

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510085500.0

[51] Int. Cl.

G12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
G12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 1 月 24 日

[11] 公开号 CN 1900279A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 37/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[22] 申请日 2005.7.22

[21] 申请号 200510085500.0

[71] 申请人 北京诺赛基因组研究中心有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区永昌北路 3 号 707

[72] 发明人 石太平 王 兰 马大龙 高 霞

高 鹏 于传飞 邓唯唯 郭金海

马进京 程华玲 王欣宇 童郁蓉

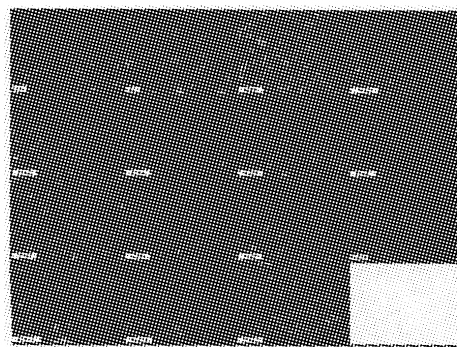
权利要求书 2 页 说明书 65 页 附图 8 页

[54] 发明名称

诱导细胞凋亡的多核苷酸及其编码的多肽和用途

[57] 摘要

本发明公开了一类新的编码具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白的多核苷酸，及其编码的多肽，多肽的抗体。本发明还公开了这类新的多核苷酸在宿主细胞中外源表达诱导细胞凋亡的应用。本发明还公开了所述多肽、抗体在制备预防和治疗与人体细胞凋亡相关的疾病，尤其在开发如艾滋病、神经系统的退行性病变等自身免疫疾病和肿瘤的药物上的用途。



1. 一种分离的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸含有编码具有诱导细胞凋亡功能的多肽的核苷酸序列，该核苷酸序列选自：

(a) 与编码含有 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸有至少 70%相似性的多核苷酸；

(b) 编码含有与 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列有至少 70%相似性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

(c) 与(a)或(b)的多核苷酸互补的多核苷酸。

2. 如权利要求 1 所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码的多肽具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26。

3. 如权利要求 1 所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸的序列与选自下组的核苷酸序列有至少 85%相似性：

(a) SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25 的编码区序列或全长序列；

(b) 在遗传密码简并范围内相应于(a)中提到的序列的至少一个序列；

(c) 与(a)或(b)中提到的序列互补的序列杂交的至少一个序列。

4. 如权利要求 3 所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸的序列选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25 的编码区序列或全长序列。

5. 权利要求 1 所述的多核苷酸编码的多肽，其特征在于，所述多肽包含选自下组中的氨基酸序列的多肽：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26；或与以上任一氨基酸序列具有至少 90%相似性的多肽；或其

保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

6. 权利要求 5 所述的多肽，其特征在于，所述多肽具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26。

7. 一种载体，其特征在于，所述载体含有权利要求 1 所述的多核苷酸。

8. 一种遗传工程宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞选自：

(a) 用权利要求 7 所述的载体转化或转导的宿主细胞；

(b) 用权利要求 1 所述的多核苷酸转化或转导的宿主细胞。

9. 一种抗体，其特征在于，所述抗体是能与权利要求 5 所述的多肽特异性结合的抗体。

10. 一种核酸片段，其特征在于，所述核酸片段含有权利要求 1 所述的任一多核苷酸中 8-100 个连续的核苷酸。

11. 权利要求 1 所述的多核苷酸在诱导细胞凋亡中的应用，其特征在于所述多核苷酸在宿主细胞中外源表达会诱导细胞凋亡。

12. 权利要求 11 所述的应用，其特征在于所述的宿主细胞选自权利要求 8 所述的宿主细胞。

13. 权利要求 1 所述的多核苷酸或权利要求 5 所述的多肽在制备预防和/或治疗与人体细胞凋亡有关的疾病的药物中的用途。

14. 根据权利要求 13 所述的用途，其中所述疾病选自如艾滋病、神经系统的退行性病变等自身免疫疾病和肿瘤。

15. 含有权利要求 5 所述的多肽和药学上可接受的载体的药物组合物。

16. 一种自身免疫疾病或肿瘤的体外检测方法，其特征在于，利用权利要求 9 所述的抗体或权利要求 10 所述的核酸片段来检测宿主样品中的多肽的存在或水平。

诱导细胞凋亡的多核苷酸及其编码的多肽和用途

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及基因表达调控领域，具体地说，本发明涉及一类新的编码具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白的多核苷酸，及其编码的多肽，多肽的抗体。本发明还涉及这类新的多核苷酸在宿主细胞中外源表达诱导细胞凋亡的应用。本发明还涉及所述多肽、抗体在制备预防和治疗与人体细胞凋亡相关的疾病，尤其在开发如艾滋病、神经系统的退行性病变等自身免疫疾病和肿瘤的药物上的用途。

背景技术

人体内的细胞注定是要死亡的，有些死亡是生理性的，有些死亡则是病理性的，有关细胞死亡过程的研究，近年来已成为生物学、医学研究的一个热点，到目前为此，人们已经知道细胞的死亡起码有两种方式，即细胞坏死与细胞凋亡。细胞坏死是早已被认识到的一种细胞死亡方式，而细胞凋亡则是近年逐渐被认识的一种细胞死亡方式，细胞凋亡是细胞的一种基本生物学现象，在多细胞生物清除不需要的或异常的细胞中起着必要的作用。它在生物体的进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着重要的作用。细胞凋亡不仅是一种特殊的细胞死亡类型，而且具有重要的生物学意义及复杂的分子生物学机制。

凋亡是多基因严格控制的过程。这些基因在种属之间非常保守，如 Bcl-2 家族、caspase 家族、癌基因如 C-myc、抑癌基因 P53 等，随着分子生物学技术的发展对多种细胞凋亡的过程有了相当的认识，但是迄今为止凋亡过程确切机制尚不完全清楚。

细胞凋亡之所以成为人们研究的一个热点，在很大程度上决定于细胞凋亡与临床疾病的密切关系。这种关系不仅表现在凋亡及其机制的研究，阐明了一大类免疫病的发病机制，而且由此可以导致疾病新疗法的出现，特别是细胞凋亡与肿瘤及艾滋病之间的密切关系倍受人们重视。

1) HIV 病毒感染造成 CD4⁺ T 细胞减少是通过细胞凋亡机制

HIV 感染引起艾滋病，其主要的发病机制是 HIV 感染后特异性地破坏 CD4⁺ T 细胞，使 CD4⁺ T 以及与其相关的免疫功能缺陷，易导致机会性感染及肿瘤，但 HIV 感染后怎样特异性破坏 CD4⁺ T 细胞呢？近年认为，CD4⁺ T 淋巴细胞绝对数显著减少的原因，主要是通过细胞凋亡机制造成的。这不仅阐明了 AIDS 是 CD4⁺ T 细胞减少的主要原因，同时也为 AIDS 的治疗研究指明了一个重要的探索方向。

2) 从细胞凋亡角度看，肿瘤的发生是由于凋亡受阻所致

一般认为恶性转化的肿瘤细胞是因为失控生长,过度增殖,从细胞凋亡的角度看则认为是肿瘤的凋亡机制受到抑制而不能正常进行细胞死亡清除的结果。因此,从细胞凋亡角度来设计对肿瘤的治疗方法就是重建肿瘤细胞的凋亡信号传导系统,即抑制肿瘤细胞的生存基因的表达,激活死亡基因的表达。

3) 细胞凋亡的研究将给自身免疫病带来真正的突破

自身免疫病包括一大类难治性的免疫紊乱而造成的疾病,自身反应性 T 淋巴细胞及产生抗体的 B 淋巴细胞是引起自身免疫病的主要免疫病理机制,正常情况下,免疫细胞的活化是一个极为复杂的过程。在自身抗原的刺激作用下,识别自身抗原的免疫细胞被活化,从而通过细胞凋亡的机制而得到清除。但如这一机制发生障碍,那么识别自身抗原的免疫活性细胞的清除就会产生障碍,造成淋巴细胞增殖性的自身免疫疾患。

4) 神经系统的退行性病变

目前知道老年性痴呆是神经细胞凋亡的加速而产生的。阿尔茨海默病(AD)是一种不可逆的退行性神经疾病,淀粉样前体蛋白(APP)、早老蛋白-1(PS1)及早老蛋白-2(PS2)的突变导致家族性阿尔茨海默病(FAD)。研究证明 PS 参与了神经细胞凋亡的调控,PS1、PS2 的过表达能增强细胞对凋亡信号的敏感性。Bcl-2 基因家族两个成员 Bcl-x1 和 Bcl-2 参与对细胞凋亡的调节。

既然很多疾病的发生和发展与细胞凋亡失调相关,那么对某些疾病进行治疗性细胞凋亡干预是合乎逻辑的。许多基因与促进或抑制肿瘤细胞凋亡有关,因此通过各种途径的基因转移诱导体内肿瘤细胞凋亡是研究肿瘤治疗的新尝试,治疗价值是不可估量的。相反,用增强细胞对凋亡的耐受性就可以治疗一些退行性变性疾病,因此,凋亡相关基因的发现及其机理研究对于进一步探讨凋亡机制及今后疾病的基因治疗具有重要意义。

发明内容

人基因组学研究目前是国际上的热点,除大规模测序的方法外,还缺少从功能研究开始的高通量筛选具有一定功能的基因的方法。针对这种现状及现有药物或试剂的不足,本发明的目的是提供一类新的编码具有诱导细胞凋亡的人蛋白的多核苷酸 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13。

本发明的另一目的是提供这类多核苷酸所编码的多肽。

本发明的另一目的是提供含有这类多核苷酸的载体,和这类多核苷酸及其载体转化或转导的宿主细胞。

本发明的另一目的是提供这类多核苷酸所编码的多肽的抗体和用于检测的核酸分子。

本发明的另一目的是提供这类新的多核苷酸在宿主细胞中外源表达诱导细胞凋亡的应用。

本发明的另一目的是提供生产这些多核苷酸和其编码的多肽的方法以及该多核苷酸及其编码的多肽的用途。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

在本发明的第一方面，提供新颖的分离的多核苷酸，它包含编码具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的核苷酸序列，该核苷酸序列选自：(a) 与编码含有 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸有至少 70% 相似性的多核苷酸；(b) 编码含有与 SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 的氨基酸序列有至少 70% 相似性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；(c) 与(a)或(b)的多核苷酸互补的多核苷酸。

较佳地，该多核苷酸编码的多肽具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26。

较佳地，该多核苷酸的序列与选自下组的核苷酸序列有至少 85% 相似性：(a) SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25 的编码区序列或全长序列；(b) 在遗传密码简并范围内相应于(a)中提到的序列的至少一个序列；(c) 与(a)或(b)中提到的序列互补的序列杂交的至少一个序列。

更佳地，该多核苷酸的序列选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25 的编码区序列或全长序列。

在本发明的第二方面，提供了上述核苷酸所编码的多肽，它包含具有选自下组中的氨基酸序列的多肽：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26；或与以上任一氨基酸序列具有至少 90% 以上相似性的多肽，或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

较佳地，该多肽是具有选自下组的氨基酸序列的多肽：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26。

在本发明的第三方面，提供了含有上述多核苷酸的载体，以及被该载体转化或转导的宿主细胞，还提供了被上述多核苷酸转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面，提供了与上述多肽特异性结合的抗体，还提供了可用于检测的核酸分子，它含有上述任一多核苷酸中 8-100 个连续的核苷酸。

在本发明的第五方面，提供了上述多核苷酸在宿主细胞中外源表达诱导细胞凋亡的应用。

在本发明的第六方面，提供了上述多核苷酸和多肽在制备预防和/或治疗与人体细胞凋亡有关的疾病的药物中的用途。较佳地，在制备预防和/或治疗与人体细胞凋亡有关的如艾滋病、神经系统的退行性病变等自身免疫疾病和肿瘤的药物中的用途。

在本发明地第七方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明中的具有诱导人体细胞凋亡功能的多肽及药学上可接受的载体。

在本发明的第八方面，提供了一种自身免疫疾病或肿瘤的体外检测方法，利用上述抗体或核酸片段来检测宿主样品中的多肽的存在或水平。

本发明的其他方面由于本文的技术的公开，对本领域技术人员而言是显而易见的。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来（如果是天然物质，原始环境即是天然环境）。如活体细胞内的天然状态下的多核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多核苷酸或多肽如果从天然状态中与共同存在的其他物质分开，则为分离纯化的。这样的多核苷酸可能是某一载体的一部分，也可能这样的多核苷酸或多肽是某一组合物的一部分，既然载体或组合物不是它们的天然环境的成分，这些多核苷酸或多肽仍然是分离的。

如本文所用，“相似性”是指核苷酸或多肽序列比对过程中用来描述检测序列和目标序列之间相同 DNA 碱基或氨基酸残基顺序所占比例的高低，是一种直接的数量关系，通过部分相同或相似的百分比来度量核苷酸序列或者多肽序列之间相似的程度，此相似性百分比可以通过本领域已有的比对方法来计算，例子有两两序列间的比对方法 FASTA 程序 (Pearson, W. R. and Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444 - 2448), BLAST 程序 (Altschul, S. F., et al. 1990 Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410) 等，或多序列比对方法 CLUSTAL W (CORPET, F. 1998 Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res., 16:10881-10890) 等。同源序列是指从某一共同祖先经趋异进化而形成的不同序列，根据相似性百分比可以判断比对序列间的同源性。当基因或蛋白质间相似程度很高时，表示它们具有一段共同的进化历程，从而判断它们会具有相似的生物学功能。当具有至少 50% 的相似程度时，比较容易推测检测序列和目标序列可能是同源序列。较佳地，具有至少 70% 的相似程度；更佳地，具有至少 85% 的相似程度；最佳地，具有至少 90% 的相似程度。而当相似性程度低于 20% 时，就难以确定或者根本无法确定其是否具有同源性。

本发明的多核苷酸包括其互补链可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。如本文所用，“编码具有诱导细胞凋亡功能的多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码序列和/或非编码序列的多核苷酸。以 NIAG1 所编码的多肽为例，编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是遗传密码简并的变异体。如本文所用，“遗传密码简并”是指一个氨基酸有几个密码子的现象。例如在本发明中 NIAG1 所编码的

多肽的遗传密码简并的变异体指编码具有 SEQ ID NO:2 的多肽的核苷酸, 且此核苷酸与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列有差别。对于其他具有诱导人体细胞凋亡功能的多肽, 可依此类推。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体, 它编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。该多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的, 等位变异体是一个多核苷酸的替换形式, 它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入, 但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与本发明所述多核苷酸序列的互补序列杂交且两个序列间具有至少 50%, 较佳地至少 70%, 更佳地至少 80% 相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与此多核苷酸序列的互补序列可杂交的多核苷酸。在本发明中, “严格条件” 是指: (1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱, 如 $0.2 \times \text{SSC}$, $0.1\% \text{SDS}$, 60°C ; 或 (2) 杂交时加有变性剂, 如 $50\% (\text{v/v})$ 甲酰胺, $0.1\% \text{小牛血清}/0.1\% \text{Ficoll}$, 42°C 等; 或 (3) 仅在两条序列之间的相同性至少在 95% 以上, 更好的是在 97% 以上时才发生杂交。并且, 可杂交的多核苷酸编码的多肽与本发明所述的多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明的多核苷酸序列能用本领域已有的方法获得。这些技术包括但不限于: (1) 通过杂交技术分离 DNA 序列; (2) 人工化学合成 DNA 序列; (3) 通过构建 cDNA 文库大规模获得所需的多核苷酸; (4) PCR 扩增技术。

第一种方法是先构建基因组文库或者 cDNA 文库, 然后通过分子杂交等技术从基因组文库或 cDNA 文库中筛选出目的基因或序列。当生物基因组比较小时, 此方法较易成功; 当生物基因组很大时, 构建其完整的基因组文库较困难, 再从庞大的文库中去克隆目的基因的工程量也很大。

第二种方法是按设计好的序列一次合成 100-200bp 长的 DNA 片段, 再用这些合成的片段组合连接成完整的基因。这种合成基因的序列的方法的价格十分昂贵。此方法主要用于合成作为引物、接头等的核酸片段。

第三种方法是用本领域通常的方法构建 cDNA 文库, 多次测序后, 结合生物信息学分析技术 (Ota et al. Nat Genet. 2004 Jan;36(1):40-5), 大规模获得目的 cDNA 克隆。生物信息学分析技术包括但不限于用 BLAST 或 BLAT 与已有的公共数据库比对, 如 refseq 数据库等; 用 Phred 算法评估测序质量; 用计算转录起始密码子 ATG 的出现概率的 ATGpr 算法筛选全长 cDNA 序列等。

第四种方法用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法 (Saiki, et al. Science 1985; 230: 1350-1354)。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择, 并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。本发明优选应用的方法是两步法通量化 RT-PCR 技术在混合 cDNA 文库中扩增得到大量的 cDNA 克隆。混合 cDNA 文库包括现有的 cDNA 文库和肿瘤文库。

本发明的基因, 或者各种 DNA 片段等核苷酸序列的测定可用常规方法, 如双脱氧链终止法

(Sanger et al. PNAS, 1977, 74: 5463-5467); 也可用商业测序试剂盒等。为了获得全长的 cDNA 序列, 测序需要反复进行。有时需要测定多个克隆的 cDNA 序列, 才能拼接成全长的 cDNA 序列。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽, 优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物, 或是化学合成的产物, 或使用重组技术从原核或真核宿主(如细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。本发明的多肽可以是糖基化的, 也可以是非糖基化的。本发明的多肽可以包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

本发明还包括具有诱导人体细胞凋亡功能的多核苷酸编码的人蛋白多肽的片段、衍生物和类似物。术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持与本发明的天然具有诱导人体细胞凋亡功能的人蛋白多肽相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物和类似物可以是:(a) 有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优先保守性氨基酸残基)被取代的多肽, 而这样取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的, 或(b) 在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽, 或(c) 成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物)融合所形成的多肽, 或(d) 附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列)。

本发明的多肽可以通过常规的重组 DNA 技术, 利用本发明的多核苷酸序列来表达或生产重组的具有诱导人体细胞凋亡功能的蛋白多肽(Science, 1984; 224: 1431)。包括以下步骤:

(1) 用本发明的多核苷酸(或其变体), 或用含有此多核苷酸的表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

(2) 在合适的培养基中培养步骤(1)得到的宿主细胞;

(3) 从培养基或细胞中分离、纯化所需的蛋白多肽。

本发明中的多核苷酸和多肽优选以分离的形式提供, 更佳地被纯化至均质。

本发明也涉及包含本发明所述多核苷酸的载体。本发明中, 编码具有诱导人体细胞凋亡功能的人蛋白多肽的多核苷酸序列可以插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒, 如腺病毒、逆转录病毒, 或者其他载体。在本发明中适用的载体可以是原核表达载体, 也可以是真核表达载体, 如在细菌中表达的基于 T7 的表达载体(Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56:125), 在哺乳动物细胞中高表达的真核表达载体 pcDNATM3.1/myc-hisB(-) (Invitrogen), pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, 以下缩写为 pcDT)。本发明优选 pcDT, 它可以直接与 PCR 产物连接来构建真核表达载体, 大大提高了规模化生产的效率。只要能在宿主体内复制和稳定, 任何质粒和载体都可以应用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。用本领域的技术人员熟知的方法来构建含有本发明所述多核苷酸序列和转录/翻译控制信号的表达载体即可。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组 DNA 技术等(Sambrook, et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989)。

本发明的多核苷酸序列可有效地连接到表达载体中的适当的启动子上来指导 mRNA 合成。这些启动子的代表性例子有：大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子；λ 噬菌体的 P_L 启动子；真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、反转录病毒的 LTRs 和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。表达载体优选的包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性、或真核细胞培养用的绿色荧光蛋白 (GFP)、新霉素抗性及二氢叶酸还原酶。

本发明还涉及用上述载体或者本发明的多核苷酸经基因工程产生的宿主细胞。本发明的载体和多核苷酸可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达具有诱导人体细胞凋亡功能的蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS 或 Bowes 黑色素瘤细胞的动物细胞；293 T、Hela 细胞等。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录增强。增强子是 DNA 的顺式作用因子，通常有 10-300 个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。例子有：在复制起始点下游的 100-270 个碱基对的 SV40 增强子、在复制起始点下游的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

本领域的普通技术人员都知道如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主细胞为原核细胞如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收集，用 CaCl₂ 法处理，所用步骤是本领域众所周知的。可供选择的是 MgCl₂ 处理，也可用电穿孔的方法处理。当宿主是真核细胞时，可选择以下转染方法：磷酸钙共沉淀法、常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。获得的转化子可以用常规方法培养，来表达本发明的多核苷酸所编码的多肽。根据所选的宿主细胞选择合适的常规培养基，在适于宿主细胞生长的条件下培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用适当的方法如温度转化或化学诱导，来诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

上述方法中的重组多肽可包被于细胞内、细胞外或在细胞膜上表达或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其他特性通过各种分离方法分离和纯化重组多肽。这些方法是本领域技术人员所熟知的，如常规的复性处理，用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超声波处理、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析和其它各种液相层析技术或这些方法的结合。

本发明还涉及与本发明多核苷酸的任何一部分同源的核酸片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含有 15 个核苷酸，较好的是至少 30 个核苷酸，更好的是至少 50 个核苷酸，最好的是至少 100 个核苷酸。此核酸片段通常是在本发明的核苷酸序列信息的基础上化学合成的 DNA 序列。上述核酸片段可以用于 PCR 扩增技术（如作为引物）以确定和/或分离编码具有诱导人体细

胞凋亡功能的多核苷酸；也可以作为杂交所用的探针。也可以用于 RNA 干扰技术。本发明的多核苷酸的一部分或全部也可作为探针固定在微阵列（Microarray）或 DNA 芯片上，用于分析组织中基因的差异表达和基因诊断。探针的标记可用放射性同位素，荧光素或酶（如碱性磷酸酶）等。

本发明的多肽可以直接作为药物治疗疾病，如艾滋病、神经系统的退行性病变等自身免疫疾病和肿瘤等；还可用于筛选促进或对抗具有诱导细胞凋亡的功能的蛋白的抗体、多肽或其它配体，例如，筛选可用于促进或抑制本发明的蛋白的功能的抗体。用表达的重组的本发明的蛋白来筛选多肽库，用于寻找有治疗价值的能够促进或抑制本发明的蛋白的功能的多肽分子。

本发明的多肽可以单独使用或者与合适的药物载体组合后使用。组合物包含安全有效量的多肽或拮抗剂及不影响药物效果的载体和赋型剂。这些载体可以是水、葡萄糖、乙醇、盐类、缓冲液、甘油及它们的组合。药物组合物可以以方便的方式给药，如通过局部、静脉内、腹膜内、肌内、皮下、鼻内或皮内的给药途径。给药于患者的用量取决于许多因素，如给药方式、待治疗者的健康条件和诊断医生的判断。

本发明的多肽也可以通过在活体表达这些多肽来使用。例如患者的细胞可以通过在体外用编码本发明多肽的基因进行基因工程操作，然后将工程细胞提供给患者，使工程细胞在体内高表达这种多肽，从而达到治疗的目的。

具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白的多核苷酸也可用于多种治疗目的。可用在基因治疗技术中来治疗由于具有诱导细胞凋亡的功能的人蛋白表达异常或活性异常导致的疾病。重组的基因治疗载体（如病毒载体）可设计成表达变异的具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白，来抑制内源性的具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白的活性。重组的具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白基因也可包装到脂质体中转移至细胞内。

抑制本发明多肽 mRNA 的寡聚核苷酸（包括反义 RNA 和 DNA）以及核酸也在本发明的范围之内。反义 RNA 和 DNA 以及核酸可用本领域已有的方法合成。为了增加核酸分子的稳定性，可用多种方法对其进行修饰，如增加两侧的序列长度，核糖核苷间的连接用磷酸硫酸酯键或肽键。

本发明的多肽及其片段、衍生物、类似物或表达它们的细胞可以作为抗原来生产抗体。这些抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段和 Fab 表达文库产生的抗体。本发明的多肽的抗体可用本领域公知的抗体制备方法生产。例子有：单克隆抗体可用杂交瘤技术生产（Kohler and Milstein. *Nature*, 1975, 256: 495-497）。多克隆抗体的生产可用本发明的多肽免疫动物，如家兔、小鼠、大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应，包括但不限于弗氏佐剂。将人恒定区和非人源的可变区结合的嵌合抗体可用已有的技术产生（Morrison et al. *PNAS*, 1985, 81: 6851）。单链抗体也可用已有的技术生产（U. S. Pat No. 4946778）。

本发明的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活体标本中的具有诱导细胞凋亡功能的蛋白。还可以在临床上用于与具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白相关的疾病的临床诊断、治疗、疗效评价等。例如用放射性同位素标记与本发明的多肽结合的单克隆抗体，然后注入体内跟踪其位置

和分布，可以作为一种非创伤性诊断方法来定位肿瘤细胞，或判断肿瘤细胞是否转移。本发明中的抗体还可以用于治疗或预防与具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白相关的疾病。给予适当剂量的抗体可以刺激或阻断具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白的产生或活性。

本发明还涉及定量和定位检测具有诱导细胞凋亡功能的蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的，且包括 FISH 测定和放射免疫测定。实验中检测的具有诱导细胞凋亡功能的蛋白水平，可以用作解释具有诱导细胞凋亡功能的蛋白在各种疾病中的重要性和用于诊断具有诱导细胞凋亡功能的蛋白起作用的疾病。

具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的多核苷酸可用于具有诱导细胞凋亡功能的蛋白相关疾病的诊断和治疗。在诊断方面，具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的多核苷酸可用于检测具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的表达与否，或在疾病状态下具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的异常表达。如具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的 DNA 序列可用于对活检标本的杂交以判断具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的表达异常。杂交技术是本领域已公开的成熟技术，包括 Southern 印迹法、Northern 印迹法、原位杂交等，相关的试剂盒可以从商业途径获得。本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列 (Microarray) 或 DNA 芯片上，用于分析组织中基因的差异表达和基因诊断。用具有诱导细胞凋亡功能的蛋白特异的引物进行 RNA-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 体外扩增也可以检测具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的转录产物。

检测具有诱导细胞凋亡功能的蛋白基因的突变也可用于诊断具有诱导细胞凋亡功能的蛋白相关的疾病。具有诱导细胞凋亡功能的蛋白基因的突变形式包括与正常野生型的具有诱导细胞凋亡功能的蛋白的 DNA 序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用本领域已有的技术如 Southern 印迹法、DNA 序列分析、PCR 和原位杂交检测突变。另外，突变有可能影响蛋白的表达，因此用 Northern 印迹法、Western 印迹法可间接判断基因有无突变。

基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 在实验中所有用到的正常组织、胎儿组织、肿瘤组织中都有表达，说明其为人体自身重要的凋亡相关基因；在不同的组织中表达量高低有差别，说明其在不同的组织中发挥功能的程度不同。

以下对本发明的实施方案进一步详细说明。

本发明通过对 NCBI 的 refseq 数据库进行人功能未知预测基因检索，获得人未知功能基因序列，进一步利用 Human_est 数据库通过 BLASTn 方法进行序列校正，根据校正后得到的序列设计基因特异引物，从混合人组织 cDNA 文库中通过两步法通量化 RT-PCR 技术扩增得到目的基因的编码区 cDNA 片段。此编码区 cDNA 片段与 pcDT 重组构建真核表达载体。采用 pRL 家族海肾荧光素酶报告基因法检测本发明中的基因诱导细胞凋亡的功能。pRL 载体组成性地表达海肾荧光素酶，在其它转染条件相同的情况下，海肾荧光素酶活性的强弱可以反映出待检基因对于细胞状态的影响，如细胞数目、细胞存活率等。将与 pcDT 空质粒相比海肾荧光素酶活性明显降低的基因挑选

出来。将这些基因单独转染细胞后，利用 LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit (L-3224) 染料对细胞进行染色，进一步观察并验证细胞存活状态。该试剂盒中的试验证明，Calcein-AM 是一种胞浆荧光标记物，本身无荧光，渗入细胞后细胞内酯酶催化生成的水溶性绿色荧光物质不易透出细胞，用于活细胞染色。EthD-1 不能进入活细胞但能进入膜已破损的死细胞，并结合于 DNA 上，产生一种红色荧光，用于死细胞染色。通过荧光显微镜观察红绿荧光的比例即可反映出细胞的存活状况。进而通过流式细胞实验检测所选基因对细胞的影响，均获得阳性结果，均程度不同的对所转染细胞有诱导凋亡的效果。实验表明本发明的多肽具有显著、稳定的诱导细胞凋亡作用。

由于采用了以上技术方案，本发明具有如下优点：

- 1、提供了规模化克隆和筛选新基因的技术平台。
- 2、提供了人类新功能基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 的 cDNA 序列及其编码多肽；
- 3、首次发现人类新功能基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 具有诱导细胞凋亡的作用，并且高效、稳定；
- 4、NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 在机体多数正常细胞表达，说明其为自身重要的细胞凋亡相关调控分子。
- 5、基于上述的 4 个优点，本发明为进一步研究凋亡机制，以及开发治疗如艾滋病、神经系统的退行性病变等自身免疫疾病和肿瘤等的新药物，为开创新的临床诊断、疗效评价及预后指标奠定必要的基础。

附图说明

图 1、真核表达载体 pcDT- NIAGx 的构建示意图

(NIAGx 选自 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13)

图 2、pRL 家族海肾荧光素酶基因报告质粒结构图

图 3、NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 外源表达对 pRL 荧光素酶表达的影响

图 4、NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 外源表达对细胞存活的影响

(明场：10×)

图 5、NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 外源表达对细胞存活的影响

(Calcein AM 及 EthD-1 染色：10×)

图 6、NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 外源表达诱导细胞凋亡

(流式细胞计数实验)

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，如《分子克隆实验指南》（2002年第三版[美]萨姆布鲁克等著，科学出版社）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1、两步法通量化 RT-PCR 技术扩增目的基因

(1) 对 NCBI 的 refseq 数据库进行人功能未知预测基因检索，获得人未知功能基因序列，并利用 Human_est 数据库通过 BLASTn 方法进行序列校正，最终得到的序列设定为下组序列：SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 25。根据此类序列设计基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 的特异引物：

基因名称	上游引物(5' -3')	下游引物(5' -3')
NIAG1	gtcgacgctgcttcggtg	gcctcctggagtgtggtggtc
NIAG2	tgtcgtgaggtgaggtgcag	gtgaaacgtggttagtctcgtataaatg
NIAG3	cctcggttaaacactggctcgttc	ttctgtcactcttactaggattcgcc
NIAG4	tgtgtccgctgccatgacag	tggttgagtggcaggtgagg
NIAG5	acttcatcgtcatgcagagcgtc	ccgtcactccgtgtgccc
NIAG6	ggaggtcgtgctatgatccg	gccttactggatcacacacagtttc
NIAG7	cctcggttaaacactggctcgttc	ttctgtcactcttactaggattcgcc
NIAG8	tgtcccatgaggtgccc	tccctaatagtagcattcaggctc
NIAG9	cattgatgcaccattccagtg	tctccagggtcgggtgtagcg
NIAG10	atgccaggtcgttgagggt	gaggaggagctacaactcg
NIAG11	gggtggccgaagcagaagac	ggcagactctcaagatattcacaacc
NIAG12	gcaaccatcaatcccgtctcc	ttgggaccaagtagtgccatttac
NIAG13	ctgagggaaacgctaagtagtgtgtc	gaagtctacatgggtgtaattgctgg

(2) 用上述引物，按目的基因的表达谱在现有的 cDNA 文库和肿瘤文库中选择模板，进行初扩。现有的文库包括 12 种人体正常组织（心、胰、睾丸、卵巢、前列腺、结肠、小肠、骨骼肌、胸腺、淋巴结、扁桃体、白细胞）；6 种人肿瘤组织（肺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌）；和 8 种胎儿组织（胎肺、胎心、胎肝、胎脾、胎肾、胎脑、胎骨骼肌、胎胸腺）的 cDNA 文库（Clonetch, K1420-1, 1241-1）。初扩反应条件如下：

50 μ l PCR 反应：

cDNA 混合库	各 1.0 μ l
5' , 3' 引物	终浓度为 2pmol/ μ l
10 \times Pyrobest buffer	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
Pyrobest	1 μ l
双蒸水	补足至 50 μ l

PCR 延伸时间根据所扩目的基因的最长片段，按 50sec/Kb 的原则进行扩增：

94℃ 5分钟; 94℃ 30秒, 64℃ 30秒, 72℃ 50sec/Kb; 72℃ 10分钟; 4℃ ∞

28个循环

初扩产物纯化到 30μl, 以去除 PCR 反应体系中大量的引物及 dNTPs 等, 并浓缩整个体系, 得到对应目的基因序列的二级扩增库, 作为二扩(大扩)的模板。

(3) 将(2)中的纯化产物作为模板, 分别对每个目的基因进行二扩, 反应条件如下:

50μl PCR (每个基因) 反应:

一扩纯化产物	1.6μl
5', 3' 引物	终浓度为 2pmol/μl
10× Ex-Taq buffer	5μl
2.5mM dNTP	4μl
Ex-Taq	0.5μl
双蒸水	补足至 50μl

PCR 延伸时间根据所扩目的基因的最长片段, 按 50sec/Kb 的原则进行扩增:

94℃ 5分钟; 94℃ 30秒, 64℃ 30秒, 72℃ 50sec/Kb; 72℃ 10分钟; 4℃ ∞

30个循环

得到的 PCR 产物取 10μl 上样电泳, 挑选有扩增条带的 PCR 产物, 进行等体积纯化 (40μl)。

通过两步 PCR 反应扩增出非单一条带的基因用 Qiagen 胶回收试剂盒切胶回收目的片段。扩增的结果表明, 这些组织的细胞中都存在基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 的 cDNA, 说明 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 在这些组织的细胞中都产生了基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 的转录产物, 有较广的表达图谱, 在多种组织中参与转录因子的调节。

实施例 2、目的基因真核表达载体的构建

将二扩纯化产物和真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, 缩写为 pcDT), 按照试剂盒制造厂商建议的条件进行连接反应。连接产物电击法转化大肠杆菌 DH5α, 转化物在含氨苄青霉素的固体 LB 平板培养基上生长, 挑选生长的单一克隆菌落, 提取质粒, 用 EcoRI 酶切, 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定, 挑选有插入片段的阳性克隆, 通过测序 (ABI PRISM 3700 DNA 分析仪) 选出正确的正向插入克隆, 各自命名为 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13。

同时收集培养液, 用 SDS-PAGE 分析沉淀蛋白, 获得 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 多肽。

NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 蛋白分析结果显示: NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 蛋白序列如下组序列: SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 所示。

实施例 3、海肾荧光素酶报告基因法测定目的基因诱导细胞凋亡的作用

用目的基因和 pRL 家族海肾荧光素酶报告基因载体共转染人胚胎肾 293T 细胞，通过检测海肾荧光素酶的活性来测定目的基因对于细胞状态的影响，如细胞数目、细胞存活率等。将与 pcDT 空质粒相比海肾荧光素酶活性明显降低的基因筛选出来。具体操作步骤如下：

(1) 细胞培养：将 1.2×10^4 个 293T 细胞 (ATCC Number: CRL-11268) 用含 10% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培养基 (Hyclone, SH0022.02) 铺在 96 孔细胞培养板 (Costar, 3599) 上 (100 μ l 培养液/孔)，在 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 的细胞培养箱 (SANYO, MCO-15AC) 中培养 24 小时。

(2) 制备转染工作液：用 2.5 μ l 生理盐水稀释 20ng pRL 家族海肾荧光素酶报告基因载体和 80ng 待检基因，轻轻混匀，室温放置；同样用 2.5 μ l 生理盐水稀释 0.04 μ l VigoFect 转染试剂 (威格拉斯生物技术 (北京) 有限公司)，轻轻混匀，室温放置 5 分钟；将稀释的 VigoFect 转染试剂逐滴加入稀释的待检基因与报告基因混合液中，轻轻混匀，是为转染工作液，室温放置 15 分钟。

(3) 转染：将转染工作液轻轻混匀，逐滴加入至 (1) 中铺好细胞的 96 孔细胞培养板中，置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 小时。

(4) 检测：转染 24 小时后，将 96 孔板的细胞以 800 转/分钟 (Eppendorf Centrifuge, 5810R) 离心 5 分钟，弃上清。每孔加入 40 μ l 细胞裂解液，混匀后将 96 孔板置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱 1 小时以上。将 96 孔板从 -80 $^{\circ}$ C 解冻后恢复至室温，每孔吸取 10 μ l 细胞裂解液移至白色酶标板，用微孔板酶标仪 (Genios Pro, Tecan) 检测海肾荧光素酶活性。海肾荧光素酶底物用量为每孔 25 μ l。

pRL 载体是将海肾荧光素酶基因与基础性表达的启动子偶联，提供组成性表达的海肾荧光素酶。实验过程中条件的改变会影响海肾荧光素酶的表达，这些因素包括细胞存活状况 (细胞数目、细胞健康状况等)、转染效率、细胞裂解效率及检测效率等。在实验系统误差的前提下，同一块 96 孔板的转染及检测效率基本近似，因此，海肾荧光素酶活性的明显降低可以反映出细胞存活状况的改变，我们以 pcDT 质粒作为对照，将与 pRL 质粒共转染后引起海肾荧光素酶活性明显降低的基因筛选出来。

结果如图 3 所示：基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 与 pcDT 比较，明显降低了海肾荧光素酶活性。表明基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 可改变转染细胞的存活状况。

实施例 4、利用染料观察细胞存活状况

用实施例 3 中筛选出的基因单独转染 293T 细胞后，利用 LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probe, L-3224) 对细胞进行染色，按产品说明书所述进行操作，于倒置荧光显微镜 (Zeiss, Axiovert 200M) 下观察细胞存活状况 (包括明场及

荧光激发状态)。具体操作步骤如下:

本实验用 96 孔细胞培养板 (Costar, 3599) 操作, 每个待检基因设置 3 个平行重复孔, 分别以 pcDT 空质粒和 Bax 质粒做为空载体和阳性对照。下述步骤中的用量均为单孔用量。

(1) 细胞培养: 将 1.2×10^4 个 293T 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基铺在 96 孔细胞培养板上 (100 μ l 培养液/孔), 置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 24 小时。

(2) 制备转染工作液: 用 2.5 μ l 生理盐水稀释 160ng 待检基因, 轻轻混匀, 室温放置; 同样用 2.5 μ l 生理盐水稀释 0.04 μ l VigoFect 转染试剂, 轻轻混匀, 室温放置 5 分钟; 将稀释的 VigoFect 转染试剂逐滴加入至稀释的待检基因溶液中, 轻轻混匀, 是为转染工作液, 室温放置 15 分钟。

(3) 转染: 将转染工作液轻轻混匀, 逐滴加入至 (1) 中铺好细胞的 96 孔细胞培养板中, 轻轻混匀, 置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24-48 小时。

(4) 镜检: 转染 24-48 小时后, 用 Zeiss 显微镜观察细胞形态改变。待检质粒分别与 pcDT 和 Bax 比较。结果如图 4 所示, 转染 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 基因 30 小时后, 所转染的细胞基础状态较差, 体积缩小, 连接消失, 核质浓缩色暗, 且偏于一侧。

(5) 染色: 用 5ml PBS 稀释 10 μ l 2 mM EthD-1 (死细胞易染) 储存液至浓度为 4 μ M, 充分混匀; 用 5ml PBS 溶液稀释 2.5 μ l 4mM Calcein AM (活细胞染料) 储存液, 充分混匀; 两种染料终浓度分别为 1 μ M Calcein AM 和 2 μ M EthD-1。弃去转染细胞的培养液, 用温育的 PBS (37 $^{\circ}$ C) 洗涤两遍。加入 50 μ l 稀释好的染料, 置 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 培养箱中孵育 30 分钟至 1 小时。

(6) 镜检: 弃去染料, 用 PBS 洗涤一遍, 加入 100 μ l PBS, 用 Zeiss 倒置荧光显微镜观察。Calcein AM 激发光波长为 485 \pm 10 nm, 发射光为 530 \pm 12.5 nm; EthD-1 激发光波长为 530 \pm 12.5 nm, 发射光为 645 \pm 20 nm。

结果如图 5 所示, 基因 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 与空载体比较, 相同视野中所转染细胞的存活状态明显不佳, 红染细胞 (EthD-1 染色细胞, 发红色荧光) 较多, 而绿染细胞 (Calcein AM 染色细胞, 发绿色荧光) 较少, 与阳性对照 Bax 效果接近, 说明 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 可明显改变细胞存活状态, 并在不同程度上诱导所转染细胞坏死或凋亡。

实施例 5、流式细胞实验

用实施例 3 中筛选出的基因单独转染 293T 细胞后, 利用流式细胞仪检测待检质粒的诱导细胞凋亡的功能。具体操作步骤如下:

(1) 细胞培养: 将 293T 细胞 (1×10^5) 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基铺在 24 孔细胞培养板 (Costar, 3599) 上, 置 37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养 16 小时。

(2) 制备转染工作液: 用 8 μ l 生理盐水稀释 500ng 待检质粒, 轻轻混匀, 室温放置; 同

样用 8 μ l 生理盐水稀释 0.16 μ l VigoFect 转染试剂，轻轻混匀，室温放置 5 分钟；将稀释的 VigoFect 转染试剂逐滴加入至稀释的待检质粒溶液中，轻轻混匀，室温放置 15 分钟。

(3) 转染：将转染工作液轻轻混匀，逐滴加入至细胞培养板（500 μ l 培养液/孔）中，轻轻混匀，置 37 $^{\circ}$ C，5% CO₂ 培养箱中培养 24-48 小时。

(4) 制备单细胞悬液，流式细胞仪检测

转染后 24 和 48 小时收获细胞。吸出培养基，加入 100 μ l 胰酶（Hyclone, SH30042.01），37 $^{\circ}$ C 消化 3 分钟，再加入 200 μ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中和胰酶，吹吸数次使形成单细胞，移入流式管（FALCON, 352052），1500 转每分钟（Eppendorf Centrifuge, 5810R）室温离心 5 分钟，弃去上清。加入 3ml PBS 重悬细胞，1500 转每分钟室温离心 5 分钟，弃去上清。重复上述洗细胞一次，并重悬于 200 μ l Binding buffer（10mM Hepes, 140mM NaCl, 1mM MgCl₂, 5mM KCl, 2.5mM CaCl₂），加入终浓度为 1 μ g/ml FITC-Annexin-V（北京宝赛生物技术有限公司, CX1001-2），室温避光反应 30 分钟，再加入终浓度为 1 μ g/ml PI（北京宝赛生物技术有限公司, CX1001-2）。检测使用流式细胞仪（FACSCalibur, BD, USA）。FITC 标记的 Annexin-V 发绿色荧光，可以特异性结合于凋亡细胞特有的外翻于细胞膜外的磷脂酰丝氨酸，PI 可以穿透死亡细胞的细胞膜，进而将细胞核染成红色。Annexin-V 与 PI 双阴性的细胞即为活细胞，其余为死亡细胞。

结果如图 6 所示，不管是转染 24 小时还是 48 小时，NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 与空载体比较均有阳性结果，与阳性对照 Bax 作用相似，只是各个基因作用程度不一，而 48 小时诱导细胞凋亡的效果比 24 小时更为显著。说明 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 可以不同程度上诱导细胞凋亡。

实施例 6、抗体制备

抗原选用原核细胞或真核细胞表达的 NIAG1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 蛋白全长或部分肽段，也可以合成多肽作为抗原。

多克隆抗体的制备：免疫动物选用成年雄性新西兰兔或 BALb/c 小鼠，初次免疫用 200 μ g（新西兰兔）或 20 μ g（BALb/c 小鼠）抗原与等体积弗氏完全佐剂（FCA）充分乳化后，于背部皮下多点注射。初次免疫后 21、42、63 天，用弗氏不完全佐剂（FIA）完全乳化的抗原蛋白，各加强免疫 1 次，用量同前。每次免疫后 7~10 天，ELISA 方法检测血清效价，达到 1×10^4 时，放血分离血清。Western blot 鉴定抗体特异性。

单克隆抗体制备：免疫 BALb/c 小鼠同前，取脾脏制成 B 细胞悬液，与对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，通过 HAT（H：次黄嘌呤；A：氨基喋呤；T：胸腺嘧啶核苷）选择性培养，获得杂交细胞系，再通过 ELISA 方法检测抗体效价，筛选出特定的杂交瘤细胞系，并得到单克隆抗体。

序列表

<110> 北京诺赛基因组研究中心有限公司

<120> 诱导细胞凋亡的多核苷酸及其编码多肽和用途

<130>

<160> 26

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1515

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (217)..(804)

<400> 1

cggaggagag cgcaggagga aacagtaccg gctggaggcc ggtcttgag gagcggggga 60

ctgctggggg cggggcttgg tgggtactgc tggcggggcg gggcctgggg ctcagagggg 120

tgggctttgg agatcagagg gtcgacgtg cttcgttgcc tggactctgg tttccgcctt 180

ggagcaagcc ggggcctggt cggcagctgg gccgcc atg gag tcc acg ctg ggc 234

Met Glu Ser Thr Leu Gly

1 5

gcg ggc atc gtg ata gcc gag gcg cta cag aac cag cta gcc tgg ctg 282

Ala Gly Ile Val Ile Ala Glu Ala Leu Gln Asn Gln Leu Ala Trp Leu

10

15

20

gag aac gtg tgg ctc tgg atc acc ttt ctg ggc gat ccc aag atc ctc 330

Glu Asn Val Trp Leu Trp Ile Thr Phe Leu Gly Asp Pro Lys Ile Leu

25

30

35

ttt ctg ttc tac ttc ccc gcg gcc tac tac gcc tcc cgc cgt gtg ggc 378

Phe Leu Phe Tyr Phe Pro Ala Ala Tyr Tyr Ala Ser Arg Arg Val Gly

40

45

50

atc gcg gtg ctc tgg atc agc ctc atc acc gag tgg ctc aac ctc atc 426

Ile Ala Val Leu Trp Ile Ser Leu Ile Thr Glu Trp Leu Asn Leu Ile

55

60

65

70

ttc aag tgg ttt ctt ttt gga gac agg ccc ttt tgg tgg gtc cat gag 474

Phe Lys Trp Phe Leu Phe Gly Asp Arg Pro Phe Trp Trp Val His Glu

75	80	85	
tct ggt tac tac agc cag gct cca gcc cag gtt cac cag ttc ccc tct Ser Gly Tyr Tyr Ser Gln Ala Pro Ala Gln Val His Gln Phe Pro Ser 90 95 100			522
tct tgt gag act ggt cca ggc agc cct tct gga cac tgc atg atc aca Ser Cys Glu Thr Gly Pro Gly Ser Pro Ser Gly His Cys Met Ile Thr 105 110 115			570
gga gca gcc ctc tgg ccc ata atg acg gcc ctg tct tgc cag gtg gcc Gly Ala Ala Leu Trp Pro Ile Met Thr Ala Leu Ser Ser Gln Val Ala 120 125 130			618
act cgg gcc cgc agg cgc tgt cct ggg ctg gct gat gac tcc ccg agt Thr Arg Ala Arg Arg Arg Cys Pro Gly Leu Ala Asp Asp Ser Pro Ser 135 140 145 150			666
gcc tat gga gcg gga gct aag ctt cta tgg gtt gac tgc act ggc cct Ala Tyr Gly Ala Gly Ala Lys Leu Leu Trp Val Asp Cys Thr Gly Pro 155 160 165			714
cat gct agg cac cag cct cat cta ttg gac cct ctt tac act ggg cct His Ala Arg His Gln Pro His Leu Leu Asp Pro Leu Tyr Thr Gly Pro 170 175 180			762
gga tct ttc ttg gtc cat cag cct agc ctt caa gtg gtg tga Gly Ser Phe Leu Val His Gln Pro Ser Leu Gln Val Val 185 190 195			804
gcggcctgag tggatacacg tggatagccg gccctttgcc tcctgagcc gtgactcagg			864
ggctgccctg gccctgggca ttgccttgc cctccctgc tatgccagg tgcgtcgggc			924
acagctggga aatggccaga agatagcctg ccttgtgctg gccatggggc tgctgggccc			984
cctggactgg ctgggccacc ccctcagat cagcctcttc tacattttca atttctcaa			1044
gtacaccctc tggccatgcc tagtcttggc cctcgtgcc tgggcagtgc acatgttcag			1104
tgcccaggaa gcaccgcca tccactcttc ctgacttctt gtgtgectcc ctttctttc			1164
cctcccacaa agccaacact ctgtgaccac cacactccag gaggcagccc catcccctc			1224
cagcccctaa gtaggcctc cctccctaa atctgcttcc gcaccactg gtcttagccc			1284
caaagatggg ccttctctct ccagataag ttggtcttcc ctctgccttt cctctcaagc			1344
cccaaagag caaaggcaac agcaagacca gcgggttctt gcaaacactgt gaggggcagc			1404
cagggcggcc ccaataaagc ccttgaatac ttgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa			1464

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

1515

<210> 2
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Glu Ser Thr Leu Gly Ala Gly Ile Val Ile Ala Glu Ala Leu Gln
 1 5 10 15

Asn Gln Leu Ala Trp Leu Glu Asn Val Trp Leu Trp Ile Thr Phe Leu
 20 25 30

Gly Asp Pro Lys Ile Leu Phe Leu Phe Tyr Phe Pro Ala Ala Tyr Tyr
 35 40 45

Ala Ser Arg Arg Val Gly Ile Ala Val Leu Trp Ile Ser Leu Ile Thr
 50 55 60

Glu Trp Leu Asn Leu Ile Phe Lys Trp Phe Leu Phe Gly Asp Arg Pro
 65 70 75 80

Phe Trp Trp Val His Glu Ser Gly Tyr Tyr Ser Gln Ala Pro Ala Gln
 85 90 95

Val His Gln Phe Pro Ser Ser Cys Glu Thr Gly Pro Gly Ser Pro Ser
 100 105 110

Gly His Cys Met Ile Thr Gly Ala Ala Leu Trp Pro Ile Met Thr Ala
 115 120 125

Leu Ser Ser Gln Val Ala Thr Arg Ala Arg Arg Arg Cys Pro Gly Leu
 130 135 140

Ala Asp Asp Ser Pro Ser Ala Tyr Gly Ala Gly Ala Lys Leu Leu Trp
 145 150 155 160

Val Asp Cys Thr Gly Pro His Ala Arg His Gln Pro His Leu Leu Asp
 165 170 175

Pro Leu Tyr Thr Gly Pro Gly Ser Phe Leu Val His Gln Pro Ser Leu
 180 185 190

Gln Val Val
 195

<210> 3
 <211> 2251
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (186)..(1598)

<400> 3
 gacgtcacgg tcaactgacag cgtgagcccg cggcggctgc tgccatggtg gctggcggcc 60
 gggttaagggt ctgagtggat ctctgccag gccagagcgc cttcgggggc cgcggcggaa 120
 ggccaggagt ttgcagccag ggcgccgggt ttgtggtctg cagtgtcgtg aggctgaggt 180
 gcagc atg tct aga ctg gga gcc ctg ggt ggt gcc cgt gcc ggg ctg gga 230
 Met Ser Arg Leu Gly Ala Leu Gly Gly Ala Arg Ala Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 ctg ttg ctg ggt acc gcc gcc ggc ctt gga ttc ctg tgc ctc ctt tac 278
 Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Gly Leu Gly Phe Leu Cys Leu Leu Tyr
 20 25 30
 agc cag cga tgg aaa cgg acc cag cgt cat ggc cgc agc cag agc ctg 326
 Ser Gln Arg Trp Lys Arg Thr Gln Arg His Gly Arg Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 ccc aac tcc ctg gac tat acg cag act tca gat ccc gga cgc cac gtg 374
 Pro Asn Ser Leu Asp Tyr Thr Gln Thr Ser Asp Pro Gly Arg His Val
 50 55 60
 atg ctc ctg cgg gct gtc cca ggt ggg gct gga gat gcc tca gtg ctg 422
 Met Leu Leu Arg Ala Val Pro Gly Gly Ala Gly Asp Ala Ser Val Leu
 65 70 75
 ccc agc ctt cca cgg gaa gga cag gag aag gtg ctg gac cgc ctg gac 470
 Pro Ser Leu Pro Arg Glu Gly Gln Glu Lys Val Leu Asp Arg Leu Asp

80	85	90	95	
ttt gtg ctg acc agc ctt gtg gcg ctg cgg cgg gag gtg gag gag ctg				518
Phe Val Leu Thr Ser Leu Val Ala Leu Arg Arg Glu Val Glu Glu Leu				
	100	105	110	
aga agc agc ctg cga ggg ctt gcg ggg gag att gtt ggg gag gtc cga				566
Arg Ser Ser Leu Arg Gly Leu Ala Gly Glu Ile Val Gly Glu Val Arg				
	115	120	125	
tgc cac atg gaa gag aac cag aga gtg gct cgg cgg cga agg ttt ccg				614
Cys His Met Glu Glu Asn Gln Arg Val Ala Arg Arg Arg Arg Phe Pro				
	130	135	140	
ttt gtc cgg gag agg agt gac tcc act ggc tcc agc tct gtc tac ttc				662
Phe Val Arg Glu Arg Ser Asp Ser Thr Gly Ser Ser Ser Val Tyr Phe				
	145	150	155	
acg gcc tcc tcg gga gcc acg ttc aca gat gct gag agt gaa ggg ggt				710
Thr Ala Ser Ser Gly Ala Thr Phe Thr Asp Ala Glu Ser Glu Gly Gly				
	160	165	170	175
tac aca aca gcc aat gcg gag tct gac aat gag cgg gac tct gac aaa				758
Tyr Thr Thr Ala Asn Ala Glu Ser Asp Asn Glu Arg Asp Ser Asp Lys				
	180	185	190	
gaa agt gag gac ggg gaa gat gaa gtg agc tgt gag act gtg aag atg				806
Glu Ser Glu Asp Gly Glu Asp Glu Val Ser Cys Glu Thr Val Lys Met				
	195	200	205	
ggg aga aag gat tct ctt gac ttg gag gaa gag gca gct tca ggt gcc				854
Gly Arg Lys Asp Ser Leu Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Gly Ala				
	210	215	220	
tcc agt gcc ctg gag gct gga ggt tcc tca ggc ttg gag gat gtg ctg				902
Ser Ser Ala Leu Glu Ala Gly Gly Ser Ser Gly Leu Glu Asp Val Leu				
	225	230	235	
ccc ctc ctg cag cag gcc gac gag ctg cac agg ggt gat gag caa ggc				950
Pro Leu Leu Gln Gln Ala Asp Glu Leu His Arg Gly Asp Glu Gln Gly				
	240	245	250	255
aag cgg gag ggc ttc cag ctg ctg ctc aac aac aag ctg gtg tat gga				998
Lys Arg Glu Gly Phe Gln Leu Leu Leu Asn Asn Lys Leu Val Tyr Gly				
	260	265	270	
agc cgg cag gac ttt ctc tgg cgc ctg gcc cga gcc tac agt gac atg				1046
Ser Arg Gln Asp Phe Leu Trp Arg Leu Ala Arg Ala Tyr Ser Asp Met				
	275	280	285	
tgt gag ctc act gag gag gtg agc gag aag aag tca tat gcc cta gat				1094

Cys Glu Leu Thr Glu Glu Val Ser Glu Lys Lys Ser Tyr Ala Leu Asp	
290	295 300
gga aaa gaa gaa gca gag gct gct ctg gag aag ggg gat gag agt gct	1142
Gly Lys Glu Glu Ala Glu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Asp Glu Ser Ala	
305	310 315
gac tgt cac ctg tgg tat gcg gtg ctt tgt ggt cag ctg gct gag cat	1190
Asp Cys His Leu Trp Tyr Ala Val Leu Cys Gly Gln Leu Ala Glu His	
320	325 330 335
gag agc atc cag agg cgc atc cag agt ggc ttt agc ttc aag gag cat	1238
Glu Ser Ile Gln Arg Arg Ile Gln Ser Gly Phe Ser Phe Lys Glu His	
	340 345 350
gtg gac aaa gcc att gct ctc cag cca gaa aac ccc atg gct cac ttt	1286
Val Asp Lys Ala Ile Ala Leu Gln Pro Glu Asn Pro Met Ala His Phe	
	355 360 365
ctt ctt ggc agg tgg tgc tat cag gtc tct cac ctg agc tgg cta gaa	1334
Leu Leu Gly Arg Trp Cys Tyr Gln Val Ser His Leu Ser Trp Leu Glu	
	370 375 380
aaa aaa act gct aca gcc ttg ctt gaa agc cct ctc agt gcc act gtg	1382
Lys Lys Thr Ala Thr Ala Leu Leu Glu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Val	
	385 390 395
gaa gat gcc ctc cag agc ttc cta aag gct gaa gaa cta cag cca gga	1430
Glu Asp Ala Leu Gln Ser Phe Leu Lys Ala Glu Glu Leu Gln Pro Gly	
400	405 410 415
ttt tcc aaa gca gga agg gta tat att tcc aag tgc tac aga gaa cta	1478
Phe Ser Lys Ala Gly Arg Val Tyr Ile Ser Lys Cys Tyr Arg Glu Leu	
	420 425 430
ggg aaa aac tct gaa gct aga tgg tgg atg aag ttg gcc ctg gag ctg	1526
Gly Lys Asn Ser Glu Ala Arg Trp Trp Met Lys Leu Ala Leu Glu Leu	
	435 440 445
cca gat gtc acg aag gag gat ttg gct atc cag aag gac ctg gaa gaa	1574
Pro Asp Val Thr Lys Glu Asp Leu Ala Ile Gln Lys Asp Leu Glu Glu	
	450 455 460
ctg gaa gtc att tta cga gac taa ccacgtttca ctggccttca tgacttgatg	1628
Leu Glu Val Ile Leu Arg Asp	
	465 470
ccactattta aggtgggggg gcggggaggc ttttttcctt agaccttgct gagatcagga	1688
aaccacacaa atctgtctcc tgggtctgac tgctaccac taccactccc cattagttaa	1748

tttattctaa cctctaacct aatctagaat tggggcagta ctcattggctt ccgtttctgt 1808
 tgttctctcc cttgagtaat ctcttaaaaa aatcaagatt cacacctgcc ccaggattac 1868
 acatgggtag agcctgcaag acctgagacc ttccaattgc tggtaggtg gatgaacttc 1928
 aaagctatag gaacaaagca cataacttgt cactttaatc tttttcactg actaatagga 1988
 ctcagtacat atagtcttaa gatcacacct tacctacca ggtaaaaaga gggatcagag 2048
 tggcccacag acattgcttt cttatcacct atcatgtgaa ttctacctgt attccagggc 2108
 tggaccactt gataacttcc agtgtcctgg cagcttttgg aatgacagca gtggtatggg 2168
 gtttatgatg ctataaaaca atgtctgaaa agttgcctag aatatatattt gttacaaact 2228
 tgaaataaac caaatttgat gtt 2251

<210> 4
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

Met Ser Arg Leu Gly Ala Leu Gly Gly Ala Arg Ala Gly Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Thr Ala Ala Gly Leu Gly Phe Leu Cys Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Gln Arg Trp Lys Arg Thr Gln Arg His Gly Arg Ser Gln Ser Leu Pro
 35 40 45

Asn Ser Leu Asp Tyr Thr Gln Thr Ser Asp Pro Gly Arg His Val Met
 50 55 60

Leu Leu Arg Ala Val Pro Gly Gly Ala Gly Asp Ala Ser Val Leu Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Pro Arg Glu Gly Gln Glu Lys Val Leu Asp Arg Leu Asp Phe
 85 90 95

Val Leu Thr Ser Leu Val Ala Leu Arg Arg Glu Val Glu Glu Leu Arg

100	105	110
Ser Ser Leu Arg Gly Leu Ala Gly Glu Ile Val Gly Glu Val Arg Cys 115		
His Met Glu Glu Asn Gln Arg Val Ala Arg Arg Arg Arg Phe Pro Phe 130		
Val Arg Glu Arg Ser Asp Ser Thr Gly Ser Ser Ser Val Tyr Phe Thr 145		
Ala Ser Ser Gly Ala Thr Phe Thr Asp Ala Glu Ser Glu Gly Gly Tyr 165		
Thr Thr Ala Asn Ala Glu Ser Asp Asn Glu Arg Asp Ser Asp Lys Glu 180		
Ser Glu Asp Gly Glu Asp Glu Val Ser Cys Glu Thr Val Lys Met Gly 195		
Arg Lys Asp Ser Leu Asp Leu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Gly Ala Ser 210		
Ser Ala Leu Glu Ala Gly Gly Ser Ser Gly Leu Glu Asp Val Leu Pro 225		
Leu Leu Gln Gln Ala Asp Glu Leu His Arg Gly Asp Glu Gln Gly Lys 245		
Arg Glu Gly Phe Gln Leu Leu Leu Asn Asn Lys Leu Val Tyr Gly Ser 260		
Arg Gln Asp Phe Leu Trp Arg Leu Ala Arg Ala Tyr Ser Asp Met Cys 275		
Glu Leu Thr Glu Glu Val Ser Glu Lys Lys Ser Tyr Ala Leu Asp Gly 290		

Lys Glu Glu Ala Glu Ala Ala Leu Glu Lys Gly Asp Glu Ser Ala Asp
305 310 315 320

Cys His Leu Trp Tyr Ala Val Leu Cys Gly Gln Leu Ala Glu His Glu
325 330 335

Ser Ile Gln Arg Arg Ile Gln Ser Gly Phe Ser Phe Lys Glu His Val
340 345 350

Asp Lys Ala Ile Ala Leu Gln Pro Glu Asn Pro Met Ala His Phe Leu
355 360 365

Leu Gly Arg Trp Cys Tyr Gln Val Ser His Leu Ser Trp Leu Glu Lys
370 375 380

Lys Thr Ala Thr Ala Leu Leu Glu Ser Pro Leu Ser Ala Thr Val Glu
385 390 395 400

Asp Ala Leu Gln Ser Phe Leu Lys Ala Glu Glu Leu Gln Pro Gly Phe
405 410 415

Ser Lys Ala Gly Arg Val Tyr Ile Ser Lys Cys Tyr Arg Glu Leu Gly
420 425 430

Lys Asn Ser Glu Ala Arg Trp Trp Met Lys Leu Ala Leu Glu Leu Pro
435 440 445

Asp Val Thr Lys Glu Asp Leu Ala Ile Gln Lys Asp Leu Glu Glu Leu
450 455 460

Glu Val Ile Leu Arg Asp
465 470

<210> 5
<211> 2310
<212> DNA
<213> 人

<220>

<221> CDS
 <222> (148)..(675)

<400> 5
 cggacgcgtg gggagaggct gttaccaga acagcataac aagggcaggt ctgactgcaa 60
 ggctgggact gggaggcaga gccgccgcca agggggcctc ggttaaacac tggtcgttca 120
 atcacctgca agacgaagga ggcaagg atg ctg ttg gcc tgg gta caa gca ttc 174
 Met Leu Leu Ala Trp Val Gln Ala Phe
 1 5
 ctc gtc agc aac atg ctc cta gca gaa gcc tat gga tct gga ggg gcc 222
 Leu Val Ser Asn Met Leu Leu Ala Glu Ala Tyr Gly Ser Gly Gly Ala
 10 15 20 25
 ggc aat cac agt tac tgc cga aac ccg gac gag gac ccg cgc ggg ccc 270
 Gly Asn His Ser Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Glu Asp Pro Arg Gly Pro
 30 35 40
 tgg tgc tac gtc agt ggc gag gcc ggc gtc cct gag aaa cgg cct tgc 318
 Trp Cys Tyr Val Ser Gly Glu Ala Gly Val Pro Glu Lys Arg Pro Cys
 45 50 55
 gag gac ctg cgc tgt cca gag acc acc tcc cag gcc ctg cca gcc ttc 366
 Glu Asp Leu Arg Cys Pro Glu Thr Thr Ser Gln Ala Leu Pro Ala Phe
 60 65 70
 acg aca gaa atc cag gaa gcg tct gaa ggg cca ggt gca gat gag gtg 414
 Thr Thr Glu Ile Gln Glu Ala Ser Glu Gly Pro Gly Ala Asp Glu Val
 75 80 85
 cag gtg ttc gct cct gcc aac gcc ctg ccc gct cgg agt gag gcg gca 462
 Gln Val Phe Ala Pro Ala Asn Ala Leu Pro Ala Arg Ser Glu Ala Ala
 90 95 100 105
 gct gtg cag cca gtg att ggg atc agc cag cgg gtg cgg atg aac tcc 510
 Ala Val Gln Pro Val Ile Gly Ile Ser Gln Arg Val Arg Met Asn Ser
 110 115 120
 aag gag aaa aag gac ctg gga act ctg ggc tac gtg ctg ggc att acc 558
 Lys Glu Lys Lys Asp Leu Gly Thr Leu Gly Tyr Val Leu Gly Ile Thr
 125 130 135
 atg atg gtg atc atc att gcc atc gga gct ggc atc atc ttg ggc tac 606
 Met Met Val Ile Ile Ile Ala Ile Gly Ala Gly Ile Ile Leu Gly Tyr
 140 145 150
 tcc tac aag agg ggg aag gat ttg aaa gaa cag cat gat cag aaa gta 654
 Ser Tyr Lys Arg Gly Lys Asp Leu Lys Glu Gln His Asp Gln Lys Val
 155 160 165

tgt gag agg gag atg cag tga atcactctgc ccttgtctgc cttaccaac	705
Cys Glu Arg Glu Met Gln	
170	175
cccacctgtg agattgtgga tgagaagact gtcgtgtgtec acaccagcca gactccagtt	765
gaccctcagg agggcagcac cccccttatg ggccaggccg ggactcctgg ggccctgagcc	825
ccccagtg gaggagccc atgcagacac tgggtcagga cagcccaccc tctacagct	885
aggaggaact accactttgt gttctgggta aaacctacc actccccgc ttttttggcg	945
aatcctagta agagtgcag aagcaggtgg ccctgtgggc tgagggtag gctgggtagg	1005
gtcctaacag tgetccttgt ccatcccttg gagcagattt tgtctgtgga tggagacagt	1065
ggcagctccc acagtgatgc tgctgctaag ggcttccaaa cattgcctgc acccctggaa	1125
ctgaaccagg gatagacggg gagctcccc aggctcctct gtgctttact aagatggcct	1185
cagtctccac tgtgggcttg agtggcatac actgttattc atgggtaagg taaagcaggt	1245
caagggatgg cattgaaaaa atatatttag ttttaaaat atttgggatg gaactcccta	1305
ctgacctctg agaactggaa acgagtttgt acagaagtca gaactttggg ttgggaatga	1365
gatctaggtt gtggctgctg gtatgcttca gcttgctggc aatgatgtgc cttgacaacc	1425
gtgggccagg cctgggccc gggactcttc ctgtttcata aggaaaggaa gaattgcact	1485
gagcattcca cttaggaaga ggatagagaa ggatctgctc cgcctttggc cacaggagca	1545
gaggcagacc tgggatgccc cagtttctct tcagggatgg atagtgcct gtcttcattt	1605
tgcacaggta agagagtagt tagctaacct atgggaatta tactgtgggg ccttgtgagc	1665
tgcttctaag aggctaacct ggaaactaag ctacagaggca aggtaataaa gcacttcagg	1725
gcttgctccc caagtgggcc tgatttagca ggtggctctg cgggcgtcca ggtcagcacc	1785
ttcctgtagg gcaactggggc tagggtcaca gccctaact cataaagcaa tcaaagaacc	1845
attagaaagg gctcattaag ctttttgac acaggacccc agagaggaaa aagtgacttg	1905
cccaggctg taagcaagct actggcatgg caagagccc gcttctgac ggagcgaac	1965
atctctccac tgcactgtgc tagcagctca gcaggcctc taacctgtga tgtcacactc	2025
aagaggcctt ggcagctcct agccatagag ctctcttcc agaacccttc cactgcccac	2085

tgtggagaca ggggttagtg gggctttcta tggagccatc tgctttgggg acctagacct 2145
 caggtggtct cttggtgta gtgatgctgg agaagagaat attactggtt tctacttttc 2205
 tataaaggca tttctctata tacatgtttt atatacctca ttctgacacc tgcataatagt 2265
 gtgggaaatt gctctgcatt tgacttaatt aaaaaaaaa aaaaa 2310

<210> 6
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 6

Met Leu Leu Ala Trp Val Gln Ala Phe Leu Val Ser Asn Met Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Glu Ala Tyr Gly Ser Gly Gly Ala Gly Asn His Ser Tyr Cys Arg
 20 25 30

Asn Pro Asp Glu Asp Pro Arg Gly Pro Trp Cys Tyr Val Ser Gly Glu
 35 40 45

Ala Gly Val Pro Glu Lys Arg Pro Cys Glu Asp Leu Arg Cys Pro Glu
 50 55 60

Thr Thr Ser Gln Ala Leu Pro Ala Phe Thr Thr Glu Ile Gln Glu Ala
 65 70 75 80

Ser Glu Gly Pro Gly Ala Asp Glu Val Gln Val Phe Ala Pro Ala Asn
 85 90 95

Ala Leu Pro Ala Arg Ser Glu Ala Ala Ala Val Gln Pro Val Ile Gly
 100 105 110

Ile Ser Gln Arg Val Arg Met Asn Ser Lys Glu Lys Lys Asp Leu Gly
 115 120 125

Thr Leu Gly Tyr Val Leu Gly Ile Thr Met Met Val Ile Ile Ile Ala
 130 135 140

Ile Gly Ala Gly Ile Ile Leu Gly Tyr Ser Tyr Lys Arg Gly Lys Asp
145 150 155 160

Leu Lys Glu Gln His Asp Gln Lys Val Cys Glu Arg Glu Met Gln
165 170 175

<210> 7
<211> 846
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (102)..(653)

<400> 7
ggcacgaggg agcacggccc gcgggcggcg ttcgctggag ctggtggacc gggcggcggg 60
gcagaccgct ggggactgcg ggcggcgctg tgtccgtcgc c atg aca gat cag acc 116
Met Thr Asp Gln Thr
1 5
tat tgt gac cgc ctg gtg cag gac acg cct ttc ctg aca ggc cat ggg 164
Tyr Cys Asp Arg Leu Val Gln Asp Thr Pro Phe Leu Thr Gly His Gly
10 15 20
cgc ttg agt gag cag cag gtg gac agg atc atc ctc cag ctg aac cgt 212
Arg Leu Ser Glu Gln Gln Val Asp Arg Ile Ile Leu Gln Leu Asn Arg
25 30 35
tac tac cca cag atc ctt acc aac aag gag gcg gaa aag ttc cgg aac 260
Tyr Tyr Pro Gln Ile Leu Thr Asn Lys Glu Ala Glu Lys Phe Arg Asn
40 45 50
ccc aag gca tcc ttg cgt gtg cgg ctc tgt gac ctc ctg agc cac ctg 308
Pro Lys Ala Ser Leu Arg Val Arg Leu Cys Asp Leu Leu Ser His Leu
55 60 65
cag cgg agc ggt gag cgg gac tgc cag gag ttc tac cga gcc ctg tat 356
Gln Arg Ser Gly Glu Arg Asp Cys Gln Glu Phe Tyr Arg Ala Leu Tyr
70 75 80 85
atc cat gcc cag ccc ctg cac agc cgc ctg ccc agc cgc cac gct ctg 404
Ile His Ala Gln Pro Leu His Ser Arg Leu Pro Ser Arg His Ala Leu
90 95 100
cag aac tca gat tgc aca gag cta gac tcg ggc agc cag agc ggc gag 452

Gln Asn Ser Asp Cys Thr Glu Leu Asp Ser Gly Ser Gln Ser Gly Glu
105 110 115

ctg agt aac agg gga ccc atg agc ttc ctg gct ggc ctg ggc ctt gct 500
Leu Ser Asn Arg Gly Pro Met Ser Phe Leu Ala Gly Leu Gly Leu Ala
120 125 130

gtg gga ctg gcc ctg ctc ctg tac tgc tat ccg cca gac ccc aag ggc 548
Val Gly Leu Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Tyr Pro Pro Asp Pro Lys Gly
135 140 145

ctg cca ggg acc cgg cgc gtc ctc ggt ttc tcg cct gtc atc atc gac 596
Leu Pro Gly Thr Arg Arg Val Leu Gly Phe Ser Pro Val Ile Ile Asp
150 155 160 165

aga cat gtc agc cgc tac ctg ctg gcc ttc ctg gca gat gac cta ggg 644
Arg His Val Ser Arg Tyr Leu Leu Ala Phe Leu Ala Asp Asp Leu Gly
170 175 180

ggg ctc tga cagaccctgg acccagggcc tcacctgcca ctcaacccaaa 693
Gly Leu

gagtcctcga gccggcctgc caaggggact gctgcttctt tttctaaatg catatttttc 753

attatttata atttgtgtaa aaaacacacc ttcaccttac aaggtgctga ccatattaaa 813

tgttcaagtt ctctcaaaaa aaaaaaaaaa aaa 846

<210> 8
<211> 183
<212> PRT
<213> 人

<400> 8

Met Thr Asp Gln Thr Tyr Cys Asp Arg Leu Val Gln Asp Thr Pro Phe
1 5 10 15

Leu Thr Gly His Gly Arg Leu Ser Glu Gln Gln Val Asp Arg Ile Ile
20 25 30

Leu Gln Leu Asn Arg Tyr Tyr Pro Gln Ile Leu Thr Asn Lys Glu Ala
35 40 45

Glu Lys Phe Arg Asn Pro Lys Ala Ser Leu Arg Val Arg Leu Cys Asp
50 55 60

gaccggggaa agaagacgta cttcatcgtc atg cag agc gtc ttc tac ccc gcc Met Gln Ser Val Phe Tyr Pro Ala 1 5	234
ggc cgc atc tcc gag agg tat gac atc aaa ggc tgc gag gtg agc cgc Gly Arg Ile Ser Glu Arg Tyr Asp Ile Lys Gly Cys Glu Val Ser Arg 10 15 20	282
tgg gtg gat ccc gcc cct gag ggc agc ccc ctt gtt ctg gtg ctg aag Trp Val Asp Pro Ala Pro Glu Gly Ser Pro Leu Val Leu Val Leu Lys 25 30 35 40	330
gac ctc aac ttt cag ggc aag acc atc aac ctg ggg ccc cag cgg agc Asp Leu Asn Phe Gln Gly Lys Thr Ile Asn Leu Gly Pro Gln Arg Ser 45 50 55	378
tgg ttc ctc cgc cag atg gaa ctg gat acc acc ttc ctc cgg gag ctc Trp Phe Leu Arg Gln Met Glu Leu Asp Thr Thr Phe Leu Arg Glu Leu 60 65 70	426
aac gtg ctg gat tac agc ctc ctg ata gcc ttc caa cgt ctc cac gag Asn Val Leu Asp Tyr Ser Leu Leu Ile Ala Phe Gln Arg Leu His Glu 75 80 85	474
gat gag agg ggc ccg ggc agc agc ctc atc ttc cgc acg gcc agg tct Asp Glu Arg Gly Pro Gly Ser Ser Leu Ile Phe Arg Thr Ala Arg Ser 90 95 100	522
gtg caa ggg gca cag agc ccg gaa gag tcg aga gcc caa aac cgc cgg Val Gln Gly Ala Gln Ser Pro Glu Glu Ser Arg Ala Gln Asn Arg Arg 105 110 115 120	570
ctg ctg ccc gac gcc ccc aac gcc cta cac atc ctg gac ggg ccc gag Leu Leu Pro Asp Ala Pro Asn Ala Leu His Ile Leu Asp Gly Pro Glu 125 130 135	618
cag cgc tat ttc ctg ggc gtc gtg gat ctc gcc aca gtc tac ggg ctc Gln Arg Tyr Phe Leu Gly Val Val Asp Leu Ala Thr Val Tyr Gly Leu 140 145 150	666
cgc aag cgg ctg gag cac ctg tgg aag aca ctg cgc tac cca ggc cgg Arg Lys Arg Leu Glu His Leu Trp Lys Thr Leu Arg Tyr Pro Gly Arg 155 160 165	714
acc ttc tcc act gtc agc ccg gct cgc tac gcc cgt cgc ctc tgc cag Thr Phe Ser Thr Val Ser Pro Ala Arg Tyr Ala Arg Arg Leu Cys Gln 170 175 180	762
tgg gtg gag gcg cac acg gag tga cgggcgccccg gccccactct ccg gatctgg Trp Val Glu Ala His Thr Glu 185 190	816

acgatgggct cacgccagga acgccggttc ccccgggcc gggcatctcg cctgcgcttc 876
 ctctgatgg tcgccagagg gcagcatccc ctaactaata ccgtaaccgc gcagtcccgt 936
 ttgacggtagg tgccgtgcc agcatcgtgc caaggactcc cctactttag ctcatттаат 996
 cctcaaaaaa tgctattatt ctctttttac agaccatgaa atggaggctc aggggggtgaa 1056
 gggactgatac aagatcattc agcaataaat gctggaacca ggactcaacc atggcttttg 1116
 gattccggag cctgtattct taaccaccag ctctgcagc ttggtctca tgatctgggc 1176
 aaggggggag gctgaaggct gcagccctct tgcatccag atggggaaac tgaggcccag 1236
 agactttaag gggcgtaagc acgggtaagt ggcaaggctc gccctgagta cccaggcctc 1296
 ccggccccct gctcctggcc tgatactcta gggatgcagg tgggagaagc aggggtcctg 1356
 ggggctgcct ggagctctgg gaggcattct gaacggggtc tactactgat ctgaggtgag 1416
 ctctgccctc ctctgaaagt cacttttctc atcagttaaa tgggggcaag ggtccgtggt 1476
 ccgaccaagg tcttggttc acagacatca ccaggagcct gcatgccct gatcactcct 1536
 tctcttctt ccaggaaact ccagcctggc ctctgacccc agttcaatcc gaccatgcc 1596
 aagcccaagc gggcctttcc tccagaactg ctccggggcc tggtgtgtg actggagcaa 1656
 ggtgctaaac ctctctgtgc ctgctggtc taatctgtaa aatgaaggaa tggaaacaga 1716
 cctcattaac tcattaata tttgttgagc acctgcc 1753

<210> 10
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 10

Met Gln Ser Val Phe Tyr Pro Ala Gly Arg Ile Ser Glu Arg Tyr Asp
 1 5 10 15

Ile Lys Gly Cys Glu Val Ser Arg Trp Val Asp Pro Ala Pro Glu Gly
 20 25 30

Ser Pro Leu Val Leu Val Leu Lys Asp Leu Asn Phe Gln Gly Lys Thr
 35 40 45

Ile Asn Leu Gly Pro Gln Arg Ser Trp Phe Leu Arg Gln Met Glu Leu
50 55 60

Asp Thr Thr Phe Leu Arg Glu Leu Asn Val Leu Asp Tyr Ser Leu Leu
65 70 75 80

Ile Ala Phe Gln Arg Leu His Glu Asp Glu Arg Gly Pro Gly Ser Ser
85 90 95

Leu Ile Phe Arg Thr Ala Arg Ser Val Gln Gly Ala Gln Ser Pro Glu
100 105 110

Glu Ser Arg Ala Gln Asn Arg Arg Leu Leu Pro Asp Ala Pro Asn Ala
115 120 125

Leu His Ile Leu Asp Gly Pro Glu Gln Arg Tyr Phe Leu Gly Val Val
130 135 140

Asp Leu Ala Thr Val Tyr Gly Leu Arg Lys Arg Leu Glu His Leu Trp
145 150 155 160

Lys Thr Leu Arg Tyr Pro Gly Arg Thr Phe Ser Thr Val Ser Pro Ala
165 170 175

Arg Tyr Ala Arg Arg Leu Cys Gln Trp Val Glu Ala His Thr Glu
180 185 190

<210> 11
<211> 2686
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (78)..(1856)

<400> 11
tcctcgaatgc caagaagagc ctgaacctca acatcttctt gaagcaattt aagtgtctcca 60

acgaggaggt cgctgct atg atc cgg gct gga gat acc acc aag ttt gat Met Ile Arg Ala Gly Asp Thr Thr Lys Phe Asp 1 5 10	110
gtg gag gtt ctc aaa caa ctc ctt aag ctc ctt ccc gag aag cac gag Val Glu Val Leu Lys Gln Leu Leu Lys Leu Leu Pro Glu Lys His Glu 15 20 25	158
att gaa aac ctg cgg gca ttc aca gag gag cga gcc aag ctg gcc agc Ile Glu Asn Leu Arg Ala Phe Thr Glu Glu Arg Ala Lys Leu Ala Ser 30 35 40	206
gcc gac cac ttc tac ctc ctc ctg ctg gcc att ccc tgc tac cag ctg Ala Asp His Phe Tyr Leu Leu Leu Leu Ala Ile Pro Cys Tyr Gln Leu 45 50 55	254
cga atc gag tgc atg ctg ctg tgt gag ggc gcg gcc gcc gtg ctg gac Arg Ile Glu Cys Met Leu Leu Cys Glu Gly Ala Ala Ala Val Leu Asp 60 65 70 75	302
atg gtg cgg ccc aag gcc cag ctg gtg ctg gct gcc tgc gaa agc ctg Met Val Arg Pro Lys Ala Gln Leu Val Leu Ala Ala Cys Glu Ser Leu 80 85 90	350
ctc acc agc cgc cag ctg ccc atc ttc tgc cag ctg atc ctg aga att Leu Thr Ser Arg Gln Leu Pro Ile Phe Cys Gln Leu Ile Leu Arg Ile 95 100 105	398
ggg aac ttc ctc aac tac ggc agc cac acc ggt gac gcc gac ggc ttc Gly Asn Phe Leu Asn Tyr Gly Ser His Thr Gly Asp Ala Asp Gly Phe 110 115 120	446
aag atc agc aca ttg ctg aag ctc acg gag acc aag tcc cag cag aac Lys Ile Ser Thr Leu Leu Lys Leu Thr Glu Thr Lys Ser Gln Gln Asn 125 130 135	494
cgc gtg acg ctg ctg cac cac gtg ctg gag gaa gcg gaa aag agc cac Arg Val Thr Leu Leu His His Val Leu Glu Glu Ala Glu Lys Ser His 140 145 150 155	542
ccc gac ctc ctg cag ctg ccc cgg gac ctg gaa cag ccc tcg caa gca Pro Asp Leu Leu Gln Leu Pro Arg Asp Leu Glu Gln Pro Ser Gln Ala 160 165 170	590
gca ggg atc aac ctg gag atc atc cgc tca gag gcc agc tcc aac ctg Ala Gly Ile Asn Leu Glu Ile Ile Arg Ser Glu Ala Ser Ser Asn Leu 175 180 185	638
aag aag ctt ctg gag acc gag cgg aag gtg tct gcc tcc gtg gcc gag Lys Lys Leu Leu Glu Thr Glu Arg Lys Val Ser Ala Ser Val Ala Glu 190 195 200	686

gtc cag gag cag tac acc gag cgc ctc cag gcc agc atc tcg gcc ttc Val Gln Glu Gln Tyr Thr Glu Arg Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Phe 205 210 215	734
cgg gca ctg gac gag ctg ttt gag gcc atc gag cag aag caa cgg gag Arg Ala Leu Asp Glu Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gln Lys Gln Arg Glu 220 225 230 235	782
ctg gcc gac tac ctg tgt gag gac gcc cag cag ctg tcc ctg gag gac Leu Ala Asp Tyr Leu Cys Glu Asp Ala Gln Gln Leu Ser Leu Glu Asp 240 245 250	830
acg ttc agc acc atg aag gct ttc cgg gac ctt ttc ctc cgc gcc ctg Thr Phe Ser Thr Met Lys Ala Phe Arg Asp Leu Phe Leu Arg Ala Leu 255 260 265	878
aag gag aac aag gac cgg aag gag cag gcg gcg aag gca gag agg agg Lys Glu Asn Lys Asp Arg Lys Glu Gln Ala Ala Lys Ala Glu Arg Arg 270 275 280	926
aag cag cag ctg gcg gag gag gag gcg cgg cgg cct cgg gga gag gac Lys Gln Gln Leu Ala Glu Glu Glu Ala Arg Arg Pro Arg Gly Glu Asp 285 290 295	974
ggg aag cct gtc agg aag ggg ccc ggg aag cag gag gag gtg tgt gtc Gly Lys Pro Val Arg Lys Gly Pro Gly Lys Gln Glu Glu Val Cys Val 300 305 310 315	1022
atc gat gcc ctg ctg gct gac atc agg aag ggc ttc cag ctg cgg aag Ile Asp Ala Leu Leu Ala Asp Ile Arg Lys Gly Phe Gln Leu Arg Lys 320 325 330	1070
aca gcc cgg ggc cgc ggg gac acc gac ggg ggc agc aag gca gcc tcc Thr Ala Arg Gly Arg Gly Asp Thr Asp Gly Gly Ser Lys Ala Ala Ser 335 340 345	1118
atg gat ccc cca aga gcc aca gag cct gtg gcc acc agt aac cct gca Met Asp Pro Pro Arg Ala Thr Glu Pro Val Ala Thr Ser Asn Pro Ala 350 355 360	1166
gga gac ccc gtg ggc agc acg cgc tgt ccc gcc tct gag ccc ggc ctt Gly Asp Pro Val Gly Ser Thr Arg Cys Pro Ala Ser Glu Pro Gly Leu 365 370 375	1214
gat gct aca aca gcc agc gag tcc cgg ggc tgg gac ctt gta gac gcc Asp Ala Thr Thr Ala Ser Glu Ser Arg Gly Trp Asp Leu Val Asp Ala 380 385 390 395	1262
gtg acc ccc ggc cct cag ccc acc ctg gag cag ttg gag gag ggt ggt Val Thr Pro Gly Pro Gln Pro Thr Leu Glu Gln Leu Glu Glu Gly Gly	1310

400	405	410	
ccg cgg ccc ctg gag agg cgt tct tcc tgg tat gtg gat gcc agc gat Pro Arg Pro Leu Glu Arg Arg Ser Ser Trp Tyr Val Asp Ala Ser Asp 415	420	425	1358
gtc cta acc act gag gat ccc cag tgc ccc cag ccc ttg gag ggg gcc Val Leu Thr Thr Glu Asp Pro Gln Cys Pro Gln Pro Leu Glu Gly Ala 430	435	440	1406
tgg ccg gtg act ctg gga gat gct cag gcc ctg aag ccc ctc aag ttc Trp Pro Val Thr Leu Gly Asp Ala Gln Ala Leu Lys Pro Leu Lys Phe 445	450	455	1454
tcc agc aac cag ccc cct gca gcc gga agt tca agg caa gat gcc aag Ser Ser Asn Gln Pro Pro Ala Ala Gly Ser Ser Arg Gln Asp Ala Lys 460	465	470	1502
gat ccc acg tcc ttg ctg ggc gtc ctc cag gcc gag gcc gac agc aca Asp Pro Thr Ser Leu Leu Gly Val Leu Gln Ala Glu Ala Asp Ser Thr 480	485	490	1550
agt gag ggg ctg gag gac gct gtc cac agc cgt ggt gcc aga ccc cct Ser Glu Gly Leu Glu Asp Ala Val His Ser Arg Gly Ala Arg Pro Pro 495	500	505	1598
gca gca ggc cca ggt ggg gat gag gac gag gac gag gag gac aca gcc Ala Ala Gly Pro Gly Gly Asp Glu Asp Glu Asp Glu Glu Asp Thr Ala 510	515	520	1646
cca gag tcc gca ctg gac aca tcc ctg gac aag tcc ttc tcc gag gat Pro Glu Ser Ala Leu Asp Thr Ser Leu Asp Lys Ser Phe Ser Glu Asp 525	530	535	1694
gcg gtg acc gac tcc tcg ggg tcg ggc aca ctc ccc agg gcc cgg ggc Ala Val Thr Asp Ser Ser Gly Ser Gly Thr Leu Pro Arg Ala Arg Gly 540	545	550	1742
cgg gcc tca aag ggg acc ggg aag cga agg aag aag cgt ccc tcc agg Arg Ala Ser Lys Gly Thr Gly Lys Arg Arg Lys Lys Arg Pro Ser Arg 560	565	570	1790
agc cag gaa gag gtt ccc cct gat tct gat gat aat aaa aca aag aaa Ser Gln Glu Glu Val Pro Pro Asp Ser Asp Asp Asn Lys Thr Lys Lys 575	580	585	1838
ctg tgt gtg atc cag taa ggcctcaggc ccaggcccaa ggccaagtga Leu Cys Val Ile Gln 590			1886
gagagcccag gccacaggac atgctgccat tctgccaaga gaggctcttc tgggggccag			1946

gctgggactg ggccccggaa accaaaactc cgtgccttac ccagccgggg ccctcctgga 2006
 gccttcttgg ggtgttgtgg ctgggaaccc gacaggcacc agtgccctgc caggcctggt 2066
 gcctcctg accgcctgca cgtgccagcc tcccacctgc ttcctaaagg caaccctggc 2126
 ccacaccgc atgcgcccgg tgcagcctgc caagggccag tcggggggtg ctgcgtcctg 2186
 ccagtgtcca ccacagctct gcctgccctt cagcccagca aggtttaate aaaatgcaat 2246
 gctttgcaag tctttactgc ttggaggtgg ctgagttggg ggccctgggc aggggtaagc 2306
 tggcagcag tgccatggca ggccagggtc ccctcccatg gggctctggcc cccgttccag 2366
 catgtccage ccctgaagtt ggagttggg gcggtctgcc ttigtctgcca ctgccaggcc 2426
 tctgccctgc agctgaaact tgccatcac atcaacagaa aaccctccc agtgccagct 2486
 gccagcgtg ggcaggcct ggggacaata caggccacc tgaggggctg cagggtgaca 2546
 cccagcagcc gctgccccct cactgcccac ccagcgaggg cagcctacc gagcctgccc 2606
 cctgccaggt gtgtgcctg aggctggcgg ctggatgcgt ggccaataaa aagcagacct 2666
 aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2686

<210> 12
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12

Met Ile Arg Ala Gly Asp Thr Thr Lys Phe Asp Val Glu Val Leu Lys
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Lys Leu Leu Pro Glu Lys His Glu Ile Glu Asn Leu Arg
 20 25 30

Ala Phe Thr Glu Glu Arg Ala Lys Leu Ala Ser Ala Asp His Phe Tyr
 35 40 45

Leu Leu Leu Leu Ala Ile Pro Cys Tyr Gln Leu Arg Ile Glu Cys Met
 50 55 60

Leu Leu Cys Glu Gly Ala Ala Ala Val Leu Asp Met Val Arg Pro Lys
65 70 75 80

Ala Gln Leu Val Leu Ala Ala Cys Glu Ser Leu Leu Thr Ser Arg Gln
85 90 95

Leu Pro Ile Phe Cys Gln Leu Ile Leu Arg Ile Gly Asn Phe Leu Asn
100 105 110

Tyr Gly Ser His Thr Gly Asp Ala Asp Gly Phe Lys Ile Ser Thr Leu
115 120 125

Leu Lys Leu Thr Glu Thr Lys Ser Gln Gln Asn Arg Val Thr Leu Leu
130 135 140

His His Val Leu Glu Glu Ala Glu Lys Ser His Pro Asp Leu Leu Gln
145 150 155 160

Leu Pro Arg Asp Leu Glu Gln Pro Ser Gln Ala Ala Gly Ile Asn Leu
165 170 175

Glu Ile Ile Arg Ser Glu Ala Ser Ser Asn Leu Lys Lys Leu Leu Glu
180 185 190

Thr Glu Arg Lys Val Ser Ala Ser Val Ala Glu Val Gln Glu Gln Tyr
195 200 205

Thr Glu Arg Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Phe Arg Ala Leu Asp Glu
210 215 220

Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gln Lys Gln Arg Glu Leu Ala Asp Tyr Leu
225 230 235 240

Cys Glu Asp Ala Gln Gln Leu Ser Leu Glu Asp Thr Phe Ser Thr Met
245 250 255

Lys Ala Phe Arg Asp Leu Phe Leu Arg Ala Leu Lys Glu Asn Lys Asp
260 265 270

Arg Lys Glu Gln Ala Ala Lys Ala Glu Arg Arg Lys Gln Gln Leu Ala
275 280 285

Glu Glu Glu Ala Arg Arg Pro Arg Gly Glu Asp Gly Lys Pro Val Arg
290 295 300

Lys Gly Pro Gly Lys Gln Glu Glu Val Cys Val Ile Asp Ala Leu Leu
305 310 315 320

Ala Asp Ile Arg Lys Gly Phe Gln Leu Arg Lys Thr Ala Arg Gly Arg
325 330 335

Gly Asp Thr Asp Gly Gly Ser Lys Ala Ala Ser Met Asp Pro Pro Arg
340 345 350

Ala Thr Glu Pro Val Ala Thr Ser Asn Pro Ala Gly Asp Pro Val Gly
355 360 365

Ser Thr Arg Cys Pro Ala Ser Glu Pro Gly Leu Asp Ala Thr Thr Ala
370 375 380

Ser Glu Ser Arg Gly Trp Asp Leu Val Asp Ala Val Thr Pro Gly Pro
385 390 395 400

Gln Pro Thr Leu Glu Gln Leu Glu Glu Gly Gly Pro Arg Pro Leu Glu
405 410 415

Arg Arg Ser Ser Trp Tyr Val Asp Ala Ser Asp Val Leu Thr Thr Glu
420 425 430

Asp Pro Gln Cys Pro Gln Pro Leu Glu Gly Ala Trp Pro Val Thr Leu
435 440 445

Gly Asp Ala Gln Ala Leu Lys Pro Leu Lys Phe Ser Ser Asn Gln Pro
450 455 460

Pro Ala Ala Gly Ser Ser Arg Gln Asp Ala Lys Asp Pro Thr Ser Leu
465 470 475 480

Leu Gly Val Leu Gln Ala Glu Ala Asp Ser Thr Ser Glu Gly Leu Glu
 485 490 495

Asp Ala Val His Ser Arg Gly Ala Arg Pro Pro Ala Ala Gly Pro Gly
 500 505 510

Gly Asp Glu Asp Glu Asp Glu Glu Asp Thr Ala Pro Glu Ser Ala Leu
 515 520 525

Asp Thr Ser Leu Asp Lys Ser Phe Ser Glu Asp Ala Val Thr Asp Ser
 530 535 540

Ser Gly Ser Gly Thr Leu Pro Arg Ala Arg Gly Arg Ala Ser Lys Gly
 545 550 555 560

Thr Gly Lys Arg Arg Lys Lys Arg Pro Ser Arg Ser Gln Glu Glu Val
 565 570 575

Pro Pro Asp Ser Asp Asp Asn Lys Thr Lys Lys Leu Cys Val Ile Gln
 580 585 590

<210> 13
 <211> 2190
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (148)..(702)

<400> 13
 cggacgcgtg gggagaggct gtttaccaga acagcataac aagggcaggt ctgactgcaa 60
 ggctgggact gggaggcaga gccgcccca agggggcctc ggtaaacac tggtcgttca 120
 atcacctgca agacgaagga ggcaagg atg ctg ttg gcc tgg gta caa gca ttc 174
 Met Leu Leu Ala Trp Val Gln Ala Phe
 1 5
 ctc gtc agc aac atg ctc cta gca gaa gcc tat gga tct gga gag acc 222
 Leu Val Ser Asn Met Leu Leu Ala Glu Ala Tyr Gly Ser Gly Glu Thr

10	15	20	25	
acc tcc cag gcc ctg cca gcc ttc acg aca gaa atc cag gaa gcg tct				270
Thr Ser Gln Ala Leu Pro Ala Phe Thr Thr Glu Ile Gln Glu Ala Ser				
	30	35	40	
gaa ggg cca ggt gca gat gag gtg cag gtg ttc gct cct gcc aac gcc				318
Glu Gly Pro Gly Ala Asp Glu Val Gln Val Phe Ala Pro Ala Asn Ala				
	45	50	55	
ctg ccc gct cgg agt gag gcg gca gct gtg cag cca gtg att ggg atc				366
Leu Pro Ala Arg Ser Glu Ala Ala Ala Val Gln Pro Val Ile Gly Ile				
	60	65	70	
agc cag cgg gtg cgg atg aac tcc aag gag aaa aag gac ctg gga act				414
Ser Gln Arg Val Arg Met Asn Ser Lys Glu Lys Lys Asp Leu Gly Thr				
	75	80	85	
ctg ggc tac gtg ctg ggc att acc atg atg gtg atc atc att gcc atc				462
Leu Gly Tyr Val Leu Gly Ile Thr Met Met Val Ile Ile Ile Ala Ile				
90	95	100	105	
gga gct ggc atc atc ttg ggc tac tcc tac aag agg ggg aag gat ttg				510
Gly Ala Gly Ile Ile Leu Gly Tyr Ser Tyr Lys Arg Gly Lys Asp Leu				
	110	115	120	
aaa gaa cag cat gat cag aaa gta tgt gag agg gag atg cag cga atc				558
Lys Glu Gln His Asp Gln Lys Val Cys Glu Arg Glu Met Gln Arg Ile				
	125	130	135	
act ctg ccc ttg tct gcc ttc acc aac ccc acc tgt gag att gtg gat				606
Thr Leu Pro Leu Ser Ala Phe Thr Asn Pro Thr Cys Glu Ile Val Asp				
	140	145	150	
gag aag act gtc gtg gtc cac acc agc cag act cca gtt gac cct cag				654
Glu Lys Thr Val Val Val His Thr Ser Gln Thr Pro Val Asp Pro Gln				
	155	160	165	
gag ggc acc acc ccc ctt atg ggc cag gcc ggg act cct ggg gcc tga				702
Glu Gly Thr Thr Pro Leu Met Gly Gln Ala Gly Thr Pro Gly Ala				
170	175	180		
gccccccag tgggcaggag cccatgcaga cactggtgca ggacagccca cctcctaca				762
gctaggagga actaccactt tgtgttctgg ttaaacctt accactcccc cgcttttttg				822
gcgaatccta gtaagagtga cagaagcagg tggccctgtg ggctgagggt aaggctgggt				882
agggtcctaa cagtctcct tgccatccc ttggagcaga ttttgtctgt ggatggagac				942
agtggcagct cccacagtga tgctgtgct aagggttccc aaacattgcc tgcaccctg				1002

gaactgaacc agggatagac ggggagctcc cccaggctcc tctgtgcttt actaagatgg 1062
 cctcagtctc cactgtgggc ttgagtggca tacactgtta ttcattggta aggtaaagca 1122
 ggtcaaggga tggcattgaa aaaatatatt tagtttttaa aatatttggg atggaactcc 1182
 ctactgacct ctgagaactg gaaacgagtt tgtacagaag tcagaacttt gggttgggaa 1242
 tgagatctag gttgtggctg ctggtatgct tcagcttgct ggcaatgatg tgccttgaca 1302
 accgtgggcc aggcctgggc ccagggactc ttctgtttc ataaggaaag gaagaattgc 1362
 actgagcatt ccacttagga agaggataga gaaggatctg ctccgccttt ggccacagga 1422
 gcagaggcag acctgggatg ccccagtttc tcttcaggga tggatagtga cctgtcttca 1482
 tttgcacag gtaagagagt agttagctaa cctatgggaa ttatactgtg gggccttgtg 1542
 agctgcttct aagaggctaa cctggaaact aagctcagag gcaaggtaat aaagcacttc 1602
 agggcttgcct cccaagtgg gcctgattta gcagggtgct ctgcggcgt ccaggtcagc 1662
 accttctgt agggcactgg ggctagggtc acagccccta actcataaag caatcaaaga 1722
 accattagaa agggctcatt aagccttttg gacacaggac ccagagagg aaaaagtgc 1782
 ttgccaagg tcgtaagcaa gctactggca tggcaagagc ccagcttctt gacggagcgc 1842
 aacatttctc cactgcaactg tgctagcagc tcagcagggc ctctaactg tgatgtcaca 1902
 ctcaagaggc cttggcagct cctagccata gagcttctt tccagaacc ttccactgcc 1962
 caatgtggag acaggggta gtggggcttt ctatggagcc atctgctttg gggacctaga 2022
 cctcagggtg tctcttggtg ttagtgatgc tggagaagag aatattactg gtttctactt 2082
 ttctataaag gcatttctct atatacatgt tttatatacc tcattctgac acctgcatat 2142
 agtgtgggaa attgctctgc attgactta attaaaaaa aaaaaaa 2190

<210> 14
 <211> 184
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 14

Met Leu Leu Ala Trp Val Gln Ala Phe Leu Val Ser Asn Met Leu Leu
 1 5 10 15

Ala Glu Ala Tyr Gly Ser Gly Glu Thr Thr Ser Gln Ala Leu Pro Ala
 20 25 30

Phe Thr Thr Glu Ile Gln Glu Ala Ser Glu Gly Pro Gly Ala Asp Glu
 35 40 45

Val Gln Val Phe Ala Pro Ala Asn Ala Leu Pro Ala Arg Ser Glu Ala
 50 55 60

Ala Ala Val Gln Pro Val Ile Gly Ile Ser Gln Arg Val Arg Met Asn
 65 70 75 80

Ser Lys Glu Lys Lys Asp Leu Gly Thr Leu Gly Tyr Val Leu Gly Ile
 85 90 95

Thr Met Met Val Ile Ile Ile Ala Ile Gly Ala Gly Ile Ile Leu Gly
 100 105 110

Tyr Ser Tyr Lys Arg Gly Lys Asp Leu Lys Glu Gln His Asp Gln Lys
 115 120 125

Val Cys Glu Arg Glu Met Gln Arg Ile Thr Leu Pro Leu Ser Ala Phe
 130 135 140

Thr Asn Pro Thr Cys Glu Ile Val Asp Glu Lys Thr Val Val Val His
 145 150 155 160

Thr Ser Gln Thr Pro Val Asp Pro Gln Glu Gly Thr Thr Pro Leu Met
 165 170 175

Gly Gln Ala Gly Thr Pro Gly Ala
 180

<210> 15
 <211> 1817
 <212> DNA
 <213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (439)..(897)

<400> 15

```

agcataacct gtttgtgaaa ctgcaaaaag gttgacatgg ctgaagcaga agatggggtg      60
gtactgaatg gttgggagag atatgtagcg gctgaccctg aaggacgttg cagcccatgc      120
tatggagacc tgattttatt ttgtaagagg tgggcaaccc ctgaagcatt ttagtgatgc      180
gaacagatgt gtctgttacc aagcaaagcc agttaaagaa ggtcacagag gaggaatgat      240
cacaagagt ctgagaagcc aactggggcc aaacaagttt tagaacctct actggctgat      300
gccaacatca tcagagatga actgttctta ccagaaactt cctgctcct gacacccac      360
ctctccccag aagagaagaa ggagagtggc cacgttgatt cagccaagca cctccaggag      420
gtcccctctg gatgtccc atg agg ctg ccc ctc agc cac agc cca gag cac      471
                Met Arg Leu Pro Leu Ser His Ser Pro Glu His
                1             5             10

gtg gag atg gct ttg ctc agc aac atc cta gcg gcc tat tcc ttt gtc      519
Val Glu Met Ala Leu Leu Ser Asn Ile Leu Ala Ala Tyr Ser Phe Val
                15             20             25

tca gaa aat cct gag cga gca gct ctg tac ttt gtt tct ggc gtg tgc      567
Ser Glu Asn Pro Glu Arg Ala Ala Leu Tyr Phe Val Ser Gly Val Cys
                30             35             40

atc ggg ctg gtg ctg acc ctg gct gct ctg gtg ata agg atc tct tgc      615
Ile Gly Leu Val Leu Thr Leu Ala Ala Leu Val Ile Arg Ile Ser Cys
                45             50             55

cac aca gac tgc agg cgg cgt ccc ggg aag aag ttc ctg cag gac aga      663
His Thr Asp Cys Arg Arg Arg Pro Gly Lys Lys Phe Leu Gln Asp Arg
60             65             70             75

gag agc agc agc gac agc agc gac agc gag gat ggc agt gag gac acc      711
Glu Ser Ser Ser Asp Ser Ser Asp Ser Glu Asp Gly Ser Glu Asp Thr
                80             85             90

gtg tcc gat ctc tcc gtg cgg aga cac cgc cgc ttc gag agg act ttg      759
Val Ser Asp Leu Ser Val Arg Arg His Arg Arg Phe Glu Arg Thr Leu
                95             100             105

aac aag aat gtg ttc acc tct gcg gag gag ctg gag cgc gcc cag cgg      807
Asn Lys Asn Val Phe Thr Ser Ala Glu Glu Leu Glu Arg Ala Gln Arg
                110             115             120

```

ctg gag gag cgc gag cgc atc atc agg gag atc tgg atg aat ggc cag 855
 Leu Glu Glu Arg Glu Arg Ile Ile Arg Glu Ile Trp Met Asn Gly Gln
 125 130 135

 cct gag gtg ccc ggg acc agg agc ctg aat cgc tac tat tag 897
 Pro Glu Val Pro Gly Thr Arg Ser Leu Asn Arg Tyr Tyr
 140 145 150

 ggagcagcag gaccccgga accactggag gccgcctgga aaggagagcg tctgcaggga 957
 cagtgggcac aaggaactga acccagctct gctaataattg tgatttcaga gaaaaagcag 1017
 gacatgcccc ttttctagcc aggaggattg ctctttttg gccaaatgta tggagaagta 1077
 gaaaaatcaa agcagttcat caccctttcc aggtctcgga atggtgctga aaaatcctct 1137
 ccaacactgt ggatggagat cggagaaacg cgactgtggt ttctcttgat ttctgaggat 1197
 ctcagaagtt tcagcagact tccttgctct gtgttattcc ttgcaaaag gaaagatcat 1257
 tatagcatga gggctgggaa tagcagggtg aacttaacc aataaatgca atttcctaaa 1317
 tgacttcatg ctatggaggt gattctgatt caaatagcat gatccatgct tattatttaa 1377
 ggctgatttt taaaatcttg tgttgcaagg gcaacctcgt ccattttaac tggcacctca 1437
 gggattaaaa tctactttt tagtgtagtt cccacctcat tcatgaaaat gaatagaact 1497
 attgtattat gggagatgtg tcagtgaact agaaaatgtc aataacctca aaggatgaag 1557
 ggtttttatt taaatagtt tataaaatat atattgacat gcatatttga aaatgctgca 1617
 taaaataaaa agtgggtgtg tttccccctc tttggagaca agaaaatttt attatgactc 1677
 tagataattg tgattttaa cactttgttt ttttttttt ttttttaatt ggatttcaaa 1737
 gaaaagaatg gaaatgagag gtaaggatta aagccaaagt taggatggga attaaaaaaa 1797
 taaacattac ataaaatctt 1817

<210> 16
 <211> 152
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 16

Met Arg Leu Pro Leu Ser His Ser Pro Glu His Val Glu Met Ala Leu
 1 5 10 15

Leu Ser Asn Ile Leu Ala Ala Tyr Ser Phe Val Ser Glu Asn Pro Glu
 20 25 30

Arg Ala Ala Leu Tyr Phe Val Ser Gly Val Cys Ile Gly Leu Val Leu
 35 40 45

Thr Leu Ala Ala Leu Val Ile Arg Ile Ser Cys His Thr Asp Cys Arg
 50 55 60

Arg Arg Pro Gly Lys Lys Phe Leu Gln Asp Arg Glu Ser Ser Ser Asp
 65 70 75 80

Ser Ser Asp Ser Glu Asp Gly Ser Glu Asp Thr Val Ser Asp Leu Ser
 85 90 95

Val Arg Arg His Arg Arg Phe Glu Arg Thr Leu Asn Lys Asn Val Phe
 100 105 110

Thr Ser Ala Glu Glu Leu Glu Arg Ala Gln Arg Leu Glu Glu Arg Glu
 115 120 125

Arg Ile Ile Arg Glu Ile Trp Met Asn Gly Gln Pro Glu Val Pro Gly
 130 135 140

Thr Arg Ser Leu Asn Arg Tyr Tyr
 145 150

<210> 17
 <211> 1868
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (403)..(870)

<400> 17
 agtttcggaa ccccagccag ctcacctctg cgccgctgaa cccgatccga gcctccggca 60

aaggtttttc cctcctcccc cggccgaggg cttctgccgc cggggcaccc ccgccccgcg	120
gcgccccaca ttccccagc ccggggccct tggcgcgtgc gctccgtgcg gctgtgctcc	180
gcgggacttt gtttgtttcc tctctgtccc tctttgttgg gctgaacacc agcctcgtca	240
aagcccccca ctccggaggg agttcggctt ctccagcagg gcggctgcag cgcgctgccc	300
cgacccccgc tgcggccct cagcccgcta gtgctccac cccgccctcc tggcacccccg	360
cctgcgtccg ttgccccgag gaagccaacc gcgacttcat tg atg cac cca ttc	414
	Met His Pro Phe
	1
cag tgg tgt aac ggg tgt ttc tgt ggc ctg gga ctg gtt agc acc aac	462
Gln Trp Cys Asn Gly Cys Phe Cys Gly Leu Gly Leu Val Ser Thr Asn	
5 10 15 20	
aag tcc tgc tcg atg cca ccc atc agt ttc cag gac ctt ccg ctc aac	510
Lys Ser Cys Ser Met Pro Pro Ile Ser Phe Gln Asp Leu Pro Leu Asn	
25 30 35	
atc tat atg gtc atc ttc ggc aca ggc atc ttt gtc ttc atg ctc agc	558
Ile Tyr Met Val Ile Phe Gly Thr Gly Ile Phe Val Phe Met Leu Ser	
40 45 50	
ctt atc ttc tgc tgc tat ttt atc agc aaa ctg cgg aac cag gca cag	606
Leu Ile Phe Cys Cys Tyr Phe Ile Ser Lys Leu Arg Asn Gln Ala Gln	
55 60 65	
agt gag cga tac gga tat aag gag gtg gtg ctt aaa ggt gat gcc aag	654
Ser Glu Arg Tyr Gly Tyr Lys Glu Val Val Leu Lys Gly Asp Ala Lys	
70 75 80	
aag tta caa tta tat ggg cag acc tgc gca gtc tgt ctg gaa gac ttc	702
Lys Leu Gln Leu Tyr Gly Gln Thr Cys Ala Val Cys Leu Glu Asp Phe	
85 90 95 100	
aag ggg aag gat gag tta ggc gtg ctc ccg tgc caa cac gcc ttt cac	750
Lys Gly Lys Asp Glu Leu Gly Val Leu Pro Cys Gln His Ala Phe His	
105 110 115	
cgc aag tgt ctg gtg aaa tgg ctg gaa gtt cgc tgt gtc tgc ccc atg	798
Arg Lys Cys Leu Val Lys Trp Leu Glu Val Arg Cys Val Cys Pro Met	
120 125 130	
tgt aac aag ccc att gct agt ccc tca gag gcc acg cag aac att ggg	846
Cys Asn Lys Pro Ile Ala Ser Pro Ser Glu Ala Thr Gln Asn Ile Gly	
135 140 145	
att cta ttg gat gag ctg gtg tga gtgctgccgc tacaccgaga cctggagaag	900

Ile Leu Leu Asp Glu Leu Val
150 155

acctcttgcc tcatggatgt ctggtccttc tgcacagctc caaccaacag gactgtaggg 960
tgatgacgat cactttccca gtgatgagaa gggtagtcta ggactgggct tctacctca 1020
gtgcaagacc agtgccagat gtgccccac ttctgcctc ctgaagcctt cttcctgct 1080
actccatgct ggtggcctca cccatcaaga cactgtctc ctggtactgg actatctacc 1140
tgccttgtec ctgttctggg ggaagggtgc caccocgatc aagaacatgg agaaagtctt 1200
ctttcaaggc tcccattagg aggatgagct gccttgacct agaagggatg agacgggctc 1260
ttacctctct acaaccttcc ctccccttcc cactccttcc ggagtaaggc tagaagggaa 1320
ggaaggaaag atcaaggaac caagcgcctc cacgggaggc gagggaggct ctgtatgaaa 1380
cagaagagca gggacataaa ggaaaatgtc agtgtttaca tgggacctat ggaacaaaag 1440
gctggcgggc gccagctgac tccagagtaa gagagggcc ttcccctgcc aggaccacg 1500
gtgctatcca ttcagtctct tctcagttta atctcggagc ttcctattcc atgttgaggt 1560
ttgtgggccc ctctagagga gggctagttc tatacttaaa ttgattccca ggggcctttt 1620
tttttttttt tttttttttt ttgatcaaaa ggggtgtggg gatgggggtg tctacggtta 1680
agcaacagat acctccttcc ctttgtaaat agtattttta tacttcatcc tcgcctctca 1740
ggctttagat acgaaatctc cagaatggaa gggggtgggg attttctgtt cctccctgga 1800
gtgggtgagg gtgggagaaa gttacatatt taaagaaaaa taaatttaaat aacaagtctc 1860
tctaacct 1868

<210> 18
<211> 155
<212> PRT
<213> 人

<400> 18

Met His Pro Phe Gln Trp Cys Asn Gly Cys Phe Cys Gly Leu Gly Leu
1 5 10 15

Val Ser Thr Asn Lys Ser Cys Ser Met Pro Pro Ile Ser Phe Gln Asp
20 25 30

Leu Pro Leu Asn Ile Tyr Met Val Ile Phe Gly Thr Gly Ile Phe Val
 35 40 45

Phe Met Leu Ser Leu Ile Phe Cys Cys Tyr Phe Ile Ser Lys Leu Arg
 50 55 60

Asn Gln Ala Gln Ser Glu Arg Tyr Gly Tyr Lys Glu Val Val Leu Lys
 65 70 75 80

Gly Asp Ala Lys Lys Leu Gln Leu Tyr Gly Gln Thr Cys Ala Val Cys
 85 90 95

Leu Glu Asp Phe Lys Gly Lys Asp Glu Leu Gly Val Leu Pro Cys Gln
 100 105 110

His Ala Phe His Arg Lys Cys Leu Val Lys Trp Leu Glu Val Arg Cys
 115 120 125

Val Cys Pro Met Cys Asn Lys Pro Ile Ala Ser Pro Ser Glu Ala Thr
 130 135 140

Gln Asn Ile Gly Ile Leu Leu Asp Glu Leu Val
 145 150 155

<210> 19
 <211> 2651
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (196).. (1599)

<400> 19
 ggcacgaggg gacgcgataa atatgcagag cggaggcttc ggcgagcaga gcccgcgcgc 60
 cgcccgtcc ggggtgctgaa tccaggcgtg gggacacgag ccaggcgccg ccgccggagc 120
 cagcggagcc ggggccagag ccggagcgcg tccggtcca cgcagccgcc ggccggccag 180

cacccagggc cctgc atg cca ggt cgt tgg agg tgg cag cga gac atg cac Met Pro Gly Arg Trp Arg Trp Gln Arg Asp Met His 1 5 10	231
ccg gcc cgg aag ctc ctc agc ctc ctc ttc ctc atc ctg atg ggc act Pro Ala Arg Lys Leu Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ile Leu Met Gly Thr 15 20 25	279
gaa ctc act caa gtg ctg ccc acc aac cct gag gag agc tgg cag gtg Glu Leu Thr Gln Val Leu Pro Thr Asn Pro Glu Glu Ser Trp Gln Val 30 35 40	327
tac agc tct gcc cag gac agc gag ggc agg tgt atc tgc aca gtg gtc Tyr Ser Ser Ala Gln Asp Ser Glu Gly Arg Cys Ile Cys Thr Val Val 45 50 55 60	375
gcc cca cag cag acc atg tgt tca cgg gat gcc cgc aca aaa cag ctg Ala Pro Gln Gln Thr Met Cys Ser Arg Asp Ala Arg Thr Lys Gln Leu 65 70 75	423
agg cag cta ctg gag aag gtg cag aac atg tct caa tcc ata gag gtc Arg Gln Leu Leu Glu Lys Val Gln Asn Met Ser Gln Ser Ile Glu Val 80 85 90	471
ttg gac agg cgg acc cag aga gac ttg cag tac gtg gag aag atg gag Leu Asp Arg Arg Thr Gln Arg Asp Leu Gln Tyr Val Glu Lys Met Glu 95 100 105	519
aac caa atg aaa gga ctg gag tcc aag ttc aaa cag gtg gag gag agt Asn Gln Met Lys Gly Leu Glu Ser Lys Phe Lys Gln Val Glu Glu Ser 110 115 120	567
cat aag caa cac ctg gcc agg cag ttt aag gcg ata aaa gcg aaa atg His Lys Gln His Leu Ala Arg Gln Phe Lys Ala Ile Lys Ala Lys Met 125 130 135 140	615
gat gaa ctt agg cct ttg ata cct gtg ttg gaa gag tac aag gcc gat Asp Glu Leu Arg Pro Leu Ile Pro Val Leu Glu Glu Tyr Lys Ala Asp 145 150 155	663
gcc aaa ttg gta ttg cag ttt aaa gag gag gtc cag aat ctg acg tca Ala Lys Leu Val Leu Gln Phe Lys Glu Glu Val Gln Asn Leu Thr Ser 160 165 170	711
gtg ctt aac gag ctg caa gag gaa att ggc gcc tat gac tac gat gaa Val Leu Asn Glu Leu Gln Glu Ile Gly Ala Tyr Asp Tyr Asp Glu 175 180 185	759
ctt cag agc aga gtg tcc aat ctt gaa gaa agg ctc cgt gca tgc atg Leu Gln Ser Arg Val Ser Asn Leu Glu Glu Arg Leu Arg Ala Cys Met 190 195 200	807

400	405	410	
aat gcc tcc acc tat gaa tac atc gac atc cca ttc cag aac aaa tac			1479
Asn Ala Ser Thr Tyr Glu Tyr Ile Asp Ile Pro Phe Gln Asn Lys Tyr			
415	420	425	
tcc cac atc tcc atg ctg gac tac aac ccc aag gac cgg gcc ctg tat			1527
Ser His Ile Ser Met Leu Asp Tyr Asn Pro Lys Asp Arg Ala Leu Tyr			
430	435	440	
gcc tgg aac aac ggc cac cag atc ctc tac aac gtg acc ctc ttc cac			1575
Ala Trp Asn Asn Gly His Gln Ile Leu Tyr Asn Val Thr Leu Phe His			
445	450	455	460
gtc atc cgc tcc gac gag ttg tag ctcctcctc ctggaagcca agggcccacg			1629
Val Ile Arg Ser Asp Glu Leu			
465			
tcctcaccac aaagggactc ctgtgaaact gctgccaaaa agataccaat aacactaaca			1689
ataccgatct tgaaaaatca tcagcagtgc ggattctgac atcgagggat ggcattacct			1749
ccgtgtttct ccttttcgag cgggcgggcc acagacgtcg gaagaaactc ccgtatttgc			1809
agctggaact gcagcccacg gcgccccggt tttctcccc gccctgtccc tctctggtea			1869
aacaacatac taaagaggcg aggcaatgac tgttgccag ttctcaccgg ggaaaaacc			1929
actgttagga tggcatgaac atttccttag atcgtggtea gctccgagga atgtggcgtc			1989
caggctcttt gagagccatg ggctgcaccc ggccgtaggc tagtgaact cgcacccat			2049
tgcagtgccg tttcttgact gtgttgctgt ctcttagatt aaccgtgctg aggctccaca			2109
tagtcctgg acctgtgtct agtacatact gaagcgatgg tcagagtgtg tagagtgaag			2169
ttgctgtgcc cacattgttt gaactcgcgt accccgtaga tacattgtgc aacgttcttc			2229
tgttattccc ttgaggtggt aacttcgtat gttcagtta tgcgatgatt gttgtaaatg			2289
caatgccgta gtttgatta ataagtggat ggtttttggt tctaaaaaga aaaaaaaaaat			2349
cagtgtcac cttatagag acatagtcaa gttcatgttg ataataatca aaggaattac			2409
tctctcttg ttaaattagc taaatcatgt aaccgcagat aggaagggt cacctgggga			2469
aactctggtt tccgatggga caggaaagtc atacgggcaa cagtatcgg aaagtacgtt			2529
ttttaagta aaaaacaaag gcaactttg tactatccag ttatctaagg aacaataaaa			2589
acattaggag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa			2649

aa

2651

<210> 20

<211> 467

<212> PRT

<213> 人

<400> 20

Met Pro Gly Arg Trp Arg Trp Gln Arg Asp Met His Pro Ala Arg Lys
 1 5 10 15

Leu Leu Ser Leu Leu Phe Leu Ile Leu Met Gly Thr Glu Leu Thr Gln
 20 25 30

Val Leu Pro Thr Asn Pro Glu Glu Ser Trp Gln Val Tyr Ser Ser Ala
 35 40 45

Gln Asp Ser Glu Gly Arg Cys Ile Cys Thr Val Val Ala Pro Gln Gln
 50 55 60

Thr Met Cys Ser Arg Asp Ala Arg Thr Lys Gln Leu Arg Gln Leu Leu
 65 70 75 80

Glu Lys Val Gln Asn Met Ser Gln Ser Ile Glu Val Leu Asp Arg Arg
 85 90 95

Thr Gln Arg Asp Leu Gln Tyr Val Glu Lys Met Glu Asn Gln Met Lys
 100 105 110

Gly Leu Glu Ser Lys Phe Lys Gln Val Glu Glu Ser His Lys Gln His
 115 120 125

Leu Ala Arg Gln Phe Lys Ala Ile Lys Ala Lys Met Asp Glu Leu Arg
 130 135 140

Pro Leu Ile Pro Val Leu Glu Glu Tyr Lys Ala Asp Ala Lys Leu Val
 145 150 155 160

Leu Gln Phe Lys Glu Glu Val Gln Asn Leu Thr Ser Val Leu Asn Glu
165 170 175

Leu Gln Glu Glu Ile Gly Ala Tyr Asp Tyr Asp Glu Leu Gln Ser Arg
180 185 190

Val Ser Asn Leu Glu Glu Arg Leu Arg Ala Cys Met Gln Lys Leu Ala
195 200 205

Cys Gly Lys Leu Thr Gly Ile Ser Asp Pro Val Thr Val Lys Thr Ser
210 215 220

Gly Ser Arg Phe Gly Ser Trp Met Thr Asp Pro Leu Ala Pro Glu Gly
225 230 235 240

Asp Asn Arg Val Trp Tyr Met Asp Gly Tyr His Asn Asn Arg Phe Val
245 250 255

Arg Glu Tyr Lys Ser Met Val Asp Phe Met Asn Thr Asp Asn Phe Thr
260 265 270

Ser His Arg Leu Pro His Pro Trp Ser Gly Thr Gly Gln Val Val Tyr
275 280 285

Asn Gly Ser Ile Tyr Phe Asn Lys Phe Gln Ser His Ile Ile Ile Arg
290 295 300

Phe Asp Leu Lys Thr Glu Thr Ile Leu Lys Thr Arg Ser Leu Asp Tyr
305 310 315 320

Ala Gly Tyr Asn Asn Met Tyr His Tyr Ala Trp Gly Gly His Ser Asp
325 330 335

Ile Asp Leu Met Val Asp Glu Ser Gly Leu Trp Ala Val Tyr Ala Thr
340 345 350

Asn Gln Asn Ala Gly Asn Ile Val Val Ser Arg Leu Asp Pro Val Ser
355 360 365

Leu Gln Thr Leu Gln Thr Trp Asn Thr Ser Tyr Pro Lys Arg Ser Ala
370 375 380

Gly Glu Ala Phe Ile Ile Cys Gly Thr Leu Tyr Val Thr Asn Gly Tyr
385 390 395 400

Ser Gly Gly Thr Lys Val His Tyr Ala Tyr Gln Thr Asn Ala Ser Thr
405 410 415

Tyr Glu Tyr Ile Asp Ile Pro Phe Gln Asn Lys Tyr Ser His Ile Ser
420 425 430

Met Leu Asp Tyr Asn Pro Lys Asp Arg Ala Leu Tyr Ala Trp Asn Asn
435 440 445

Gly His Gln Ile Leu Tyr Asn Val Thr Leu Phe His Val Ile Arg Ser
450 455 460

Asp Glu Leu
465

<210> 21
<211> 2087
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (106)..(1023)

<400> 21
tttctcggg aaccgtgccg ggagagcgcg cgggtgctgga gccgcaccgg gtggccgaag 60

cagaagactt tccggaagct gctgggggat gtctgactag ctctc atg gag ctc cac 117
Met Glu Leu His
1

tac ctt gct aag aag agc aac cag gca gac ctc tgt gat gcc agg gac 165
Tyr Leu Ala Lys Lys Ser Asn Gln Ala Asp Leu Cys Asp Ala Arg Asp
5 10 15 20

tgg agt tca aga ggg ctg cct ggt gac cag gca gat aca gca gcc aca 213

gac cgc tgt gtg att gcg ggg ctc tgc ctc ctc acg ctg ggg ggc gtc Asp Arg Cys Val Ile Ala Gly Leu Cys Leu Leu Thr Leu Gly Gly Val 230 235 240	837
atc ctg tcc tgc ttg tta atg atg tcc atg tgg aag ggg gag ctc tat Ile Leu Ser Cys Leu Leu Met Met Ser Met Trp Lys Gly Glu Leu Tyr 245 250 255 260	885
cgt cga aac aga ttt gcc tct tcc aaa gag tct gca aaa ctc tat ggt Arg Arg Asn Arg Phe Ala Ser Ser Lys Glu Ser Ala Lys Leu Tyr Gly 265 270 275	933
tct ttc aac ttc agg atg aaa acc agc acg aat gaa aac act ctg gaa Ser Phe Asn Phe Arg Met Lys Thr Ser Thr Asn Glu Asn Thr Leu Glu 280 285 290	981
ctg tcc ttg gta gag gaa gat gcg ctt gct gta cag agt taa Leu Ser Leu Val Glu Glu Asp Ala Leu Ala Val Gln Ser 295 300 305	1023
ttctggttgt gaatatcttg agagtctgcc ttggcatttt ataatatgaa aaaagttaat	1083
ttataaaaat tcacagtgca atttatttgc ctggcaagaa aagtttattt cacaaaccaa	1143
cagccagtaa gtgtttttgt tctctatgtg tcttctattt agaagaaaag ccatgtaaga	1203
tgtataagaa accacaacca gccacaccta tccttctgaa gagctgaagg ctaattaatc	1263
tgtaatggcc aagaacttct acttcgatag aaaaatattt ctaatgacc agtctacaaa	1323
ttatttcttt tacacaaata tatgatgtta ttctttggac actaggtggt cctacacaca	1383
gtaggatcaa ttgctaactt acttttgtaa aaagaactaa gcactaatca ataataaggc	1443
ttacatctaa ttctcaaagg tgcttatcca ttttcttgct aaattatcct tcttgtaatt	1503
tggttaaaca ctaaaacatg gaatttttag ttgfaatatt ttgaagtttg aggatgttgg	1563
gctttcctta ttgtaaaaa tgttatgttt gaaattattc ctgttttcaa aaatggtaat	1623
taagtcatta ggataaactt tctaataaaa aaaaattatg taaatcattg taagaccaat	1683
gtgaatttaa accacagtgt tggtgccaga tattagccag ggtcacaggc tcttttttaa	1743
aatgaagtca aattagttac tgatataagt tttatatttt gtgattttgc catcactactg	1803
gttatctgtg ctcttgaagt ctgctggttc tcacaccagc agcaagaggc aaggcatgag	1863
acattttaaa tatatttcca gacatctaaa catctagaca ggctgagtc atgattggct	1923
ctggtgtgct tccaggtaac atcttgttat tgctgtttgg ggaaaaccac caatagaatt	1983

gcagctagac ttttggggac tgtgcctcgc aggctgtatc acttgctgta ggccaagcaa 2043

cgagcacttc cctcatggtgta gcaacagtcc ttaagcccaa agcc 2087

<210> 22

<211> 305

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Met Glu Leu His Tyr Leu Ala Lys Lys Ser Asn Gln Ala Asp Leu Cys
1 5 10 15

Asp Ala Arg Asp Trp Ser Ser Arg Gly Leu Pro Gly Asp Gln Ala Asp
 20 25 30

Thr Ala Ala Thr Arg Ala Ala Leu Cys Cys Gln Lys Gln Cys Ala Ser
 35 40 45

Thr Pro Arg Ala Thr Glu Met Glu Gly Ser Lys Leu Ser Ser Ser Pro
50 55 60

Ala Ser Pro Ser Ser Ser Leu Gln Asn Ser Thr Leu Gln Pro Asp Ala
65 70 75 80

Phe Pro Pro Gly Leu Leu His Ser Gly Asn Asn Gln Ile Thr Ala Glu
 85 90 95

Arg Lys Val Cys Asn Cys Cys Ser Gln Glu Leu Glu Thr Ser Phe Thr
 100 105 110

Tyr Val Asp Lys Asn Ile Asn Leu Glu Gln Arg Asn Arg Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Ala Lys Gly His Asn His Pro Gly Glu Leu Gly Trp Glu Asn Pro
130 135 140

Asn Glu Trp Ser Gln Glu Ala Ala Ile Ser Leu Ile Ser Glu Glu Glu
145 150 155 160

Asp Asp Thr Ser Ser Glu Ala Thr Ser Ser Gly Lys Ser Ile Asp Tyr
 165 170 175

Gly Phe Ile Ser Ala Ile Leu Phe Leu Val Thr Gly Ile Leu Leu Val
 180 185 190

Ile Ile Ser Tyr Ile Val Pro Arg Glu Val Thr Val Asp Pro Asn Thr
 195 200 205

Val Ala Ala Arg Glu Met Glu Arg Leu Glu Lys Glu Ser Ala Arg Leu
 210 215 220

Gly Ala His Leu Asp Arg Cys Val Ile Ala Gly Leu Cys Leu Leu Thr
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Val Ile Leu Ser Cys Leu Leu Met Met Ser Met Trp Lys
 245 250 255

Gly Glu Leu Tyr Arg Arg Asn Arg Phe Ala Ser Ser Lys Glu Ser Ala
 260 265 270

Lys Leu Tyr Gly Ser Phe Asn Phe Arg Met Lys Thr Ser Thr Asn Glu
 275 280 285

Asn Thr Leu Glu Leu Ser Leu Val Glu Glu Asp Ala Leu Ala Val Gln
 290 295 300

Ser
 305

<210> 23
 <211> 1882
 <212> DNA
 <213> 人

<220>
 <221> CDS
 <222> (534)..(1505)

Pro Val Thr Trp Ser Val Ile Ser Leu Leu Arg Gly Glu Ala Tyr Val	
115	120 125
tgt gct ctc agt gag ttc gtg gac cct tcc tca ctc acg gcc agg gaa	968
Cys Ala Leu Ser Glu Phe Val Asp Pro Ser Ser Leu Thr Ala Arg Glu	
130	135 140 145
gag cac ttc cca tca gcc cac gcc act gaa atc ctg gcc agg ttc ccc	1016
Glu His Phe Pro Ser Ala His Ala Thr Glu Ile Leu Ala Arg Phe Pro	
	150 155 160
tgc aag gag aac cct gac aac ctg tca gac ttc cgg gag gag gtc agc	1064
Cys Lys Glu Asn Pro Asp Asn Leu Ser Asp Phe Arg Glu Glu Val Ser	
	165 170 175
cgc agg ctc agg tat gag tcc cag ctc ttt gga tgg ctg ctc atc ggc	1112
Arg Arg Leu Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Phe Gly Trp Leu Leu Ile Gly	
	180 185 190
gtg gtg gcc atc ctg gtg ttc ctg acc aag tgc ctc aag cat tac tgc	1160
Val Val Ala Ile Leu Val Phe Leu Thr Lys Cys Leu Lys His Tyr Cys	
	195 200 205
tca cca ctc agc tac cgc cag gag gcc tac tgg gcg cag tac cgc gcc	1208
Ser Pro Leu Ser Tyr Arg Gln Glu Ala Tyr Trp Ala Gln Tyr Arg Ala	
210	215 220 225
aat gag gac cag ctg ttc cag cgc acg gcc gag gtg cac tct cgg gtg	1256
Asn Glu Asp Gln Leu Phe Gln Arg Thr Ala Glu Val His Ser Arg Val	
	230 235 240
ctc gct gcc aac aat gtg cgc cgc ttc ttt ggc ttt gtg gcg ctc aac	1304
Leu Ala Ala Asn Asn Val Arg Arg Phe Phe Gly Phe Val Ala Leu Asn	
	245 250 255
aag gat gat gag gaa ctg att gcc aac ttc cca gtg gaa ggc acg cag	1352
Lys Asp Asp Glu Glu Leu Ile Ala Asn Phe Pro Val Glu Gly Thr Gln	
	260 265 270
cca cgg cca cag tgg aat gcc atc acc ggc gtc tac ttg tac cgt gag	1400
Pro Arg Pro Gln Trp Asn Ala Ile Thr Gly Val Tyr Leu Tyr Arg Glu	
	275 280 285
aac cag ggc ctc cca ctc tac agc cgc ctg cac aag tgg gcc cag ggt	1448
Asn Gln Gly Leu Pro Leu Tyr Ser Arg Leu His Lys Trp Ala Gln Gly	
290	295 300 305
ctg gca ggc aac ggc gcg gcc cct gac aac gtg gag atg gcc ctg ctc	1496
Leu Ala Gly Asn Gly Ala Ala Pro Asp Asn Val Glu Met Ala Leu Leu	
	310 315 320

ccc tcc taa ggaggtgctt cccatgctct ttgtaaatgg cactacttgg 1545
 Pro Ser

tcccaaactg aaccccactg cttgctcaca tccatatcag aaggggattt ttaaaaaact 1605

gttatcttct tggccagggg aaaggaccac aaggcaatct ggggtgtgga cagaccctgt 1665

agacaatgga agccccagcc agcagggcca ggtgacagtg aagctcacca gtgggctcct 1725

ttatggtact ctatgcagtt aacatgtatc tagctgcata gggacacca ggcgagcagt 1785

gcaccactgg gaagtggcct ccagtgcagc ctctggcctt atttatata tttaaatttt 1845

tgataaagtt tttcttacta aaaggaaaa aaaaaaa 1882

<210> 24
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 24

Met Ala Ala Leu Ile Ala Glu Asn Phe Arg Phe Leu Ser Leu Phe Phe
 1 5 10 15

Lys Ser Lys Asp Val Met Ile Phe Asn Gly Leu Val Ala Leu Gly Thr
 20 25 30

Val Gly Ser Gln Glu Leu Phe Ser Val Val Ala Phe His Cys Pro Cys
 35 40 45

Ser Pro Ala Arg Asn Tyr Leu Tyr Gly Leu Ala Ala Ile Gly Val Pro
 50 55 60

Ala Leu Val Leu Phe Ile Ile Gly Ile Ile Leu Asn Asn His Thr Trp
 65 70 75 80

Asn Leu Val Ala Glu Cys Gln His Arg Arg Thr Lys Asn Cys Ser Ala
 85 90 95

Ala Pro Thr Phe Leu Leu Leu Ser Ser Ile Leu Gly Arg Ala Ala Val
 100 105 110

Ala Pro Val Thr Trp Ser Val Ile Ser Leu Leu Arg Gly Glu Ala Tyr
 115 120 125

Val Cys Ala Leu Ser Glu Phe Val Asp Pro Ser Ser Leu Thr Ala Arg
 130 135 140

Glu Glu His Phe Pro Ser Ala His Ala Thr Glu Ile Leu Ala Arg Phe
 145 150 155 160

Pro Cys Lys Glu Asn Pro Asp Asn Leu Ser Asp Phe Arg Glu Glu Val
 165 170 175

Ser Arg Arg Leu Arg Tyr Glu Ser Gln Leu Phe Gly Trp Leu Leu Ile
 180 185 190

Gly Val Val Ala Ile Leu Val Phe Leu Thr Lys Cys Leu Lys His Tyr
 195 200 205

Cys Ser Pro Leu Ser Tyr Arg Gln Glu Ala Tyr Trp Ala Gln Tyr Arg
 210 215 220

Ala Asn Glu Asp Gln Leu Phe Gln Arg Thr Ala Glu Val His Ser Arg
 225 230 235 240

Val Leu Ala Ala Asn Asn Val Arg Arg Phe Phe Gly Phe Val Ala Leu
 245 250 255

Asn Lys Asp Asp Glu Glu Leu Ile Ala Asn Phe Pro Val Glu Gly Thr
 260 265 270

Gln Pro Arg Pro Gln Trp Asn Ala Ile Thr Gly Val Tyr Leu Tyr Arg
 275 280 285

Glu Asn Gln Gly Leu Pro Leu Tyr Ser Arg Leu His Lys Trp Ala Gln
 290 295 300

Gly Leu Ala Gly Asn Gly Ala Ala Pro Asp Asn Val Glu Met Ala Leu
 305 310 315 320

Leu Pro Ser

<210> 25

<211> 673

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (135)..(467)

<400> 25

```

cttccgagca agatggcgcc gcgggcattt cttccactgc ccgtctgagg gaacgctaag      60
tagtgtgtcc ggcgccgtgt tccagctccg cgttgttccg cgagaaagcg agaggccgag      120
cctgggctgg tgcg atg gcc gcg gtg gtg gcc aag cgg gaa ggg ccg ccg      170
          Met Ala Ala Val Val Ala Lys Arg Glu Gly Pro Pro
          1             5             10
ttc atc agc gag gcg gcc gtg cgg ggc aac gcc gcc gtc ctg gat tat      218
Phe Ile Ser Glu Ala Ala Val Arg Gly Asn Ala Ala Val Leu Asp Tyr
          15             20             25
tgc cgg acc tcg gtg tca gcg ctg tcg ggg gcc acg gcc ggc atc ctc      266
Cys Arg Thr Ser Val Ser Ala Leu Ser Gly Ala Thr Ala Gly Ile Leu
          30             35             40
ggc ctc acc ggc ctc tac ggc ttc atc ttc tac ctg ctc gcc tcc gtc      314
Gly Leu Thr Gly Leu Tyr Gly Phe Ile Phe Tyr Leu Leu Ala Ser Val
          45             50             55             60
ctg ctc tcc ctg ctc ctc att ctc aag gcg gga agg agg tgg aac aaa      362
Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ile Leu Lys Ala Gly Arg Arg Trp Asn Lys
          65             70             75
tat ttc aaa tca cgg aga cct ctc ttt aca gga ggc ctc atc ggg ggc      410
Tyr Phe Lys Ser Arg Arg Pro Leu Phe Thr Gly Gly Leu Ile Gly Gly
          80             85             90
ctc ttc acc tac gtc ctg ttc tgg acg ttc ctc tac ggc atg gtg cac      458
Leu Phe Thr Tyr Val Leu Phe Trp Thr Phe Leu Tyr Gly Met Val His
          95             100             105
gtc tac tga aatgggggcc cgggggactt ttttaaaaaa ccagatcggg      507
Val Tyr

```

110

aggactgtgg ccagcaatta acaccatgta gacttcctta gttcttaagt ggttgaattc 567

gctgcttggt ctgtaacggt ataaataatt tataatctgaa gacggagagc ctgtaatatt 627

cttcagatta aatgaagcgt gagacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 673

<210> 26

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 26

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

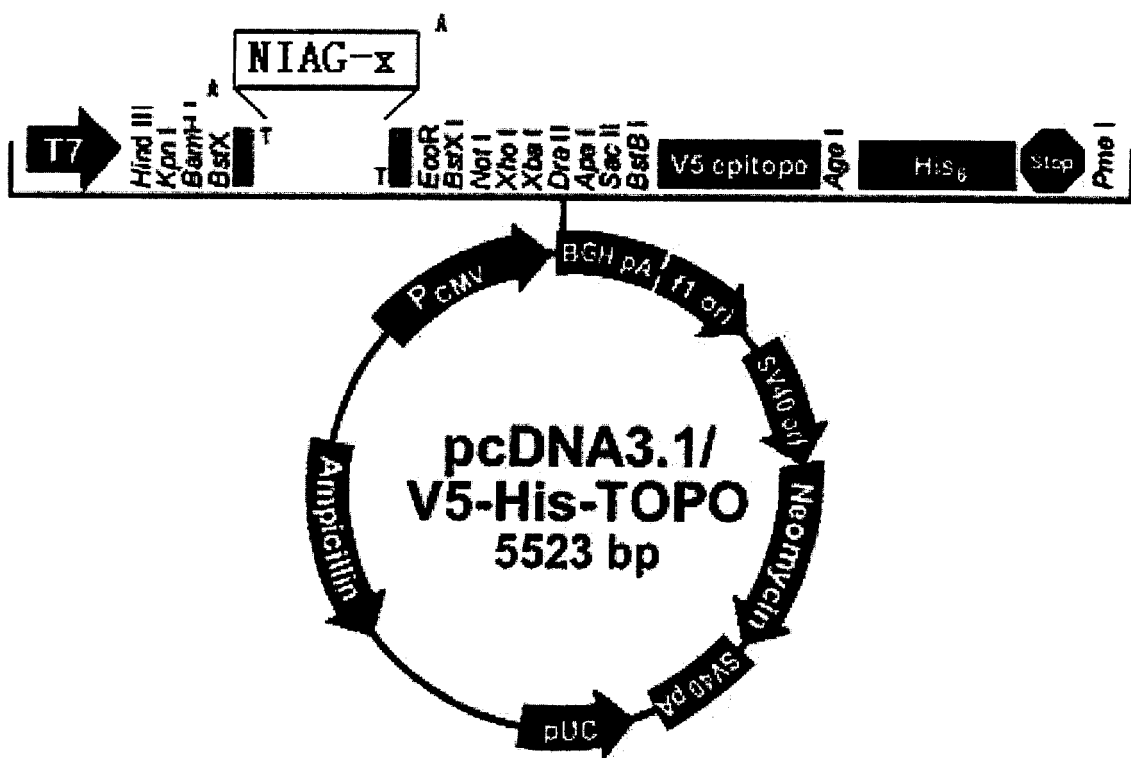


图 1

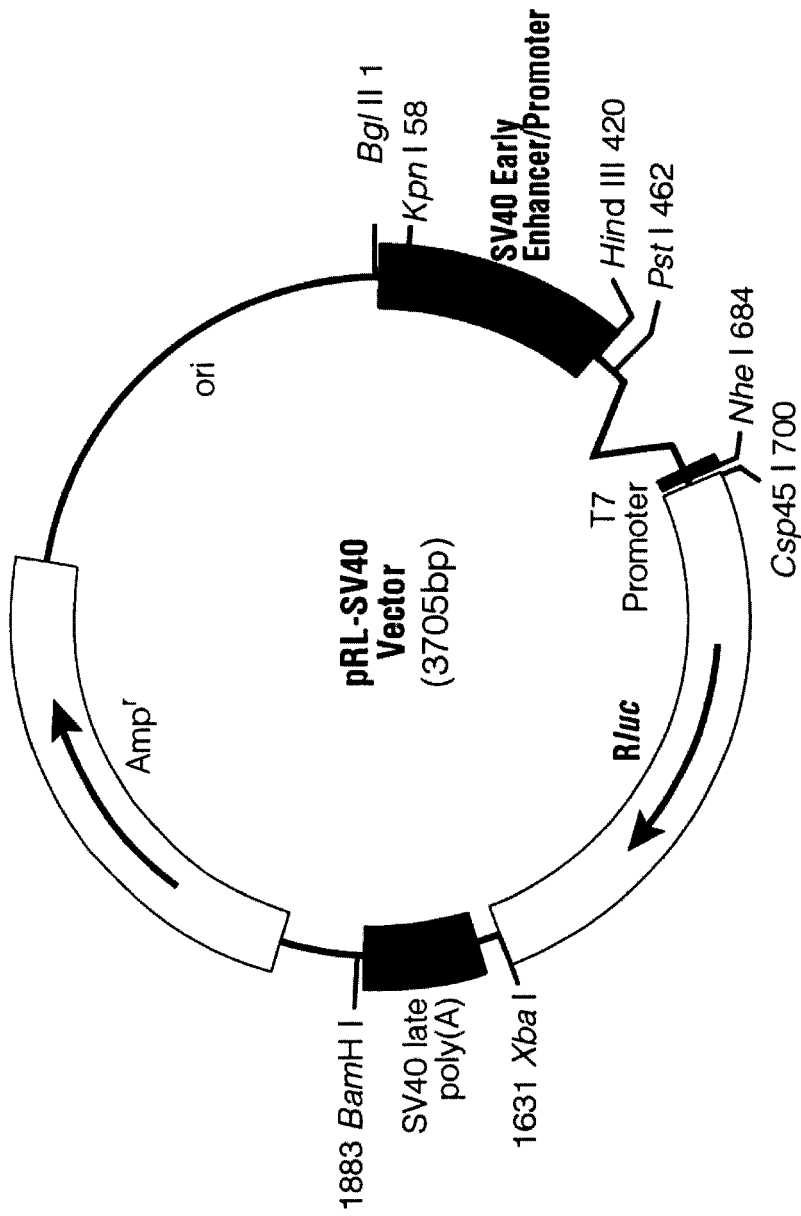


图 2

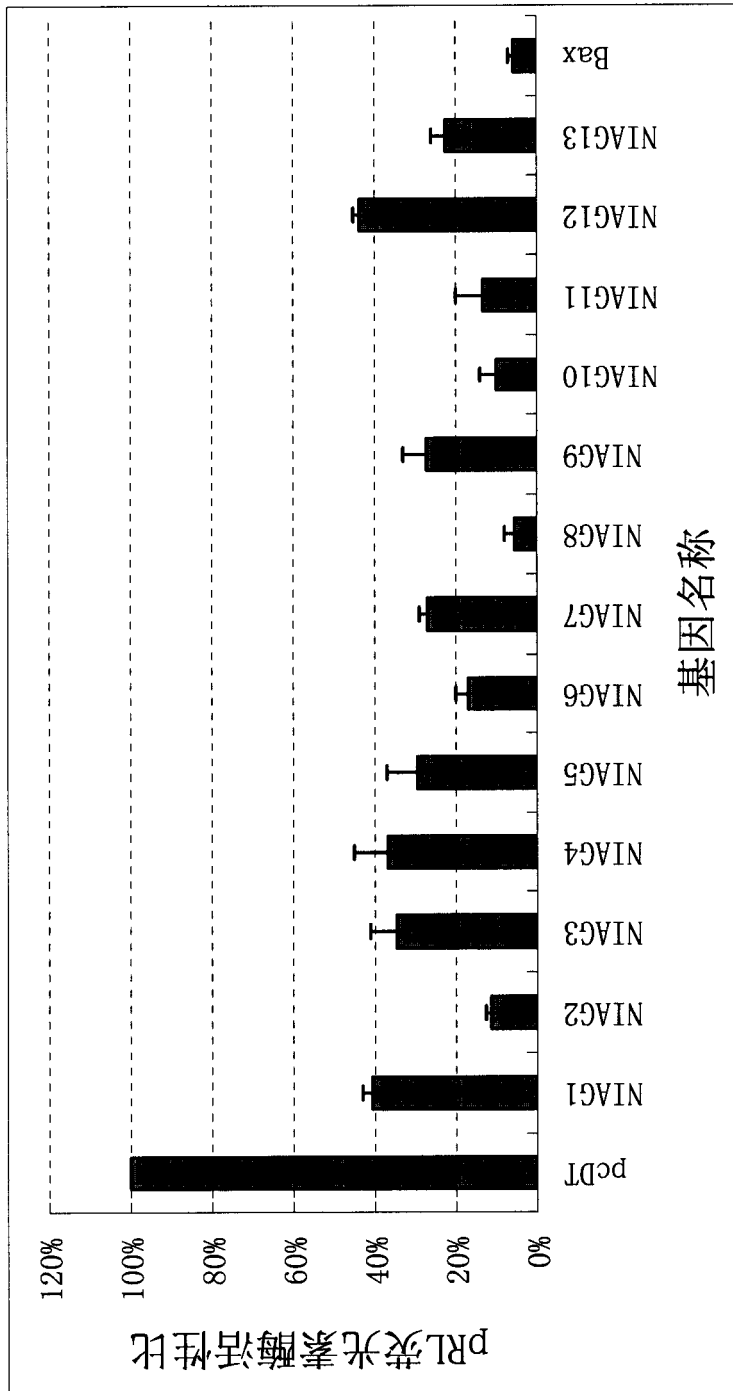


图3

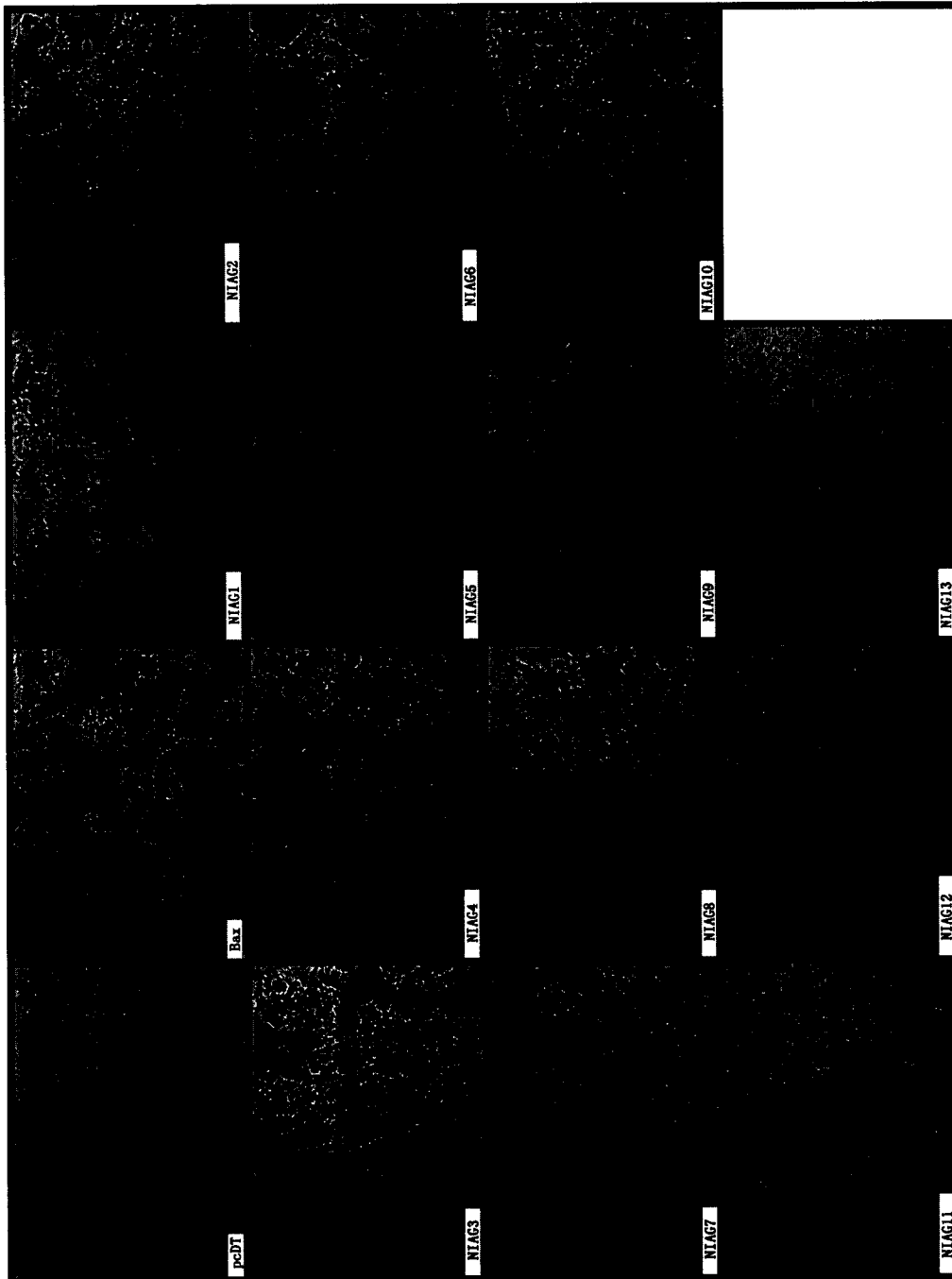


图 4

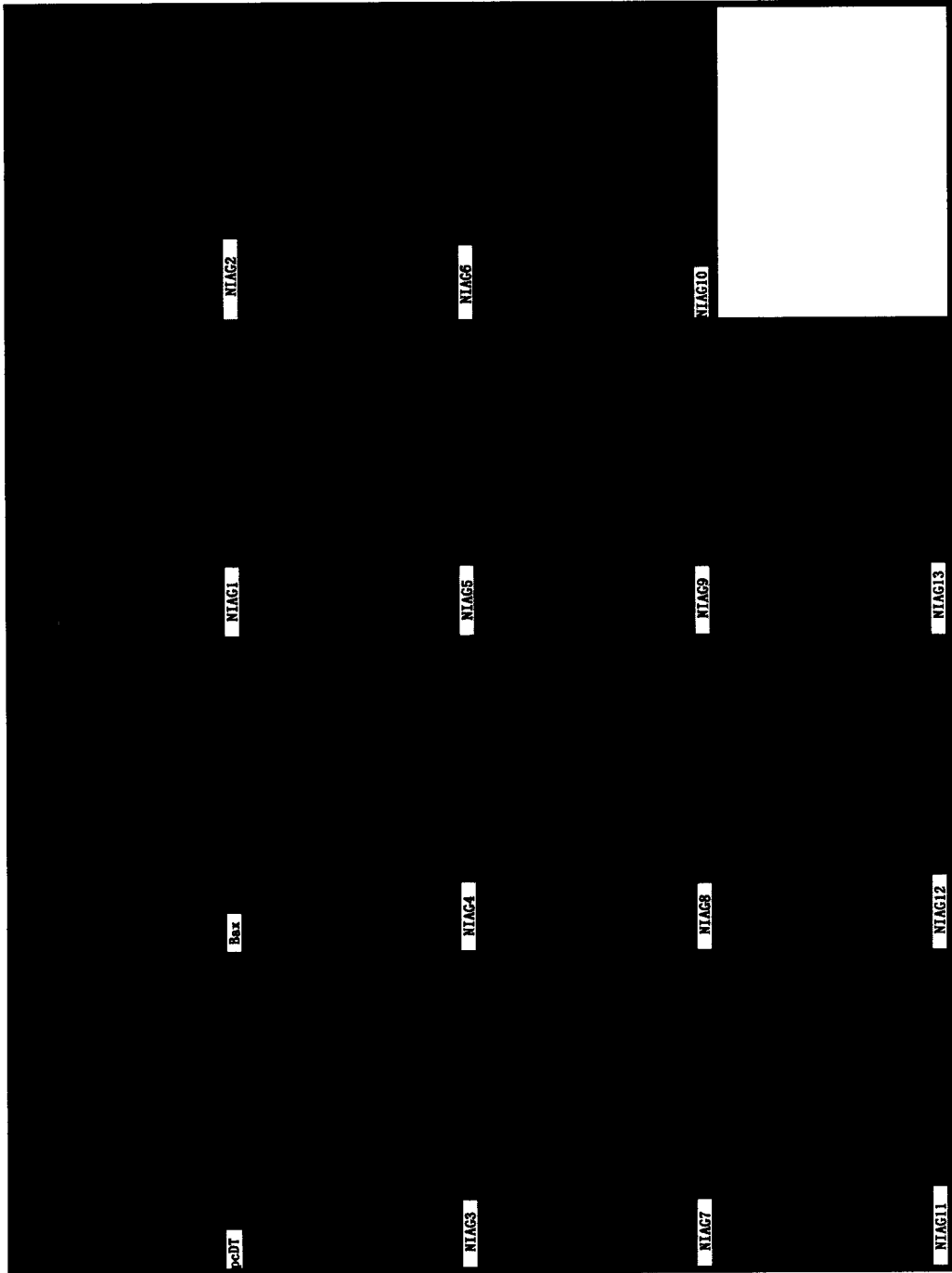
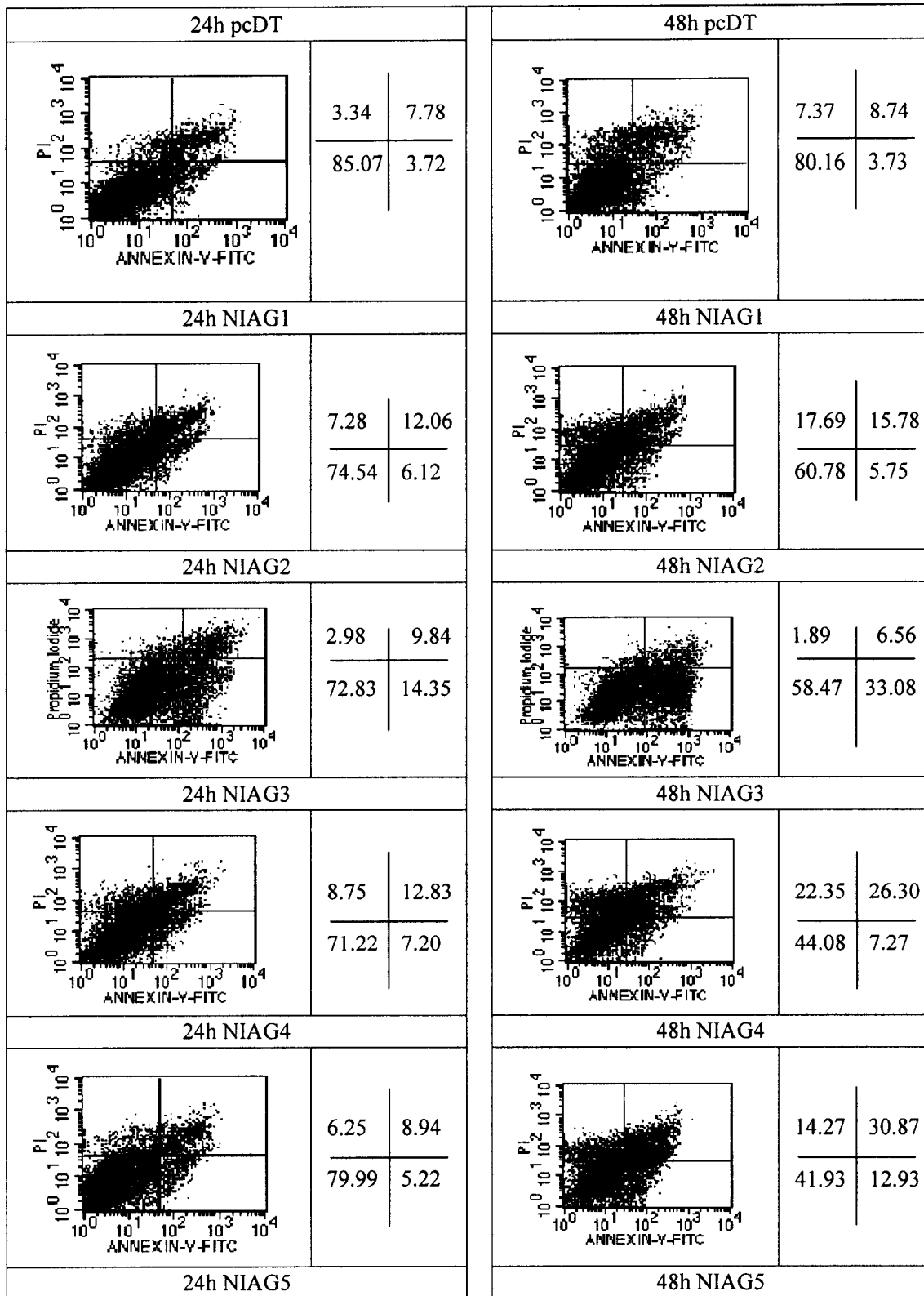
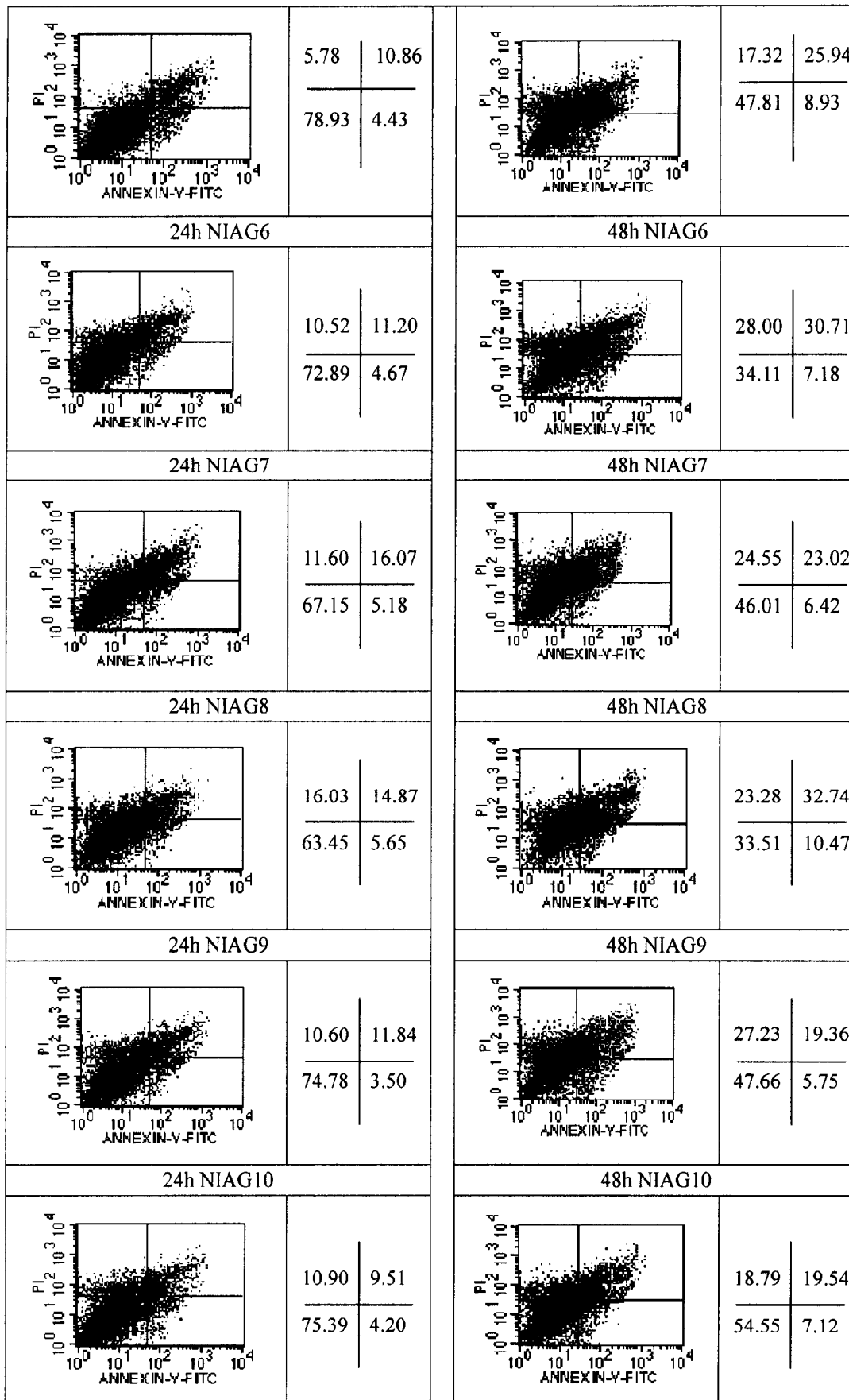


图 5





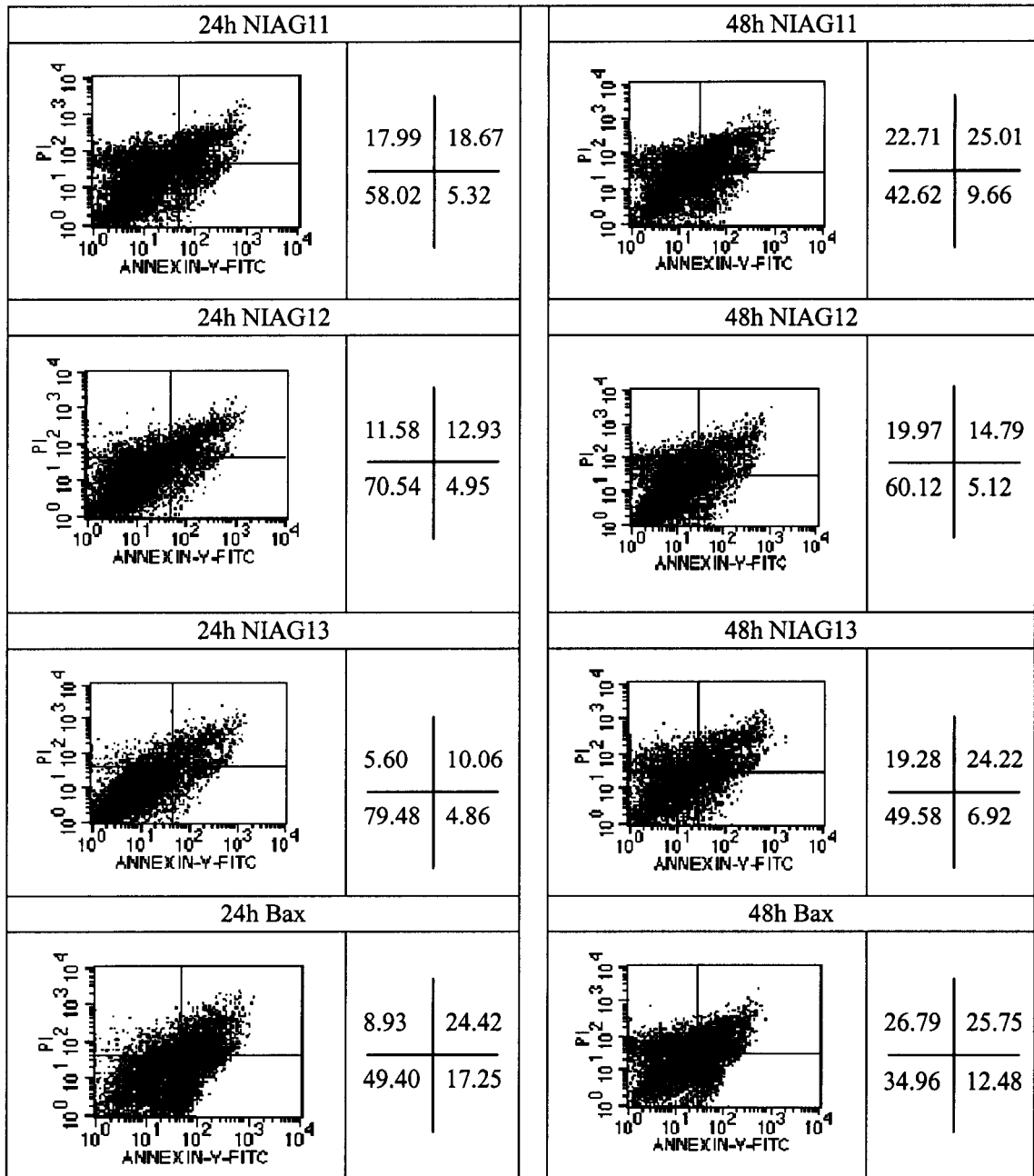


图 6

专利名称(译)	诱导细胞凋亡的多核苷酸及其编码的多肽和用途		
公开(公告)号	CN1900279A	公开(公告)日	2007-01-24
申请号	CN200510085500.0	申请日	2005-07-22
[标]申请(专利权)人(译)	北京诺赛基因组研究中心有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京诺赛基因组研究中心有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京诺赛基因组研究中心有限公司		
[标]发明人	石太平 王兰 马大龙 高霞 高鹏 于传飞 邓唯唯 郭金海 马进京 程华玲 王欣宇 董郁蓉		
发明人	石太平 王兰 马大龙 高霞 高鹏 于传飞 邓唯唯 郭金海 马进京 程华玲 王欣宇 董郁蓉		
IPC分类号	C12N15/12 C07K14/435 C12N15/63 C07K16/18 A61K38/17 A61P35/00 A61P37/00 C12Q1/68 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一类新的编码具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白的多核苷酸，及其编码的多肽，多肽的抗体。本发明还公开了这类新的多核苷酸在宿主细胞中外源表达诱导细胞凋亡的应用。本发明还公开了所述多肽、抗体在制备预防和治疗与人体细胞凋亡相关的疾病，尤其在开发如艾滋病、神经系统的退行性病变等自身免疫疾病和肿瘤的药物上的用途。

