

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510127371.7

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/21 (2006.01)

C12N 15/23 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/866 (2006.01)

C07K 14/56 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月23日

[11] 公开号 CN 1821397A

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/57 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

[22] 申请日 2005.12.22

[21] 申请号 200510127371.7

[71] 申请人 东北农业大学

地址 150030 黑龙江省哈尔滨市香坊区木材街59号

[72] 发明人 王君伟 李洪涛 马波 秘晶纬

[74] 专利代理机构 哈尔滨市哈科专利事务所有限责任公司
代理人 祖玉清

权利要求书2页 说明书6页

[54] 发明名称

鹅重组 I、II 干扰素的制备方法

[57] 摘要

本发明提供的是鹅重组 I、II 型干扰素的制备方法。通过 RT-PCR 扩增编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因，对基因序列分别测序鉴定，将目的基因分别定向亚克隆至 pET30a 原核表达载体，分别在大肠杆菌 BL21 (DE3) plysS 中，进行诱导表达，并对融合表达的目的蛋白分别进行亲和层析纯化、分别定向亚克隆至 pBlueBacHis2A 和 pMel BacA 杆状病毒转移载体，转移载体与线性化的杆状病毒 DNA 分别共转染昆虫细胞 Sf9，重组病毒感染昆虫细胞，真核表达系统表达鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 。本方法得到的产品可作为鹅用抗病毒性疫病的药物及免疫佐剂增强鹅用疫苗的免疫效力。

1、鹅重组 I、II 型干扰素的制备方法，其特征是：

通过 RT-PCR 扩增编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因，对获得基因序列分别测序鉴定，将目的基因分别定向亚克隆至 pET30a 原核表达载体，分别在大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 中，于 37°C IPTG 终浓度 1mM 进行诱导表达，并对融合表达的目的蛋白分别进行亲和层析纯化；

同时将目的基因分别定向亚克隆至 pBlueBacHis2A 和 pMelBacA 杆状病毒转移载体，利用重组杆状病毒转移载体与线性化的杆状病毒 DNA 分别共转染昆虫细胞 Sf9 获得重组杆状病毒，重组病毒感染昆虫细胞，真核表达系统表达鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 。

2、根据权利要求 1 所述的鹅重组 I、II 型干扰素的制备方法，其特征是：

(1) 设计扩增编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因的特异性引物；

(2) 通过 RT-PCR 扩增获得编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因；

(3) 对 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因序列分别进行克隆、测序鉴定；

(4) 将 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别定向亚克隆至 pET30a 原核表达载体；

(5) mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别在大肠杆菌的诱导表达，重组表达质粒 pET30a-mIFN- α 和 pET30a-mIFN- γ 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3)plysS，进行表达；

(6) mIFN- α 与 mIFN- γ 基因原核表达系统融合表达蛋白的亲和层析纯化；

(7) 将 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别定向亚克隆至 pBlueBacHis2A 和 pMelBacA 杆状病毒转移载体；

(8) 重组杆状病毒转移载体与线性化的杆状病毒 DNA 共转染昆虫细胞 Sf9 分别获得携带有鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因的重组杆状病毒；

(9) 利用重组病毒感染昆虫细胞，真核表达系统表达鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 。

3、根据权利要求 2 所述的鹅重组 I、II 型干扰素的制备方法，其特征是：

鹅 mIFN- α 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列为:

```

TGCAGCCCCCTGCGCCTCCACGACAGCGCCTTCCCCTGGGACAGCCTCCAGCTCCTCTGC
1   C S P L R L H D S A F P W D S L Q L L C

61   AACATGGCTCCAGCCCCACACAGCCCTGCCCGCAGCAACATGCACCTTGCTCCTTCCCG
21   N M A P S P T Q P C P Q Q H A P C S F P

121  GACACCCTCTGGACACCAACGACACACAGCAAGCCTCACAGCCACCCTCCACCTCCTC
41   D T L L D T N D T Q Q A S H A T L H L L

181  CAACACCTCTTCGACACCCTCAGCAGCCCCAGACCCCGCGCACTGGCTCCACACCGCA
61   Q H L F D T L S S P S T P A H W L H T A

241  CGCCACGACCTCCTCAACCAGCTCCAGCACCACATCCACCACCTCGAGCGCTGCTTCCCA
81   R H D L L N Q L Q H H I H H L E R C F P

301  GCCGACGCCACGCGCTTCCACAGGCGAGGGCCCCGCAACCTTACCTCGGCATCAACAAG
101  A D A T R F H R R G P R N L H L G I N K

361  TACTTCGGCTGCATCCAACACTTCTCCAGAACCACACCTACAGCCCTGCGCCTGGGAC
121  Y F G C I Q H F L Q N H T Y S P C A W D

421  CACGTCCGCTCGAGGCTCAGCCTGCTTCCAGCGCATCCACCGCCTCACCCGCACCATG
141  H V R L E A H A C F Q R I H R L T R T M

481  CGC
161  R

```

鹅 mIFN- γ 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列为:

```

TGTTCTGGAAGTGCTCTATTTCTTAGTCAACTTCAACATGACATAGACAAACTGAAAGCT
1   C S G S A L F L S Q L Q H D I D K L K A

61   GACTTTAACGCAAGTAATTCAGATGTAGCTGATGGCAATCCTGTTTTATAGAGAAACTG
21   D F N A S N S D V A D G N P V F I E K L

121  AAAAAGTGGACAGAGAAATGAAAAAGGATCATACTGAGCCAGATTGTTTCCCTGTAC
41   K N W T E R N E K R I I L S Q I V S L Y

181  TTGAAATGTAAAGAAAAGTACATGTCAAAGCCACACATCAAAAACCTGTCTGAGCAG
61   L E M L K K T D M S K P H I K N L S E Q

241  CTCAATACTCTGAGAGACACCCTTTCTGATGACTATAAGAAGTTCAAAGACCTCGTGGAC
81   L N T L R D T L S D D Y K K F K D L V D

301  CTGTCAAACCTTCAGCTGACTGGCTTGAATAACCAACGCAAGGCTGTGAGTGAGCTGTTC
101  L S N L Q L T G L K I Q R K A V S E L F

361  AGTGTCTTACAGAACTGCTGGAGACTTCAACTCTCAAAGGAAAAGGAGCCAGTCTCCA
121  S V L Q K L L E T S T L K R K R S Q S P

421  AAGAGATGCAGATGT
141  K R C R C。

```

鹅重组 I、II 干扰素的制备方法

(一) 技术领域

本发明涉及的是基因工程制品的制作方法，具体地说是大肠杆菌原核表达系统、杆状病毒/昆虫细胞真核表达系统表达鹅 IFN- α 成熟蛋白及 IFN- γ 成熟蛋白的制备方法。

(二) 背景技术

目前，禽类疾病的防制仍然采用疫苗免疫、化药以及抗生素。然而大量使用抗生素和化药容易导致环境问题以及危害人类健康。疫苗免疫预防也存在血清型单一以及疫苗研发的速度赶不上毒株变异的速度而常导致免疫失败等问题。细胞因子作为机体内源性物质，具有高效的免疫调节作用，IFN 是机体抗病毒感染防御反应中出现最早、且对大多数病毒均有作用，毒性小，作用快，是一种比较理想的抗病毒生物制剂，同时，将干扰素作为免疫佐剂可提高疫苗的保护效力，鹅干扰素的基因工程制品的研制与开发具有广阔的应用前景。迄今，国内外未见有关鹅干扰素的研究报道，鹅基因工程干扰素的制备，为鹅干扰素的理化特性、生物学活性的研究奠定了物质基础。因此研究和应用鹅 mIFN- α 基因和 mIFN- γ 基因原核表达产物及真核表达产物具有重要的实践应用和理论研究价值。

(三) 发明内容

本发明提供编码鹅 IFN- α 成熟蛋白 (mIFN- α) 及编码 IFN- γ 成熟蛋白 (mIFN- γ) 基因的原核表达蛋白、杆状病毒/昆虫细胞表达蛋白的制备方法。其目的在于提供应用于鹅病防治，具有内源性、高效性、抗病毒谱广、作用快、稳定性好、无药残危险、可实现工业化生产、低成本的原核表达或具有更高生物学活性的真核表达，较理想的抗病毒生物制剂鹅干扰素。同时，将其作为免疫佐剂可提高鹅用疫苗的保护效力。为进一步研究鹅干扰素的分类及其理化特性、生物学活性提供物质基础。

本发明的目的是这样实现的：

通过 RT-PCR 扩增编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因，对获得基因序列分别测序鉴定，将目的基因分别定向亚克隆至 pET30a 原核表达载体，分别在大肠杆菌 BL21 (DE3) plysS 中，于 37 $^{\circ}$ C IPTG 终浓度 1mM 进行诱导表达，并对融合表达的目的蛋白分别进行亲和层析纯化；

同时将目的基因分别定向亚克隆至 pBlueBacHis2A 和 pMelBacA 杆状病毒转移载体，利用重组杆状病毒转移载体与线性化的杆状病毒 DNA 分别共转染昆虫细胞 Sf9 获得重组杆状病毒，重组病毒感染昆虫细胞，真核表达系统表达鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 。

本发明的具体制备方法为：

(1) 设计扩增编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因的特异性引物；

(2) 通过 RT-PCR 扩增获得编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因；

(3) 对 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因序列分别进行克隆、测序鉴定；

(4) 将 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别定向亚克隆至 pET30a 原核表达载体；

(5) mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别在大肠杆菌的诱导表达，重组表达质粒 pET30a-mIFN- α 和 pET30a-mIFN- γ 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS，进行表达；

(6) mIFN- α 与 mIFN- γ 基因原核表达系统融合表达蛋白的亲合层析纯化；

(7) 将 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别定向亚克隆至 pBlueBacHis2A 和 pMelBacA 杆状病毒转移载体；

(8) 重组杆状病毒转移载体与线性化的杆状病毒 DNA 共转染昆虫细胞 Sf9 分别获得携带有鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因的重组杆状病毒；

(9) 利用重组病毒感染昆虫细胞，真核表达系统表达鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 。

编码鹅 IFN- α 成熟蛋白 (mIFN- α) 及编码 IFN- γ 成熟蛋白 (mIFN- γ) 基因的原核表达蛋白、杆状病毒/昆虫细胞表达蛋白它是大肠杆菌原核表达系统、杆状病毒/昆虫细胞真核表达系统表达鹅 IFN- α 成熟蛋白及 IFN- γ 成熟蛋白。鹅 mIFN- α 的编码基因含有 483 个碱基，编码 161 个氨基酸残基，鹅 mIFN- γ 的编码基因含有 435 个碱基，编码 145 个氨基酸残基，用原核表达载体 pET30a 进行表达时，mIFN- α 和 mIFN- γ 基因分别与融合表达载体上的 6 个组氨酸多肽得到融合表达，融合蛋白的分子量大小约为 29KU 和 27KU。用杆状病毒/昆虫细胞表达系统表达 mIFN- α 和 mIFN- γ ，因糖基化修饰，His 标签融合蛋白的分子量大小约为 41KU 和 40KU，分泌性表达蛋白的分子量大小约为 39KU 和 41KU。

鹅 mIFN- α 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列为：

TGCAGCCCCCTGCGCCTCCACGACAGCGCCTTCCCCTGGGACAGCCTCCAGCTCCTCTGC
 1 C S P L R L H D S A F P W D S L Q L L C
 AACATGGCTCCAGCCCCACACAGCCTGCCCGCAGCAACATGCACCTTGCTCCTTCCCG
 61 N M A P S P T Q P C P Q Q H A P C S F P
 21
 GACACCCTCTGGACACCAACGACACAGCAAGCCTCACACGCCACCCTCCACCTCCTC
 121 D T L L D T N D T Q Q A S H A T L H L L
 42
 CAACACCTCTTCGACACCCTCAGCAGCCCCAGACCCCGCGCACTGGCTCCACACCGCA
 181 Q H L F D T L S S P S T P A H W L H T A
 61
 CGCCACGACCTCCTCAACCAGCTCCAGCACCATCCACCACCTCGAGCGCTGCTTCCCA
 241 R H D L L N Q L Q H H I H H L E R C F P
 81
 GCCGACGCCACGCGCTTCCACAGGCGAGGGCCCCGCAACCTTACCTCGGCATCAACAAG
 301 A D A T R F H R R G P R N L H L G I N K
 101
 TACTTCGGCTGCATCCAACACTTCTCCAGAACCACACCTACAGCCCCTGCGCCTGGGAC
 361 Y F G C I Q H F L Q N H T Y S P C A W D
 121
 CACGTCCGCTCGAGGCTCACGCTGCTTCCAGCGCATCCACCGCTCACCCGCACCATG
 421 H V R L E A H A C F Q R I H R L T R T M
 141
 481 CGC
 162 R

鹅 mIFN- γ 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列为:

TGTTCTGGAAGTGCTCTATTTCTTAGTCAACTTCAACATGACATAGACAAACTGAAAGCT
 1 C S G S A L F L S Q L Q H D I D K L K A
 GACTTTAACGCAAGTAATTCAGATGTAGCTGATGGCAATCCTGTTTTTATAGAAAAGT
 61 D F N A S N S D V A D G N P V F I E K L
 21
 AAAAACTGGACAGAGAAAATGAAAAAGGATCATACTGAGCCAGATTGTTTCCCTGTAC
 121 K N W T E R N E K R I I L S Q I V S L Y
 41
 TTGGAATGTAAAGAAAAGTACATGTCAAAGCCACACATCAAAAACCTGTCTGAGCAG
 181 L E M L K K T D M S K P H I K N L S E Q
 61
 CTCAATACTCTGAGAGACACCCTTTCTGATGACTATAAGAAGTTCAAAGACCTCGTGGAC
 241 L N T L R D T L S D D Y K K F K D L V D
 81
 CTGTCAAACCTTCACTGACTGGCTTAAAAATCCAACGCAAGGCTGTGAGTGAGCTGTT
 301 L S N L Q L T G L K I Q R K A V S E L F
 101
 AGTGTCTTACAGAACTGCTGGAGACTTCAACTCTCAAAGGAAAAGGAGCCAGTCTCCA
 361 S V L Q K L L E T S T L K R K R S Q S P
 121
 421 AAGAGATGCAGATGT
 141 K R C R C

本发明提供的编码鹅 IFN- α 成熟蛋白 (mIFN- α) 及编码 IFN- γ 成熟蛋白 (mIFN- γ) 基因的原核表达蛋白、杆状病毒/昆虫细胞表达蛋白, 是利用基因工程技术, 对鹅 mIFN- α 及 mIFN- γ 基因进行克隆的基础上, 并分

别与原核表达载体 pET30a (是一种带有 6 个组氨酸前导肽的融合表达载体)连接,转化大肠杆菌 BL21 表达系统进行原核表达鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ ; 克隆的目的基因与杆状病毒转移载体 pBlueBacHis2A 和 pMe1BacA (pBlueBacHis2A 是带有 6 个组氨酸前导肽标记的融合表达的杆状病毒转移载体, pMe1BacA 是带有)连接,重组杆状病毒转移载体与线性化的杆状病毒 DNA 共转染昆虫细胞 Sf9 分别获得携带有鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因的重组杆状病毒,利用重组病毒感染昆虫细胞,真核表达系统表达鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 。为了获得具有更高生物学活性的鹅干扰素,在基因克隆中删除了编码鹅 IFN- α 与 IFN- γ 信号肽的碱基序列,为方便产物的纯化,在原核表达及真核表达策略中利用 6 个组氨酸标记的融合表达,同时为最大限度保持鹅 IFN- α 与 IFN- γ 的天然活性,在真核表达策略中还采用鹅 IFN- α 与 IFN- γ 的分泌性表达。

采用本发明的方法生产的产品可用于:

作为较理想的抗病毒生物制剂,应用于鹅病防治。同时,将其作为免疫佐剂可提高鹅用疫苗的保护效力。并成为鹅干扰素的分类及其理化特性、生物学活性研究的物质对象。

本发明的产品优点体现在:

①作为理想的抗病毒生物制剂,应用于鹅病防治,具有内源性、高效性、抗病毒谱广、作用快、稳定性好、无药残危险、并可实现工业化生产等特点。

②作为免疫佐剂可提高鹅用疫苗的保护效力。

③即提供具有高生物学活性和低成本原核表达系统表达的鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ , 又提供被糖基化修饰的,接近天然干扰素的真核表达系统表达的鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 。

(四) 具体实施方式

编码鹅 IFN- α 成熟蛋白(mIFN- α)及编码 IFN- γ 成熟蛋白(mIFN- γ)基因的原核表达蛋白、杆状病毒/昆虫细胞表达蛋白及其制备方法包括:

(1)设计扩增编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因的特异性引物;

(2)通过 RT-PCR 扩增获得编码鹅 IFN- α 成熟蛋白及编码 IFN- γ 成熟蛋白基因;

(3)对 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因序列分别进行克隆、测序鉴定;

(4)将 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别定向亚克隆至 pET30a 原核表达

载体;

(5) mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别在大肠杆菌的诱导表达;

(6) mIFN- α 与 mIFN- γ 基因融合表达蛋白的亲合层析纯化, 主要包括:

① mIFN- α 基因融合表达蛋白的亲合层析纯化

离心收集表达细菌, 弃上清取沉淀, 用 1mol/L、pH7.4 的 PBS 洗涤 3 次, 将菌体沉淀用 37℃ 预热的 6M 盐酸胍溶液 pH7.8 (Ni-NAT Purification System Invitrogen) 重悬起, 室温作用 5-10min, 然后进行超声处理, 3000g 离心 15min, 将上清溶液加入已填充 Ni-NAT Agarose 的纯化柱中, 于室温充分作用 15-30min, 弃掉流出液, 用 4ml 的 Denaturing Binding Buffer 冲洗柱子 2 次, 用 4ml 的 Denaturing Wash Buffer 冲洗柱子 2 次, 用 8ml 的 Native Wash Buffer 冲洗柱子 4 次, 用 8-12ml 的 Native Elute Buffer 洗脱结合物, 按 1-2ml 量于洁净 Eppendorf 管内收集洗脱液。

② mIFN- γ 基因融合表达蛋白的亲合层析纯化

离心收集表达细菌, 弃上清取沉淀, 用 1mol/L、pH7.4 的 PBS 洗涤 3 次, 将菌体沉淀用 Native Binding Buffer 重悬起, 反复冻融 3 次, 然后进行超声处理, 3000g 离心 15min, 将上清溶液加入已填充 Ni-NAT Agarose 的纯化柱中, 于室温充分作用 30-60min, 弃掉流出液, 用 8ml 的 Native Wash Buffer 冲洗柱子 4 次, 用 8-12ml 的 Native Elute Buffer 洗脱结合物, 按 1-2ml 量于洁净 Eppendorf 管内收集洗脱液。

(7) 将 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因分别定向亚克隆至 pBlueBacHis2A 和 pMelBacA 杆状病毒转移载体;

(8) 重组杆状病毒转移载体与线性化的杆状病毒 DNA 共转染昆虫细胞 Sf9 分别获得携带有鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 基因的重组杆状病毒;

(9) 利用重组病毒感染昆虫细胞, 真核表达系统表达鹅 mIFN- α 与 mIFN- γ 。

鹅 mIFN- α 的编码基因含有 483 个碱基, 编码 161 个氨基酸残基, 鹅 mIFN- γ 的编码基因含有 435 个碱基, 编码 145 个氨基酸残基, 用原核表达载体 pET30a 进行表达时, mIFN- α 和 mIFN- γ 基因分别与融合表达载体上的 6 个组氨酸多肽得到融合表达, 融合蛋白的分子量大小约为 29KU 和 27KU。用杆状病毒/昆虫细胞表达系统表达 mIFN- α 和 mIFN- γ , 因糖基化修饰, His 标签融合蛋白的分子量大小约为 41KU 和 40KU, 分泌性表达蛋

白的分子量大小约为 39KU 和 41KU。

鹅 mIFN- α 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列为：

```

TGCAGCCCCCTGCGCCTCCACGACAGCGCCTTCCCCTGGGACAGCCTCCAGCTCCTCTGC
1   C S P L R L H D S A F P W D S L Q L L C

61  AACATGGCTCCCAGCCCCACAGCCTGCCCGCAGCAACATGCACCTTGCTCCTTCCCG
21  N M A P S P T Q P C P Q Q H A P C S F P

121 GACACCCTCCTGGACACCAACGACACACAGCAAGCCTCACACGCCACCCTCCACCTCCTC
43  D T L L D T N D T Q Q A S H A T L H L L

181 CAACACCTCTTCGACACCCTCAGCAGCCCCAGACCCCCGCGCACTGGCTCCACACCGCA
61  Q H L F D T L S S P S T P A H W L H T A

241 CGCCACGACCTCCTCAACCAGCTCCAGCACCACATCCACCACCTCGAGCGCTGCTTCCCA
81  R H D L L N Q L Q H H I H H L E R C F P

301 GCCGACGCCACGCGCTTCCACAGCGAGGGCCCCGCAACCTTCACCTCGGCATCAACAAG
101 A D A T R F H R R G P R N L H L G I N K

361 TACTTCGGCTGCATCCAACACTTCTCCAGAACCACACTACAGCCCCTGCGCCTGGGAC
121 Y F G C I Q H F L Q N H T Y S P C A W D

421 CACGTCCGCCTCGAGGCTCAGCCTGCTTCCAGCGCATCCACCGCCTCACCCGCACCATG
141 H V R L E A H A C F Q R I H R L T R T M

481 CGC
163 R

```

鹅 mIFN- γ 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列为：

```

TGTTCTGGAAGTGCTCTATTTCTTAGTCAACTTCAACATGACATAGACAAACTGAAAGCT
1   C S G S A L F L S Q L Q H D I D K L K A

61  GACTTTAACGCAAGTAATTCAGATGTAGCTGATGGCAATCCTGTTTTATAGAGAAACTG
21  D F N A S N S D V A D G N P V F I E K L

121 AAAAACTGGACAGAGAGAAATGAAAAAGGATCATACTGAGCCAGATTGTTCCCTGTAC
41  K N W T E R N E K R I I L S Q I V S L Y

181 TTGAAATGTTAAAGAAAAGTACATGTCAAAGCCACACATCAAAAACCTGTCTGAGCAG
61  L E M L K K T D M S K P H I K N L S E Q

241 CTCAATACTCTGAGAGACACCCTTTCTGATGACTATAAGAAGTTCAAAGACCTCGTGGAC
81  L N T L R D T L S D D Y K K F K D L V D

301 CTGTCAAACCTTCAGCTGACTGGCTTGAAAATCCAACGCAAGGCTGTGAGTGAGCTGTTT
101 L S N L Q L T G L K I Q R K A V S E L F

361 AGTGTCTTACAGAAACTGCTGGAGACTTCAACTCTCAAAGGAAAAGGAGCCAGTCTCCA
121 S V L Q K L L E T S T L K R K R S Q S P

421 AAGAGATGCAGATGT
141 K R C R C .

```