



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111909916 B

(45) 授权公告日 2021.06.08

(21) 申请号 202010657454.1

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2020.07.09

G12N 9/22 (2006.01)

G12N 15/81 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111909916 A

审查员 姜鑫

(43) 申请公布日 2020.11.10

(73) 专利权人 江苏海洋大学

地址 222000 江苏省连云港市新浦区苍梧路59号

专利权人 江苏愚公生命科技有限公司

(72) 发明人 卢辰 司鑫鑫 邵钰晨 马燕燕

李婷婷

(74) 专利代理机构 北京和联顺知识产权代理有

限公司 11621

代理人 闫超良

权利要求书1页 说明书5页

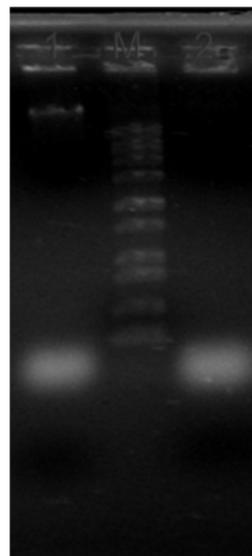
序列表3页 附图5页

(54) 发明名称

一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶及其制备方法。将来源于南极磷虾的DSN基因编码序列进行密码子优化,克隆到毕赤酵母表达载体中,构建重组表达载体。用电转化方法将质粒转入毕赤酵母感受态细胞中,获得能高效分泌表达DSN的菌株,在甲醇诱导下,实现DSN的分泌表达。收集发酵液上清,运用镍基质亲和层析方法进行纯化,获得高纯度的DSN蛋白。活性测试结果表明,重组表达获得的南极磷虾DSN具有高效切割DNA双链的能力,对单链DNA和RNA无效,可用于去除RNA样品中DNA的污染。



1. 一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶,其特征在于,所述双链特异性核酸酶的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

2. 一种制备权利要求1所述双链特异性核酸酶的方法,其具体步骤如下:

S1: 按照毕赤酵母密码子偏好性优化DSN编码序列,合成该序列;

S2: 利用基因重组的方法构建DSN重组表达质粒;

S3: 转化毕赤酵母菌株,筛选阳性转化子;

S4: 毕赤酵母重组表达菌株发酵;

S5: 分离纯化发酵液上清中的DSN。

3. 根据权利要求2所述的一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶的制备方法,其特征在于:所述重组表达质粒具体的构建方法是:以合成优化过的DSN编码序列为模板进行PCR扩增,获得目的片段;将pPIC9K载体用EcoRI和NotI双酶切,然后将载体和片段通过无缝克隆进行连接转化,将转化产物转入大肠杆菌,获得重组表达质粒pPIC9k-DSN。

4. 根据权利要求2所述的一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶的制备方法,其特征在于:所述由毕赤酵母重组菌株发酵上清液中分离纯化DSN的方法是:4℃条件下,将发酵液上清加到平衡好的镍基质亲和层析柱,用含100mM-1M咪唑的洗脱液进行洗脱,浓缩后,再利用凝胶过滤层析柱进行上样洗脱,获得纯化DSN蛋白。

5. 一种如权利要求1所述南极磷虾双链特异性核酸酶的应用,其特征在于:重组表达的南极磷虾DSN蛋白具有高效切割DNA双链的能力,对单链DNA和RNA无效,应用于去除RNA样品中的DNA污染。

## 一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及核酸酶领域,具体为一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 双链特异性核酸酶最早是2002年从堪察加蟹的肝胰脏中发现的一种核酸酶。该酶是一种分子量为41.5kD的单体,能高效识别、切割DNA双链或者DNA/RNA杂交双链中的DNA链,而对单链DNA和单/双链RNA几乎没有作用。此外,这种酶能够区分完全匹配和不完全匹配的短DNA双链,对完全互补配对的短片段双链DNA(8-12bp)具有很高的酶活性,对于不完全互补配对的短片段双链DNA几乎没有酶活性。DSN酶优异的选择性酶切能力使其在生物和医学等领域中展现出巨大的应用前景,一经面世很快被EVROGEN公司制成商品,广泛应用于分子生物学研究,如全长cDNA文库均一化、单核苷酸多态性(SNP)检测和高通量测序等。

[0003] 2010年研究人员又从北极虾胰脏中分离出一种新的DSN酶。与勘察加蟹来源的DSN相比,北极虾中DSN具有更高的比活力,且该酶是一种热敏核酸酶,最适反应温度为35-40℃,可通过中等热处理(65℃15分钟)灭活,且热失活表现为不可逆,更适合用于PCR相关技术中的DNA污染处理。

[0004] 本发明在南极磷虾中鉴定出另一来源的新的DSN酶,并将其在毕赤酵母中成功表达,获得有功能的DSN蛋白,对其进行了活性检测,证明具有高效切割DNA双链的能力,对单链DNA和RNA无效,并将其应用于RNA样品中DNA污染的去。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种双链特异性核酸酶,其特征在于,所述双链特异性核酸酶的氨基酸序列与SEQ ID No.1存在至少90%以上一致性。

[0006] 一种双链特异性核酸酶的制备方法,其具体步骤如下:

[0007] S1:按照毕赤酵母密码子偏好性优化DSN编码序列,合成该序列;

[0008] S2:利用基因重组的方法构建DSN重组表达质粒;

[0009] S3:转化毕赤酵母菌株,筛选阳性转化子;

[0010] S4:毕赤酵母重组表达菌株发酵;

[0011] S5:分离纯化发酵液上清中的DSN。

[0012] 作为本发明的一种优选技术方案,所述重组表达质粒具体的构建方法是:以合成优化过的DSN编码序列为模板进行PCR扩增,获得目的片段;将pPIC9K载体用EcoRI和NotI双酶切,然后将载体和片段通过无缝克隆进行连接转化,将转化产物转入大肠杆菌,获得重组表达质粒pPIC9k-DSN。

[0013] 作为本发明的一种优选技术方案,所述由毕赤酵母重组菌株发酵上清液中分离纯化DSN的方法是:4℃条件下,将发酵液上清加到平衡好的镍基质亲和层析柱,用含100mM-1M咪唑的洗脱液进行洗脱,浓缩后,再利用凝胶过滤层析柱进行上样洗脱,获得纯化DSN蛋白。

[0014] 一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶的应用,重组表达的南极磷虾DSN蛋白具有高效切割DNA双链的能力,对单链DNA和RNA无效,应用于去除RNA样品中的DNA污染。

[0015] 本发明的有益效果:南极磷虾DSN的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,经密码子优化,将该基因序列克隆到赤酵母表达载体pPIC9K中,构建重组表达载体。用电转化方法将质粒转入到毕赤酵母菌感受态细胞中,筛选出阳性转化子,获得能高效分泌表达DSN酶的菌株,在甲醇诱导下,实现DSN的分泌表达。收集发酵液,用Ni基质亲和层析、凝胶过滤层析纯化获得DSN蛋白。酶活测试结果表明,表达纯化的南极磷虾DSN蛋白高效切割DNA双链的能力,对单链DNA和RNA无效,可用于RNA样品中DNA污染的去。

### 附图说明

[0016] 图1:为本发明毕赤酵母表达DSN转化子发酵液粗酶活图;

[0017] 从左往右:泳道1为底物;泳道M为DNA Marker;泳道2为发酵液粗酶液。

[0018] 图2:为本发明纯化所得南极磷虾DSN蛋白的SDS-PAGE图;

[0019] 从左往右:泳道1为纯化所得南极磷虾DSN蛋白;泳道M为蛋白Marker。

[0020] 图3:为本发明纯化所得南极磷虾DSN对双链DNA具有切割活性;

[0021] 从左往右:1为南极磷虾DSN的酶活结果;M为DNA Marker;2为阴参(不加酶)。

[0022] 图4:为本发明纯化所得南极磷虾DSN对单链DNA无切割活性;

[0023] 其中,从左往右:M为DNA Marker,1为南极磷虾切割15bp的单链DNA,2为阴参(不加酶)。

[0024] 图5:为本发明纯化所得南极磷虾DSN对RNA无切割活性;

[0025] 其中,从左往右:1为北极虾切割tRNA,2为南极磷虾切割tRNA,3为阴参(tRNA),M为DNA Marker。

### 具体实施方式

[0026] 下面对本发明的较佳实施例进行详细阐述,以使本发明的优点和特征能更易于本领域人员理解,从而对本发明的保护范围做出更为清楚明确的界定。

[0027] 一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶及其制备方法,具体步骤如下:

[0028] S1:按照毕赤酵母密码子偏好性优化DSN编码序列,合成该序列;

[0029] S2:利用基因重组的方法构建DSN重组表达质粒;

[0030] S3:转化毕赤酵母菌株,筛选阳性转化子;

[0031] S4:毕赤酵母重组表达菌株发酵;

[0032] S5:分离纯化发酵液上清中的DSN。

[0033] 所述双链特异性核酸酶的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0034] 所述S2中构建重组表达质粒的方法是指利用EcoRI和NotI双酶切酵母表达载体,所用载体可以是pPIC9K,也可以是pPIC9、pPICZαA/B/C等;以合成优化过的DSN编码序列为模板进行PCR扩增,获得目的片段;然后将载体和片段通过无缝克隆进行连接转化,将转化产物转入大肠杆菌,获得重组表达载体。

[0035] 所述S3中转化毕赤酵母菌株细胞的方法包括电击转化和化学转化等。

[0036] 其中电击转化是指利用限制酶SacI或SalI对构建所得的重组表达质粒进行线性

化,以电压1500V、放电时间4.0ms电击转化毕赤酵母菌株感受态细胞;平板筛选阳性转化子是指通过MD平板筛选获得his<sup>+</sup>转化子以及含G418的YPD平板筛选获得阳性转化子;所述毕赤酵母菌株选自GS115、KM71、SMD1168等。

[0037] 所述S4中的毕赤酵母重组菌株发酵的方法是指在平板挑取转化子接种于培养基中,通过摇瓶发酵筛选,获得高分泌表达DSN的毕赤酵母菌株;所述培养基包括BMGY、BMMY和YPD;

[0038] MD平板的配方是:15g琼脂粉+800ml ddH<sub>2</sub>O,121℃,20min;待温度降至60℃,加100ml 10x YNB,100ml 10x D,2ml 500x B;

[0039] 所述YPD培养基的配方是(/L):10g Yeast Extract,20g PePtone,20g glucose定容至1L;固体补加1.5%琼脂粉;115℃,15min;

[0040] 所述BMGY培养基的配方是(/L):10g Yeast Extract,20g PePtone定容至700ml ddH<sub>2</sub>O中,121℃,20min;待温度降至60℃,加入100ml 10x YNB,100ml 10x GY,100ml 1M磷酸钾,2ml 500x B;

[0041] 所述BMMY培养基的配方是(/L):10g Yeast Extract,20g PePtone定容至793ml ddH<sub>2</sub>O中,121℃,20min;待温度降至60℃,加入100ml 10x YNB,100ml 10x GY,5ml无水甲醇,2ml 500x B;

[0042] 所述S5中由毕赤酵母重组菌株表达上清液中分离纯化DSN的方法是:4℃条件下,将发酵液上清加到平衡好的镍基质亲和层析柱,洗脱得到的产物浓缩后,再利用凝胶过滤层析柱进行上样洗脱,获得纯化DSN蛋白。

[0043] 上述分离纯化DSN的方法中所述缓冲液选自pH5.0-8.0的Tris-HCl缓冲液或磷酸盐缓冲液;所述亲和层析的方法是:利用金属离子螯合层析,将重悬后的粗酶液和Ni基质共结合,用含100mM-1M咪唑的缓冲液为洗脱液进行洗脱,收集的洗脱液即为纯化的DSN。

[0044] 上述分离纯化DSN的方法中所述凝胶过滤层析的方法是将洗脱所得产物浓缩至体积不超过10ml,上样到凝胶过滤层析柱,以pH5.0-8.0的Tris-HCl缓冲液或磷酸盐缓冲液进行洗脱,以波长为280nm检测收集液,收集峰值洗脱液,即为纯化DSN。所述凝胶过滤层析柱优选Sephadex G-75或Supeedex G-75。所述对洗脱液的浓缩用截留分子量为5KD的超滤管进行。

[0045] 一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶的应用,重组表达的南极磷虾DSN蛋白高效切割DNA双链的能力,对单链DNA和RNA无效,应用于RNA样品中DNA污染的去。

[0046] 实施例1 重组质粒构建

[0047] 利用限制性内切酶EcoRI和NotI双酶切酵母表达质粒pPIC9K,经氯仿抽提、乙醇沉淀获得线性化载体。通过PCR扩增、胶回收得到目的片段,通过无缝克隆进行目的片段和线性化载体的重组,产物转化到大肠杆菌感受态细胞,筛选阳性克隆,随机挑取数个单克隆,进行菌落PCR验证阳性,将阳性克隆活化后抽提质粒,通过酶切验证阳性后送测序,得到测序正确的质粒。

[0048] 实施例2 高效表达DSN的酵母菌株的构建和筛选

[0049] 1. 重组质粒线性化:利用SacI单酶切测序正确的重组质粒,并用AP去磷酸化处理,醇沉后得到线性化质粒。

[0050] 2. 毕赤酵母菌株转化及平板筛选:首先制备毕赤酵母GS115感受态细胞,即划线后

挑取单克隆于YPD中进行活化,培养至OD为1.3-1.5,低速离心去上清,将菌体用无菌水重悬后继续离心去上清,将菌体用3倍体积的1M山梨醇重悬后保留菌体,再用3倍体积的山梨醇重悬后得到GS115感受态细胞。取7 $\mu$ g线性化质粒进行电击转化毕赤酵母GS115感受态细胞,所用的电转仪为Eppendorf Eporator,参数为:电压是1500V,放电时间为4-5ms,电击后立即加入1ml预冷的1M山梨醇,冰上静置10min后30 $^{\circ}$ C低速孵育1h,涂布于MD平板,30 $^{\circ}$ C培养2-3天。

[0051] 3.将MD平板上所有克隆用无菌水重悬后测OD,将OD稀释到0.2后分别取20 $\mu$ L涂布到不同浓度的G418平板上(每0.25mg/ml是一个梯度),30 $^{\circ}$ C培养3-4天,通过菌落PCR验证阳性,将阳性克隆活化保种存于-80 $^{\circ}$ C。

[0052] 实施例3 DSN的表达和纯化

[0053] 1.毕赤酵母重组菌株发酵:随机选取阳性克隆进行摇瓶发酵,筛选方法如下:从平板上挑单克隆于YPD培养基中进行活化,30 $^{\circ}$ C,230rpm培养两天至OD为2-4,将活化液以1:100的比例接种于BMGY中,30 $^{\circ}$ C培养24h后低速离心(2500g,5min)取菌体,将菌体用少量BMMY重悬后转接到BMMY中,使得BMMY的OD应为1.0左右,继续培养,每24h补加0.5%的甲醇并取样通过SDS-PAGE检测蛋白表达量,到72h时以10000g,20min收菌,收集发酵液上清。

[0054] 2.镍基质亲和层析:用Tris-HCl缓冲液平衡重力柱3-5个柱体积,将基质和重悬液结合,用洗脱液洗3个柱体积,收集洗脱液。

[0055] 3.凝胶层析:将洗脱液用截留分子量为5KD的超滤管浓缩至体积不超过10ml,上样到凝胶过滤层析柱Sephadex G-75,以Tris-HCl缓冲液进行洗脱,以波长为280nm检测收集液,收集峰值洗脱液,即为纯化DSN。

[0056] 实施例4 DSN活性的检测

[0057] 南极磷虾DSN对双链DNA的切割:以 $\lambda$ DNA为底物,取1 $\mu$ L纯化所得的南极磷虾DSN,加入200ng $\lambda$ DNA,共10 $\mu$ L反应体系,将反应体系在37 $^{\circ}$ C下共反应10min,加loading后取2 $\mu$ L跑胶。

[0058] 南极磷虾DSN对单链DNA的切割:以15bp单链引物作为底物,取1 $\mu$ L纯化所得的南极磷虾DSN,加入终浓度为5 $\mu$ M的单链DNA,共10 $\mu$ L反应体系,将反应体系在37 $^{\circ}$ C下共反应10min,加loading后取2 $\mu$ L跑胶。

[0059] 南极磷虾双链特异性核酸酶对RNA的切割:以tRNA为底物,取1 $\mu$ L纯化所得的南极磷虾DSN,加入500ng tRNA(浓度为),共10 $\mu$ L反应体系,将反应体系在37 $^{\circ}$ C下共反应10min,加loading后取2 $\mu$ L跑胶。

[0060] 序列表

[0061] 南极磷虾DSN的氨基酸序列为:

[0062] QECVWNKDSDFPENPPLILEDIDGHILLPVLEGDDRIVRIPSGSALTIACSNYALSAFDGVPAITAVCVQDLVLDVDGM EYTMQDMGCTHSIKESIFRDQDTCGDGNGISLHQIGFETFEDQFYPLIDVCFEKTQETTLWTEHV VHGHSIAAKEIDPSRPSFKTSTGFFTVPMS TVYSQKAQLQLMIEQLGDEDLANSIIDTHKEWYFAKGHMSPDADFV TEAEQDATYYFINALPQWQAFNNGNWKHMEERTRELAEEHGTDMRVISGGFNILNLDDVNGNPVEIFLGDTEGEKV VPAPAITWKVVFEEGSNKAAALIGINPHIDVAPEPLCTDIDCQLLWIDFDVSDLAHGTYCCTVEDLRAAIPNVP DIGSVDLLDK\*

[0063] 合成的经优化的DSN基因序列为:

[0064] CAAGAGTGTGTCTGGAACAAGGACTCTGACTTCCCAGAAAACCCACCATTGATCTTGGAGGACATTGACGGTCACATCTTGTGGCCAGTTTTGGAGGGTGACGACAGAATCGTTAGAATCCCATCTGGTTCCGCCTTGACTATCGCCTGTTCTAACTACGCTTTGTCCGCTTTCGATGGTGTCCAGCTATCACTGCTGTTTGTGTTCCAGGACTTGGTTTGGACGTTGACGGTATGGAGTACACCATGCAAGACATGGGTTGTACCCACTCCATCAAAGAGTCCATCTTCAGAGATCAGGACACCTGTGGTGACGGTAACATTGGTTCCTTGACAC CAGATTGGTTTTCGAGACTTTCGAGGACCAGTTCTACCCATTGATCGACGTCTGCTTCGAAAAGACCCAAGAGACTACTTTGTGGACCGAGCATGTTGTTACGGTCACTCCATTGCTGCTAAAGAGATTGACCCATCCAGACCATCCTTCAAGACTTCCACTGGTTTTCTTCACCGTTCCAATGTCCACTGTCTACTCCCAAAAGGCTCAGTTGCAGTTGATGATCGAGCAATTGGGTGATGAGGACTTGGCTAACTCCATCATCGACACTCACAAGAGTGGTACTTCGCCAAGGGTCACATGTCTCCAGATGCTGACTTTGTTACTGAGGCTGAGCAAGACGCTACCTACTACTTCATTAACGCTTTGCCACAGTGGCAGGCCTTCAACAACGGTAACTGGAAGCACATGGAAGAGAGAACCAGAGAATTGGCTGAGGAACACGGTACTGACATGAGAGTTATTTCCGGTGGTTTTCAACATCCTGAACCTGGACGATGTTAACGGTAACCCAGTCGAGATTTTCTTGGGTGACACTGAGGGTGAGAAGGTTGTTCTGCTCCAGCTATTACTTGGAAGGTCGTTTTTCGAGGAAGGTTCCAACAAGGCTGCTGCTTTGATCGGTATTAACAACCCACACATCGACGTTGCTCCAGAGCCATTGTGTACCGATATTTGCGATCAGTTGCTGTGGATCGACTTCGACGTTTCTGATTTGGCTCACGGTTACACCTACTGTTGTACTGTGAGGATTTGAGAGCCGCCATTCCAAACGTTCCAGATATTGGTTCGTCGACTTGTGGACAAGTAA。

[0065] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

- [0001] 序列号:
- [0002] <110> 江苏海洋大学 江苏愚公生命科技有限公司
- [0003] <120> 一种来源于南极磷虾的双链特异性核酸酶及其制备方法
- [0004] <140> 2020106574541
- [0005] <141> 2020-07-09
- [0006] <160> 2
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1149
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 南极磷虾(*Euphausia superba*)
- [0011] <400> 1
- [0012] caagagtgtg tctggaacaa ggactctgac ttcccagaaa acccaccatt gatcttggag 60
- [0013] gacattgacg gtcacatctt gttgccagtt ttggagggtg acgacagaat cgttagaatc 120
- [0014] ccatctggtt ccgccttgac tatcgctgt tctaactacg ctttgtccgc tttcgatggt 180
- [0015] cttccagcta tcaactgctgt ttgtgttcag gacttggttt tggacgttga cggtatggag 240
- [0016] tacaccatgc aagacatggg ttgtaccac tccatcaaag agtccatctt cagagatcag 300
- [0017] gacacctgtg gtgacggtaa cattggttcc ttgcaccaga ttggtttcga gactttcgag 360
- [0018] gaccagttct acccattgat cgacgtctgc ttcgaaaaga cccaagagac tactttgtgg 420
- [0019] accgagcatg ttgttcacgg tcaactcatt gctgctaaag agattgacc atccagacca 480
- [0020] tcctcaaga cttccactgg tttcttacc gttccaatgt ccaactgtcta ctccc aaaag 540
- [0021] gctcagttgc agttgatgat cgagcaattg ggtgatgagg acttggttaa ctccatcatt 600
- [0022] gacactcaca aagagtggta cttcgccaag ggtcacatgt ctccagatgc tgactttgtt 660
- [0023] actgaggctg agcaagacga tacctactac ttcattaacg ctttgccaca gtggcaggcc 720
- [0024] ttcaacaacg gtaactggaa gcacatggaa gagagaacca gagaattggc tgaggaacac 780
- [0025] ggtaactgaca tgagagttat ttccggtggt ttcaacatcc tgaacctgga cgatgttaac 840
- [0026] ggtaaccag tcgagatctt cttgggtgac actgagggtg agaaggttgt tctgtctcca 900
- [0027] gctattactt ggaaggtcgt tttcgaggaa gttccaaca aggctgctgc tttgatcgg 960
- [0028] attaacaacc cacacatcga cgttgctcca gagccattgt gtaccgatat ttgcgatcag 1020
- [0029] ttgctgtgga tcgacttcca cgtttctgat ttggtcagc gttacaccta ctgttgatc 1080
- [0030] gtcgaggatt tgagagccgc cattccaaac gttccagata ttggttccgt cgacttgttg 1140
- [0031] gac aag taa 1149
- [0032] <210> 2
- [0033] <211> 383
- [0034] <212> PRT
- [0035] <213> 南极磷虾(*Euphausia superba*)
- [0036] <400> 2
- [0037] Gln Glu Cys Val Trp Asn Lys Asp Ser Asp Phe Pro Glu Asn Pro Pro
- [0038] 1 5 10 15
- [0039] Leu Ile Leu Glu Asp Ile Asp Gly His Ile Leu Leu Pro Val Leu Glu
- [0040] 20 25 30
- [0041] Gly Asp Asp Arg Ile Val Arg Ile Pro Ser Gly Ser Ala Leu Thr Ile

[0042]	35	40	45
[0043]	Ala Cys Ser Asn Tyr Ala Leu Ser Ala Phe Asp Gly Val Pro Ala Ile		
[0044]	50	55	60
[0045]	Thr Ala Val Cys Val Gln Asp Leu Val Leu Asp Val Asp Gly Met Glu		
[0046]	65	70	75
[0047]	Tyr Thr Met Gln Asp Met Gly Cys Thr His Ser Ile Lys Glu Ser Ile		
[0048]		85	90
[0049]	Phe Arg Asp Gln Asp Thr Cys Gly Asp Gly Asn Ile Gly Ser Leu His		95
[0050]		100	105
[0051]	Gln Ile Gly Phe Glu Thr Phe Glu Asp Gln Phe Tyr Pro Leu Ile Asp		110
[0052]	114	120	125
[0053]	Val Cys Phe Glu Lys Thr Gln Glu Thr Thr Leu Trp Thr Glu His Val		
[0054]	130	135	140
[0055]	Val His Gly His Ser Ile Ala Ala Lys Glu Ile Asp Pro Ser Arg Pro		
[0056]	145	150	155
[0057]	Ser Phe Lys Thr Ser Thr Gly Phe Phe Thr Val Pro Met Ser Thr Val		
[0058]		165	170
[0059]	Tyr Ser Gln Lys Ala Gln Leu Gln Leu Met Ile Glu Gln Leu Gly Asp		175
[0060]		180	185
[0061]	Glu Asp Leu Ala Asn Ser Ile Ile Asp Thr His Lys Glu Trp Tyr Phe		
[0062]	195	200	205
[0063]	Ala Lys Gly His Met Ser Pro Asp Ala Asp Phe Val Thr Glu Ala Glu		
[0064]	210	215	220
[0065]	Gln Asp Ala Thr Tyr Tyr Phe Ile Asn Ala Leu Pro Gln Trp Gln Ala		
[0066]	225	230	235
[0067]	Phe Asn Asn Gly Asn Trp Lys His Met Glu Glu Arg Thr Arg Glu Leu		
[0068]		245	250
[0069]	Ala Glu Glu His Gly Thr Asp Met Arg Val Ile Ser Gly Gly Phe Asn		
[0070]		260	265
[0071]	Ile Leu Asn Leu Asp Asp Val Asn Gly Asn Pro Val Glu Ile Phe Leu		
[0072]	275	280	285
[0073]	Gly Asp Thr Glu Gly Glu Lys Val Val Pro Ala Pro Ala Ile Thr Trp		
[0074]	290	295	300
[0075]	Lys Val Val Phe Glu Glu Gly Ser Asn Lys Ala Ala Ala Leu Ile Gly		
[0076]	305	310	315
[0077]	Ile Asn Asn Pro His Ile Asp Val Ala Pro Glu Pro Leu Cys Thr Asp		
[0078]		325	330
[0079]	Ile Cys Asp Gln Leu Leu Trp Ile Asp Phe Asp Val Ser Asp Leu Ala		
[0080]		340	345
[0081]	His Gly Tyr Thr Tyr Cys Cys Thr Val Glu Asp Leu Arg Ala Ala Ile		
[0082]	355	360	365
[0083]	Pro Asn Val Pro Asp Ile Gly Ser Val Asp Leu Leu Asp Lys *		

[0084]	370	375	380
--------	-----	-----	-----

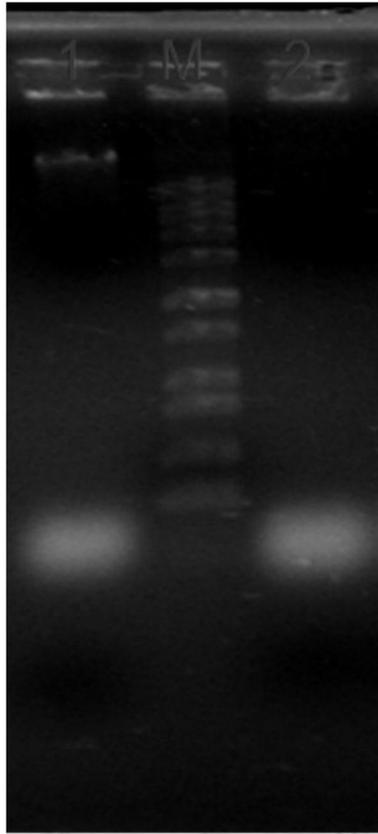


图1

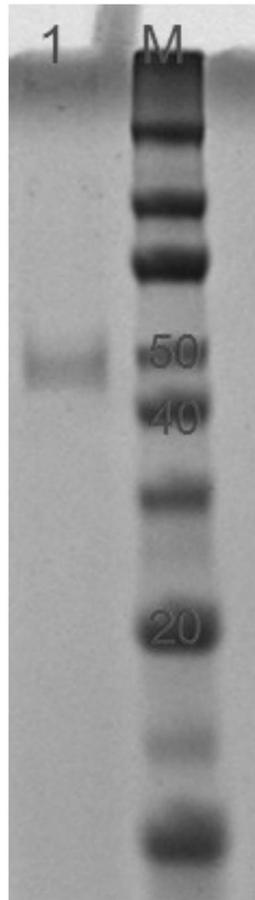


图2

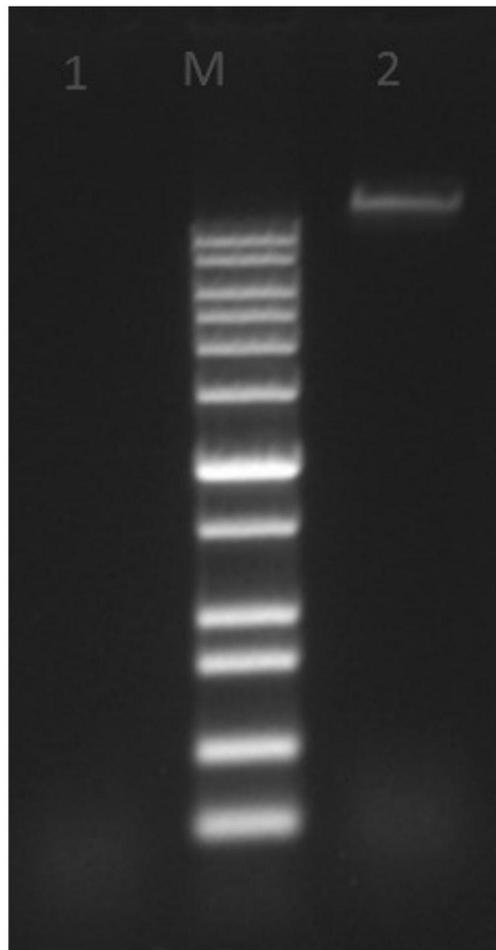


图3

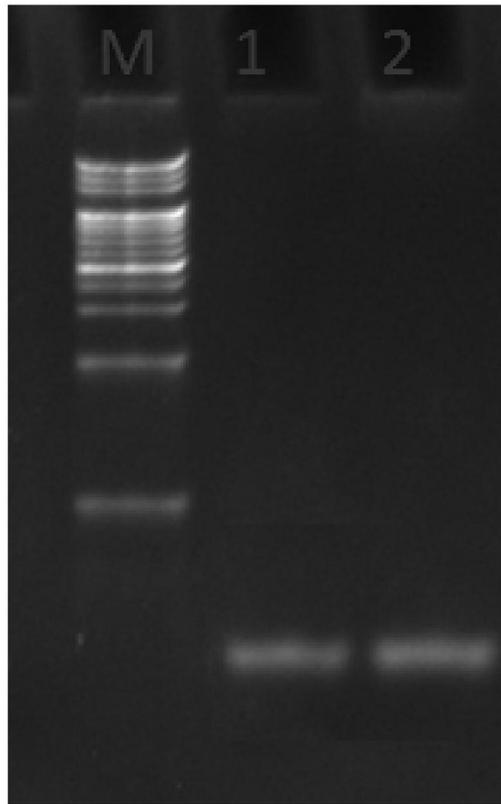


图4

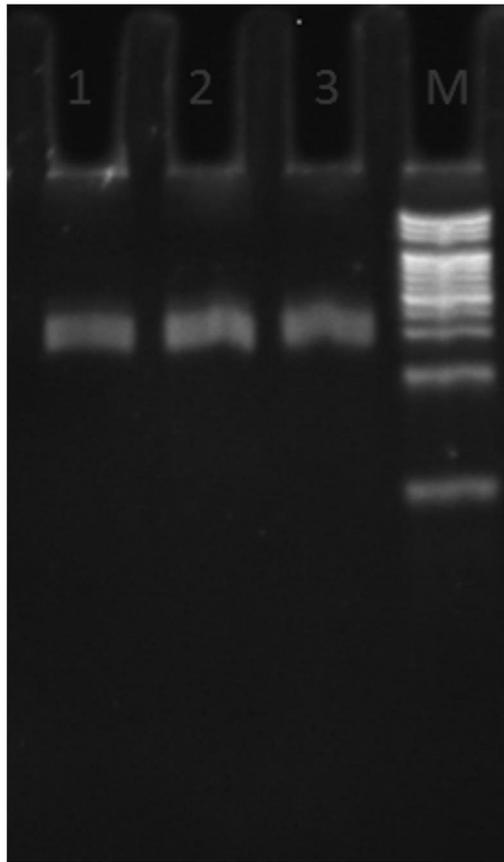


图5