



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103384680 B

(45) 授权公告日 2015.08.26

(21) 申请号 201180067656.X

(22) 申请日 2011.12.16

(30) 优先权数据

61/424,273 2010.12.17 US

61/488,353 2011.05.20 US

61/533,063 2011.09.09 US

61/537,940 2011.09.22 US

61/565,380 2011.11.30 US

61/565,849 2011.12.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.08.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2011/003265 2011.12.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/080844 EN 2012.06.21

(73) 专利权人 拜奥拉米那公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72) 发明人 卡尔·特吕格瓦松 谢尔盖·罗丁

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 丁业平 金小芳

(51) Int. Cl.

C07K 14/78(2006.01)

C12N 5/00(2006.01)

(56) 对比文件

Unger C et al..Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells.

《Human Reproduction》.2009,第24卷(第10期),2567-2581.

Unger C et al.,.Immortalized human skin fibroblast feeder cells support growth and maintenance of both human embryonic and induced pluripotent stem cells.

《Human Reproduction》.2009,第24卷(第10期),2567-2581.

Sergey Rodin et al..Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511.

《Nature Biotechnology》.2010,第28卷(第6期),611-615.

Levenstein mark et al..Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal.《Stem Cells》.2006,第24卷(第3期),568-574.

审查员 刘俊

权利要求书1页 说明书36页

序列表37页 附图13页

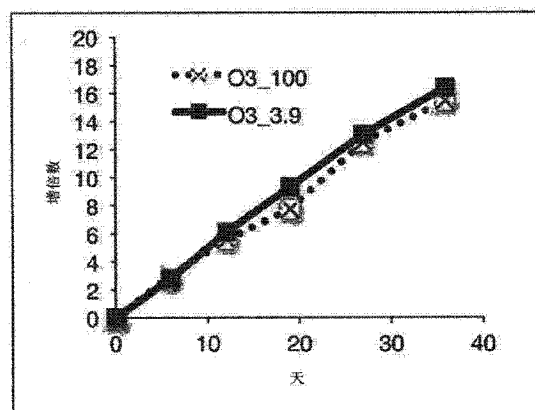
(54) 发明名称

细胞培养基

(57) 摘要

本公开涉及分离的层粘连蛋白-521、制备重组层粘连蛋白-521的方法、表达重组层粘连蛋白-521的宿主细胞、以及包含层粘连蛋白-521的组合物。层粘连蛋白-521能够保持干细胞在体外的多能性,允许自我更新,并使人胚胎干细胞能够单细胞存活。在被重组层粘连蛋白-521(层粘连蛋白-11)包被的平板中,当在分化抑制因子或饲养细胞不存在的条件下培养多能人胚胎干细胞时,胚胎干细胞增殖并保持它们的多能性。还发现人重组层粘连蛋白-521(层粘连蛋白-11)使得

干细胞在完全解离为单细胞悬液后能够单细胞存活。本文还公开了有用的细胞培养基,其包含至多3.9ng/ml的 β 成纤维细胞生长因子(bFGF)。



1. 一种用于保持多能干细胞的系统,包含:
细胞培养基,其含有 0.5ng/mL 至 3.5ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF);和
为所述干细胞提供支持的基底,其中所述基底包含层粘连蛋白 -521。
2. 根据权利要求 1 所述的系统,其中所述基底还包含钙粘蛋白。
3. 根据权利要求 1 所述的系统,其中所述细胞培养基还包含至少一种附加生长因子、
至少一种微量矿物质和至少一种脂类。
4. 根据权利要求 1 所述的系统,其中所述细胞培养基还包含至少一种微量矿物质。
5. 根据权利要求 1 所述的系统,其中所述细胞培养基还包含至少一种脂类。
6. 根据权利要求 1 所述的系统,其中所述细胞培养基还包含至少一种无机盐、至少一
种微量矿物质、至少一种能量物质、至少一种脂类、至少一种氨基酸和至少一种维生素。
7. 根据权利要求 1 所述的系统,其中所述细胞培养基不含以下物质中的任意一者:(1)
白蛋白,(2) 胰岛素或胰岛素替代物,或(3) 转铁蛋白或转铁蛋白替代物。
8. 根据权利要求 1 所述的系统,其中所述细胞培养基还包含白蛋白、胰岛素、氯化锂、
GABA、TGF β 1、哌啶酸、L- 谷氨酰胺、MEM 非必需氨基酸溶液、以及 DMEM/F12 溶液。
9. 根据权利要求 2 所述的系统,其中所述细胞培养基还包含至少一种附加生长因子、
至少一种微量矿物质和至少一种脂类。

细胞培养基

[0001] 背景

[0002] 本申请要求于 2010 年 12 月 17 日提交的美国临时专利申请序列 No. 61/424, 273、于 2011 年 5 月 20 日提交的美国临时专利申请序列 No. 61/488, 353、于 2011 年 9 月 9 日提交的美国临时专利申请序列 No. 61/533, 063、于 2011 年 9 月 22 日提交的美国临时专利申请序列 No. 61/537, 940、于 2011 年 11 月 30 日提交的美国临时专利申请序列 No. 61/565, 380、以及于 2011 年 12 月 1 日提交的美国临时专利申请序列 No. 61/565, 849 的优先权。这些临时申请的全部内容通过引用方式并入本文。

[0003] 本发明涉及细胞生物学、细胞分化、细胞治疗、分子生物学、蛋白质、人重组蛋白、核酸和层粘连蛋白。

[0004] 基底层(基底膜)为片状、与细胞相连的细胞外基质,其在细胞生长、细胞分化、细胞表型维持、组织发育和组织维持中起到核心作用。它们实际上存在于所有组织中,并且出现在胚胎发育的最早期阶段。

[0005] 基底层对各种构建功能和细胞间相互作用功能而言是重要的。例如:

[0006] 1. 它们作为组织的构建支持体,为细胞提供粘附基质。

[0007] 2. 它们在阻碍细胞迁移的组织隔室之间建立选择通透性屏障,并且被动调节大分子的交换。以肾小球基底膜作为例子来描述这些功能,肾小球基底膜起到重要的过滤结构的作用,其建立了有效的血-组织屏障,使得大多数蛋白质和细胞不能透过。

[0008] 3. 基底层建立了高度的相互作用表面,其能够在胚胎发育和创伤修复过程中促进细胞迁移和细胞铺展。在受伤后,它们提供了细胞依靠其再生以恢复正常组织功能的表面。

[0009] 4. 基底层将其结构中所编码的信息呈递给与其接触的、对细胞分化、细胞凋亡抑制和组织维持重要的细胞。该信息通过各种受体而传递给细胞,所述受体包括整联蛋白、肌营养不良蛋白聚糖和细胞表面蛋白聚糖。传递信号不仅依赖于基质配体和相应的受体(该基质配体和受体以足够的亲和力而相互作用)的存在,还依赖于地形因素,如三维基质“景观”中的配体密度,以及依赖于基底层组分聚集受体的能力。由于这些基质蛋白的寿命长,因此,基底层在基底层中为居住性(resident)细胞和暂留性(transient)细胞建立了“表面记忆”。

[0010] 基底层主要由层粘连蛋白和 IV 型胶原异三聚体构成,这些组分组织成复杂的聚合结构。其它组分包括诸如凝集素和基底膜蛋白聚糖等蛋白聚糖和巢蛋白(触觉蛋白)。目前,已经确认了六种类型的 IV 型胶原多肽链和至少 12 种层粘连蛋白亚基链。这些链具有共同的和独特的功能,并且按特定的时间(发育)和空间(组织位点特异性)模式表达。

[0011] 层粘连蛋白为主要存在于基底层中的异源三聚体糖蛋白家族。它们通过一侧与相邻的细胞受体进行结合而相互作用,并且与其他层粘连蛋白分子或其它基质蛋白(如胶原、巢蛋白、或蛋白聚糖)结合而发挥作用。层粘连蛋白分子也是重要的信号分子,其能够强烈地影响细胞的行为和功能。层粘连蛋白对于维持细胞/组织表型,以及在组织修复和发育中促进细胞生长和分化是重要的。

[0012] 层粘连蛋白是大的多结构域蛋白,其具有常见的结构组织。层粘连蛋白分子在一

个分子中集合了不同的基质和细胞相互作用的功能。

[0013] 层粘连蛋白分子包含一个 α 链亚基、一个 β 链亚基和一个 γ 链亚基,这些亚基通过卷曲螺旋结构域结合在一起成为三聚体。图 1 示出了所得到的层粘连蛋白分子的结构。在天然的组织中,12 种已知的层粘连蛋白亚基链能够形成至少 15 种三聚体层粘连蛋白类型。三聚体层粘连蛋白结构中具有对其它层粘连蛋白和基底层分子以及膜结合受体有结合活性的可识别结构域。图 2 分别示出了 3 种层粘连蛋白链亚基。例如,VI、IVb 和 IVa 结构域形成球状结构,V、IIIb 和 IIIa 结构域(其含有富含半胱氨酸的类 EGF 元件)形成棒状结构。三种链的 I 和 II 结构域参与形成三股卷曲螺旋结构(长臂)。

[0014] 已经发现存在于人组织中的五种不同的 α 链、三种 β 链和三种 γ 链具有至少 15 种不同的组合。基于它们的发现历史,这些分子被命名为层粘连蛋白-1 至层粘连蛋白-15,然而另一种命名法则是根据它们的链的组成来描述这些同种型,例如层粘连蛋白-111(层粘连蛋白-1),其包含 α -1 链、 β -1 链和 γ -1 链。已经确认了层粘连蛋白的四种结构确定的家族组。第一组的 5 种确认的层粘连蛋白分子均具有 β 1 链和 γ 1 链,它们的 α -链组成(α 1 至 α 5 链)有所不同。第二组的 5 种确认的层粘连蛋白分子(包括层粘连蛋白-521)均具有 β 2 链和 γ 1 链,它们的 α -链组成也有所不同。第三组确认的层粘连蛋白分子具有一个确认的成员(层粘连蛋白-332),其链组成为 α 3 β 3 γ 2。第四组确认的层粘连蛋白分子具有一个确认的成员(层粘连蛋白-213),其具有新鉴定的 γ 3 链(α 2 β 1 γ 3)。

[0015] 尚没有对分离的层粘连蛋白-521 的报道,其不含有其它层粘连蛋白链。到目前为止,对层粘连蛋白-521 的功能尚没有研究。利用层粘连蛋白链抗体通过亲和层析法从细胞源中纯化层粘连蛋白-521 的尝试在去除(例如)层粘连蛋白 β 1 链(其为层粘连蛋白-411 和层粘连蛋白-511 的成分)方面并不成功。提供含有层粘连蛋白-521 (aka LN-521)的组合物和制备层粘连蛋白-521 的方法是人们所希望的。

[0016] 人胚胎干细胞(hES)为针对各种疾病(如脊髓和心脏损伤、I 型糖尿病和诸如帕金森病等神经退行性疾病)的再生医学的发展带来了希望。干细胞是一种未分化的细胞,随后由该细胞衍生出特化细胞。胚胎干细胞具有广泛的自我更新能力,并且具有有分化成所有三种胚层的细胞的潜能的多能性。它们可用于治疗的目的,并且可为组织替代治疗、药物筛选、功能基因组学和蛋白质组学提供无限的细胞来源

[0017] 用于再生医学的由干细胞衍生的细胞的发育的前提条件包括:有一种能够长期培养多能干细胞的方法、一个化学成分确定且可重复的分化流程、以及一种不含异源物的细胞培养系统。然而,在多能人胚胎干细胞(hES 细胞)和诱导的多能干细胞(hiPS 细胞)的培养方面遇到了很多问题。一个主要的问题在于 hES 细胞缓慢地成簇生长,这需要人工分离以进行细胞增殖。细胞的解离通常导致大量细胞死亡,完全解离后,hES 细胞的克隆效率 $\leq 1\%$ 。

[0018] 多能 hES 细胞的维持需要复合培养基质(例如细胞外基质蛋白混合物,如鼠肿瘤来源的 Matrigel 或成纤维细胞饲养细胞层),其可能具有免疫原性和毒性,并且会产生大的批间差异从而降低实验的可靠性。到目前为止,用于 hES 细胞培养的最成功的不含饲养细胞的基质为 Matrigel,其为得自鼠 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)肉瘤肿瘤组织的肿瘤和 BM 类提取物复合物。Matrigel 主要包含鼠 LN-111、IV 型胶原、基底膜蛋白聚糖和巢蛋白,但也含有不同量的其它物质,包括生长因子和细胞蛋白,因此其组成不确定并且批次间

是不同的。这种差异会导致科学结果的不可再现性,并且由于基质是来源于动物的,使得 Matrigel 不能用于人类细胞治疗用 hES 细胞的扩增和维持。

[0019] 然而,近来已经报道成功研发了能够支持 hES 和 hiPS 细胞自我更新的大致确定的包被材料。已经报道了重组玻连蛋白可支持 hES 细胞的粘附和自我更新。还研发出了包含来自于各种 ECM 蛋白的各种多肽的丙烯酸酯包被物,并且已经表明合成的甲基丙烯酸酯类聚合物也有利于 hES 细胞的粘附和自我更新。

[0020] hES 细胞大规模繁殖的主要问题之一在于它们在解离为单细胞悬液后再接种的存活能力差。因此,这使得多次传代以及大规模自动化扩增变得不可能。然而,在 rho- 激酶 (ROCK) 抑制剂¹⁰或细胞收缩抑制剂(blebbistatin)¹¹的存在下使用胰蛋白酶进行处理而释放到单细胞悬液中的 hES 细胞能够被接种并由单克隆进行扩增,但是所述分子不是天然干细胞小生境(niche)的组分,并且它们会影响肌动蛋白细胞骨架,因此能够导致细胞的破坏。因此,对于用于细胞治疗目的 hES 细胞的长期扩增而言,使用 ROCK 抑制剂可能不是优选的方案。

[0021] 为了再生医学的目的,希望开发出这样的方法,在化学成分确定、不含异源物、不含病原体并且批次间稳定的条件下,其使得多能干细胞能够衍生和长期培养。此外,这样的方法应当允许快速且经济有效的扩大培养,从而在短期内获得大量的多能 hES/hiPS 细胞。优选的是,这些方法还应当允许人 ES 细胞在不含合成的细胞凋亡抑制剂的培养基中克隆存活,这将有涉及细胞分选或细胞内基因敲除的科学应用和临床应用。

发明内容

[0022] 本公开提供了分离的层粘连蛋白 -521 (还称为 LN-521 或层粘连蛋白 -11)以及制备分离的层粘连蛋白 -521 的方法。在进一步的方面,本公开提供了表达层粘连蛋白 -521 链并分泌重组层粘连蛋白 -521 的重组宿主细胞。

[0023] 在其它方面,本公开提供了 GMP 品质的层粘连蛋白 -521,其用于培养为了使细胞发育以进行人细胞治疗的目的而分化和维持的细胞。本公开还提供了药物组合物,其包含分离的层粘连蛋白 -521 以及可药用的载体。所述药物组合物可任选地与其它细胞外基质组分一起提供。

[0024] 本公开还提供了有效地产生一定量的用于各种应用的分离的层粘连蛋白 -521 的方法。在这些用途的优选实施方案中,使用了重组层粘连蛋白 -521。还公开了试剂盒,其包含一定量的能有效达到所需效果的分离的层粘连蛋白 -521、或其药物组合物,以及使用它们的说明书。

[0025] 本公开还提供了用于以单层培养物方式(有利于细胞同质性)培养干细胞的方法、在单细胞悬液中从细胞培养平板或其它细胞支持物上移除干细胞的方法、以及在单细胞悬液中重新接种干细胞以在显著稀释条件下进行传代和扩增从而使得干细胞培养物扩增并大规模生产该细胞的方法。

[0026] 在进一步的方面,本公开描述了以单层培养方式在层粘连蛋白 -521 上培养多能干细胞,在单细胞悬液中从细胞培养平板以及其它细胞支持材料上移除干细胞,并且将来自于单细胞悬液中的干细胞以单层细胞的方式接种在含有层粘连蛋白 -521 的基质上,以使得该工艺可以用自动化机器人系统高效进行。

[0027] 在进一步的方面,本公开提供了改进的医疗器件和植入物,其中所述改进包括提供具有有效量的分离的层粘连蛋白-521的医疗器件和植入物。

[0028] 在进一步的方面,本公开通过向细胞培养装置(用于细胞粘附和随后的细胞停留(stasis)、增殖、分化和/或迁移)提供有效量的分离的层粘连蛋白-521,提供了改进的细胞培养装置,以及制造改进的细胞培养装置的方法,以用于使培养中的细胞生长并保持表型。

[0029] 在其它方面,本公开提供了用于在体外培养未分化状态的人胚胎干细胞并使其快速扩增的组合物(例如人重组层粘连蛋白-521)和方法。该方法包括将人胚胎干细胞进行单细胞解离,以及在不含任何 Rho- 相关激酶(ROCK)抑制剂(例如不含 Y-27632)(参见文献“Watanabe et al., Nature Biotechnology 25, 681-686 (2007)”)的培养基中将它们接种在包被有层粘连蛋白-521的细胞培养皿上。与常规的人胚胎干细胞培养物相比,这种改进为人胚胎干细胞在多能状态下更快地扩增提供了可能性。

[0030] 在进一步的方面,本公开提供了新材料,例如人重组层粘连蛋白-521,其使得人胚胎细胞在解离为单细胞悬液后能够存活。这种改进使人胚胎干细胞的克隆存活力增强,这可能有利于分离克隆(例如在基因操作之后)或获得同质且均匀的人胚胎干细胞群。

[0031] 在一些实施方案中公开了分离的重组层粘连蛋白-521,该重组层粘连蛋白-521包含: α 链,其包含与多肽序列 SEQ ID NO:1 有至少 80% 一致性的多肽; β 链,其包含与多肽序列 SEQ ID NO:2 有至少 70% 一致性的多肽;以及 γ 链,其包含与多肽序列 SEQ ID NO:3 有至少 70% 一致性的多肽;其中所述 α 链、 β 链和 γ 链装配成重组层粘连蛋白-521。

[0032] 在进一步的实施方案中,所述 α 链多肽与所述多肽序列 SEQ ID NO:1 有至少 90% 的一致性。所述 β 链多肽也可以与所述多肽序列 SEQ ID NO:2 有至少 90% 的一致性。所述 γ 链多肽也可以与所述多肽序列 SEQ ID NO:3 有至少 90% 的一致性。

[0033] 在其它实施方案中,所述 α 链具有 SEQ ID NO:1 所示的多肽序列。此外,所述 β 链可具有 SEQ ID NO:2 所示的多肽序列。更具体而言,所述 γ 链可具有 SEQ ID NO:3 所示的多肽序列。

[0034] β 链多肽可具有与多肽序列 SEQ ID NO:2 至少 80% 的一致性。 γ 链多肽可具有与多肽序列 SEQ ID NO:3 至少 80% 的一致性。

[0035] 在实施方案中还公开了药物组合物,其包含:a) 权利要求 1 所述的分离的重组层粘连蛋白-521;和 b) 可药用的载体。

[0036] 在实施方案中还公开了能使在体外生长的多能干细胞自我更新(self renewal)的组合物,其包含生长介质和覆盖在其上的包被物,所述包被物包含重组层粘连蛋白 521(层粘连蛋白-11)。

[0037] 所述组合物还可包含生长因子。

[0038] 所述组合物可不含任何分化抑制剂。所述组合物还可不含任何饲养细胞。所述组合物还可不含任何分化诱导物。在一些实施方案中,所述组合物不含任何分化抑制剂、饲养细胞或分化诱导物。

[0039] 在实施方案中还公开了在体外保持多能干细胞的的多能性的方法,包括:提供基底,该基底包含生长介质和覆盖在其上的包被物,所述包被物包含重组层粘连蛋白 521(层粘连蛋白-11);使多能干细胞解离为单细胞悬液;以及将所述单细胞悬液中的多能干细胞接种

在所述包被物上。

[0040] 生长介质可包含一种生长因子或多种生长因子。示例性生长因子包括碱性成纤维细胞生长因子和胰岛素生长因子。

[0041] 有时,所述生长介质和所述包被物不含任何分化抑制剂。例如,不存在白血病抑制因子。

[0042] 所述组合物可不含任何饲养细胞,例如小鼠成纤维细胞或人包皮成纤维细胞。所述组合物可不含任何分化诱导物,如头蛋白或角质形成细胞生长因子。在一些实施方案中,所述组合物不含任何分化抑制剂、饲养细胞或分化诱导物。

[0043] 可以以单层将所述多能干细胞接种在层粘连蛋白-521包被物上。

[0044] 所述多能干细胞可以以 200 个细胞/mm²或更低的密度接种在所述包被物上。可供选择的是,所述多能干细胞可以以 200 个细胞/mm²或更高的密度接种在所述包被物上。可供选择的是,可以以任意两个干细胞彼此不接触的方式将所述多能干细胞接种在所述包被物上。

[0045] 实施方案中还公开了由以下方法制备的分离的层粘连蛋白-521,所述方法包括:提供表达重组层粘连蛋白-521的宿主细胞,其中所述重组层粘连蛋白-521包含:第一链,其包含与多肽序列 SEQ ID NO:1 有至少 80%一致性的多肽;第二链,其包含与多肽序列 SEQ ID NO:2 有至少 70%一致性的多肽;以及第三链,其包含与多肽序列 SEQ ID NO:3 有至少 70%一致性的多肽;其中所述第一链、第二链和第三链装配成重组层粘连蛋白-521。在刺激所述重组层粘连蛋白-521链表达的条件下,使所述宿主细胞在细胞培养基中生长;使宿主细胞培养基通过柱,其中所述柱包含能与所述重组层粘连蛋白-521结合的化合物;洗涤所述柱以除去未结合的物质;以及从所述柱上将所述结合的重组层粘连蛋白-521洗脱下来。

[0046] 在其它实施方案中描述了在体外保持多能干细胞的的多能性的方法,包括:取得其上具有包被物的基底,所述包被物包含完整的层粘连蛋白;将多能干细胞和细胞培养基置于所述基底上;以及激活 PI3- 激酶/Akt 通路。

[0047] 所述完整的层粘连蛋白可为层粘连蛋白-521或层粘连蛋白-511。在一些实施方案中,所述细胞培养基不含任何生长因子,如 β 成纤维细胞生长因子(bFGF)。所述包被物还可包含钙粘蛋白。所述多能干细胞可以以 200 个细胞/mm²或更低的密度接种在所述包被物上。

[0048] 本公开还涉及可以用于保持干细胞处于多能状态的细胞培养基。在不同的实施方案中描述了为多能干细胞提供营养的细胞培养基,其包含大于 0 至 3.9ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。

[0049] 所述细胞培养基可包含 3.5ng/mL 或更少的 bFGF,包括 0.5ng/mL 至 3.5ng/mL 的 bFGF。

[0050] 所述细胞培养基还可包含至少一种无机盐、至少一种微量矿物质(trace mineral)、至少一种能量物质、至少一种脂类、至少一种氨基酸、至少一种维生素或至少一种附加生长因子。在特定的实施方案中,所述细胞培养基还包含至少一种无机盐、至少一种微量矿物质、至少一种能量物质、至少一种脂类、至少一种氨基酸和至少一种维生素。

[0051] 所述细胞培养基可不含以下物质中的任意一者:(1) 白蛋白,(2) 胰岛素或胰岛素替代物,或(3) 转铁蛋白或转铁蛋白替代物。

[0052] 所述细胞培养基还可包含白蛋白、胰岛素、氯化锂、GABA、TGF β 1、哌啶酸、L- 谷氨酰胺、MEM 非必需氨基酸溶液和 DMEM/F12 溶液。

[0053] 所述细胞培养基还可包含至少一种附加生长因子、至少一种微量矿物质和至少一种脂类。

[0054] 还公开了一种保持多能干细胞的系统, 包含: 细胞培养基, 其含有大于 0 至 3.9ng/mL 的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF); 和为干细胞提供支持的基底。

[0055] 所述基底可包含层粘连蛋白 -521 或层粘连蛋白 -511。所述基底还可包含钙粘蛋白。

[0056] 下面将更详细地描述本公开的这些以及其它的非限定性特征。

附图说明

[0057] 本专利或申请文件包括至少一幅带有颜色的图。在提出请求并支付必要费用后, 官方将提供附有彩图的本专利或专利申请公开的副本。

[0058] 下面是附图的简要说明, 其目的在于说明本文所公开的示例性实施方案, 而不是为了对其进行限制的目的。

[0059] 图 1 为重组层粘连蛋白分子的旋转式投影电子显微镜照片。

[0060] 图 2 示出了层粘连蛋白 α 、 β 和 γ 链的结构基序。N 端、内部和 C 端的球状结构域用白色椭圆形表示。卷曲螺旋形成结构域(I 和 II) 用白色长方形表示。棒状结构(V、IIIb 和 IIIa 结构域) 用灰色长方形表示。

[0061] 图 3 示出了使用 SDS-PAGE 对人重组层粘连蛋白 -521 进行鉴定的结果。在非还原(标记为 ox) 和还原(标记为 red) 条件下进行重组层粘连蛋白 -521 的免疫印迹。将 3-8% 凝胶中的蛋白质转印至 PVDF 膜上, 然后用抗层粘连蛋白 α 5 (2F7)、 β 2 (MAB2066)、 β 1 (MAB1921) 和 γ 1 (H-19) 的抗体进行染色。

[0062] 图 4 和图 5 示出了对培养 1 天后粘附至包被有以下物质的培养皿中的人 ES 细胞的结晶紫染色结果, 所述物质为 Matrigel (Mg)、鼠层粘连蛋白 -111 (mLN111)、人重组 - 层粘连蛋白 -511 (r- 层粘连蛋白 -511 或 r-LN-511)、人重组 - 层粘连蛋白 -521 (r- 层粘连蛋白 -521 或 r-LN-521)、或 r- 层粘连蛋白 -511 和 r- 层粘连蛋白 -521 的混合物(mix)。在图 4 中, 在不存在 ROCK 抑制剂的条件下培养所述细胞。在图 5 中, 在存在 ROCK 抑制剂 Y-27632 的条件下培养所述细胞。

[0063] 图 6 为示出在不存在 ROCK 抑制剂下培养 1 小时后, 人 ES 细胞对包被有人 r- 层粘连蛋白 -521 (记为 LN521)、人 r- 层粘连蛋白 -511 (LN511) 和 Matrigel (Mg) 的培养皿的粘附的图。误差线示出了测量的标准误差(n=3)。

[0064] 图 7 为示出在不存在 ROCK 抑制剂下培养 1 天后, 人 ES 细胞对包被有 Matrigel (Mg)、鼠层粘连蛋白 -111(mLN111)、人 r- 层粘连蛋白 -511(LN511)、人 r- 层粘连蛋白 -521 (LN521)、或 r- 层粘连蛋白 -511 和 r- 层粘连蛋白 -521 的混合物(mix) 的培养皿的粘附的图。还包括在培养 1 天后, 对具有 ROCK 抑制剂和 Matrigel (In&Mg)、鼠层粘连蛋白 -111 (In&mLN111)、人 r- 层粘连蛋白 -511 (In&LN511)、人 r- 层粘连蛋白 -521 (In&LN521)、或 r- 层粘连蛋白 -511 和 r- 层粘连蛋白 -521 的混合物(In&mix) 的培养皿的结果。对于这两个实验, 将细胞以相同密度接种在相同的细胞培养皿上。误差线示出了测量的标准误差

(n=3)。

[0065] 图 8 示出采用单细胞解离传代的培养在 r- 层粘连蛋白 -521 (LN-521_1 和 LN-521_2) 上的人 ES 细胞的生长曲线, 以及采用小簇传代的培养在 Matrigel (Mg_1 和 Mg_2) 上的人 ES 细胞的生长曲线。后一种情况按照文献“Rodin et al., Nature Biotechnol., vol. 28, pp. 611-615 (2010)”所述对细胞进行传代。

[0066] 图 9 为在 r- 层粘连蛋白 -521 上进行几次单细胞解离传代后, 检测人 ES 细胞的 OCT4 (多能性标志物) 的 FACS 分析。阳性细胞的百分比列在括号中。

[0067] 图 10 为在 Matrigel 上采用以分开的小簇的方式传代几次后, 检测人 ES 细胞的 OCT4 的 FACS 分析。阳性细胞的百分比列在括号中。

[0068] 图 11 示出了实时定量 RT-PCR 分析的结果, 其用于比较培养在人 r- 层粘连蛋白 -521 (LN521) 上的进行了几次单细胞解离传代后的人 ES 细胞中, 以及培养在 Matrigel 上的进行了小簇传代几次后的细胞中的多能性标志物 Oct4 和 Nanog 的 mRNA 转录本的数目。误差线示出了 95% 置信区间。

[0069] 图 12 为比较接种在 Matrigel (Mg)、LN-111、LN-511 和 LN-521 上, 生长了 1 小时的干细胞中的磷酸化肌球蛋白轻链(P-MLC) 的水平的蛋白质印迹(Western blot) 图。

[0070] 图 13 为比较接种在 Matrigel (Mg)、LN-111、LN-511 和 LN-521 上, 生长了 6 小时的干细胞中的磷酸化肌球蛋白轻链(P-MLC) 的水平的蛋白质印迹图。

[0071] 图 14 为比较接种在 Matrigel (Mg)、LN-111、LN-511 和 LN-521 上, 生长了 5 至 7 小时的人胚胎干细胞的相对迁移量的图。

[0072] 图 15 为比较施加了 IgG 和 IgM 封闭抗体(IgGM)和施加了抗整联蛋白 $\beta 1$ (b1) 的功能性封闭抗体, 生长在 LN-521 上的人胚胎干细胞的相对迁移量的图。这表明封闭整联蛋白极大地降低了运动性。

[0073] 图 16 为比较在水、DMSO、LY294002 (Akt 抑制剂)、渥曼青霉素(PI3K/Akt 抑制剂)和 PD98059 (MEK1 抑制剂)的存在下, hES 细胞在 LN-521 上的相对存活率的图。这表明 PI3K/Akt 的激活是 hES 细胞在 LN-521 上存活所必要的。培养基中包含 bFGF。

[0074] 图 17 为比较在 DMSO、LY294002 (Akt 抑制剂)和 PD98059 (MEK1 抑制剂)的存在下, hES 细胞在 LN-521 上的相对存活率的图。不存在外源性 bFGF。

[0075] 图 18 为接种在 LN-521 上 1 小时后收集并用 LY294002 处理的细胞与对照细胞(DMSO) 比较的蛋白质印迹。

[0076] 图 19 为接种在 LN-521 上 1 小时后收集并用 PD98059 处理的细胞与对照细胞(DMSO) 比较的蛋白质印迹。

[0077] 图 20 为示出采用 ELISA 获得的, 接种在 Matrigel(Mg)、LN-111、LN-511 或 LN-521 上 1 小时后收集的细胞的裂解物中的 Akt2 磷酸化的相对水平的图。

[0078] 图 21 为示出采用 ELISA 获得的, 接种在 Matrigel(Mg)、LN-111、LN-511 或 LN-521 上 1 小时后收集的细胞的裂解物中的 Akt1 磷酸化的相对水平的图。

[0079] 图 22 为示出培养在低 bFGF 培养基(03_3.9)中的 HS181hES 细胞相比于培养在较高 bFGFF 培养基(03_100)中的 HS181hES 细胞的生长曲线的图。

[0080] 图 23 为示出培养在低 bFGF 培养基(03_3.9)中的 HS181hES 细胞相比于培养在较高 bFGFF 培养基(03_100)中的 HS181hES 细胞中的两种多能性标志物(Oct4 和 Nanog) 的

RNA 表达的相对水平的图。

[0081] 图 24 为示出新的人胚胎干细胞系 HS841 在层粘连蛋白 -521/E- 钙粘蛋白基质上的早期分化的照片。

具体实施方式

[0082] 结合附图,可对本文所述的组合物和方法有更完整的理解。为了方便且易于理解本发明,这些图仅为示意性代表图,因此它们的意图不在于定义或限制示例性实施方案的范围。

[0083] 尽管为了清楚的目的,在下文中使用了专用术语,但这些术语旨在仅用于表示被选择用来说明附图的实施方案的特定结构,并且不意味着定义或限制本公开的范围。在附图和下文中,应当理解相似的数字标记表示具有类似功能的组分。

[0084] 本文所述所有的出版物、专利和专利申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0085] 除非另有说明,本申请所用的技术可参见几个公知参考文献中的任何一篇,如:Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook et al.,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol.185,edited by D.Goeddel,1991,Academic Press,San Diego,Calif.)、"Guide to Protein Purification" in Methods in Enzymology (M.P.Deutschcer,ed.,(1990) Academic Press,Inc.) ;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications (Innis et al.,1990.Academic Press,San Diego,Calif.)、Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,Second Ed. (R. I.Freshney.1987.Liss, Inc.New York,N. Y.)、Gene Transfer and Expression Protocols,pp.109-128,ed.E. J.Murray, The Humana Press Inc.,Clifton,N. J.)、或者 Ambion1998Catalog (Ambion,Austin,Tex.)。

[0086] 本文所用的术语“分离的核酸序列”是指不含在该核酸所来源的有机体的基因组 DNA 中与该核酸为天然侧翼序列的基因序列(即,在该核酸所来源的有机体的基因组 DNA 中与该所分离的核酸分子的基因相邻的遗传序列)的核酸序列。然而,所述“分离的”序列可连接至与所述序列不为天然侧翼序列的其它核苷酸序列,例如异源启动子序列或其它载体序列。对所分离的核酸序列而言,不必认为其必须不含其它细胞物质才是“分离的”,因为本公开的核酸序列可以是用于转染宿主细胞的表达载体的一部分(见下文)。

[0087] 本公开提供了重组表达载体,其包含人层粘连蛋白 $\beta 2$ 链的全长层粘连蛋白 $\beta 2$ 链核酸序列(SEQ ID NO:4)。在一些实施方案中,该表达载体含有由 SEQ ID NO:4 编码的核酸,其被有效连接(operatively linked)至异源启动子(即,不是给定层粘连蛋白 $\beta 2$ 链的天然存在的启动子)上。当启动子能够启动层粘连蛋白 $\beta 2$ 链 DNA 表达为 RNA 时,该启动子和层粘连蛋白 $\beta 2$ 链核酸序列即被“有效连接”。

[0088] 本文所用的术语“载体”是指能够运载其所连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体为“质粒”,其是指能够克隆其中的另外的 DNA 片段的环状双链 DNA。另一种类型的载体为病毒载体,其中另外的 DNA 片段可被克隆至病毒基因组。某些载体能够自动在它们被引入的宿主细胞中复制(如具有细菌的复制起点的细菌载体、和哺乳动物游离型载体)。其它载体(如哺乳动物非游离型载体)在被引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而随着宿主基因组进行复制。此外,某些载体能够指导其有效连接的基因的表达。在本文

中这样的载体称为“重组表达载体”或简称为“表达载体”。在本公开中,通过将本发明的启动子序列有效连接至待表达的基因,本发明的启动子序列可指导层粘连蛋白多肽序列的表达。一般来讲,重组 DNA 技术中所用的表达载体通常为质粒的形式。由于质粒是最常用的载体形式,因此在本说明书中“质粒”和“载体”可以互换使用。然而,本公开意欲包括表达载体的其它形式,例如起到同等功能的病毒载体(如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

[0089] 载体还可包含其它的序列,如用于亚克隆其它核酸序列的多位点接头、或使转录本进行合适的多腺苷酸化的多腺苷酸化信号。我们认为,多腺苷酸化信号的本性不是成功实现本发明的方法的关键,并且可采用任何这样的序列,包括但不限于 SV40 和牛生长激素 poly-A 位点。预期所述载体还可以包含的元件为终止序列,其能够用于提高信息水平并使从构建体到其它序列的通读最小化。另外,表达载体通常具有选择性标记,其通常为抗生素抗性基因的形式,从而能够使携带这些载体的细胞被筛选出来。

[0090] 在另一实施方案中,本公开提供了被表达层粘连蛋白 $\beta 2$ 链的重组表达载体转染的宿主细胞。本文所用的术语“宿主细胞”是指已经引入了本公开的核酸(如重组表达载体)的细胞。该细胞可以为原核细胞,其可用于例如快速产生大量的本公开的表达载体,或者可以为真核细胞以用于功能性研究。

[0091] 在本文中术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”可以互换使用。应当理解这些术语不仅仅指特定的受试细胞,还指该细胞的子代细胞或是潜在的子代细胞。由于变异或受到环境影响,传代时可能发生一定的改变,因此实际上这样的子代可能不会与母代细胞完全相同,但它们仍然包括在本文所用的术语的范围中。

[0092] 可以用本公开的一种或多种表达载体瞬时或稳定地转染宿主细胞。将表达载体转染入原核或真核细胞可以通过本领域已知的任意技术实现,所述技术包括但不限于:标准细菌转化、磷酸钙共沉淀、电穿孔、或脂质体介导的-、DEAE 葡聚糖介导的-、聚阳离子介导的-、或病毒介导的转染。(参见(例如)文献“Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Sambrook et al.,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press”;“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,2nd Ed.(R. I. Freshney.1987.Liss, Inc. New York, N. Y.)”)。

[0093] 另一方面,本公开提供了由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列构成的分离的全长人层粘连蛋白 $\beta 2$ 链多肽。

[0094] 本文所用的“分离的多肽”是指基本上不含其它蛋白质(包括其它层粘连蛋白链)和凝胶试剂(如聚丙烯酰胺和琼脂糖)的多肽。在优选的实施方案中,分离的层粘连蛋白多肽不含可检测到的污染层粘连蛋白链。因此,所述蛋白可以是天然来源分离的,或者是从上述转染的宿主细胞中分离的重组蛋白。

[0095] 在另一方面,本公开提供了分离的层粘连蛋白-521。本文所用的术语“层粘连蛋白-521”是指由 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链结合在一起而形成的蛋白质。该术语应当被理解为既包括重组层粘连蛋白-521,也包括天然来源的异三聚体层粘连蛋白-521。在优选的实施方案中,层粘连蛋白-521 包括重组层粘连蛋白-521(或“r-层粘连蛋白-521”)。

[0096] 本文所用的术语“r-层粘连蛋白-521”是指重组异三聚体层粘连蛋白-521,其由已经转染了一种或多种表达载体的宿主细胞表达,所述表达载体含有至少一种编码选自

$\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链的层粘连蛋白 -521 链的核酸序列；或者是指该重组异三聚体层粘连蛋白 -521 的加工或分泌形式。因此，所述 r- 层粘连蛋白 -521 可包含来自同一个有机体或不同有机体的 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 序列。各种层粘连蛋白 -521 链 DNA 序列是本领域已知的，并且预期可以使用任意这样的序列来制备本公开所述的 r- 层粘连蛋白 -521。（参见，例如“Pouliot, N. et al., *Experimental Cell Research* 261(2):360-71, (2000)”；“Kikkawa, Y. et al., *Journal of Cell Science* 113(Pt5):869-76, (2000)”；“Church, H. J. et al., *Biochemical Journal* 332(Pt2):491-8, (1998)”；“Sorokin, L. M. et al., *Developmental Biology* 189(2):285-300, (1997)”；“Miner, J. H. et al., *Journal of Biological Chemistry* 270(48):28523-6, (1995)”；“Sorokin, L. et al., *European Journal of Biochemistry* 223(2):603-10, (1994)”。在优选的实施方案中，r- 层粘连蛋白 -521 由重组人 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 多肽链形成。

[0097] 本公开包括这样的层粘连蛋白分子，其中重组异三聚体层粘连蛋白 -521 中的仅一条链或两条链是由内源性层粘连蛋白 -521 链编码的。在优选的实施方案中， $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 多肽链均为重组表达的。

[0098] 层粘连蛋白 -521 是完整的蛋白质。术语“完整的”是指该蛋白质由 α -链、 β -链和 γ -链的所有结构域构成，并且所述 3 条链结合在一起形成异三聚体结构。该蛋白质没有被拆成独立的链、片段或功能结构域。术语“链”是指层粘连蛋白的 α 、 β 或 γ 链的整体。术语“片段”是指包含一个、两个或三个具有与另一分子或受体的结合活性的功能性结构域的任何蛋白质片段。然而，链不应当被理解为片段，因为每条链都具有多于 3 个的这样的结构域。相似地，完整的层粘连蛋白不应当被理解为片段。功能性结构域的例子包括结构域 I、II、III、IV、V、VI 和 G 结构域。

[0099] 层粘连蛋白 -521 是分泌型蛋白，其能由信号序列被引导至内质网(ER)、分泌小泡和细胞外间隙。如果分泌型蛋白被释放到细胞外间隙，那么该分泌型蛋白能够经过细胞外加工而成为“成熟的”蛋白质。所述加工的情况可以不同，因此可以产生不同形式的最终的“成熟蛋白质”。例如，各蛋白的 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链的长度可以不同。然而，虽然链的长度不同，但最终的成熟蛋白质仍然具有相同的功能。本公开的分离的层粘连蛋白 -521 包括含有全长多肽链的异三聚体，也包括任何经所述天然加工的层粘连蛋白 -521 多肽链。

[0100] 如本文所用，层粘连蛋白 -521 多肽链是指以下一种或多种多肽链：

[0101] (a) 包含选自由 R1-R2-R3、R1-R2-R4、R3、R4、R1-R3、R1-R4、R2-R3 和 R2-R4 组成的组中的多肽结构的多肽链，其中 R1 为氨基末端甲硫氨酸；R2 为能引导多肽分泌的信号序列，其中该信号序列可以为针对特定的层粘连蛋白链的天然信号序列、或者是另一种分泌型蛋白的信号序列、或者是人工序列；R3 为分泌型的层粘连蛋白链，其选自由 $\alpha 5$ 链、 $\beta 2$ 链和 $\gamma 1$ 链组成的组中；并且 R4 为还包含附加表位(如下文所述的那些)的分泌型的 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 或 $\gamma 1$ 层粘连蛋白链，所述附加表位可位于所述层粘连蛋白链氨基酸序列的任意位置；或

[0102] (b) 由在高或低严格条件下与本文公开的一种或多种重组层粘连蛋白 -521 链 DNA 序列(SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6)的编码区或编码区的一部分杂交或者与它们的互补序列杂交的多核苷酸编码的多肽链；或

[0103] (c) 与本文所公开的一种或多种层粘连蛋白 -521 多肽链氨基酸序列(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3)有至少 70% 一致性的多肽链，优选有至少 80% 的一致性，

最优选有至少约 90% 的一致性。

[0104] 本文所用的杂交“严格度”或“严格条件”是指核酸杂交体的洗涤条件,在该条件下被洗涤时该核酸杂交体是稳定的。本公开还包括在高严格条件下(如本文中所定义)与本文所公开的层粘连蛋白链多核苷酸的编码序列的全部或部分杂交或者与它们的互补序列杂交的核酸。该杂交核酸的杂交部分的长度通常为至少 50 个核苷酸。如本领域普通技术人员已知的,杂交体的稳定性由该杂交体的解链温度(T_m)反映。序列同源性每降低 1%, T_m 降低约 1°C 至 1.5°C。通常,杂交体的稳定性是钠离子浓度和温度的函数。通常,杂交反应在严格度较低的条件下进行,然后在不同且较高的严格度下洗涤。如本文所用,高严格度是指在以下溶液中在 42°C 下孵育过夜,然后将滤膜在约 65°C 下在 0.1×SSC 中洗涤,所述溶液包含 50% 甲酰胺、5×SSC(750mM NaCl、75mM 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠(pH7.6)、5× 邓哈特溶液(Denhardt's solution)、10% 硫酸葡聚糖和 20 μg/ml 变性的、切断的鲑鱼精子 DNA。

[0105] 本发明还包括在严格度较低的杂交条件下与本公开的多核苷酸杂交的编码层粘连蛋白-521 的核酸序列。改变杂交的严格度以及检测信号主要通过控制甲酰胺的浓度(甲酰胺的百分比较低导致严格度较低)、盐浓度或温度来完成。例如,低严格条件包括在以下溶液中在 37°C 下孵育过夜,然后在 50°C 下用 1×SSPE、0.1%SDS 洗涤,所述溶液包含 6×SSPE (20×SSPE=3M NaCl;0.2M NaH_2PO_4 ;0.02M EDTA, pH7.4)、0.5%SDS、30% 甲酰胺、100 μg/ml 鲑鱼精子封闭 DNA。此外,为了达到更低的严格度,严格杂交后进行的洗涤可以在更高的盐浓度(如 5×SSC)下完成。

[0106] 请注意,上述条件的改变可以通过引入和/或替换可选的封闭试剂来完成,所述封闭试剂用于抑制杂交实验的背景信号。典型的封闭试剂包括邓哈特试剂(Denhardt's reagent)、BLOTTO、肝素、变性鲑鱼精子 DNA、以及市售的专用制剂。由于相容性的问题,可能需要对上述杂交条件进行改变来包含具体的封闭试剂。

[0107] 如本文所用,两种氨基酸或两种核酸的“一致性”百分比是采用由 Karlin 和 Altschul 提出(参见“Proc. Natl. Acad. Sci. USA87:2264, 2268, 1990”)并由 Karlin 和 Altschul 改进(参见“Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:5873-5877, 1993”)的算法确定的。该算法被并入 Altschul 等(参见“J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990”)的 NBLAST 和 XBLAST 程序中。BLAST 核苷酸搜索利用 NBLAST 程序进行,设定分值为 100,词长=12,从而确定核苷酸序列与本公开核酸分子的一致性。BLAST 蛋白搜索是用 XBLAST 程序进行的,设定分值=50,词长=3,从而确定氨基酸序列与本公开多肽的一致性。为了获得空位比对(gapped alignment)结果以进行比较,按照 Altschul 等(参见“Nucleic Acids. Res. 25:3389-3402, 1997”)所述使用 Gapped BLAST。当使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时,使用相应程序(如 XBLAST 和 NBLAST)的缺省参数。

[0108] 本公开的进一步的实施方案包括编码层粘连蛋白-521 链多肽的多核苷酸,所述层粘连蛋白-521 链多肽与包含在 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 中的一种或多种多肽序列有至少 70% 的一致性,优选至少 80% 的一致性,最优选至少 90% 的一致性。

[0109] 如本文所用,“α5 多核苷酸”是指编码层粘连蛋白 α5 链的多核苷酸。该多核苷酸可以由以下一者或多者表征:(a)编码与选自 SEQ ID NO:5 的序列有至少 70% 一致性、优选 80% 一致性、最优选至少 90% 一致性的多肽的多核苷酸;(b)在低或高严格条件下与 SEQ ID NO:5 的编码序列或其互补序列杂交的多核苷酸;或(c)编码具有选自由 R1-R2-R3、

R1-R2-R4、R3、R4、R1-R3、R1-R4、R2-R3 和 R2-R4 组成的组中的通用结构的层粘连蛋白 $\alpha 5$ 链多肽的多核苷酸,其中 R1 和 R2 如上所述,R3 为分泌型的 $\alpha 5$ 链,R4 为含有附加表位的分泌型的 $\alpha 5$ 链。

[0110] 如本文所用,“ $\beta 2$ 多核苷酸”是指编码同名的 $\beta 2$ 层粘连蛋白链的多核苷酸。该多核苷酸可以由以下一者或多者表征:(a)编码与 SEQ ID NO:4 的序列有至少 70% 一致性、优选至少 80% 一致性、最优选至少 90% 一致性的多肽的多核苷酸;(b)在低或高严格条件下与 SEQ ID NO:4 的编码序列或其互补序列杂交的多核苷酸;或(c)编码具有选自 R1-R2-R3、R1-R2-R4、R3、R4、R1-R3、R1-R4、R2-R3 和 R2-R4 中的通用结构的多肽的多核苷酸,其中 R1 和 R2 如上所述,R3 为分泌型的 $\beta 2$ 链,R4 为含有附加表位的分泌型的 $\beta 2$ 链。

[0111] 如本文所用,“ $\gamma 1$ 多核苷酸”是指编码同名的 $\gamma 1$ 层粘连蛋白链的多核苷酸。该多核苷酸可以由以下一者或多者表征:(a)编码与 SEQ ID NO:6 的序列具有至少 70% 一致性、优选至少 80% 一致性、最优选至少 90% 一致性的多肽的多核苷酸;(b)在低或高严格条件下与 SEQ ID NO:6 的编码序列或其互补序列杂交的多核苷酸;或(c)编码具有选自 R1-R2-R3、R1-R2-R4、R3、R4、R1-R3、R1-R4、R2-R3 和 R2-R4 中的通用结构的多肽的多核苷酸,其中 R1 和 R2 如上所述,R3 为分泌型的 $\gamma 1$ 链,R4 为含有附加表位的分泌型的 $\gamma 1$ 链。

[0112] 本文所用的术语“附加表位”是指作为嵌合蛋白的一部分被表达的多肽序列,其中该附加表位为用于与针对该附加表位而产生的抗体结合的识别位点,或者为用于与其它分子结合的识别位点,所述其它分子可以用于亲和纯化含有该表位的序列。

[0113] 在优选的实施方案中,将编码层粘连蛋白 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链、或它们的片段的 cDNA 亚克隆至表达载体中。可供选择的是,可以使用包含一个或多个内含子的层粘连蛋白 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 / 或 $\gamma 1$ 基因序列,将它们亚克隆至表达载体中。

[0114] 在其它方面,本公开提供了表达层粘连蛋白 -521 的细胞,该细胞已被包含与核酸序列有效连接的启动子序列的表达载体转染,所述核酸序列编码至少一种包含选自由层粘连蛋白 -521 的 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链组成的组中的序列的多肽序列,其中所述转染的细胞能分泌含有重组层粘连蛋白链的异三聚体层粘连蛋白 -521。在优选的实施方案中,该细胞被包含与核酸序列有效连接的启动子序列的多个重组表达载体系统地转染,所述核酸序列编码包含层粘连蛋白 -521 的 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链(它们更优选均为人类来源的链)的多肽序列。多重转染后,该细胞表达重组层粘连蛋白 -521 链,其然后形成异三聚体 r- 层粘连蛋白 -521。

[0115] 将表达载体转染到真核细胞中可通过本领域已知的任意技术完成,所述技术包括但不限于:磷酸钙共沉淀、电穿孔、或脂质体介导的 -、DEAE 葡聚糖介导的 -、聚阳离子介导的 -、或病毒介导的转染。细菌细胞的转染可通过标准方法完成。

[0116] 在优选的实施方案中,细胞被稳定转染。稳定转染的方法以及选择已被合适转染的细胞的方法是本领域已知的。在其它优选的实施方案中,在人胚肾 293 细胞系中使用 CMV 启动子驱动的表达载体。

[0117] 可以使用能表达和分泌 r- 层粘连蛋白 -521 的任意细胞。优选地,使用真核细胞,并且最优选地使用哺乳动物细胞,其包括但不限于肾和上皮细胞系。用于驱动单个的链或 r- 层粘连蛋白 -521 的表达的启动子序列可以是组成型的(由各种启动子中的任意启动子启动,包括但不限于 CMV、SV40、RSV、肌动蛋白、EF)或诱导型的(由各种可诱导的启动子中的任意启动子启动,包括但不限于四环素、蜕皮激素、类固醇应答性的启动子)。认为糖类和

二硫化物翻译后修饰是层粘连蛋白-521 折叠和发挥功能所必需的。这使得优选使用真核细胞来制备功能性 r- 层粘连蛋白-521, 尽管其它体系有利于获得(例如)用于生产抗体的抗原。在最优选的实施方案中, 哺乳动物细胞不会内源性表达层粘连蛋白 $\beta 2$ 链。在其它优选的实施方案中, 细胞不会内源性表达所有层粘连蛋白-521 链。

[0118] 所述蛋白可包含有利于促进蛋白质纯化的附加序列, 例如附加表位和转运信号。所述附加表位的例子包括但不限于 FLAG (Sigma Chemical 公司, 圣路易斯, 密苏里州)、myc (9E10) (Invitrogen 公司, 卡尔斯班, 加利福尼亚州)、6-His (Invitrogen 公司; Novagen 公司, 麦迪逊, 威斯康星州)、和 HA (Boehringer Mannheim Biochemicals 公司)。所述转运信号的例子包括但不限于输出信号、分泌信号、核定位信号和质膜定位信号。

[0119] 在一些实施方案中, 至少一种层粘连蛋白链多肽序列或其片段被有效与编码“附加表位”的核酸序列连接, 从而至少一种所述链被表达为具有所表达的附加表位的融合蛋白。附加表位可以表达作为氨基末端、羧基末端、或位于含有 r- 层粘连蛋白-521 的任意多肽链的内部, 只要所得 r- 层粘连蛋白-521 仍然具有功能性即可。

[0120] 在其它实施方案中, r- 层粘连蛋白-521 链中的一种被表达为具有第一附加表位的融合蛋白, 并且至少另一种 r- 层粘连蛋白链被表达为具有不同的第二附加表位的融合蛋白。这允许进行多次纯化。可供选择的是, 可以将相同的附加表位用于制备具有多于一种 r- 层粘连蛋白链的融合蛋白。

[0121] 在进一步的实施方案中, 可以将附加表位设计为可从 r- 层粘连蛋白-521 链上切除。可供选择的是, 没有附加表位与任何 r- 层粘连蛋白-521 链融合, r- 层粘连蛋白-521 通过标准技术分离, 所述技术包括但不限于使用层粘连蛋白-521 特异性抗体或其它的层粘连蛋白-521 结合性分子的亲和层析。

[0122] 首先通过蛋白质印迹(Western blot)法, 利用层粘连蛋白链特异性抗体对被单一层粘连蛋白链转染的细胞的培养基进行分析。转染后通常在细胞内表达单一层粘连蛋白链。通过任意适当的方法检测显示出对单一一种所转染的链有反应性的克隆, 从而确定引入了所转染的基因, 所述方法例如 PCR、逆转录 PCR、或核酸杂交。优选的是, 通过 PCR, 利用层粘连蛋白链特异性引物对由所述克隆制备的基因组 DNA 进行分析。通过任意合适的方法(包括蛋白质印迹分析和细胞结合检验)对产生所有三种链的转染克隆的培养基进行进一步分析, 从而分析 r- 层粘连蛋白-521 的分泌和 / 或活性。

[0123] 在优选的实施方案中, 通过使转染细胞的培养基通过抗体亲和柱来完成 r- 层粘连蛋白-521 的纯化。在一些实施方案中, 将针对在至少一种重组链上表达的多肽表位的抗体连接至亲和柱, 该抗体会与分泌到培养基中的 r- 层粘连蛋白-521 结合。通过使过量的多肽流过柱子来从柱子上除去 r- 层粘连蛋白-521。利用任意合适的方法分析洗脱部分, 所述方法包括凝胶电泳和蛋白质印迹分析。在另一实施方案中, 纯化后可切除多肽表位。在其它实施方案中, 两种或三种独立的 r- 层粘连蛋白链被表达为融合蛋白, 每种均具有不同的附加表位, 从而允许两次或三次纯化以及双重或三重分离的 r- 层粘连蛋白-521。可以设计附加表位, 使得纯化后附加表位可以从 r- 层粘连蛋白-521 链上切除。可供选择的是, 没有附加表位与任何 r- 层粘连蛋白-521 链融合, r- 层粘连蛋白-521 通过标准技术分离, 所述技术包括但不限于使用层粘连蛋白-521 特异性抗体或其它的层粘连蛋白-521 结合性分子的亲和层析。

[0124] 在其它实施方案中,通过使转染细胞的培养基通过凝胶过滤层析柱来完成 r- 层粘连蛋白 -521 的纯化。通过任意合适的方法分析洗脱部分,所述方法包括凝胶电泳和蛋白质印迹分析。收集含有 r- 层粘连蛋白 -521 的部分并通过任意合适的方法评价样品的纯度,所述方法包括凝胶电泳和蛋白质印迹分析。在一些实施方案中,可以使蛋白质溶液再次通过凝胶过滤层析柱以获得更高纯度的蛋白质。在一些实施方案中,为了使 r- 层粘连蛋白 -521 溶液达到更高的纯度,可以使经前述纯化步骤获得的培养基或 r- 层粘连蛋白 -521 溶液通过离子交换柱。通过任意合适的方法分析洗脱部分,所述方法包括凝胶电泳和蛋白质印迹分析。收集含有 r- 层粘连蛋白 -521 的部分并通过任意合适的方法(包括上述方法)评价样品的纯度。

[0125] 本公开的层粘连蛋白 -521 多肽链还包括:(i) 一个或多个非保守性氨基酸残基的替换,其中替换的氨基酸残基可以由或不由遗传密码编码,或(ii) 一个或多个具有取代基的氨基酸残基的替换,或(iii) 成熟多肽与另一种化合物的融合,所述化合物为,例如,能增加多肽的稳定性和 / 或可溶性的化合物(例如聚乙二醇),或(iv) 多肽与其它氨基酸的融合,例如 IgG Fc 融合区肽段、或导向或分泌序列、或利于纯化的序列。本领域技术人员根据本发明的教导能够理解该变体多肽在本发明的范围之内。

[0126] 例如,包含将带电氨基酸替换为其它带电或中性氨基酸的多肽变体可以产生具有改善的特征(例如减少聚集)的蛋白质。由于聚集体的免疫活性,药物配制物的聚集会降低活性并提高清除率(参见文献:“Pinckard et al., Clin. Exp. Immunol. 2:331-340(1967)” ; “Robbins et al., Diabetes 36:838-845(1987)” ; “Cleland et al., Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377(1993)”)。

[0127] 在特定的实施方案中,分离的层粘连蛋白 -521 包含 3 条链。第一链包含与多肽序列 SEQ ID NO:1 (即 α 5 层粘连蛋白链) 有至少 80% 一致性的多肽。第二链包含与多肽序列 SEQ ID NO:2 (即 β 2 层粘连蛋白链) 有至少 70% 一致性的多肽。第三链包含与多肽序列 SEQ ID NO:3 (即 γ 1 层粘连蛋白链) 有至少 70% 一致性的多肽。这些第一链、第二链和第三链装配成重组层粘连蛋白 -521。

[0128] 在更具体的实施方案中,第一链的多肽与多肽序列 SEQ ID NO:1 具有至少 80% 的一致性,第二链的多肽与多肽序列 SEQ ID NO:2 具有至少 80% 的一致性,第三链的多肽与多肽序列 SEQ ID NO:3 具有至少 80% 的一致性。

[0129] 在更具体的实施方案中,第一链的多肽与多肽序列 SEQ ID NO:1 具有至少 90% 的一致性,第二链的多肽与多肽序列 SEQ ID NO:2 具有至少 90% 的一致性,第三链的多肽与多肽序列 SEQ ID NO:3 具有至少 90% 的一致性。

[0130] 在具体的实施方案中,第一链包含多肽序列 SEQ ID NO:1,第二链包含多肽序列 SEQ ID NO:2,第三链包含多肽序列 SEQ ID NO:3。

[0131] 在具体的实施方案中,第一链为多肽序列 SEQ ID NO:1,第二链为多肽序列 SEQ ID NO:2,第三链为多肽序列 SEQ ID NO:3。

[0132] 本公开还提供了包含分离的层粘连蛋白 -521 和可药用的载体的药物组合物。在优选的实施方案中,所述药物组合物包含分离的 r- 层粘连蛋白 -521。根据本公开的这些方面,根据所处理的病症,所述药物组合物可以包含其它试剂。所述药物组合物还可包含一种或多种其它化合物,其包括但不限于以下物质中的任意一者,所述物质为胶原、其它种类的

层粘连蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、钙粘蛋白、整联蛋白、 α -肌营养不良蛋白聚糖、触觉蛋白 / 巢蛋白、 α -肌营养不良蛋白聚糖、糖蛋白、蛋白聚糖、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、粘多糖、表皮生长因子，血管内皮细胞生长因子、成纤维细胞生长因子、或神经生长因子、及其多肽片段。

[0133] 包含分离的层粘连蛋白 -521 的药物制剂可以被制备为任意合适的形式，并且其通常包含分离的层粘连蛋白 -521 以及可药用的载体。所述载体可以为可注射载体、局部载体、透皮载体等。所述制剂可以有利地为用于局部给药的形式，例如软膏、凝胶、乳剂、喷雾剂、分散剂、悬浮剂或糊剂。所述制剂还可在组合物中有利地包含防腐剂、抗菌剂、抗真菌剂、抗氧化剂、渗透剂和类似物质，并且其量为常规用量。用于本公开的合适的溶液为无菌的，并且是对所需应用无害的，并且可经过常规的药剂操作如灭菌和 / 或可包含常规的佐剂，如防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、缓冲剂等。为了帮助配制本公开的组合物，可参见文献“Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1975)”。

[0134] 在进一步的方面，本公开包括生物相容性提高的医疗器件，其中该器件的外表面包被有分离的层粘连蛋白 -521 或其药物组合物，该分离的层粘连蛋白 -521 或其药物组合物单独包被或与用于提高器件表面的生物相容性的其它蛋白质或试剂一起包被。经包被的器件可刺激细胞粘附（如内皮细胞粘附），并且可在该器件的植入部位提供减少的炎症和 / 或感染。

[0135] 该医疗器件可以为用于植入体内的任意材料，并且优选由生物相容性金属（如不锈钢或钛）制备或包被。可供选择的是，该器件由陶瓷材料或聚合物制备或包被，所述聚合物如聚酯、聚乙醇酸或聚半乳糖 - 聚乙醇酸共聚物。

[0136] 如果所述器件是由天然或合成的生物可降解性材料制成的网、片或织物的形式，那么分离的层粘连蛋白 -521 或其药物组合物可以直接涂敷于其表面。然后可将合适的细胞培养在该基质上以形成可移植的或可植入的器件，包括牙科支持片、针、金属针或棒；留置导管；结肠造口术管；外科用网状物以及任意其它需要以分离的层粘连蛋白 -521 包被的器具。可供选择的是，可以将所述器件植入，并且可使细胞在体内粘附。

[0137] 对分离的层粘连蛋白 -521 的偶联可为非共价的方式（例如通过吸附）或者是共价的方式。可将所述器件在分离的层粘连蛋白 -521 或其药物组合物中浸渍、孵育，或者用分离的层粘连蛋白 -521 或其药物组合物喷涂。

[0138] 利用本公开的分离的层粘连蛋白 -521 进行各种治疗的给药方案取决于一系列因素，包括损伤或病症的类型、年龄、体重、性别、个体的医疗情况、病症的严重程度以及给药途径。因此，给药方案可以非常广泛，但可以由医师利用标准方法常规地确定。层粘连蛋白是非常有效的分子，在每个细胞中一个或几个分子就可以产生效果。因此，如果优化了给药方式，有效剂量可以在每毫升皮克的范围内。

[0139] 在其它方面，本公开提供了新的材料，即分离的层粘连蛋白 -521，其使得人胚胎干细胞在解离为单细胞悬液后能够存活。通过胰蛋白酶 -EDTA 处理将干细胞解离为单细胞悬液，离心使其成团，重悬于 03 培养基中，用 $40\ \mu\text{m}$ 筛过滤，并且以 $3\ \text{万个细胞}/\text{cm}^2$ 的密度接种在由分离的层粘连蛋白 -521、层粘连蛋白 -511 或 Matrigel 预包被的细胞培养皿中。培养一天后，如本领域所知，接种在 Matrigel 中的细胞死亡。接种在层粘连蛋白 -521 上的人

胚胎干细胞,以及大部分情况下接种在层粘连蛋白-511上的人胚胎干细胞存活并开始增殖,由此形成多能细胞的小克隆。

[0140] 在进一步的方面,本公开提供了扩增多能状态下的人胚胎干细胞的方法。已经显示,以单细胞悬液方式接种在层粘连蛋白-521上的人胚胎干细胞存活,并且以比本领域已知的经典方法更高的速率增殖。3代后(1个月),以单细胞悬液方式传代的细胞经历了与在Matrigel上以片的方式传代20代(3个月)的细胞培养物相同的细胞分裂次数。因此,所述新方法在时间和人力方面是有益的,其可以提供显著的经济效益。

[0141] 层粘连蛋白-521通常由人多能胚胎干细胞表达和分泌,并且也可见于肾、神经肌肉接头、肺和胎盘。

[0142] 能够获得纯的层粘连蛋白-521将能够研究该蛋白对细胞分化和细胞表型维持的影响。因此,如果能够获得纯的完整的分离的层粘连蛋白-521,那么在包括但不限于治疗组织损伤、促进细胞粘附、扩增和迁移、来自体外(ex vivo)的细胞疗法、改善医疗器件的生物相容性、以及制备改进的细胞培养装置和媒介等大量的研究和治疗目的方面将会取得进步。此外,由于层粘连蛋白-521在早期哺乳动物胚胎中表达,因此纯的层粘连蛋白-521对干细胞的影响对研究非常重要。

[0143] 因此,在本领域中,需要分离的层粘连蛋白-521用于研究和治疗目的,并且需要制备分离的层粘连蛋白-521的方法。层粘连蛋白-521可以作为解离的人ES和诱导的多能干(iPS)细胞在化学成分完全确定、不含饲养细胞且不含动物蛋白质(不含异源物)条件下进行长期自我更新和快速增殖的基质。基于LN-521的体系易于使用并且易于自动化操作,并且允许快速扩大人ES/iPS的培养。

[0144] 本公开还涉及能用于为细胞(特别是干细胞)提供营养的细胞培养基。在这一方面,培养干细胞通常需要两种物质:(1)为干细胞提供结构支持的基底或包被物;以及(2)为干细胞提供营养的细胞培养基。所述基底或包被物(1)通常置于(例如)有盖培养皿中或其它容器中。

[0145] 本文所用的术语“自我更新”是指干细胞经过多次细胞分裂周期并保持未分化状态(即多能性)的能力。多能性本身是指干细胞分化为任意细胞类型的能力。术语“增殖”是指干细胞分裂的能力。存活是指分化或未分化的干细胞生存的能力,其不需要干细胞保持其分裂或分化的能力。

[0146] 本公开的细胞培养基特别适合与含有层粘连蛋白-521和/或层粘连蛋白-511的基底一起使用。这些层粘连蛋白激活 $\alpha 6 \beta 1$ 整联蛋白,进而导致PI3K/Akt通路的激活。这增强了干细胞的多能性、自我更新和/或增殖。认为基底可由完整的、独立的链、或片段形式的层粘连蛋白-521或层粘连蛋白-511组成。重组层粘连蛋白-521和重组层粘连蛋白-511是市售可得的。许多不同的分子可以激活PI3K/Akt通路,尽管具有不同的效率。例如,TGF $\beta 1$ 和bFGF激活该通路。使用层粘连蛋白-521和/或层粘连蛋白-511使得这些分子在细胞培养基中的用量降低。层粘连蛋白-521通过 $\alpha 6 \beta 1$ 整联蛋白传送最高剂量的信号,由此激活PI3K/Akt通路。使用层粘连蛋白-521允许以单细胞悬液方式传代而不需要加入对细胞不利的rho激酶(ROCK)抑制剂来提高单细胞酶解后的细胞存活率。之前,进行人ES细胞单细胞酶催化传代而不使用人工凋亡抑制剂是不可能的。传代程序简单化意味着实验方差降低,并且允许该过程自动化以进行高通量细胞培养,并且导致不需要细胞培养人

员的大量训练和花费。另外,接种在层粘连蛋白-521 或层粘连蛋白-511 上的人 ES 和 iPS 细胞以单层生长,由于细胞相等地暴露于基质和细胞培养基,因此这使得培养同质化。与生长在 Matrigel 上以簇的方式传代的细胞相比,在化学成分确定且不含异源物的环境中、在层粘连蛋白-521 上生长,在缺乏 ROCK 抑制剂的条件下以单细胞传代的人 ES 细胞培养物可以以更高的生长速率连续扩增数月。这些多能的长期扩增的细胞均一地表达 Oct4,并且保持核型正常。因此,人们可以获得具有持续存活和增殖能力的人 ES 和 iPS 细胞。

[0147] 相比于其它可用的基底,培养在层粘连蛋白-511 上的细胞的平均接触面积和铺展均匀性更大。在层粘连蛋白-511 上生长超过 3 个月的人 ES 细胞保持了多能性,并且在植入 SCID 小鼠后能产生畸胎瘤。层粘连蛋白-511 还支持小鼠 ES 细胞自我更新超过 5 个月,而不需要 LIF 或饲养细胞的存在,而其它已知的物质在持续支持细胞方面却不能超过几周。

[0148] 生长在所述细胞培养基中的干细胞可以被诱导成为多能干细胞、胚胎干细胞、成体干细胞、胎儿干细胞、羊膜干细胞、以及通常的任意多能干细胞。

[0149] 通常,细胞培养基包含大量的各种生长因子和细胞因子以抑制分化并提高增殖。本公开的细胞培养基的一个优点在于其不包含种类如此多或量如此高的生长因子或细胞因子。

[0150] 最通常地,与通常使用的细胞培养基相比,本公开的细胞培养基需要较少量的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)。认为细胞培养基可包含大于 0 至 3.9 纳克/毫升(ng/mL)的 bFGF。该 bFGF 为人 bFGF,从而该细胞培养基为完全人源的且成分确定的。在一些更具体的实施方案中,所述细胞培养基可包含 3.5ng/mL 或更少的 bFGF。在其它实施方案中,所述细胞培养基可包含 0.5ng/mL 至 3.5ng/mL 的 bFGF。在一些实施方案中,细胞培养基可具有零 bFGF,即不存在 bFGF。

[0151] 一般来讲,所述细胞培养基包含液体相,其中溶解有至少一种无机盐、至少一种微量矿物质、至少一种能量物质、至少一种脂类、至少一种氨基酸、至少一种维生素和至少一种生长因子(除 bFGF 之外)。下表 1 列出了可存在于本公开的细胞培养基中的各种成分,以及存在该成分时的最低和最高浓度。数值用科学计数法表示。例如“4.1E-01”应当被理解为 4.1×10^{-01} 。

[0152] 表 1.

[0153]

成分	摩尔质量 (g/mol)	最低浓度 (mM)	最高浓度 (mM)	最低浓度 (ng/mL)	最高浓度 (ng/mL)
无机盐					
氯化钙(无水)	110.98	4.1E-01	1.6E+00	4.6E+04	1.8E+05
HEPES	238.3	5.9E+00	1.8E+01	1.4E+06	4.2E+06
氯化锂(LiCl)	42.39	4.9E-01	1.5E+00	2.1E+04	6.2E+04
氯化镁(无水)	95.21	1.2E-01	3.6E-01	1.1E+04	3.4E+04
硫酸镁(MgSO ₄)	120.37	1.6E-01	4.8E-01	1.9E+04	5.8E+04
氯化钾(KCl)	74.55	1.6E+00	4.9E+00	1.2E+05	3.6E+05
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	84.01	9.0E+00	4.4E+01	7.6E+05	3.7E+06
氯化钠(NaCl)	58.44	4.7E+01	1.4E+02	2.8E+06	8.3E+06
磷酸氢二钠(无水)	141.96	2.0E-01	5.9E-01	2.8E+04	8.3E+04
磷酸二氢钠一水合物, (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	137.99	1.8E-01	5.3E-01	2.4E+04	7.3E+04
微量矿物质					
硝酸铁 (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	404	4.9E-05	1.9E-04	2.0E+01	7.5E+01
七水硫酸亚铁 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	278.01	5.9E-04	1.8E-03	1.6E+02	4.9E+02
五水硫酸铜(II) (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	249.69	2.0E-06	8.0E-06	5.1E-01	2.0E+00
七水硫酸锌 (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	287.56	5.9E-04	1.8E-03	1.7E+02	5.1E+02
偏钒酸铵 NH ₄ VO ₃	116.98	5.5E-06	1.6E-05	6.4E-01	1.9E+00
一水硫酸锰 (MnSO ₄ ·H ₂ O)	169.02	9.9E-07	3.0E-06	1.7E-01	5.0E-01
NiSO ₄ ·6H ₂ O	262.85	4.9E-07	1.5E-06	1.3E-01	3.8E-01
硒	78.96	8.9E-05	2.7E-04	7.0E+00	2.1E+01
硅酸钠 Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	284.2	4.8E-04	1.4E-03	1.4E+02	4.1E+02
SnCl ₂	189.62	6.2E-07	1.9E-06	1.2E-01	3.5E-01
钼酸铵盐	1235.86	9.9E-07	3.0E-06	1.2E+00	3.7E+00
CdCl ₂	183.32	6.1E-06	1.8E-05	1.1E+00	3.4E+00
CrCl ₃	158.36	9.9E-07	3.0E-06	1.6E-01	4.7E-01
AgNO ₃	169.87	4.9E-07	1.5E-06	8.3E-02	2.5E-01
AlCl ₃ ·6H ₂ O	241.43	2.4E-06	7.3E-06	5.9E-01	1.8E+00
乙酸钡 (Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂)	255.42	4.9E-06	1.5E-05	1.3E+00	3.8E+00
CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.93	4.9E-06	1.5E-05	1.2E+00	3.5E+00
GeO ₂	104.64	2.5E-06	7.5E-06	2.6E-01	7.8E-01
KBr	119	4.9E-07	1.5E-06	5.9E-02	1.8E-01
KI	166	5.0E-07	1.5E-06	8.3E-02	2.5E-01
NaF	41.99	4.9E-05	1.5E-04	2.1E+00	6.2E+00

[0154]

RbCl	120.92	4.9E-06	1.5E-05	5.9E-01	1.8E+00
ZrOCl ₂ · 8H ₂ O	178.13	4.9E-06	1.5E-05	8.7E-01	2.6E+00
能量物质					
D-葡萄糖	180.16	6.9E+00	2.1E+01	1.2E+06	3.7E+06
丙酮酸钠	110.04	2.0E-01	5.9E-01	2.2E+04	6.5E+04
脂类					
亚油酸	280.45	9.4E-05	2.8E-04	2.6E+01	7.9E+01
硫辛酸	206.33	2.0E-04	7.8E-04	4.1E+01	1.6E+02
花生四烯酸	304.47	6.5E-06	1.9E-05	2.0E+00	5.9E+00
胆固醇	386.65	5.6E-04	1.7E-03	2.2E+02	6.5E+02
DL-α 生育酚乙酸酯	472.74	1.5E-04	4.4E-04	6.9E+01	2.1E+02
亚麻酸	278.43	3.5E-05	1.0E-04	9.7E+00	2.9E+01
肉豆蔻酸	228.37	4.3E-05	1.3E-04	9.8E+00	2.9E+01
油酸	282.46	3.5E-05	1.0E-04	9.8E+00	2.9E+01
棕榈酸	256.42	3.8E-05	1.1E-04	9.8E+00	2.9E+01
棕榈油酸	254.408	3.9E-05	1.2E-04	9.8E+00	2.9E+01
硬脂酸	284.48	3.4E-05	1.0E-04	9.8E+00	2.9E+01
氨基酸					
L-丙氨酸	89.09	2.5E-02	2.1E-01	2.2E+03	1.8E+04
L-盐酸精氨酸	147.2	2.7E-01	1.5E+00	4.0E+04	2.2E+05
L-天冬酰胺-H ₂ O	150.13	5.0E-02	2.1E-01	7.5E+03	3.1E+04
L-天冬氨酸	133.1	2.5E-02	2.1E-01	3.3E+03	2.7E+04
L-半胱氨酸-HCl-H ₂ O	175.63	3.9E-02	1.2E-01	6.9E+03	2.1E+04
L-胱氨酸二盐酸盐	313.22	3.9E-02	1.2E-01	1.2E+04	3.7E+04
L-谷氨酸	147.13	2.5E-02	2.1E-01	3.7E+03	3.0E+04
L-谷氨酰胺	146.15	1.5E+00	4.4E+00	2.1E+05	6.4E+05
甘氨酸	75.07	1.5E-01	4.4E-01	1.1E+04	3.3E+04
L-组氨酸盐酸盐一水合物	209.63	5.9E-02	1.8E-01	1.2E+04	3.7E+04
L-异亮氨酸	131.17	1.6E-01	4.9E-01	2.1E+04	6.4E+04
L-亮氨酸	131.17	1.8E-01	5.3E-01	2.3E+04	7.0E+04
L-盐酸赖氨酸	182.65	2.0E-01	5.9E-01	3.6E+04	1.1E+05
L-甲硫氨酸	149.21	4.5E-02	1.4E-01	6.8E+03	2.0E+04
L-苯丙氨酸	165.19	8.5E-02	2.5E-01	1.4E+04	4.2E+04
L-脯氨酸	115.13	1.1E-01	3.2E-01	1.2E+04	3.7E+04
L-丝氨酸	105.09	1.5E-01	4.4E-01	1.5E+04	4.6E+04
L-苏氨酸	119.12	1.8E-01	5.3E-01	2.1E+04	6.3E+04
L-色氨酸	204.23	1.7E-02	5.2E-02	3.5E+03	1.1E+04
L-酪氨酸二钠盐水合物	225.15	8.4E-02	3.7E-01	1.9E+04	8.4E+04
L-缬氨酸	117.15	1.8E-01	5.3E-01	2.1E+04	6.2E+04
维生素					
抗坏血酸	176.12	1.3E-01	3.8E-01	2.2E+04	6.7E+04
生物素	244.31	5.6E-06	1.7E-05	1.4E+00	4.1E+00

[0155]

B ₁₂	1355.37	2.0E-04	5.9E-04	2.7E+02	8.0E+02
氯化胆碱	139.62	2.5E-02	7.5E-02	3.5E+03	1.1E+04
D-泛酸钙	238.27	1.8E-03	1.4E-02	4.4E+02	3.4E+03
叶酸	441.4	2.4E-03	7.1E-03	1.0E+03	3.1E+03
i-肌醇	180.16	2.7E-02	1.1E-01	4.9E+03	1.9E+04
烟酰胺	122.12	6.5E-03	2.0E-02	7.9E+02	2.4E+03
盐酸吡多辛	205.64	3.8E-03	1.1E-02	7.8E+02	2.4E+03
核黄素	376.36	2.3E-04	6.8E-04	8.6E+01	2.6E+02
盐酸硫胺素	337.27	3.3E-03	3.6E-02	1.1E+03	1.2E+04
生长因子/蛋白质					
GABA	103.12	0	1.5E+00	0	1.5E+05
哌啶酸	129	0	1.5E-03	0	1.9E+02
bFGF	18000	0	2.17E-07	0	3.9E+00
TGF β 1	25000	0	3.5E-08	0	8.8E-01
人胰岛素	5808	0	5.9E-03	0	3.4E+04
人全铁转铁蛋白	78500	0	2.1E-04	0	1.6E+04
人血清白蛋白	67000	0	2.9E-01	0	2.0E+07
谷胱甘肽(还原型)	307.32	0	9.6E-03	0	2.9E+03
其它组分					
次黄嘌呤钠	136.11	5.9E-03	2.6E-02	8.0E+02	3.6E+03
酚红	354.38	8.5E-03	2.5E-02	3.0E+03	9.0E+03
腐胺-2HCl	161.07	2.0E-04	5.9E-04	3.2E+01	9.5E+01
胸苷	242.229	5.9E-04	1.8E-03	1.4E+02	4.3E+02
2-巯基乙醇	78.13	4.9E-02	1.5E-01	3.8E+03	1.1E+04
泊洛沙姆 (Pluronic F-68)	8400	1.2E-02	3.5E-02	9.8E+04	2.9E+05
吐温 80	1310	1.6E-04	4.9E-04	2.2E+02	6.5E+02

[0156] 细胞培养基的液相可以为水、血清或白蛋白。

[0157] 上表 1 中列出的许多组分或成分不是必须的,或者可以以较低浓度使用。

[0158] 认为细胞培养基可包含胰岛素或胰岛素替代物。相似地,细胞培养基可包含转铁蛋白或转铁蛋白替代物。

[0159] 在更具体的实施方案中,认为细胞培养基可不包含:(1)白蛋白,(2)胰岛素或胰岛素替代物,(3)转铁蛋白或转铁蛋白替代物,或者这三种组分的任意组合。

[0160] 应当注意的是,其它细胞培养基可包含生长因子,如白细胞介素-1β (IL-1β 或异化产物)、白细胞介素-6(IL6)、或色素上皮衍生因子(PEDF)。这些生长因子不存在于本公开的细胞培养基中。

[0161] 表 2 提供了细胞培养基的一种具体配方:

[0162] 表 2.

[0163]

成分	量	单位
----	---	----

bFGF	0.39	微克 (μg)
白蛋白	1.34	毫克 (Mg)
胰岛素	2	mg
氯化锂	4.23	mg
GABA	0.01	mg
TGF β 1	0.06	μg
腺嘌呤	0.013	mg
L- 谷氨酰胺	2.92	克
MEM 非必需氨基酸溶液	1	mL
DMEM/F12	100	mL

[0164] 在此, MEM 非必需氨基酸溶液通常以 100× 浓缩物的形式提供。表 2 中的 MEM 在稀释至 1× 后使用, 并且包含表 3 列出的具有如下浓度的以下氨基酸:

[0165] 表 3.

[0166]

MEM 氨基酸	浓度 (ng/mL)
甘氨酸	7.50E+03
L- 丙氨酸	8.90E+03
L- 天冬酰胺	1.32E+04
L- 天冬氨酸	1.33E+04
L- 脯氨酸	1.15E+04
L- 丝氨酸	1.05E+04

[0167] DMEM/F12 含有表 4 所列出的以下组分:

[0168] 表 4.

[0169]

DMEM/F12 成分	浓度 (ng/mL)
甘氨酸	187.5

L- 丙氨酸	44.5
L- 盐酸精氨酸	1475
L- 天冬酰胺 $\cdot \text{H}_2\text{O}$	75
L- 天冬氨酸	66.5
L- 盐酸半胱氨酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$	175.6
L- 半胱氨酸 $\cdot 2\text{HCl}$	312.9
L- 谷氨酸	73.5
L- 谷氨酰胺	3650
L- 盐酸组氨酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$	314.8
L- 异亮氨酸	544.7
L- 亮氨酸	590.5
L- 盐酸赖氨酸	912.5
L- 甲硫氨酸	172.4
L- 苯丙氨酸	354.8
L- 脯氨酸	172.5
L- 丝氨酸	262.5
L- 苏氨酸	534.5
L- 色氨酸	90.2
L- 酪氨酸二钠盐二水合物	557.9
L- 缬氨酸	528.5
生物素	0.035
氯化胆碱	89.8
D- 泛酸钙	22.4

[0170]

DMEM/F12 成分	浓度 (ng/mL)
叶酸	26.5
烟酰胺	20.2
盐酸吡多辛	20
核黄素	2.19
盐酸硫胺素	21.7
维生素 B ₁₂	6.8
i-肌醇	126
氯化钙 (CaCl ₂) (无水)	1166
硫酸铜 (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.013
硝酸铁 (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.5
硫酸铁 (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	4.17
氯化镁 (无水)	286.4
硫酸镁 (MgSO ₄) (无水)	488.4
氯化钾 (KCl)	3118
碳酸氢钠 (NaHCO ₃)	24380
氯化钠 (NaCl)	69955
磷酸氢二钠 (Na ₂ HPO ₄) 无水	710.2
磷酸二氢钠 (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	625
硫酸锌 (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	4.32
D-葡萄糖 (Dextrose)	31510
次黄嘌呤 Na	23.9
亚油酸	0.42
硫辛酸	1.05

酚红	81
腐胺 2HCl	0.81
丙酮酸钠	550
胸苷	3.65

[0171] 层粘连蛋白基底与本公开的细胞培养基的组合使得细胞培养系统能够更廉价,并且在保持多能干细胞方面更高效。实质上,这需要的只是层粘连蛋白和最少量的营养。特别地,认为与该细胞培养基组合使用的层粘连蛋白为 LN-511 或 LN-521。

[0172] 以下实施例为了进一步解释本公开。这些例子仅仅是示例性的,并非旨在将本公开的装置限制于所述材料、条件、工艺参数。

实施例

[0173] 实施例 1

[0174] 人层粘连蛋白 β 2cDNA 的克隆

[0175] 使用引物 5'-GTGGTACCCACAGGCAGAGTTGAC-3' (SEQ ID NO:7) 和 5'-GCTCTAGAGCTCTTCAGTGCATAGGC-3' (SEQ ID NO:8), 由人肝 cDNA 文库 (BD Biosciences 公司) PCR 扩增人层粘连蛋白 β 2cDNA 的 5.6kb 片段, 从而在该片段末端引入人工 XbaI 和 KpnI 切割位点。为了降低 PCR 扩增过程中的错误率, 使用 Phusion™ 高保真 PCR 试剂盒 (Finnzymes 公司)。随后, 用 XbaI 和 KpnI 消化该片段, 并亚克隆到经相同的限制性内切酶消化的 pSK 载体 (pSKHLAMB2 质粒) 上。为了检验该序列的完整性, 对 pSKHLAMB2 质粒的若干克隆进行测序。使用 ABI PRISM® BigDye™ Terminator 循环测序试剂盒 (PE Applied Biosystems 公司), 在 ABI PRISM™310 遗传分析仪 (Perkin Elmer 公司) 上进行测序。仅选择与 NCBI 数据库人层粘连蛋白 β 2 序列完全匹配的序列用于进一步的克隆。

[0176] 构建体的表达

[0177] 为了表达人层粘连蛋白 β 2 链, 将 pSKHLAMB2 质粒用 XbaI 和 KpnI 消化并亚克隆到经 XbaI-KpnI 处理的 pcDNA3.1(+) 载体 (Invitrogen) 中。

[0178] 前人已经描述了用于表达人层粘连蛋白 α 5 (HLN5Full, pcDNA 构建体) 和 γ 1 (HG1 构建体) 的构建体 (参见文献 "Doi, M. et al., J. Biol. Chem. 277(15), 12741-8(2002) ")。

[0179] 抗体

[0180] 抗层粘连蛋白 β 2 (MAB2066) 单克隆抗体 (mAb) 购自 R&D Systems 公司。抗层粘连蛋白 α 5mAb (2F7) 购自 Abnova 公司。抗层粘连蛋白 β 1mAb (MAB1921) 购自 Chemicon 公司。抗层粘连蛋白 γ 1 (H-190) 兔多克隆抗体购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。

[0181] 重组层粘连蛋白 -521 的制备和纯化

[0182] 利用在湿润的 5%CO₂ 气氛、37℃ 下, 在 DMEM、10%FCS 中培养的人胚肾细胞 (HEK293, ATCC CRL-1573) 生产 r- 层粘连蛋白 -521。使用标准磷酸钙法, 用 HG1 构建体转染野生型细胞, 并使用 100mg/ml 潮霉素 (Cayla 公司) 将稳定的克隆选择出来。所有进一步的细胞培养和克隆扩增均在连续存在相应的选择性抗生素的条件下进行。然后用人层粘连蛋白 β 2

构建体转染高表达的克隆,并且使用 500mg/ml G418 (Life Technologies 公司)将稳定的克隆选择出来。最后用 HLN5Full.pcdNA 构建体转染高表达层粘连蛋白 γ 1 和层粘连蛋白 β 2 的克隆,并且使用 200mg/ml 博来霉素 (Cayla 公司)将稳定的细胞群选择出来。进一步扩增表现出最高分泌量的克隆。

[0183] 为了制备 r- 层粘连蛋白 -521,将融合细胞在 DMEM 中培养至多 5 天。使用抗 FLAG M2 基质 (Sigma 公司)来亲和纯化 r- 层粘连蛋白 -521。以分批的方式将收集到的培养基与所述基质在 4℃ 下孵育搅拌过夜。在室温下,用 50mg/ml 溶于 TBS/E (50mM Tris-Cl、pH7.5, 150mM NaCl、1mM EDTA) 中的 FLAG 多肽 (Sigma 公司)对结合的 r- 层粘连蛋白 -521 进行竞争性洗脱。浓缩洗脱液,并且采用 30kD 截留超滤膜 (Millipore 公司)以 PBS 替换缓冲液。最后使该浓缩的溶液流过 0.2mm 滤膜以除去自聚集的聚合物。

[0184] 重组层粘连蛋白 -521 的鉴定

[0185] 纯化后,使用 3-8% 梯度 SDS-PAGE 鉴定培养基中的分泌型的层粘连蛋白。使用 Sypro 染色 (Bio-Rad 公司)或转印至 PVDF 上肉眼观测蛋白质 (图 3)。用上述抗体探测所述膜。洗涤后,用 HRP- 偶联山羊抗体孵育膜。按照制造商的说明书,用化学发光试剂盒 (Life Science Products 公司)检测免疫反应性。

[0186] 方法

[0187] 人 ES 细胞培养

[0188] 在 37℃、5%CO₂中,在包被有 r- 层粘连蛋白 -521 的实验培养皿上,在化学成分确定的 O3 培养基中培养人 ES 细胞 (在文献 “Rodin et al., Nature Biotechnol., vol. 28, pp. 611-615 (2010)” 中有所描述)。每 10 至 12 天,在 37℃ 下将细胞暴露于胰蛋白酶 -EDTA 溶液 (GIBCOInvitrogen 公司)5 分钟,从而对细胞进行常规传代。然后温和地吹打使其分开成为单细胞悬液,并加入一定的胰蛋白酶抑制剂 (GIBCOInvitrogen 公司)。将该细胞悬浮液离心 4 分钟,丢弃上清,将所得细胞团重悬在预温的 O3 培养基中,然后使细胞通过 40 μ m 筛。之后将细胞以 3 万个细胞 /cm² (1:25-1:30 分流比)的浓度接种在新的包被有 r- 层粘连蛋白 -521 的培养皿上。除了传代后的第一天仅加入几滴新鲜培养基以外,每天用在孵育器中已预温 1 小时的新鲜培养基喂养细胞一次。如文献 “Rodin et al., Nature Biotechnol., vol. 28, pp. 611-615 (2010)” 所述,在 O3 培养基中、在 Matrigel (BD Biosciences 公司)上培养相同细胞系的对照细胞。将对照细胞分成多个小份以进行传代。

[0189] 细胞培养皿的包被

[0190] 在 4℃ 下,用浓度均为 30 μ g/ml (5 μ g/cm²) 的以下无菌溶液将 96 孔组织细胞培养板包被过夜:小鼠 ECM 蛋白 LN-111 (Invitrogen 公司)无菌溶液、人重组 LN-511 无菌溶液和人重组 LN-521 无菌溶液。根据制造商的说明书,对对照细胞使用了 BD Matrigel™ hESC qualified (BD Biosciences 公司)。

[0191] 细胞粘附试验

[0192] 按照文献所述 (Extracellular Matrix Protocols, 2000) 进行粘附分析。简言之,根据上面描述的方法将 96 孔板用细胞外基质蛋白包被,并用含有牛血清白蛋白的 O3 培养基封闭。将 ES 细胞以 600 个细胞 /mm² 的细胞密度接种在包被有细胞外基质的平板上,并使其在细胞孵育器中粘附 1 小时或 1 天。将没有粘附的细胞冲洗掉,并将粘附的细胞用 5% 的戊二醛固定 20 分钟,并用 0.1% 的结晶紫染色。

[0193] mRNA 的实时 PCR 定量

[0194] 如文献“Rodin et al., Nature Biotechnol., vol. 28, pp. 611-615 (2010)”所述, 分离总 RNA 并合成 cDNA。使用 Applied Biosystems 7300 实时 PCR 系统进行实时定量 RT-PCR Taqman 分析。用含有针对目的 mRNA 的引物和探针的预制基因表达检验混合物 (Applied Biosystems) 进行所有反应, 一式四份。对每个实验进行包括针对 GAPDH 的预制基因表达分析混合物的额外反应, 以用于使 RNA 输入标准化。所有数据用 7300 System SDS 软件第 1.4 版分析。

[0195] FACS 分析

[0196] 按照 Ludwig, T. E 等所述, 分析 OCT4 的表达。人胚胎干细胞在规定的环境中分化 (参见文献“Nat. Biotechnol. 24, 185 - 187 (2006)”)。使细胞通过 FACSCalibur 流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司)。数据用 CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 分析。

[0197] 实施例 1 的结果

[0198] 为了得知不同细胞培养包被物如何影响不含任何添加剂的 O3 培养基中的人 ES 细胞的单细胞存活, 我们将 HS181 细胞群完全解离, 并将其接种在 Matrigel、小鼠层粘连蛋白 -111、人 r- 层粘连蛋白 -511、人 r- 层粘连蛋白 -521、或 r- 层粘连蛋白 -511 和 r- 层粘连蛋白 -521 的混合物中。结果如图 4 所示。正如所期望的那样, 接种 24 小时后几乎没有细胞仍然粘附在 Matrigel 或小鼠层粘连蛋白 -111 上。相比之下, 在人 r- 层粘连蛋白 -521、所述混合物上的细胞存活, 在人 r- 层粘连蛋白 -511 上的细胞较少存活。

[0199] 利用 O3 培养基中的用 ROCK 抑制剂 Y-27632 处理的人 ES 细胞重复该实验。结果如图 5 所示。干细胞仍然粘附在所有 5 种包被物上。

[0200] 为了量化该效果, 在接种 1 小时和 1 天后, 我们在所有上述包被物上进行了细胞粘附实验 (即, 5 种包被物, 有或没有 Y-27632)。图 6 示出了对不存在 Y-27632 的 LN-521、LN-511 和 Matrigel (Mg) 进行 1 小时实验的结果。在不含任何添加剂的 O3 培养基中人 ES 细胞的粘附在此时基本相同。

[0201] 图 7 示出了对所有包被物进行 1 天实验的结果。含有 Y-27632 抑制剂和包被物的平板被标记为 “In&”。接种 1 天后, 粘附至到不含添加剂的 LN-521 上的干细胞比粘附到不含添加剂的 Matrigel 上的多 20 倍。另外, 结果显示, 细胞对不含添加剂的 LN-521 的粘附与含有 ROCK 抑制剂的所有培养皿上的细胞粘附相似。也就是说, 必要的是, 不含 ROCK 抑制剂的情况与 LN-532 包被物结合, 由此获得与包含 ROCK 抑制剂的包被物相似的结果。

[0202] 我们在人 r- 层粘连蛋白 -521 上培养人 ES 细胞, 每 10 至 12 天, 在完全解离为单细胞悬液后以 1:25 至 1:30 的比例传代。细胞以稳定且高的速率健壮生长持续至少 9 代 (3 个月)。此外, 3 代后 (1 个月), 它们完成了与使用常规方法培养 20 代 (100 天) 之后的干细胞相同的细胞增倍数目。这在图 8 中示出, 其中示出了细胞数目随时间的增长。与在 Matrigel 上相比, 在 LN-521 上的细胞以远远较高的速率增加。因此, 在时间和人力方面, 新的 r- 层粘连蛋白 -521 hES 细胞培养方法是有利的。

[0203] 为了鉴定 hES 细胞在不含任何添加剂的 O3 培养基中在人 r- 层粘连蛋白 -521 上经过几次单细胞悬液传代之后的同一性, 我们对多能性标志物 Oct4 进行了 FACS 分析。图 9 示出了在 r-LN-521 上生长的细胞的结果, 而图 10 示出了在 Matrigel 上生长的细胞的结果。阳性细胞的百分比被列在括号中。R-LN-521 具有较高百分比的多能性细胞。

[0204] 另外,对多能性标志物 Oct4 和 Nanog 的 mRNA 转录本数量进行定量。图 11 示出了这些结果。对于这两种标志物, LN-521 上的细胞显示出较高数量的转录本。

[0205] 这两种方法表明,与使用 Matrigel 作为细胞培养皿包被材料并且以小簇方式传代细胞的现有方法相比,所述新方法提供了品质相同或更好的 hES 细胞。

[0206] 实施例 2

[0207] 在本实施例 2 中,研究了被表达和纯化的重组 LN-521 (也在多能性 hES 细胞中表达)对培养的 hES 和 iPS 细胞的影响。结果表明, LN-521 可单独强烈地支持多能性 hES 和 iPS 细胞的自我更新,并且重要的是,在 LN-521 上以高的稀释度接种单细胞悬液中的经胰蛋白酶处理的干细胞后,其能够使得多能干细胞存活。据表明, LN-521 的作用是通过诱导 hES 细胞迁移和激活 PI3K/Akt 通路并由 $\alpha 6 \beta 1$ 整联蛋白传递信号而介导的。其结果可以用于大规模生产多能性 hES 和 iPS 细胞的有效甚至自动化的扩增方法,并且可用于开发用于多能干细胞自我更新的新培养基配制物。本文描述的新的 hES/hiPS 细胞培养方法非常类似于标准的细胞培养方法(例如用于培养成纤维细胞的方法),因此,其不需要特殊的技巧。该方法在每次细胞分裂时仅消耗极少的细胞包被材料,并且是省时的,从而相比于培养 hES/hiPS 细胞的现有工艺提供了显著的经济效益。

[0208] 通过克隆全长层粘连蛋白 $\beta 2$ cDNA,并用人层粘连蛋白 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链三重转染 HEK293 细胞来制备人重组 LN-521,该人重组 LN-521 的纯化形式在本发明之前还不能获得。类似地,通过克隆全长 $\alpha 1$ 和 $\beta 2$ 链 cDNA,并且用人 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 和 $\gamma 1$ 链 cDNA 以及 $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链 cDNA 分别三重转染 HEK293 细胞,从而制备人重组 LN-111 和 LN-121。如蛋白质染色和蛋白质印迹分析所示,表明纯化的 LN-521、LN-111 和 LN-121 蛋白分别包含纯的 $\alpha 5$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链, $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 和 $\gamma 1$ 链以及 $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 和 $\gamma 1$ 链。

[0209] 方法

[0210] 人 ES 和 iPS 细胞培养

[0211] 在 37°C、5%CO₂ 下,在包被有 LN-521 的培养皿上,在 03 培养基(如文献“Rodin et al., Nature Biotechnol., vol. 28, pp. 611-615 (2010)”所述,并且调节 pH 至 7.35)中,在 mTeSR1 (STEMCELL Technologies 公司)和化学成分确定且不含异源物的 TeSR2 (STEMCELL Technologies 公司)中培养人 ES 细胞 HS181 和 HS401。首先,使用灭菌刀小心刮擦,然后进行胰蛋白酶处理而将细胞系从人饲养细胞层转移至 LN-521 包被物上,或者从 LN-511 包被物上将细胞胰蛋白酶消化为单细胞悬液。除了接种后第一天仅加入几滴新鲜培养基以外,每天给细胞提供已在孵育器中预温 1 小时的新鲜培养基 1 次。每 10 至 12 天,在 37°C、5%CO₂ 下将细胞暴露于胰蛋白酶/EDTA (GIBCO Invitrogen 公司,位于苏格兰佩斯利) 5 分钟,由此对细胞进行常规传代。然后温和地吹打使其分开成为单细胞悬液,并加入规定的胰蛋白酶抑制剂(GIBCO Invitrogen 公司)。将细胞悬浮液以 25rcf 离心 4 分钟,丢弃上清,将所得细胞团重悬在预温的 03 培养基中,然后使细胞通过 40 μ m 筛。之后,将细胞以 30,000 个细胞/cm²的浓度(1:25-1:30 分流比)接种在新的包被有层粘连蛋白 -521 的培养皿上。如前所述,在 03 培养基中,在 Matrigel (STEMCELL Technologies 公司)和 LN-511 上培养相同细胞系的对照细胞 9。

[0212] 对于确定的且不含异源物的培养物,使用了 TeSR2(STEMCELL Technologies 公司)培养基和确定的不含任何动物来源组分的 TrypLE™Select (GIBCO Invitrogen 公司,位于

苏格兰佩斯利)酶。每 10 至 14 天在 37℃、5%CO₂下将细胞暴露于 TrypLE™Select, 暴露时间为 4 至 5 分钟, 以进行传代。然后小心地吸取酶, 并加入预温的 TeSR2 培养基。然后, 温和地吹打细胞使其分散为单细胞悬液, 离心, 丢弃上清, 将细胞团重悬在预温的 TeSR2 中。然后使细胞通过 40 μm 筛并接种在新鲜的包被有 LN-521 的培养皿上。

[0213] 将组织细胞培养板用 ECM 蛋白(如人重组 LN-521, 浓度均为 30 μg/ml (5 μg/cm²)) 的无菌溶液在 4℃下包被过夜。根据 STEMCELL Technologies 的说明书, 对照板用 Matrigel 包被。使用前, 将培养皿在孵育器中预温 1 小时, 然后不对该培养皿进行额外地洗涤而加入预温的 03 培养基。向新的培养皿中施加新鲜的 LN-521 溶液后, 剩余的 LN-521 溶液还可以使用至少一次。使用新鲜的包被材料进行所有的粘附、存活和存活抑制实验。

[0214] 作为人 iPS 细胞, ChiPSW 细胞系来自于用病毒转导 OCT-4/SOX2/NANOG/LIN28 重组基因的人包皮成纤维细胞(HFF)。经过对不同代的重复测试, ChiPSW 细胞系具有正常男性核型(46, XY)。在细胞培养和传代实验之前, 首先在体外鉴定细胞的多能性标志物的表达。用抗 Oct3/4 (SC-5279)、Nanog (SC-33759)、TRA-1-60 (SC-21705) 和 SSEA4 (sc-21704) 的抗体进行的免疫荧光研究表明, 这些细胞表达所有这些多能性标志物。RT-PCR 分析证实这些细胞缺乏病毒转基因的表达。ChiPSW 细胞的多能性通过体外(胚状体形成和免疫荧光研究)和体内(皮下注射到 SCID 浅褐色小鼠)实验证实。ChiSW 细胞系的细胞可进一步分化成跳动的心肌细胞。它们还可进行造血分化。

[0215] 在进行本发明的不含饲养细胞的培养之前, 在经照射的人包皮成纤维细胞上保持并使 iPS 细胞增殖。将补充有血清(KSR, Invitrogen 公司)的 Knock-out 培养基用于增殖, 其中补充了 8ng/ml 的碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, R&D Systems 公司)。每天喂养细胞并每周用胶原酶 IV (1mg/ml, Roche 公司)或采用人工分离(需要时)进行传代。

[0216] 在这些实验之前, 显示出 CutB1.2 细胞表达多能性标志物 Oct4/Nanog/Sox2/TRA-1-60/TRA-1-81, 不表达病毒转基因, 该细胞的多能性通过体内和体外分化研究得到证实。

[0217] 层粘连蛋白 -521 和其它包被材料

[0218] 基本上按照上文所述的方法, 依次用全长层粘连蛋白 γ 1、β 1 和 α 5 构建体转染人胚肾细胞(HEK293 ;ATCC CRL-1573), 在该细胞中制备人重组 LN-521 (可购自 BioLamina 公司, AB, 斯德哥尔摩(www.biolamina.com))。对于蛋白质的制备, 在补充有 GlutaMax I 的 Dulbecco 氏改良的 Eagle 培养基(DMEM 培养基)中培养 HEK293 细胞至多 6 天。使用抗 -FLAG 基质(Sigma 公司)来亲和纯化 LN-521 分子, 然后在还原和非还原条件下使用 3-8% 和 4-15% 梯度的 SDS-PAGE 鉴定 LN-521 分子。使用 Sypro Ruby (Bio-Rad 公司)对聚偏二氟乙烯膜上的链进行蛋白质染色和免疫染色, 从而使蛋白质可被视觉观察。为了进一步对蛋白质进行鉴定, 使用抗层粘连蛋白 α 5、β 1 和 γ 1 链的抗体进行蛋白质印迹分析。按照与 LN-521 相似的方法制备人重组层粘连蛋白 -111 和层粘连蛋白 -121, 并且通过蛋白质印迹和 SDS-PAGE 显示出其包含预计分子大小的正确的链。除非另有说明, 将相应的小鼠层粘连蛋白 -111 (Invitrogen 公司)表示为 LN-111。

[0219] 试剂和抗体。

[0220] InSolution™ LY294002 (特异性 Akt 抑制剂)、InSolution™ 渥曼青霉素(特异性 PI3K 抑制剂)和 InSolution™ 98059 (特异性 MEK1/Erk 抑制剂)购自 Calbiochem 公司。

抗 phospho-Akt (#4060)、抗 total-Akt (#9272)、抗 phospho-Erk (#9101)和抗 total-Erk (#9102) 的抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。PathScan Phospho-Akt1 夹心 ELISA 试剂盒(#7160)、PathScan total Akt1 夹心 ELISA 试剂盒(#7170)、PathScan Phospho-Akt2 夹心 ELISA 试剂盒(#7048) 和 PathScan total Akt2 夹心 ELISA 试剂盒(#7046)也购自 Cell Signaling Technology 公司。抗钙联接蛋白(#ab10286)的抗体购自 Abcam 公司。针对各种整联蛋白亚基的功能性封闭抗体、小鼠同种型抗体和 α -肌营养不良蛋白聚糖购自 Millipore 公司。由于抗 α V (MAB1980)和 α 6 (MAB1378)的功能性封闭抗体存在于具有叠氮化钠的溶液中,因此在抑制存活实验之前,所有抗 α 整联蛋白亚基的抗体用 03 培养基透析 3 次,每次 2 小时。抗卢氏(Lutheran)受体和 α -甲胎蛋白的抗体、以及大鼠同种型对照抗体得自 R&D Systems 公司。抗 Oct4、Nanog、SSEA-4、平滑肌肌动蛋白和 MAP-2 的抗体购自 Millipore 公司。

[0221] 免疫荧光.

[0222] 为了进行免疫荧光研究,在 8 孔玻片小室(BD Biosciences 公司)或 96 孔板中培养 ES 细胞并用 4% 的多聚甲醛将其固定,用 0.1% 的 Triton-X 进行通透,并用溶于含 0.1% 的 Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, <http://www.sigmaaldrich.com>)的磷酸盐缓冲液(PBS)中的 10% 胎牛血清(GIBCO Invitrogen 公司)封闭 1 小时。在室温下用一抗孵育 1.5 小时。用二抗和 4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,分子探针)孵育 40 分钟。在两次孵育之间,将样品用含 0.1% Tween-20 的 PBS 缓冲液洗 3-5 次。将样品保存在荧光封固剂(Dako 公司,丹麦格洛斯楚普市, <http://www.dako.com>)中,并用荧光显微镜(Leica 公司,瑞士赫尔伯格市, <http://www.leica.com>)观察。

[0223] 不同 mRNA 的实时 PCR 定量

[0224] 按照制造商的说明书,用 Absolutely RNA Microprep 试剂盒(Stratagene 公司,加州拉由拉市, www.stratagene.com)分离总 RNA。按照制造商的说明书,使用 0.2 μ g 的总 RNA 在 20 μ l 反应混合物中合成 cDNA,所述反应混合物含有寡聚胸腺嘧啶(oligo(dT))12-18 引物和 Superscript II 反转录酶(GIBCO Invitrogen 公司)。使用 Applied Biosystems 7300 实时 PCR 系统(Applied Biosystems 公司,加州福斯特市)进行实时定量 RT-PCR Taqman 检验。使用含有引物和针对目的 mRNA 的探针的预制基因表达检验混合物(Applied Biosystems 公司)完成所有反应,一式四份。对每个实验进行包括针对 GAPDH 的预制基因表达检验混合物的额外反应,以用于使 RNA 输入标准化。所有数据用 7300 System SDS 软件第 1.4 版分析。

[0225] FACS 分析

[0226] 用胰蛋白酶/EDTA 从培养皿上取下细胞,将其解离为单细胞悬液并在冰冷的 FACS 缓冲液(2% 胎牛血清、含有 0.1% 叠氮化钠的 Hank 缓冲液)中重悬。在冰上,用抗 SSEA-4 的一抗孵育 1 小时(Millipore 公司,麻省比尔里卡市, <http://www.millipore.com>)。然后用冰冷的 FACS 缓冲液洗涤细胞 3 次。之后,在避光条件下,在含有 1:400 稀释的 Alexa Fluor 抗小鼠二抗(GIBCO Invitrogen 公司)的 FACS 缓冲液中对细胞进行探测 30 分钟,洗涤 4 次。用小鼠免疫球蛋白孵育对照细胞,随后用上述二抗孵育。在 FACSCalibur 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司,加州圣何塞市)上分析细胞。用 CellQuest 软件(Becton Dickinson 公司)分析数据。

[0227] 核型分析

[0228] 使用标准 Q 带技术对细胞系进行核型分析。细胞样品用秋水仙胺 KaryoMAX (0.1 µg/ml; Gibco Invitrogen 公司) 处理至多 4 小时, 之后用 TrypLE™Express (GIBCO Invitrogen 公司) 解离。通过离心使细胞成团, 并在预温的 0.0375M KCl 低渗溶液中重悬, 并且孵育 10 分钟。在离心之后, 将细胞重悬于固定剂 (3:1 的甲醇: 乙酸) 中。在显微镜用玻片上制备中期涂片, 短暂暴露于胰蛋白酶并用 4:1 的 Gurr/Leishmann 氏染料 (Sigma-Aldrich 公司) 染色, 从而获得 G 带。分析至少 10 片中期涂片, 并对另外 20 片进行计数。

[0229] 形成畸胎瘤

[0230] 在患重症联合免疫缺陷病 (SCID) 的幼年 (7 周大) 小鼠的睾丸囊下植入约 10^6 个细胞, 从而进行畸胎瘤形成实验。每种细胞系使用 3 只动物。通过每周触诊来观察畸胎瘤的生长, 并且在植入 8 周后杀死小鼠。将畸胎瘤固定, 用苏木精和曙红 (HE), 或者用苏木精、曙红和 PAS (HE-PAS) 对切片进行染色。通过对染色的切片的分析, 所有三个胚胎种系层的组织成分的存在得到了证实。根据伦理委员会的批准, 所有动物实验都是在卡罗林斯卡大学医院的无感染动物设备中进行的。

[0231] 形成胚状体

[0232] 在 37 °C、5%CO₂ 下, 使来自包被有 LN-521 的细胞培养皿上的 ES 细胞暴露于 TrypLE™Select 中 1 分钟, 用培养基洗涤两次, 将其破坏成大的片, 并以悬浮液的形式在低粘附平板中培养。所用培养基为补充有 2mM L-谷氨酰胺、20% 胎牛血清 (GIBCO Invitrogen 公司)、0.1mM β-巯基乙醇 (GIBCO Invitrogen 公司) 和 1% 非必需氨基酸 (GIBCO Invitrogen 公司) 的 Knockout DMEM (GIBCO Invitrogen 公司)。悬浮 1 至 2 周后, 将胚状体转移至包被有明胶的组织细胞培养 96 孔板 (Sarstedt 公司) 中, 培养 1 至 2 周, 然后固定, 用分别抗三个胚胎种系层标志物 (平滑肌肌动蛋白、MAP-2 和 α-甲胎蛋白) 的抗体染色, 并如上所述进行免疫荧光分析。

[0233] 细胞粘附试验

[0234] 简言之, 根据上面描述的方法将 MaxiSorp96 孔板 (Nunc) 用细胞外基质蛋白包被, 并用含有牛血清白蛋白的 03 培养基封闭。将 ES 细胞以 50,000 个细胞 /cm² 的细胞密度接种在包被有细胞外基质的平板上, 并使其在细胞孵育器中粘附 1 小时。之后用培养基洗涤平板三次以除去没有粘附的细胞, 之后将粘附的细胞用 5% 的戊二醛固定 20 分钟, 并用 0.1% 的结晶紫 (Kebo Lab 公司, 瑞典斯庞加市, <http://www.kebolab.se>) 染色。1 小时后, 用水洗涤 3 次, 用 10% 乙酸提取结晶紫, 并通过在 570nm 下测量光密度来进行定量。所有实验以一式四份进行。

[0235] 细胞存活和存活抑制试验

[0236] 按照与上述细胞粘附试验相同的方法进行存活试验, 不同之处在于将细胞置于细胞孵育器中 24 小时。对于存活抑制试验, 将细胞保持在含有制造商推荐浓度的功能性封闭抗体或文中所示浓度的通路抑制剂的培养基中 30 分钟, 然后接种在包被的培养皿上。所有实验以一式四份进行。

[0237] 蛋白质印迹和 ELISA.

[0238] 如上所述, 将 HS181 细胞用胰蛋白酶消化为单细胞悬液。对于抑制实验, 将细胞置于具有封闭抗体或通路抑制剂的 03 培养基中 30 分钟, 然后将 45 万个细胞接种在预先包被

了合适的基质包被物的 35mm 培养皿中。对于其它实验,在胰蛋白酶消化后直接接种相同数目的细胞。在所有情况中,允许细胞在 37℃、5%CO₂ 下铺展 1 小时。用冰冷的 PBS 洗涤两次后,将具有细胞的平板在液氮中急速冷冻并储存在 -80℃。为了制备用于蛋白质印迹和 ELISA 的样品,将所述平板缓慢解冻并放置在冰上,在其上添加 100-150 μl 的裂解缓冲液(50mM Tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 0.5% 脱氧胆酸盐, 0.5% SDS, 1% Triton X-100, 1% Igepal, Complete™ (Roche 公司)和 Phospho-Stop™ (Roche 公司))。然后,利用 27G3/4" 针对细胞进行刮擦、吹和剪切。之后,在 4℃ 下以 16, 100rcf 离心 15 分钟以净化细胞团。对于蛋白质印迹,使用 4-12% 梯度凝胶进行 SDS 电泳,并将蛋白质转印至 PVDF 膜上。根据制造商的说明书,用目的抗体对该膜进行杂交。使用购自 Amersham Biosciences 公司的化学发光 HRP-底物进行可视化。为了进行光密度法分析,以 2, 400dpi 扫描该膜并用 ChemiImager5500 程序(1D-Multi Line 光密度法分析模式)进行分析。对于 ELISA,根据制造商的说明书将样品施加在孔中。

[0239] 体内成像和迁移试验。

[0240] 用细胞外基质蛋白包被 24 孔板,并用含有牛血清白蛋白的 O3 培养基封闭。以 30,000-40,000 个细胞/cm² 的细胞密度将 ES 细胞接种在包被有细胞外基质的平板上,并在细胞孵育器中使其粘附半小时。之后,将平板转移至配有环境控制单元的高含量成像系统 Operetta (PerkinElmer 公司)中,使其保持 37℃、5%CO₂。对于拍摄的两部影像,在接种后的 24 小时内,每 15 分钟用 Harmony 软件(PerkinElmer 公司)拍摄一次明场图像,输出,并用 ImageJ 软件(NIH 公司,美国)分析。对于迁移试验,在接种后 18 小时内每 7 分钟拍摄一次图像。使用 MTrackJ plug-in (大学医疗中心,荷兰鹿特丹市)对接种后在第 5 至第 7 小时之间获得的图像进行分析。对每个包被物上的 100 个粘附的细胞进行追踪,并且计算目前的踪迹点到之前的踪迹点的平均距离。误差线示出了平均标准误差(n=100)。

[0241] 统计。通过 Student's 双尾 t 检验确定不等方差,由此确定统计显著性。

[0242] 实施例 2 的结果讨论

[0243] 多能 hES 细胞表达 α1、α5、β1、β2 和 γ1 层粘连蛋白链。为了比较由单细胞悬液接种到不同包被基底上的 hES 细胞的粘附和克隆存活率,将在 LN-511 上以单层生长、或在饲养层上以簇生长的 hES 细胞用胰蛋白酶消化为处于 O3 培养基中的单细胞悬液,并且在不存在或存在 ROCK 抑制剂(Y-27632)下,接种在包被有 Matrigel、LN-111、LN-511、LN-521、或 LN-511 和 LN-521 的混合物的细胞培养皿上,24 小时后进行分析。

[0244] 在 Matrigel 或 LN-111 上细胞未存活,但是它们在人重组 LN-511 和 LN-521 上以单细胞形式存活,并且在这两者的混合物上也存活。然而, LN-521 上的细胞存活率显著高于在 LN-511 上的细胞存活率(下面用数值进行比较)。接种在人重组 LN-111 或 LN-121 上的细胞在 24 小时后不能存活(数据未示出),因此,这表明层粘连蛋白三聚体中存在 β2 链不足以支持该作用。在 ROCK 抑制剂 Y-27632 的存在下, hES 细胞在所有表面上存活。

[0245] 然而,在接种 24 小时之后,在缺乏或存在 ROCK 抑制剂的条件下生长在 LN-521 上的细胞之间,细胞形状有显著差别。在缺乏 ROCK 抑制剂的条件下,接种 24 小时后,生长在 LN-521 上的细胞为圆形;而在存在 ROCK 抑制剂的条件下生长的细胞则为类似纺锤或新月的形状,这可能由肌动蛋白细胞骨架重排导致。

[0246] 为了检验 LN-521 是否可以用作用于人多能细胞长期自我更新的细胞包被材料,

在 O3、mTeSR1 或 TeSR2 培养基中,在该蛋白质上培养 HS181、HS401、H1 细胞和人 iPS ChiPSW 和 CutB1.2 细胞。每 10 至 14 天,将在 O3 或 mTeSR1 培养基中生长的细胞以 1:20-1:30 的比例以单细胞悬液的方式传代。与生长在 LN-511 或 Matrigel 上以小簇方式传代的细胞相比,多能 hES 细胞以相似或更高的稳定速率增殖。因此,与以小簇方式传代两次的对照细胞相比,在 LN-521 上传代一次产生了相同或更高数目的细胞分裂。HS181、HS401 和 H1 细胞分别在 O3 培养基中增殖至少 24、5 和 15 代(9、2 和 6 个月)。CutB1.2iPS 和 ChiPSW 细胞分别在 mTeSR1 中培养了 5 和 3 代。有趣的是,在完全确定且不含异源物的条件下,使用 TeSR2 培养基和 TrypLE Select 酶,能够在 LN-521 上培养解离的 hES 细胞。传代一次之后的接种效率略低于 O3 或 mTeSR1 培养基中的细胞,通常每 10 至 14 天以 1:15-1:20 的比例对解离的细胞进行传代。H1 和 HS401 细胞已经在 TeSR2 中分别培养了 12 和 4 代(5 和 1.5 个月)。

[0247] 在包被有 LN-521 的培养皿中通常以每 1cm^2 30,000 个细胞的密度,以单细胞悬液的形式接种 hES 细胞,这种接种使得各个细胞彼此之间没有任何的直接接触。接种 8 小时后,可以观察到单细胞形式的表达多能性标志物 Oct4、Nanog 和 Sox2 的 hES 细胞。接种 24 小时后,细胞形成小的单层群落,并最终结合形成覆盖孔的大部分的单层的大的岛状物。

[0248] 在 LN-521 上生长的细胞显示出多能性标志物 Oct4、Nanog 和 SSEA4 的稳定的表达水平,这与接种在 Matrigel 上且以小簇方式传代的那些细胞相似。为了比较 LN-521 和 Matrigel 培养物的自发分化水平,在传代 1 次(10 天)和传代 10 次(4 个月)后,比较 Matrigel 培养物和 LN-521 培养物中所表达的分化标志物 PAX6、SOX17 和 SOX7 的 mRNA 的量。定量 RT-PCR 表明,在 LN-521 培养物中,所有三种分化标志物的表达水平类似于或低于 Matrigel 培养物,而不依赖于传代次数。

[0249] 在 O3 培养基中在 LN-521 上分别传代 12 次和 10 次后,经鉴定, hES 细胞系 HS181 和 H1 的核型正常;并且 H1 在 TeSR2 培养基中传代 7 次后核型也正常。向 SCID 小鼠中注射以下细胞以形成畸胎瘤:在 O3 培养基中在 LN-521 上分别培养 13 和 12 代的 HS181 和 H1 细胞以及在 TeSR2 培养基中在 LN-521 上培养 7 代的 H1 细胞;对该畸胎瘤进行的组织学检验表明,发育出了包含人胚胎的所有三个胚系的组织。体外分化也表明三种情况中的细胞保持了形成胚状体的能力,其表达中胚层(平滑肌肌动蛋白)、外胚层(MAP-2)和内胚层(α -甲胎蛋白)的标志物。

[0250] 为了对包被基底的效果进行量化,研究了解离的 hES 细胞在 Matrigel、LN-111、LN-511、LN-521、和 LN-511 与 LN-521 的等量混合物上,在 1 小时之后的粘附以及在 24 小时之后的存活。有趣的是,1 小时后,虽然细胞在 LN-521 和 LN-511 上的铺展明显优于在 Matrigel 或 LN-111 上(未示出)的铺展,但约 75-80% 的相同量的细胞粘附在所有包被物上。24 小时后,在 Matrigel 或 LN-111 上几乎没有细胞存活,在 LN-511 上仅有非常少量的细胞存活。相比之下, hES 细胞在 LN-521 上的存活力比在 Matrigel 上的存活率高大约 20 倍,并且比在 LN-511 上的高 3 倍。

[0251] 为了定量地比较 LN-521 和 ROCK 抑制剂(Y-27632)的作用,我们将来自相同的单细胞悬液的细胞以相同的接种密度(每 1cm^2 40,000 个细胞)接种在含有 $10\text{ }\mu\text{M}$ Y-27632 的培养基中,并研究它们在不同包被物上的存活力。在接种 24 小时后,在 LN-521 上的未处理的细胞与在 Matrigel 上的经 Y-27632 处理的细胞显示出相似的存活率。有趣的是,与 Matrigel 相比,即使是经 Y-27632 处理的人 ES 细胞也在 LN-521 上存活得更好。

[0252] 如果从 O3 培养基中除去外源 bFGF, 细胞仍然显示出在 LN-521 上的存活力比在 Matrigel 上高 20 倍。此外, hES 细胞在接种 24 小时后在 LN-521 上仍存活, 即使在缺乏 TeSR1 配制物的所有生长因子(bFGF、LiCl、 γ -氨基丁酸(GABA), 哌啶酸和 TGF β)¹⁶的培养基中也是如此, 这表明存活机制不依赖于由这些因子诱导的信号传递。

[0253] 利用抗位于质膜上的针对 LN-521 的潜在受体的功能性封闭抗体对细胞存活的抑制进行检验, 该检验表明抗整联蛋白 $\alpha 6$ 的抗体(对 $\beta 1$ 有较低程度的抗性)抑制了人 ES 细胞在 LN-521 上的存活。抗其它所检验的整联蛋白亚基的功能性封闭抗体, 以及抗卢氏受体和抗 α -肌营养不良蛋白聚糖的功能性封闭抗体显示出对人 ES 细胞在 LN-521 上的存活力有非常低(几乎没有)的影响。

[0254] 近来, 已经表明 ROCK 抑制剂和细胞收缩抑制剂通过消除肌动蛋白-肌球蛋白的收缩而发挥作用, 所述收缩是通过肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化介导的。为了检验 LN-521 是否具有类似的活性, 比较接种之后 1 小时和 6 小时, 位于 Matrigel、LN-111、LN-511 和 LN-521 上的解离细胞之间的磷酸化 MLC 的水平(图 12 和图 13)。有趣的是, 蛋白质印迹表明, 与 Matrigel 和 LN-111 上的细胞相比, 在 LN-511 和 LN-521 上的细胞中的 MLC 的磷酸化水平甚至更高。由于肌动蛋白-肌球蛋白重排不仅对于收缩是必须的, 其对于细胞的运动性也是必需的, 因此我们推测细胞迁移可能由 LN-521 与其整联蛋白受体 $\alpha 6 \beta 1$ 之间的相互作用引起。Matrigel 和 LN-521 上的细胞的体内成像表明, 通过聚集成小的快速移动的群落, 细胞在后者上迁移得更快并且能够存活。在接种后的第 5 小时和第 7 小时之间(此时, 在所有情况中细胞仍然粘附), 比较了 hES 细胞在所述四种包被物上的迁移(图 14)。hES 细胞在 LN-521 上的运动性高于该细胞在其它包被物上的运动性, 并且这与细胞在包被物上存活的能力有关。用抗整联蛋白 $\beta 1$ 的功能性封闭抗体进行处理, 显著降低了细胞在 LN-521 上的运动性(图 15)和粘附性(数据未示出)。

[0255] 大量数据表明由整联蛋白激活的 MEK1/Erk 或 PI3- 激酶 /Akt 通路可以阻断失巢凋亡。对 LY294002 和 PD98059 (分别是 Akt 和 MEK1 的特异性抑制剂)的效用进行了检验, 以研究这些通路在 hES 细胞在 LN-521 上存活中的潜在作用。发现用 LY294002 阻断 Akt 的激活可促进 hES 细胞的分离和死亡, 在 LN-521 上接种 24 小时后没有细胞存活(图 16)。相比之下, 用 PD98059 处理不那么严重地影响存活。用另一种 PI3K/Akt 特异性抑制剂渥曼青霉素处理的 hES 细胞在接种在 LN-521 上 24 小时后也无法存活, 这证明激活 PI3K/Akt 是细胞在 LN-521 上存活所必需的。

[0256] 由于已知 bFGF 是 MEK1/Erk 通路的有效激活剂, 其影响不能被 PD98059 完全抑制, 因此, 我们在不含外源性 bFGF 的 O3 培养基中进行了相同的实验并得到了相同的结果(图 17)。对接种在 LN-521 上 1 小时之后所收集的经处理的细胞和对照细胞进行蛋白质印迹分析, 由此确定了 LY294002 处理和 PD98059 处理的作用(图 18 和图 19)。

[0257] 对在 Matrigel 和 LN-521 上生长的细胞的提取物用抗磷酸化 -Akt 的抗体进行蛋白质印迹分析, 结果表明两种情况中的 PI3K/Akt 通路均被激活(数据未示出)。为了确定不同包被物上的细胞中的 Akt 激活水平, 对在 Matrigel、LN-111、LN-511 和 LN-521 上接种 1 小时后(此时细胞彼此之间还没有直接接触)收集的细胞裂解物进行 ELISA 分析(图 20 和图 21)。不同包被物上的细胞中的 Akt2 磷酸化水平与在它们上的存活力有关。

[0258] 已经证明在 α 和 β 亚基中, $\alpha 6$ 和 $\beta 1$ 整联蛋白分别是人 ES 细胞中表达最丰富

的整联蛋白同种型。整联蛋白 $\alpha 6 \beta 1$ 表现出对不同层粘连蛋白有广谱特异性,但是其对 LN-521 或 LN-511 的结合亲和力高于对 LN-111 的结合亲和力。近来已经确定,与 $\beta 1$ 层粘连蛋白相比, $\beta 2$ 层粘连蛋白对整联蛋白的亲和力更高。因此,由于对整联蛋白具有最高的亲和力,LN-521 能提供用于迁移的最佳锚定,并且可通过 $\alpha 6 \beta 1$ 整联蛋白传送最高量的信号,这导致解离的多能 hES 细胞具有最佳的存活力,尽管(例如) LN-511 也可以以较低的水平做到这一点。

[0259] 本发明的结果可有利于人多能干细胞的普遍培养和扩增,甚至可使这种细胞(包括用于临床应用的细胞)的自动化扩增成为可能。解离的 hES 细胞在 LN-521 上的存活似乎依赖于迁移,因此以极低密度接种后该细胞不能存活。本文所述的新的 hES 细胞培养方法仅利用天然存在的 LN-521 粘着蛋白,其不会像 ROCK 抑制剂处理或细胞收缩抑制剂处理那样损坏细胞骨架。因此,只有在细胞表面上具有正确的整联蛋白谱时, LN-521 才能最有利于细胞的存活。本发明的结果还表明,以每 1cm^2 20,000-30,000 个细胞的较低的密度接种在 LN-521 上的 hES 细胞能够存活,并且能够至少与其它 hES 培养系统一样有效地增殖。所述新方法非常类似于标准的细胞培养程序(如成纤维细胞的培养),因此,在 LN-521 上培养 hES 细胞不需要受到特别训练的人员,而这在之前是一个主要的问题,因为培养 hES 细胞是具有技术挑战的。

[0260] 广泛使用的用于人多能干细胞自我更新的 TeSR1 配制物最初是被开发用于 Matrigel 的,并且其含有高剂量的主要针对 MEK1/Erk 通路的 bFGF,因此其不被广泛地认为对多能 hES 细胞具有有益效果。本发明的结果可凭借 LN-521 作为包被材料以及通路特异性的优势来开发新的培养基配制物,这对于人 ES 细胞自我更新而言是重要的。

[0261] 总体而言,本发明表明,与 LN-511 相似,由多能 hES 正常分泌的 LN-521 可以在培养中单独用作支持人多能干细胞自我更新的包被材料。这两种层粘连蛋白均有利于细胞在体外以同质的单层生长。然而,这两种层粘连蛋白之间的重要差别在于, hES/hiPS 细胞可以被胰蛋白酶消化为单细胞悬液,并且可在 LN-521 上接种并由单细胞有效地扩增,这与手工分开细胞簇是不同的,而手工分开细胞簇是在 Matrigel 或饲养细胞上生长的 hES/iPS 细胞进行扩增所需要的。本发明的结果可以有利于培养人多能干细胞并且有利于这种细胞的自动化扩增。

[0262] 实施例 3

[0263] 在两种不同的细胞培养基中,在层粘连蛋白 -521 基底上培养人胚胎干细胞。两种细胞培养基的不同之处在于 bFGF 的含量, 3.9ng/ml 和 100ng/ml 。

[0264] 图 22 示出了在含有 3.9ng/mL bFGF 并具有层粘连蛋白 -521 基底的 O3 培养基中培养的 HS181hES 细胞传代 5 次(40 天)后的生长曲线,该曲线用黑色实线表示。O3 培养基是市售可得的化学成分确定的 mTeSR1 培养基的变化形式,其含有牛血清白蛋白作为唯一的动物来源成分。在含有 100ng/mL bFGF 并具有层粘连蛋白 -521 基底的 O3 培养基中培养的 HS181hES 细胞的生长曲线用虚线表示。将细胞解离为单细胞悬液以用于传代。如本文所示, bFGF 量较低的生长曲线与 bFGF 量较高的生长曲线一样好或更好。

[0265] 图 23 示出了在两种培养基中传代 5 次(40 天)后,多能性标志物 Oct4 和 Nanog 的 mRNA 转录本的相对量,这利用实时定量逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)分析而获得。两种细胞培养基又一次获得了相似的量,这表明量较低的 bFGF 中的干细胞保持了多能性。因

此,特别是与层粘连蛋白-521 基质结合使用时,可以使用较低量的 bFGF,并且仍然可以获得良好的结果。

[0266] 实施例 4

[0267] 在实施例 1 和 2 中,解离的干细胞主要通过 LN-521 上进行活跃运动并且联合成小的有效生长和迁移的单层岛状物而存活。以非常低的克隆密度接种的细胞通过失巢凋亡(程序性细胞死亡的特殊形式)而死亡。通常,来自于细胞外基质分子(如层粘连蛋白)的整联蛋白相关的信号传递以及钙粘蛋白相关的细胞-细胞信号传递可以防止失巢凋亡。人 ES 细胞表面最丰富的钙粘蛋白同种型为上皮-钙粘蛋白(E-钙粘蛋白)。进行实施例 3 中的实验以研究 LN-521 和 E-钙粘蛋白结合是否能保护人 ES 细胞不发生失巢凋亡并使得细胞能够克隆存活。

[0268] 在 mTeSR1 培养基中,在不同包被物上,以每 cm^2 250 个细胞的密度接种 hES 细胞,培养 5 天后使用碱性磷酸酶染色试剂盒进行检测。层粘连蛋白-521 和 E-钙粘蛋白都不能单独地使得已被分成单个的 hES 细胞实现有效的克隆存活。

[0269] 接下来,检测层粘连蛋白-521 和 E-钙粘蛋白的结合以确定这种结合是否能保持细胞的克隆存活。使用固定量的层粘连蛋白-521 包被细胞培养皿,并且滴加 E-钙粘蛋白。不同比例的 E-钙粘蛋白和层粘连蛋白-521 实现了细胞的克隆存活,所述比例包括约 1:10w/w 至约 1:5w/w。

[0270] 进行另外的测试以检测对 mTeSR1 培养基进行各种改变的效果。使用比例为约 1:10w/w 的 E-钙粘蛋白与层粘连蛋白-521 的混合物包被平板。出乎意料的是,发现白蛋白浓度升高 2 倍显著提高了 hES 细胞在层粘连蛋白-521/E-钙粘蛋白基质上的克隆存活。在这些条件下,独立化的 hES 细胞的存活率为 10% 至 15%,并且无论是在 mTeSR1 培养基中还是在含有附加的白蛋白的 mTeSR1 培养基中,该存活率均比在单独的 Matrigel、层粘连蛋白-521 或 E-钙粘蛋白上的细胞高一个数量级。对细胞的延时摄影证明,层粘连蛋白-521/E-钙粘蛋白包被物通过单细胞的增殖而不是通过不同细胞的聚集而促进细胞的存活。相似地,层粘连蛋白-521/E-钙粘蛋白保持了细胞在化学成分完全确定且不含异源物的、添加有重组人血清白蛋白(rHSA)的 TeSR2 培养基中的克隆存活。

[0271] 在另一试验中,使 hES 细胞系进行了衍生分化。用 Dulbecco 磷酸盐缓冲液洗涤 24 孔组织细胞培养板 2 次。然后在 37°C 下用含有下列物质的灭菌溶液包被所述培养板 2 小时,从而制备层粘连蛋白-521/E-钙粘蛋白基质,所述物质为:48 μL 的 100 $\mu\text{g/mL}$ 层粘连蛋白-521 (BioLamina AB 公司,斯德哥尔摩);6 μL 的 82 $\mu\text{g/mL}$ E-钙粘蛋白(R@DSystems 公司);和含有钙和镁的 300 μL of DPBS (GIBCO 公司)。

[0272] 在得到合作伙伴同意和伦理会批准后,从公认的体外受精诊所获得了用于衍生分化 hES 细胞系的捐赠胚胎。仅使用了新鲜或冷冻胚胎(其不能用于不孕不育治疗)用于分化程序。在使用为此目的设计的激光装置在透明带上打开一个小开口后,使用微量吸液管从 8 细胞期胚胎中分离出一个或两个细胞。该工艺已经获得了在临床上用于胚胎植入前基因诊断(PGD)的授权。将细胞接种在含有附加的 rHSA 的 TeSR2 培养基中的层粘连蛋白-521/E-钙粘蛋白基质上。细胞成功地粘附并开始增殖。允许母代胚胎生长至胚泡期并冷冻。在 37°C 和 5% O_2 /10% CO_2 下,利用在油中形成液滴的不含异源物的标准化体外受精培养基进行胚胎培养。除去透明带后,人工分离出 5 个人胚泡的内细胞团,并接种在 4 孔培养板(Nunc

公司) 中的层粘连蛋白 -521/E- 钙粘蛋白基质上。初始培养 48 小时后, 每天更换培养基。10 至 14 天后, 人工分离出生长晕并重新接种在层粘连蛋白 -521/E- 钙粘蛋白基质上。采用人工传代进行随后的 2 至 3 次传代, 之后使用 TrypLE Select (GIBCO 公司) 对克隆进行传代。

[0273] 通过使用上述的层粘连蛋白 -521/E- 钙粘蛋白基质以及含有附加的牛白蛋白的 mTeSR1 培养基, 由 6 个培养的胚泡衍生分化出 3 个新的 hES 细胞系。接种 4 天后, 内细胞团提供了干细胞样生长晕。图 24 示出了新的人胚胎干细胞系 HS841 在层粘连蛋白 -521/E- 钙粘蛋白基质上的早期分化。显示了由 6 天的胚泡的内细胞团, 在人工分离出内细胞团并接种在层粘连蛋白 -521/E- 钙粘蛋白基质上 4 天后生长出的形态学典型的人胚胎干细胞。

[0274] 出乎意料的是, 所述细胞培养系统和方法由 6 个胚胎中的 3 个 (50%) 提供了稳定的 hES 细胞系, 其分化率高于标准方法。

[0275] 使用层粘连蛋白 -521/E- 钙粘蛋白基质和含有附加的 rHSA 的 TeSR2 培养基 (其为化学成分完全确定且不含异源物的环境) 产生了与新 hES 细胞系衍生分化类似的结果。

[0276] 应当理解, 可以将上述公开以及其它特征和功能的改变形式或其替代形式组合成很多其它不同的系统或应用。本领域技术人员可以进行目前未预见到或未预料到的各种替换、修改、改变或改进, 也应理解这些替换、修改、改变或改进亦被包含在所附权利要求书中。

[0001]

序列表

<110> 拜奥拉米那公司

<120> 细胞培养基

<130> VI-131378-59:57/C

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3695

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Met Ala Lys Arg Leu Cys Ala Gly Ser Ala Leu Cys Val Arg Gly Pro
1 5 10 15

Arg Gly Pro Ala Pro Leu Leu Leu Val Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala
20 25 30

Ala Arg Ala Arg Glu Glu Ala Gly Gly Gly Phe Ser Leu His Pro Pro
35 40 45

Tyr Phe Asn Leu Ala Glu Gly Ala Arg Ile Ala Ala Ser Ala Thr Cys
50 55 60

Gly Glu Glu Ala Pro Ala Arg Gly Ser Pro Arg Pro Thr Glu Asp Leu
65 70 75 80

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

Thr Ile Arg Gly Gln Tyr Cys Asp Ile Cys Thr Ala Ala Asn Ser Asn
100 105 110

Lys Ala His Pro Ala Ser Asn Ala Ile Asp Gly Thr Glu Arg Trp Trp
115 120 125

Gln Ser Pro Pro Leu Ser Arg Gly Leu Glu Tyr Asn Glu Val Asn Val
130 135 140

Thr Leu Asp Leu Gly Gln Val Phe His Val Ala Tyr Val Leu Ile Lys
145 150 155 160

Phe Ala Asn Ser Pro Arg Pro Asp Leu Trp Val Leu Glu Arg Ser Met
165 170 175

Asp Phe Gly Arg Thr Tyr Gln Pro Trp Gln Phe Phe Ala Ser Ser Lys
180 185 190

Arg Asp Cys Leu Glu Arg Phe Gly Pro Gln Thr Leu Glu Arg Ile Thr
195 200 205

Arg Asp Asp Ala Ala Ile Cys Thr Thr Glu Tyr Ser Arg Ile Val Pro
210 215 220

Leu Glu Asn Gly Glu Ile Val Val Ser Leu Val Asn Gly Arg Pro Gly

[0002]

225	230	235	240
Ala Met Asn Phe Ser Tyr Ser Pro Leu Leu Arg Glu Phe Thr Lys Ala	245	250	255
Thr Asn Val Arg Leu Arg Phe Leu Arg Thr Asn Thr Leu Leu Gly His	260	265	270
Leu Met Gly Lys Ala Leu Arg Asp Pro Thr Val Thr Arg Arg Tyr Tyr	275	280	285
Tyr Ser Ile Lys Asp Ile Ser Ile Gly Gly Arg Cys Val Cys His Gly	290	295	300
His Ala Asp Ala Cys Asp Ala Lys Asp Pro Thr Asp Pro Phe Arg Leu	305	310	315
Gln Cys Thr Cys Gln His Asn Thr Cys Gly Gly Thr Cys Asp Arg Cys	325	330	335
Cys Pro Gly Phe Asn Gln Gln Pro Trp Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser	340	345	350
Ala Asn Glu Cys Gln Ser Cys Asn Cys Tyr Gly His Ala Thr Asp Cys	355	360	365
Tyr Tyr Asp Pro Glu Val Asp Arg Arg Arg Ala Ser Gln Ser Leu Asp	370	375	380
Gly Thr Tyr Gln Gly Gly Gly Val Cys Ile Asp Cys Gln His His Thr	385	390	395
Thr Gly Val Asn Cys Glu Arg Cys Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Ser Pro	405	410	415
Asn His Pro Leu Asp Ser Pro His Val Cys Arg Arg Cys Asn Cys Glu	420	425	430
Ser Asp Phe Thr Asp Gly Thr Cys Glu Asp Leu Thr Gly Arg Cys Tyr	435	440	445
Cys Arg Pro Asn Phe Ser Gly Glu Arg Cys Asp Val Cys Ala Glu Gly	450	455	460
Phe Thr Gly Phe Pro Ser Cys Tyr Pro Thr Pro Ser Ser Ser Asn Asp	465	470	475
Thr Arg Glu Gln Val Leu Pro Ala Gly Gln Ile Val Asn Cys Asp Cys	485	490	495
Ser Ala Ala Gly Thr Gln Gly Asn Ala Cys Arg Lys Asp Pro Arg Val	500	505	510
Gly Arg Cys Leu Cys Lys Pro Asn Phe Gln Gly Thr His Cys Glu Leu	515	520	525
Cys Ala Pro Gly Phe Tyr Gly Pro Gly Cys Gln Pro Cys Gln Cys Ser			

[0003]

530	535	540
Ser Pro Gly Val Ala Asp Asp Arg Cys Asp Pro Asp Thr Gly Gln Cys 545 550 555 560		
Arg Cys Arg Val Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Asp Arg Cys Ala Pro 565 570 575		
Gly Tyr Phe His Phe Pro Leu Cys Gln Leu Cys Gly Cys Ser Pro Ala 580 585 590		
Gly Thr Leu Pro Glu Gly Cys Asp Glu Ala Gly Arg Cys Leu Cys Gln 595 600 605		
Pro Glu Phe Ala Gly Pro His Cys Asp Arg Cys Arg Pro Gly Tyr His 610 615 620		
Gly Phe Pro Asn Cys Gln Ala Cys Thr Cys Asp Pro Arg Gly Ala Leu 625 630 635 640		
Asp Gln Leu Cys Gly Ala Gly Gly Leu Cys Arg Cys Arg Pro Gly Tyr 645 650 655		
Thr Gly Thr Ala Cys Gln Glu Cys Ser Pro Gly Phe His Gly Phe Pro 660 665 670		
Ser Cys Val Pro Cys His Cys Ser Ala Glu Gly Ser Leu His Ala Ala 675 680 685		
Cys Asp Pro Arg Ser Gly Gln Cys Ser Cys Arg Pro Arg Val Thr Gly 690 695 700		
Leu Arg Cys Asp Thr Cys Val Pro Gly Ala Tyr Asn Phe Pro Tyr Cys 705 710 715 720		
Glu Ala Gly Ser Cys His Pro Ala Gly Leu Ala Pro Val Asp Pro Ala 725 730 735		
Leu Pro Glu Ala Gln Val Pro Cys Met Cys Arg Ala His Val Glu Gly 740 745 750		
Pro Ser Cys Asp Arg Cys Lys Pro Gly Phe Trp Gly Leu Ser Pro Ser 755 760 765		
Asn Pro Glu Gly Cys Thr Arg Cys Ser Cys Asp Leu Arg Gly Thr Leu 770 775 780		
Gly Gly Val Ala Glu Cys Gln Pro Gly Thr Gly Gln Cys Phe Cys Lys 785 790 795 800		
Pro His Val Cys Gly Gln Ala Cys Ala Ser Cys Lys Asp Gly Phe Phe 805 810 815		
Gly Leu Asp Gln Ala Asp Tyr Phe Gly Cys Arg Ser Cys Arg Cys Asp 820 825 830		
Ile Gly Gly Ala Leu Gly Gln Ser Cys Glu Pro Arg Thr Gly Val Cys		

[0004]

835	840	845
Arg Cys Arg Pro Asn Thr Gln Gly Pro Thr Cys Ser Glu Pro Ala Arg 850	855	860
Asp His Tyr Leu Pro Asp Leu His His Leu Arg Leu Glu Leu Glu Glu 865	870	875 880
Ala Ala Thr Pro Glu Gly His Ala Val Arg Phe Gly Phe Asn Pro Leu 885	890	895
Glu Phe Glu Asn Phe Ser Trp Arg Gly Tyr Ala Gln Met Ala Pro Val 900	905	910
Gln Pro Arg Ile Val Ala Arg Leu Asn Leu Thr Ser Pro Asp Leu Phe 915	920	925
Trp Leu Val Phe Arg Tyr Val Asn Arg Gly Ala Met Ser Val Ser Gly 930	935	940
Arg Val Ser Val Arg Glu Glu Gly Arg Ser Ala Thr Cys Ala Asn Cys 945	950	955 960
Thr Ala Gln Ser Gln Pro Val Ala Phe Pro Pro Ser Thr Glu Pro Ala 965	970	975
Phe Ile Thr Val Pro Gln Arg Gly Phe Gly Glu Pro Phe Val Leu Asn 980	985	990
Pro Gly Thr Trp Ala Leu Arg Val Glu Ala Glu Gly Val Leu Leu Asp 995	1000	1005
Tyr Val Val Leu Leu Pro Ser Ala Tyr Tyr Glu Ala Ala Leu Leu 1010	1015	1020
Gln Leu Arg Val Thr Glu Ala Cys Thr Tyr Arg Pro Ser Ala Gln 1025	1030	1035
Gln Ser Gly Asp Asn Cys Leu Leu Tyr Thr His Leu Pro Leu Asp 1040	1045	1050
Gly Phe Pro Ser Ala Ala Gly Leu Glu Ala Leu Cys Arg Gln Asp 1055	1060	1065
Asn Ser Leu Pro Arg Pro Cys Pro Thr Glu Gln Leu Ser Pro Ser 1070	1075	1080
His Pro Pro Leu Ile Thr Cys Thr Gly Ser Asp Val Asp Val Gln 1085	1090	1095
Leu Gln Val Ala Val Pro Gln Pro Gly Arg Tyr Ala Leu Val Val 1100	1105	1110
Glu Tyr Ala Asn Glu Asp Ala Arg Gln Glu Val Gly Val Ala Val 1115	1120	1125
His Thr Pro Gln Arg Ala Pro Gln Gln Gly Leu Leu Ser Leu His		

[0005]

1130	1135	1140
Pro Cys Leu Tyr Ser Thr	Leu Cys Arg Gly Thr	Ala Arg Asp Thr
1145	1150	1155
Gln Asp His Leu Ala Val	Phe His Leu Asp Ser	Glu Ala Ser Val
1160	1165	1170
Arg Leu Thr Ala Glu Gln	Ala Arg Phe Phe Leu His	Gly Val Thr
1175	1180	1185
Leu Val Pro Ile Glu Glu	Phe Ser Pro Glu Phe	Val Glu Pro Arg
1190	1195	1200
Val Ser Cys Ile Ser Ser	His Gly Ala Phe Gly	Pro Asn Ser Ala
1205	1210	1215
Ala Cys Leu Pro Ser Arg	Phe Pro Lys Pro Pro	Gln Pro Ile Ile
1220	1225	1230
Leu Arg Asp Cys Gln Val	Ile Pro Leu Pro Pro	Gly Leu Pro Leu
1235	1240	1245
Thr His Ala Gln Asp Leu	Thr Pro Ala Met Ser	Pro Ala Gly Pro
1250	1255	1260
Arg Pro Arg Pro Pro Thr	Ala Val Asp Pro Asp	Ala Glu Pro Thr
1265	1270	1275
Leu Leu Arg Glu Pro Gln	Ala Thr Val Val Phe	Thr Thr His Val
1280	1285	1290
Pro Thr Leu Gly Arg Tyr	Ala Phe Leu Leu His	Gly Tyr Gln Pro
1295	1300	1305
Ala His Pro Thr Phe Pro	Val Glu Val Leu Ile	Asn Ala Gly Arg
1310	1315	1320
Val Trp Gln Gly His Ala	Asn Ala Ser Phe Cys	Pro His Gly Tyr
1325	1330	1335
Gly Cys Arg Thr Leu Val	Val Cys Glu Gly Gln	Ala Leu Leu Asp
1340	1345	1350
Val Thr His Ser Glu Leu	Thr Val Thr Val Arg	Val Pro Lys Gly
1355	1360	1365
Arg Trp Leu Trp Leu Asp	Tyr Val Leu Val Val	Pro Glu Asn Val
1370	1375	1380
Tyr Ser Phe Gly Tyr Leu	Arg Glu Glu Pro Leu	Asp Lys Ser Tyr
1385	1390	1395
Asp Phe Ile Ser His Cys	Ala Ala Gln Gly Tyr	His Ile Ser Pro
1400	1405	1410
Ser Ser Ser Ser Leu Phe	Cys Arg Asn Ala Ala	Ala Ser Leu Ser

[0006]

1415	1420	1425
Leu Phe Tyr Asn Asn Gly	Ala Arg Pro Cys Gly Cys His Glu Val	
1430	1435	1440
Gly Ala Thr Gly Pro Thr Cys	Glu Pro Phe Gly Gly Gln Cys Pro	
1445	1450	1455
Cys His Ala His Val Ile Gly	Arg Asp Cys Ser Arg Cys Ala Thr	
1460	1465	1470
Gly Tyr Trp Gly Phe Pro Asn	Cys Arg Pro Cys Asp Cys Gly Ala	
1475	1480	1485
Arg Leu Cys Asp Glu Leu Thr	Gly Gln Cys Ile Cys Pro Pro Arg	
1490	1495	1500
Thr Ile Pro Pro Asp Cys Leu	Leu Cys Gln Pro Gln Thr Phe Gly	
1505	1510	1515
Cys His Pro Leu Val Gly Cys	Glu Glu Cys Asn Cys Ser Gly Pro	
1520	1525	1530
Gly Ile Gln Glu Leu Thr Asp	Pro Thr Cys Asp Thr Asp Ser Gly	
1535	1540	1545
Gln Cys Lys Cys Arg Pro Asn	Val Thr Gly Arg Arg Cys Asp Thr	
1550	1555	1560
Cys Ser Pro Gly Phe His Gly	Tyr Pro Arg Cys Arg Pro Cys Asp	
1565	1570	1575
Cys His Glu Ala Gly Thr Ala	Pro Gly Val Cys Asp Pro Leu Thr	
1580	1585	1590
Gly Gln Cys Tyr Cys Lys Glu	Asn Val Gln Gly Pro Lys Cys Asp	
1595	1600	1605
Gln Cys Ser Leu Gly Thr Phe	Ser Leu Asp Ala Ala Asn Pro Lys	
1610	1615	1620
Gly Cys Thr Arg Cys Phe Cys	Phe Gly Ala Thr Glu Arg Cys Arg	
1625	1630	1635
Ser Ser Ser Tyr Thr Arg Gln	Glu Phe Val Asp Met Glu Gly Trp	
1640	1645	1650
Val Leu Leu Ser Thr Asp Arg	Gln Val Val Pro His Glu Arg Gln	
1655	1660	1665
Pro Gly Thr Glu Met Leu Arg	Ala Asp Leu Arg His Val Pro Glu	
1670	1675	1680
Ala Val Pro Glu Ala Phe Pro	Glu Leu Tyr Trp Gln Ala Pro Pro	
1685	1690	1695
Ser Tyr Leu Gly Asp Arg Val	Ser Ser Tyr Gly Gly Thr Leu Arg	

[0007]

1700	1705	1710
Tyr Glu Leu His Ser Glu Thr Gln Arg Gly Asp Val Phe Val Pro 1715	1720	1725
Met Glu Ser Arg Pro Asp Val Val Leu Gln Gly Asn Gln Met Ser 1730	1735	1740
Ile Thr Phe Leu Glu Pro Ala Tyr Pro Thr Pro Gly His Val His 1745	1750	1755
Arg Gly Gln Leu Gln Leu Val Glu Gly Asn Phe Arg His Thr Glu 1760	1765	1770
Thr Arg Asn Thr Val Ser Arg Glu Glu Leu Met Met Val Leu Ala 1775	1780	1785
Ser Leu Glu Gln Leu Gln Ile Arg Ala Leu Phe Ser Gln Ile Ser 1790	1795	1800
Ser Ala Val Phe Leu Arg Arg Val Ala Leu Glu Val Ala Ser Pro 1805	1810	1815
Ala Gly Gln Gly Ala Leu Ala Ser Asn Val Glu Leu Cys Leu Cys 1820	1825	1830
Pro Ala Ser Tyr Arg Gly Asp Ser Cys Gln Glu Cys Ala Pro Gly 1835	1840	1845
Phe Tyr Arg Asp Val Lys Gly Leu Phe Leu Gly Arg Cys Val Pro 1850	1855	1860
Cys Gln Cys His Gly His Ser Asp Arg Cys Leu Pro Gly Ser Gly 1865	1870	1875
Val Cys Val Asp Cys Gln His Asn Thr Glu Gly Ala His Cys Glu 1880	1885	1890
Arg Cys Gln Ala Gly Phe Val Ser Ser Arg Asp Asp Pro Ser Ala 1895	1900	1905
Pro Cys Val Ser Cys Pro Cys Pro Leu Ser Val Pro Ser Asn Asn 1910	1915	1920
Phe Ala Glu Gly Cys Val Leu Arg Gly Gly Arg Thr Gln Cys Leu 1925	1930	1935
Cys Lys Pro Gly Tyr Ala Gly Ala Ser Cys Glu Arg Cys Ala Pro 1940	1945	1950
Gly Phe Phe Gly Asn Pro Leu Val Leu Gly Ser Ser Cys Gln Pro 1955	1960	1965
Cys Asp Cys Ser Gly Asn Gly Asp Pro Asn Leu Leu Phe Ser Asp 1970	1975	1980
Cys Asp Pro Leu Thr Gly Ala Cys Arg Gly Cys Leu Arg His Thr		

[0008]

1985	1990	1995
Thr Gly Pro Arg Cys Glu Ile 2000	Cys Ala Pro Gly Phe 2005	Tyr Gly Asn 2010
Ala Leu Leu Pro Gly Asn Cys 2015	Thr Arg Cys Asp Cys 2020	Thr Pro Cys 2025
Gly Thr Glu Ala Cys Asp Pro 2030	His Ser Gly His Cys 2035	Leu Cys Lys 2040
Ala Gly Val Thr Gly Arg Arg 2045	Cys Asp Arg Cys Gln 2050	Glu Gly His 2055
Phe Gly Phe Asp Gly Cys Gly 2060	Gly Cys Arg Pro Cys 2065	Ala Cys Gly 2070
Pro Ala Ala Glu Gly Ser Glu 2075	Cys His Pro Gln Ser 2080	Gly Gln Cys 2085
His Cys Arg Pro Gly Thr Met 2090	Gly Pro Gln Cys Arg 2095	Glu Cys Ala 2100
Pro Gly Tyr Trp Gly Leu Pro 2105	Glu Gln Gly Cys Arg 2110	Arg Cys Gln 2115
Cys Pro Gly Gly Arg Cys Asp 2120	Pro His Thr Gly Arg 2125	Cys Asn Cys 2130
Pro Pro Gly Leu Ser Gly Glu 2135	Arg Cys Asp Thr Cys 2140	Ser Gln Gln 2145
His Gln Val Pro Val Pro Gly 2150	Gly Pro Val Gly His 2155	Ser Ile His 2160
Cys Glu Val Cys Asp His Cys 2165	Val Val Leu Leu Leu 2170	Asp Asp Leu 2175
Glu Arg Ala Gly Ala Leu Leu 2180	Pro Ala Ile His Glu 2185	Gln Leu Arg 2190
Gly Ile Asn Ala Ser Ser Met 2195	Ala Trp Ala Arg Leu 2200	His Arg Leu 2205
Asn Ala Ser Ile Ala Asp Leu 2210	Gln Ser Gln Leu Arg 2215	Ser Pro Leu 2220
Gly Pro Arg His Glu Thr Ala 2225	Gln Gln Leu Glu Val 2230	Leu Glu Gln 2235
Gln Ser Thr Ser Leu Gly Gln 2240	Asp Ala Arg Arg Leu 2245	Gly Gly Gln 2250
Ala Val Gly Thr Arg Asp Gln 2255	Ala Ser Gln Leu Leu 2260	Ala Gly Thr 2265
Glu Ala Thr Leu Gly His Ala 2270	Lys Thr Leu Leu Ala 2275	Ala Ile Arg 2280

[0009]

2270	2275	2280
Ala Val Asp Arg Thr Leu Ser Glu Leu Met Ser Gln Thr Gly His 2285	2290	2295
Leu Gly Leu Ala Asn Ala Ser Ala Pro Ser Gly Glu Gln Leu Leu 2300	2305	2310
Arg Thr Leu Ala Glu Val Glu Arg Leu Leu Trp Glu Met Arg Ala 2315	2320	2325
Arg Asp Leu Gly Ala Pro Gln Ala Ala Ala Glu Ala Glu Leu Ala 2330	2335	2340
Ala Ala Gln Arg Leu Leu Ala Arg Val Gln Glu Gln Leu Ser Ser 2345	2350	2355
Leu Trp Glu Glu Asn Gln Ala Leu Ala Thr Gln Thr Arg Asp Arg 2360	2365	2370
Leu Ala Gln His Glu Ala Gly Leu Met Asp Leu Arg Glu Ala Leu 2375	2380	2385
Asn Arg Ala Val Asp Ala Thr Arg Glu Ala Gln Glu Leu Asn Ser 2390	2395	2400
Arg Asn Gln Glu Arg Leu Glu Glu Ala Leu Gln Arg Lys Gln Glu 2405	2410	2415
Leu Ser Arg Asp Asn Ala Thr Leu Gln Ala Thr Leu His Ala Ala 2420	2425	2430
Arg Asp Thr Leu Ala Ser Val Phe Arg Leu Leu His Ser Leu Asp 2435	2440	2445
Gln Ala Lys Glu Glu Leu Glu Arg Leu Ala Ala Ser Leu Asp Gly 2450	2455	2460
Ala Arg Thr Pro Leu Leu Gln Arg Met Gln Thr Phe Ser Pro Ala 2465	2470	2475
Gly Ser Lys Leu Arg Leu Val Glu Ala Ala Glu Ala His Ala Gln 2480	2485	2490
Gln Leu Gly Gln Leu Ala Leu Asn Leu Ser Ser Ile Ile Leu Asp 2495	2500	2505
Val Asn Gln Asp Arg Leu Thr Gln Arg Ala Ile Glu Ala Ser Asn 2510	2515	2520
Ala Tyr Ser Arg Ile Leu Gln Ala Val Gln Ala Ala Glu Asp Ala 2525	2530	2535
Ala Gly Gln Ala Leu Gln Gln Ala Asp His Thr Trp Ala Thr Val 2540	2545	2550
Val Arg Gln Gly Leu Val Asp Arg Ala Gln Gln Leu Leu Ala Asn		

[0010]

2555	2560	2565
Ser Thr Ala Leu Glu Glu	Ala Met Leu Gln Glu	Gln Gln Arg Leu
2570	2575	2580
Gly Leu Val Trp Ala Ala	Leu Gln Gly Ala Arg	Thr Gln Leu Arg
2585	2590	2595
Asp Val Arg Ala Lys Lys	Asp Gln Leu Glu Ala	His Ile Gln Ala
2600	2605	2610
Ala Gln Ala Met Leu Ala	Met Asp Thr Asp Glu Thr	Ser Lys Lys
2615	2620	2625
Ile Ala His Ala Lys Ala	Val Ala Ala Glu Ala	Gln Asp Thr Ala
2630	2635	2640
Thr Arg Val Gln Ser Gln	Leu Gln Ala Met Gln	Glu Asn Val Glu
2645	2650	2655
Arg Trp Gln Gly Gln Tyr	Glu Gly Leu Arg Gly	Gln Asp Leu Gly
2660	2665	2670
Gln Ala Val Leu Asp Ala	Gly His Ser Val Ser	Thr Leu Glu Lys
2675	2680	2685
Thr Leu Pro Gln Leu Leu	Ala Lys Leu Ser Ile	Leu Glu Asn Arg
2690	2695	2700
Gly Val His Asn Ala Ser	Leu Ala Leu Ser Ala	Ser Ile Gly Arg
2705	2710	2715
Val Arg Glu Leu Ile Ala	Gln Ala Arg Gly Ala	Ala Ser Lys Val
2720	2725	2730
Lys Val Pro Met Lys Phe	Asn Gly Arg Ser Gly	Val Gln Leu Arg
2735	2740	2745
Thr Pro Arg Asp Leu Ala	Asp Leu Ala Ala Tyr	Thr Ala Leu Lys
2750	2755	2760
Phe Tyr Leu Gln Gly Pro	Glu Pro Glu Pro Gly	Gln Gly Thr Glu
2765	2770	2775
Asp Arg Phe Val Met Tyr	Met Gly Ser Arg Gln	Ala Thr Gly Asp
2780	2785	2790
Tyr Met Gly Val Ser Leu	Arg Asp Lys Lys Val	His Trp Val Tyr
2795	2800	2805
Gln Leu Gly Glu Ala Gly	Pro Ala Val Leu Ser	Ile Asp Glu Asp
2810	2815	2820
Ile Gly Glu Gln Phe Ala	Ala Val Ser Leu Asp	Arg Thr Leu Gln
2825	2830	2835
Phe Gly His Met Ser Val	Thr Val Glu Arg Gln	Met Ile Gln Glu

[0011]

2840	2845	2850
Thr Lys Gly Asp Thr Val 2855	Ala Pro Gly Ala Glu 2860	Gly Leu Leu Asn 2865
Leu Arg Pro Asp Asp Phe Val 2870	Phe Tyr Val Gly 2875	Gly Tyr Pro Ser 2880
Thr Phe Thr Pro Pro Pro 2885	Leu Leu Arg Phe Pro 2890	Gly Tyr Arg Gly 2895
Cys Ile Glu Met Asp Thr 2900	Leu Asn Glu Glu Val 2905	Val Ser Leu Tyr 2910
Asn Phe Glu Arg Thr Phe 2915	Gln Leu Asp Thr Ala 2920	Val Asp Arg Pro 2925
Cys Ala Arg Ser Lys Ser 2930	Thr Gly Asp Pro Trp 2935	Leu Thr Asp Gly 2940
Ser Tyr Leu Asp Gly Thr 2945	Gly Phe Ala Arg Ile 2950	Ser Phe Asp Ser 2955
Gln Ile Ser Thr Thr Lys 2960	Arg Phe Glu Gln Glu 2965	Leu Arg Leu Val 2970
Ser Tyr Ser Gly Val Leu 2975	Phe Phe Leu Lys Gln 2980	Gln Ser Gln Phe 2985
Leu Cys Leu Ala Val Gln 2990	Glu Gly Ser Leu Val 2995	Leu Leu Tyr Asp 3000
Phe Gly Ala Gly Leu Lys 3005	Lys Ala Val Pro Leu 3010	Gln Pro Pro Pro 3015
Pro Leu Thr Ser Ala Ser 3020	Lys Ala Ile Gln Val 3025	Phe Leu Leu Gly 3030
Gly Ser Arg Lys Arg Val 3035	Leu Val Arg Val Glu 3040	Arg Ala Thr Val 3045
Tyr Ser Val Glu Gln Asp 3050	Asn Asp Leu Glu Leu 3055	Ala Asp Ala Tyr 3060
Tyr Leu Gly Gly Val Pro 3065	Pro Asp Gln Leu Pro 3070	Pro Ser Leu Arg 3075
Arg Leu Phe Pro Thr Gly 3080	Gly Ser Val Arg Gly 3085	Cys Val Lys Gly 3090
Ile Lys Ala Leu Gly Lys 3095	Tyr Val Asp Leu Lys 3100	Arg Leu Asn Thr 3105
Thr Gly Val Ser Ala Gly 3110	Cys Thr Ala Asp Leu 3115	Leu Val Gly Arg 3120
Ala Met Thr Phe His Gly 3125	His Gly Phe Leu Arg 3130	Leu Ala Leu Ser 3135

[0012]

3125	3130	3135
Asn Val Ala Pro Leu Thr Gly 3140	Asn Val Tyr Ser Gly 3145	Phe Gly Phe 3150
His Ser Ala Gln Asp Ser Ala 3155	Leu Leu Tyr Tyr Arg 3160	Ala Ser Pro 3165
Asp Gly Leu Cys Gln Val Ser 3170	Leu Gln Gln Gly Arg 3175	Val Ser Leu 3180
Gln Leu Leu Arg Thr Glu Val 3185	Lys Thr Gln Ala Gly 3190	Phe Ala Asp 3195
Gly Ala Pro His Tyr Val Ala 3200	Phe Tyr Ser Asn Ala 3205	Thr Gly Val 3210
Trp Leu Tyr Val Asp Asp Gln 3215	Leu Gln Gln Met Lys 3220	Pro His Arg 3225
Gly Pro Pro Pro Glu Leu Gln 3230	Pro Gln Pro Glu Gly 3235	Pro Pro Arg 3240
Leu Leu Leu Gly Gly Leu Pro 3245	Glu Ser Gly Thr Ile 3250	Tyr Asn Phe 3255
Ser Gly Cys Ile Ser Asn Val 3260	Phe Val Gln Arg Leu 3265	Leu Gly Pro 3270
Gln Arg Val Phe Asp Leu Gln 3275	Gln Asn Leu Gly Ser 3280	Val Asn Val 3285
Ser Thr Gly Cys Ala Pro Ala 3290	Leu Gln Ala Gln Thr 3295	Pro Gly Leu 3300
Gly Pro Arg Gly Leu Gln Ala 3305	Thr Ala Arg Lys Ala 3310	Ser Arg Arg 3315
Ser Arg Gln Pro Ala Arg His 3320	Pro Ala Cys Met Leu 3325	Pro Pro His 3330
Leu Arg Thr Thr Arg Asp Ser 3335	Tyr Gln Phe Gly Gly 3340	Ser Leu Ser 3345
Ser His Leu Glu Phe Val Gly 3350	Ile Leu Ala Arg His 3355	Arg Asn Trp 3360
Pro Ser Leu Ser Met His Val 3365	Leu Pro Arg Ser Ser 3370	Arg Gly Leu 3375
Leu Leu Phe Thr Ala Arg Leu 3380	Arg Pro Gly Ser Pro 3385	Ser Leu Ala 3390
Leu Phe Leu Ser Asn Gly His 3395	Phe Val Ala Gln Met 3400	Glu Gly Leu 3405
Gly Thr Arg Leu Arg Ala Gln 3410	Ser Arg Gln Arg Ser 3415	Arg Pro Gly 3420

[0013]

3410	3415	3420
Arg Trp His Lys Val Ser	Val Arg Trp Glu Lys Asn	Arg Ile Leu
3425	3430	3435
Leu Val Thr Asp Gly Ala	Arg Ala Trp Ser Gln Glu	Gly Pro His
3440	3445	3450
Arg Gln His Gln Gly Ala	Glu His Pro Gln Pro His	Thr Leu Phe
3455	3460	3465
Val Gly Gly Leu Pro Ala	Ser Ser His Ser Ser Lys	Leu Pro Val
3470	3475	3480
Thr Val Gly Phe Ser Gly	Cys Val Lys Arg Leu Arg	Leu His Gly
3485	3490	3495
Arg Pro Leu Gly Ala Pro	Thr Arg Met Ala Gly Val	Thr Pro Cys
3500	3505	3510
Ile Leu Gly Pro Leu Glu	Ala Gly Leu Phe Phe Pro	Gly Ser Gly
3515	3520	3525
Gly Val Ile Thr Leu Asp	Leu Pro Gly Ala Thr Leu	Pro Asp Val
3530	3535	3540
Gly Leu Glu Leu Glu Val	Arg Pro Leu Ala Val Thr	Gly Leu Ile
3545	3550	3555
Phe His Leu Gly Gln Ala	Arg Thr Pro Pro Tyr Leu	Gln Leu Gln
3560	3565	3570
Val Thr Glu Lys Gln Val	Leu Leu Arg Ala Asp Asp	Gly Ala Gly
3575	3580	3585
Glu Phe Ser Thr Ser Val	Thr Arg Pro Ser Val Leu	Cys Asp Gly
3590	3595	3600
Gln Trp His Arg Leu Ala	Val Met Lys Ser Gly Asn	Val Leu Arg
3605	3610	3615
Leu Glu Val Asp Ala Gln	Ser Asn His Thr Val Gly	Pro Leu Leu
3620	3625	3630
Ala Ala Ala Ala Gly Ala	Pro Ala Pro Leu Tyr Leu	Gly Gly Leu
3635	3640	3645
Pro Glu Pro Met Ala Val	Gln Pro Trp Pro Pro Ala	Tyr Cys Gly
3650	3655	3660
Cys Met Arg Arg Leu Ala	Val Asn Arg Ser Pro Val	Ala Met Thr
3665	3670	3675
Arg Ser Val Glu Val His	Gly Ala Val Gly Ala Ser	Gly Cys Pro
3680	3685	3690
Ala Ala		

[0014]

3695

<210> 2

<211> 1811

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```

Met Glu Leu Thr Ser Arg Glu Arg Gly Arg Gly Gln Pro Leu Pro Trp
 1          5          10          15

Glu Leu Arg Leu Gly Leu Leu Leu Ser Val Leu Ala Ala Thr Leu Ala
 20          25          30

Gln Ala Pro Ala Pro Asp Val Pro Gly Cys Ser Arg Gly Ser Cys Tyr
 35          40          45

Pro Ala Thr Gly Asp Leu Leu Val Gly Arg Ala Asp Arg Leu Thr Ala
 50          55          60

Ser Ser Thr Cys Gly Leu Asn Gly Pro Gln Pro Tyr Cys Ile Val Ser
 65          70          75          80

His Leu Gln Asp Glu Lys Lys Cys Phe Leu Cys Asp Ser Arg Arg Pro
 85          90          95

Phe Ser Ala Arg Asp Asn Pro His Ser His Arg Ile Gln Asn Val Val
100          105          110

Thr Ser Phe Ala Pro Gln Arg Arg Ala Ala Trp Trp Gln Ser Glu Asn
115          120          125

Gly Ile Pro Ala Val Thr Ile Gln Leu Asp Leu Glu Ala Glu Phe His
130          135          140

Phe Thr His Leu Ile Met Thr Phe Lys Thr Phe Arg Pro Ala Ala Met
145          150          155          160

Leu Val Glu Arg Ser Ala Asp Phe Gly Arg Thr Trp His Val Tyr Arg
165          170          175

Tyr Phe Ser Tyr Asp Cys Gly Ala Asp Phe Pro Gly Val Pro Leu Ala
180          185          190

Pro Pro Arg His Trp Asp Asp Val Val Cys Glu Ser Arg Tyr Ser Glu
195          200          205

Ile Glu Pro Ser Thr Glu Gly Glu Val Ile Tyr Arg Val Leu Asp Pro
210          215          220

Ala Ile Pro Ile Pro Asp Pro Tyr Ser Ser Arg Ile Gln Asn Leu Leu
225          230          235

Lys Ile Thr Asn Leu Arg Val Asn Leu Thr Arg Leu His Thr Leu Gly
245          250          255

Asp Asn Leu Leu Asp Pro Arg Arg Glu Ile Arg Glu Lys Tyr Tyr Tyr
260          265          270

```

[0015]

Ala Leu Tyr Glu Leu Val Val Arg Gly Asn Cys Phe Cys Tyr Gly His
 275 280 285
 Ala Ser Glu Cys Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro Ala His Ala Glu Gly
 290 295 300
 Met Val His Gly Ala Cys Ile Cys Lys His Asn Thr Arg Gly Leu Asn
 305 310 315 320
 Cys Glu Gln Cys Gln Asp Phe Tyr Arg Asp Leu Pro Trp Arg Pro Ala
 325 330 335
 Glu Asp Gly His Ser His Ala Cys Arg Lys Cys Glu Cys His Gly His
 340 345 350
 Thr His Ser Cys His Phe Asp Met Ala Val Tyr Leu Ala Ser Gly Asn
 355 360 365
 Val Ser Gly Gly Val Cys Asp Gly Cys Gln His Asn Thr Ala Gly Arg
 370 375 380
 His Cys Glu Leu Cys Arg Pro Phe Phe Tyr Arg Asp Pro Thr Lys Asp
 385 390 395 400
 Leu Arg Asp Pro Ala Val Cys Arg Ser Cys Asp Cys Asp Pro Met Gly
 405 410 415
 Ser Gln Asp Gly Gly Arg Cys Asp Ser His Asp Asp Pro Ala Leu Gly
 420 425 430
 Leu Val Ser Gly Gln Cys Arg Cys Lys Glu His Val Val Gly Thr Arg
 435 440 445
 Cys Gln Gln Cys Arg Asp Gly Phe Phe Gly Leu Ser Ile Ser Asp Arg
 450 455 460
 Leu Gly Cys Arg Arg Cys Gln Cys Asn Ala Arg Gly Thr Val Pro Gly
 465 470 475 480
 Ser Thr Pro Cys Asp Pro Asn Ser Gly Ser Cys Tyr Cys Lys Arg Leu
 485 490 495
 Val Thr Gly Arg Gly Cys Asp Arg Cys Leu Pro Gly His Trp Gly Leu
 500 505 510
 Ser His Asp Leu Leu Gly Cys Arg Pro Cys Asp Cys Asp Val Gly Gly
 515 520 525
 Ala Leu Asp Pro Gln Cys Asp Glu Gly Thr Gly Gln Cys His Cys Arg
 530 535 540
 Gln His Met Val Gly Arg Arg Cys Glu Gln Val Gln Pro Gly Tyr Phe
 545 550 555 560
 Arg Pro Phe Leu Asp His Leu Ile Trp Glu Ala Glu Asp Thr Arg Gly
 565 570 575

[0016]

Gln Val Leu Asp Val Val Glu Arg Leu Val Thr Pro Gly Glu Thr Pro
 580 585 590
 Ser Trp Thr Gly Ser Gly Phe Val Arg Leu Gln Glu Gly Gln Thr Leu
 595 600 605
 Glu Phe Leu Val Ala Ser Val Pro Lys Ala Met Asp Tyr Asp Leu Leu
 610 615 620
 Leu Arg Leu Glu Pro Gln Val Pro Glu Gln Trp Ala Glu Leu Glu Leu
 625 630 635 640
 Ile Val Gln Arg Pro Gly Pro Val Pro Ala His Ser Leu Cys Gly His
 645 650 655
 Leu Val Pro Lys Asp Asp Arg Ile Gln Gly Thr Leu Gln Pro His Ala
 660 665 670
 Arg Tyr Leu Ile Phe Pro Asn Pro Val Cys Leu Glu Pro Gly Ile Ser
 675 680 685
 Tyr Lys Leu His Leu Lys Leu Val Arg Thr Gly Gly Ser Ala Gln Pro
 690 695 700
 Glu Thr Pro Tyr Ser Gly Pro Gly Leu Leu Ile Asp Ser Leu Val Leu
 705 710 715 720
 Leu Pro Arg Val Leu Val Leu Glu Met Phe Ser Gly Gly Asp Ala Ala
 725 730 735
 Ala Leu Glu Arg Gln Ala Thr Phe Glu Arg Tyr Gln Cys His Glu Glu
 740 745 750
 Gly Leu Val Pro Ser Lys Thr Ser Pro Ser Glu Ala Cys Ala Pro Leu
 755 760 765
 Leu Ile Ser Leu Ser Thr Leu Ile Tyr Asn Gly Ala Leu Pro Cys Gln
 770 775 780
 Cys Asn Pro Gln Gly Ser Leu Ser Ser Glu Cys Asn Pro His Gly Gly
 785 790 795 800
 Gln Cys Leu Cys Lys Pro Gly Val Val Gly Arg Arg Cys Asp Leu Cys
 805 810 815
 Ala Pro Gly Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Thr Gly Cys Gln Ala Cys Gln
 820 825 830
 Cys Ser His Glu Gly Ala Leu Ser Ser Leu Cys Glu Lys Thr Ser Gly
 835 840 845
 Gln Cys Leu Cys Arg Thr Gly Ala Phe Gly Leu Arg Cys Asp Arg Cys
 850 855 860
 Gln Arg Gly Gln Trp Gly Phe Pro Ser Cys Arg Pro Cys Val Cys Asn
 865 870 875 880

[0017]

Gly His Ala Asp Glu Cys Asn Thr His Thr Gly Ala Cys Leu Gly Cys
 885 890 895
 Arg Asp His Thr Gly Gly Glu His Cys Glu Arg Cys Ile Ala Gly Phe
 900 905 910
 His Gly Asp Pro Arg Leu Pro Tyr Gly Gly Gln Cys Arg Pro Cys Pro
 915 920 925
 Cys Pro Glu Gly Pro Gly Ser Gln Arg His Phe Ala Thr Ser Cys His
 930 935 940
 Gln Asp Glu Tyr Ser Gln Gln Ile Val Cys His Cys Arg Ala Gly Tyr
 945 950 955 960
 Thr Gly Leu Arg Cys Glu Ala Cys Ala Pro Gly His Phe Gly Asp Pro
 965 970 975
 Ser Arg Pro Gly Gly Arg Cys Gln Leu Cys Glu Cys Ser Gly Asn Ile
 980 985 990
 Asp Pro Met Asp Pro Asp Ala Cys Asp Pro His Thr Gly Gln Cys Leu
 995 1000 1005
 Arg Cys Leu His His Thr Glu Gly Pro His Cys Ala His Cys Lys
 1010 1015 1020
 Pro Gly Phe His Gly Gln Ala Ala Arg Gln Ser Cys His Arg Cys
 1025 1030 1035
 Thr Cys Asn Leu Leu Gly Thr Asn Pro Gln Gln Cys Pro Ser Pro
 1040 1045 1050
 Asp Gln Cys His Cys Asp Pro Ser Ser Gly Gln Cys Pro Cys Leu
 1055 1060 1065
 Pro Asn Val Gln Gly Pro Ser Cys Asp Arg Cys Ala Pro Asn Phe
 1070 1075 1080
 Trp Asn Leu Thr Ser Gly His Gly Cys Gln Pro Cys Ala Cys His
 1085 1090 1095
 Pro Ser Arg Ala Arg Gly Pro Thr Cys Asn Glu Phe Thr Gly Gln
 1100 1105 1110
 Cys His Cys Arg Ala Gly Phe Gly Gly Arg Thr Cys Ser Glu Cys
 1115 1120 1125
 Gln Glu Leu His Trp Gly Asp Pro Gly Leu Gln Cys His Ala Cys
 1130 1135 1140
 Asp Cys Asp Ser Arg Gly Ile Asp Thr Pro Gln Cys His Arg Phe
 1145 1150 1155
 Thr Gly His Cys Ser Cys Arg Pro Gly Val Ser Gly Val Arg Cys
 1160 1165 1170

[0018]

Asp Gln Cys Ala Arg Gly Phe Ser Gly Ile Phe Pro Ala Cys His 1175 1180 1185
Pro Cys His Ala Cys Phe Gly Asp Trp Asp Arg Val Val Gln Asp 1190 1195 1200
Leu Ala Ala Arg Thr Gln Arg Leu Glu Gln Arg Ala Gln Glu Leu 1205 1210 1215
Gln Gln Thr Gly Val Leu Gly Ala Phe Glu Ser Ser Phe Trp His 1220 1225 1230
Met Gln Glu Lys Leu Gly Ile Val Gln Gly Ile Val Gly Ala Arg 1235 1240 1245
Asn Thr Ser Ala Ala Ser Thr Ala Gln Leu Val Glu Ala Thr Glu 1250 1255 1260
Gln Leu Arg Arg Glu Ile Gly Glu Ala Thr Glu His Leu Thr Gln 1265 1270 1275
Leu Glu Ala Asp Leu Thr Asp Val Gln Asp Glu Asn Phe Asn Ala 1280 1285 1290
Asn His Ala Leu Ser Gly Leu Glu Arg Asp Arg Leu Ala Leu Asn 1295 1300 1305
Leu Thr Leu Arg Gln Leu Asp Gln His Leu Asp Leu Leu Lys His 1310 1315 1320
Ser Asn Phe Leu Gly Ala Tyr Asp Ser Ile Arg His Ala His Ser 1325 1330 1335
Gln Ser Ala Glu Ala Glu Arg Arg Ala Asn Thr Ser Ala Leu Ala 1340 1345 1350
Val Pro Ser Pro Val Ser Asn Ser Ala Ser Ala Arg His Arg Thr 1355 1360 1365
Glu Ala Leu Met Asp Ala Gln Lys Glu Asp Phe Asn Ser Lys His 1370 1375 1380
Met Ala Asn Gln Arg Ala Leu Gly Lys Leu Ser Ala His Thr His 1385 1390 1395
Thr Leu Ser Leu Thr Asp Ile Asn Glu Leu Val Cys Gly Ala Pro 1400 1405 1410
Gly Asp Ala Pro Cys Ala Thr Ser Pro Cys Gly Gly Ala Gly Cys 1415 1420 1425
Arg Asp Glu Asp Gly Gln Pro Arg Cys Gly Gly Leu Ser Cys Asn 1430 1435 1440
Gly Ala Ala Ala Thr Ala Asp Leu Ala Leu Gly Arg Ala Arg His 1445 1450 1455

[0019]

Thr	Gln	Ala	Glu	Leu	Gln	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Ser	Ile
1460						1465					1470			
Leu	Ser	Arg	Val	Ala	Glu	Thr	Arg	Arg	Gln	Ala	Ser	Glu	Ala	Gln
1475						1480					1485			
Gln	Arg	Ala	Gln	Ala	Ala	Leu	Asp	Lys	Ala	Asn	Ala	Ser	Arg	Gly
1490						1495					1500			
Gln	Val	Glu	Gln	Ala	Asn	Gln	Glu	Leu	Gln	Glu	Leu	Ile	Gln	Ser
1505						1510					1515			
Val	Lys	Asp	Phe	Leu	Asn	Gln	Glu	Gly	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Ile
1520						1525					1530			
Glu	Met	Val	Ala	Thr	Arg	Val	Leu	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Ala	Ser
1535						1540					1545			
Ala	Glu	Gln	Ile	Gln	His	Leu	Ala	Gly	Ala	Ile	Ala	Glu	Arg	Val
1550						1555					1560			
Arg	Ser	Leu	Ala	Asp	Val	Asp	Ala	Ile	Leu	Ala	Arg	Thr	Val	Gly
1565						1570					1575			
Asp	Val	Arg	Arg	Ala	Glu	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp	Ala	Arg	Arg	Ala
1580						1585					1590			
Arg	Ser	Trp	Ala	Glu	Asp	Glu	Lys	Gln	Lys	Ala	Glu	Thr	Val	Gln
1595						1600					1605			
Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Ala	Gln	Arg	Ala	Gln	Gly	Ile	Ala	Gln	Gly
1610						1615					1620			
Ala	Ile	Arg	Gly	Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Arg	Asp	Thr	Glu	Gln	Thr
1625						1630					1635			
Leu	Tyr	Gln	Val	Gln	Glu	Arg	Met	Ala	Gly	Ala	Glu	Arg	Ala	Leu
1640						1645					1650			
Ser	Ser	Ala	Gly	Glu	Arg	Ala	Arg	Gln	Leu	Asp	Ala	Leu	Leu	Glu
1655						1660					1665			
Ala	Leu	Lys	Leu	Lys	Arg	Ala	Gly	Asn	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Thr
1670						1675					1680			
Ala	Glu	Glu	Thr	Ala	Gly	Ser	Ala	Gln	Gly	Arg	Ala	Gln	Glu	Ala
1685						1690					1695			
Glu	Gln	Leu	Leu	Arg	Gly	Pro	Leu	Gly	Asp	Gln	Tyr	Gln	Thr	Val
1700						1705					1710			
Lys	Ala	Leu	Ala	Glu	Arg	Lys	Ala	Gln	Gly	Val	Leu	Ala	Ala	Gln
1715						1720					1725			
Ala	Arg	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Asp	Glu	Ala	Arg	Asp	Leu	Leu	Gln
1730						1735					1740			

[0020]

Ala Ala Gln Asp Lys Leu Gln Arg Leu Gln Glu Leu Glu Gly Thr
 1745 1750 1755
 Tyr Glu Glu Asn Glu Arg Ala Leu Glu Ser Lys Ala Ala Gln Leu
 1760 1765 1770
 Asp Gly Leu Glu Ala Arg Met Arg Ser Val Leu Gln Ala Ile Asn
 1775 1780 1785
 Leu Gln Val Gln Ile Tyr Asn Thr Cys Gln Lys Ser Ser Trp Pro
 1790 1795 1800
 Gly Arg Ala Pro Asn Lys Pro Val
 1805 1810
 <210> 3
 <211> 1609
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 3
 Met Arg Gly Ser His Arg Ala Ala Pro Ala Leu Arg Pro Arg Gly Arg
 1 5 10 15
 Leu Trp Pro Val Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys
 20 25 30
 Ala Gln Ala Ala Met Asp Glu Cys Thr Asp Glu Gly Gly Arg Pro Gln
 35 40 45
 Arg Cys Met Pro Glu Phe Val Asn Ala Ala Phe Asn Val Thr Val Val
 50 55 60
 Ala Thr Asn Thr Cys Gly Thr Pro Pro Glu Glu Tyr Cys Val Gln Thr
 65 70 75 80
 Gly Val Thr Gly Val Thr Lys Ser Cys His Leu Cys Asp Ala Gly Gln
 85 90 95
 Pro His Leu Gln His Gly Ala Ala Phe Leu Thr Asp Tyr Asn Asn Gln
 100 105 110
 Ala Asp Thr Thr Trp Trp Gln Ser Gln Thr Met Leu Ala Gly Val Gln
 115 120 125
 Tyr Pro Ser Ser Ile Asn Leu Thr Leu His Leu Gly Lys Ala Phe Asp
 130 135 140
 Ile Thr Tyr Val Arg Leu Lys Phe His Thr Ser Arg Pro Glu Ser Phe
 145 150 155 160
 Ala Ile Tyr Lys Arg Thr Arg Glu Asp Gly Pro Trp Ile Pro Tyr Gln
 165 170 175
 Tyr Tyr Ser Gly Ser Cys Glu Asn Thr Tyr Ser Lys Ala Asn Arg Gly
 180 185 190

[0021]

Phe Ile Arg Thr Gly Gly Asp Glu Gln Gln Ala Leu Cys Thr Asp Glu
 195 200 205
 Phe Ser Asp Ile Ser Pro Leu Thr Gly Gly Asn Val Ala Phe Ser Thr
 210 215 220
 Leu Glu Gly Arg Pro Ser Ala Tyr Asn Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu
 225 230 235 240
 Gln Glu Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Thr Leu Asn Arg Leu
 245 250 255
 Asn Thr Phe Gly Asp Glu Val Phe Asn Asp Pro Lys Val Leu Lys Ser
 260 265 270
 Tyr Tyr Tyr Ala Ile Ser Asp Phe Ala Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys
 275 280 285
 Asn Gly His Ala Ser Glu Cys Met Lys Asn Glu Phe Asp Lys Leu Val
 290 295 300
 Cys Asn Cys Lys His Asn Thr Tyr Gly Val Asp Cys Glu Lys Cys Leu
 305 310 315 320
 Pro Phe Phe Asn Asp Arg Pro Trp Arg Arg Ala Thr Ala Glu Ser Ala
 325 330 335
 Ser Glu Cys Leu Pro Cys Asp Cys Asn Gly Arg Ser Gln Glu Cys Tyr
 340 345 350
 Phe Asp Pro Glu Leu Tyr Arg Ser Thr Gly His Gly Gly His Cys Thr
 355 360 365
 Asn Cys Gln Asp Asn Thr Asp Gly Ala His Cys Glu Arg Cys Arg Glu
 370 375 380
 Asn Phe Phe Arg Leu Gly Asn Asn Glu Ala Cys Ser Ser Cys His Cys
 385 390 395 400
 Ser Pro Val Gly Ser Leu Ser Thr Gln Cys Asp Ser Tyr Gly Arg Cys
 405 410 415
 Ser Cys Lys Pro Gly Val Met Gly Asp Lys Cys Asp Arg Cys Gln Pro
 420 425 430
 Gly Phe His Ser Leu Thr Glu Ala Gly Cys Arg Pro Cys Ser Cys Asp
 435 440 445
 Pro Ser Gly Ser Ile Asp Glu Cys Asn Ile Glu Thr Gly Arg Cys Val
 450 455 460
 Cys Lys Asp Asn Val Glu Gly Phe Asn Cys Glu Arg Cys Lys Pro Gly
 465 470 475 480
 Phe Phe Asn Leu Glu Ser Ser Asn Pro Arg Gly Cys Thr Pro Cys Phe
 485 490 495

[0022]

Cys Phe Gly His Ser Ser Val Cys Thr Asn Ala Val Gly Tyr Ser Val
 500 505 510
 Tyr Ser Ile Ser Ser Thr Phe Gln Ile Asp Glu Asp Gly Trp Arg Ala
 515 520 525
 Glu Gln Arg Asp Gly Ser Glu Ala Ser Leu Glu Trp Ser Ser Glu Arg
 530 535 540
 Gln Asp Ile Ala Val Ile Ser Asp Ser Tyr Phe Pro Arg Tyr Phe Ile
 545 550 555 560
 Ala Pro Ala Lys Phe Leu Gly Lys Gln Val Leu Ser Tyr Gly Gln Asn
 565 570 575
 Leu Ser Phe Ser Phe Arg Val Asp Arg Arg Asp Thr Arg Leu Ser Ala
 580 585 590
 Glu Asp Leu Val Leu Glu Gly Ala Gly Leu Arg Val Ser Val Pro Leu
 595 600 605
 Ile Ala Gln Gly Asn Ser Tyr Pro Ser Glu Thr Thr Val Lys Tyr Val
 610 615 620
 Phe Arg Leu His Glu Ala Thr Asp Tyr Pro Trp Arg Pro Ala Leu Thr
 625 630 635 640
 Pro Phe Glu Phe Gln Lys Leu Leu Asn Asn Leu Thr Ser Ile Lys Ile
 645 650 655
 Arg Gly Thr Tyr Ser Glu Arg Ser Ala Gly Tyr Leu Asp Asp Val Thr
 660 665 670
 Leu Ala Ser Ala Arg Pro Gly Pro Gly Val Pro Ala Thr Trp Val Glu
 675 680 685
 Ser Cys Thr Cys Pro Val Gly Tyr Gly Gly Gln Phe Cys Glu Met Cys
 690 695 700
 Leu Ser Gly Tyr Arg Arg Glu Thr Pro Asn Leu Gly Pro Tyr Ser Pro
 705 710 715 720
 Cys Val Leu Cys Ala Cys Asn Gly His Ser Glu Thr Cys Asp Pro Glu
 725 730 735
 Thr Gly Val Cys Asn Cys Arg Asp Asn Thr Ala Gly Pro His Cys Glu
 740 745 750
 Lys Cys Ser Asp Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Thr Ala Gly Thr Ser Ser
 755 760 765
 Asp Cys Gln Pro Cys Pro Cys Pro Gly Gly Ser Ser Cys Ala Val Val
 770 775 780
 Pro Lys Thr Lys Glu Val Val Cys Thr Asn Cys Pro Thr Gly Thr Thr
 785 790 795 800

[0023]

Gly Lys Arg Cys Glu Leu Cys Asp Asp Gly Tyr Phe Gly Asp Pro Leu
 805 810 815
 Gly Arg Asn Gly Pro Val Arg Leu Cys Arg Leu Cys Gln Cys Ser Asp
 820 825 830
 Asn Ile Asp Pro Asn Ala Val Gly Asn Cys Asn Arg Leu Thr Gly Glu
 835 840 845
 Cys Leu Lys Cys Ile Tyr Asn Thr Ala Gly Phe Tyr Cys Asp Arg Cys
 850 855 860
 Lys Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ala Asp Lys
 865 870 875 880
 Cys Lys Ala Cys Asn Cys Asn Leu Tyr Gly Thr Met Lys Gln Gln Ser
 885 890 895
 Ser Cys Asn Pro Val Thr Gly Gln Cys Glu Cys Leu Pro His Val Thr
 900 905 910
 Gly Gln Asp Cys Gly Ala Cys Asp Pro Gly Phe Tyr Asn Leu Gln Ser
 915 920 925
 Gly Gln Gly Cys Glu Arg Cys Asp Cys His Ala Leu Gly Ser Thr Asn
 930 935 940
 Gly Gln Cys Asp Ile Arg Thr Gly Gln Cys Glu Cys Gln Pro Gly Ile
 945 950 955 960
 Thr Gly Gln His Cys Glu Arg Cys Glu Val Asn His Phe Gly Phe Gly
 965 970 975
 Pro Glu Gly Cys Lys Pro Cys Asp Cys His Pro Glu Gly Ser Leu Ser
 980 985 990
 Leu Gln Cys Lys Asp Asp Gly Arg Cys Glu Cys Arg Glu Gly Phe Val
 995 1000 1005
 Gly Asn Arg Cys Asp Gln Cys Glu Glu Asn Tyr Phe Tyr Asn Arg
 1010 1015 1020
 Ser Trp Pro Gly Cys Gln Glu Cys Pro Ala Cys Tyr Arg Leu Val
 1025 1030 1035
 Lys Asp Lys Val Ala Asp His Arg Val Lys Leu Gln Glu Leu Glu
 1040 1045 1050
 Ser Leu Ile Ala Asn Leu Gly Thr Gly Asp Glu Met Val Thr Asp
 1055 1060 1065
 Gln Ala Phe Glu Asp Arg Leu Lys Glu Ala Glu Arg Glu Val Met
 1070 1075 1080
 Asp Leu Leu Arg Glu Ala Gln Asp Val Lys Asp Val Asp Gln Asn
 1085 1090 1095

[0024]

Leu Met	Asp Arg Leu Gln Arg	Val Asn Asn Thr	Leu Ser Ser Gln
1100	1105		1110
Ile Ser	Arg Leu Gln Asn Ile	Arg Asn Thr Ile	Glu Glu Thr Gly
1115	1120		1125
Asn Leu	Ala Glu Gln Ala Arg	Ala His Val Glu Asn	Thr Glu Arg
1130	1135		1140
Leu Ile	Glu Ile Ala Ser Arg	Glu Leu Glu Lys Ala	Lys Val Ala
1145	1150		1155
Ala Ala	Asn Val Ser Val Thr	Gln Pro Glu Ser Thr	Gly Asp Pro
1160	1165		1170
Asn Asn	Met Thr Leu Leu Ala	Glu Glu Ala Arg Lys	Leu Ala Glu
1175	1180		1185
Arg His	Lys Gln Glu Ala Asp	Asp Ile Val Arg Val	Ala Lys Thr
1190	1195		1200
Ala Asn	Asp Thr Ser Thr Glu	Ala Tyr Asn Leu Leu	Leu Arg Thr
1205	1210		1215
Leu Ala	Gly Glu Asn Gln Thr	Ala Phe Glu Ile Glu	Glu Leu Asn
1220	1225		1230
Arg Lys	Tyr Glu Gln Ala Lys	Asn Ile Ser Gln Asp	Leu Glu Lys
1235	1240		1245
Gln Ala	Ala Arg Val His Glu	Glu Ala Lys Arg Ala	Gly Asp Lys
1250	1255		1260
Ala Val	Glu Ile Tyr Ala Ser	Val Ala Gln Leu Ser	Pro Leu Asp
1265	1270		1275
Ser Glu	Thr Leu Glu Asn Glu	Ala Asn Asn Ile Lys	Met Glu Ala
1280	1285		1290
Glu Asn	Leu Glu Gln Leu Ile	Asp Gln Lys Leu Lys	Asp Tyr Glu
1295	1300		1305
Asp Leu	Arg Glu Asp Met Arg	Gly Lys Glu Leu Glu	Val Lys Asn
1310	1315		1320
Leu Leu	Glu Lys Gly Lys Thr	Glu Gln Gln Thr Ala	Asp Gln Leu
1325	1330		1335
Leu Ala	Arg Ala Asp Ala Ala	Lys Ala Leu Ala Glu	Glu Ala Ala
1340	1345		1350
Lys Lys	Gly Arg Asp Thr Leu	Gln Glu Ala Asn Asp	Ile Leu Asn
1355	1360		1365
Asn Leu	Lys Asp Phe Asp Arg	Arg Val Asn Asp Asn	Lys Thr Ala
1370	1375		1380

[0025]

Ala Glu Glu Ala Leu Arg Lys Ile Pro Ala Ile Asn Gln Thr Ile
1385 1390 1395

Thr Glu Ala Asn Glu Lys Thr Arg Glu Ala Gln Gln Ala Leu Gly
1400 1405 1410

Ser Ala Ala Ala Asp Ala Thr Glu Ala Lys Asn Lys Ala His Glu
1415 1420 1425

Ala Glu Arg Ile Ala Ser Ala Val Gln Lys Asn Ala Thr Ser Thr
1430 1435 1440

Lys Ala Glu Ala Glu Arg Thr Phe Ala Glu Val Thr Asp Leu Asp
1445 1450 1455

Asn Glu Val Asn Asn Met Leu Lys Gln Leu Gln Glu Ala Glu Lys
1460 1465 1470

Glu Leu Lys Arg Lys Gln Asp Asp Ala Asp Gln Asp Met Met Met
1475 1480 1485

Ala Gly Met Ala Ser Gln Ala Ala Gln Glu Ala Glu Ile Asn Ala
1490 1495 1500

Arg Lys Ala Lys Asn Ser Val Thr Ser Leu Leu Ser Ile Ile Asn
1505 1510 1515

Asp Leu Leu Glu Gln Leu Gly Gln Leu Asp Thr Val Asp Leu Asn
1520 1525 1530

Lys Leu Asn Glu Ile Glu Gly Thr Leu Asn Lys Ala Lys Asp Glu
1535 1540 1545

Met Lys Val Ser Asp Leu Asp Arg Lys Val Ser Asp Leu Glu Asn
1550 1555 1560

Glu Ala Lys Lys Gln Glu Ala Ala Ile Met Asp Tyr Asn Arg Asp
1565 1570 1575

Ile Glu Glu Ile Met Lys Asp Ile Arg Asn Leu Glu Asp Ile Arg
1580 1585 1590

Lys Thr Leu Pro Ser Gly Cys Phe Asn Thr Pro Ser Ile Glu Lys
1595 1600 1605

Pro

<210> 4

<211> 5518

<212> DNA

<213> 人

<400> 4

atggagctga cctcaaggga aagagggagg ggacagcctc tgccttggga acttcgactg 60

ggcctactgc taagegtgct ggetgccaca ctggcacagg cccctgccc ggatgtgcct 120

ggctgttcca ggggaagctg ctacccgcc acgggcgacc tgcitgtggg ccgagctgac 180

[0026]

agaactgactg ccfcacccac ttgtggcctg aatggceccc agccctactg catcgtcagt	240
cacctgcagg acgaaaaaa gtgttcctt tgtgaetccc ggcgccctt ctotgctaga	300
gacaacccac acagecatcg catccagaat gtagtcacca gctttgcacc acageggcgg	360
gcagcctggt ggcagtcaga gaatggtatc cctggcgtea ccatccagct ggacctggag	420
gtctagtttc atttcacaca cctcattatg acctcaaga catttcgccc tgetgccatg	480
ctggtggaac gctcagcaga ctttggccgc acctggcatg tgtaccgata ttctcctat	540
gactgtgggg ctgacttccc aggagtccca ctageacccc caccggcactg ggaatgatga	600
gtctgtgagt cccgctaetc agagattgag ccatccactg aaggcgaggt catctatcgt	660
gtgctggacc ctgccatccc taicccagac ccctacagct caccgattca gaacctgttg	720
aagatcacca acctacgggt gaacctgact cgtctacaca cgttgggaga caacctactc	780
gacccacgga gggagatccg agagaagtac tactatgccc tctatgagct ggttgtacgt	840
ggcaactgct tctgtctacgg acacgectca gagtgtgcac cgcgccagg ggcaccagcc	900
catgtctagg gcatggtgca cggagcttgc atctgcaaac acaacacacg tggcctcaac	960
tgcgagcagt gtcaggattt ctatcgigac ctgccctggc gtccggetga ggacggccat	1020
agtcatgctt gtaggaagtg tgagtccat gggcacaccc acagctgcca ctccgacatg	1080
gcegfatacc tggcatctgg caatgtgagt ggagggtgtg gtgatggatg tcagcataac	1140
acagctgggc gccactgtga gctctgtcgg cccttctct accgtgaccc aaccaaggac	1200
ctgggggac cggctgtgtg ccgtctctgt gattgtgacc ccatgggttc tcaagacggt	1260
ggtcgtgtg attcccatga tgacctgca ctgggactgg tctccggcca gtgtcgtgc	1320
aaagaacaig tgggtggcac tcgtgccag caatgccgtg atggtctctt tgggctcage	1380
atcagtgacc gtctgggctg ccggcgatgt caatgtaatg caccgggcae agtgccggg	1440
agcactcctt gtgaccccaa cagtggatcc tgttactgca aacgtctagt gactggacgt	1500
ggatgtgacc gctgcctgcc tggcactgg ggcttgagcc acgaactget cggctgccgc	1560
ccctgtgact gcgacgtggg tgggtctttg gatccccagt gtgatgaggg cacaggtcaa	1620
tgccactgcc gccagcacat ggttgggca cgtgtgagc aggtgcaacc tggctacttc	1680
cggcccttcc tggaccacct aatttgggag gctgaggaca cccgaggga ggtgctcgat	1740
gtgtgggagc gctgtgtgac ccccgggaa actccatcct ggactggctc aggttctgtg	1800
cggctacagg aaggtcagac cctggagtgc ctgggtgacct ctgtgccga ggetatggac	1860
tatgaacctg tgcctgctt agageccccag gtccctgagc aatgggcaga gttggaactg	1920
attgtgcagc gtccagggcc tgtgcctgcc cacagcctgt gtgggcattt ggtgcccaag	1980
gatgatcgca tccaaggga cctgcaacea catgccaggt acctgatatt tcctaactct	2040
gtctgcttg agcctggial ctccacaag ctgcactga agctggtagc gacaggggga	2100
agtgcaccag ctgagactcc ctactctgga cctggcctgc tcatfgactc gctgggtctg	2160
ctgccccgtg tctgtgtgt agagatgttt agtgggggtg atgtctgtgc cctggagcgc	2220
caggccacct ttgaacgta ccaatgccat gaggagggtc tgggtcccag caagacttct	2280
ccctctgagg cctgcgcacc cctcctcact agcctgtcca cctcateta caatggtgce	2340
ctgccatgtc agtgcaccc tcaaggttca ctgagttctg agtgcaaccc tcatggtggt	2400
cagtgcctgt gcaagcctgg agtgggtggg cgcgcgtgtg acctctgtgc cctggetac	2460

[0027]

tatggetttg gcccacagg ctgtcaagcc tgccagtga gccacgaggg ggcactcagc	2520
agtctctgtg aaaagaccag tgggcaatgt ctctgtcgaa ctgggtgcctt tgggcttcgc	2580
tgtgaccgct gccagcgtgg ccagtgggga ttccctagct gccggccatg tgtctgcaat	2640
gggcatgcag atgagtgcaa caccacaca ggcgcttgcc tgggtgcgc tgateacaca	2700
gggggtgagc acigtgaaag gtgcattgct ggtttccacg gggacccacg gctgccatat	2760
gggggccagt gccggccctg tccctgtcct gaaggccctg ggagccaacg gcactttgct	2820
acttcttgcc accaggatga atattcccag cagatttgtt gccactgccg ggcaggctat	2880
acggggctgc gatgtgaagc ttgtgccctt gggcactttg gggacccatc aaggccaggt	2940
ggccggtgcc aactgtgtga gtgcagtggg aacattgacc caatggatcc tgatgcctgt	3000
gacccccaca cggggcaatg ccgtgcgtgt ttacaccaca cagaggggcc aactgtgcc	3060
cactgcaagc ctggtctcca tgggcaggct gccgcacaga gctgtaccg ctgcacatgc	3120
aacctgttgg gcacaaatcc gcagcagtgc ccattcctg accagtgcca ctgtgatcca	3180
agcagtgggc agtgcccatg cctcccaat gtccagggcc ctagtgtga ccgtgtgcc	3240
cccaacttct ggaacctcac cagtggccat ggttgccagc cttgtgctg ccaccaagc	3300
cgggccagag gcccaccctg caacgagttc acaggcagc gccactgccg tgccggcttt	3360
ggagggcgga ctgtgttga gtccaagag ctccactggg gagaacctgg gtgcagtgc	3420
catgcctgtg atgtgactc tcgtggaata gataacctc agtgtaccg cttcacaggt	3480
cactgcagct gccgcccagg ggtgtctgtt gtgcgtgtg accagtgtgc ccgtggcttc	3540
tcaggaaatc ttctgcctg ccattccctg catgcatgct tcggggattg ggaccgagt	3600
gtgcaggact tggcagcccg tacacagcgc ctagagcagc gggcgagga gttgcaacag	3660
acgggtgtgc tgggtgcctt tgagagcagc ttctggcaca tgcaggagaa gctgggcatt	3720
gtgcagggca tcgtagggtc ccgcaacacc tcagccgctt ccactgcaca gcttgggag	3780
gccacagagg agctgcggcg tgaattggg gaggcactg agcactgac tcagctcag	3840
gcagacctga cagatgtgca agatgagaa ttcaatgcca accatgcaact aagtgtctg	3900
gagcgagata ggettgcact taatctcaca ctgcggcagc tcgaccagca tcttgacttg	3960
ctcaaacatt eaaacttctt ggggtgctat gacagcatcc ggcattgcc aagccagtct	4020
gcagaggcag aacgtcgtgc caatacttca gccctggcag tacttagccc tgtgagcaac	4080
tcggcaagtg ctcgcatcgc gacagaggca ctgatggatg ctcagaagga ggacttcaac	4140
agcaaacaca tggccaacca gcgggcactt ggcaagetct ctgccatac ccacacctg	4200
agcctgacag acataaatga gctggtgtgt ggggcaccag gggatgcacc ctgtgtaca	4260
agcccttggt ggggtgccgg ctgtcgagat gaggatgggc agcccgctg tgggggcctc	4320
agctgcaatg gggcagcggc tacagcagac ctacactgg gccgggcccg gcacacacag	4380
gcagagctgc agcgggcact ggcagaaggt ggtagcatcc tcagcagagt ggtgagact	4440
cgctggcagg caagcgaggc acagcagcgg gcccggcag ccctggacaa ggctaatgct	4500
tccaggggac aggtggaaca ggccaaccag gaacttcaag aacttateca gagtgtgaag	4560
gaattcttca accaggaggg ggcgtatcct gatagcattg aaatggtggc cacacgggtg	4620
ctagagctct ccattcccag ttacgtgag cagatccagc acctggcggg tgcgattgca	4680
gagcagctcc ggagcctgac agatgtggat gcgatcctgg cagctactgt aggagatgtg	4740

[0028]

cgtcgtgccc agcagctact gcaggatgca cggcgggcaa ggagctgggc tgaggatgag 4800
 aaacagaagg cagagacagt acaggcagca ctggaggagg ccagcgggc acagggtatt 4860
 gcccagggtg ccatccgggg ggcagtggct gacacacggg acacagagca gacctgtac 4920
 caggtacagg agaggatggc aggtgcagag cgggcactga gctctgcagg tgaagggtct 4980
 eggcagttgg atgctctcct ggaggctctg aaattgaaac gggcaggaaa taglctggca 5040
 gcctctacag cagaagaaac ggcaggcagt gcccagggtc gtgccaggga ggctgagcag 5100
 ctgtctacgg gtcctctggg tgatcagtac cagacggtga aggccctagc tgagcgcaag 5160
 gcccaagggt tgctggctgc acaggcaagg gcagaacaac tgcgggatga ggctcgggac 5220
 ctgttgcaag ccgtcagga caagctgcag cggtacagg aatiggaagg cacctatgag 5280
 gaaaaatgagc gggcactgga gactaaggca gcccagttgg acgggttgga ggccaggatg 5340
 cgcagcgtgc ttcaagccat caacttgcag gtgcagatct acaacacctg ccagtaccc 5400
 ctgcccagg cctaccccag ttctagcac tgcccacat geatgtctgc ctatgcactg 5460
 aagagctctt ggcccggcag gcccceaat aaaccagtgt gaaccccaa aaaaaaa 5518

<210> 5
 <211> 11426
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 5
 agaccgcgcg ggctccgcgc gcgcgcgtg tccctggagc tcggggacgc ggcccggagc 60
 cgggaagatg gcgaagcggc tctgcgcggg gacgcactg tgtgttcgcg gccccgggg 120
 ccccgcgccg ctgtctgtgg tcgggtggc gctgtgggc gcggcgggg cgcgggagga 180
 ggcggggcgc ggcttcagcc tgcaccgcgc ctacttcaac ctggccgagg gcgcccgcat 240
 cgcgcctcc gcgacctgcg gagaggaggc ccggcgcgcg ggctcccgcg gccccaccga 300
 ggacctttac tgcaagctgg tagggggccc cgtggccggc ggcgacccca accagaccat 360
 ccggggccag tactgtgaca tctgcacggc tgccaacagc aacaaggcac accccgcgag 420
 caatgccatc gatggcacgg agcgttggtg gcagagtcca ccgtgtccc gcggcctgga 480
 gtacaacgag gtcaacgtca cctggacct ggcccaggte ttccacgtgg cctacgtcct 540
 catcaagttt gccaaactcac ccggccgga cctctgggtg ctggagcgtt ccatggactt 600
 eggccgcacc taccagccct ggcagttctt tgctctctcc aagagggaet gtctggagcg 660
 gttcgggcca cagacgtgg agcgcatcac acgggacgac gcggccatct gcaccaccga 720
 gtactcacgc ategtgeccc tggagaacgg agagatcgtg gtgtccctgg tgaacggacg 780
 tccgggcgcc atgaatttct ctactcgcg gtgtctacgt gatttaccac aggccaccaa 840
 cgtccgcctg cgttctctgc gtaccaacac gtgtgtggc catctcatgg ggaaggcgct 900
 gcgggacccc acggtcaccg gccggtatta ttacagcatc aaggatatca gcatcgagg 960
 ccgtgtgtgc tgccacggcc acgcggatgc ctgcgatgcc aaagacccca cggaccggtt 1020
 caggtgcag tgcacctgcc agcacaacac ctgcgggggc acctgcgacc gctgtctccc 1080
 eggctteaat cagcagcgt ggaagcctgc gactgccaac agtgccaac agtgccagtc 1140
 ctgtaactgc tacggccatg ccaccgactg ttactacgac cctgagggtg accggcgccg 1200
 cgcagccag agcctggatg gcacctatca ggggtgggggt gtctgtatcg actgccagca 1260

[0029]

ccacaecacc ggcgtaact gtagcgctg cctgccggc ttetaccgt cteccaacca	1320
ccctctcgac tcgcccacg tctgcgcgc ctgcaactgc gagtecgact tcacggatgg	1380
cacctgcgag gacctgacgg gtcgatgcta ctgccggccc aacttctctg gggagcggtg	1440
tgacgtgtgt gccgagggt tcaagggtt ccdaagctgc taccgcagc cctcgtcctc	1500
caatgacacc agggagcagg tcttgcagc cgccagatt gigaattgtg actgcagcgc	1560
ggcagggacc cagggaacg cctgccgga ggaccaagg gtgggaagct gtcgtgcaa	1620
acccaacttc caaggaccc attgtgagct ctgcgcgcca gggttctac gccccggctg	1680
ccagccctgc cagtgttcca gccctggagt gcccgatgac cgtgtgacc ctgacacagg	1740
ccagtgcagg tcccgagtgg gcttcgagg gccacatgt gatcgtgtg cccccggcta	1800
ctttcacttc cctctctgcc agttgtgtgg ctgcagccct gcaggaaact tgcggagg	1860
ctgcgatgag gccggcgcct gcctatgcca gcctgagttt gctggacctc attgtgaccg	1920
gtgccgccct ggctaccatg gtttcccaa ctgccaagca tgcaactgcg accctcgggg	1980
agccctggac cagctctgtg gggcgggagg ttgtgcccgc tccgccccg gtacacagg	2040
cactgcctgc caggaatgca gccccggctt tcacggcttc cctagctgtg tccccgcca	2100
ctgctctgct gaaggtccc tgcacgcagc ctgtgacccc cggagtgggc agtcagctg	2160
ccggccccgt gtgacggggc tgcgggtgta cacatgtgtg ccgggtgcct acaacttccc	2220
ctactgcgaa gctggcttll gctaccctgc cggctcggcc ccagtggatc ctgcccttc	2280
tgaggcacag gtccctgta tctgccgggc tcacgtggag gggccgagct gtgaccgctg	2340
caaacctggg ttctggggac tgagcccag caaccgcag ggctgtaccc gctgcagctg	2400
cgacctcagg ggcacactgg gtggagtgtg tgagtgcag ccgggcaccc gccagtgtt	2460
ctgcaagccc caegtgtgcg gccaggcctg cgcgtcctgc aaggatggct tctttgact	2520
ggatcaggtc gactatlllg cctgccgcag ctgccgggtg gacatggcg gtgcactggg	2580
ccagagctgt gaaccgagga cgggcgtctg ccggtgccgc cccaacccc agggccccac	2640
ctgcagcgag cctgcgagg accactacct cccggacctg caccacctgc gccgtggagt	2700
ggaggaggt gccacacctg agggtcacgc cgtgcgttt ggcttcaacc cctcagatt	2760
cgagaacttc agctggagg gctacgcgca gatggcacct gtccagccca ggatcgtggc	2820
caggctgaac ctgacctccc ctgacctttt ctggtctgtc ttccgatac tcaaccgggg	2880
ggccatgagt gtgagcgggc gggctctgtg gcgagaggag ggcaggtcgg ccacctgcgc	2940
caactgcaca gcacagatc agcccgtggc cttcccacc agcacggagc ctgccttcct	3000
caaccgtgcc cagaggggct tcggagagcc ctttgtctg aacctggca cctgggccct	3060
gcgtgtggag gccgaagggt gctctctgga ctacgtggtt ctgctgccta gcgcatacta	3120
cagggcggcg ctcctgcagc tgcgggtgac tgaggcctgc acatacgtc cctctgccc	3180
gcagtctggc gacaactgcc tcctctacac acacctcccc ctggatggct tccccctggc	3240
cgcgggctg gaggccctgt gtcgccagga caacagcctg ccccgccct gccccacgga	3300
gcagctcagc ccgtgcacc cgcactgat cacctgcac ggcatgatg tggacgtcca	3360
gttcaagtgt gcagtgcac agccaggccg ctatgcctc gtggtggagt acgccaatga	3420
ggatgcccc caggaggtgg gcgtggccgt gcacacccc cagcgggccc cccagcagg	3480
gtgtctctcc ctgcacccct gcctgtacag caccctgtgc cggggcactg cccgggatac	3540

[0030]

ccaggaccac ctggetgtct tccacctgga ctggagggee agcgtgagge tcacagccga	3600
acaggcacgc ttcttcttge acggggteac tetgtgtccc attgaggagt tcagcccgga	3660
gttcgtggag ccccggtca gctgcatcag cagccacggc gcctttggcc ccaacagtgc	3720
cgcctgtctg ccctcgcgct tcccaaaagc gcccagccc atcatcctca gggactgcca	3780
ggtagtcccg ctgcccgcg gcctcccgct gaccacgcg caggatctca ctccagccat	3840
gtcccagct ggaccccgac ctggccccc caccgtgtg gacctgatg cagagccac	3900
ctgtgctgct gagccccagg ccaccgtgtt ctccaccacc catgtgcca cgtggggcg	3960
ctatgccttc ctgtgcacg gctaccagcc agcccacccc accttcccc tggaagtctt	4020
cateaacgcc ggcccggtgt ggcagggeca cgecaagcc agcttctgt cecatggcta	4080
cggctgccgc accctggtg tgtgtgagg ccaggccctg ctggacgtga cccacagcga	4140
gtcacgtgt accgtgctg tgcacaagg ccggtggctc tggttggtt atgtactct	4200
ggltccctgag aacgtctaca gcttggcta cctccgggag gagcccttg alaaatctta	4260
tgacttcate agccactgcg cagcccagg ctaccacate agcccagca gctcatccct	4320
gttctgccga aacgtgtctg ctccctctc cctctctat aacacggag ccgttcctg	4380
tggctgccac gaagtagggt ctacaggccc cactgtgag cccttcggg gccagtgtc	4440
ctgcatgcc catgtcattg gccgtgactg ctcccgtgt gccaccgat actggggctt	4500
ccccaactgc aggcctgtg actgcggtg ccgcctctgt gacgagctca cgggccagt	4560
catctgccc ccacgcacca tcccgcgga ctgctgtg tgccagccc agacctttg	4620
ctgccacccc ctggtcggct gtgaggagt taactgtca ggcccggca tccaggagct	4680
cacagaccct acctgtgaca cagacagcgg ccagtgcag tgcagacca acgtgactg	4740
gcgccgtgt gatacctgct ctccgggctt ccatggctac ccccgctgc gccctgtga	4800
ctgtcacgag gcgggcactg cgcctggct gtgtgaccc ctacagggc agtgctactg	4860
taaggagaac gtgcagggcc ccaaatgtga ccagtgcag cttgggacct tctactgga	4920
tgctgccaac cccaaaggt gcaccogctg cttctgttt ggggccacgg agcgtgccg	4980
gagctegtcc tacacccgc aggagtctg ggatatggag ggatgggtgc tgetgagcac	5040
tgaccggcag gtggtgccc acgagcggea gccagggacg gagatgtcc gtgcagacct	5100
gcggcacgtg ctgaggtg tgcggaggc ttccccag cgtactggc aggecccacc	5160
ctcttaactg ggggacggg tgctactca cgggtggacc ctccgttatg aactgactc	5220
agagaccag cggggagatg tctttgtcc catggagagc agcccgatg tgggtgtgca	5280
gggcaaccag atgagcatca cattcttga gccggcatac cccacgctg gccacgttca	5340
ccgtgggcag ctgcagctg tggaggga cttccggcat acggagacgc gcaacactgt	5400
gtcccgcgag gagctcatga tgggtctggc cagcctggag cagctgcaga tccgtgccct	5460
cttctcacag atctctctgg ctgtcttctt gcgcagggtg gcactggagg tggcagccc	5520
agcaggccag ggggccctgg ccagcaatgt ggagctgtg ctgtgcccc ccagctaccg	5580
gggggactca tgccaggaat gtgccccgg cttctatcgg gacgtcaaag gtctcttct	5640
gggccgatgt gtcccttgt agtgccatg aactcagac cgtgctctc ctggtcttg	5700
cgtctgtgtg gactgccagc acaacaccga aggggccac tgtgagcgt gccagctgg	5760
cttctgtgag agcagggaag accccagcgc cccctgtgt agctgcccct gcccctctc	5820

[0031]

agtgccttcc aacaacttcg ccgagggtcg tgtcctgcga ggcggccgca cccagtgcct	5880
ctgcaaacct ggttatgcag gtccctcctg cgagcggtgt gcgcccgat tctttggaa	5940
cccactggig ctgggcagct cctgccagcc atgcgactgc agcggcaacg gtgaccccaa	6000
cttgccttcc agcgactgcg accccctgac gggcgctgc cgtggctgcc tgcgccacac	6060
cactgggccc cgctgcgaga tctgtgccc cgcttctac ggcaacgcc tctgcccgg	6120
caactgcacc cggctgcgact gtaccccatg tgggacagag gcctgcgacc cccacagcgg	6180
gcactgcctg tgcaaggcgg gcgtgactgg gcggcgctgt gaccgctgcc aggagggaca	6240
ttttggttcc gatggctgcg ggggctgccg cccgtgtgct tgtggaccgg ccgccgaggg	6300
ctccgagtgc cccccccaga gggacagtg cactgcgca ccagggacca tgggaccca	6360
gtgccgcgag tgtgccctg gctactgggg gctccctgag cagggtgca ggcgctcca	6420
gtgccctggg ggccgctgt accctcacac ggcccgctgc aactgcccc cggggctcag	6480
cggggagcgc tgcgacacct gcagccagca gcaacagggt cctgttcag gcgggctgt	6540
gggccacagc atccactgtg aagtgtgtga cactgtgtg gtctgtctcc tggatgacct	6600
ggnaaggccc ggcgccctcc tccccccat tcacgagca ctgcgtgca tcaatgccag	6660
ctccatggcc tgggccgctc tgcacaggt gaacgcctcc atcgtgacc tgcagagcca	6720
gtcccgagc cccctgggcc cccgccatga gacggcacag cagctggagg tgcaggagca	6780
gcagagcaca agcctcgggc aggacgcac gcggctaggc gccagggccg tggggaccgc	6840
agaccaggcg agccaattgc tggccggcac cagggccaca ctgggccat cgaagacgt	6900
gttggcgccc atccgggtg tggaccgac cctgagcgag ctcatgtccc agacgggcca	6960
cctggggctg gccaatgcct cggctccatc aggtgagcag ctgctcggga cactggccga	7020
ggtggagcgg ctgctctggg agatgcgggc ccgggacctg ggggccccgc aggcagcagc	7080
tgaggctgag ttgctgcag cacagagatt gctggcccg gtgcaggagc agctgagcag	7140
cctctgggag gagaaccagg cactggccac acaaaccgc gaccgctgg cccagcacga	7200
ggccggcctc atggacctgc gagaggcttt gaaccgggca gtggacgcca caccggaggc	7260
ccaggagctc aacagccgca accaggagcg cctggaggaa gccctgcaaa ggaagcagga	7320
gtgtccccg gacaatgcca ccctgcaggc cactctgcat gcggctaggg acacctggc	7380
cagcgtcttc agattgtgc acagcctgga ccaggctaag gaggagctgg agcgcctcgc	7440
cgccagcctg gatggggctc ggacccact gctgcagagg atgcagacct tctccccgc	7500
gggcagcaag ctgcgtctag tggaggccgc caggccccc gcacagcagc tgggccagct	7560
ggcactcaat ctgtccagca tcatctgga cgtcaaccag gaccgctca cccagagggc	7620
catcagggcc tccaacgct acagccgcat cctgcaggcc gtgcagctg ccaggatgc	7680
tgttgccag gccctgcagc aggcggacca cagtgggcg acggtgtgc ggcaggccct	7740
ggtggaccga gccagcagc tcttgccaa cagcactgca ctagaaggagg ccatgtctca	7800
ggaacagcag aggtgggccc ttgtgtgggc tggccccag ggtgccagga cccagctccg	7860
agatgtccgg gcccaagaagg accagctgga ggcgcacatc caggcggcgc aggccatgct	7920
tgccatggac acagacgaga caagcaagaa gatcgacat gccaaagctg tggctgtga	7980
agcccaggac accgcccacc gtgtgcagtc ccagctgcag gccatgcagg agaattgtga	8040
gcggtggcag gccagctac agggcctgcg gggccaggac ctgggccagg cagtgctga	8100

[0032]

cgcagggcac tcagtgteca cctggagaa gacgtgccc cagctgctgg ccaagctgag	8160
catectggag aaccgtgggg tgcacaacgc cagcctggcc ctgtccgcca gcattggccc	8220
cgtgcgagag ctcatgtccc agggccgggg gctgcccagt aaggtcaagg tgcccatgaa	8280
gttcaacggg cgctcagggg tgcagctgcg caccceacgg gatcttgccg accttgctgc	8340
ctacactgcc ctcaagtict acctgcaggg ccagagacct gagcctgggc agggtaaccga	8400
ggatcgttct gtgatgtaca tgggcagccg ecaggccact ggggaactaca tgggtgtgtc	8460
tcgtcgtgac aagaagggtc actgggtgta tcagctgggt gaggcgggcc ctgcagtctt	8520
aagcatcgat gaggacattg gggagcagtt cgcagctgtc agcctggaca ggactctcca	8580
gtttggccac atgtccgtca cagtggagag acagatgata caggaaacca agggtagaac	8640
ggtggccctt ggggcagagg gctgtctcaa cctgcggcca gacgacttcg tcttctacgt	8700
cgggggggtac ccagctacct tcacgcccc tccccgtctt cgttccccc gctaccgggg	8760
ctgcctcgag atggacacgc tgaatgagga ggtgggcagc ctctacaact tcgagaggac	8820
cttccagctg gacacggctg tggacaggcc ttgtgccgcg tcaagtcga ccggggaccc	8880
gtggtcacg gacggctctt acctggacgg caccggcttc gccgcataca gcttcgacag	8940
tcagatcage accaccaage gcttcgagca ggagctggg ctctgtctct acagcggggt	9000
gcctctcttc ctgaagcage agagccagtt cctgtgcttg gccgtgcaag aaggcagcct	9060
cgtgtgtttg tatgaatttg gggtggcctt gaaaaaggcc gtcccactgc agcccccaac	9120
gcccctgacc tcggccagca aggcgataca ggtgttctct ctggggggca gccgcaagcg	9180
tgtgtgtgtg cgtgtggagc gggccacggg gtacagcgtg gacgaggaca atgatctgga	9240
gctggccgac gcctactacc tggggggcgt gccgcccagc cagctgcccc cgagcctgcg	9300
acggctcttc cccaccggag gctcagtcgg tggctgcgtc aaaggcatca aggccctggg	9360
caagtatgtg gacctcaagc ggtcgaacac gacaggcgtg agcgcggctt gcaccgccga	9420
cctgtgtgtg gggcgcgcca tgactttcca tggccacggc ttctctgcgc tggcgtcttc	9480
gaacgtggca ccgctcactg gcaacgtcta ctccgcttc ggcttccaca gcgccagga	9540
cagtgccttg ctctactacc gggcgtcccc ggaatgggcta tgccaggtgt ccctgcagca	9600
gggccgtgtg agcctacage tcttgaggac tgaagtgaat actcaagcgg gcttcgccga	9660
tgggtccccc cattacgtcg ccttctacag caatgccacg ggagctctggc tgaatgtcga	9720
tgaccagctc cagcagatga agccccaccg gggaccaccc cccgagctcc agcgcagcc	9780
tgaggggccc ccgaggctcc tcttgggagg cctgcctgag tctggacca ttataactt	9840
cagtggctgc atcagcaacg tcttctgtga gcggctcctg ggccacagc gcgtatttga	9900
tctgcagcag aacctgggca gcgtcaatgt gacacgggc tgtgcacccc ccttgcaagc	9960
ccagaccccg ggcctggggc ctgaggagct gcaggccacc gcccggaagg cctcccggcg	10020
cagccgtcag cccgcccggc atcctgctct catgtgccc ccacacctca ggaccacccg	10080
agactctac cagtctgggg gtccctgtgc cagtcacctg gactttgttg gcatcctggc	10140
ccgacatagg aactggccca gtctctctcat gcacgtcttc ccgcgaagct cccgagcct	10200
ctctctcttc actgcccgtc tgaggcccgg cagccccctc ctggcgtctt tcttgagcaa	10260
tggccacttc gtgcacaga tggaaaggct cgggactcgg ctccgcgcc agagccgcca	10320
gcgtctccgg cctggccgct ggcacaaggc ctccgtgcgc tgggagaaga accggatctt	10380

[0033]

gctgggtgacg gacggggccc ggccctggag ccaggagggg ccgcaccggc agcaccaggg 10440
 ggcagagcac cccagccccc acaccctctt tgtgggcggc ctcccggcca gcagccacag 10500
 ctccaaactt ccggtgaccg tcgggttcag cggtgtgtg aagagactga ggctgcacgg 10560
 gagggccctg ggggccccca caggatggc aggggtcaca cctgcatct tgggcccct 10620
 ggagcgggc ctgttcttcc cagcagcgg ggagttatc acittagacc tcccaggagc 10680
 tacactgct gatgtgggc tggaaatgga ggtgcggccc ctggcagta ccgactgat 10740
 ctccacttg ggccaggccc gacgccecc ctacttgag ttgcaggta ccgagaagca 10800
 agtctgctg cggcggatg acggagcagg ggagtctcc acgtcagta cccgccctc 10860
 agtctgtgt gatggcagt gcaccggct agcggtagt aaaagcggga atgtgctccg 10920
 gctggaggtg gacgcgcaga gcaaccacac cgtgggcccc ttgctggcg ctgcagctgg 10980
 tgccccagcc cctctgtacc tgggggacct gcctgagccc atggccgtgc agccctggcc 11040
 ccccgctac tgggctgca tggaggagct ggcggtgaac cggtcceccg tcgcatgac 11100
 tctctctgt gaggtccac gggcagtgga gccagtgga tggccagccg cctaggacac 11160
 agccaacccc ggccccgtt caggccctg cagctgctc acaccgccc ttgtgtctgc 11220
 ctcataggtg tctatttga cctaaagtc tacgggtgac agatcttgt ttgaagatg 11280
 gttaagtta tagcttctta aacgaagaa taaaactctg caaatgttt ttatatattg 11340
 ccttccacc ctttttaat tgtgagatg ttgtaccaa tcatcactgg ttcctctta 11400
 aaaataaaa agtaactct gtgtaa 11426

<210> 6
 <211> 7632
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 6
 atgagaggga gccatgggc cgcgcggcc ctgcggccc gggggcggt ctggccctg 60
 ctggccgtgc tggcggggc cgcgcggcg ggtgtgccc aggcagccat ggaagagtgc 120
 acggacagg gggggcgcc gcagcgtgc atgccagat tctcaacgc cgccttcaac 180
 gtgactgtg tggccacca caggtgtgg actccgccg aggaatactg tgtcagacc 240
 ggggtgacc gggtaacca gtctgtcac ctgtgcgac cggggcagc caactgcag 300
 cagggggcag ccttctgac cgactaac aaccaggcc acaccacct gtggcaaagc 360
 cagaccatgc tggcggggt gcagtaccc agctccatc acctaacgt gcacctggga 420
 aaagctttt acataacct tgtgcgttc aagttccaca ccagccgcc ggagagcttt 480
 gccatttaca agcgcacac ggaagacgg ccttgattc cttaccagta ctacagtgt 540
 tctgtgaga acactactc caaggcaac cgcggttca tcaggacag aggggacgag 600
 cagcaggcct tgtgtactg tgaattcagt gacatttct cctcactgg gggcaacgt 660
 gccctttcta ccttggaag aagggccag ccctataact ttgacaatag cctgtgtg 720
 caggaatgg taactgccac tgacacaga gtaacttta atgcctgaa cacttttgg 780
 gatgaagtgt ttaacgacc caaagtctc aagtcctatt attatgccat ctctgattt 840
 gctgtagggt gcagatgaa atglaatgga cagcaagcg agtlatgaa gaacgaatt 900
 gataagctgg tgtgtaatt caaacatanc acatatggag tagactgtga aaagtgtct 960
 cctttcttca atgaccggc gtggaggagg gcaactgagg aaagtgcag tgaatgctg 1020

[0034]

ccctgtgatt gcaatggctg atcccaggaa tgetacttcg accctgaact ctatcgttcc	1080
actggccatg ggggccactg taccnaactgc caggataaca cagaatggcg ccactgtgag	1140
aggatgccag agaaattctt ccgccttggc aacaatgaag cctgtcttcc atgccactgt	1200
agtcctgtgg gctctetaag cacacagtgt gatagttacg gcagaigcag ctgtaagcca	1260
ggagtgtagg gggacaaatg tgaccgttgc cagcttggat tccattctct caetgaagca	1320
ggatgcaggc catgctcttg tgatccctct ggcagcatag atgaatgtaa tattgaacaa	1380
ggaagatgtg ttgcaaaaga caatgtcgaa ggcttcaatt gtgaaagatg caaacctgga	1440
ttttttaatc tggaaatcgc taatcctcgg ggttgccacac cctgtctctg ctttgggcac	1500
tcttctgtct gtacaaacgc tgttggctac agtgtttatt ctatctctcc tacctttcag	1560
attgatgagg atgggtggcg tgcggaacag agagatggct ctgaagcacc tctcagtggt	1620
tcctctgaga ggcaagatat cggcgtgacg tcagacagct actttctctg gtacttcatt	1680
gctcctgcaa agttcttggg caagcagggt ttgagttatg gtcagaacct ctcttctcc	1740
tttcagtggt acaggcgaga tactcgcctc tctgcagaag acctgtgtgt tgaggagct	1800
ggcttaagag tatctgtacc ctgtatgctc cagggaatt cctatccaag tgagaccact	1860
gtgaagtatg tcttcaggct ccatgaagca acagattacc cttggaggcc tgccttacc	1920
cttttgaat ttcagaagct cctaaacaac ttgacctcta tcaagatacg tgggacatac	1980
agtgaagaaa gtgttgata ttggatgat gtcacctgg caagtgtctg tcttggccct	2040
ggagtccctg caacttgggt ggagtctgc acctgtctg tgggatattg agggcagttt	2100
tgtgagatgt gcctctcagg ttacagaaga gaaactccta atcttggacc atacagtcca	2160
tgtgtgtttt ggcctgcaa tggacacagc gagacctgtg atcctgagac aggtgtttgt	2220
aactgcagag acaatacggc tggcccgcac tgtgagaagt gcagtgtagg gtactatgga	2280
gattcaactg caggcacctc ctccgattgc caacctgtc cgtgtctctg aggttcaagt	2340
tgtgtgtttt ttcaccaagc aaaggagggt gtgtgcacca actgtcttac tggcaccact	2400
ggtaagagat gtgagctctg tgatgatggc tactttggag accccctggg tagaaaaggc	2460
cctgtgagac ttgcccgtc gtgccagtgc agtgacaaca tcatcccaa tgcagttgga	2520
aattgcaatc gcttgacggg agaatgectg aagtgcattc ataacactgc tggcttctat	2580
tgtgaccggt gcaaaagcgg attttttggg aatccccctg ctcaccaatc agcagacaaa	2640
tgcaaaacct gcaattgcaa tctgtatggg acctgaagc agcagagcag ctgtaacccc	2700
gtgacggggc agtgtgaatg ttgectcac gtgactggcc aggactgtgg tgcctgtgac	2760
cctggattct acaatctgca gattgggcaa ggtgtgaga ggtgtgactg ccatgcctg	2820
ggctccacca atgggcagtg tgacatccgc accggccagt gtgagtgcca gcccgccatc	2880
actggtcagc acigtgagcg ctgtgaggic aaccacttgg ggtttggacc tgaaggcigc	2940
aaacctgtg actgtcatcc tgaggatct ctttcacttc agtgcaaga tgatggtcgc	3000
tgtgaatgca gagaaggctt tgtgggaat cgtgtgacc agtgtgaaga aaactatttc	3060
tacaatcggt cttggcctgg ctgccaggaa tgtccagctt gttaccggct ggtaaaggat	3120
aaggttgtc atcatagagt gaagctccag gaattagaga gtctcatagc aaacctgga	3180
actggggatg agatggtgac agatcaagcc ttccaggata gactaaagga agcagagagg	3240
gaagtatttg acctccttcg tgaggccag gatgtcaag atgttgacca gaatttgatg	3300

[0035]

gatcgccctac agagagtga taacactctg tccagccaaa ttagccgttt acagaatate	3360
cggaaatacca ttgaagagac tggaaacttg gctgaacaag cgcgtgccca tftagagaac	3420
acagagcggg tgattgaaat cgcattccaga gaactigaga aagcaaaagt cgtgctgccc	3480
aatgtgtcag tcaactcagcc agaattctaca ggggacccaa acaacatgac tcttttggca	3540
gaagaggtct gaaagcttgc tgaacgtcat aaacaggaag ctgatgacat tgttcgagtg	3600
gcaaagacag ccaatgatac gtcaactgag gcatacaacc tgcttctgag gacactggca	3660
ggagaaaaac aaacagcatt tgagattgaa gagcttaata ggaagtatga acaagcgaag	3720
aacatctcac aggatctgga aaaacaagct gcccgagtac atgaggaggc caaaagggcc	3780
ggfgacaagg ctgtggagat ctatgccagc gtggctcagc tgagcccttt ggactctgag	3840
acactggaga atgaagcaaa taacataaag atggaagctg agaattctgga acaactgatt	3900
gaccagaaat taaaagattt tgaggacctc agagaagata tgagaggga ggaactigaa	3960
gtcaagaacc ttctggagaa aggcaagact gaacagcaga ccgcagacca actcctagcc	4020
cagctgtagt ctgccaaagg cctcgtgtaa gaagctgcaa agaaggagc ggatacctta	4080
caagaagctt atgacattct caacaacctg aaagattttg ataggcgtgt gaacgataac	4140
aagacggccg cagaggagge actaaggaag attcctgcca tcaaccagac catcactgaa	4200
gccaatgaaa agaccagaga agcccagcag gccctgggca gtgctggcgc ggatgccaca	4260
gaggccaaga acaaggccca tgaggcggag aggatcgcga gcgctgtcca aaagaatgcc	4320
accagacca aggcagaagc tgaagaact tttgcagaag ttacagatct ggataatgag	4380
gtgaacaata tgttgaagca actgcaggaa gcagaaaaag agctaagag aaaacaagat	4440
gacgtgacc aggacatgat gatggcaggg atggcttcac aggtctgtca agaagccgag	4500
atcaatgcca gaaaagccaa aaactctgtt actagcctcc tcagatttat taatgacctc	4560
ttggagcagc tggggcagct ggatacagtg gacctgaata agctaaacga gattgaaggc	4620
accctaaaca aagccaaaga tgaatatgaag gtcagcgatc ttgatagga agtgtctgac	4680
ctggagaatg aagccaagaa gcaggaggct gccatcatgg actataaccg agatatcgag	4740
gagatcatga aggacattcg caatctggag gacatcagga agacctacc atctggctgc	4800
ttcaacaccc cgtccattga aaagccctag tgtctttagg gctggaagge agcaccctc	4860
tgacaggggg gcagttgtga ggccacagag tgccttgaca caaagattac attttcaga	4920
ccccactcc tctgtgtctg tccatgactg tcttttgaa ccaggaaaag tcacagagtt	4980
taagagaag caattaaac atcctgaatc gggaacaaag ggttttatct aataaagtgt	5040
cttttccatt cactgtgta ccttaccac actttccctt ctgatttgcg tgaggacgtg	5100
geatccctac ttaactgtaca gtggcataag cacatcgtgt gagcccatgt atgctggggt	5160
agagcaagta gccctccctt gttctatcga taccagcaga acctctcag tctcagtact	5220
cttgtttcta tgaaggaaaa gtttggttac taacagtage attgtgatgg ccagtataac	5280
cagtccatgg ataaagaaaa tgcattgtca tctctaccc ctcttccttc taagcaaaag	5340
gaaataaaca tctgtgtcca aaggtattgg tcatttagaa tgcggtage catccatcag	5400
tgtttttagt tattatgagt gtaggacact gagccatccg tgggtcagga tgcaattatt	5460
tataaaagtc tccaggtgaa catggctgaa gatttttcta gtatattaat aattigactag	5520
gaagatgaac ttttttctag atctttgggc agctgataat ttaaatctgg atgggcagct	5580

[0036]

```

tgcactcacc aatagaccaa aagacatctt ttgataattct tataaatgga acttacacag 5640
aagaaatagg gatatgataa ccactaaaat ttgtttttca aaatecaaaact aattctttaca 5700
gctttttttat tagtttagtct tggaaactagt gtttaagtatc tggcagagaa cagttaaatcc 5760
ctaaggtctt gacaaaacag aagaaaaaca agcctcctcg tcttagtctt ttctagcaaa 5820
gggataaaac ttagatggca gcttgtagctg tcagaatccc gtgtatecat ttgtttctct 5880
gttggagaga tgagacattt gaccttagc tccagttttc ttctgatgtt tccatcttcc 5940
agaafecctc aaaaaacatt gtttgcctaa tcttggtggc aaatacttgc actcagtatt 6000
tcacacagct gccaacgcta tcgagttcct gcactttgtg atttaaatcc actctaaacc 6060
ttccctctaa gtgtagaggg aagaccttta cgtggagttt cctagtgggc ttctcaactt 6120
ttgatctcta gcctgtgtgt tttaagacca cagtgtgaca gttccctgcc acacaccccc 6180
ttcctcttac caacccacct ttgagattca tatatagcct ttaacactat gcaactttgt 6240
actttgcgta gcagggggcg ggtgggggga aagaaactat tatctgacac actgggtgcta 6300
ttaattattt caaatttata tttttgtgtg aatgttttgt gttttgttta tcatgattat 6360
agaataagga atttatgtaa atatacttag tcttatttct agaalgacac tctgttcact 6420
ttgtcaattt ttctctctc actggcaca tgtatctgaa taccctcttc cctccttct 6480
agaattcttt ggattgtact ccaagaattt gtgccttgtg ttgtagcat ctccattctc 6540
taaaattaat ataattgett tctccacac ccagccactg taaagaggta acttgggtcc 6600
tcttccattg cagtctgat gactctaacc tgcagcaggg tggttttaca atgttcaga 6660
gcaggaacgc caggttgaca agctatggta ggattaggaa agtttctga agaggatctt 6720
tgacgccaca ggggacttag ccaggaatga gggagaaatg cctttctgg caattgttgg 6780
agctggatag gtaagtttta taaggaggta catttigact gagcacttag ggcattcagga 6840
acagtgtctc ttactgatgg gtagactggg agagggtgtg taacttagtt cttgatgatc 6900
ccacttcttg ttccatctg cttgggatat accagagttt accacaagtg ttttagcat 6960
atactctga gctttcactc tctgtcttct cccagcctc ttctactatg gcaggagatg 7020
tggcgtgctg ttgcaaagtt ttcacgtcat tgtttcttgg ctagttcatt tcattaagtg 7080
gtacatctc aacatatgca ttgtgtcaag gttgcagaag aggaactgaag attgactgcc 7140
aagetagttt ggggtgaagt cactccagca agtctcaggc cacaatgggg tggtttggtt 7200
tggtttccit ttaactttct tttgttatt tcttttctc ctccacctgt gtggtataat 7260
ttttaagcag aattttattt tttaaaataa aaggttcttt acaagatgat accttaatta 7320
cactcccgca acacagccat tattttattg tctagctcca gttatctgta ttttatgtaa 7380
tgtaattgac aggatggctg ctgcagaatg cgggttgaca cagggtattat tatatgcta 7440
tttttccctg aattttttt ctttgaattc caactgtgga ctttttataat gtccttccac 7500
tttagctggt tgccttaate tctacagcct tctctccgg ggtggttaat aaaatgcaac 7560
acttgcattt tttatgtttt aagaaaaaca gtattttatt tataataaaa tetgaatatt 7620
tgtaaccctt ta 7632

```

<210> 7
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0037]

<220>		
<223>	引物	
<400>	7	
gtggtaccca caggcagagt tgac		24
<210>	8	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	8	
gctctagagc tcctcagtc ataggc		26

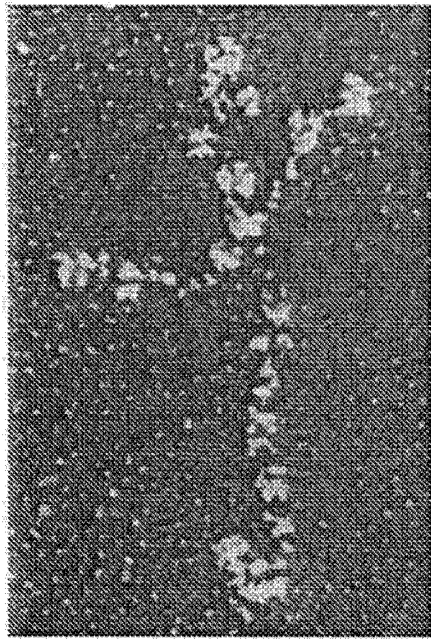


图 1

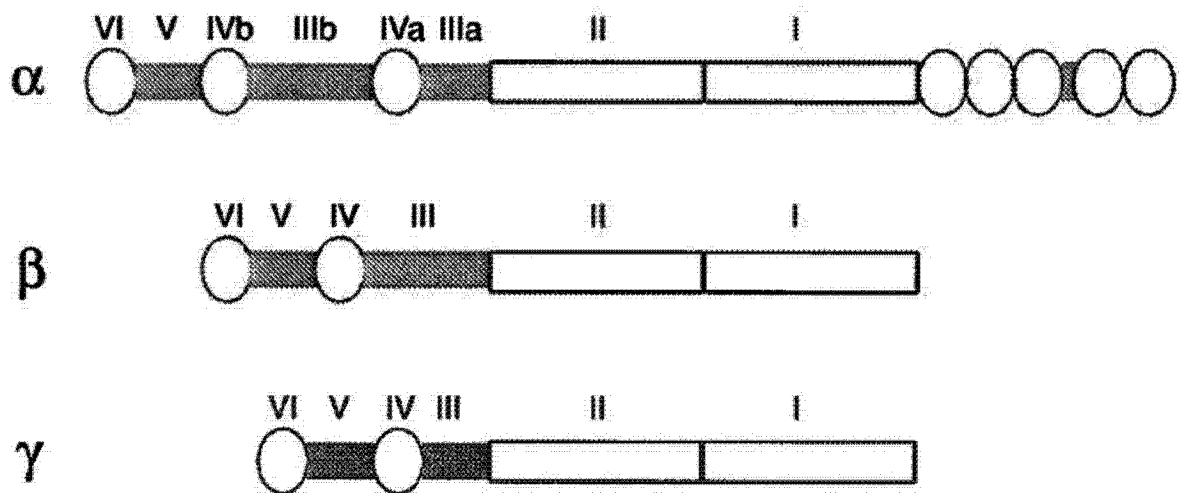


图 2

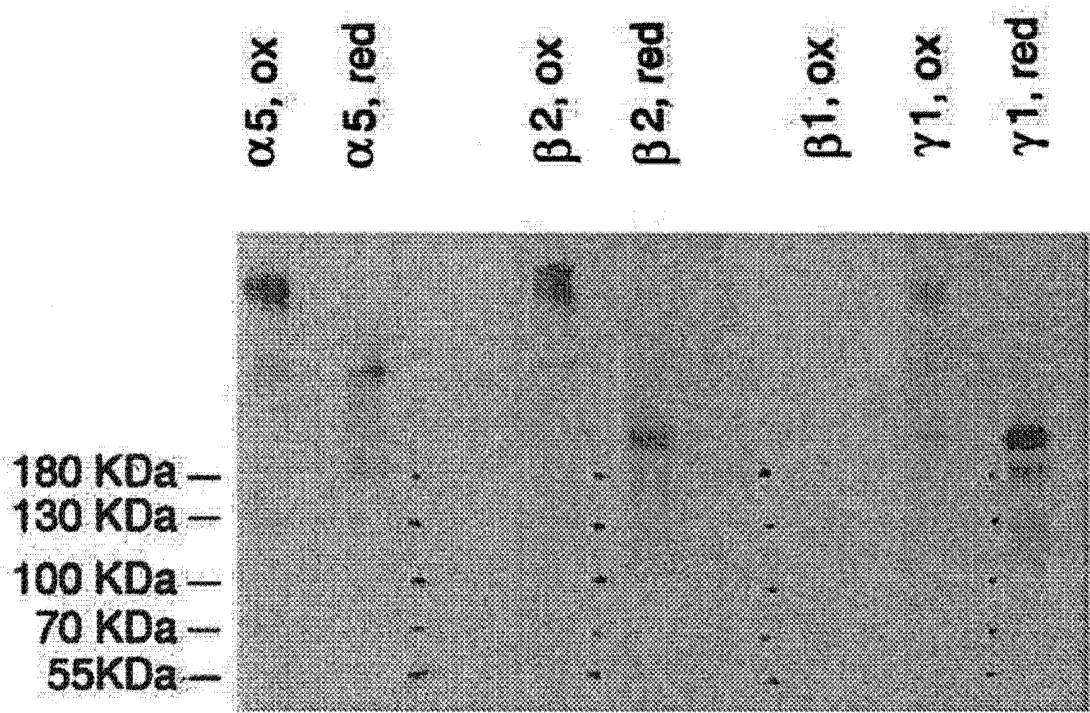


图 3

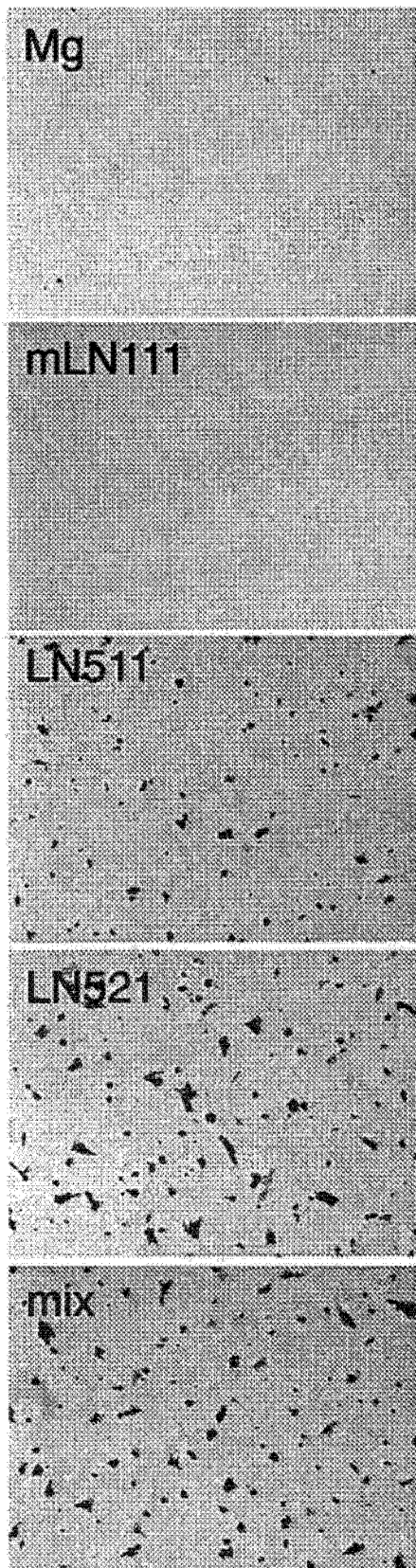


图 4

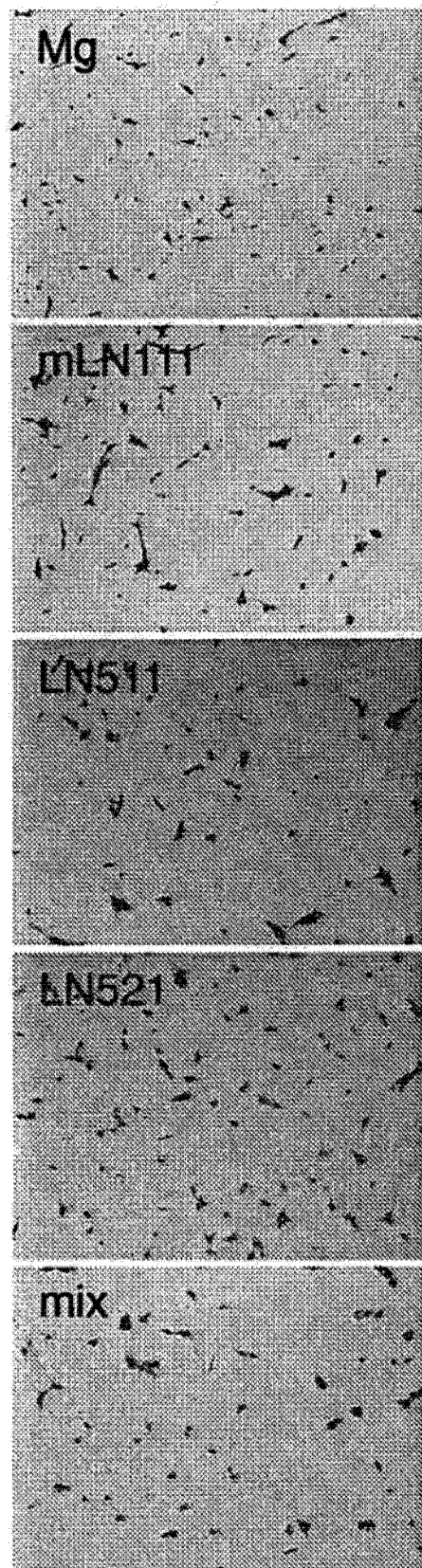


图 5

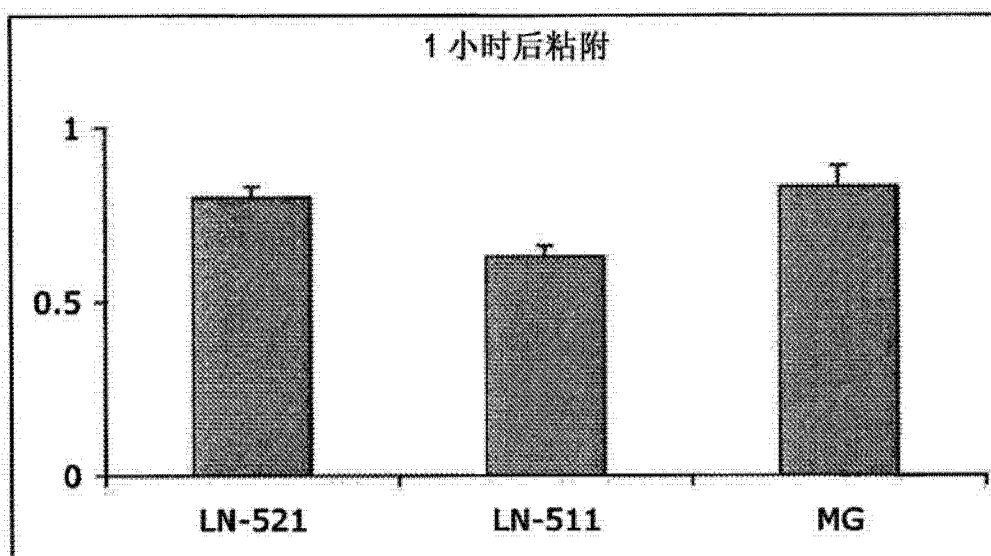


图 6

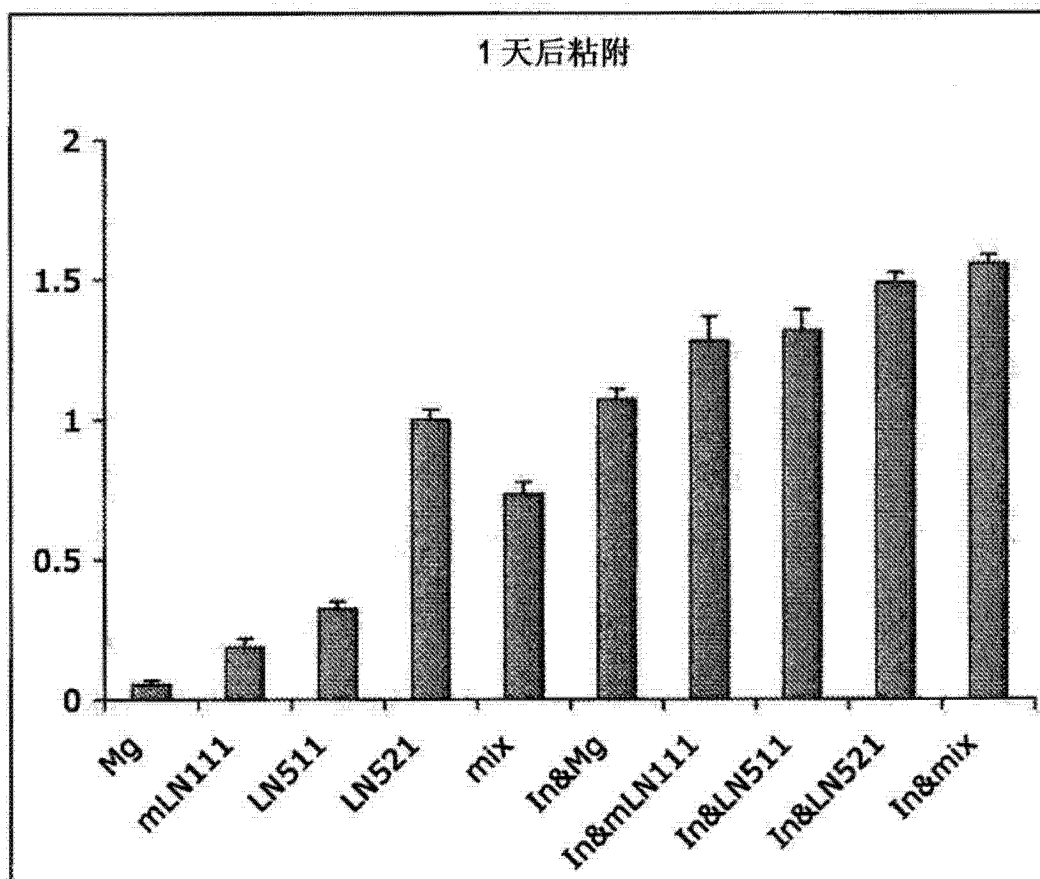


图 7

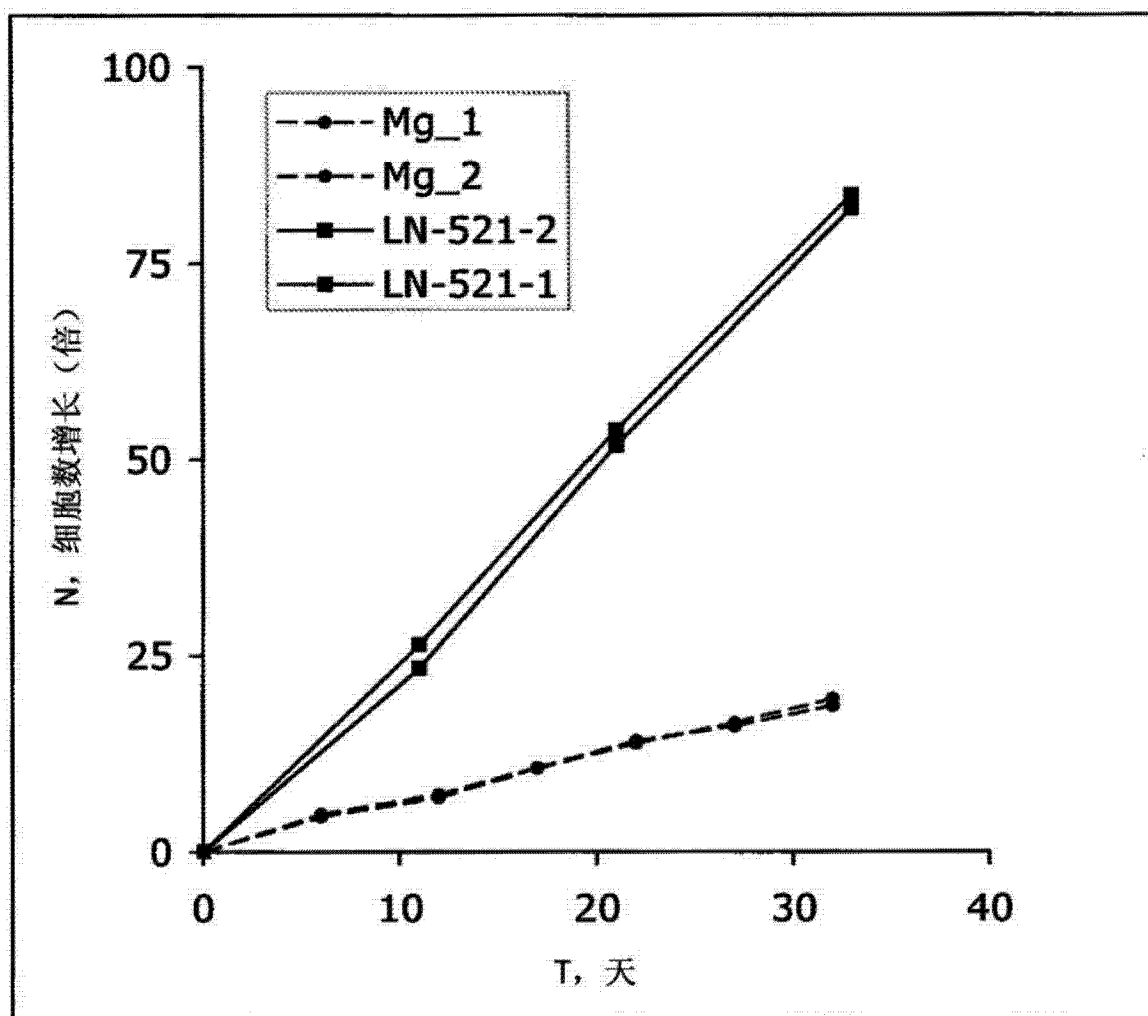


图 8

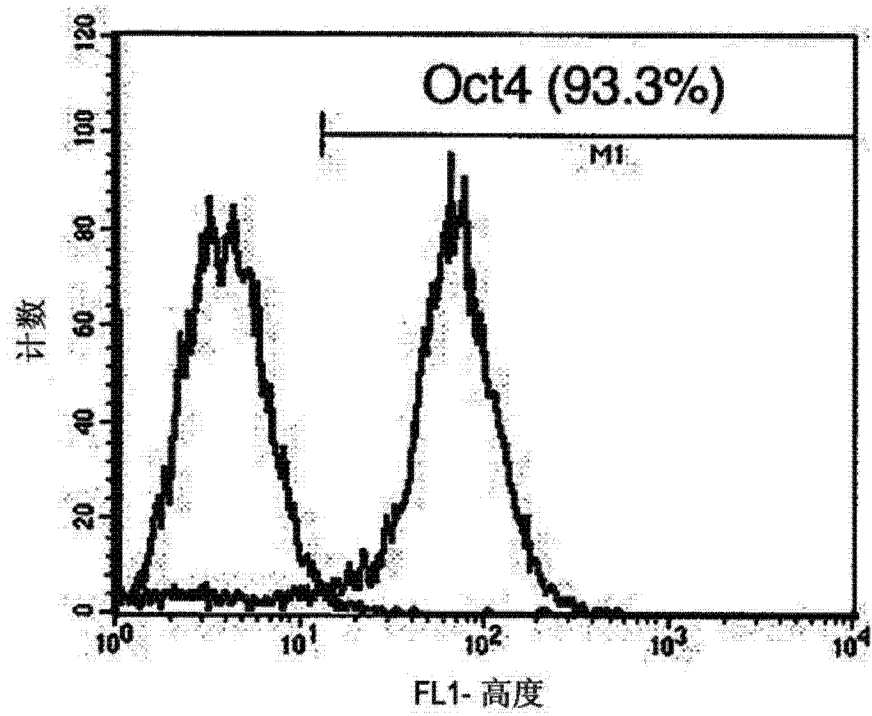


图 9

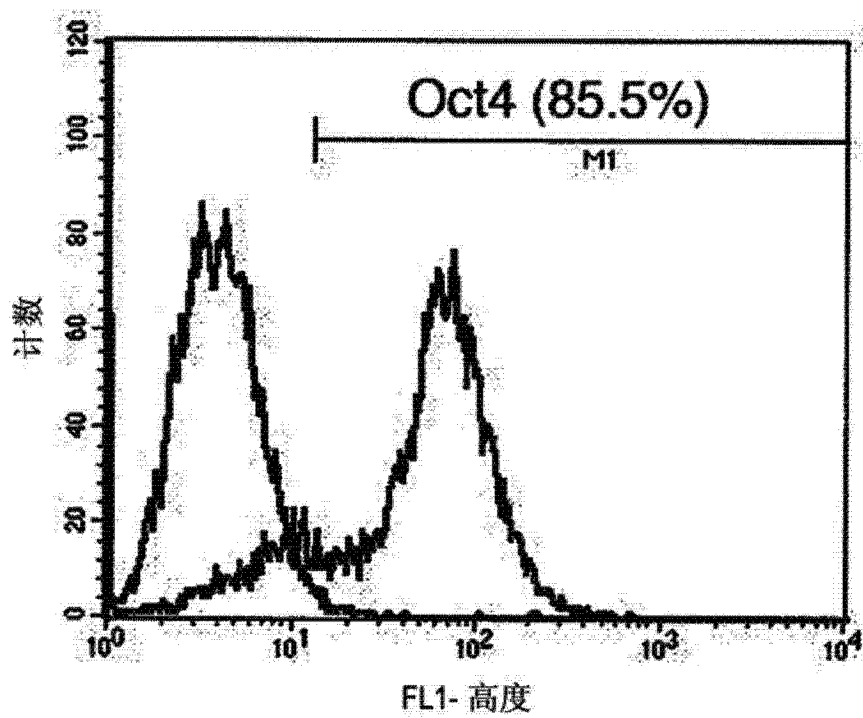


图 10

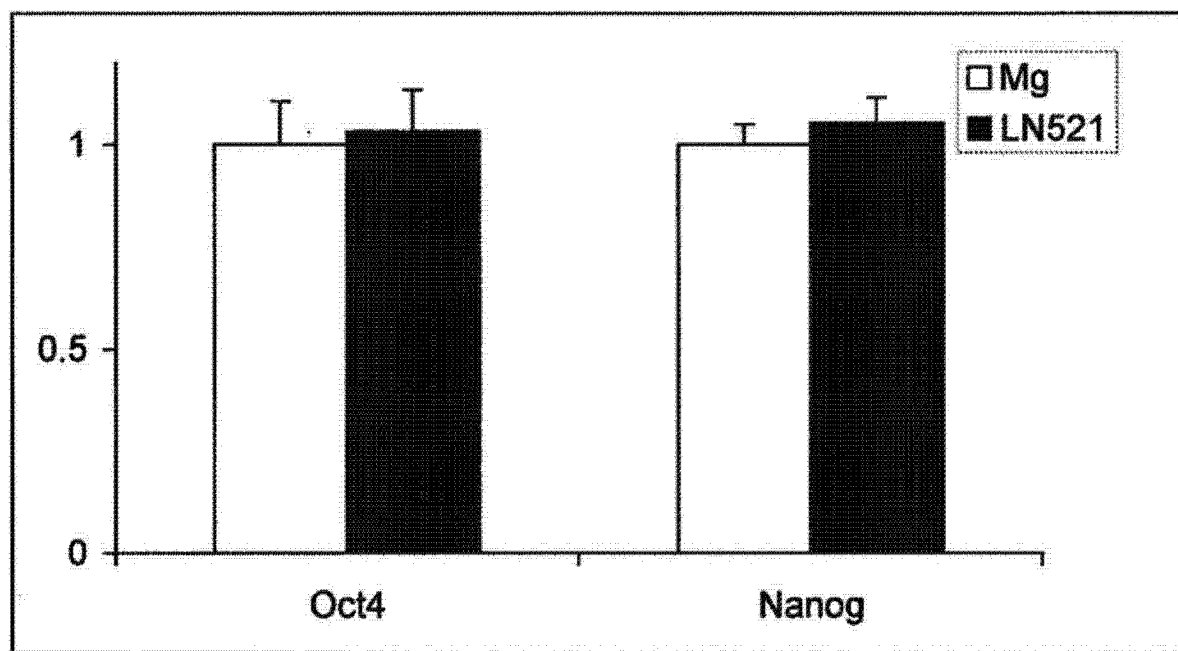


图 11

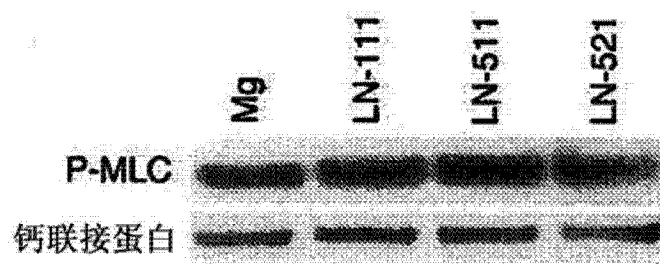


图 12

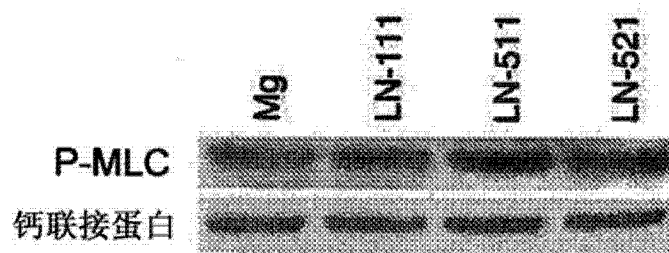


图 13

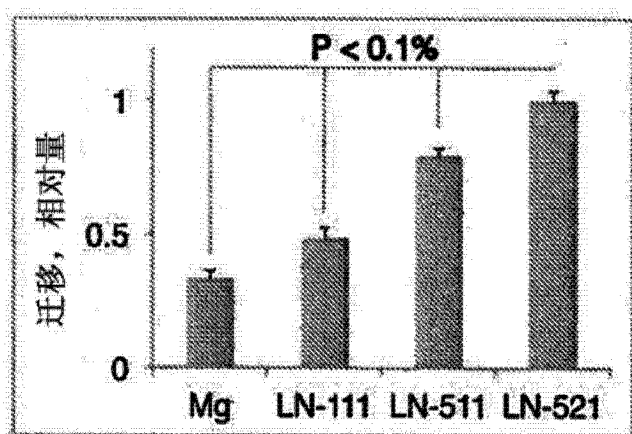


图 14

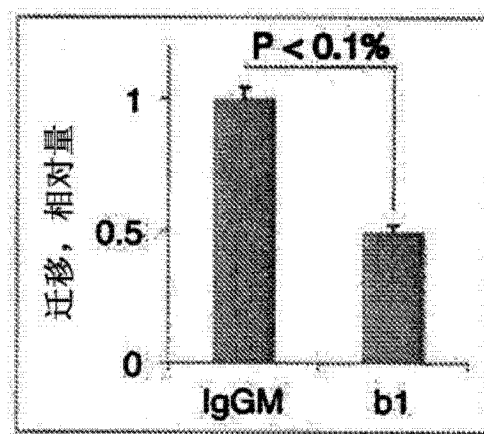


图 15

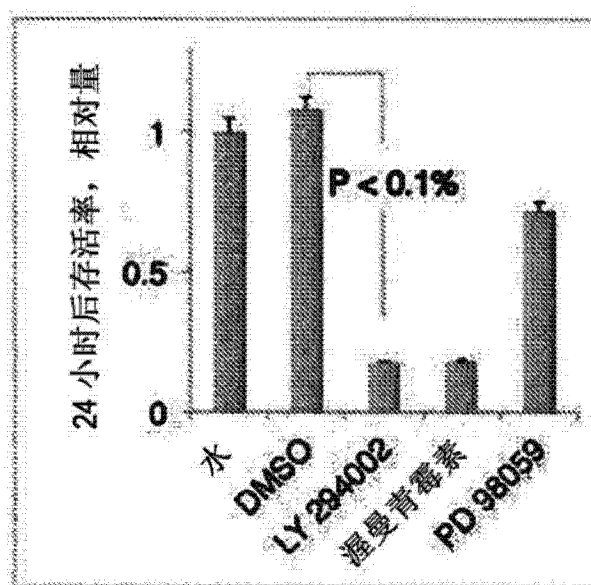


图 16

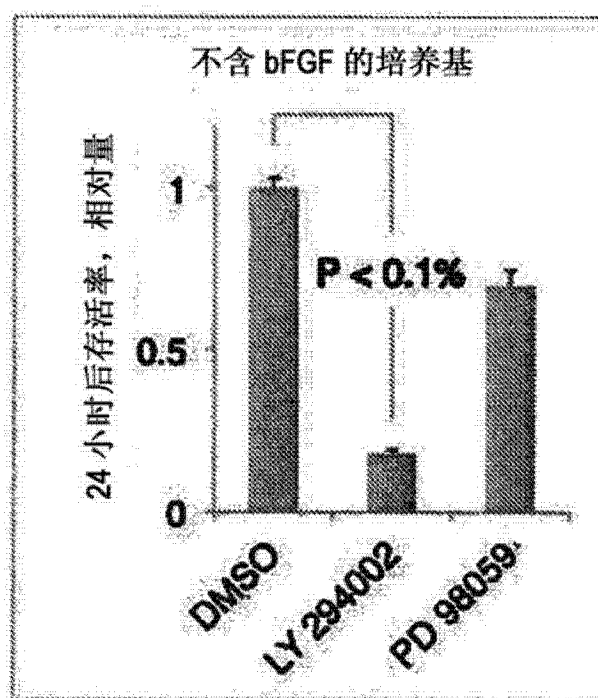


图 17

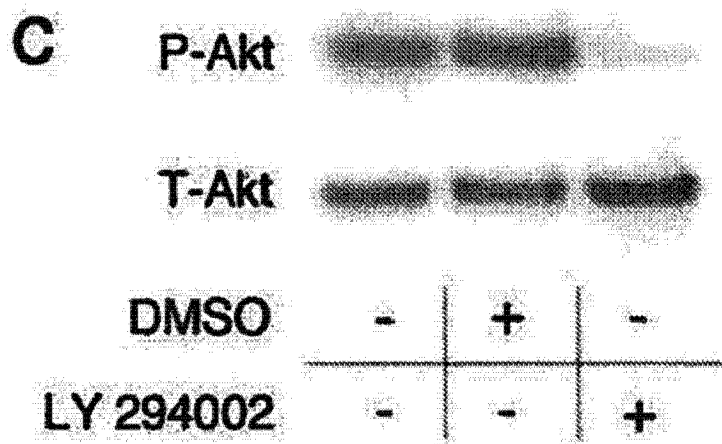


图 18

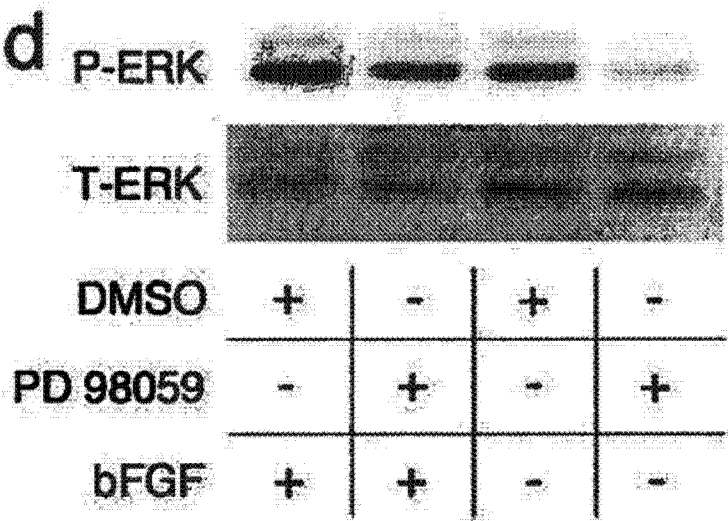


图 19

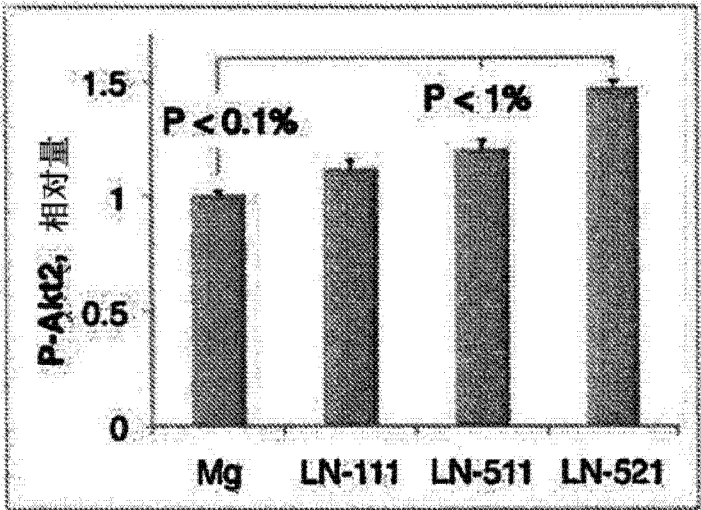


图 20

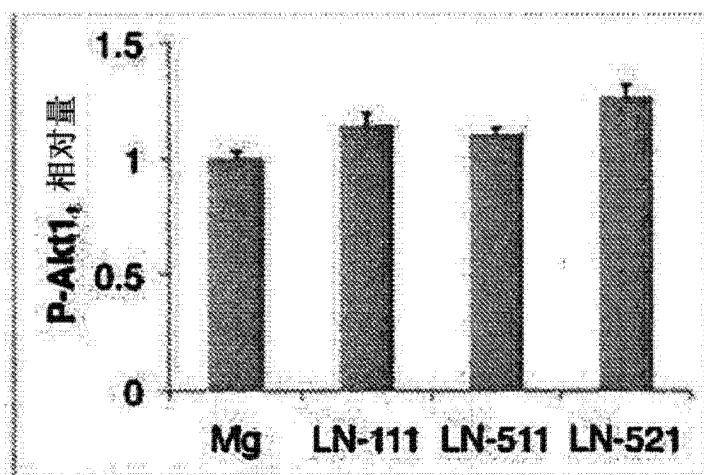


图 21

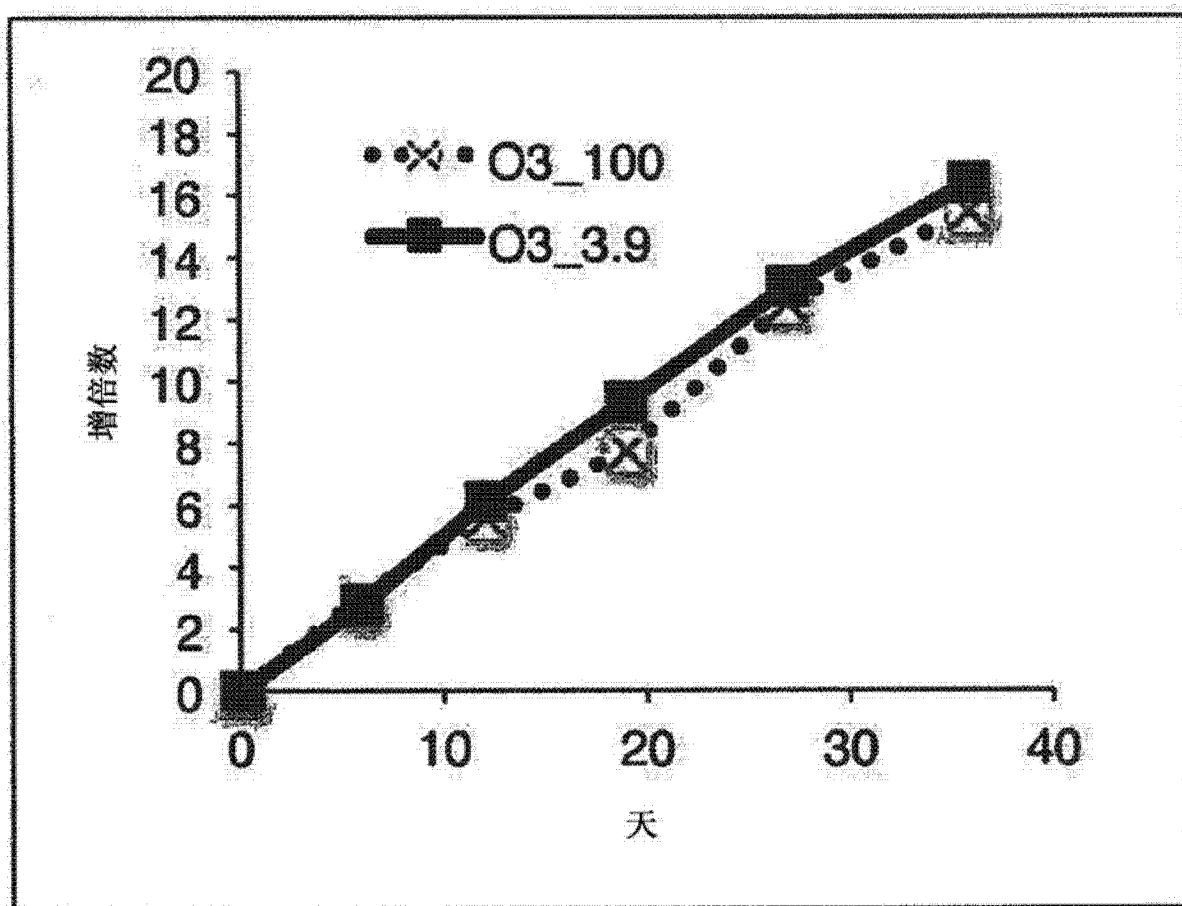


图 22

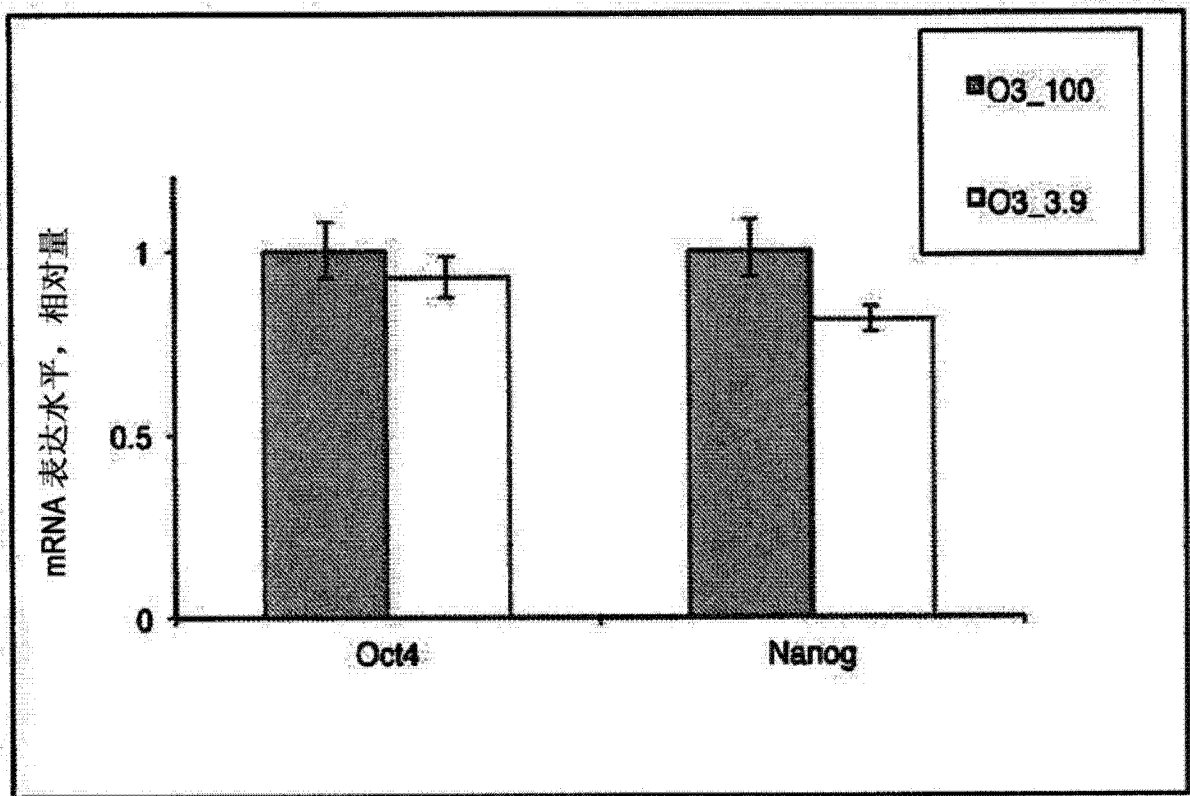


图 23

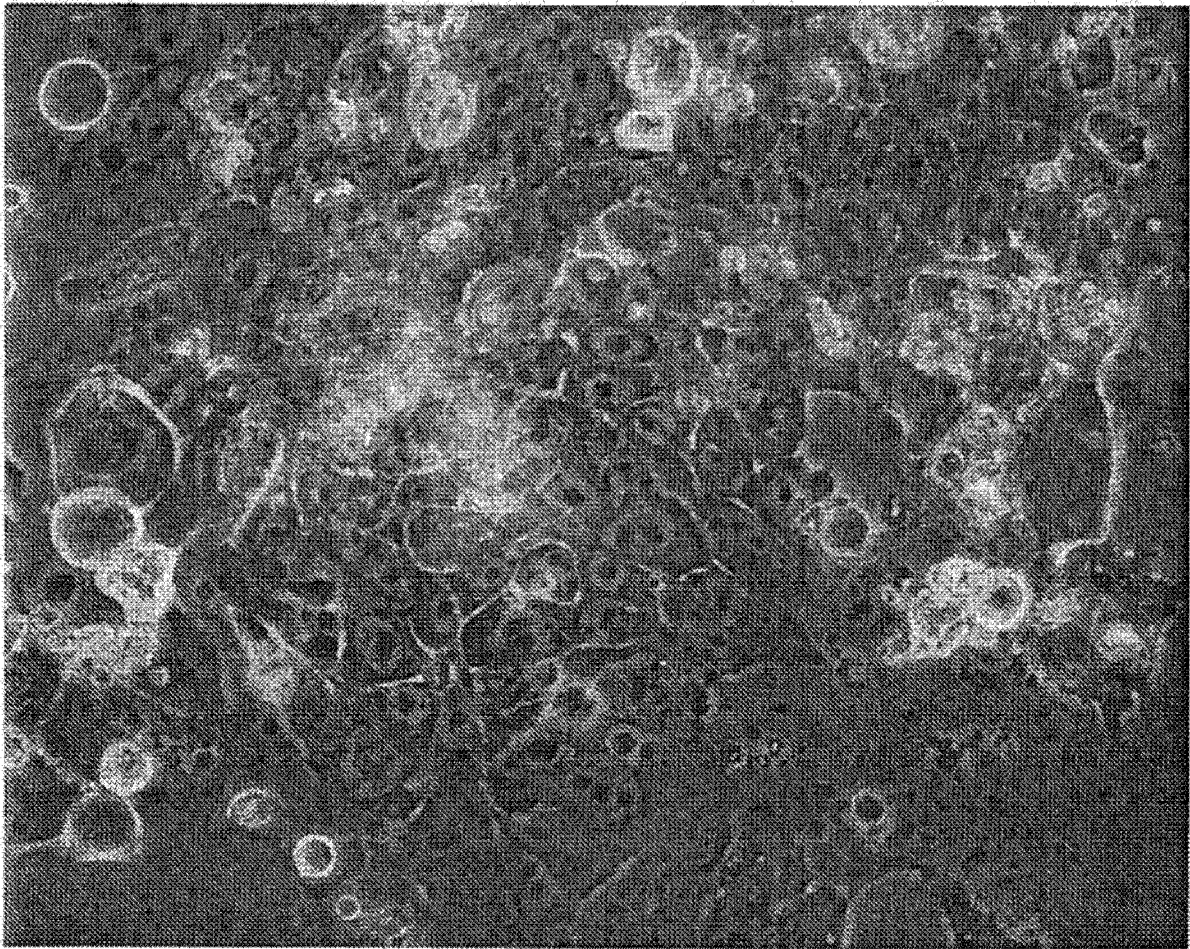


图 24