



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112142848 A

(43)申请公布日 2020.12.29

(21)申请号 201910558444.X

C12P 21/06(2006.01)

(22)申请日 2019.06.26

C12N 15/62(2006.01)

(71)申请人 中国科学院大连化学物理研究所

C12N 1/21(2006.01)

地址 116023 辽宁省大连市沙河口区中山路457-41号

C12R 1/19(2006.01)

(72)发明人 梁鑫淼 叶贤龙 郭志谋 于伟

(74)专利代理机构 沈阳科苑专利商标代理有限公司 21002

代理人 马驰

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C07K 14/62(2006.01)

C07K 1/22(2006.01)

C07K 1/18(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

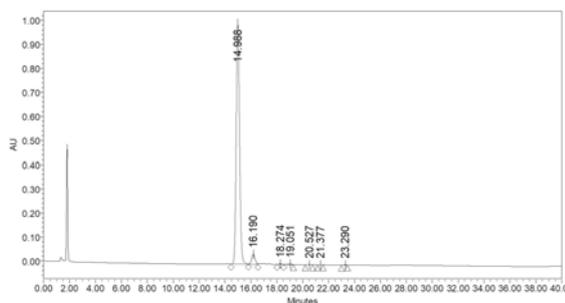
权利要求书2页 说明书6页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

一种重组人胰岛素及其纯化制备方法

(57)摘要

本发明为一种纯化制备重组人胰岛素的方法,特别涉及一种可溶性表达重组人胰岛素的纯化制备方法。首先设计合成了重组人胰岛素原的全长序列,将其连接到含有SUMO分子伴侣肽的表达载体中,将构建好的表达载体导入适当的宿主细胞,培养诱导后重组人胰岛素原融合蛋白以可溶性形式表达,经亲和色谱、酶切、离子交换、反相色谱等步骤纯化,最终获得纯度在98%以上的重组人胰岛素。本发明与现有的制备人胰岛素方法相比,具有操作简单、收率高、生产成本低等优势,适合大规模工业化生产。



1. 一种重组人胰岛素,其特征在于:所述重组人胰岛素是重组人胰岛素原与类泛素蛋白修饰分子SUMO标签融合可溶性表达,经纯化,分离得到;

所述重组人胰岛素原对应的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.4所示;

所述重组人胰岛素原编码基因的核苷酸序列如序列表中SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.3所示;

所述重组人胰岛素原与类泛素蛋白修饰分子SUMO标签融合表达在宿主细胞为可溶性表达,纯化过程中不需要复性操作。

2. 按照权利要求1所述的重组人胰岛素,其特征在于:所述重组人胰岛素原编码基因的表达载体为pET30a(+),表达载体的宿主细胞为Rossetta (DE3)。

3. 一种权利要求1所述的重组人胰岛素的纯化制备方法,其特征在于:所述重组人胰岛素是重组人胰岛素原与类泛素蛋白修饰分子SUMO标签融合可溶性表达,经纯化,分离得到;具体为:

通过重组人胰岛素原基因表达载体的构建,将编码重组人胰岛素原核苷酸序列与含有类泛素蛋白修饰分子SUMO标签的表达载体相连接得到重组表达载体;再将该重组表达载体转化宿主细胞;筛选高表达阳性宿主细胞,培养细胞并诱导表达融合胰岛素原,收集菌体、破碎、离心、澄清、纯化得到重组人胰岛素。

4. 根据权利要求3所述的重组人胰岛素纯化制备方法,其特征在于:所述的重组人胰岛素纯化制备方法具体制备步骤为:

(1) 重组人胰岛素原基因表达载体的构建;

通过DNA合成公司,合成具有SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.4基因序列的重组人胰岛素原基因序列,将合成的重组人胰岛素原目的片段与原核表达载体pET30a(+),该载体已连上SUMO基因连接,4℃连接过夜,经过酶切鉴定后,构建得到重组人胰岛素原基因表达载体pET-30a-SUMO-Insulin;

(2) 重组人胰岛素原融合蛋白的诱导表达;

将步骤(1)构建得到重组人胰岛素原基因表达载体pET-30a-SUMO-Insulin转化表达达到菌株Rosseta (DE3)上,转化后的单菌落分别接种至20mL含氨苄青霉素(Amp)(100ug/mL)的LB培养基中,37℃培养8-10h,以1:100接种于另一20mL含Amp(100μg/mL)的LB培养基中,37℃培养,当A600在0.3-0.4时,在温度为18-25℃、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)终浓度为0.1-1mmol/L、转速为40-120r/min的条件下诱导6-10h之后收集菌体;

(3) 重组人胰岛素类似物纯化分离得到重组人胰岛素;

经过步骤(2)诱导表达得到的菌体,用lysis buffer重悬,超声破碎后离心或过滤,得菌体上清澄清液,上清澄清液采用Ni柱亲和层析获得SUMO-Insulin融合蛋白粗样,向获得的SUMO-Insulin融合蛋白粗样中加入胰蛋白酶酶切,酶切产物经一步或二步S或CM阳离子交换层析中度纯化,最后经一步或2步C8或C18高效液相色谱制备技术精纯获得纯度大于98%的重组人胰岛素。

5. 根据权利要求4所述的重组人胰岛素纯化制备方法,其特征在于:

步骤(2)重组人胰岛素原融合蛋白的诱导表达中,对筛选的高表达阳性克隆菌进行大量培养并诱导表达得到菌体,通过中空纤维柱膜过滤技术对菌体进行富集,破碎,离心,上清液采用Ni亲和层析柱分离得到SUMO-Insulin融合蛋白粗样;

Ni亲和层析柱分离的条件为: Ni Sepharose6FF作为层析介质,平衡液为20mM Na₃PO₄、20mM咪唑、500mM NaCl、pH7.5,洗脱液为20mM Na₃PO₄、250mM咪唑、500mM NaCl、pH7.5;

向上述获得SUMO-Insulin融合蛋白粗样中加入胰蛋白酶混合进行酶切反应,使胰蛋白酶与SUMO-Insulin融合蛋白粗样的质量比为1:1000,将混合液于37℃下反应1h,用磷酸调节混合液pH约至4.0以终止酶切反应,得到重组人胰岛素粗品;

将上述酶切产物重组人胰岛素粗品稀释后过阳离子交换层析中度纯化,采用WorkBeads40S填料为介质,平衡缓冲液体系为20mM乙酸钠(40%乙醇)、pH4.0,洗脱缓冲液体系为20mM乙酸钠+1M氯化钠(40%乙醇)、pH4.0,采用梯度条件为10%1BV、40%3BV、100%2BV的方式洗脱目标蛋白,得纯度较高的重组人胰岛素;

将上述阳离子交换层析中度纯化的重组人胰岛素再经高效液相色谱技术进一步精纯,采用配基为C8的硅胶填料,粒径为10μm,流动相体系为50mM醋酸铵-乙腈缓冲液,梯度条件为10-30%1BV、30-60%6BV、100%1BV,收集洗脱峰,HPLC分析,合并合格馏分得到重组人胰岛素纯品;

HPLC分析条件如下:

1) 色谱柱填料:Unitary C18(5μm,4.6*250mm,100Å);

2) 流动相:磷酸盐缓冲液:称取磷酸二氢钠20.7g,加800ml水溶解,85%磷酸调节pH至2.5,然后加水至1000ml A相:磷酸缓冲盐250ml+乙腈250ml+水400ml+氯化钠18.4g,溶解后加水至1000ml B相:磷酸缓冲盐250ml+乙腈650ml+水50ml+氯化钠3.2g,溶解后加水至1000ml;

3) 流速:1ml/min;

4) 梯度条件:0-20min从4-17%B相,20-30min从17-37%B相,30-40min从37-4%B相;

5) 柱温:35℃;

6) 检测波长:214nm;

7) 进样体积:2μl。

一种重组人胰岛素及其纯化制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及一种制备重组人胰岛素的方法,特别涉及一种可溶性表达和纯化重组人胰岛素的制备方法。

背景技术

[0002] 糖尿病是全球范围内威胁人类健康的一类重大疾病。全球糖尿病患者的数量正逐年增长,预计2030年将达到5.52亿。糖尿病药物种类很多,其中胰岛素是至今仍广泛使用的治疗糖尿病的特效药物,因此胰岛素的消耗量也会逐年递增。胰岛素的临床用药量大,每个糖尿病患者每天需使用胰岛素约1.5-2.0mg,且需终身用药,因此开发一种用于大规模低成本制备胰岛素的工艺方法具有良好的商业价值和社会意义。

[0003] 目前重组人胰岛素及其类似物的生产采用了两套系统,其一是用酵母系统,其二是用大肠杆菌系统。相对细菌,酵母菌生长慢,导致生产周期长,且表达水平一般。应用大肠杆菌表达重组人胰岛素生产的方式主要包括三种方式:一种是重组大肠杆菌分别表达胰岛素的A链和B链,表达产物经溴化氰(bromine cyanide, CNBr)切下融合导肽片段后,得到的A链和B链经纯化后再进行复性,最后得到有活性的重组人胰岛素。由于该方式的复性率只有10%左右,采用这条工艺生产的胰岛素成本太高。第二种也是目前仍然是诸多公司生产重组人胰岛素的主要方式。通常采用融合蛋白的形式,将人胰岛素原接在一个较大的N-端融合蛋白后面,大大增加了胰岛素原的表达量(10%-30%)(Castellanos-Serra, et al.1996; Tikhonov, et al.2001),表达产物通过溴化氰释放出人胰岛素原。由于C肽的存在,胰岛素原能形成良好的空间构象,折叠率达到70%,从而在一定程度上降低了胰岛素的生产成本。第三种方式是丹麦诺和诺德公司采用的A、B链同时表达的方法,在A链前端和A、B链中间均有甲硫氨酸。表达产物经溴化氰处理,得到A链和B链,再经过复性和纯化得到有活性的重组人胰岛素,这种方式与第一种方式存在着同样的因为复性效率带来的成本问题。

[0004] 综上所述,重组人胰岛素的制备工艺中,普遍存在的问题是生产过程复杂,包涵体表达复性率低造成生产成本高。本发明将重组人胰岛素原与SUMO标签融合,在大肠杆菌中以可溶形式表达,增加了胰岛素的表达量,纯化过程中不需要变复性工序,简化了纯化工艺、提高了胰岛素回收率、降低了生产成本。

发明内容

[0005] 本发明解决的技术问题是提供了一种重组人胰岛素及其纯化制备方法,该重组人胰岛素由类泛素蛋白修饰分子SUMO标签和重组人胰岛素原融合而成,构建的重组融合蛋白具有可溶性表达、表达量高的特点。

[0006] 本发明为解决上述技术问题采用如下技术方案,一种重组人胰岛素是类泛素蛋白修饰分子SUMO标签和重组人胰岛素原融合而成,重组人胰岛素原对应的氨基酸序列如序列表中SEQ ID NO.2和SEQ ID NO.4所示。

[0007] 重组胰岛素原编码基因的核苷酸序列如序列表中SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.3所

示。

[0008] 本发明所述的含有重组人胰岛素原融合蛋白编码基因的表达载体和表达载体的宿主细胞,表达载体为pET30a(+),宿主细胞为Rossetta(DE3)。

[0009] 本发明重组人胰岛素的纯化制备方法,具体过程为:将编码重组人胰岛素原核苷酸序列与含有SUMO标签的表达载体相连接得到重组表达载体;再将该重组表达载体转化宿主细胞;筛选高表达阳性宿主细胞,培养细胞并诱导表达融合胰岛素原,收集菌体、破碎、离心、澄清、纯化得到重组人胰岛素蛋白。

[0010] 所述的重组人胰岛素纯化制备方法具体制备步骤为:

[0011] (1) 重组人胰岛素原基因表达载体的构建;

[0012] 通过DNA合成公司,合成具有SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4基因序列的重组人胰岛素原基因序列,将合成的重组人胰岛素原目的片段与原核表达载体pET30a(+),该载体已连上SUMO基因连接,4℃连接过夜,经过酶切鉴定后,构建得到重组人胰岛素原基因表达载体 pET-30a-SUMO-Insulin;

[0013] (2) 重组人胰岛素原融合蛋白的诱导表达;

[0014] 将步骤(1)构建得到重组人胰岛素原基因表达载体pET-30a-SUMO-Insulin 转化表达菌株Rosseta(DE3)上,转化后的单菌落分别接种至20mL含Amp(100ug/mL)的LB培养基中,37℃培养8-10h,以1:100接种于另一20mL含Amp(100μg/mL)的LB培养基中,37℃培养,当A600在0.3-0.4时,在温度为18-25℃、IPTG终浓度为0.1-1mmol/L、转速为40-120r/min的条件下诱导6-10h之后收集菌体;在此条件下进行表达重组融合蛋白SUMO-Insulin时,能够显著提高重组融合蛋白的表达水平。

[0015] (3) 重组人胰岛素类似物纯化分离得到重组人胰岛素;

[0016] 经过步骤(2)诱导表达得到的菌体,用lysis buffer悬浮,超声破碎后离心或过滤,得菌体上清澄清液,上清澄清液采用Ni柱亲和层析获得SUMO-Insulin 融合蛋白粗样,向获得的SUMO-Insulin融合蛋白粗样中加入胰蛋白酶酶切,酶切产物经一步或二步S或CM阳离子交换层析中度纯化,最后经一步或2步C8 或C18高效液相色谱制备技术精纯获得纯度大于98%的重组人胰岛素。

[0017] 优选的,步骤(2)重组人胰岛素原融合蛋白的诱导表达中,筛选高表达阳性克隆菌进行大量培养并诱导表达得到菌体,通过中空纤维柱膜过滤技术对菌体进行富集,破碎,离心,上清液采用Ni亲和层析柱分离得到SUMO-Insulin融合蛋白粗样;

[0018] 将分离得到的SUMO-Insulin融合蛋白粗样中加入胰蛋白酶酶切,酶切产物经一步或2步S或CM阳离子交换层析中度纯化,最后经一步或2步C8或C18 高效液相制备技术精纯获得纯度大于98%的重组人胰岛素蛋白。

[0019] 本发明与现有技术相比具有以下有益效果:本发明通过重组人胰岛素与SUMO标签融合表达提高了胰岛素表达量,实现胰岛素可溶表达,解决了包涵体复性率低的问题,降低胰岛素生产成本。

附图说明

[0020] 图1是重组人胰岛素融合蛋白SUMO-Insulin诱导表达的SDS-PAGE电泳分析。

[0021] 图2是重组人胰岛素类似物纯化的Tricin-SDS-PAGE电泳分析。

[0022] 图3是纯化的重组人胰岛素类似物的HPLC分析。

具体实施方式

[0023] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0024] 说明:本发明中涉及的基因的设计、合成和克隆、表达载体的构建、核酸提取、测序和鉴定,以及表达产物的分离和纯化等操作步骤,可按照本领域已知的技术进行(参见CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0025] 实施例1

[0026] 重组人胰岛素原基因表达载体的构建

[0027] 通过DNA合成公司(Invitrogen公司),合成具有SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.4基因序列的重组人胰岛素原基因序列。

[0028] 将合成的重组人胰岛素原目的片段与原核表达载体pET30a(+)(该载体已连上SUMO基因)连接,连接反应体系(10 μ l)如下:

	pET30a (+) 载体	1.0 μ l (10 ng)
	纯化的胰岛素双酶切产物	1.0 μ l (20 ng)
[0029]	10 \times T ₄ Ligation Buffer	1.0 μ l
	T ₄ DNA Ligase	1.0 μ l
	ddH ₂ O	6.0 μ l

[0030] 共10 μ l体系,混匀,4 $^{\circ}$ C连接过夜。经过酶切鉴定后,构建得到重组人胰岛素原基因表达载体pET-30a-SUMO-Insulin。

[0031] 实施例2

[0032] 重组人胰岛素原融合蛋白的诱导表达

[0033] 将构建得到重组人胰岛素原基因表达载体pET-30a-SUMO-Insulin转化至表达菌株Rosetta (DE3) (北京全式金生物技术有限公司,目录号:CD801)。转化后的单菌落分别接种至20mL含氨苄青霉素(Amp)(100ug/mL)的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C培养8h,以1:100接种于另一20mL含Amp(100ug/mL)的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C培养,当A600在0.35左右时,加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.25mmol/L进行诱导,诱导温度为20 $^{\circ}$ C,4h后收获菌体,用lysis buffer缓冲液(20mM Na₃PO₄、20mM咪唑、500mM NaCl、pH 7.5)重悬菌体,破碎菌体后离心,分别取上清液和沉淀进行12%SDS-PAGE电泳分析。结果显示重组人胰岛素可溶性显著增加,如图1所示。泳道1:标准蛋白分子量Maker; 2:未诱导的全菌;3:诱导的全菌;4:SUMO-Insulin破菌后沉淀;5:SUMO-Insulin 破菌后上清。

[0034] 实施例3

[0035] 胰岛素类似物的纯化分离

[0036] 按照实施例2的重组人胰岛素原融合蛋白的诱导表达的条件,扩大培养,诱导表达后收集菌体,用lysis buffer悬浮,超声破碎后离心或过滤,得菌体上清澄清液。

[0037] 将上述上清澄清液采用亲和层析进行纯化,用Ni Sepharose 6FF作为层析介质,平衡液为lysis buffer缓冲液。洗脱液为20mM Na₃PO₄、250mM咪唑、500mM NaCl、pH 7.5,获得SUMO-Insulin融合蛋白粗样。

[0038] 向上述获得SUMO-Insulin融合蛋白粗样中加入胰蛋白酶混合进行酶切反应,使胰蛋白酶与SUMO-Insulin融合蛋白粗样的质量比为1:1000,将混合液于37℃下反应1h,用磷酸调节混合液pH约至4.0以终止酶切反应,得到重组人胰岛素粗品。

[0039] 将上述酶切产物重组人胰岛素粗品稀释后过阳离子交换层析中度纯化,采用WorkBeads 40S填料为介质,平衡缓冲液体系为20mM乙酸钠(40%乙醇)、pH 4.0,洗脱缓冲液体系为20mM乙酸钠+1M氯化钠(40%乙醇)、pH 4.0,采用梯度条件为10%1BV、40%3BV、100%2BV的方式洗脱目标蛋白,得纯度较高的重组人胰岛素。

[0040] 将上述离子交换纯化的重组人胰岛素(经氨基酸序列分析,所得结构与预期一致)再经高效液相色谱技术进一步精纯,采用配基为C8的硅胶填料(粒径为10μm),流动相体系为50mM醋酸铵-乙腈缓冲液,梯度条件为10-30%1BV、30-60%6BV、100%1BV,按照紫外峰值收集各洗脱馏分,并进行HPLC分析,合并纯度高于96%的馏分得重组人胰岛素纯品。

[0041] Tricin-SDS-PAGE分析结果如图2所示,泳道1:标准分子量蛋白Marker;2:第一次过Ni层析洗脱样品;3:胰酶酶切后样品;4:第二次过Ni流穿样品;5:第二次过Ni洗脱样品;6、7、8、9、10过离子交换层析不同浓度NaCl洗脱样品(还原上样缓冲液)

[0042] 对电泳图谱显示较纯的样品进行高效液相色谱分析,谱图结果如图3显示,经分析,本方法纯化制备的胰岛素样品纯度较高,达98%以上。HPLC分析条件如下:

[0043] (1) 色谱柱填料:Unitary C18(5μm,4.6*250mm,100Å);

[0044] (2) 流动相:磷酸盐缓冲液:称取磷酸二氢钠20.7g,加800ml水溶解,85%磷酸调节pH至2.5,然后加水至1000ml A相:磷酸缓冲盐250ml+乙腈250ml+水400ml+氯化钠18.4g,溶解后加水至1000ml B相:磷酸缓冲盐250ml+乙腈650ml+水50ml+氯化钠3.2g,溶解后加水至1000ml。

[0045] (3) 流速:1ml/min;

[0046] (4) 梯度条件:0-20min从4-17%B相,20-30min从17-37%B相,30-40min从37-4%B相;

[0047] (5) 柱温:35℃;

[0048] (6) 检测波长:214nm;

[0049] (7) 进样体积:2μl。

[0050] 以上实施例描述了本发明的基本原理、主要特征及优点,本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理,在不脱离本发明原理的范围下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进均落入本发明保护的范围内。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院大连化学物理研究所

<120> 一种纯化制备重组人胰岛素类似物的方法

<160> 10

<170> PatentIn version 3.3

[0051]

<210> SEQ ID NO:1

<211> 180

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> SEQ ID NO:1

[0052]

CTGGGTACCG GTCCGCGTTT CGTTAACCAG CACCTGTGCG GTTCTCACCT GGTGAAGCT 60
 CTGTACCTGG TTTGCGGTGA ACGTGGTTTC TTCTACACCC CGAAAACCCG TCGTGGTATC 120
 GTTGAACAGT GCTGCACCTC TATCTGCTCT CTGTACCAGC TGGAAAACTA CTGCGGTAA 180

<210> SEQ ID NO:2

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> SEQ ID NO:2

Leu Gly Thr Gly Pro Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala 20
 Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Gly Ile 40
 Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly *** 59

<210> SEQ ID NO:3

<211> 177

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> SEQ ID NO:3

CTGGGTACCG GTCCGCGTTT CGTTAACCAG CACCTGTGCG GTTCTCACCT GGTGAAGCT 60
 CTGTACCTGG TTTGCGGTGA ACGTGGTTTC TTCTACACCC CGAAAACCCG TGGTATCGTT 120
 GAACAGTGCT GCACCTCTAT CTGCTCTCTG TACCAGCTGG AAACTACTG CGGTTAA 177

<210> SEQ ID NO:4

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> SEQ ID NO:4

Leu Gly Thr Gly Pro Arg Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala 20
 Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Gly Ile Val 40
 Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Gly *** 58

序列表

<110> 中国科学院大连化学物理研究所
 <120> 一种重组人胰岛素及其纯化制备方法

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 180

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

```
ctgggtaccg gtccgcgttt cgtaaccag cacctgtgcg gttctcacct ggttgaagct 60
ctgtacctgg tttgcggtga acgtggttcc ttctacaccc cgaaaaccg tcgtggtatc 120
gttgaacagt gctgcacctc tatctgetct ctgtaccagc tggaaaacta ctgcggttaa 180
```

<210> 2

<211> 59

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

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

<210> 3

<211> 177

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

```
ctgggtaccg gtccgcgttt cgtaaccag cacctgtgcg gttctcacct ggttgaagct 60
ctgtacctgg tttgcggtga acgtggttcc ttctacaccc cgaaaaccg tggatcgtt 120
gaacagtget gcacctctat ctgetctctg taccagctgg aaaactactg cgggttaa 177
```

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

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

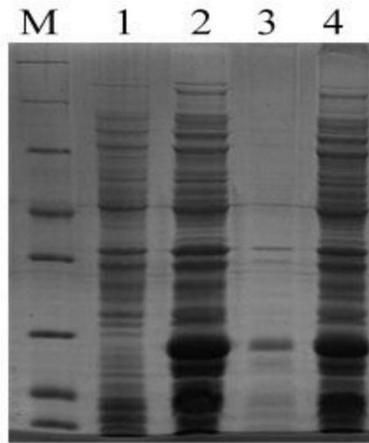


图1

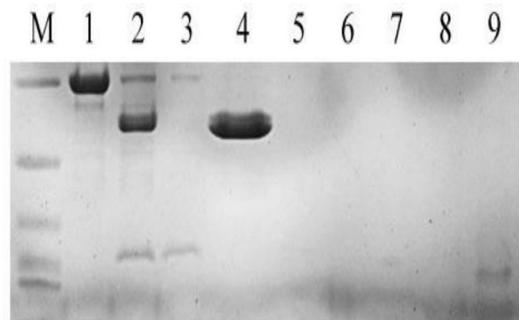


图2

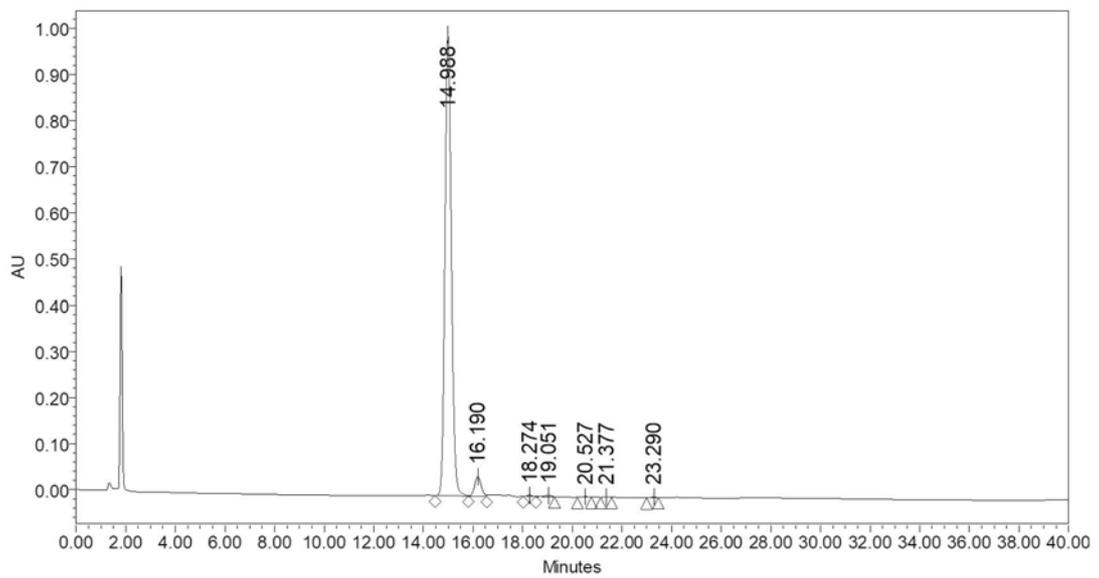


图3