



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109112134 B

(45)授权公告日 2020.06.02

(21)申请号 201811139623.1

C12Q 1/6883(2018.01)

(22)申请日 2018.09.28

G01N 33/68(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109112134 A

(56)对比文件

CN 106282369 A,2017.01.04,

CN 105940109 A,2016.09.14,

(43)申请公布日 2019.01.01

Andreas Marquardt等.Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease).《Human Molecular Genetics》.1998,第7卷(第9期),1517-1525.

(73)专利权人 中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街29号

骆静怡等.多灶性卵黄样视网膜病变BEST1基因筛查及临床特征分析.《中华眼底病杂志》.2018,第34卷(第2期),149-154.

(72)发明人 李世迎 孟晓红 刘勇 任佳云
龙艳玲 徐碧薇 陶琴 殷欣
阴正勤

刘婧姝等.Best卵黄样黄斑营养不良临床特点及BEST1基因突变研究进展.《国际眼科杂志》.2015,第15卷(第4期),621-624.

(74)专利代理机构 重庆乐泰知识产权代理事务所(普通合伙) 50221

代理人 谭科学

审查员 吕小蒙

(51)Int.Cl.

C12N 15/12(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

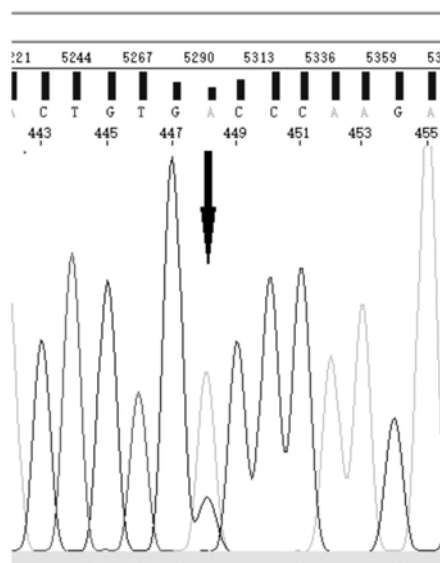
序列表6页 附图5页

(54)发明名称

一种视网膜变性疾病的BEST1新突变致病基因及其试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种视网膜变性疾病的BEST1新突变致病基因,属于分子生物学领域,所述新突变致病基因的核酸样本与BEST1基因如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列相比,核苷酸变化:c.1242G>A;还涉及到由新突变致病基因编码的突变体多肽。本发明首次揭示了BEST1基因c.1242G>A位点突变与视网膜变性疾病相关,进一步提供筛选视网膜变性疾病的试剂盒,可用于筛选由这种突变致病基因导致的视网膜变性疾病,为患者及时发现及时治疗提供指导。



1. 一种视网膜变性疾病的BEST1新突变致病基因,其特征在于,所述新突变致病基因的核酸样本与BEST1基因如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列相比,核苷酸变化:c.1242G>A。
2. 权利要求1所述的BEST1新突变致病基因,其特征在于,所述突变致病基因的核酸样本指人工分离或合成的单链DNA、双链DNA、RNA或DNA与RNA的聚合物。
3. 一种视网膜变性疾病的BEST1新突变体多肽,其特征在于,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相比,氨基酸变化:p.W414X。
4. 根据权利3所述的多肽,其特征在于,所述多肽由权利要求1所述的基因编码的。

一种视网膜变性疾病的BEST1新突变致病基因及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种视网膜变性疾病的BEST1新突变致病基因及其试剂盒。

背景技术

[0002] 视网膜变性(retinal degeneration),属于视锥、视杆营养不良,是一组遗传病,以夜盲、视野缩小、眼底骨细胞样色素沉着和光感受器功能不良为特征。性连锁隐性遗传、常染色体隐性或者显性遗传均可以见到,也有散发的。人类BEST1基因突变与至少4种不同的视网膜变性疾病相关,它们被统称为Best病,包括:Best卵黄样黄斑营养不良(BVMD),常染色体隐性遗传Best病(ARB),成人型卵黄样黄斑营养不良和常染色体显性遗传玻璃体视网膜脉络膜病变。Best黄斑营养不良(BMD)或青少年发病型卵黄样黄斑营养不良,是一种不规则的常染色体显性遗传性疾病,也有一些散发病例。其典型的临床特征是在青少年时期双眼黄斑部视网膜出现卵黄状的脂质样沉积物,而视力很少受影响。随着病情发展,卵黄样物质逐渐吸收,进入假性积液期和卵黄破裂期,开始出现视力波动,最终发展为后极部视网膜色素上皮萎缩,纤维瘢痕形成,以及继发性脉络膜新生血管形成和视网膜下出血,导致视力严重的不可逆性损害。所以如果能及早的应用医疗检测手段检查出病变的可能性,及时的进行治疗干预,尽可能的减少患者视觉衰退是当前科研人员迫不及待的心愿。

[0003] 目前基因检测方法为二代测序,分为突变筛查(运用高通量测序技术)、基因数据分析(运用生物信息学及临床信息分析技术)和疑似致病突变验证(运用Sanger测序技术)三个主要步骤。测序效率高,但是价格昂贵,另外此方法适用于点突变及20bp以内的缺失插入突变(微小突变)以及外显子水平的纯合型缺失检测,不适用于杂合性基因大片段拷贝数变异、动态突变及复杂重组等特殊类型突变的检测,也不适用于检测基因组结构变异(例如大片段缺失、复制与倒位重排)、大片段杂合插入突变(如Alu介导的插入)及位于基因调节区及深度内含子区的突变。另外,由于部分基因存在高重复低复杂度区域或假基因,以致检测不能完全覆盖其所有外显子区。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种BEST1新突变致病基因及其试剂盒。

[0005] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 1.一种视网膜变性疾病的BEST1新突变致病基因,所述新突变致病基因的核酸样本与BEST1基因如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列相比,核苷酸变化:c.1242G>A。

[0007] 进一步,所述突变致病基因的核酸样本指人工分离或合成的单链DNA、双链DNA、RNA或DNA与RNA的聚合物。

[0008] 进一步,所述视网膜变性疾病为卵黄样黄斑营养不良。

[0009] 2.一种视网膜变性疾病的BEST1新突变体多肽,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相比,氨基酸变化:p.W414X。

[0010] 进一步,所述多肽由权利要求1所述的基因编码的。

[0011] 3.筛选视网膜变性疾病的试剂盒,所述试剂盒包含检测权利要求1所述的BEST1新突变致病基因的试剂,所述新突变致病基因与BEST1基因如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列相比,具有核苷酸变化:c.1242G>A。

[0012] 进一步,所述检测BEST1新突变致病基因的试剂是核酸探针。

[0013] 进一步,所述试剂盒还包括如SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:18的一个或多个引物。

[0014] 进一步,所述检测BEST1新突变致病基因的试剂是检测致病基因所编码的蛋白。

[0015] 进一步,所述蛋白的氨基酸与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列相比,具有p.W414X突变。

[0016] BEST1基因位于常染色体11q13,编码位于视网膜色素上皮层(retinal pigment epithelium,RPE)的一个由585个氨基酸构成的跨通道转运蛋白bestrophin-1蛋白,分子量约68kDa,并在成年或青少年的视网膜色素上皮上均有特异性表达。

[0017] 本发明的有益效果在于:本发明首次发现了BEST1基因c.1242G>A位点突变和卵黄样黄斑营养不良的视网膜变性疾病密切相关,并以此设计出直接检测该突变基因的试剂盒。本发明所述的试剂盒可以直接通过一代测序,减少繁琐程序,跳过高通量筛选,直接针对目的基因外显子全长测序,能清楚知道外显子的情况。本发明所提供的引物设计,PCR扩增增加上一代测序对基因外显子突变进行检测,操作简单,技术成熟,成本极低,不受突变大小(20bp)影响,可对外显子纯合缺失及大片断缺失插入进行检测。并且该试剂盒实用范围广,所检测的DNA可以提取自新鲜组织、外周血以及石蜡切片样本。

附图说明

[0018] 为了使本发明的目的、技术方案和有益效果更加清楚,本发明提供如下附图进行说明:

[0019] 图1为患者一个突变位点表型变化;

[0020] 图2为患者3两个突变位点表型变化;

[0021] 图3为患者3外显子6一代测序部分结果;

[0022] 图4为患者3外显子9一代测序部分结果;

[0023] 图5为该患者父亲母亲在外显子6位点的验证,父亲验证(变异,上)母亲验证(野生型,下);

[0024] 图6为该患者父亲母亲在外显子9位点的验证,父亲验证(野生型,上)母亲(变异,下);

[0025] 图7为患者3家系图;

[0026] 图8为RT-PCR验证琼脂糖凝胶电泳图;

[0027] 图9是正常人外显子9测序部分峰图结果;

[0028] 图10是患者3外显子9测序部分峰图结果。

具体实施方式

[0029] 下面将结合附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。

[0030] 实施例1获取生物样品

[0031] 2015年至2018年期间,一共收集了BEST病10例病例,7男3女。临床表型均为Best卵样黄斑变性,样本为疾病患者的外周静脉血。所有参与本发明研究的家系成员均签署了知情同意书。

[0032] 实施例2DNA提取

[0033] 利用高盐沉淀法提取各血液样本中基因组DNA,利用分光光度计测量DNA的浓度及纯度,所得的每个标本基因组DNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀均位于1.7-2.0之间,浓度不少于200ng/微升,总量不少于30微克。

[0034] 实施例3引物设计及PCR反应

[0035] 参考人类基因组序列数据库,设计得到BEST1基因1-10号外显子序列分别对应的PCR特异性引物对,具体内容如表1所示,1-10号外显子所对应的序列如图2所示。

[0036] 表1BEST1基因1-10号外显子序列分别对应的PCR特异性引物对

Amplicon	Primer sequence 5'---3'	引物序号	Tm 值	Product size (bp)
1 号外显子	F:GCCTCTGATCCCTACAAACCC	SEQ ID NO: 3	60°C	420
	R:GACTTCTTTTCTCTCCCCAGCC	SEQ ID NO: 4	60°C	
2 号外显子	F:GGTTTGGGGCTGTACAAGGA	SEQ ID NO: 5	60°C	437

3 号外显子	R:CAGTCCGCACCTTTCCTAC	SEQ ID NO: 6	60°C	620
	F:CGGGTGACAGAACCCTTGG	SEQ ID NO: 7	60°C	
4-5 号外显子	R:ACCTTCAGACACCCGACTCT	SEQ ID NO: 8	60°C	735
	F:CCTTCTGCAGGTTCTCCCAAC	SEQ ID NO: 9	60°C	
6 号外显子	R:AGCTGCTTCCTTGGTCCTTC	SEQ ID NO: 10	60°C	283
	F:ACCACATCCTCCTCCTCCTC	SEQ ID NO: 11	60°C	
7-8 号外显子	R:CCCCTGAGACCTTCCTTTC	SEQ ID NO: 12	60°C	1085
	F:GGTGTTTCAGGGAAGGACTGG	SEQ ID NO: 13	60°C	
9 号外显子	R:GAGCCAGGTCCTAACGTTCC	SEQ ID NO: 14	60°C	1129
	F:GCCCTGCATCTCCTGTTTCT	SEQ ID NO: 15	60°C	
10 号外显子	R:CCTGCCACCCTTCCTGTAG	SEQ ID NO: 16	60°C	462
	F:ATCTTGTCTTGGGCTGGGTG	SEQ ID NO: 17	60°C	
	R:CTGTATGGCTGTGACTGGA	SEQ ID NO: 18	60°C	

[0039] 表2 1-10号外显子所对应的基因

	LOCUS
外显子1	NG_009033:1924..2075
外显子2	NG_009033:5224..5318
外显子3	NG_009033:5835..6068

外显子4	NG_009033:6961..7115
外显子5	NG_009033:7504..7581
外显子6	NG_009033:8263..8415
外显子7	NG_009033:9615..9695
外显子8	NG_009033:10009..10160
外显子9	NG_009033:12372..13010
外显子10	NG_009033:14221..14239

[0041] 接着,分别按照以下配比配制各基因组DNA样本的PCR反应体系以及进行PCR反应,其中PCR使用的Promega品牌的Go Taq®Green Master Mix,lot号000242981。

[0042] 按照表1针对BEST1基因1-10号外显子序列,按表3配比分别配制各基因组DNA样本的各PCR反应体系,PCR反应体系为40ul。

[0043] 表3:PCR反应体系(40ul)

[0044]	Go Taq® Green Master Mix(2x)	20ul
	正向引物	1ul
	反向引物(10P)	1ul
	DNA模板(200ng/ul)	2ul
	ddH ₂ O	18ul(add up to 40ul)

[0045] 再将以上配置好的各反应体系按照表3的反应条件进行PCR反应。

[0046] 表3:PCR程序

[0047]	94℃	3min	
	94℃	30S	30—35个循环
	T _m 值(60℃)	30S	
	72℃	30S-60S	
	72℃	5min	
	4℃	∞	

[0048] 实施例4Sanger法测序验证

[0049] 将所获得的PCR扩增产物直接进行Sanger法测序验证。10名患者样本基因检测突变结果如表4所示,其中患者3的测序结果在NCBI上进行比对发现两个点突变: BEST1基因突变体与SEQ ID NO:2相比;具有p.R255W突变和p.W414X突变,发现后者为新突变,和参考序列NM_004183(SEQ ID NO:1)相比对,核苷酸变化:c.1242G>A,氨基酸变化为p.W414X,提前终止,致缺失了251个氨基酸,为有害突变。此患者的临床表型比其他单个突变的更严重,表

型变化如图1和图2所示,图1为一个突变位点表型变化,图2为该患者两个突变位点表型变化,两个突变位点的CNV(脉络膜,Choroidal NeoVascularisation,简称CNV)区域拱起严重。从测序峰图中可以看出病症患者的Beat1基因具有c.1242G>A突变,而家系外正常人在相应位点上均不存在该突变。图3和图4为10个患者中患者3测序结果,图3为外显子6一代测序部分结果,图3可以看到核苷酸C突变为T,为杂合突变;图4为外显子9一代测序部分结果,图4可以看出核苷酸G突变为A,为杂合突变。该患者的双亲未患病,是杂合携带者,图5为该患者父亲母亲在外显子6位点的验证,父亲验证(变异,上)母亲验证(野生型,下);图6为该患者父亲母亲在外显子9位点的验证,父亲验证(野生型,上)母亲(变异,下);双亲无病子女不患病,符合常染色体完全隐性遗传特征。患者3家系图见图7,家族中其他人相似的临床特征。

[0050] 表4 10名患者样本基因检测突变结果

患者	性别	年龄	基因	转录本编号	外显子	核苷酸变化	氨基酸变化	纯合/杂合	家系验证	
1	男	47	BEST1	NM_004183	exon6	c.763C>T	p.Arg225Trp(W)	het		
2	男	19	BEST1	NM_004183	exon6	c.763C>T	p.Arg225Trp(W)	het	母亲携带	
			BEST1	NM_004183	exon9	c.1740-1G>A	splicing	het		
3	女	8	BEST1	NM_004183	exon6	c.763C>T	p.Arg225Trp(W)	het	父亲携带	
			BEST1	NM_004183	exon9	c.1242G>A	p.414,W>X(251)Trp414X	het	母亲携带	
4	女	27	BEST1	NM_004183	exon6	c.763C>T	p.Arg225Trp(W)	het	父亲携带,母亲无	
[0051]	5	男	44	BEST1	NM_004183	exon1	c.38G>A	p.Arg13His	het	父亲携带
			BEST1	NM_004183	exon3	c.313C>A	p.Arg105Ser	het	母亲携带	
6	男	18	BEST1	NM_004183	exon4	c.584C>T	p.Ala195Val	Het	母亲携带	
					EX4_IN4	c.712_c.71412del CAGGTGAGGACTAGG	splicing	Het	父亲携带	
7	女	38	BEST1	NM_004183	exon1	c.140G>A	p.Arg47His	Hom		
8	男	42	BEST1	NM_004183	exon1	c.55C>T	p.Arg19Cys	het	无父母	
9	男	29	BEST1	NM_004183	exon5	c.652C>T	p.Arg218Ser	Het	父亲携带,母亲无	
10	男		BEST1	NM_004183	exon8	c.1037C>A	p.Pro346His	Het		

[0052] 此方法直接通过一代测序,减少繁琐程序,跳过高通量筛选,直接针对目的基因外显子全长测序,能清楚知道外显子的情况,简单直接有效。

[0053] 实施例5RT-PCR验证

[0054] 抽取患者3外周血,提取RNA,反转录,PCR扩增,一代测序。

[0055] Trizol法提取血液RNA

[0056] 1、试剂和材料

[0057] 10×红细胞裂解液(BD)、RNAiso Blood(Takara)、氯仿、异丙醇、无水乙醇、DEPC(焦碳酸二乙酯)、超纯水、1.5mL EP管(RNase-free)、大中小3种枪头(RNase-free)、一次性乳胶手套(小号)、锡箔纸、橡胶圈、脱脂棉、镊子、玻璃瓶、量筒、制冰机、涡旋机、冷冻离心机、分光光度计、移液枪。

[0058] 1) 0.1%DEPC水:在1.5mL EP管中分装0.5mL 0.1%DEPC水,共20管,-20℃冻存。

[0059] 2) 75%无酶乙醇:分别用移液枪吸取0.75mL无水乙醇和0.25mL 0.1%DEPC水于1.5mLEP管中,混匀,-20℃冻存。

[0060] 3) 1×红细胞裂解液:取10×红细胞裂解液0.1mL于0.9mL 0.1%DEPC水中,室温放置。

[0061] 2、操作步骤

[0062] 1) 打开制冰机;异丙醇-20℃预冷30min;超净工作台台面、移液枪等用75%无水乙醇消毒,紫外照射30min;打开冷冻离心机4℃预冷;75%无酶乙醇、0.1%DEPC水室温解冻。

[0063] 2) 将刚抽取的新鲜血液放置4℃冰箱静置2h后,弃血清。

[0064] 3) 将1.5mL EP管(RNase-free)标号,取0.30mL血液于管中,加入0.9mL红细胞裂解液,颠倒混匀后室温静置10min(期间应该颠倒轻弹混匀数次帮助裂解红细胞),4℃,1000rpm离心5min,弃上清,保留管底白细胞沉淀。

[0065] 4) 向管底白细胞沉淀中加入1.0mL RNAiso,用移液枪反复吹吸直至无明显沉淀,室温静置5min,4℃,12000rpm离心15min,吸取上清液于新的EP管中。

[0066] 5) 向管中加入200μL氯仿,剧烈震荡混匀后室温放置5min,4℃,12000rpm离心15min。吸取上清液于新的EP管中。

[0067] 6) 向管中加入等体积异丙醇,上下颠倒离心管充分混匀后,室温下静置10分钟,4℃,12000rpm离心10min,弃上清,RNA沉于管底。

[0068] 7) 向管中加入1mL 75%无酶乙醇,温和颠倒悬浮沉淀,4℃,8000rpm离心5min,小心去掉上清液,用镊子夹住管壁,室温倒置凉干(3min)。

[0069] 8) 向管中加入30μL 0.1%DEPC水,吹打混匀溶解后置于冰上。

[0070] 9) 检测纯度和浓度(OD260/OD280在1.8-2.0之间),置于-80度冰箱保存。

[0071] 目标基因扩增步骤

[0072] 1、试剂和材料

[0073] PrimeScript™RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Time)、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase、6×Loading Buffer、GelRed® Nucleic Acid Gel Stain、DL15000DNA Marker、DL2000DNA Marke、Agarose Regular、Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50× Powder (pH8.3)、200μL EP管(RNase-free)、微波炉、三角瓶、玻璃瓶、量筒、称量器、移液枪、凝胶成像系统。

[0074] 1) 清洗2个1L玻璃瓶,100mL三角瓶,100mL和1L玻璃量筒,烘干备用。

[0075] 1) 50×TAE母液:将Tris-Acetate-EDTA Buffer (TAE) 50× Powder干粉倒进1L玻璃

瓶中,加入1L超纯水,混匀后做好标记。

[0076] 2) 1×TAE溶液:量取20mL 50×TAE母液于1L玻璃量筒中,并用超纯水定容至1L,倒入新的1L玻璃瓶中,混匀后做好标记。

[0077] 3) 6×Loading Buffer中加入0.5μL GelRed®Nucleic Acid Gel Stain,涡旋混匀后做好标记。

[0078] 4) 制胶:平衡好制胶板,插好梳子后,称取Agarose Regular 0.8g于三角瓶中,加入1×TAE溶液80mL,微波炉打热完全溶解后倒入制胶板中。

[0079] 2、操作步骤

[0080] 1) RNA反转录成cDNA

[0081] a. 去除DNA

[0082] PCR反应体系(10μL)如下:

	①gDNA Eraser	1 μL
	②5×gDNA Eraser Buffer	2 μL
[0083]	RNA	1 μg
	⑥RNase Free H2O	Up to10 μL

[0084] PCR反应程序如下:42℃,2min;4℃,forever。

[0085] (2) 反转录

[0086] PCR反应体系(20μL)如下:

	(1) 反应液	10 μL
[0087]	③PrimeScript RT Enzyme Mix I	1 μL
	④5×PrimeScript Buffer 2	4 μL
[0088]	⑤RT Primer Mix	1 μL
	⑥RNase Free H2O	2 μL

[0089] PCR反应程序如下:37℃,15min;85℃,5s;4℃,forever。

[0090] 2、目标基因扩增

[0091] (1) 设计目标基因引物:

[0092] PrimerF:TGGGCTCCACCTTCAACATC,SEQ ID NO:19

[0093] PrimerR:GGCTTAGGAATGTGCTTCATCC,SEQ ID NO:20

[0094] cDNA模板包括了外显子9全长639个核苷酸序列。

[0095] (2) 扩增

[0096] PCR反应体系(25μL)如下:

	cDNA 模板	1 μ L
	PrimeSTAR Max DNA Polymerase	12 μ L
[0097]	PrimerF	1 μ L
	PrimerR	1 μ L
	dd H ₂ O	10 μ L

[0098] PCR反应程序如下：

98℃, 2 min(预变性)

94℃, 10 s(变性)

55℃, 10 s(退火)

72℃, 10 s(延伸)

72℃, 5 min(补充延伸)

16℃, forever

} 35 个循环

[0100] 3、电泳：将制好的琼脂糖凝胶放入电泳仪中，吸取步骤2中PCR反应液2 μ L，与3 μ L6 \times Loading Buffer混匀后点进孔中，最后点Marker。120V, 20min。

[0101] 4、看胶：将跑好的胶放入凝胶成像系统中，打开紫外，拍照并保存图片，见附图8，其中泳道1是正常人，泳道2是患者，MAKER是DL2000。

[0102] 5、送公司测序，测序结果见附图9和图10，图9是正常人外显子9测序部分峰图结果；图10是患者3外显子9测序部分峰图结果。

[0103] 最后说明的是，以上优选实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管通过上述优选实施例已经对本发明进行了详细的描述，但本领域技术人员应当理解，可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变，而不偏离本发明权利要求书所限定的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院
- [0003] <120> 一种视网膜变性疾病的BEST1新突变致病基因及其试剂盒
- [0004] <160> 20
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 1758
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] atgaccatca cttacacaag ccaagtggct aatgcccgct taggctcctt ctcccgcctg 60
- [0012] ctgctgtgct ggcggggcag catctacaag ctgctatatg gcgagttctt aatcttctctg 120
- [0013] ctctgtact acatcatccg ctttatttat aggctggccc tcacggaaga acaacagctg 180
- [0014] atgtttgaga aactgactct gtattgcgac agctacatcc agctcatccc catttccttc 240
- [0015] gtgtctggct tctacgtgac gctggtcgtg acccgctggg ggaaccagta cgagaacctg 300
- [0016] ccgtggcccg accgcctcat gagcctggtg tcgggcttcg tcgaaggcaa ggacgagcaa 360
- [0017] ggccggctgc tgcggcgac gctcatccgc tacgccaacc tgggcaacgt gctcatcctg 420
- [0018] cgcagcgtca gcaccgcagt ctacaagcgc ttccccagcg cccagcacct ggtgcaagca 480
- [0019] ggctttatga ctccggcaga acacaagcag ttggagaaac tgagcctacc acacaacatg 540
- [0020] ttctgggtgc cctgggtgtg gtttgccaac ctgtcaatga aggcgtggct tggaggtcga 600
- [0021] atccgggacc ctatcctgct ccagagcctg ctgaacgaga tgaacacctt gcgtactcag 660
- [0022] tgtggacacc tgtatgccta cgactggatt agtatccac tgggtgtatac acaggtgggtg 720
- [0023] actgtggcgg tgtacagctt cttcctgact tgtctagttg ggccgcagtt tctgaacca 780
- [0024] gccaaaggcct accctggcca tgagctggac ctggttgctc ccgtcttcac gttcctgcag 840
- [0025] ttcttcttct atgttggtg gctgaagggt gcagagcagc tcatcaacce ctttggagag 900
- [0026] gatgatgatg attttgagac caactggatt gtcgacagga atttgcaggt gtccctgttg 960
- [0027] gctgtggatg agatgcacca ggacctgcct cggatggagc cggacatgta ctggaataag 1020
- [0028] cccgagccac agcccccta cacagctgct tccgccagc tccgtcgagc ctcttttatg 1080
- [0029] ggctccacct tcaacatcag cctgaacaaa gaggagatgg agttccagcc caatcaggag 1140
- [0030] gacgaggagg atgctcacgc tggcatcatt ggccgcttc taggcctgca gtcccatgat 1200
- [0031] caccatctc ccaggcaca ctcaaggacc aaactactgt ggcccaagag ggaatccctt 1260
- [0032] ctccacgagg gcctgcccc aaaccacaag gcagccaaac agaacgtag gggccaggaa 1320
- [0033] gacaacaagg cctggaagct taaggctgtg gacgcctca agtctgcccc actgtatcag 1380
- [0034] aggccagct actacagtgc cccacagac ccctcagcc ccaactccat gttcttcccc 1440
- [0035] ctagaacat cagcgcctc aaagcttcac agtgtcacag gcatagacac caaagacaaa 1500
- [0036] agcttaaaga ctgtgagttc tggggccaag aaaagtttg aattgctctc agagagcgat 1560
- [0037] gggccttga tggagaccc agaagtatct caagttagga ggaaaactgt ggagtttaac 1620
- [0038] ctgacggata tgccagagat ccccgaaaat cacctcaaag aacctttgga acaatcacca 1680
- [0039] accaacatac aactacact caaagatcac atggatcctt attggcctt ggaaaacagg 1740
- [0040] gatgaagcac attcctaa 1758
- [0041] <210> 2

[0042] <211> 585
 [0043] <212> PRT
 [0044] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0045] <400> 2
 [0046] Met Thr Ile Thr Tyr Thr Ser Gln Val Ala Asn Ala Arg Leu Gly Ser
 [0047] 1 5 10 15
 [0048] Phe Ser Arg Leu Leu Leu Cys Trp Arg Gly Ser Ile Tyr Lys Leu Leu
 [0049] 20 25 30
 [0050] Tyr Gly Glu Phe Leu Ile Phe Leu Leu Cys Tyr Tyr Ile Ile Arg Phe
 [0051] 35 40 45
 [0052] Ile Tyr Arg Leu Ala Leu Thr Glu Glu Gln Gln Leu Met Phe Glu Lys
 [0053] 50 55 60
 [0054] Leu Thr Leu Tyr Cys Asp Ser Tyr Ile Gln Leu Ile Pro Ile Ser Phe
 [0055] 65 70 75 80
 [0056] Val Leu Gly Phe Tyr Val Thr Leu Val Val Thr Arg Trp Trp Asn Gln
 [0057] 85 90 95
 [0058] Tyr Glu Asn Leu Pro Trp Pro Asp Arg Leu Met Ser Leu Val Ser Gly
 [0059] 100 105 110
 [0060] Phe Val Glu Gly Lys Asp Glu Gln Gly Arg Leu Leu Arg Arg Thr Leu
 [0061] 115 120 125
 [0062] Ile Arg Tyr Ala Asn Leu Gly Asn Val Leu Ile Leu Arg Ser Val Ser
 [0063] 130 135 140
 [0064] Thr Ala Val Tyr Lys Arg Phe Pro Ser Ala Gln His Leu Val Gln Ala
 [0065] 145 150 155 160
 [0066] Gly Phe Met Thr Pro Ala Glu His Lys Gln Leu Glu Lys Leu Ser Leu
 [0067] 165 170 175
 [0068] Pro His Asn Met Phe Trp Val Pro Trp Val Trp Phe Ala Asn Leu Ser
 [0069] 180 185 190
 [0070] Met Lys Ala Trp Leu Gly Gly Arg Ile Arg Asp Pro Ile Leu Leu Gln
 [0071] 195 200 205
 [0072] Ser Leu Leu Asn Glu Met Asn Thr Leu Arg Thr Gln Cys Gly His Leu
 [0073] 210 215 220
 [0074] Tyr Ala Tyr Asp Trp Ile Ser Ile Pro Leu Val Tyr Thr Gln Val Val
 [0075] 225 230 235 240
 [0076] Thr Val Ala Val Tyr Ser Phe Phe Leu Thr Cys Leu Val Gly Arg Gln
 [0077] 245 250 255
 [0078] Phe Leu Asn Pro Ala Lys Ala Tyr Pro Gly His Glu Leu Asp Leu Val
 [0079] 260 265 270
 [0080] Val Pro Val Phe Thr Phe Leu Gln Phe Phe Phe Tyr Val Gly Trp Leu
 [0081] 275 280 285
 [0082] Lys Val Ala Glu Gln Leu Ile Asn Pro Phe Gly Glu Asp Asp Asp Asp
 [0083] 290 295 300

[0084]	Phe Glu Thr Asn Trp Ile Val Asp Arg Asn Leu Gln Val Ser Leu Leu
[0085]	305 310 315 320
[0086]	Ala Val Asp Glu Met His Gln Asp Leu Pro Arg Met Glu Pro Asp Met
[0087]	325 330 335
[0088]	Tyr Trp Asn Lys Pro Glu Pro Gln Pro Pro Tyr Thr Ala Ala Ser Ala
[0089]	340 345 350
[0090]	Gln Phe Arg Arg Ala Ser Phe Met Gly Ser Thr Phe Asn Ile Ser Leu
[0091]	355 360 365
[0092]	Asn Lys Glu Glu Met Glu Phe Gln Pro Asn Gln Glu Asp Glu Glu Asp
[0093]	370 375 380
[0094]	Ala His Ala Gly Ile Ile Gly Arg Phe Leu Gly Leu Gln Ser His Asp
[0095]	385 390 395 400
[0096]	His His Pro Pro Arg Ala Asn Ser Arg Thr Lys Leu Leu Trp Pro Lys
[0097]	405 410 415
[0098]	Arg Glu Ser Leu Leu His Glu Gly Leu Pro Lys Asn His Lys Ala Ala
[0099]	420 425 430
[0100]	Lys Gln Asn Val Arg Gly Gln Glu Asp Asn Lys Ala Trp Lys Leu Lys
[0101]	435 440 445
[0102]	Ala Val Asp Ala Phe Lys Ser Ala Pro Leu Tyr Gln Arg Pro Gly Tyr
[0103]	450 455 460
[0104]	Tyr Ser Ala Pro Gln Thr Pro Leu Ser Pro Thr Pro Met Phe Phe Pro
[0105]	465 470 475 480
[0106]	Leu Glu Pro Ser Ala Pro Ser Lys Leu His Ser Val Thr Gly Ile Asp
[0107]	485 490 495
[0108]	Thr Lys Asp Lys Ser Leu Lys Thr Val Ser Ser Gly Ala Lys Lys Ser
[0109]	500 505 510
[0110]	Phe Glu Leu Leu Ser Glu Ser Asp Gly Ala Leu Met Glu His Pro Glu
[0111]	515 520 525
[0112]	Val Ser Gln Val Arg Arg Lys Thr Val Glu Phe Asn Leu Thr Asp Met
[0113]	530 535 540
[0114]	Pro Glu Ile Pro Glu Asn His Leu Lys Glu Pro Leu Glu Gln Ser Pro
[0115]	545 550 555 560
[0116]	Thr Asn Ile His Thr Thr Leu Lys Asp His Met Asp Pro Tyr Trp Ala
[0117]	565 570 575
[0118]	Leu Glu Asn Arg Asp Glu Ala His Ser
[0119]	580 585
[0120]	<210> 3
[0121]	<211> 21
[0122]	<212> DNA
[0123]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0124]	<400> 3
[0125]	gcctetgata cctacaaacc c 21

[0126] <210> 4
[0127] <211> 22
[0128] <212> DNA
[0129] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0130] <400> 4
[0131] gacttctttt ctctccccag cc 22
[0132] <210> 5
[0133] <211> 20
[0134] <212> DNA
[0135] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0136] <400> 5
[0137] ggtttggggc tgtacaagga 20
[0138] <210> 6
[0139] <211> 20
[0140] <212> DNA
[0141] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0142] <400> 6
[0143] cagtccgcac cttccctac 20
[0144] <210> 7
[0145] <211> 19
[0146] <212> DNA
[0147] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0148] <400> 7
[0149] cgggtgacag aacccttg 19
[0150] <210> 8
[0151] <211> 20
[0152] <212> DNA
[0153] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0154] <400> 8
[0155] accttcagac acccgactct 20
[0156] <210> 9
[0157] <211> 20
[0158] <212> DNA
[0159] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0160] <400> 9
[0161] cttctgcag gttctccac 20
[0162] <210> 10
[0163] <211> 20
[0164] <212> DNA
[0165] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0166] <400> 10
[0167] agctgettcc ttggtccttc 20

[0168] <210> 11
[0169] <211> 20
[0170] <212> DNA
[0171] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0172] <400> 11
[0173] accacatcct cctcctcctc 20
[0174] <210> 12
[0175] <211> 20
[0176] <212> DNA
[0177] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0178] <400> 12
[0179] cccgtgagac cttcctttcc 20
[0180] <210> 13
[0181] <211> 20
[0182] <212> DNA
[0183] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0184] <400> 13
[0185] ggtgttcagg gaaggactgg 20
[0186] <210> 14
[0187] <211> 20
[0188] <212> DNA
[0189] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0190] <400> 14
[0191] gagccaggtc ctaacgttcc 20
[0192] <210> 15
[0193] <211> 20
[0194] <212> DNA
[0195] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0196] <400> 15
[0197] gccctgcatc tctgtttct 20
[0198] <210> 16
[0199] <211> 20
[0200] <212> DNA
[0201] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0202] <400> 16
[0203] cctgccaccc tttcctgtag 20
[0204] <210> 17
[0205] <211> 20
[0206] <212> DNA
[0207] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0208] <400> 17
[0209] atcttgtctt gggtgggtg 20

-
- [0210] <210> 18
[0211] <211> 19
[0212] <212> DNA
[0213] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0214] <400> 18
[0215] ctgtatggct gtgactgga 19
[0216] <210> 19
[0217] <211> 20
[0218] <212> DNA
[0219] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0220] <400> 19
[0221] tgggctccac cttcaacatc 20
[0222] <210> 20
[0223] <211> 22
[0224] <212> DNA
[0225] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0226] <400> 20
[0227] ggcttaggaa tgtgcttcat cc 22

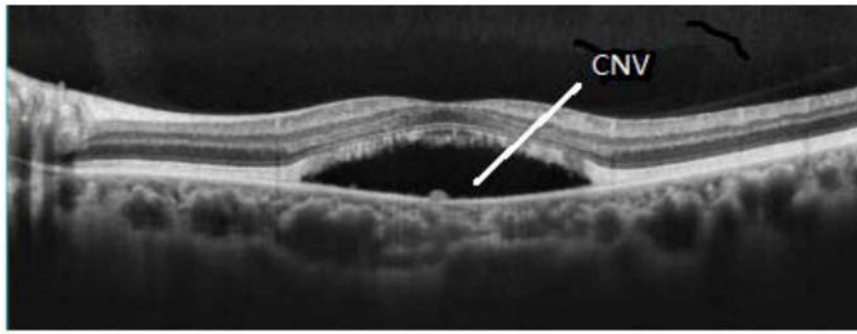


图1

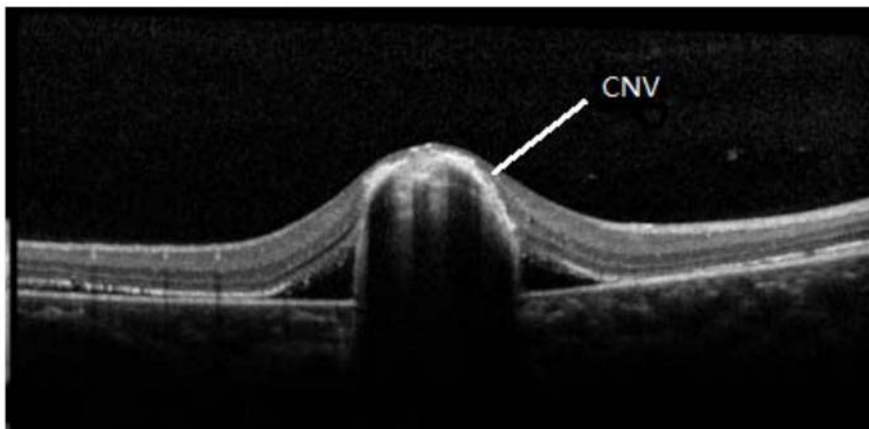


图2

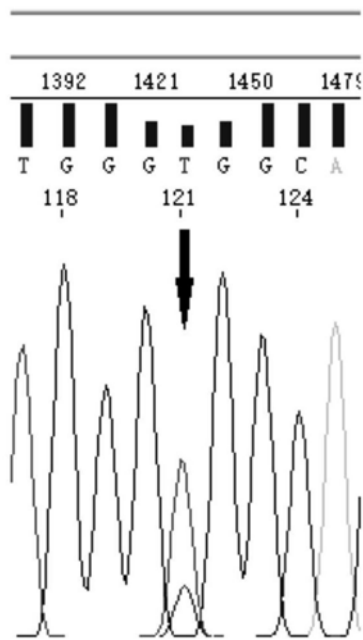


图3

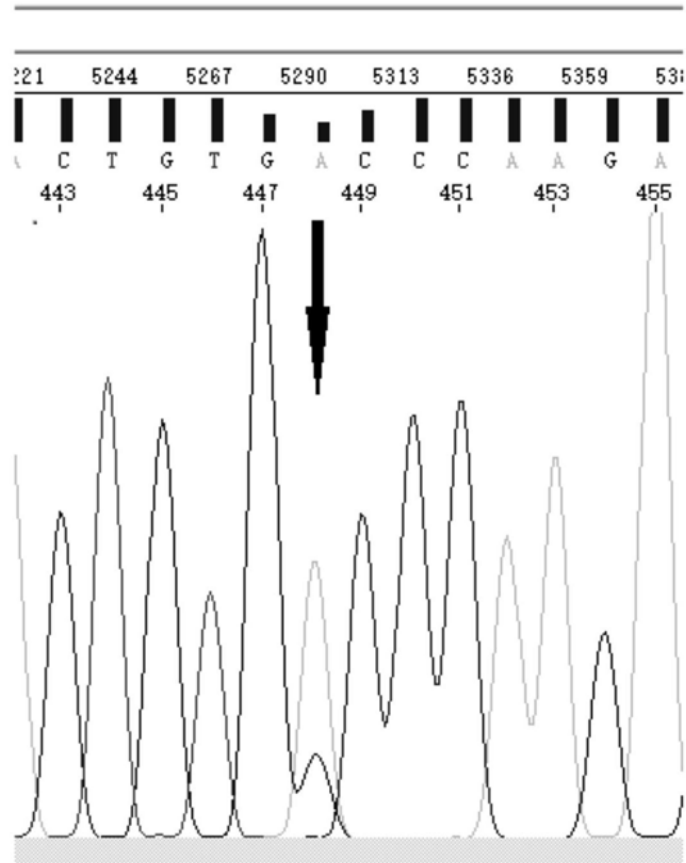


图4

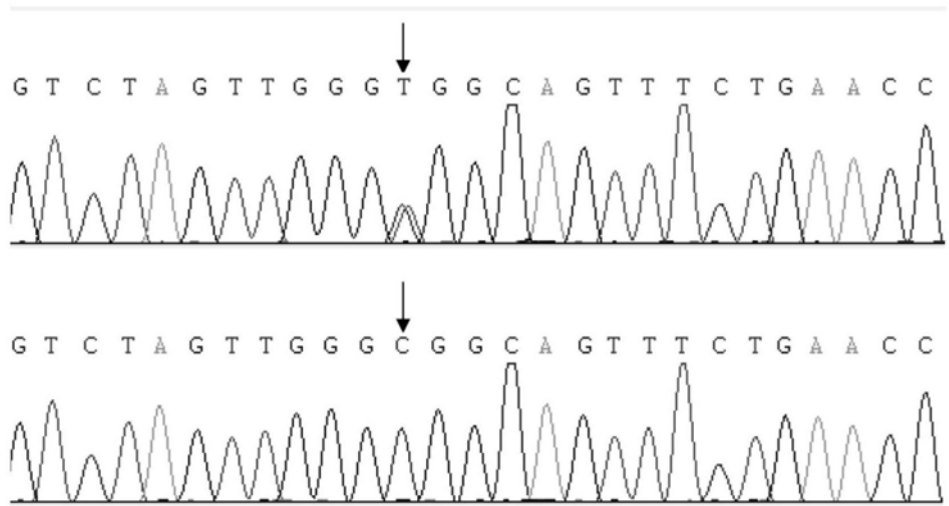


图5

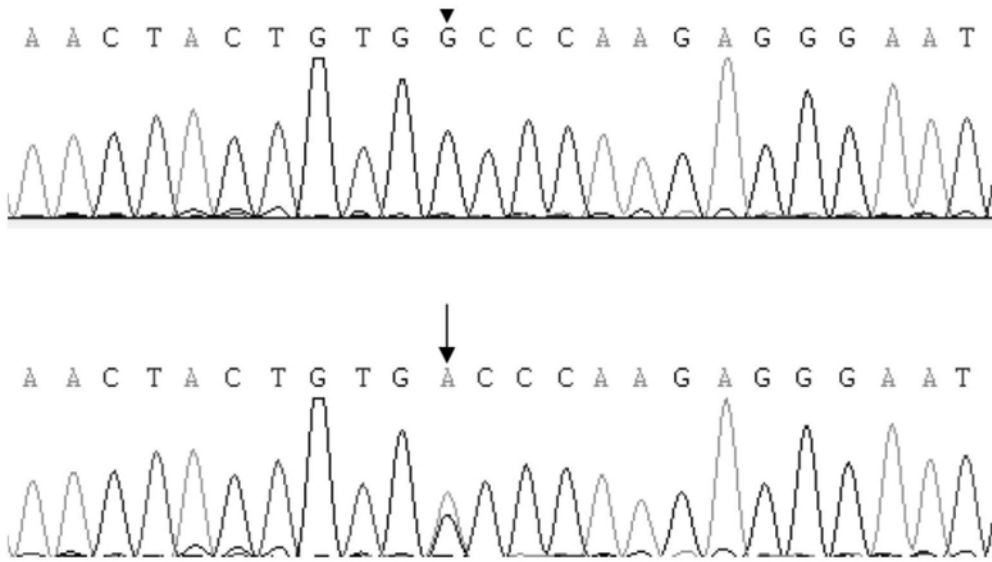


图6

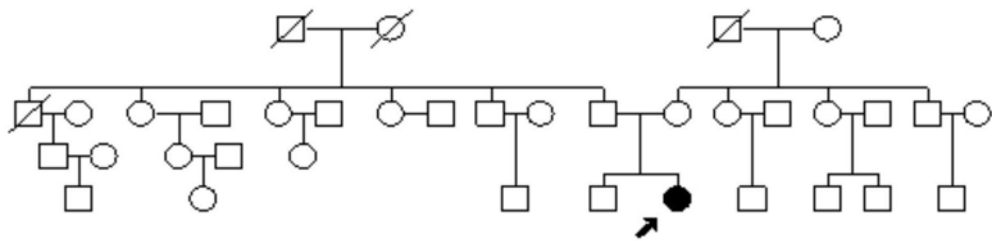


图7

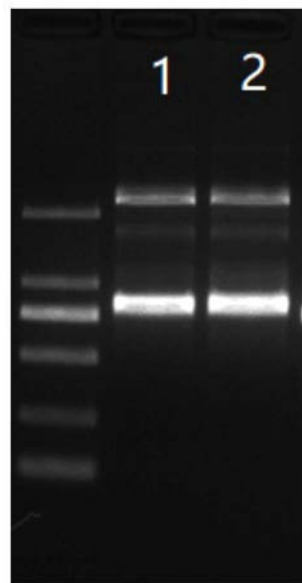


图8

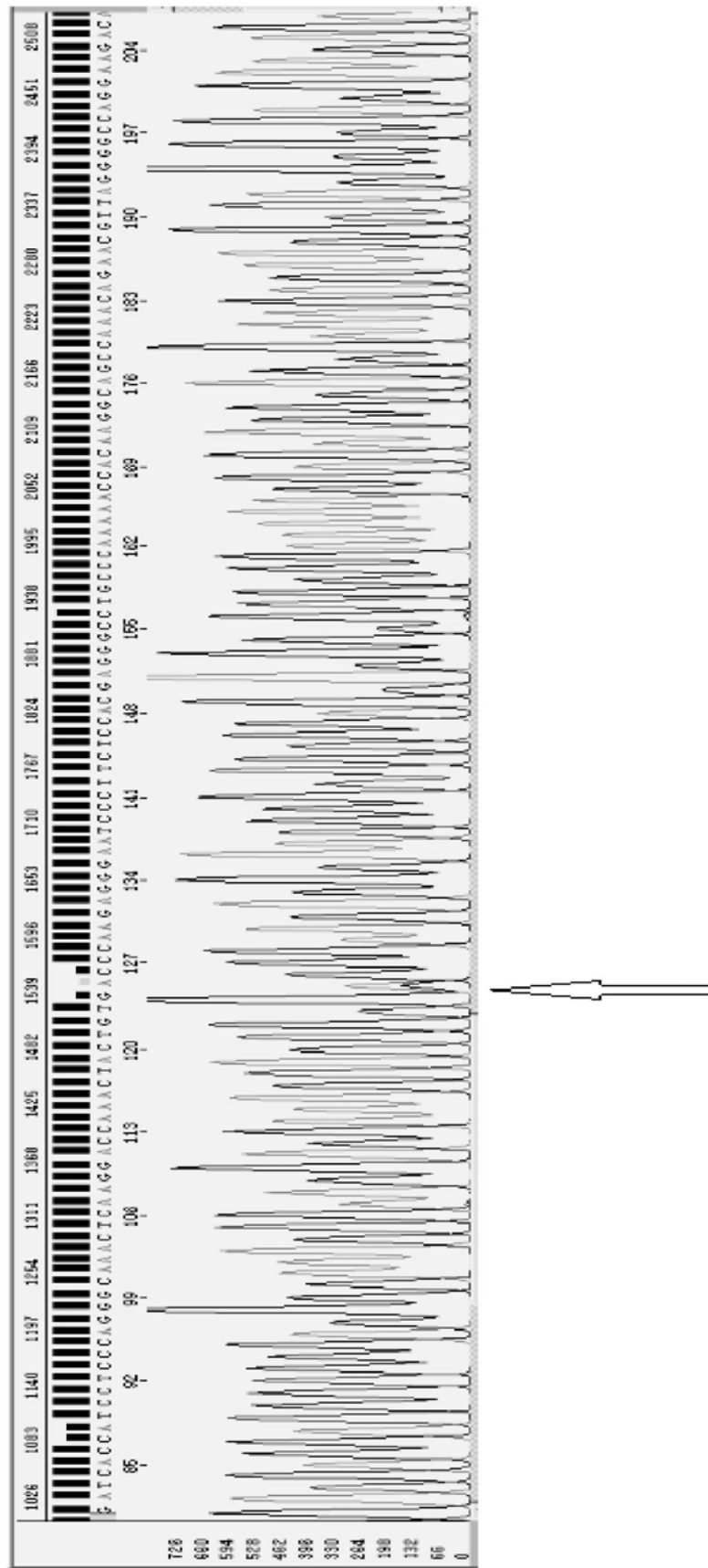


图10