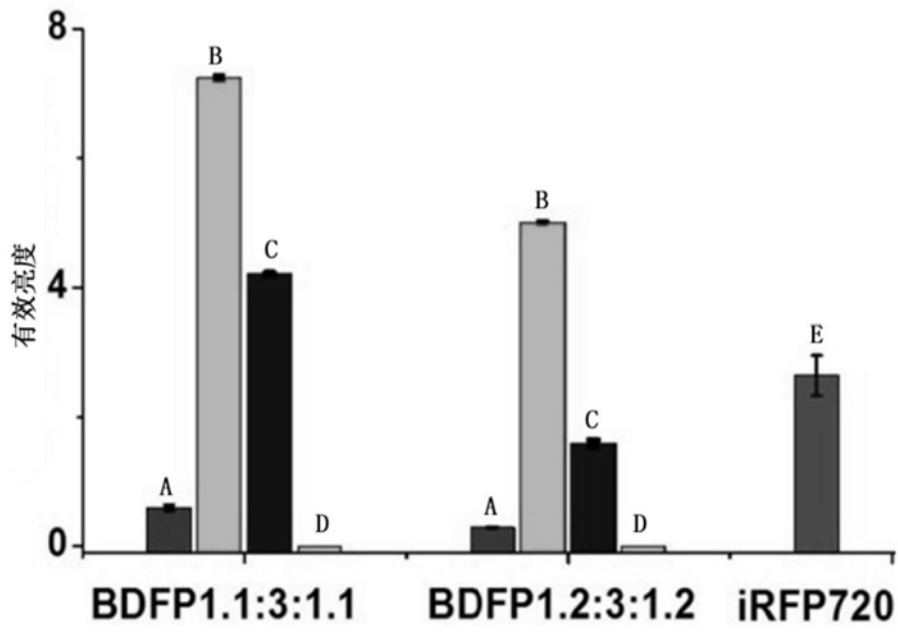


图3

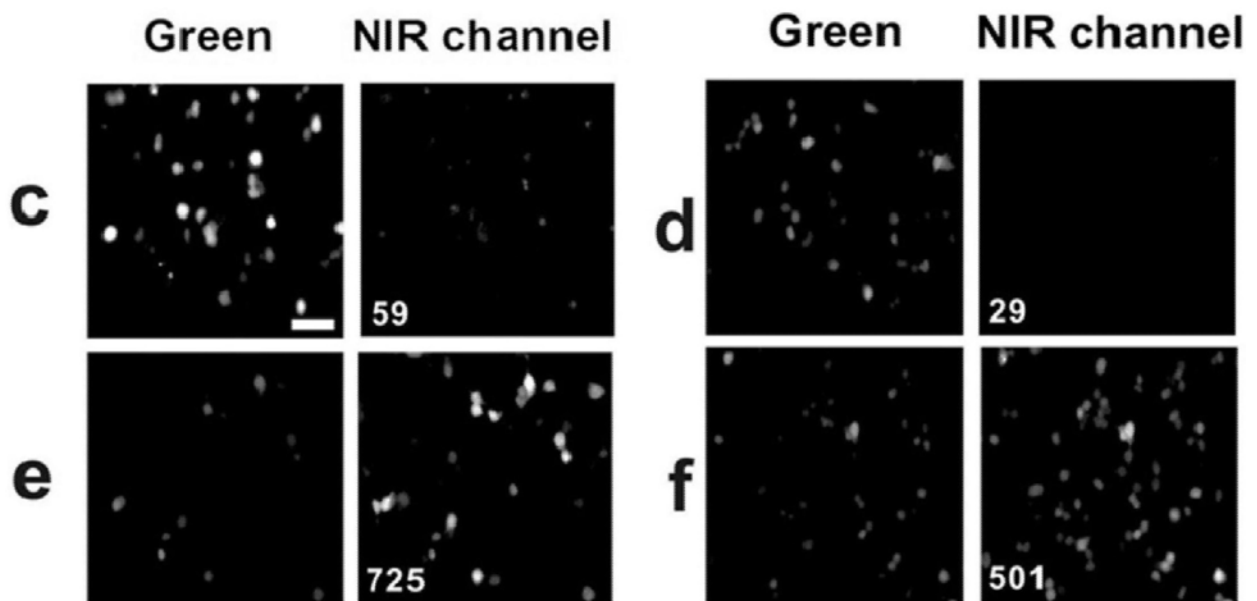


图4