



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104892769 B

(45)授权公告日 2018.04.06

(21)申请号 201510268710.7

C12N 9/88(2006.01)

(22)申请日 2015.05.22

C12N 15/70(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 1/21(2006.01)

申请公布号 CN 104892769 A

G01N 33/53(2006.01)

(43)申请公布日 2015.09.09

A61K 38/16(2006.01)

(73)专利权人 盐城师范学院

A61P 35/00(2006.01)

地址 224002 江苏省盐城市开放大道50号

C12R 1/19(2006.01)

(72)发明人 赵庆新 王建 崔刚 王欢莉

(56)对比文件

康贻军 沈敏

CN 1353762 A,2002.06.12,

CN 102010870 A,2011.04.13,

(74)专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务
所(特殊普通合伙) 11419

Kimoto H et al..Expression of

代理人 张勇

recombinant Streptolysin O and specific
antibody production.《J Mol Microbiol
Biotechnol》.2005,第10卷(第1期),第64-68页.

(51)Int.Cl.

审查员 段珊

C07K 19/00(2006.01)

C07K 14/315(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表10页 附图2页

(54)发明名称

一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用

(57)摘要

本发明公开了一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用,属于医学微生物或生物制药领域。本发明在大肠杆菌中表达了该溶血素融合蛋白PEHSLO,发现该溶血素融合蛋白PEHSLO表达量提高且对宿主细胞毒性低。溶血素融合蛋白PEHSLO同时具有果胶酶活性、溶血性和SLO抗原性,该工程菌果胶酶产率为5.6Unit/mL培养液,溶血酶产率为400000Unit/mL,可溶性溶血素融合蛋白PEHSLO产率为1.2mg/mL培养液。在生产监控检测方面,溶血素融合蛋白PEHSLO可以用果胶酶活性进行定性和定量分析,避免使用免疫学和溶血法检测,简化了检测方法、缩短了检测时间、节约了检测成本。溶血素融合蛋白PEHSLO还可以应用于溶血素蛋白SLO生产、SLO抗体制品生产、SLO抗体检测试剂生产或抗癌药物生产。

CN 104892769 B

1. 一种溶血素融合蛋白PEHSLO,其特征在于,所述溶血素融合蛋白PEHSLO含果胶酸裂解酶和溶血素蛋白序列;编码所述果胶酸裂解酶和溶血素蛋白的氨基酸序列之间还含有肠激酶酶切位点序列和10个组氨酸序列;

所述溶血素融合蛋白的氨基酸序列是SEQ ID NO.1所示的序列。

2. 根据权利要求1所述的溶血素融合蛋白PEHSLO,其特征在于,编码所述溶血素融合蛋白PEHSLO的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 表达权利要求1-2任一所述溶血素融合蛋白PEHSLO的质粒。

4. 根据权利要求3所述的质粒,其特征在于,所述质粒的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

5. 表达权利要求1-2任一所述溶血素融合蛋白PEHSLO的基因工程菌。

6. 表达权利要求1-2任一所述溶血素融合蛋白PEHSLO的转基因细胞系。

7. 一种检测溶血素融合蛋白的方法,其特征在于,所述方法是融合表达果胶酸裂解酶和溶血素蛋白,通过检测果胶酶活性定性和定量分析溶血素融合蛋白PEHSLO。

8. 一种提高溶血素SLO可溶性表达的方法,其特征在于,所述方法是以大肠杆菌BL21(DE3)为宿主,pET-28a(+)为载体,表达核苷酸序列为SEQ ID NO.2的溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sI_o。

9. 权利要求1所述溶血素融合蛋白PEHSLO在溶血素蛋白SLO生产、SLO抗体制品生产、SLO抗体检测试剂生产或抗乳腺癌药物生产中的应用。

一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用,属于医学微生物或生物制药领域。

背景技术

[0002] 化脓链球菌是一类常见的细菌,可引起皮肤、皮下组织的化脓性炎症、呼吸道感染、流行性咽炎的爆发性流行以及新生儿败血症、细菌性心内膜炎、猩红热和风湿热、肾小球肾炎等变态反应。

[0003] 化脓链球菌的溶血素 (Streptolysin O, SLO) 能够与人及其它动物的细胞膜上的胆固醇相结合,结合到细胞膜上的SLO蛋白会形成环状寡聚体,形成大的孔道,导致细胞膜溶解,另外,SLO具有极强的抗原性且易在体内残留,刺激人体及其它动物产生抗体 (anti-SLO, ASO), ASO集聚,导致变态反应。

[0004] SLO作为检测试剂,可以用来检测患者体内的ASO;其次,可以作为治疗肿瘤和杀死肿瘤细胞的药物,另外,SLO作为成孔蛋白,在动物基因工程和蛋白工程领域,用作动物细胞转基因和转蛋白工具。

[0005] 目前SLO蛋白的基因工程重组技术主要存在以下缺陷:SLO蛋白对宿主具有毒性,表达量低和生产过程中SLO检测方法相对繁琐。

发明内容

[0006] 本发明针对SLO重组蛋白对宿主具有毒性,表达量低和SLO蛋白检测相对繁琐的问题,提供了一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用。

[0007] 本发明的第一个目的是提供了一种溶血素融合蛋白 (PeLa-EK-10His-SLO, PEHSLO),该溶血素融合蛋白PEHSLO具有果胶酸裂解酶和溶血素蛋白活性;PEHSLO内部有肠激酶的酶切位点,可以根据需要切除果胶酸裂解酶;另外,还含有10个组氨酸序列,为蛋白纯化提供有效的亲和基团。

[0008] 所述溶血素融合蛋白的氨基酸序列是SEQ ID NO.1所示的序列。

[0009] 编码所述溶血素融合蛋白的溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sIo,可在大肠杆菌中高效表达溶血素融合蛋白PEHSLO。

[0010] 所述溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sIo的核苷酸序列,在本发明的一种实施方式中,如SEQ ID NO.2所示。

[0011] 所述npeIa-ek-10his-sIo的核苷酸序列,在本发明的一种实施方式中,使用了曲霉果胶酸裂解酶酶活性区peIa序列、大肠杆菌肠激酶位点序列、10个组氨酸和化脓链球菌溶血素sIo活性区与抗原区序列。而且曲霉果胶酸裂解酶酶活性区peIa序列和化脓链球菌溶血素sIo活性区与抗原区序列,依据大肠杆菌背景下的密码子优化和增加蛋白表明基团亲水性等原理,进行了优化设计。

[0012] 本发明的第二个目的是提供一种表达所述溶血素融合蛋白PEHSLO或使用所述npeIa-ek-10his-sIo融合基因构建的表达质粒。

[0013] 所述质粒,在本发明的一种实施方式中,为npeIa-ek-10his-sIo-pET-28a(+),其核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0014] 本发明的第三个目的是提供一种表达所述溶血素融合蛋白PEHSLO的基因工程菌或转基因细胞系。

[0015] 所述基因工程菌,在本发明的一种实施方式中,以大肠杆菌BL21 (DE3) 为宿主,pET-28a (+) 为载体,表达核苷酸序列为SEQ ID NO.2的溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sIo。

[0016] 本发明的第四个目的是提供一种检测溶血素SLO的方法,所述方法是融合表达果胶裂解酶和溶血素蛋白,通过检测果胶酶活性定性和定量分析溶血素SLO。所述融合表达是融合表达编码氨基酸序列为SEQ ID NO.1所示的基因。

[0017] 本发明的第五个目的是提供一种提高SLO可溶性表达的方法。所述方法是以大肠杆菌BL21 (DE3) 为宿主,pET-28a (+) 为载体,表达核苷酸序列为SEQ ID NO.2的溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sIo。

[0018] 本发明还要求保护所述溶血素融合蛋白PEHSLO在SLO蛋白生产、SLO检测、SLO抗体制品制备、抗癌药物生产、基因工程或蛋白工程等领域的应用。

[0019] 本发明的有益效果:

[0020] (1) 本发明设计并合成了溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sIo,构建了含该npeIa-ek-10his-sIo融合基因的表达质粒和含该表达质粒的工程菌,该工程菌可以表达溶血素融合蛋白 (PeLa-EK-10His-SLO, PEHSLO)。摇瓶发酵表达结果表明,溶血素融合蛋白PEHSLO对宿主细胞毒性低,20℃条件下表达48h后,npeIa-ek-10his-sIo工程菌OD600可以达到2.5,高于sIo独立表达的工程菌 (OD600:1.60);说明融合表达可以降低SLO蛋白对宿主具有毒性。

[0021] (2) 本发明的工程菌表达的溶血素融合蛋白PEHSLO同时具有果胶酶活性、溶血性和SLO抗原性;该工程菌果胶酶产率为5.6Unit/mL培养液,溶血酶产率为400000Unit/mL,可溶性溶血素融合蛋白PEHSLO产率为1.2mg/mL培养液,占到细胞总蛋白的30%,相比sIo胞内独立表达(可溶性目标蛋白占胞内蛋白的5%),可溶性目标蛋白产量上升达400%;说明融合表达可以提高SLO蛋白的表达量。

[0022] (3) 在生产监控检测方面,溶血素融合蛋白PEHSLO可以用果胶酶活性进行定性和定量分析,一次果胶酶检测所需时间为0.3h,检测成本为0.15元人民币,避免使用免疫学(一次检测所需时间为10h,检测成本为500.00元人民币)和溶血法检测(一次检测所需时间为1.0h,检测成本为0.50元人民币),相对于经测定免疫学和溶血法检测,检测时间分别缩短9.5h和0.5h,检测成本分别节省499.85元和0.35元人民币,经测定1Unit果胶酶活性对应于0.2mg左右的蛋白量和 7.0×10^4 Unit溶血酶活性。本发明的方法可以简便SLO的检测,缩短检测时间、降低检测成本。

附图说明

[0023] 图1:设计的npeIa-ek-10his-sIo-pET-28a (+) 质粒结构图;

[0024] 图2:npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+)酶切鉴定图;1.DNA Marker,2.npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a,3.npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+)双酶切;

[0025] 图3:重组表达PeIa-EK-10His-SLO的SDS-PAGE图谱;1.蛋白Marker,2.npeIa-sIo/pET28a(+)/BL21(DE3)的胞内上清,3.纯化的PeIa-EK-10His-SLO。

具体实施方式

[0026] 以下通过实施例来进一步阐明本发明,下列实施例用于说明目的而非用于限制本发明范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,基本上都按照常见的分子克隆手册所述的条件进行操作。

[0027] 实施例1 溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sIo设计与表达质粒设计

[0028] 所述核苷酸序列使用了曲霉果胶酸裂解酶活性区peIa序列、大肠杆菌肠激酶位点序列、10个组氨酸和化脓链球菌溶血素sIo活性区与抗原区序列,而且曲霉果胶酸裂解酶活性区peIa序列和化脓链球菌溶血素sIo活性区与抗原区序列,依据大肠杆菌背景下的密码子优化和增加蛋白表面基团亲水性等原理,进行了优化设计。在果胶酸裂解酶peIa序列的上游添加Noc I位点序列,在果胶酸裂解酶peIa序列下游加上肠激酶序列、10个组氨酸序列和Nde I位点序列;Nde I位点序列下游,连接sIo基因序列,sIo下游加上BamH I序列,构建的融合基因的具体核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,表达质粒npeIa-ek-10his-sIo-pET-28a(+)的核苷酸序列如SEQ ID NO.3。npeIa-ek-10his-sIo-pET-28a(+)质粒结构如图1所示。

[0029] 本发明加入果胶酸裂解酶peIa序列的目的,是利用该PeIa蛋白在大肠杆菌中可以高效表达出活性蛋白同时对宿主毒性低的优越性,提高SLO蛋白的可溶性,降低SLO蛋白对宿主的毒性,同时提供一种低成本和短时间的目标蛋白检测方法;加肠激酶序列的作用是可以根据应用需要出发,提供切除果胶酸裂解酶PeIa的便利;加入10个组氨酸序列,是为了提供Ni-亲和层析的亲和基团,由于是加在二个蛋白基团之间,根据本本发明的需要,10个组氨基,能保证有效结合,同时在40mM咪唑浓度下可以有效洗脱,不必使用常规的500mM咪唑,可以减少成本。

[0030] 实施例2 溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sIo中npeIa-ek-10his序列的合成与克隆

[0031] 使用化学合成和Over-Lap PCR的方法合成血红素融合基因npeIa-ek-10his-sIo的npeIa-ek-10his部分(SEQ ID NO.2的1-992bp),合成npeIa-ek-10his片段,上游加上Noc I位点,下游加上Nde I序列将合成的片段与PMD18T载体连接,转化JM109,转化产物涂布含100g/mL氨苄青霉素的LB平板,经过37℃培养过夜,得到单克隆转化子npeIa-ek-10his/PMD18T/JM109,经过菌落PCR鉴定,质粒酶切鉴定和测序鉴定,测定的序列和设计序列完全相同。

[0032] 实施例3 溶血素融合基因npeIa-ek-10his-sIo中sIo序列的合成与克隆

[0033] 使用化学合成和Over-Lap PCR的方法合成血红素融合基因npeIa-ek-10his-sIo的sIo部分(SEQ ID NO.2的992-2483bp),上游加上Nde I位点,下游加上BamH I序列,将合成的sIo基因与PMD18T载体连接,转化JM109,转化产物涂布含100g/mL氨苄青霉素的LB平板,经过37℃培养过夜,得到单克隆转化子sIo/PMD18T/JM109,经过菌落PCR鉴定,质粒酶切

鉴定和测序鉴定,表明新合成的sIo基因全长为1485bp,编码495氨基酸,测定的序列和设计序列完全相同,提取sIo/PMD18T备用。

[0034] 实施例4 npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+) 表达载体构建

[0035] 用于实现融合基因在大肠杆菌中表达的载体是pET-28a(+),但对构架有较大改变,不使用pET-28a(+)的二个His-tag和Thrombin序列,将pET-28a(+)质粒和npeIa-ek-10his/PMD18T用Noc I和Nde I切,酶切产物切胶回收,再用T4连接酶连接,连接产物转化E.coIi JM109感受态细胞,经过37℃培养过夜,挑选转化子,通过菌落PCR鉴定,质粒酶切鉴定(见图2)和测序鉴定,保存鉴定的npeIa-ek-10his/pET-28a(+)E.coIi JM109菌,提取npeIa-ek-10his/pET-28a(+)备用。将npeIa-ek-10his/pET-28a(+)质粒和sIo/PMD18T用Nde I和BamH I切,酶切产物切胶回收,再用T4连接酶连接,连接产物转化E.coIi JM109感受态细胞,在100g/mL卡那霉素的LB平板,经过37℃培养过夜,挑选转化子,通过菌落PCR鉴定,质粒酶切鉴定(见图2)和测序鉴定(序列如SEQ ID NO.3所示),保存鉴定的npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+)E.coIi JM109菌,提取npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+)备用。

[0036] 实施例5 表达溶血素融合蛋白PeIA-EK-10His-SLO的工程菌构建

[0037] 将质粒npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+)转化大肠杆菌宿主BL21(DE3),再在100g/mL卡那霉素的LB平板,经过37℃培养过夜,经过菌落PCR鉴定,得到单克隆转化子npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+)/BL21(DE3)。

[0038] 实施例6 溶血素融合蛋白PeIa-EK-10His-SLO表达与分离纯化

[0039] 将npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+)/BL21(DE3)接种在LB培养基中37℃液体培养过夜,后接入TB(甘油5g/L,蛋白胨12g/L,酵母膏24g/L,K₂HPO₄12.54g/L,KH₂PO₄2.31g/L)发酵液体培养基,37℃培养到细菌OD₆₀₀到0.8,用0.5mM IPTG(异丙基硫代β-D半乳糖苷)诱导,降温至20℃培养,表达48h。摇瓶发酵表达结果表明,溶血素融合蛋白PEHSLO对宿主细胞毒性低,20℃条件下表达48h后,npeIa-ek-10his-sIo工程菌OD₆₀₀可以达到2.5,高于sIo独立表达的工程菌(OD₆₀₀:1.60);该工程菌表达的溶血素融合蛋白PEHSLO同时具有果胶酶活性、溶血性和SLO抗原性;该工程菌果胶酶产率为5.6Unit/mL培养液,溶血酶产率为400000Unit/mL,可溶性溶血素融合蛋白PEHSLO产率为1.2mg/mL培养液,占到细胞总蛋白的30%,相比sIo独立表达(占胞内蛋白的5%),可溶性目标蛋白产量上升达400%。

[0040] 实施例7 溶血素融合蛋白PeIa-EK-10His-SLO的分离纯化

[0041] 将npeIa-ek-10his-sIo/pET-28a(+)/BL21(DE3)表达后的培养液离心,得到上清用0.45m膜过滤,过滤后的溶液按照1:1的比例和2X Binding buffer(10mM咪唑,1M NaCl,40mM Tris-HCL)混匀备用;His-tag亲和层析柱用5倍柱体积的1X charging buffer(50mM NiSO₄)处理后,再用倍柱体积1X Binding buffer(5mM咪唑,0.5M NaCl,20mM Tris-HCL)平衡;上样品后用10倍柱体积1X Binding buffer洗柱,再用5倍柱体积1X Washing buffer(10mM咪唑,0.5M NaCl,20mM Tris-HCL)洗柱;用6倍柱体积1X Elution buffer(40mM咪唑,0.5M NaCl,20mM Tris-HCL)洗脱。重组表达的溶血素融合蛋白PEHSLO的SDS-PAGE图谱如图3所示。

[0042] 实施例8 溶血素融合蛋白PEHSLO的果胶酶活性测定

[0043] 检测上清的酶活,果胶酸裂解酶活性检测的反应体系为:0.5mL反应液,内含25mmol/L Tris/HCl(pH 8.0),0.1%果胶酸,1mmol/L CaCl₂和1μL上清,在50℃反应10min,

反应结束后,加1mL 0.02mol/L HCl终止反应,然后在235nm检测光吸收值的变化。一个酶活单位定义为每min释放的1 μ mol不饱和半乳糖醛酸(unsaturated galacturonic acid)的酶量。在235nm,不饱和半乳糖醛酸光吸收系数为4600/M⁻¹cm⁻¹。

[0044] 在生产监控检测方面,溶血素融合蛋白PEHSLO可以用果胶酶活性进行定性和定量分析,一次果胶酶检测所需时间为0.5h,检测成本为0.15元人民币,避免使用免疫学(一次免疫学检测所需时间为10h,检测成本为500.00元人民币)和溶血法检测(一次溶血酶检测所需时间为1.0h,检测成本为0.50元人民币),相对于经测定免疫学和溶血法检测,检测时间分别缩短9.5h和0.5h,检测成本分别节省499.85元和0.35元人民币,经测定1Unit果胶酶活性对应于0.2mg左右的蛋白量和7.0 $\times 10^4$ Unit溶血酶活性。

[0045] 实施例9 溶血素融合蛋白PEHSLO的融血活性测定

[0046] 溶血素融合蛋白样品可用溶液A(溶液A:36mM H₃PO₄,126mM NaCl,1g/L BSA(bovine serum albumin),pH 7.0)进行系列梯度稀释。将0.5mL的150mM 2-mercaptoethanol与1mL稀释样品混匀,30 $^{\circ}$ C孵育15min,然后每管加0.5mL含绵羊红细胞的A溶液(1.58 $\times 10^8$ cells/mL)30 $^{\circ}$ C下反应20min,离心后,用541nm检测上清中血红蛋白的浓度,1U定义为在该实验条件下,引起上述反应体系中红细胞溶解的最小酶量,经测定,融合蛋白PeIa-EK-10His-SLO具有溶血性,酶活为4 $\times 10^5$ Unit/mL培养基左右。Western实验结果为阳性,表明融合蛋白PEHSLO具有抗原性。

[0047] 实施例10 溶血素融合蛋白PEHSLO在诊断试剂生产中的应用

[0048] 用npeIa-ek-10his-slo/pET-28a(+)/BL21(DE3)表达的融合蛋白可以用作临床检测患者体内ASO(抗SLO蛋白的抗体)的重要生物学试剂。利用融合蛋白PeIA-EK-10His-SLO、偶联辣根过氧化物酶的二抗和邻苯二胺,定量分析患者体内的SLO抗体(ASO)的量。

[0049] 实施例11 溶血素融合蛋白PEHSLO在SLO抗体制品生产中的应用

[0050] 将融合蛋白用肠激酶消化后,再用亲和层析纯化,得到SLO蛋白,用200 μ g SLO蛋白免疫牛等敏感动物,首次注射后大约3周后,用50 μ g SLO蛋白加强免疫一次,在大约14天后左右,抗体的滴度会达到最大值,抽取血样,获得血清,制备成多抗。

[0051] 可参考下列文献:

[0052] 1.Kimoto H,Fujii Y,Hirano S,Yokota Y,Taketo A.Expression of recombinant Streptolysin O and specific antibody production.J Mol Microbiol Biotechnol.2005;10(1):64-8.

[0053] 2.Velázquez B,Massaldi H,Battistoni J,Chabalgoity JA.Construction and expression of recombinant streptolysin-o and preevaluation of its use in immunoassays.Clin Diagn Lab Immunol.2005May;12(5):683-4.

[0054] 实施例12 溶血素融合蛋白PEHSLO在动物基因工程领域中作为打孔试剂,转移核酸与蛋白

[0055] 将动物细胞悬浮在Hank平衡盐溶液中(配方为:8g/L NaCl,0.4g/L KCl,1g/L葡萄糖,60mg/L KH₂PO₄,47.5mg/L Na₂HPO₄,NaHCO₃,0.35g/L,30mM HEPES,pH至7.2,定容到1L),加入一定量的PEKSLO蛋白,在37 $^{\circ}$ C,处理15min。

[0056] 实施例13 溶血素融合蛋白PEHSLO可以作为药物封闭乳腺癌细胞EGF受体蛋白ErbB1

[0057] 用终浓度为10unit/ml的SLO Hank平衡盐溶液,处理乳腺癌细胞1.5h。

[0058] 可参考下列文献:

[0059] HaII EH,Gurel V,Dahlberg AE,McMichael J,Brautigan DL.Inhibition of human breast cancer Matrigel invasion by Streptolysin O activation of the EGF receptor ErbB1.CeII Signal.2011Dec;23(12):1972-7.

[0060] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

序列表

<110> 盐城师范学院

<120> 一种溶血素融合蛋白 PeLa-EK-10His-SLO 及其表达质粒与应用

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 824

<212> PRT

<213> 人工合成

[0001]

<400> 1

```

Met Gly Ser Pro Ala Pro Asp Leu Asn Ala Arg His Glu Leu Thr Arg
1           5           10           15
Arg Gln Ala Ser Glu Ser Cys Pro Ile Gly Tyr Cys Thr Gln Asn Gly
           20           25           30
Arg Thr Thr Gly Gly Ala Gly Gly Asp Ser Leu Thr Val Thr Asn Leu
           35           40           45
Ala Asp Leu Ala Glu Ala Ala Glu Ser Asp Gly Pro Leu Thr Ile Ile
           50           55           60
Val Ser Gly Ser Ile Ser Gly Ser Thr Lys Ile Arg Val Ala Ser Asp
65           70           75           80
Lys Thr Ile Phe Gly Glu Ser Gly Ser Ser Ile Pro Gly Ile Gly Phe
           85           90           95
Tyr Ile Arg Arg Val Arg Asn Val Ile Met Arg Asn Leu Lys Ile Ser
           100          105          110
Lys Val Asp Ala Asp Asn Ala Asp Ala Asn Gly Ile Asp Ala Ser Ser

```

	115	120	125	
	Asn Val Trp Val Asp His Cys Asp Leu Ser Gly Asp Leu Ser Gly Gly			
	130	135	140	
	Lys Asp Asp Leu Asp Gly Leu Val Asp Ile Ser His Gly Ala Glu Trp			
	145	150	155	160
	Ile Thr Val Ser Asn Thr Tyr Phe His Asp His Trp Lys Gly Ser Leu			
	165	170	175	
	Ile Gly His Ser Asp Asn Asn Glu Asp Glu Asp Leu Gly His Leu His			
	180	185	190	
	Val Thr Tyr Ala Asn Asn Tyr Trp Tyr Asn Val Tyr Ser Arg Thr Pro			
	195	200	205	
	Leu Ile Arg Phe Ala Thr Val His Ile Ile Asn Asn Tyr Trp Asp Ser			
	210	215	220	
	Leu Ile Asp Thr Gly Val Asn Trp Arg Met Asp Ala Gln Val Leu Ile			
	225	230	235	240
[0002]	Gln Ser Ser Ala Phe His Asn Cys Pro Asp Arg Ala Ile Phe Phe Ala			
	245	250	255	
	Asp Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Ala Val Val Asp Asp Val Asp Leu Gly			
	260	265	270	
	Gly Ser Ser Asn Ser Val Pro Glu Gly Thr Leu Thr Pro Ser Ser Leu			
	275	280	285	
	Pro Tyr Ala Ala Ile Thr Ala Leu Gly Ser Gly Gln Val Ala Ser Val			
	290	295	300	
	Ile Pro Gly Thr Ala Gly Gln Lys Leu Asp Asp Asp Asp Lys His His			
	305	310	315	320
	His His His His His His His His His Met Leu Ala Pro Lys Glu Met			
	325	330	335	
	Pro Leu Glu Ser Ala Glu Lys Glu Glu Lys Lys Ser Glu Asp Lys Lys			
	340	345	350	
	Lys Ser Glu Glu Asp His Thr Glu Glu Ile Asn Asp Lys Ile Tyr Ser			
	355	360	365	

	Leu Asn Tyr Lys Glu Leu Glu Val Leu Ala Lys Asn Gly Glu Thr Ile		
	370	375	380
	Glu Asn Phe Val Pro Lys Glu Gly Val Lys Lys Ala Asp Lys Phe Ile		
	385	390	395
	Val Ile Glu Arg Lys Lys Lys Asn Ile Asn Thr Thr Pro Val Asp Ile		400
		405	410
	Ser Ile Ile Asp Ser Val Thr Asp Met Thr Tyr Pro Ala Ala Leu Gln		
		420	425
	Leu Ala Asp Lys Gly Phe Thr Glu Asn Lys Pro Asp Ala Val Val Thr		
	435	440	445
	Lys Arg Asn Pro Gln Lys Ile His Ile Asp Leu Pro Gly Met Gly Asp		
	450	455	460
	Lys Ala Thr Val Glu Val Asn Asp Pro Thr Tyr Ala Asn Val Ser Thr		
	465	470	475
	Ala Ile Asp Asn Leu Val Asn Gln Trp His Asp Asn Tyr Ser Gly Gly		
[0003]		485	490
	Asn Thr Leu Pro Ala Arg Thr Gln Tyr Thr Glu Ser Met Val Tyr Ser		495
		500	505
	Lys Ser Gln Ile Glu Ala Ala Leu Asn Val Asn Ser Lys Ile Leu Asp		
		515	520
	Gly Thr Leu Gly Ile Asp Phe Lys Ser Ile Ser Lys Gly Glu Lys Lys		
	530	535	540
	Val Met Ile Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Phe Tyr Thr Val Ser Ala Asn		
	545	550	555
	Leu Pro Asn Asn Pro Ala Asp Val Phe Asp Lys Ser Val Thr Phe Lys		
		565	570
	Asp Leu Gln Arg Lys Gly Val Ser Asn Glu Ala Pro Pro Leu Phe Val		
		580	585
	Ser Asn Val Ala Tyr Gly Arg Thr Val Phe Val Lys Leu Glu Thr Ser		
		595	600
	Ser Lys Ser Asn Asp Val Glu Ala Ala Phe Ser Ala Ala Leu Lys Gly		605

	610	615	620	
	Thr Asp Val Lys Thr Asn Gly Lys Tyr Ser Asp Ile Leu Glu Asn Ser			
	625	630	635	640
	Ser Phe Thr Ala Val Val Leu Gly Gly Asp Ala Ala Glu His Asn Lys			
		645	650	655
	Val Val Thr Lys Asp Phe Asp Val Ile Arg Asn Val Ile Lys Asp Asn			
	660	665	670	
	Ala Thr Phe Ser Arg Lys Asn Pro Ala Tyr Pro Ile Ser Tyr Thr Ser			
	675	680	685	
	Val Phe Leu Lys Asn Asn Lys Ile Ala Gly Val Asn Asn Arg Thr Glu			
	690	695	700	
	Tyr Val Glu Thr Thr Ser Thr Glu Tyr Thr Ser Gly Lys Ile Asn Leu			
	705	710	715	720
	Ser His Arg Gly Ala Tyr Val Ala Gln Tyr Glu Ile Leu Trp Asp Glu			
		725	730	735
[0004]	Ile Asn Tyr Asp Asp Lys Gly Lys Glu Val Ile Thr Lys Arg Arg Trp			
	740	745	750	
	Asp Asn Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Ser Pro Phe Ser Thr Val Ile Pro			
	755	760	765	
	Leu Gly Ala Asn Ser Arg Asn Ile Arg Ile Met Ala Arg Glu Cys Thr			
	770	775	780	
	Gly Leu Ala Trp Glu Trp Trp Arg Lys Val Ile Asp Glu Arg Asp Val			
	785	790	795	800
	Lys Leu Ser Lys Glu Ile Asn Val Asn Ile Ser Gly Ser Thr Leu Ser			
		805	810	815
	Pro Tyr Gly Ser Ile Thr Tyr Lys			
	820			

<210> 2

<211> 2483

[0005]

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 2

```

ccatgggctc gcctgcgccg gacctcaacg cccgtcacga atfgaccegc cgccaggcct      60
cagaaagetg tccgatcggg tactgcacac agaacggacg cactaccggt ggtgegggeg      120
gtgactccct gaccgtgacc aatctggccg acctggctga agccgccgag agcgatgggc      180
cgctgacaat catcgtgtct gggctccatct cgggcagtac caagatccgc gtggcctcag      240
ataagacgat ctttgagag tegggtagtt ctatccctgg tateggatte tacattegcc      300
ggctccggaa tgcatcatg cggaacttga agatcagcaa ggtcagcga gacaacgccg      360
atgccaatgg cattgatgcc tctccaatg tctgggtcga tcattgcgac ctctctggag      420
acctcagcgg tgggaaggat gacttggacg gactggtgga taccagccac ggcgcggaat      480
ggateaccgt ctgaaacact tacttccacg accattggaa aggttccctt atcggcact      540
ccgacaacaa tgaagacgag gacctaggcc atctgcacgt caccctaccgt aacaactact      600
ggtacaacgt gtacagccgt acaccctga tccggttcgc cacagtgcac atcataaca      660
actattggga cagcctgacg gacacgggcg tgaactggcg tatggatgca caggtctgca      720
tccagtcctc cgcgttccac aactgccccg acagagcgat ctctctcgcg gactcagact      780
acaccgggta tctgtctgta gacgatgtt accctggcgg ctcgagtaac tccgtgcccc      840
agggaacct gacgcctagc tcttgcctt atcgggccc atctgcctg ggatctggcc      900
aggttgcaag cgtgattccg ggtacagccg gacagaaatt ggacgacgac gacaagcacc      960
atcatacata tcatcata calcaccata tcttggccc gaaagaaatg ccgctggaaa      1020
gtgctgaaaa agaagaaaa aaatccgaag acaaaaaaaaa atccgaagaa gaccacacgg      1080
aagaaataca cgaataaate tactctctga actacaaaga actggaagtg ctggcaaaaa      1140
acggcgaaac cattgaaaat ttgtcccca aagaaggcgt gaagaaagcg gataaattca      1200
ttgttatcga acgtaaaaag aaaaacata acaccacgcc gtttgacatc tctattatcg      1260
atagtgtcac cgacatgacc taccggccg cactgcagct ggccgataaa ggtttaccg      1320
aaaacaaacc ggacgccgtg gttacgaaac gcaatccgca aaaattcat atcgatctgc      1380
eggcatggg tgacaaagcc accgtggaag ttaacgatcc gacctatgca aatgtgtcaa      1440
cggctatfga taacctggtt aatcagtggc acgacaacta ctccggcgggt aataccctgc      1500
cggcacgtac ccagtatacg gaataaatgg tctactcaaa atcgcaaatf gaagcagctc      1560
tgaacgtgaa tagtaaaatc ctggatggca ccttgggaat tgacttcaaa agcatctcta      1620

```

[0006]

aaggigaaaa gaaagtgatg attgcggcct ataaacagat cttctacacc gtcctggcga	1680
acctgcecaa caatccggcc gatgttttg acaaaagegt cacgttcaaa gatctgcaac	1740
gtaaaggcgt gctaaacgaa gcaccgcegc tgtttgtag taatgteget tatggctgca	1800
ccgtcttctg gaaactggaa acgagctcta aatcgaatga tgggaagca gcttttagcg	1860
cgccctgaa aggcaccgat gttaaaacga acggfaata ttccgacatt ctggaaaata	1920
gttcttttac cgccgttgg ctgggcgggtg atgcagctga acataacaaa gttgtaacga	1980
aagatttfga cgtgattcgt aacgttatea aagataatgc gacctcage cgcaaaaatc	2040
cgccctatcc gattagttac acgtccgtgt ttcigaaaaa caataaaaatc gccggcgta	2100
acaategaac cgaatatgtg gaaaccacgt ccaccgaata cacgtcaggc aaaatcaacc	2160
tgagccaccg cgggtcgtat gggcccagc acgaaattct ggggatgaa atcaactacg	2220
atgacaaggg taaagaagt atcaccaaac gtcctggga caacaattgg tactcaaaaa	2280
ctctgccgtt cagcacggtt atcccgtgg gcgcgaacac tcgtaatat cgcatcatgg	2340
cacgcgaatg caccggtctg gcttgggaat ggtggcgtaa agtgattgat gaacgcgacg	2400
ttaaactgag taaagaaaat aatgtaaca ttagecggcag caccctgtec ccgtatggt	2460
caatcaccta caataagga tcc	2483

<210> 3

<211> 7748

<212> DNA

<213> 人工合成

<400> 3

taggeclata tcaaggagga aagtcgtttt ttggggagtt ctgggcaaat ctccggggtt	60
ccccaaatcg atcaataacg agtcgccacc gtcgtcgggt gagtcgaagg aaagcccga	120
acaatcgtcg gcttagagtc accaccacca ccaccagag ctcacgccgg cgttcgaaca	180
gtgcctega gcttaagect aggaataaac atccactaac tcggtatgcc cctgtcccac	240
gacggcgatt acaactglaa ctaaagaaat gagtcaaatt gcagcgaag tagttagtga	300
aatgegggtg taagggttcg gcttggccac gtaagegcac ggtactacgc ttataatgt	360
ctcaagcgcg ggtcgcctta ttggcagac ttcccctcc aaaaactcat ggtaaacac	420
agggtcgtc caaacacia ttgaagaaat gggaacagta gcataacta aagtaggggtg	480

[0007]

tcttaaagca tgacccgggtg tatgcgtggc gccaccgagt ccaactaaaa cggactgcac	540
ataagccaacc tgcaccaaag gtgtataagc caagctaaca actgcegccc ctaaaataac	600
aaaaagtcct tgtgectgca cattgattag cctatecggc claaaaacgc cgacttccag	660
cgtaatagaa actattgcaa tgetttagtc agttttagaa agcactgttg aaacaatata	720
agtcgacgta gtggcgggtc gtgittgccgc catttccttg ataaaaggtc ttacagcctt	780
ataaatggca agcaaaatg tagccaaggga aagtcceggc gcgattttcg acgaagggtg	840
agtaagctaa atctcgagca aaggtaaaag tgettctgce acgetgggat tcgctgtaat	900
gattgtttgt cgcgccacg aagcaatctg tgcggaaatg caacgtctag aaacttgcac	960
tgcgaaaaca gttttttag ccggcctaac aaccgctca agcggctctg ccacatcttc	1020
tagacaaata tccggcgta gtagtgaaag aaaagtggaa atctctacga aaacttcagt	1080
taagggtccc acggtaggtc claaaatgat aagtgcaagt ctgcacgaag ttaaagcta	1140
aaactcatct ggtaactaag gcatatgacc catgcaaggc cgtcccataa tggcggccctc	1200
atcaacagea cggtgactaa ttggtccaat agttatcggc aactgtgtaa acgtatccag	1260
cctagcaatt gaaggigcca ccgaaacagt ggglacgggc cgtctagctt tacttaaaaa	1320
acgcctaacg caaagcattg gtgccgcagg ccaaacaaaa gccattttgg aaatagccgg	1380
tcgacgtcac gccggccctat ccagtaacgc cactgtgata gctattatct ctacagttgg	1440
ccgcaccaca actacaaaaa gaaaaatgca agetattgtt acttaaatag gcgaaagaag	1500
tgcggaagaa agccctgttt taaaagttac caaagcggca aaaaacggtc gtgaaggtea	1560
agaaacatea agtctctcat claaaatagc aactaaagaa ggcacaccag aagaagccta	1620
aaaaaaaaaca gaagcctaaa aaaaagaaga aaaagtcgtg aaaggtcgcc gtaaagaag	1680
ccccggctgt ataccaclac tactactact actactacta clacgaacag cagcagcagg	1740
ttaaagacag gccgacatgg gccttagtgc gaacgttggga ccggtctagg gtcgcgtcat	1800
taccggcgta ttcggttct cgalccgcag tcccaggga gcccggtggt caatgagctc	1860
ggcgggtcca gttgtagcag atgctgtcgt atgggccaca tcagactcag ccgcttctc	1920
tagcgagaca gccccgtcaa caccttgcgc ctctgacct agtcgtggac acgtagggtat	1980
gcggtaagt ggggcacag ctagtcgac agggttatca acaactacta cactgacac	2040
cgcttggcct agtcccaca tgcgacatg tgaacatgg tcatcaaaa tgcctccac	2100
tgcacgtcta ccggtaccag gagcagaagt aacaacagcc tcaccggcta ttccttggga	2160
aaggtaacca gcacctcat tcacaagctc tgcactagg taaggcggc caccgactat	2220
aggtggtcag gcaggttcag taggaagggt ggcgactca gaggtctctc cagcgttact	2280
agctgggctt gtaacctct ccgtagtlac gglaaccgta gccgcaacag acgcagctgg	2340

[0008]

aacgactaga agttcaagge gtactactgt aaggcctgcg ccgcttacat cttaggetat	2400
ggteccctate ttgatgggct gagaggttc tagcagaata gactceggig cgectagaac	2460
catgacggge tctacctggg tctgtgctac taacagtcgc egggtagega gagccgcca	2520
agteggcca gccggctctaa ccagtgccag tccctcagtg gcgggcgtgg tggccatcac	2580
gcaggcaaga cacacgtcat gggetagcct gtcgaaagac tccggaccgc cgeccagita	2640
agcactgccc gcaactccag gcegcgctcg ctccgggtacc atatagagga agaatttcaa	2700
tttgitttaa taaagatctc ccttaacaa taggcgagtg ttaaggggat atcactcagc	2760
ataaftaaag cgccttagct cttagagctag gagatgcggc ctgcgtagca ccggccgtag	2820
tggccgcggt gtccacgcca acgaccgagg atatagcggc tctagtggct acccctteta	2880
gcccgagcgg tgaageccga gtactcgcga acaagccgc acccatacca cgtccgggg	2940
caccggcccc ctgacaacc gcggtagagg aacgtactg gtaaggaac ccgcccacc	3000
gagttgccgg agttggatga tgaccgcagc aaggattacg tccctcagct atccctctc	3060
gcagctctag ggctgtgtgt agcttaccgc gttttgaaa ggcctacc gtactatgc	3120
ggccttctc tcaagtaagt cccaccactt acactttgtt cattgcaata tcttacagcg	3180
tctcatacgg ccacagagaa tagtctggca aagggcgcac cacttggfct ggtcgggtca	3240
aagaecgttt tgcgccctt tteaccttcg ccgctaccgc ctgacttaa tgtaagggtt	3300
ggcgaccctt gttgtgacc gcccgttgt cagcaacgac taaccgcaac ggtggaggtc	3360
agaccgggac gtgcgcggca gctttaaaca gcgccgctaa tttagagcgc ggttagttga	3420
cccacggteg caccaccaca gctaccatct tcttcgccc cagcttcgga catttcgccc	3480
ccacgigta gaagagcgcg ttgcgcagtc acccgactag taattgatag gcgacctact	3540
ggctctacgg taacgacacc ttgcacggac gctgattaca ggcgcgaata aagaactaca	3600
gagactggte tctgggtagt tctcataata aaagagggtt cttctgcat gcgctgacc	3660
gcacctcgtg gaccagegta acccagttgt cgtttagegc gacaatgcc cgggtaatic	3720
aagacagagc cgcgcagacg cagaccgacc gaccglattt atagagttag cgttagtlla	3780
agtcggctat cgccttgccc ttecgctgac ctacaggtac aggccaaaag ttgtttggtt	3840
cgtttaacgac ttactcccgt agcaaggggt acgctacgac caacggttgc tagctaccg	3900
cgaccgcgt tacgcgcggt aatggctcag gcccgacgcg caaccacgcc tatagagcca	3960
tcacctatg ctgctatggc tctgtctgag tacaataatg ggcggcaatt ggtggtagtt	4020
tgtcctaaaa gcggacgacc ccgtttggc gcacctggcg aacgacgtt agagagtecc	4080
ggtecgccac ttecgttag tegacaacgg gcagagtga cacttttctt ttgggtggga	4140
ccgcggglla tgcgtttggc ggagaggggc gcgcaaccgg ctaagtaatt acgtcgaccg	4200

[0009]

tgctgtccaa agggctgacc ttctgcccgt cactcgcgtt gcgtaatta catcaatcg	4260
agtgagtaat ccgtggccct agagctgget acgggaacte tcggaagttg ggtcagtcga	4320
ggaaggccac ccgcgccccg tactgatagc agcggcgiga atactgacag aagaaatagt	4380
acgttgagca tctgtccac ggccgtcgcg agaccagta aaagccctc ctggcgaaag	4440
cgacctcgcg ctgctactag ccggacagcg aacgccataa gccttagaac gtgcgggagc	4500
gagttcggaa gcagtgacca gggcgggtgt ttgcaaaagc gctcttcgtc cggtaatagc	4560
ggccgtaccg ccgggggtgcc cacgcgtact agcagagga cagcaactcc tgggcccagc	4620
cgaccgcccc aacggaatga ccaatcgtct tacttagtgg ctatgcctc gcttgcactt	4680
cgctgacgac gacgtttgc agacgttga ctctgttg tacttaccag aagccaaagg	4740
cacaaageat ttcagacctt tgcgcctca gtgcgggac gtgtaatac aagccctaga	4800
cgtagcgtcc tacgacgacc gatgggacac ctgtggatg tagacataat tgcttcgca	4860
ccgtaactgg gactcaacta aaagagacca gggcggcgta ggtatggcgg tcaacaaatg	4920
ggagtgtgc aaggtcattg gccctacaa gtagtagtca ttgggcatag cactcgtagg	4980
agagagcaaa gtagccatag taatgggggt acttctctt agggggaatg tgcctcgtt	5040
gtcactgggt tctctttt ttgggggaat tgtaccgggc gaaatagtct tgggtctgta	5100
attgegaaga cctctttgag ttgctcgacc tgcgcctact tctcctctg tagacactta	5160
gcgaagtgt ggtgcgacta ctcgaaatgg cgtcgacgga gcgcgcaaaag ccaactctgc	5220
cacttttggg gactgtgtac gtcgagggcc tctgccagtg tgaacagac attgcctac	5280
ggccctcgtc tcttcgggca gtcgcgcga gtcgccaca accgccaca gcccgcgtc	5340
ggtactgggt cagtcctcg ctatgcctc acatagacc gaattgatac gccgtagtct	5400
cgtelaacat gactctcag tgglatata gccacactt atggcgtgtc taecattcc	5460
tcttttatgg cgtagtcgc gagaaggcga aggagcaggt gactgagcga cgcgagccag	5520
caagccgacg ccgctcgcca tagtcagtg agttccgcc attatgcaa taggtgtctt	5580
agtcctctat tgcctctt ctgtacact cgtttccgg tctttccg gtccttggca	5640
ttttccggc gcaacgaccg caaaaaggta tccgagcgg ggggactgct cgtagtgtt	5700
ttagctgcga gttcagctc caecgtttg ggtctctg atattctat ggtccgcaaa	5760
gggggacctt cgaggagca cgcgagagga caaggctggg acggcgaatg gcctatggac	5820
aggcggaaag agggaaagccc ttgcaccgc gaaagagtat cgagtgcgac atccatagag	5880
tcaagccaca tccagcaagc gaggtcgac ccgacacag tcttggggg gcaagtcggg	5940
ctggcgacgc ggaatagcc atgatagca gaactcaggt tgggccattc tgtgtgaat	6000
agcggtgacc gtcgtcgtg accatgtcc taatcgtc gctccataca tccgccagca	6060

[0010]

tgtctcaaga acttcaccac cggattgatg ccgatgtgat cttectgtca taaaccatag	6120
acgegagaeg acttcggtea atggaagcct tttctcaac categagaac taggcggttt	6180
gtttggtggc gaccategce accaaaaaaaa caaacgttcg tegtetaatg cgcgtctttt	6240
tttcttagag ttctcttagg aaactagaaa agatgcecca gactgagagt caccttgctt	6300
ttgagtgcaa ttccctaaaa ecagtaactg ttattttgac agacgaatgt atttgteatt	6360
atgttcecca caatactcgg tataagtgc cctttgcaga acgagatecg ggcetaattt	6420
aaggttgtac ctacgactaa atatacccat atttaeccga gcgctattac agcccgttag	6480
tccacgctgt tagatageta acataccctt cgggctacgc ggtctcaaca aagactttgt	6540
accgtttcca tgcgaacggg tactacaatg tctactctac cagtctgatt tgaccgactg	6600
cettaaatac ggagaaggct ggtagtctgt aaaataggca tgaggactac tacglaccaa	6660
tgagtggiga cgttaggggc cctttgtcg taaggctcat aatcttctta taggactaag	6720
tccactttta taacaactac ggcaccgtca caaggacgcg gccaacgtaa gctaaggaca	6780
aacattaaca ggaaaattgt cgtatgcga taaagcagag cgagtcgcgc ttagtgetta	6840
cttattgcca aaccaactac geteactaaa actactgctc geattaccga ccggacaact	6900
tgctcagacc tttctttacg taittgaaaa cggtaagagt ggcctaagtc agcagtgagt	6960
accactaaag agtgaactat tggaataaaa actgctcccc ttaattatc caacataact	7020
acaacctgct cagccttagc gtctggctat ggtctagaa cggtaggata ccttgacgga	7080
gccactcaaa agaggaagta atgtcttgc cgaaaaagt tttataccat aactattagg	7140
actatactta tttaacgtca aagtaaacct cgagctactc aaaaagattc ttaattagt	7200
actegcctat gtataaactt acataaatet ttttattgt ttatceccaa ggcgcgtgta	7260
aaggggcttt tcacggtgga cttaacatt tgcaattata aaacaatttt aagcgcatt	7320
taaaaacaat ttagtgcagt aaaaaattgg ttatccgget ttagecgttt tagggaatat	7380
ttagttttet tatctggctc tateccaact cacaacaagg tcaaaccttg ttctcagggt	7440
ataatttctt gcaacctgagg ttgcagttc ccgcttttg gcagatagtc ccgctaccgg	7500
gtgatgcact tggtagtggg attagttcaa aaaaccccag ctccacggca ttctgtgatt	7560
tagccttggg atttccctcg ggggctaaat ctggaactgc cccttcggc cgtttgcacc	7620
gctcttctt tcccttcttt cgtttctc ccccgcgate ccgcgacctg teacategcc	7680
agtgcgacgc gcattggtgg tgtgggcggc gcgaattacg ccgcatgtc ccgcgcaggg	7740
taagcggg	7748

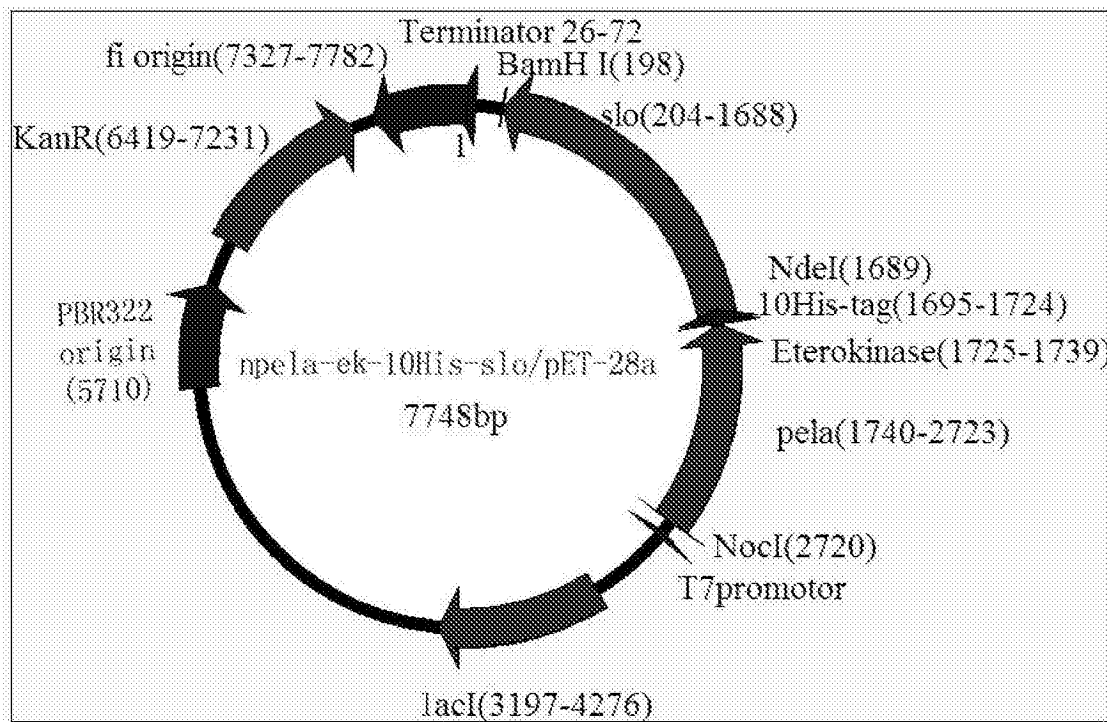


图1

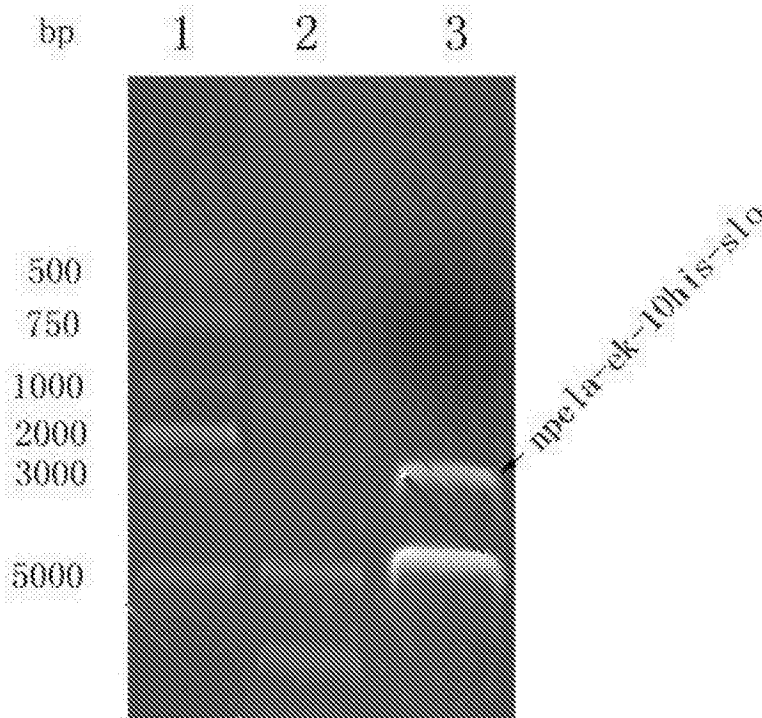


图2

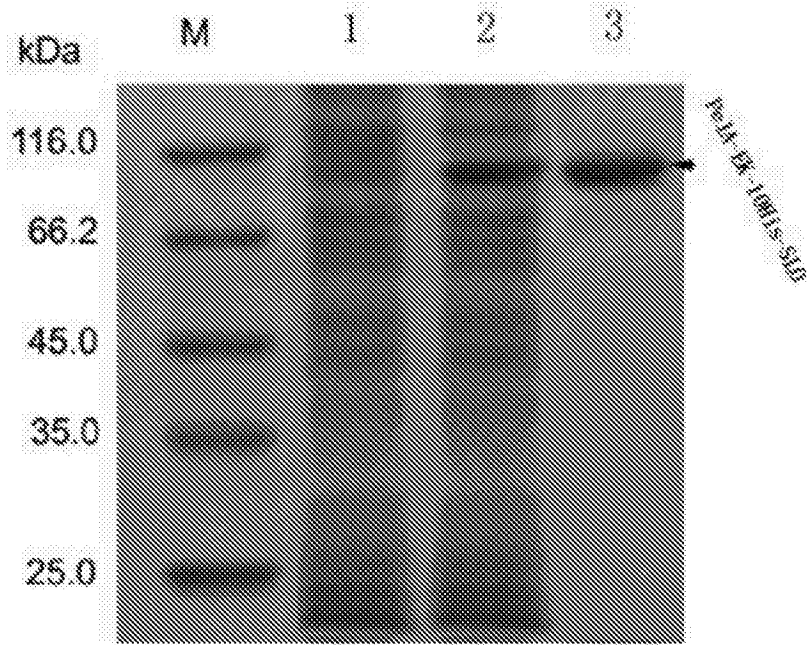


图3

专利名称(译)	一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用		
公开(公告)号	CN104892769B	公开(公告)日	2018-04-06
申请号	CN201510268710.7	申请日	2015-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	盐城师范学院		
申请(专利权)人(译)	盐城师范学院		
当前申请(专利权)人(译)	盐城师范学院		
[标]发明人	赵庆新 王建 崔刚 王欢莉 康贻军 沈敏		
发明人	赵庆新 王建 崔刚 王欢莉 康贻军 沈敏		
IPC分类号	C07K19/00 C07K14/315 C12N9/88 C12N15/70 C12N1/21 G01N33/53 A61K38/16 A61P35/00 C12R1/19		
代理人(译)	张勇		
审查员(译)	段珊		
其他公开文献	CN104892769A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种溶血素融合蛋白PeLa-EK-10His-SLO及其表达质粒与应用,属于医学微生物或生物制药领域。本发明在大肠杆菌中表达了该溶血素融合蛋白PEHSLO,发现该溶血素融合蛋白PEHSLO表达量提高且对宿主细胞毒性低。溶血素融合蛋白PEHSLO同时具有果胶酶活性、溶血性和SLO抗原性,该工程菌果胶酶产率为5.6Unit/mL培养液,溶血酶产率为400000Unit/mL,可溶性溶血素融合蛋白PEHSLO产率为1.2mg/mL培养液。在生产监控检测方面,溶血素融合蛋白PEHSLO可以用果胶酶活性进行定性和定量分析,避免使用免疫学和溶血法检测,简化了检测方法、缩短了检测时间、节约了检测成本。溶血素融合蛋白PEHSLO还可以应用于溶血素蛋白SLO生产、SLO抗体制品生产、SLO抗体检测试剂生产或抗癌药物生产。

