



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105483076 B

(45)授权公告日 2019.01.25

(21)申请号 201510974956.6

A61K 47/42(2017.01)

(22)申请日 2015.12.23

A61K 47/14(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 赵楠

申请公布号 CN 105483076 A

(43)申请公布日 2016.04.13

(73)专利权人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 刘平生 汪洋 周晓明 马学婧

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

公司 11245

代理人 关畅 何叶喧

(51)Int.Cl.

C12N 5/07(2010.01)

C07K 14/47(2006.01)

A61K 47/24(2006.01)

权利要求书2页 说明书15页

序列表14页 附图10页

(54)发明名称

一种脂肪体的制备方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种脂肪体的制备方法及其应用。本发明所提供的一种制备由中性脂质和单层磷脂膜组成的脂肪体的方法,包括下述步骤:
a1)将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应,然后进行离心,收集上层液相;
a2)将步骤a1)得到的上层液相进行两次以上的纯化;每次纯化的方法为:将上层液相与所述缓冲液混匀,然后使其分层,收集上层液相;a3)将步骤a2)得到的上层液相与所述缓冲液混合,然后使其分层,收集下层液相,其中含有脂肪体。利用本发明提供的方法制备的脂肪体,可招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白、获得人工脂滴,可招募一种或几种载脂蛋白、获得人工脂蛋白,均在制备药物和/或药物载体中具有重要作用。

1. 一种制备由中性脂质和单层磷脂膜组成的脂肪体的方法,包括下述步骤:

a1) 将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋 以实现两者的反应, 然后进行离心, 收集上层液相, 从上层液相中分离得到脂肪体;

所述“从上层液相中分离得到脂肪体”包括如下步骤:

a2) 将所述上层液相进行两次以上的纯化; 每次纯化的方法为: 将上层液相与所述缓冲液混匀, 然后使其分层, 收集上层液相;

a3) 将步骤a2) 得到的上层液相与所述缓冲液混合, 然后使其分层, 收集下层液相, 其中含有脂肪体;

所述步骤a2) 中, 所述“使其分层”是通过离心实现的, 所述离心的参数为: 18000~22000g、3~7min;

所述步骤a3) 中, 所述“使其分层”是通过离心实现的, 所述离心的参数为: 800~1200g、3~7min;

所述磷脂为b1)、b2) 或b3):

b1) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱;

b2) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸乙醇胺;

b3) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;

所述b2) 中, 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸乙醇胺的质量比为1:0.01~2;

所述b3) 中, 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比为1:0.01~2;

所述中性脂质为c1) 或c2):

c1) 甘油三酯;

c2) 胆固醇油酸酯和甘油三酯;

所述c2) 中, 胆固醇油酸酯和甘油三酯的质量比为1~5:1;

所述磷脂和所述中性脂质的质量比0.25~3:5。

2. 如权利要求1所述的方法, 其特征在于: 所述缓冲液为缓冲液B;

所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度为: 15mM~25mM HEPES, 80mM~120mM KCl, 1.5~2.5mM的MgCl₂; 溶剂为去离子水; pH为7.2~7.6。

3. 如权利要求2所述的方法, 其特征在于:

所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度为: 20mM HEPES, 100mM KCl, 2mM的MgCl₂; 溶剂为去离子水; pH为7.4。

4. 如权利要求1至3任一所述的方法, 其特征在于:

所述步骤a1) 中, 所述涡旋的参数为: 总时长为3~5min;

所述步骤a1) 中, 所述离心的参数为: 18000~22000g、3~7min。

5. 如权利要求4所述的方法, 其特征在于:

所述涡旋的参数为: 总时长4min;

所述离心的参数为: 20000g、5min。

6. 如权利要求1至3中任一所述的方法,其特征在于:
所述步骤a2)中,所述“上层液相进行两次以上的纯化”中的次数以上层液相与所述缓冲液混匀,分层后无沉淀为准。
7. 如权利要求1-3任一所述的方法,其特征在于:所述步骤a2)中,所述离心的参数为:20000g、5min。
8. 如权利要求1-3任一所述的方法,其特征在于:所述步骤a3)中,所述离心的参数为:1000g、5min。
9. 如权利要求1至3任一所述的方法,其特征在于:
所述b2)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸乙醇胺的质量比为2:1、1:1或1:2;
所述b3)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比为2:1、1:1或1:2;
所述c2)中,胆固醇油酸酯和甘油三酯的质量比为5:1、4:1、3:1或2:1。
10. 如权利要求1至3任一所述的方法,其特征在于:所述磷脂和所述中性脂质的质量比为(d2)至(d6)中的任一种:
(d2) 3:5;
(d3) 2:5;
(d4) 1:5;
(d5) 1:10;
(d6) 1:20。
11. 用权利要求1-10任一所述方法制备的脂肪体。
12. 一种制备人工脂滴的方法,包括在权利要求11所述脂肪体上招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白,获得人工脂滴。
13. 如权利要求12所述的方法,其特征在于:
所述固有蛋白为MLDS蛋白、MDT-28蛋白或Perilipin-2蛋白;
所述功能蛋白为ATGL;
所述MLDS蛋白的氨基酸序列如序列表中序列2所示;
所述MDT-28蛋白的氨基酸序列如序列表中序列4所示;
所述Perilipin-2蛋白的氨基酸序列如序列表中序列6所示;
所述ATGL的氨基酸序列如序列表中序列8所示。
14. 用权利要求12或13所述方法制备的人工脂滴。
15. 一种制备人工脂蛋白的方法,包括在权利要求11所述脂肪体上招募一种或几种载脂蛋白,获得人工脂蛋白。
16. 如权利要求15所述的方法,其特征在于:所述载脂蛋白为Apo A-I。
17. 用权利要求15或16所述方法制备的人工脂蛋白。
18. 权利要求11所述脂肪体在制备人工脂滴和/或人工脂蛋白和/或药物载体中的应用。
19. 权利要求14所述人工脂滴在制备药物载体中的应用。
20. 权利要求17所述人工脂蛋白在制备药物载体中的应用。

一种脂肪体的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种脂肪体的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 脂滴(lipid droplet,LD)是一种细胞器,它由中性脂质核心,单层磷脂膜与相关蛋白组成,这一细胞器的功能包括:1)脂质的合成,存储,代谢和运输;2)蛋白质的存储和降解;3)脂质信号分子和激素的生产和修饰;4)与其他细胞器的相互作用。由于脂滴具有上述的多种功能,许多人类的疾病,特别是代谢性疾病,与脂滴的形成和动态变化息息相关,然而,脂滴的形成机制和动态变化研究依然困难重重。目前仍然缺乏对脂滴如何形成、脂滴的功能及调控机制的全面了解。脂滴的组成的复杂性及其与其它细胞器的相互作用干扰了我们解构这些机制的能力。

[0003] 在过去的十年中,人们致力于脂滴的分离纯化,并通过蛋白质组和脂质组研究阐明脂滴的蛋白质和脂质组成。可是蛋白质组和其他的组分研究发现,分离得到的脂滴几乎总是含有内质网、线粒体和其它细胞器的碎片。可见,制备结构和组成上都接近天然脂滴的人工脂滴(Artificial Lipid Droplets,ALDs)是非常必要的。

[0004] 除脂滴以外,人体内还有一类由单层磷脂膜包裹中性脂,表面覆有蛋白的结构,称为脂蛋白(lipoprotein)。虽然脂蛋白与脂滴的结构非常类似,但二者定位不同,表面蛋白不同:脂滴存在于细胞中,而脂蛋白存在于血液中;脂滴上的主要蛋白为脂滴固有/结构蛋白(lipid droplet resident/structural protein),而脂蛋白上的主要蛋白为载脂蛋白(apolipoprotein)。不同的脂蛋白表面有不同的载脂蛋白。脂蛋白的种类和比例对人体健康有着非常重要的影响。高密度脂蛋白(high-density lipoprotein,HDL)是胆固醇逆向运输(cholesterol reverse transport)的关键组分,可防止胆固醇在血管壁上的沉积,对动脉粥样硬化等心脑血管疾病有非常重要的预防作用。人工脂蛋白或可用于高密度脂蛋白的补充制剂或其他药物载体。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的问题是提供药物载体及一种体外研究脂滴的体系。

[0006] 为解决上述问题,本发明首先提供了一种脂肪体的制备方法,所述脂肪体由中性脂质和单层磷脂膜组成。

[0007] 本发明所提供的制备脂肪体的方法,包括下述步骤:

[0008] a1) 将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应,然后进行离心,收集上层液相,从上层液相中分离得到脂肪体。

[0009] 所述“从上层液相中分离得到脂肪体”可包括如下步骤:

[0010] a2) 将所述上层液相进行两次以上的纯化;每次纯化的方法可为:将上层液相与所述缓冲液混匀,然后使其分层,收集上层液相;

[0011] a3) 将步骤a2)得到的上层液相与所述缓冲液混合,然后使其分层,收集下层液相,

其中含有脂肪体。

[0012] 所述缓冲液可为缓冲液B。

[0013] 所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度可为:15mM~25mM HEPES,80mM~120mM KCl,1.5~2.5mM的MgCl₂;溶剂可为去离子水;pH可为7.2~7.6。

[0014] 所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度具体可为:20mM HEPES,100mM KCl,2mM的MgCl₂;溶剂具体可为去离子水;pH具体可为7.4。

[0015] 所述步骤a1)中,所述涡旋的参数可为:总时长为3~5min;

[0016] 所述步骤a1)中,所述离心的参数可为:18000~22000g、3~7min。

[0017] 所述步骤a1)中,所述涡旋的参数具体可为:总时长4min。

[0018] 所述步骤a1)中,所述离心的参数具体可为:20000g、5min。

[0019] 所述步骤a2)中,所述“上层液相进行两次以上的纯化”中的次数以上层液相与所述缓冲液混匀,分层后无沉淀为准。

[0020] 所述步骤a2)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数可为:18000~22000g、3~7min。

[0021] 所述步骤a2)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数具体可为:20000g、5min。

[0022] 所述步骤a3)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数可为:800~1200g、3~7min。

[0023] 所述步骤a3)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数具体可为:1000g、5min。

[0024] 所述磷脂为b1)、b2)或b3):

[0025] b1) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC);

[0026] b2) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE);

[0027] b3) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。

[0028] 所述中性脂质为c1)或c2):

[0029] c1) 甘油三酯;

[0030] c2) 胆固醇油酸酯(cholesteryl oleate,CO)和甘油三酯。

[0031] 所述b2)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的质量比可为1:0.01~2;

[0032] 所述b3)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比可为1:0.01~2;

[0033] 所述c2)中,甘油三酯和胆固醇油酸酯的质量比可为1~5:1。

[0034] 所述b2)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的质量比具体可为2:1、1:1或1:2;

[0035] 所述b3)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比具体可为2:1、1:1或1:2;

[0036] 所述c2)中,甘油三酯和胆固醇油酸酯的质量比具体可为5:1、4:1、3:1或2:1。

[0037] 所述甘油三酯(triacylglycerol, TAG)的制备方法可如下:(1)取死亡的SD大鼠1只,取皮下脂肪与大网膜脂肪,剪碎;(2)将步骤(1)得到的碎组织置于离心管中,加入萃脂液甲(氯仿:去离子水=1:1,v/v),剧烈涡旋1分钟,然后8000g离心10分钟;(3)取步骤(2)得到的下层有机相,置于新的离心管中,如果发现其浑浊的话按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取直至其澄清;(4)取步骤(3)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(若吹干过程中发现其变浑浊的话则按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取);(5)取步骤(4)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(连续3次称重质量不变),产物即为甘油三酯。

[0038] 所述甘油三酯可为甘油三油酸酯(triolein, T0)。

[0039] 所述甘油三油酸酯(triolein, T0)具体可为Sigma公司的产品,产品目录号为92860。

[0040] 所述磷脂和所述中性脂质的质量比可为(d1)至(d6)中的任一种:

[0041] (d1) 0.25~3:5;

[0042] (d2) 3:5;

[0043] (d3) 2:5;

[0044] (d4) 1:5;

[0045] (d5) 1:10;

[0046] (d6) 1:20。

[0047] 利用上述脂肪体的制备方法制备的脂肪体也属于本发明的保护范围。

[0048] 本发明还提供了一种制备人工脂滴的方法。

[0049] 本发明所提供的制备人工脂滴的方法,包括在通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体上招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白,获得人工脂滴。

[0050] 所述固有蛋白可为MLDS蛋白、MDT-28蛋白或Perilipin-2蛋白。

[0051] 所述功能蛋白可为ATGL。

[0052] 所述MLDS蛋白可为如下e1)或e2):

[0053] e1) 氨基酸序列如序列表中序列2所示的蛋白质;

[0054] e2) 将e1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与MLDS蛋白具有相同功能的蛋白质。

[0055] 所述MDT-28蛋白可为如下f1)或f2):

[0056] f1) 氨基酸序列如序列表中序列4所示的蛋白质;

[0057] f2) 将f1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与MDT-28蛋白具有相同功能的蛋白质。

[0058] 所述Perilipin-2蛋白可为如下g1)或g2):

[0059] g1) 氨基酸序列如序列表中序列6所示的蛋白质;

[0060] g2) 将g1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与Perilipin-2蛋白具有相同功能的蛋白质。

[0061] 所述ATGL可为如下h1)或h2):

[0062] h1) 氨基酸序列如序列表中序列8所示的蛋白质;

[0063] h2) 将h1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与ATGL具有相同功能的蛋白质。

- [0064] 利用上述制备人工脂滴的方法制备的人工脂滴也属于本发明的保护范围。
- [0065] 本发明还提供了一种制备人工脂蛋白的方法。
- [0066] 本发明所提供的制备人工脂蛋白的方法,包括在通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体上招募一种或几种载脂蛋白,获得人工脂蛋白。
- [0067] 所述载脂蛋白为Apo A-I。
- [0068] 所述Apo A-I具体可通过参考文献Peitsch,M.C.et al.A purification method for apolipoprotein A-I and A-II.Anal Biochem 178,301-305(1989).中记载的方法获得。
- [0069] 利用上述制备人工脂蛋白的方法制备的人工脂蛋白也属于本发明的保护范围。
- [0070] (j1)至(j5)中的任一种也属于本发明的保护范围:
- [0071] (j1)通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体在制备人工脂滴和/或人工脂蛋白和/或药物载体中的应用;
- [0072] (j2)通过上述任一所述人工脂滴的制备方法制备的人工脂滴在制备药物载体中的应用;
- [0073] (j3)通过上述任一所述人工脂滴的制备方法制备的人工脂滴在制备药物中的应用;
- [0074] (j4)通过上述任一所述人工脂蛋白的制备方法制备的人工脂蛋白在制备药物载体中的应用;
- [0075] (j5)通过上述任一所述人工脂蛋白的制备方法制备的人工脂蛋白在制备药物中的应用。
- [0076] 本发明提供了一种脂肪体的制备方法及其应用。本发明所提供的一种脂肪体的制备方法通过涡旋混合中性脂质和磷脂,使用两步法纯化,制备出了由中性脂质核心和单层磷脂膜构成的脂肪体。在脂肪体上招募固有蛋白和/或功能蛋白,如细菌的蛋白MLDS,线虫的蛋白MDT-28、哺乳动物的蛋白Perilipin-2、脂肪甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase,ATGL),获得人工脂滴;在脂肪体上招募载脂蛋白,如Apo A-I(apolipoprotein A-I),获得人工脂蛋白。利用本发明提供的方法制备的脂肪体、人工脂滴和人工脂蛋白,可作为药物载体,进而完成各种生物学和医学的目标。

附图说明

- [0077] 图1为使用涡旋及两步法离心制备纯化脂肪体。
- [0078] A为脂肪体制备流程图:a为制备脂肪体的组分;b为制备脂肪体的流程图,蓝色箭头代表涡旋,红色箭头显示被移除的组分。
- [0079] B为脂肪体制备过程中各组分的形态:a为光学显微镜的观察结果(比例尺=10微米):箭头表示非球形结构,左图为初始制备组分,中图为沉淀组分,右图为上层组分;b为荧光显微镜的观察结果(比例尺=10微米):箭头表示非球形结构,左图为初始制备组分,中图为沉淀组分,右图为上层组分;c为显微镜进行透射电镜正染的结果(比例尺=1微米):左图为初始制备组分,中图为沉淀组分,右图为上层组分。
- [0080] C为光学显微镜观察脂肪体的形态(比例尺=10微米):左图为微分干涉相衬光学显微镜,右图为荧光显微镜。

[0081] D为透射电镜正染脂肪体和脂质体的结果(比例尺=500纳米):左图为脂肪体,右图为脂质体。

[0082] 图2为脂肪体的特征。

[0083] 其中A为脂肪体和线粒体的形态(比例尺=500纳米):a为透射电镜的观察结果:左图为脂肪体,右图为线粒体;b为冷冻电镜的观察结果:左图为脂肪体,右图为线粒体。

[0084] B通过动态光散射(DLS)测定脂肪体的尺寸,多分散性指数=0.085。

[0085] C为薄层层析色谱分析脂肪体制备的过程中每个组分的DOPC/总脂质的比例:a为碘蒸气对样品染色结果(泳道1为脂质Marker,泳道2为初始制备组分,泳道3为混合组分,泳道4为脂肪体a);b为各组分DOPC与总脂质的比例,N=3,平均值±方差。

[0086] D为脂肪体与脂滴的形态:a为脂肪体的形态,左图为肉眼观察结果,中图为光学显微镜的观察结果,右图为荧光显微镜的观察结果;b为小鼠肝脏组织-脂滴的形态,左图为肉眼观察结果,中图为光学显微镜的观察结果,右图为荧光显微镜的观察结果;c为小鼠棕色脂肪组织-脂滴的形态,左图为肉眼观察结果,中图为光学显微镜的观察结果,右图为荧光显微镜的观察结果;d为浊红球菌RHA1-脂滴的形态,左图为肉眼观察结果,中图为光学显微镜的观察结果,右图为荧光显微镜的观察结果。

[0087] 图3制备脂肪体的影响因素。

[0088] A为不同涡旋时间(1为脂肪体b,2为脂肪体c,3为脂肪体d,4为脂肪体a)对脂肪体的影响:a为脂肪体的形态,b为脂肪体的光密度,c为脂肪体的尺寸;

[0089] B为不同比例的DOPC和TAG制备的脂肪体的光密度(a)和尺寸(b);

[0090] C为不同比例的DOPC和DSPC制备的脂肪体的光密度(a)和尺寸(b);

[0091] D为不同比例的DOPC和DOPE制备的脂肪体的光密度(a)和尺寸(b);

[0092] E为不同比例的TAG和CO制备的脂肪体的光密度(a)和尺寸(b);

[0093] F为4℃或室温下孵育7天脂肪体的光密度(a)和尺寸(b)。

[0094] 图4为室温或4℃下储存7天的脂肪体的显微镜照片(比例尺=10微米)。

[0095] A和C为光学显微镜;B和D为荧光显微镜。

[0096] 图5为SMT3-Perilipin-2蛋白的分离与纯化。

[0097] A为用SDS-PAGE分离并通过银染(上图)和Western印迹(下图)分析IPTG诱导前后的全细胞裂解液。黑色箭头指向SMT3-Perilipin-2蛋白对应的条带;

[0098] B为经镍离子金属亲和层析柱纯化的各组分进行SDS-PAGE和胶体蓝染色的分析结果。

[0099] C为从镍柱洗脱的SMT3-Perilipin-2蛋白通过分子筛进一步纯化。四个组分(1,2,3和4)根据其保留体积分别收集,图中用蓝色短线分开表示;

[0100] D为通过SDS-PAGE分析镍柱纯化的SMT3-Perilipin-2蛋白(咪唑洗脱)和分子筛得到的组分。

[0101] 图6为人工重组的不同物种来源的脂滴固有/结构蛋白被招募到脂肪体上。

[0102] 图7为通过募集脂滴的固有/结构蛋白构建人工脂滴。

[0103] A为人工脂滴构建示意图;

[0104] B为脂肪体可以招募脂滴固有/结构蛋白GFP融合蛋白;

[0105] C为SMT3-Perilipin-2蛋白饱和度测定。

- [0106] 图8为脂肪体招募脂滴固有/结构蛋白GFP融合蛋白(比例尺=5微米)。
- [0107] 图9为SMT3-ATGL蛋白在室温或4℃下与脂肪体孵育后的银染分析结果。
- [0108] 图10为脂肪体上募集ATGL与Apo A-I。
- [0109] A为SMT3-ATGL蛋白饱和度测定,其中泳道1至7对应加入的SMT3-ATGL蛋白浓度分别为:0.091,0.132,0.171,0.209,0.244,0.278,0.310微克/微升;
- [0110] B为通过募集高密度脂蛋白的载脂蛋白Apo A-I构建人工脂蛋白。

具体实施方式

[0111] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。

[0112] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0113] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0114] 本发明中所述脂肪体(adiposome)定义为一类以天然或人工合成的中性脂质为核心,天然或人工合成的极性脂质单层膜包裹的,人工合成的结构。脂肪体的脂质组成及形态结构与脂滴近似,因此可以作为制备人工脂滴的主要原材料。

[0115] 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)为Avanti公司的产品,产品状态为DOPC溶液,即DOPC溶解于氯仿中。

[0116] 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)为Avanti公司的产品,产品状态为DOPE溶液,即DOPE溶解于氯仿中。

[0117] 1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)为Avanti公司的产品,产品状态为DSPC溶液,即DSPC溶解于氯仿中。

[0118] 胆固醇油酸酯(cholesteryl oleate,CO)为Alfa Aesar公司的产品,尼罗红为Sigma-Aldrich公司的产品,LipidTOX red为Invitrogen公司的产品、产品目录号为H34476,抗Perilipin-2为Abcam公司的产品、产品目录号为ab108323,Percoll为GE Healthcare公司产品,醋酸铀、25%戊二醛和EMbed 812包埋试剂盒均为Electron Microscopy Sciences公司(哈特菲尔德,美国)产品,四氧化钨(电镜级)为NAKALAI Tesque公司(京都,日本)产品,丹宁酸为Sigma公司的产品,C57BL/6小鼠为北京维通利华实验动物技术有限公司产品。动态光散射仪(DLS,Delsa Nano C颗粒分析仪)为Beckman公司产品。

[0119] 下述实施例中的“涡旋”均使用Vortex-Genie 1涡旋仪(Scientific Industries, Inc.公司,美国)进行,“胶体蓝染色”均使用胶体蓝染色试剂盒(Invitrogen公司的产品,产品目录号为LC6025)进行。

[0120] 线粒体从C57BL/6小鼠的棕色脂肪组织分离得到,具体分离方法参考Yu, J. et al. Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochim Biophys Acta* 1853, 918-928, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.020 (2015).

[0121] 2.5%戊二醛溶液的制备方法:将25%戊二醛溶解于pH7.4、0.1M PB缓冲液,使戊二醛在体系中质量浓度为2.5%。

[0122] 实施例1中的甘油三酯(triacylglycerol, TAG)的制备方法如下:(1)取死亡的SD大鼠1只,取皮下脂肪与大网膜脂肪,剪碎;(2)将步骤(1)得到的碎组织置于离心管中,加入

萃脂液甲(氯仿:去离子水=1:1,v/v),剧烈涡旋1分钟,然后8000g离心10分钟;(3)取步骤(2)得到的下层有机相,置于新的离心管中,如果发现其浑浊的话按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取直至其澄清;(4)取步骤(3)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干,(若吹干过程中发现其变浑浊的话则按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取);(5)取步骤(4)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(连续3次称重质量不变),产物即为甘油三酯。

[0123] 缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度为:20mM HEPES(实际应用中15mM-25mM HEPES均可),100mM KCl(实际应用中80mM-120mM KCl均可),2mM MgCl₂(实际应用中1.5-2.5mM MgCl₂均可);溶剂为去离子水;pH为7.4(实际应用中7.2-7.6均可)。

[0124] 脂质体为磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺按质量比3:7混合,然后用带有100nm孔径的聚碳酸酯滤器微型挤出机(Avanti公司产品)制备的单层脂质体,具体制备方法参考 Nakatogawa,H.,Ichimura,Y.&Ohsumi,Y.Atg8,a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation,mediates membrane tethering and hemifusion.Cell 130, 165-178,doi:10.1016/j.cell.2007.05.021(2007)。

[0125] 用荧光显微镜对脂肪体或脂滴进行观察,具体步骤如下:将脂肪体或脂滴用尼罗红(浓度为1μg/ml)或LipidTOX red稀释液(LipidTOX red用缓冲液B以1:1000倍稀释,得到LipidTOX red稀释液)染色,室温孵育30min,取孵育后的脂肪体或脂滴6μl,滴加在载玻片上,然后加2μl抗荧光淬灭剂(碧云天公司产品,产品目录号为P0126)混合、盖盖玻片。用Zeiss M2荧光显微镜、奥林巴斯FV1000荧光共聚焦显微镜或DeltaVision OMX V3超分辨率显微镜获得荧光图像。

[0126] 透视电镜正染具体步骤如下:取脂肪体或脂质体8μl滴在辉光放电处理后的覆有碳膜的铜网上,静置1min,用滤纸吸干多余的样品,然后将样品用1%四氧化锇固定10min、去离子水漂洗,再将样品分别用0.1%单宁酸和2%乙酸双氧铀依次染色5min、用去离子水漂洗。用Tecnai Spirit(FEI)透射型电子显微镜在100千伏下获得显微照片。

[0127] 用透视电镜对脂肪体或线粒体进行观察,具体步骤如下:取脂肪体或线粒体迅速与融化的3%低熔点琼脂糖混合,并在冰上凝固,然后切成约1mm³的小块。将小块在2.5%戊二醛溶液中固定30min,然后继续用溶于pH7.4、0.1M PB缓冲液的1%四氧化锇在室温下固定1h,得到固定块。将该固定块用去离子水洗涤,用乙醇脱水,然后用EMbed 812包埋试剂盒进行渗透和包埋,并在60℃下聚合24h,用Leica EM UC6超微切片机制备70nm超薄切片。用Tecnai Spirit(FEI)透射型电子显微镜在100千伏下获得显微照片。

[0128] 用冷冻电镜对脂肪体或线粒体进行观察,具体步骤如下:取脂肪体或线粒体4μl,滴加在铜网上。使用Vitrobot Mark IV(FEI公司产品)在100%湿度下吸干3秒,然后快速浸入预先用液氮冷却的液态乙烷中使其玻璃化。使用装有Gatan UltraScan4000相机(产品型号895)的Titan Krios冷冻电子显微镜(FEI公司产品)在300千伏下拍摄显微照片。

[0129] 缓冲液T为pH7.4、含50mM Tris-HCl和150mM NaCl的缓冲液。

[0130] 载体pET28a为Novagen公司产品。

[0131] “改造后的pET28a质粒”记载于如下文献中:Hu,W.,Wu,H.,Zhang,H.,Gong,W.& Perrett,S.Resonance assignments for the substrate binding domain of Hsp70chaperone Ssa1 from Saccharomyces cerevisiae.Biomol NMR Assign 9,329-332,doi:10.1007/s12104-015-9603-5(2015)。“改造后的pET28a质粒”在下文中命名为载

体pET28a-SMT3。

[0132] 载体pGEX-6p-1购自Novagen公司。

[0133] 镍离子金属亲和层析柱填料为螯合有镍离子的Chelating Sepharose Fast Flow,为Amersham Biosciences公司产品。

[0134] GST亲和层析柱填料为生工生物工程(上海)有限公司产品。

[0135] 实施例1、脂肪体的制备

[0136] 一、制备脂肪体a

[0137] 1、利用运用涡旋和两步法离心制备脂肪体a,具体步骤如下:

[0138] (1)取80 μ L DOPC溶液(其中含有2mg DOPC)加入到微量离心管中,用高纯氮气吹干溶剂。

[0139] (2)完成步骤(1)后,向微量离心管中加入100 μ l缓冲液B和5mg TAG,涡旋4min(涡旋10s,停止10s),得到乳白色的脂质混合物1(即初始制备组分),将该脂质混合物1以20000g离心5min(实际应用中18000-22000g离心3-7min均可)。离心后,微量离心管中底部为沉淀组分1,液相体系呈现两层分层(上层为白色带1,白色带1以下的部分为溶液1)。

[0140] (3)完成步骤(2)后,通过抽取的方式弃除溶液1与沉淀组分1,保留白色带1,加入100 μ l缓冲液B,涡旋,得到乳白色的脂质混合物2,将该脂质混合物2以20000g离心5min(实际应用中18000-22000g离心3-7min均可)。离心后,如果微量离心管中底部有沉淀,即为沉淀组分2,液相体系呈现两层分层(上层为白色带2,白色带2以下的部分为溶液2)。

[0141] (4)完成步骤(3)后,通过抽取的方式弃除溶液2与沉淀组分2,保留白色带2,加入100 μ l缓冲液B,涡旋,得到乳白色的脂质混合物3,将该脂质混合物3以20000g离心5min(实际应用中18000-22000g离心3-7min均可)。离心后,液相体系呈现两层分层(上层为白色带3,白色带3以下的部分为溶液3)。

[0142] 步骤(4)即步骤(3)的重复,实际应用中的步骤(3)的重复次数以白色带下层无沉淀为准。

[0143] (5)完成步骤(4)后,取白色带3,加入100 μ l缓冲液B,涡旋混匀,1000g离心5min(实际应用中800-1200g离心3-7min),离心后,液相体系呈现两层分层(上层为白色带4,白色带4以下的部分为溶液4)。收集溶液4,即为脂肪体a。

[0144] 将上述步骤中的白色带4命名为上层组分。

[0145] 将上述步骤中的沉淀组分1和沉淀组分2混合,命名为沉淀组分。

[0146] 将上述步骤中的沉淀组分和上层组分混合,命名为混合组分。

[0147] 利用上述方法制备脂肪体a的具体流程见图1中A(其中a为制备脂肪体a的组分,b为制备脂肪体a的流程图)。对制备脂肪体a过程中的组分形态用光学显微镜和荧光显微镜进行观察、用显微镜进行透射电镜正染,结果如下:初始制备组分、沉淀组分和上层组分中除含中性脂质的球状结构,还存在许多其它类型的结构(图1中B);溶液4几乎所有结构均为球形,且均为尼罗红阳性,而且尼罗红标记的结构尺寸与光学显微镜图像中的球状结构的尺寸一致,这表明这些球状结构都含有TAG核心(图1中C);将脂肪体a和脂质体用显微镜进行透射电镜正染,结果表明两者具有明显的差异(图1中D)。

[0148] 2、脂肪体a的特征

[0149] (1)用透射电镜分别对脂肪体a和线粒体进行观察,用冷冻电镜分别对脂肪体a和

线粒体进行观察,结果表明(图2中A),脂肪体a由单层磷脂膜包裹,线粒体由双层磷脂膜包裹。

[0150] (2) 用动态光散射仪测定脂肪体a的平均尺寸约为189纳米(图2中B),然后使用文献(Ding Y,Zhang S,et al.Isolating lipid droplets from multiple species.Nat Protoc.2013 Jan;8(1):43-51.doi:10.1038/nprot.2012.142.Epub 2012 Dec 6.)中的公式,计算得到脂肪体a中DOPC与总脂质(总脂质即TAG和DOPC)的体积比约为6.6%。

[0151] (3) 使用薄层色谱法分析脂质,具体步骤如下:

[0152] a、取待提取物(待提取物体积和下述萃脂液乙中缓冲液B的体积之和为300 μ l),用萃脂液乙(由300 μ l氯仿、300 μ l甲醇和缓冲液B组成)进行萃取以获取脂质(收集有机相,命名为有机相甲),剩余的部分再加入300 μ l氯仿进行萃取以进一步获取脂质(收集有机相,命名为有机相乙);将有机相甲和有机相乙混合,用氮气吹干,得到待提取物的总脂质;待提取物为脂肪体a、脂质混合物1(即初始制备组分)或混合组分。

[0153] b、将步骤a得到的总脂质溶解在100 μ l氯仿中,上样10 μ l至硅胶板;

[0154] c、完成步骤b后,样品在正己烷:乙醚:冰乙酸(体积比为80:20:1)的展开剂中展开,以分离TAG;

[0155] d、完成步骤c后,在空气中挥干有机溶剂(即步骤c中的正己烷、乙醚和冰乙酸),将硅胶板再次在氯仿:甲醇:冰乙酸:水(体积比为75:13:9:3)的溶剂系统中展开,以分离DOPC;

[0156] e、完成步骤d后,用饱和碘蒸气进行染色,用ImageJ软件对脂质斑点的灰度进行量化。

[0157] 结果表明(图2中C),样品中DOPC与脂质的比例为 $7.1 \pm 1.2\%$,与步骤(2)中的计算值相似,表明脂肪体a具有单层磷脂膜的结构。

[0158] (4) 根据Ding Y,Zhang S,et al.Isolating lipid droplets from multiple species.Nat Protoc.2013 Jan;8(1):43-51.doi:10.1038/nprot.2012.142.Epub 2012 Dec 6.)和Yu,J.et al.Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment.Biochim Biophys Acta 1853,918-928,doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.020(2015)中记载的方法分别从C57BL/6小鼠肝脏组织、C57BL/6小鼠棕色脂肪组织和产油菌RHA1中分离脂滴,依次命名为肝脏组织-脂滴(Liver LD)、棕色脂肪组织-脂滴(BAT LD)和RHA1-脂滴(RHA1 LD)。

[0159] 脂肪体a、RHA1 LD、Liver LD和BAT LD均呈牛奶状溶液。用动态光散射仪测量脂肪体a、RHA1 LD、Liver LD和BAT LD的平均尺寸,结果BAT LD的粒径最大,平均直径为1848nm;RHA1 LD的粒径最小,平均直径为493nm;脂肪体a的平均直径为189nm(图2中B)。上述结果与光学显微镜得到的结果基本一致(图2中D)。用荧光显微镜对脂肪体或脂滴进行观察,脂肪体a、RHA1 LD、Liver LD和BAT LD都呈现球状结构(图2中D),表明它们都含有TAG核心。

[0160] 3、影响脂肪体形成的因素

[0161] 为优化制备脂肪体的条件,我们系统地改变了步骤1中所述涡旋和两步法中两个主要因素,即步骤(2)中的涡旋时间和两种原料(磷脂与中性脂质)的比例,并通过测量在600nm波长处的光密度(OD_{600})来反映脂肪体的产量,通过动态光散射仪测量脂肪体的尺寸。

[0162] (1) 涡旋时间的优化

[0163] 按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的涡旋4min分别替换为涡旋1min、涡旋2min和涡旋3min,其它步骤均不变,得到脂肪体b、脂肪体c和脂肪体d,然后分别测量脂肪体a、脂肪体b、脂肪体c或脂肪体d的尺寸和光密度。

[0164] 实验结果见图3中A。结果表明,脂肪体的产量随涡旋时间的延长而上升,而脂肪体尺寸随涡旋时间的延长而降低,在大约2min达到最小值并进入平台。综合脂肪体的光密度较高(即产量较高)且脂肪体的尺寸较大两个因素,确定涡旋和两步法中步骤(2)的最佳涡旋时间为4min。

[0165] (2) 磷脂与中性脂质的比例优化

[0166] 制备脂肪体a中的磷脂具体为DOPC,中性脂质具体为TAG,DOPC:TAG的比例为2:5。

[0167] ①按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的2mg DOPC分别替换为0.25mg DOPC、0.5mg DOPC、1mg DOPC和3mg DOPC,其它步骤均不变,得到脂肪体a1(DOPC:TAG的比例为1:20)、脂肪体a2(DOPC:TAG的比例为1:10)、脂肪体a3(DOPC:TAG的比例为1:5)和脂肪体a4(DOPC:TAG的比例为3:5),然后分别测量脂肪体a1、脂肪体a2、脂肪体a3和脂肪体a4的尺寸和光密度。

[0168] 实验结果见图3中B。结果表明,当DOPC与TAG的比例为2:5时,脂肪体的产量最高;脂肪体的尺寸随着DOPC与TAG的比例上升而减小,至DOPC:TAG为1:5时达到最小并进入平台。综合脂肪体的即产量较高且脂肪体的尺寸较大两个因素,确定制备脂肪体中DOPC与TAG的最佳比例为2:5。

[0169] ②按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的2mg DOPC分别替换为1.33mg DOPC和0.67mg DSPC、1mg DOPC和1mg DSPC、0.67mg DOPC和1.33mg DSPC、以及2mg DSPC,其它步骤均不变,得到脂肪体A1(DOPC: DSPC的比例为2:1)、脂肪体A2(DOPC: DSPC的比例为1:1)、脂肪体A3(DOPC: DSPC的比例为1:2)和脂肪体A4(磷脂仅为DSPC),然后分别测量脂肪体A1、脂肪体A2、脂肪体A3和脂肪体A4的尺寸和光密度。

[0170] 结果表明,当DOPC与DSPC的比例降低时,即DSPC的相对含量升高时,脂肪体的产量明显下降(图3中C的a),而脂肪体的尺寸随着DOPC与DSPC的比例降低而急剧增大(图3中C的b)。

[0171] ③按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的2mg DOPC分别替换为1.33mg DOPC和0.67mg DOPE、1mg DOPC和1mg DOPE、0.67mg DOPC和1.33mg DOPE、和、2mg DOPE,其它步骤均不变,得到脂肪体B1(DOPC:DOPE的比例为2:1)、脂肪体B2(DOPC:DOPE的比例为1:1)、脂肪体B3(DOPC:DOPE的比例为1:2)和脂肪体B4(磷脂仅为DOPE),然后分别测量脂肪体B1、脂肪体B2、脂肪体B3和脂肪体B4的尺寸和光密度。

[0172] 结果表明,DOPE的掺入不影响脂肪体的产量,直至DOPC与DOPE的比例达到1:2时,脂肪体的产量才急剧下降(图3中D的a),而脂肪体的尺寸随着DOPC与DOPE的比例降低而急剧增大,直至DOPC与DOPE的比例达到1:2时,脂肪体的尺寸无法检出(图3中D的b)。

[0173] ④按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的5mg TAG分别替换为4.17mg TAG和0.83mg CO、4mg TAG和1mg CO、3.75mg TAG和1.25mg CO、和、3.33mg TAG和1.67mg CO,其它步骤均不变,得到脂肪体C1(TAG:CO的比例为5:1)、脂肪体C2(TAG:CO的比例为4:1)、脂肪体C3(TAG:CO的比例为3:1)和脂肪体C4(TAG:CO的比例为2:1),然后分别测量脂肪体C1、脂肪体C2、脂肪体C3和脂肪体C4的尺寸和光密度。

[0174] 结果表明,CO的掺入不影响脂肪体的产量,直至TAG与CO的比例达到3:1时,脂肪体的产量才显著下降(图3中E的a),脂肪体的尺寸也略有下降(图3中E的b),表明中性脂质组成可以极大地影响脂肪体产量和大小。

[0175] 4、脂肪体的稳定性

[0176] 在室温或4℃条件下孵育脂肪体a,孵育7天。整个孵育过程中,每天测定脂肪体a的尺寸、在OD₆₀₀处的光密度,并用光学显微镜和荧光显微镜对脂肪体进行观察。

[0177] 结果表明(图3中F和图4),整个孵育过程中,脂肪体a的光密度和尺寸均无显著变化,可见脂肪体a是相对稳定的。

[0178] 实施例2、通过招募固有蛋白和/或功能蛋白的重组人工脂滴和通过招募载脂蛋白重组人工脂蛋白

[0179] 下述实施例中的Ulp1记载在如下文献中:Hu,W.,Wu,H.,Zhang,H.,Gong,W.& Perrett,S. Resonance assignments for the substrate binding domain of Hsp70 chaperone Ssa1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomol NMR Assign* 9,329-332,doi:10.1007/s12104-015-9603-5 (2015)。在下述实验孵育过程中Ulp1可剪切蛋白上的SMT3标签。

[0180] 脂滴是高度动态的,并通过多种脂滴蛋白的介导参与数目繁多的生理功能和相互作用。脂滴上的蛋白可大致分为两类:固有蛋白和动态蛋白。固有蛋白被认为选择性的定位于脂滴上,参与脂滴大小的控制,并介导动态蛋白的定位。例如,磷酸化的PLIN1促使激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive lipase,HSL)定位于脂滴上。因此,使用脂肪体来解构脂滴的功能,就必须在脂肪体上装载脂滴固有蛋白,然后在成功招募固有蛋白生成人工脂滴的基础上,进一步招募功能蛋白。对于脂蛋白而言,不同的载脂蛋白不仅是不同脂蛋白的特异性标记,同时也是脂蛋白的骨架之一。本发明中,脂滴固有蛋白具体为来自于从细菌到哺乳动物的不同生物体的脂滴固有蛋白,包括从产油菌RHA1中分离的RHA1-脂滴(RHA1 LD)上的MLDS蛋白,线虫脂滴上的MDT-28蛋白和哺乳动物非脂肪细胞中的Perilipin-2蛋白,功能蛋白为ATGL。载脂蛋白具体为来自于人的载脂蛋白A1(apolipoprotein A-I,Apo A-I)。

[0181] 一、蛋白的表达和纯化

[0182] 人工合成序列表中序列1所示的DNA分子(即MLDS基因),序列1所示的DNA分子编码序列2所示的蛋白质(即MLDS蛋白)。

[0183] 人工合成序列表中序列3所示的DNA分子(即MDT-28基因),序列3所示的DNA分子编码序列4所示的蛋白质(即MDT-28蛋白)。

[0184] 人工合成序列表中序列5所示的DNA分子(即Perilipin-2基因),序列5所示的DNA分子编码序列6所示的蛋白质(即Perilipin-2蛋白)。

[0185] 人工合成序列表中序列7所示的DNA分子(即ATGL基因),序列7所示的DNA分子编码序列8所示的蛋白质(即ATGL)。

[0186] 人工合成序列表中序列9所示的DNA分子(即MLDS-GFP融合基因),序列9所示的DNA分子编码序列10所示的蛋白质(即MLDS-GFP融合蛋白)。

[0187] 人工合成序列表中序列11所示的DNA分子(即MDT-28-GFP融合基因),序列11所示的DNA分子编码序列12所示的蛋白质(即MDT-28-GFP融合蛋白)。

[0188] 人工合成序列表中序列13所示的DNA分子(即Perilipin-2-GFP融合基因),序列13

所示的DNA分子编码序列14所示的蛋白质(即Perilipin-2-GFP融合蛋白)。

[0189] 牛血清白蛋白购自Sigma公司,产品目录号为A4612。

[0190] 1、SMT3-Perilipin-2蛋白的表达与纯化

[0191] (1)用序列表中序列5所示的DNA分子替换载体pET28a-SMT3的限制性内切酶EcoRI和XhoI识别序列间的片段(载体pET28a-SMT3被限制性核酸内切酶EcoRI和XhoI切成一个大片段和一个小片段,将大片段与序列5中所示的DNA分子连接),得到重组质粒。该重组质粒可表达N-末端融合有6×His标签和SMT3结构域的可溶性蛋白。

[0192] (2)将步骤(1)构建的重组质粒导入大肠杆菌BL21(DE3),得到含有重组质粒的重组大肠杆菌。

[0193] (3)将步骤(2)获得的重组大肠杆菌接种于2×YT培养基(将16g蛋白胨、10g酵母提取物和4g氯化钠溶解于1000mL蒸馏水),37℃培养,当重组大肠杆菌的培养菌液的OD₆₀₀达到0.6(将该培养菌液命名为诱导前菌液),加入异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG),使IPTG在体系中浓度为0.4mM,16℃诱导24h(IPTG诱导后的培养菌液命名为诱导后菌液)。

[0194] 分别收集(4000rpm、离心20min)诱导前菌液或诱导后菌液的菌体,重悬于缓冲液T中,然后用高压细胞破碎仪(型号为JNBIO JN-3000PLUS)裂解,得到全细胞裂解液。将全细胞裂解液进行SDS-PAGE,然后通过银染和Western印迹法进行分析。结果表明(图5中A,其中a为银染分析结果,b为Western印迹法分析结果,箭头指向SMT3-Perilipin-2蛋白对应的条带),诱导后菌液中SMT3-Perilipin-2蛋白大量表达。

[0195] (4)取步骤(3)的诱导后菌液的菌体的全细胞裂解液,30000g离心50min,得到的上清和沉淀,将上清上样至镍离子金属亲和层析柱(填料为螯合有镍离子的Chelating Sepharose Fast Flow,柱体购自Thermo,产品目录号为29924,柱体积4mL,内径1.2cm),然后先用含20mM咪唑的缓冲液T洗脱12个柱体积以去除非目的蛋白一次,再用含500mM咪唑的缓冲液T洗脱3个柱体积以收集目的蛋白(过柱后全部缓冲液T均含目的蛋白)两次,然后用离心超滤管(Amicon公司产品)进行缓冲液交换去除咪唑,通过尺寸排阻色谱法(Size Exclusive Chromatography,SEC)再次纯化(HiLoad 16/600 Superdex 200柱,GE公司产品),洗脱流速为0.8mL/min,根据其保留体积分别收集四个组分,分别命名为组分1(保留体积为45mL-57mL)、组分2(保留体积为57mL-67mL)、组分3(保留体积为67mL-79mL)和组分4(保留体积为79mL-94mL)。

[0196] 将镍离子金属亲和层析柱纯化的各组分的进行SDS-PAGE,然后用胶体蓝染色,结果见图5中B(泳道依次为全细胞裂解液、上清、沉淀、流穿、咪唑洗脱液-1(20mM咪唑洗脱液)、咪唑洗脱液-2(500mM咪唑洗脱液第一部分)、咪唑洗脱液-3(500mM咪唑洗脱液第二部分)。尺寸排阻色谱法分子筛纯化结果见图5中C(峰1为组分1,峰2为组分2,峰3为组分3,峰4为组分4)。对全部500mM咪唑二次洗脱液(即咪唑洗脱液-2合并咪唑洗脱液-3)(图5中D的左图)和尺寸排阻色谱法纯化得到的四个组分(组分1、组分2、组分3和组分4)(图5中D的右图)进行SDS-PAGE和胶体蓝染色,结果表明,组分1包含了纯化后的SMT3-Perilipin-2蛋白。

[0197] 2、MLDS蛋白的表达与纯化

[0198] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列1所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pGEX-6p-1、限制性内切酶XhoI替换为BamHI,步骤1中(4)的镍离子金属亲和层析柱替换为GST亲和层析柱、咪唑替换为还原性谷

胱甘肽,其它步骤均不变,获得纯化MLDS蛋白。

[0199] 3、MDT-28蛋白的表达与纯化

[0200] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列3所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pGEX-6p-1、限制性内切酶EcoRI和XhoI替换为限制性内切酶BamHI和NotI,步骤1中(4)的镍离子金属亲和层析柱替换为GST亲和层析柱、咪唑替换为还原性谷胱甘肽,其它步骤均不变,获得纯化MDT-28蛋白。

[0201] 4、MLDS-GFP融合蛋白的表达与纯化

[0202] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列9所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pET28a,其它步骤均不变,获得纯化MLDS-GFP融合蛋白。

[0203] 5、MDT-28-GFP融合蛋白的表达与纯化

[0204] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列11所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pET28a、限制性内切酶EcoRI替换为限制性内切酶BamHI,其它步骤均不变,获得纯化MDT-28-GFP融合蛋白。

[0205] 6、Perilipin-2-GFP融合蛋白的表达与纯化

[0206] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列13所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pET28a,其它步骤均不变,获得纯化Perilipin-2-GFP融合蛋白。

[0207] 7、SMT3-ATGL蛋白的表达与纯化

[0208] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列7所示的DNA分子,步骤1中(2)的大肠杆菌BL21(DE3)替换为大肠杆菌Rosetta,其它步骤均不变,获得纯化SMT3-ATGL蛋白。

[0209] 8、Apo A-I的表达与纯化

[0210] 参考文献Peitsch,M.C.et al.A purification method for apolipoprotein A-I and A-II. Anal Biochem 178,301-305 (1989).中记载的方法,获得纯化Apo A-I。

[0211] 二、脂肪体对固有蛋白和/或功能蛋白和/或载脂蛋白的招募

[0212] 1、固有蛋白的招募与分布

[0213] (1) Perilipin-2蛋白的招募

[0214] a1、5 μ g SMT3-Perilipin-2蛋白、25ng Ulp1和实施例1制备的50 μ l脂肪体a混合,得到100 μ l的混合体系。

[0215] a2、完成步骤a1后,室温下(实际操作中在冰上也可)孵育1h,得到混合体系。

[0216] a3、完成步骤a2后,取混合体系,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层(上层为脂肪体),抽去下层溶液,保留上层。

[0217] a4、取完成步骤a3的上层,重悬于100 μ l缓冲液B中,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层(上层为脂肪体),抽去下层溶液,保留上层。

[0218] a5、取完成步骤a4的上层,重悬于100 μ l缓冲液B中,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层,抽去下层溶液,保留上层(即脂肪体)。

[0219] 将5 μ g SMT3-Perilipin-2蛋白、步骤a5得到脂肪体和步骤a3抽去的下层溶液均进行SDS-PAGE后银染检测。

[0220] 结果见图6中的泳道7、8和9(泳道7为总蛋白(SMT3-Perilipin-2蛋白),泳道8为脂质体募集蛋白(步骤a5得到脂肪体),泳道9为溶液蛋白(步骤a3抽去下层溶液))。结果表明,Perilipin-2蛋白有约50%被招募到脂肪体a上。将招募有Perilipin-2蛋白的脂肪体命名为人工脂滴Perilipin-2。

[0221] 蛋白饱和度测定:将SMT3-Perilipin-2蛋白、25ng Ulp1和实施例1中制备的30 μ l脂肪体a混合,得到50 μ l的混合体系,混合体系中SMT3-Perilipin-2蛋白的浓度为0.015 μ g/ μ l、0.030 μ g/ μ l、0.056 μ g/ μ l、0.080 μ g/ μ l、0.101 μ g/ μ l、0.137 μ g/ μ l、0.166 μ g/ μ l或0.191 μ g/ μ l。然后按照上述步骤a2至a5,获得人工脂滴,进行SDS-PAGE,然后用胶体蓝染色,或以Perilipin-2抗体为一抗进行Western blot检测。结果见图7中C(其中a为胶体蓝染色结果,b为Western blot检测结果)。结果表明,Perilipin-2蛋白在脂肪体上的募集是可以饱和的。

[0222] (2) MLDS蛋白的招募

[0223] b1、5 μ g MLDS蛋白和实施例1制备的50 μ l脂肪体a混合,得到100 μ l的混合体系。

[0224] b2、完成步骤b1后,室温下(实际操作中在冰上也可)孵育1h,得到混合体系。

[0225] b3、完成步骤b2后,取混合体系,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层(上层为脂肪体),抽去下层溶液,保留上层。

[0226] b4、取完成步骤b3的上层,重悬于100 μ l缓冲液B中,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层(上层为脂肪体),抽去下层溶液,保留上层。

[0227] b5、取完成步骤b4的上层,重悬于100 μ l缓冲液B中,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层,抽去下层溶液,保留上层(即脂肪体)。

[0228] 将5 μ g MLDS蛋白、步骤b5得到脂肪体和步骤b3抽去下层溶液均进行SDS-PAGE后银染检测。

[0229] 结果见图6中的泳道1、2和3(泳道1为总蛋白(MLDS蛋白),泳道2为脂质体募集蛋白(步骤b5得到脂肪体),泳道3为溶液蛋白(步骤b3抽去下层溶液))。结果表明,MLDS蛋白有约80%被招募到脂肪体a上。将招募有MLDS蛋白的脂肪体命名为人工脂滴MLDS。

[0230] (3) MDT-28蛋白的招募

[0231] 将步骤(2)中的MLDS蛋白替换为MDT-28蛋白,其他步骤均不变。结果见图6中的泳道4、5和6(泳道4为总蛋白(MDT-28蛋白),泳道5为脂质体募集蛋白,泳道6为溶液蛋白)。结果表明,MDT-28蛋白有约90%被招募到脂肪体a上。将招募有MDT-28蛋白的脂肪体命名为人工脂滴MDT-28。

[0232] (4) 牛血清白蛋白的招募

[0233] 将步骤(2)中的MLDS蛋白替换为牛血清白蛋白,其他步骤均不变。结果见图6中的泳道11、12和13(泳道11为总蛋白(牛血清白蛋白),泳道12为脂质体募集蛋白,泳道13为溶液蛋白)。结果表明,牛血清白蛋白没有被招募到脂肪体a上。

[0234] 将招募有蛋白质的脂肪体命名为人工脂滴。

[0235] (5) 固有蛋白在人工脂滴上的分布

[0236] 将步骤1中(1) 5 μ g SMT3-Perilipin-2蛋白替换为10 μ g纯化Perilipin-2-GFP融合蛋白,其他步骤均不变,获得人工脂滴Perilipin-2-GFP。

[0237] 将步骤1中(2) 5 μ g MLDS蛋白替换为10 μ g纯化MLDS-GFP融合蛋白,获得人工脂滴

MLDS-GFP。

[0238] 将步骤1中(3) 5 μ g MDT-28蛋白替换为10 μ g MDT-28-GFP融合蛋白,获得人工脂滴MDT-28-GFP。

[0239] 然后用共聚焦显微镜对人工脂滴进行观察。结果表明(图7中B和图8),人工脂滴上的荧光蛋白质呈环形结构,Perilipin-2-GFP融合蛋白、MLDS-GFP融合蛋白和MDT-28-GFP融合蛋白均匀分布在人工脂滴的表面上,偶尔可观察到大的荧光蛋白的聚集体,未检测到游离的GFP;使用OMX DeltaVision (SIM) 超分辨率显微镜观察人工脂滴,人工脂滴上的蛋白仍然呈现均匀分布的状态。

[0240] 2、功能蛋白ATGL的招募

[0241] 将步骤1中(1) SMT3-Perilipin-2蛋白替换为SMT3-ATGL蛋白,50 μ l脂肪体a替换为30 μ l脂肪体a,其他步骤均不变,获得招募有ATGL的脂肪体。

[0242] 结果见图9(左图为常温孵育的实验结果,右图为4 $^{\circ}$ C孵育的实验结果,其中泳道1和5为Marker,泳道2和6为总蛋白(SMT3-ATGL蛋白),泳道3和7为脂质体募集蛋白,泳道4和8为溶液蛋白)。结果表明,ATGL有约1/3被招募到脂肪体a上。将招募有ATGL的脂肪体命名为人工脂滴ATGL。

[0243] 蛋白饱和度测定:将SMT3-ATGL蛋白和实施例1中制备的50 μ l脂肪体a混合,得到100 μ l的混合体系,混合体系中SMT3-ATGL蛋白的浓度为0.091 μ g/ μ l,0.132 μ g/ μ l,0.171 μ g/ μ l,0.209 μ g/ μ l,0.244 μ g/ μ l,0.278 μ g/ μ l或0.310 μ g/ μ l。然后按照步骤1中的a2至a5,获得人工脂滴,进行SDS-PAGE,然后银染,或以ATGL抗体(Cell Signaling Technology公司,产品目录号为2138)为一抗进行Western blot检测。结果见图10中A(其中a为银染结果,b为Western blot检测结果)。结果表明,当ATGL在反应体系中的浓度为0.209 μ g/ μ l时,脂肪体a对ATGL的招募达到了饱和。

[0244] 3、载脂蛋白的招募

[0245] 将步骤1中(2) 5 μ g MLDS蛋白替换为9 μ g Apo A-I,其他步骤均不变,获得招募有Apo A-I的脂肪体。结果见图10中B(泳道1为脂质体募集蛋白,泳道2为溶液蛋白,泳道3为总蛋白(Apo A-I))。结果表明,Apo A-I有约50%被招募到脂肪体a上。将招募有Apo A-I的脂肪体命名为人工脂蛋白Apo A-I。

[0246] 制备脂肪体a',方法基本同实施例1的步骤一,差别仅在于用商购的甘油三油酸酯代替实施例1中的甘油三脂,在步骤(5)中得到脂肪体a'。将脂肪体a'进行实施例2的各项试验,其结果与脂肪体a基本一致,均无显著差异。

[0247] 商购的甘油三油酸酯为甘油三油酸酯(triolein,T0),购自Sigma公司,产品目录号为92860。

<110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 一种脂肪体的制备方法及其应用
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 831
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 1

```

atgactgacc agaagacat cgacagcgtc aagacctcgc tgtacgcggc cgtaggcgcc      60
ggagacgtcg tcgtgcaggc cgtggccgac gtcgtcgccc aggtccgctc gcgcgccgag      120
tccaccaggc gtgacgtcga agagcgtgtc ggcggcgcca aggagcgcac cgccggactc      180
caggaagagg tcaccgaggg tgtcgagaac cttcgcgacc gcctcgccgg actgccgtcc      240
gagctgcccc aggagcttgc cgagctgcgt gagaagtcca ccgccgacga gctgcgcaag      300
gttgccgagg cctacctgaa ggtcgctctc gacctgtaca cgtcgctcgc cgagcgcggc      360
gaggacaccg tcgagcgcac ccgcaagcag ccggtcgtcg aggagggcat cggccgcgcc      420
gagaccgcct tcggtgacgc cgtcgagctg accgaggaag ctctcggcac cgttgcacgc      480
cagacgcgcg ccgctggcga gcaggccgca aagctcgcgg gccgcgcttc gggtcgcacg      540
tccgacaccg ccgagggact cggcgaggcc atcggcgacg ccggcgacga ggctgccttg      600
aaggttctcg acctgggcca ccaggccgag gaagcgtcga aggacgtgc cgatcgcgtc      660
accgccaccg cggccgacgt ccaggctcgc gccgacaagg ctgccccggc caagcacgcc      720
gctcccgcga agaaggtcgc tccggccaag gctcgggcaa ccccggcccc ggccccggcc      780
aagaaggccc ccgctccggc caagaaggct gctccggcca agaaggttg a      831
    
```

[0001]

<210> 2
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 2

```

Met Thr Asp Gln Lys Thr Ile Asp Ser Val Lys Thr Ser Leu Tyr Ala
1          5          10          15
Ala Val Gly Ala Gly Asp Val Val Val Gln Ala Val Ala Asp Val Val
          20          25          30
Ala Gln Val Arg Ser Arg Ala Glu Ser Thr Gln Gly Asp Val Glu Glu
          35          40          45
Arg Val Gly Gly Ala Lys Glu Arg Ile Ala Gly Leu Gln Glu Glu Val
          50          55          60
Thr Glu Gly Val Glu Asn Leu Arg Asp Arg Leu Ala Gly Leu Pro Ser
65          70          75          80
Glu Leu Pro Glu Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Lys Phe Thr Ala Asp
          85          90          95
Glu Leu Arg Lys Val Ala Glu Ala Tyr Leu Lys Val Ala Ser Asp Leu
          100         105         110
Tyr Thr Ser Leu Ala Glu Arg Gly Glu Asp Thr Val Glu Arg Ile Arg
          115         120         125
Lys Gln Pro Val Val Glu Glu Gly Ile Gly Arg Ala Glu Thr Ala Phe
          130         135         140
Gly Asp Ala Val Glu Leu Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr Val Ala Arg
    
```

145 150 155 160
 Gln Thr Arg Ala Val Gly Glu Gln Ala Ala Lys Leu Ala Gly Arg Ala
 165 170 175
 Ser Gly Arg Ile Ser Asp Thr Ala Glu Gly Leu Gly Glu Ala Ile Ala
 180 185 190
 Asp Ala Gly Asp Glu Ala Ala Leu Lys Val Leu Asp Leu Gly Asp Gln
 195 200 205
 Ala Glu Glu Ala Ser Lys Asp Ala Ala Asp Arg Val Thr Ala Thr Ala
 210 215 220
 Ala Asp Val Gln Ala Arg Ala Asp Lys Ala Ala Pro Ala Lys His Ala
 225 230 235 240
 Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr Pro Ala
 245 250 255
 Pro Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro
 260 265 270
 Ala Lys Lys Ala
 275

- <210> 3
- <211> 1257
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>
- <400> 3

[0002]

```

atgactgacg tcgagcagcc agtatcagtt gaggatcaac aagcccaagc ccaaagctac      60
tacgatcaag tcttaggaaa tgcttacgta caaacggcaa tcaatgcata cacaaagact      120
aaagagttcc atccacttct taactccaca ttgaattcag ccgaagaaaa ggtttccact      180
gtcggaaatt atgcggtcga aaaagcctat gacggataca attcgtacta cgттаagcca      240
aagaacaccg cttatgaage agtctcttat ggaaccgaga gggccaaaac agctgttgag      300
agcggaaage aagctgctat cgttggtggt acattcggaa ttggagctgc cgctgttttg      360
accaattctt cacttgccctt gagtgctgga ggtgccgccc tggtccttga gcaagtggac      420
agtgctaaaa agttgggaag cagcgcgatt tctacgatca aagaagccga gcttgctgtc      480
gaacacagaa tcttctcagc tcttcatcag gcccaacgaa tcgccatggt tcctgtggag      540
aaaatcacag aaaataactaa ttcattgctt gacattcttg acggagcagt tcagaaagga      600
ctcaatatcg aggtcccacc atctgtgaac ctaccatcg gacagcgagt caaaaatctg      660
gcttacttga tcgtccaagg agtatctaac aagcttttta aggcacatga tcatgttate      720
gatccaatca acgagagagc cgttaattat cttgagcagc tcagccaatc cttcgtattg      780
ctagacatcg tccgtgagaa gaaaacgtgg gtcatagaga agtcaaacga gctctccaca      840
tctgtctttg atttcaagaa aacacttgag gaagaggcac aaaaatacaa agttgctcca      900
gaagagatgt tgatgaaaca cattcaatca acctccgagc aactctcaac acaacttcaa      960
tcattgcgtg agaagggaca aaacgttttc ggtgatggaa ctaagattga ctccaccatt     1020
gactacttgg agaacttgaa gaagaacttc acagatgctg aggatgttta caaagtccgc     1080
gacgaggttc tgaacgaggg acgtcaacgg atcggcgagc tttcaacctg gacgactage     1140
cttttgatta tctcggccga atggcaattt gaacctgaag atctactaat cgaagagctc     1200
tacttcgatg cgccaccgcc agttcgcaca agaaacttgt ataggaatcg tgcctaa      1257
  
```

- <210> 4
- <211> 418
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>

<400> 4
 Met Thr Asp Val Glu Gln Pro Val Ser Val Glu Asp Gln Gln Ala Gln
 1 5 10 15
 Ala Gln Ser Tyr Tyr Asp Gln Val Leu Gly Asn Ala Tyr Val Gln Thr
 20 25 30
 Ala Ile Asn Ala Tyr Thr Lys Thr Lys Glu Phe His Pro Leu Leu Asn
 35 40 45
 Ser Thr Leu Asn Ser Ala Glu Lys Val Ser Thr Val Gly Asn Tyr
 50 55 60
 Ala Ala Gln Lys Ala Tyr Asp Gly Tyr Asn Ser Tyr Tyr Val Lys Pro
 65 70 75 80
 Lys Asn Thr Ala Tyr Glu Ala Val Ser Tyr Gly Thr Glu Arg Ala Lys
 85 90 95
 Thr Ala Val Glu Ser Gly Lys Gln Ala Ala Ile Val Gly Gly Thr Phe
 100 105 110
 Gly Ile Gly Ala Ala Val Val Leu Thr Gln Phe Ser Leu Ala Leu Ser
 115 120 125
 Ala Gly Gly Ala Ala Leu Val Leu Glu Gln Val Asp Ser Ala Lys Lys
 130 135 140
 Leu Gly Ser Ser Ala Ile Ser Thr Ile Lys Glu Ala Glu Leu Ala Val
 145 150 155 160
 Glu His Arg Ile Phe Ser Ala Leu His Gln Ala Gln Arg Ile Ala Met
 165 170 175
 Val Pro Val Glu Lys Ile Thr Glu Asn Thr Asn Ser Leu Leu Asp Ile
 180 185 190
 Leu Asp Gly Ala Val Gln Lys Gly Leu Asn Ile Glu Val Pro Pro Ser
 195 200 205
 Val Asn Leu Thr Ile Gly Gln Arg Val Lys Asn Leu Ala Ser Leu Ile
 210 215 220
 Val Gln Gly Val Ser Asn Lys Leu Phe Lys Ala His Asp His Val Ile
 225 230 235 240
 Asp Pro Ile Asn Glu Arg Ala Arg Asn Tyr Leu Glu Gln Leu Ser Gln
 245 250 255
 Ser Phe Val Leu Leu Asp Ile Val Arg Glu Lys Lys Thr Trp Val Ile
 260 265 270
 Glu Lys Ser Asn Glu Leu Ser Thr Ser Val Phe Asp Phe Lys Lys Thr
 275 280 285
 Leu Glu Glu Glu Ala Gln Lys Tyr Lys Val Ala Pro Glu Glu Met Leu
 290 295 300
 Met Lys His Ile Gln Ser Thr Ser Glu Gln Leu Ser Thr Gln Leu Gln
 305 310 315 320
 Ser Leu Arg Glu Lys Gly Gln Asn Val Phe Gly Asp Gly Thr Lys Ile
 325 330 335
 Asp Ser Thr Ile Asp Tyr Leu Glu Asn Leu Lys Lys Asn Phe Thr Asp
 340 345 350
 Ala Glu Asp Val Tyr Lys Val Arg Asp Glu Val Leu Asn Glu Gly Arg
 355 360 365
 Gln Arg Ile Ala Glu Leu Ser Thr Trp Thr Thr Ser Leu Leu Ile Ile
 370 375 380
 Ser Ala Glu Trp Gln Phe Glu Pro Glu Asp Leu Leu Ile Glu Glu Leu
 385 390 395 400
 Tyr Phe Asp Ala Pro Pro Pro Val Arg Thr Arg Asn Leu Tyr Arg Asn
 405 410 415

[0003]

Arg Ala

<210> 5

<211>1314

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 5

atggcatccg	ttgcagttga	tccacaaccg	agtgtggtga	ctcgggtggt	caacctgccc	60
ttggtgagct	ccacgtatga	cctcatgtcc	tcagcctatc	tcagtacaaa	ggaccagtat	120
ccctacctga	agtctgtgtg	tgagatggca	gagaacgggtg	tgaagacat	cacctccgtg	180
gccatgacca	gtgctctgcc	catcatccag	aagctagagc	cgcaaattgc	agttgccaat	240
acctatgcct	gtaaggggct	agacaggatt	gaggagagac	tgcctattct	gaatcagcca	300
tcaactcaga	ttgttgccaa	tgccaaaggc	gctgtgactg	gggcaaaaga	tgctgtgacg	360
actactgtga	ctggggccaa	ggattctgtg	gccagcacga	tcacaggggt	gatggacaag	420
accaaagggg	cagtgactgg	cagtgtggag	aagaccaagt	ctgtggtcag	tggcagcatt	480
aacacagtct	tggggagtgc	gatgatgcag	ctcgtgagca	gtggcgtaga	aatgcactc	540
accaaactcg	agctgtttgt	agaacagtac	ctcctctca	ctgaggaaga	actagaaaa	600
gaagcaaaaa	aagttgaagg	atttgatctg	gttcagaagc	caagtatta	tgtagactg	660
ggatccctgt	ctaccaagct	tactcccgt	gcctaccagc	aggctctcag	cagggtaaa	720
gaagctaagc	aaaaaagcca	acagaccatt	tctcagctcc	attctactgt	tcacctgatt	780
gaatttgcca	ggaagaatgt	gtatagtgcc	aatcagaaaa	ttcaggatgc	tcaggataag	840
ctctacctct	catgggtaga	gtggaaaagg	agcattggat	atgatgatac	tgatgagtc	900
cactgtgctg	agcacattga	gtcacgtact	cttgcattg	cccgaacct	gactcagcag	960
ctccagacca	cgtgccacac	cctcctgtcc	aacatccaag	gtgtaccaca	gaacatccaa	1020
[0004] gatcaagcca	agcacatggg	ggtgatggca	ggcgacatct	actcagtgtt	ccgcaatgct	1080
gcctccttta	aagaagtgtc	tgacagcctc	ctcacttcta	gcaaggggca	gctgcagaaa	1140
atgaaggaat	cttttagatga	cgtgatggat	tatcttgta	acaacacgcc	cctcaactgg	1200
ctggtaggtc	ccttttatcc	tcagctgact	gagtctcaga	atgctcagga	ccaaggtgca	1260
gagatggaca	agagcagcca	ggagaccag	cgatctgagc	ataaaactca	taa	1314

<210> 6

<211> 437

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 6

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

	Thr Gly Ala Lys Asp Ala Val Thr Thr Thr Val Thr Gly Ala Lys Asp	
	115 120 125	
	Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val Met Asp Lys Thr Lys Gly Ala	
	130 135 140	
	Val Thr Gly Ser Val Glu Lys Thr Lys Ser Val Val Ser Gly Ser Ile	
	145 150 155 160	
	Asn Thr Val Leu Gly Ser Arg Met Met Gln Leu Val Ser Ser Gly Val	
	165 170 175	
	Glu Asn Ala Leu Thr Lys Ser Glu Leu Leu Val Glu Gln Tyr Leu Pro	
	180 185 190	
	Leu Thr Glu Glu Glu Leu Glu Lys Glu Ala Lys Lys Val Glu Gly Phe	
	195 200 205	
	Asp Leu Val Gln Lys Pro Ser Tyr Tyr Val Arg Leu Gly Ser Leu Ser	
	210 215 220	
	Thr Lys Leu His Ser Arg Ala Tyr Gln Gln Ala Leu Ser Arg Val Lys	
	225 230 235 240	
	Glu Ala Lys Gln Lys Ser Gln Gln Thr Ile Ser Gln Leu His Ser Thr	
	245 250 255	
	Val His Leu Ile Glu Phe Ala Arg Lys Asn Val Tyr Ser Ala Asn Gln	
	260 265 270	
	Lys Ile Gln Asp Ala Gln Asp Lys Leu Tyr Leu Ser Trp Val Glu Trp	
	275 280 285	
	Lys Arg Ser Ile Gly Tyr Asp Asp Thr Asp Glu Ser His Cys Ala Glu	
	290 295 300	
	His Ile Glu Ser Arg Thr Leu Ala Ile Ala Arg Asn Leu Thr Gln Gln	
	305 310 315 320	
[0005]	Leu Gln Thr Thr Cys His Thr Leu Leu Ser Asn Ile Gln Gly Val Pro	
	325 330 335	
	Gln Asn Ile Gln Asp Gln Ala Lys His Met Gly Val Met Ala Gly Asp	
	340 345 350	
	Ile Tyr Ser Val Phe Arg Asn Ala Ala Ser Phe Lys Glu Val Ser Asp	
	355 360 365	
	Ser Leu Leu Thr Ser Ser Lys Gly Gln Leu Gln Lys Met Lys Glu Ser	
	370 375 380	
	Leu Asp Asp Val Met Asp Tyr Leu Val Asn Asn Thr Pro Leu Asn Trp	
	385 390 395 400	
	Leu Val Gly Pro Phe Tyr Pro Gln Leu Thr Glu Ser Gln Asn Ala Gln	
	405 410 415	
	Asp Gln Gly Ala Glu Met Asp Lys Ser Ser Gln Glu Thr Gln Arg Ser	
	420 425 430	
	Glu His Lys Thr His	
	435	

<210> 7

<211> 1515

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 7

atgtttcccc gcgagaagac gtggaacatc tcgttcgegg getgcggett cctcggcgtc	60
tactacgtcg gcgtggcctc ctgcctccgc gageacgcgc ccttcctggt ggccaacgcc	120
acgcacatct acggcgcctc ggccggggcg ctcacggcca cggecgtggt caccggggtc	180

```

tgcctgggtg aggctgggtc caagttcatt gaggtatcta aagaggcccg gaagcggttc      240
ctgggcccc tgcaccctc cttcaacctg gtaaagatca tccgcagttt cctgctgaag      300
gtcctgcctg ctgatagcca tgagcatgcc agtgggcgcc tgggcatctc cctgaccgcg      360
gtgtcagacg gcgagaatgt cattatatcc cacttcaact ccaaggacga gctcatccag      420
gccaatgtct gcagcggttt cateccccgtg tactgtgggc tcatccctcc ctcctccag      480
ggggtgcgct acgtggatgg tggcatttca gacaacctgc cactctatga gcttaagaac      540
accatcacag tgtccccctt ctggggcgag agtgacatct gtccgcagga cagctccacc      600
aacatccacg agctgcgggt caccaacacc agcatccagt tcaacctggc caacctctac      660
cgctctcca aggccctctt cccgccggag ccctgggtgc tgcgagagat gtgcaagcag      720
ggataccggg atggcctgcg ctttctgcag cggaacggcc tctgaaccg gcccaacccc      780
ttgctggcgt tgccccccgc ccgccccac ggcccagagg acaaggacca ggcaagtggag      840
agcggccaa cggaggatta ctgcagctg cccggagaag atcacatcct ggagcacctg      900
cccggccggc tcaatgagge cctgctggag gctgcgtgg agccacgga cctgctgacc      960
accctctcca acatgctgcc tgtgcgtctg gccacggcca tgatggtgcc ctacacgctg     1020
ccgctggaga gcgctctgtc cttcaccatc cgcttctgtg agtggctgcc cgacgttccc     1080
gaggacatcc ggtggatgaa ggagcagacg ggcagcatct gccagtacct ggtgatgcgc     1140
gccaagagga agctgggcag gcacctgccc tccaggctgc cggagcaggt ggagctgcgc     1200
cgctccagc cgctgccgct cgtgccgctg tctgcgccg cctacagaga ggcaactgcc     1260
ggctggatgc gcaacaacct ctgctgggg gacgcctgg ccaagtggga ggagtgccag     1320
cgccagctgc tgetggcct cttctgcacc aacgtggcct tcccggccga agctctgcgc     1380
atgcgcgcac ccgccgacc ggctcccgc cccggcgacc cagcatcccc gcagaccag      1440
ctggccgggc ctgccccctt gctgagcacc cctgctccc aggccggcc cgtgatcggg      1500
gcctggggc tgtga                                     1515
    
```

- <210> 8
- <211> 504
- [0006] <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>
- <400> 8

```

Met Phe Pro Arg Glu Lys Thr Trp Asn Ile Ser Phe Ala Gly Cys Gly
1          5          10          15
Phe Leu Gly Val Tyr Tyr Val Gly Val Ala Ser Cys Leu Arg Glu His
          20          25          30
Ala Pro Phe Leu Val Ala Asn Ala Thr His Ile Tyr Gly Ala Ser Ala
          35          40          45
Gly Ala Leu Thr Ala Thr Ala Leu Val Thr Gly Val Cys Leu Gly Glu
          50          55          60
Ala Gly Ala Lys Phe Ile Glu Val Ser Lys Glu Ala Arg Lys Arg Phe
65          70          75          80
Leu Gly Pro Leu His Pro Ser Phe Asn Leu Val Lys Ile Ile Arg Ser
          85          90          95
Phe Leu Leu Lys Val Leu Pro Ala Asp Ser His Glu His Ala Ser Gly
          100         105         110
Arg Leu Gly Ile Ser Leu Thr Arg Val Ser Asp Gly Glu Asn Val Ile
          115         120         125
Ile Ser His Phe Asn Ser Lys Asp Glu Leu Ile Gln Ala Asn Val Cys
          130         135         140
Ser Gly Phe Ile Pro Val Tyr Cys Gly Leu Ile Pro Pro Ser Leu Gln
145         150         155         160
Gly Val Arg Tyr Val Asp Gly Gly Ile Ser Asp Asn Leu Pro Leu Tyr
          165         170         175
    
```

Glu Leu Lys Asn Thr Ile Thr Val Ser Pro Phe Ser Gly Glu Ser Asp
 180 185 190
 Ile Cys Pro Gln Asp Ser Ser Thr Asn Ile His Glu Leu Arg Val Thr
 195 200 205
 Asn Thr Ser Ile Gln Phe Asn Leu Arg Asn Leu Tyr Arg Leu Ser Lys
 210 215 220
 Ala Leu Phe Pro Pro Glu Pro Leu Val Leu Arg Glu Met Cys Lys Gln
 225 230 235 240
 Gly Tyr Arg Asp Gly Leu Arg Phe Leu Gln Arg Asn Gly Leu Leu Asn
 245 250 255
 Arg Pro Asn Pro Leu Leu Ala Leu Pro Pro Ala Arg Pro His Gly Pro
 260 265 270
 Glu Asp Lys Asp Gln Ala Val Glu Ser Ala Gln Ala Glu Asp Tyr Ser
 275 280 285
 Gln Leu Pro Gly Glu Asp His Ile Leu Glu His Leu Pro Ala Arg Leu
 290 295 300
 Asn Glu Ala Leu Leu Glu Ala Cys Val Glu Pro Thr Asp Leu Leu Thr
 305 310 315 320
 Thr Leu Ser Asn Met Leu Pro Val Arg Leu Ala Thr Ala Met Met Val
 325 330 335
 Pro Tyr Thr Leu Pro Leu Glu Ser Ala Leu Ser Phe Thr Ile Arg Leu
 340 345 350
 Leu Glu Trp Leu Pro Asp Val Pro Glu Asp Ile Arg Trp Met Lys Glu
 355 360 365
 Gln Thr Gly Ser Ile Cys Gln Tyr Leu Val Met Arg Ala Lys Arg Lys
 370 375 380
 [0007] Leu Gly Arg His Leu Pro Ser Arg Leu Pro Glu Gln Val Glu Leu Arg
 385 390 395 400
 Arg Val Gln Ser Leu Pro Ser Val Pro Leu Ser Cys Ala Ala Tyr Arg
 405 410 415
 Glu Ala Leu Pro Gly Trp Met Arg Asn Asn Leu Ser Leu Gly Asp Ala
 420 425 430
 Leu Ala Lys Trp Glu Glu Cys Gln Arg Gln Leu Leu Leu Gly Leu Phe
 435 440 445
 Cys Thr Asn Val Ala Phe Pro Pro Glu Ala Leu Arg Met Arg Ala Pro
 450 455 460
 Ala Asp Pro Ala Pro Ala Pro Ala Asp Pro Ala Ser Pro Gln His Gln
 465 470 475 480
 Leu Ala Gly Pro Ala Pro Leu Leu Ser Thr Pro Ala Pro Glu Ala Arg
 485 490 495
 Pro Val Ile Gly Ala Leu Gly Leu
 500

<210> 9

<211> 1563

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>9

atgactgacc	agaagacat	cgacagcgtc	aagacctcgc	tgtacgcggc	cgtaggcgcc	60
ggagacgtcg	tcgtgcaggc	cgtggccgac	gtcgtcgccc	aggtccgctc	gcgcgccgag	120
tccaccagg	gtgacgtcga	agagcgtgtc	ggcggcgcca	aggagcgc	cgccggactc	180

```

caggaagagg tcaccgaggg tgtcgagaac cttcgcgacc gcctcgcgg actgccgtcc 240
gagctgcccc aggagcttgc cgagctgcgt gagaagtcca cgcgcgacga gctgcgcaag 300
gttgccgagg cctacctgaa ggctgcctcc gacctgtaca cgtcgcctgc cgagcgcggc 360
gaggacaccg tcgagcgcac ccgcaagcag ccggtcgtcg aggagggcat cggccgcgcc 420
gagaccgcct tcggtgacgc cgtcgagctg accgaggaag ctctcggcac cgttgacgc 480
cagacgcgcg ccgtcggcga gcaggccgca aagctcgcgg gccgcgcttc gggtcgcac 540
tccgacaccg ccgagggact cggcgaggcc atcgcgcgac ccggcgacga ggctgccctg 600
aaggttctcg acctgggcga ccaggccgag gaagcgtcga aggacgtgc cgtcgcgtc 660
accgccaccg cggccgacgt ccaggctcgc gccgacaagg ctgccccggc caagcacgcc 720
gtccccgcga agaaggctgc tccggccaag gctcgggcaa cccccggccc ggccccggcc 780
aagaaggccg ccgctccggc caagaaggct gctccggcca agaaggctaa gcttgcggcc 840
gcaatggtga gcaagggcga ggagctgttc accggggtgg tgcccatcct ggctgagctg 900
gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg cgtgccacc 960
tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca agctgcccgt gccctggccc 1020
accctcgtga ccaccctgac ctacggcgtg cagtgttcca gccgtaccc cgaccacatg 1080
aagcagcacg acttcttcaa gtccgcatg cccgaaggct acgtccagga gcgcaccatc 1140
ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga gggcgacacc 1200
ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg aggacggcaa catctgggg 1260
cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag 1320
aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc 1380
gccgaccact accagcagaa cacccecatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac 1440
cactacctga gcaccagtc cgcctgagc aaagacccca acgagaagcg cgtcacatg 1500
gtcctgctgg agttcgtgac cgcgcgggg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag 1560
taa 1563

```

- [0008] <210> 10
- <211> 520
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>
- <400> 10

```

Met Thr Asp Gln Lys Thr Ile Asp Ser Val Lys Thr Ser Leu Tyr Ala
1          5          10          15
Ala Val Gly Ala Gly Asp Val Val Val Gln Ala Val Ala Asp Val Val
20          25          30
Ala Gln Val Arg Ser Arg Ala Glu Ser Thr Gln Gly Asp Val Glu Glu
35          40          45
Arg Val Gly Gly Ala Lys Glu Arg Ile Ala Gly Leu Gln Glu Glu Val
50          55          60
Thr Glu Gly Val Glu Asn Leu Arg Asp Arg Leu Ala Gly Leu Pro Ser
65          70          75          80
Glu Leu Pro Glu Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Lys Phe Thr Ala Asp
85          90          95
Glu Leu Arg Lys Val Ala Glu Ala Tyr Leu Lys Val Ala Ser Asp Leu
100         105         110
Tyr Thr Ser Leu Ala Glu Arg Gly Glu Asp Thr Val Glu Arg Ile Arg
115         120         125
Lys Gln Pro Val Val Glu Glu Gly Ile Gly Arg Ala Glu Thr Ala Phe
130         135         140
Gly Asp Ala Val Glu Leu Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr Val Ala Arg
145         150         155         160
Gln Thr Arg Ala Val Gly Glu Gln Ala Ala Lys Leu Ala Gly Arg Ala

```

Ser Gly Arg Ile Ser Asp Thr Ala Glu Gly Leu Gly Glu Ala Ile Ala
 165 170 175
 180 185 190
 Asp Ala Gly Asp Glu Ala Ala Leu Lys Val Leu Asp Leu Gly Asp Gln
 195 200 205
 Ala Glu Glu Ala Ser Lys Asp Ala Ala Asp Arg Val Thr Ala Thr Ala
 210 215 220
 Ala Asp Val Gln Ala Arg Ala Asp Lys Ala Ala Pro Ala Lys His Ala
 225 230 235 240
 Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr Pro Ala
 245 250 255
 Pro Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro
 260 265 270
 Ala Lys Lys Ala Lys Leu Ala Ala Ala Met Val Ser Lys Gly Glu Glu
 275 280 285
 Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 290 295 300
 Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 305 310 315 320
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 325 330 335
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys
 340 345 350
 Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
 355 360 365
 Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 [0009] 370 375 380
 Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr
 385 390 395 400
 Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
 405 410 415
 Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
 420 425 430
 Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
 435 440 445
 Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 450 455 460
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys
 485 490 495
 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr
 500 505 510
 Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 515 520

<210> 11

<211> 1980

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>11

	atgactgacg	tcgagcagcc	agtatcagtt	gaggatcaac	aagcccaagc	ccaaagctac	60
	tacgatcaag	tcttaggaaa	tgtttacgta	caaacggcaa	tcaatgcata	cacaaagact	120
	aaagagttcc	atccacttct	taactccaca	ttgaattcag	ccgaagaaaa	ggtttccact	180
	gtcggaaatt	atgctggctca	aaaagcctat	gacggataca	attcgtacta	cgtttaagcca	240
	aagaacaccg	cttatgaagc	agtctcttat	ggaaccgaga	gggcccacaa	agctgttgag	300
	agcggaaaagc	aagctgctat	cgttgggtggt	acattcggaa	ttggagctgc	cgctgttttg	360
	acccaattct	cacttgccctt	gagtgtctgga	ggtgccgccc	tggtccttga	gcaagtggac	420
	agtgctaaaa	agttgggaag	cagcgcgatt	tctacgatca	aagaagccga	gcttgctgtc	480
	gaacacagaa	tcttctcagc	tcttcatcag	gcccacgaa	tcgccatggt	tctgtggag	540
	aaaatcacag	aaaataactaa	ttcattgctt	gacattcttg	acggagcagt	tcagaaaagga	600
	ctcaatatcg	aggtcccacc	atctgtgaac	ctcaccatcg	gacagcagct	caaaaatctg	660
	gcttcaactga	tcgtccaagg	agtatctaac	aaggcacatg	atcatgttat	cgatccaatc	720
	aacgagagag	cccgttaatta	tcttgagcag	ctcagccaat	ccttcgtatt	gctagacatc	780
	gtccgtgaga	agaaaacgtg	ggcatagag	aagtcaaacg	agctctccac	atctgtcttt	840
	gatttcaaga	aaacacttga	ggaagaggca	caaaaataca	aagttgctcc	agaagagatg	900
	ttgatgaaac	acattcaatc	aacctccgag	caactctcaa	cacaacttca	atcattgcgt	960
	gagaagggac	aaaacgtttt	cggtgatgga	actaagattg	actccaccat	tgactacttg	1020
	gagaacttga	agaagaactt	cacagatgct	gaggatgttt	acaaagtccg	cgacgaggtt	1080
	ctgaacgagg	gacgtcaacg	gatcgccgag	cttcaacctt	ggacgactag	ccttttgatt	1140
	atctcggccg	aatggcaatt	tgaacctgaa	gatctactaa	tcgaagagct	ctacttcgat	1200
	gcgccaccgc	cagttcgcac	aagaaacttg	tataggaatc	gtccaagctt	tgccggccgca	1260
	atgggtgagca	agggcgagga	gctgttcacc	gggtgggtgc	ccatcctggt	cgagctggac	1320
	ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gagagggcga	tgccacctac	1380
	ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagc	tgcccgtgcc	ctggcccacc	1440
	ctcgtgacca	ccctgaccta	cggcgtgcag	tgcttcagcc	gtaccccga	ccacatgaag	1500
	cagcacgact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg	tccaggagcg	caccatcttc	1560
[0010]	ttcaaggacg	acggcaacta	caagaccgcg	gccgaggtga	agttcagagg	cgacaccctg	1620
	gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	ttcaaggagg	acggcaacat	cctggggcac	1680
	aagctggagt	acaactacaa	cagccacaac	gtctatatca	tgcccgacaa	gcagaagaac	1740
	ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatccgccac	aacatcgagg	acggcagcgt	gcagctcgcc	1800
	gaccactacc	agcagaacac	ccccatcggc	gacggccccg	tgctgtctgc	cgacaaccac	1860
	tacctgagca	cccagtcgcg	cctgagcaaa	gaccccaacg	agaagcgcga	tcacatggtc	1920
	ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggatc	actctcgcca	tgacagagct	gtacaagtaa	1980

<210> 12

<211> 659

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 12

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

Thr Ala Val Glu Ser Gly Lys Gln Ala Ala Ile Val Gly Gly Thr Phe
 100 105 110
 Gly Ile Gly Ala Ala Val Val Leu Thr Gln Phe Ser Leu Ala Leu Ser
 115 120 125
 Ala Gly Gly Ala Ala Leu Val Leu Glu Gln Val Asp Ser Ala Lys Lys
 130 135 140
 Leu Gly Ser Ser Ala Ile Ser Thr Ile Lys Glu Ala Glu Leu Ala Val
 145 150 155 160
 Glu His Arg Ile Phe Ser Ala Leu His Gln Ala Gln Arg Ile Ala Met
 165 170 175
 Val Pro Val Glu Lys Ile Thr Glu Asn Thr Asn Ser Leu Leu Asp Ile
 180 185 190
 Leu Asp Gly Ala Val Gln Lys Gly Leu Asn Ile Glu Val Pro Pro Ser
 195 200 205
 Val Asn Leu Thr Ile Gly Gln Arg Val Lys Asn Leu Ala Ser Leu Ile
 210 215 220
 Val Gln Gly Val Ser Asn Lys Ala His Asp His Val Ile Asp Pro Ile
 225 230 235 240
 Asn Glu Arg Ala Arg Asn Tyr Leu Glu Gln Leu Ser Gln Ser Phe Val
 245 250 255
 Leu Leu Asp Ile Val Arg Glu Lys Lys Thr Trp Val Ile Glu Lys Ser
 260 265 270
 Asn Glu Leu Ser Thr Ser Val Phe Asp Phe Lys Lys Thr Leu Glu Glu
 275 280 285
 Glu Ala Gln Lys Tyr Lys Val Ala Pro Glu Glu Met Leu Met Lys His
 290 295 300
 [0011] Ile Gln Ser Thr Ser Glu Gln Leu Ser Thr Gln Leu Gln Ser Leu Arg
 305 310 315 320
 Glu Lys Gly Gln Asn Val Phe Gly Asp Gly Thr Lys Ile Asp Ser Thr
 325 330 335
 Ile Asp Tyr Leu Glu Asn Leu Lys Lys Asn Phe Thr Asp Ala Glu Asp
 340 345 350
 Val Tyr Lys Val Arg Asp Glu Val Leu Asn Glu Gly Arg Gln Arg Ile
 355 360 365
 Ala Glu Leu Ser Thr Trp Thr Thr Ser Leu Leu Ile Ile Ser Ala Glu
 370 375 380
 Trp Gln Phe Glu Pro Glu Asp Leu Leu Ile Glu Glu Leu Tyr Phe Asp
 385 390 395 400
 Ala Pro Pro Pro Val Arg Thr Arg Asn Leu Tyr Arg Asn Arg Ala Lys
 405 410 415
 Leu Ala Ala Ala Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val
 420 425 430
 Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe
 435 440 445
 Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr
 450 455 460
 Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr
 465 470 475 480
 Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro
 485 490 495
 Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly
 500 505 510
 Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys

515	520	525
Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile		
530	535	540
Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His		
545	550	555
Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp		560
	565	570
Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile		575
	580	585
Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro		590
	595	600
Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr		605
	610	615
Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val		620
625	630	635
Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu		640
	645	650
		655
Leu Tyr Lys		

- <210> 13
- <211> 2031
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>
- <400>13

[0012]	atggcatccg	ttgcagttga	tccacaaccg	agtgtggtga	ctcgggtggt	caacctgccc	60
	ttggtgagct	ccacgtatga	cctcatgtcc	tcagcctatc	tcagtacaaa	ggaccagtat	120
	ccctacctga	agtctgtgtg	tgagatggca	gagaacggtg	tgaagaccat	cacctccgtg	180
	gccatgacca	gtgctctgcc	catcatccag	aagctagagc	cgcaaattgc	agttgccaat	240
	acctatgcct	gtaaggggct	agacaggatt	gaggagagac	tgcctattct	gaatcagcca	300
	tcaactcaga	ttgttgccaa	tgccaaaggc	gctgtgactg	gggcaaaaga	tgctgtgacg	360
	actactgtga	ctggggccaa	ggattctgtg	gccagcacga	tcacaggggt	gatggacaag	420
	accaaagggg	cagtgactgg	cagtgtggag	aagaccaagt	ctgtggtcag	tggcagcatt	480
	aacacagtct	tggggagtcg	gatgatgcag	ctcgtgagca	gtggcgtaga	aatgcactc	540
	accaaatcag	agctgttggg	agaacagtac	ctccctctca	ctgaggaaga	actagaaaaa	600
	gaagcaaaaa	aagttgaagg	atitgatctg	gttcagaagc	caagttatta	tgttagactg	660
	ggatccctgt	ctaccaagct	tcaactccgt	gcctaccagc	aggctctcag	cagggttaaa	720
	gaagctaagc	aaaaaagcca	acagaccatt	tctcagctcc	attctactgt	tcactgatt	780
	gaatttgcca	ggaagaatgt	gtatagtgcc	aatcagaaaa	ttcaggatgc	tcaggataag	840
	ctctacctct	catgggtaga	gtggaaaagg	agcattggat	atgatgatac	tgatgagtc	900
	cactgtgctg	agcacattga	gtcacgtact	cttgcaattg	cccgcaacct	gactcagcag	960
	ctccagacca	cgtgccacac	cctcctgtcc	aacatccaag	gtgtaccaca	gaacatccaa	1020
	gatcaagcca	agcacatggg	ggatgatggca	ggcgacatct	actcagtgtt	ccgcaatgct	1080
	gcctccttta	agaagtgctc	tgacagcctc	ctcacttcta	gcaaggggca	gctgcagaaa	1140
	atgaaggaat	cttttagatga	cgtgatggat	tatcttggtta	acaacacgcc	cctcaactgg	1200
	ctggtaggtc	ccttttatcc	tcagctgact	gagtctcaga	atgctcagga	ccaaggtgca	1260
	gagatggaca	agagcagcca	ggagaccagc	cgatctgagc	ataaaaactca	tatggtgagc	1320
	aagggcgagg	agctgttcac	cgggggtggtg	cccacacctg	tcgagctgga	cggcgacgta	1380
	aacggccaca	agttcagcgt	gtccggcgag	ggcgagggcg	atgccaccta	cggcaagctg	1440
	accctgaagt	tcattctgcac	caccggcaag	ctgcccgtgc	cctggcccac	cctcgtgacc	1500
	accctgacct	acggcgtgca	gtgcttcagc	cgctaccccc	accacatgaa	gcagcagcag	1560
	ttcttcaagt	ccgccatgcc	cgaaggctac	gtccaggagc	gcaccatctt	cttcaaggac	1620

gacggcaact acaagaccgc cgccgaggtg aagttcgagg ggcacaccct ggtgaaccgc 1680
 atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag 1740
 tacaactaca acagccacaa cgtctatata atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag 1800
 gtgaacttca agatccgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac 1860
 cagcagaaca ccccatcggc cgacggcccc gtgctgctgc cgcacaacca ctacctgagc 1920
 acccagtcgc ccttgagcaa agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag 1980
 ttctgtaccg ccgcccggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta a 2031

<210> 14
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 14

[0013]

Met Ala Ser Val Ala Val Asp Pro Gln Pro Ser Val Val Thr Arg Val
 1 5 10 15
 Val Asn Leu Pro Leu Val Ser Ser Thr Tyr Asp Leu Met Ser Ser Ala
 20 25 30
 Tyr Leu Ser Thr Lys Asp Gln Tyr Pro Tyr Leu Lys Ser Val Cys Glu
 35 40 45
 Met Ala Glu Asn Gly Val Lys Thr Ile Thr Ser Val Ala Met Thr Ser
 50 55 60
 Ala Leu Pro Ile Ile Gln Lys Leu Glu Pro Gln Ile Ala Val Ala Asn
 65 70 75 80
 Thr Tyr Ala Cys Lys Gly Leu Asp Arg Ile Glu Glu Arg Leu Pro Ile
 85 90 95
 Leu Asn Gln Pro Ser Thr Gln Ile Val Ala Asn Ala Lys Gly Ala Val
 100 105 110
 Thr Gly Ala Lys Asp Ala Val Thr Thr Thr Val Thr Gly Ala Lys Asp
 115 120 125
 Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val Met Asp Lys Thr Lys Gly Ala
 130 135 140
 Val Thr Gly Ser Val Glu Lys Thr Lys Ser Val Val Ser Gly Ser Ile
 145 150 155 160
 Asn Thr Val Leu Gly Ser Arg Met Met Gln Leu Val Ser Ser Gly Val
 165 170 175
 Glu Asn Ala Leu Thr Lys Ser Glu Leu Leu Val Glu Gln Tyr Leu Pro
 180 185 190
 Leu Thr Glu Glu Glu Leu Glu Lys Glu Ala Lys Lys Val Glu Gly Phe
 195 200 205
 Asp Leu Val Gln Lys Pro Ser Tyr Tyr Val Arg Leu Gly Ser Leu Ser
 210 215 220
 Thr Lys Leu His Ser Arg Ala Tyr Gln Gln Ala Leu Ser Arg Val Lys
 225 230 235 240
 Glu Ala Lys Gln Lys Ser Gln Gln Thr Ile Ser Gln Leu His Ser Thr
 245 250 255
 Val His Leu Ile Glu Phe Ala Arg Lys Asn Val Tyr Ser Ala Asn Gln
 260 265 270
 Lys Ile Gln Asp Ala Gln Asp Lys Leu Tyr Leu Ser Trp Val Glu Trp
 275 280 285
 Lys Arg Ser Ile Gly Tyr Asp Asp Thr Asp Glu Ser His Cys Ala Glu
 290 295 300

His Ile Glu Ser Arg Thr Leu Ala Ile Ala Arg Asn Leu Thr Gln Gln
 305 310 315 320
 Leu Gln Thr Thr Cys His Thr Leu Leu Ser Asn Ile Gln Gly Val Pro
 325 330 335
 Gln Asn Ile Gln Asp Gln Ala Lys His Met Gly Val Met Ala Gly Asp
 340 345 350
 Ile Tyr Ser Val Phe Arg Asn Ala Ala Ser Phe Lys Glu Val Ser Asp
 355 360 365
 Ser Leu Leu Thr Ser Ser Lys Gly Gln Leu Gln Lys Met Lys Glu Ser
 370 375 380
 Leu Asp Asp Val Met Asp Tyr Leu Val Asn Asn Thr Pro Leu Asn Trp
 385 390 395 400
 Leu Val Gly Pro Phe Tyr Pro Gln Leu Thr Glu Ser Gln Asn Ala Gln
 405 410 415
 Asp Gln Gly Ala Glu Met Asp Lys Ser Ser Gln Glu Thr Gln Arg Ser
 420 425 430
 Glu His Lys Thr His Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly
 435 440 445
 Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys
 450 455 460
 Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
 465 470 475 480
 Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro
 485 490 495
 [0014] Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr
 500 505 510
 Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu
 515 520 525
 Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr
 530 535 540
 Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg
 545 550 555 560
 Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
 565 570 575
 His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala
 580 585 590
 Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn
 595 600 605
 Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr
 610 615 620
 Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser
 625 630 635 640
 Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met
 645 650 655
 Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp
 660 665 670
 Glu Leu Tyr Lys
 675

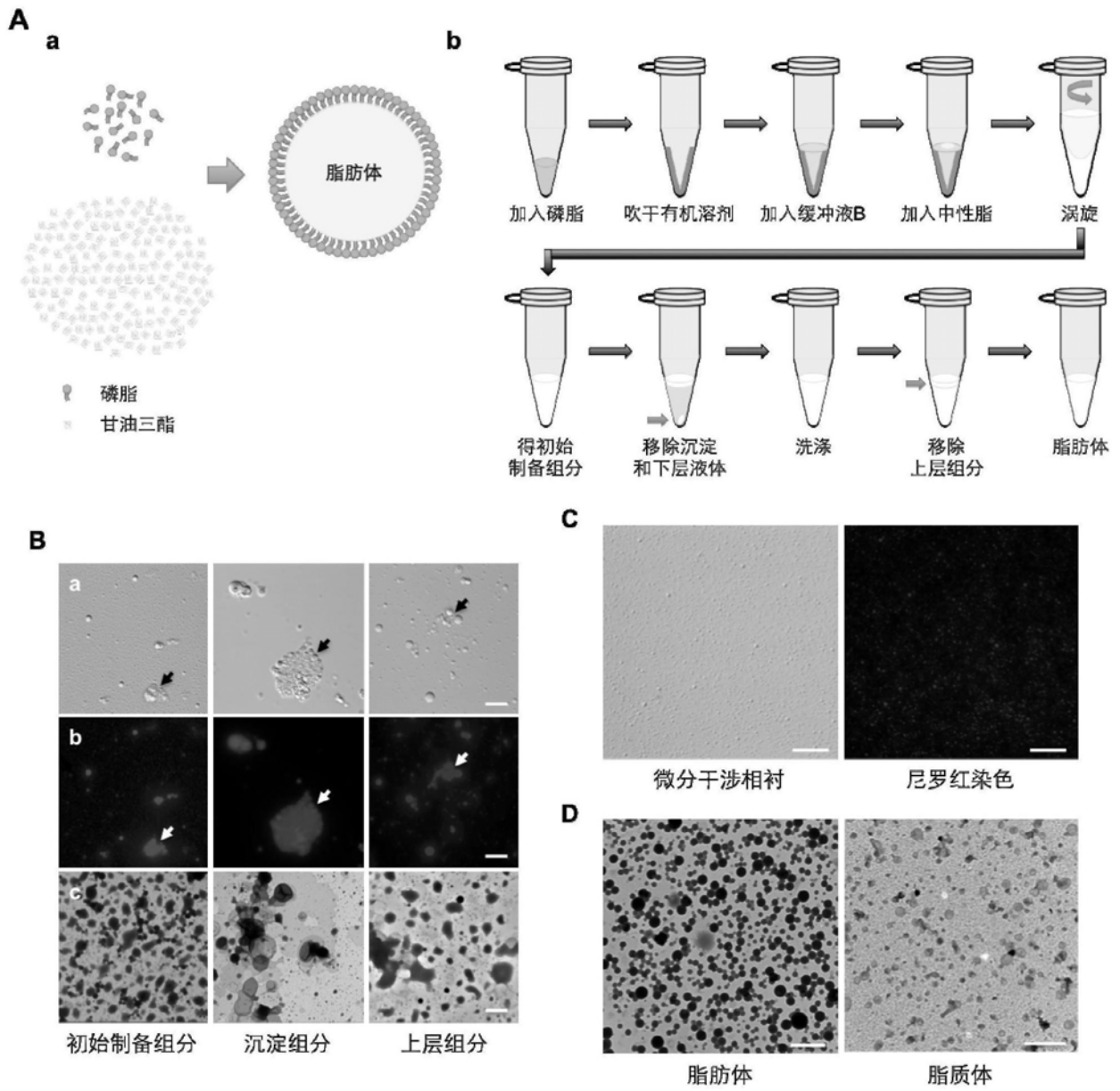


图1

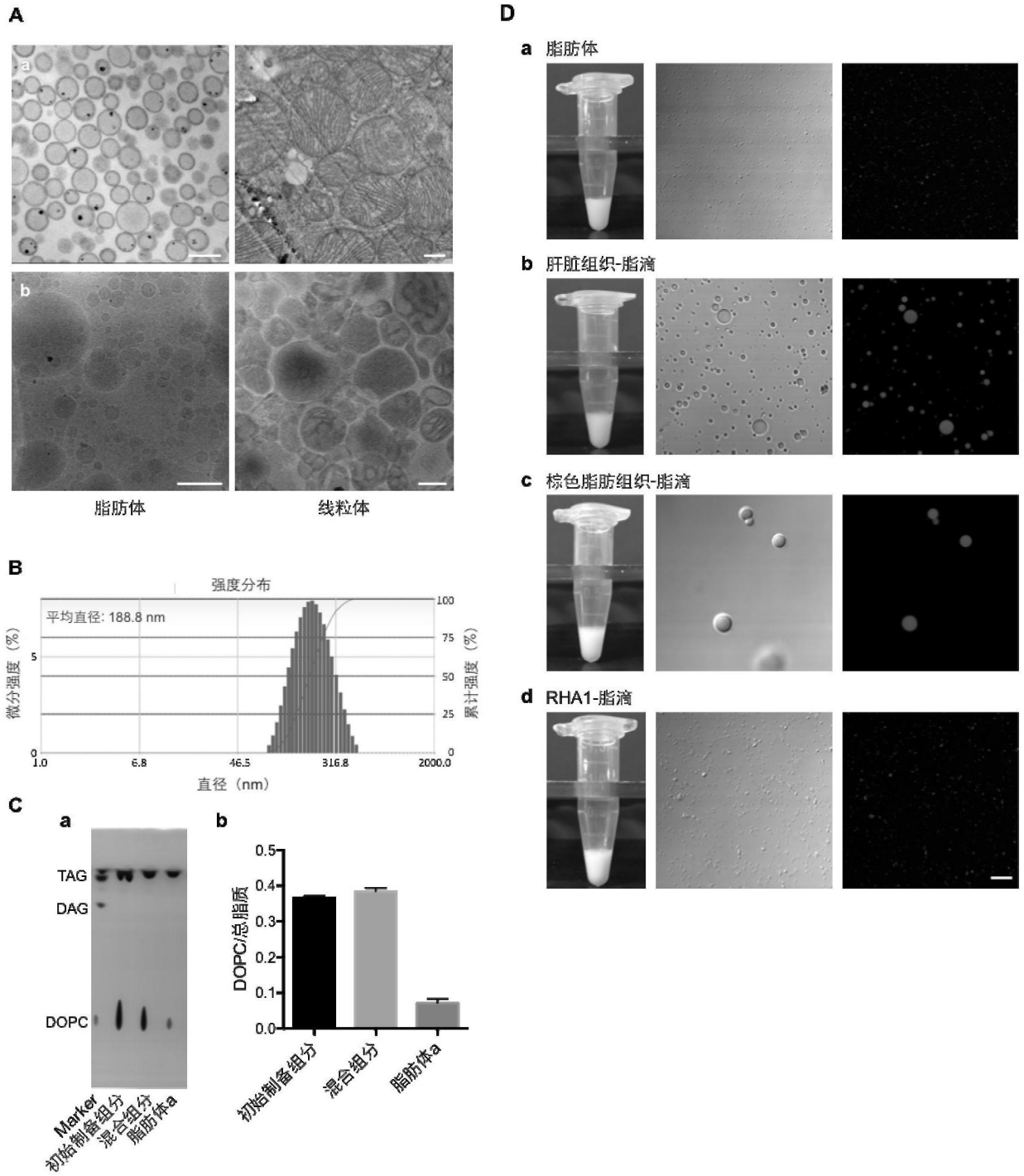


图2

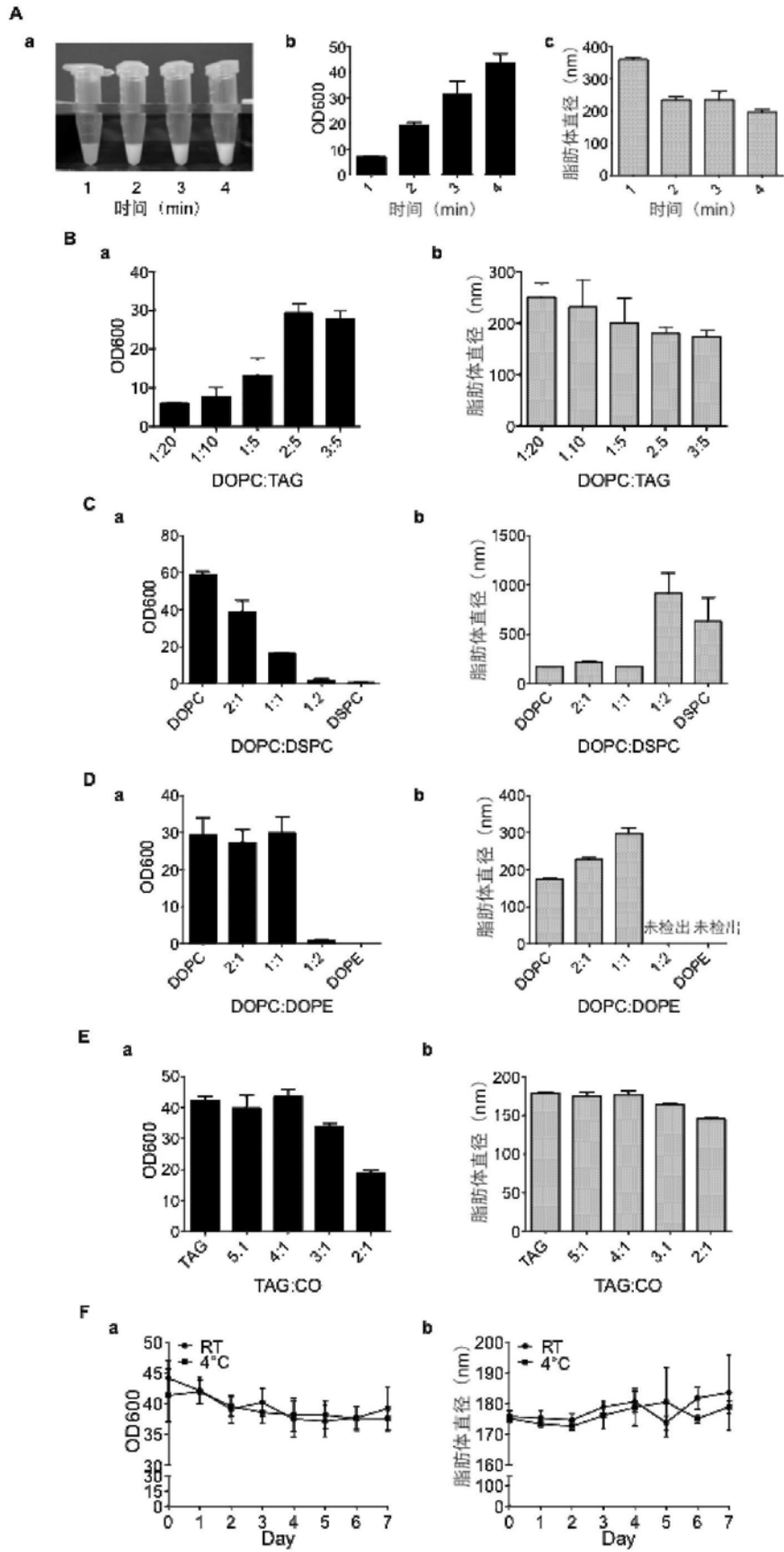


图3

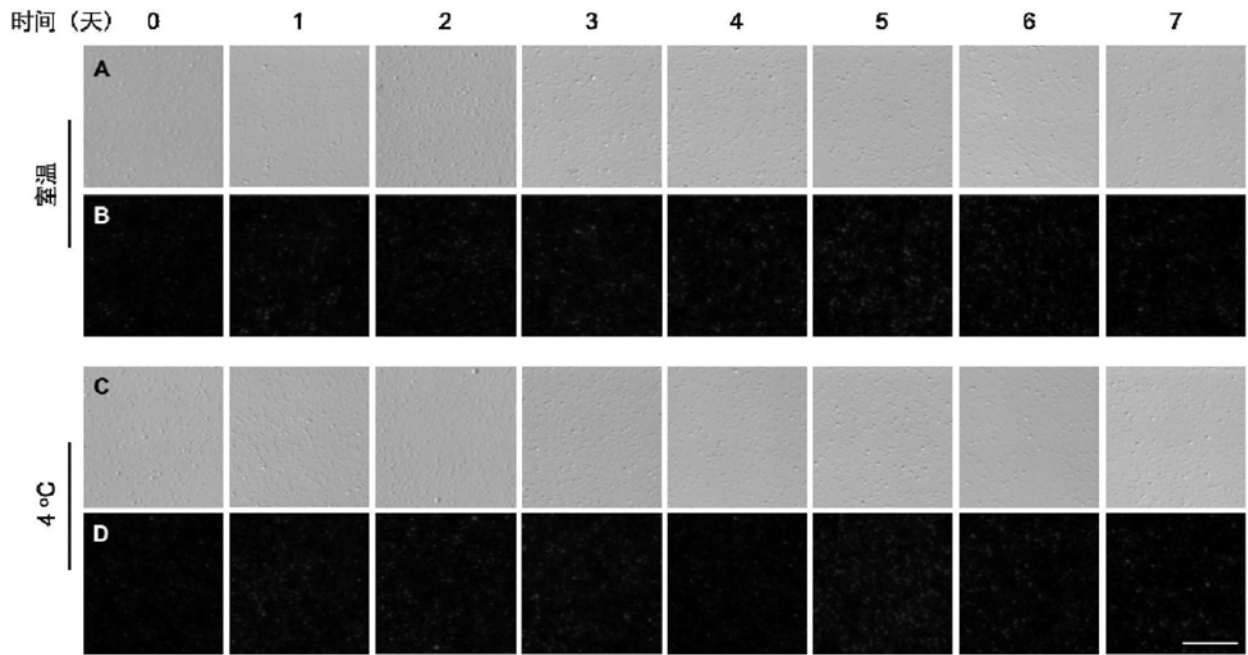


图4

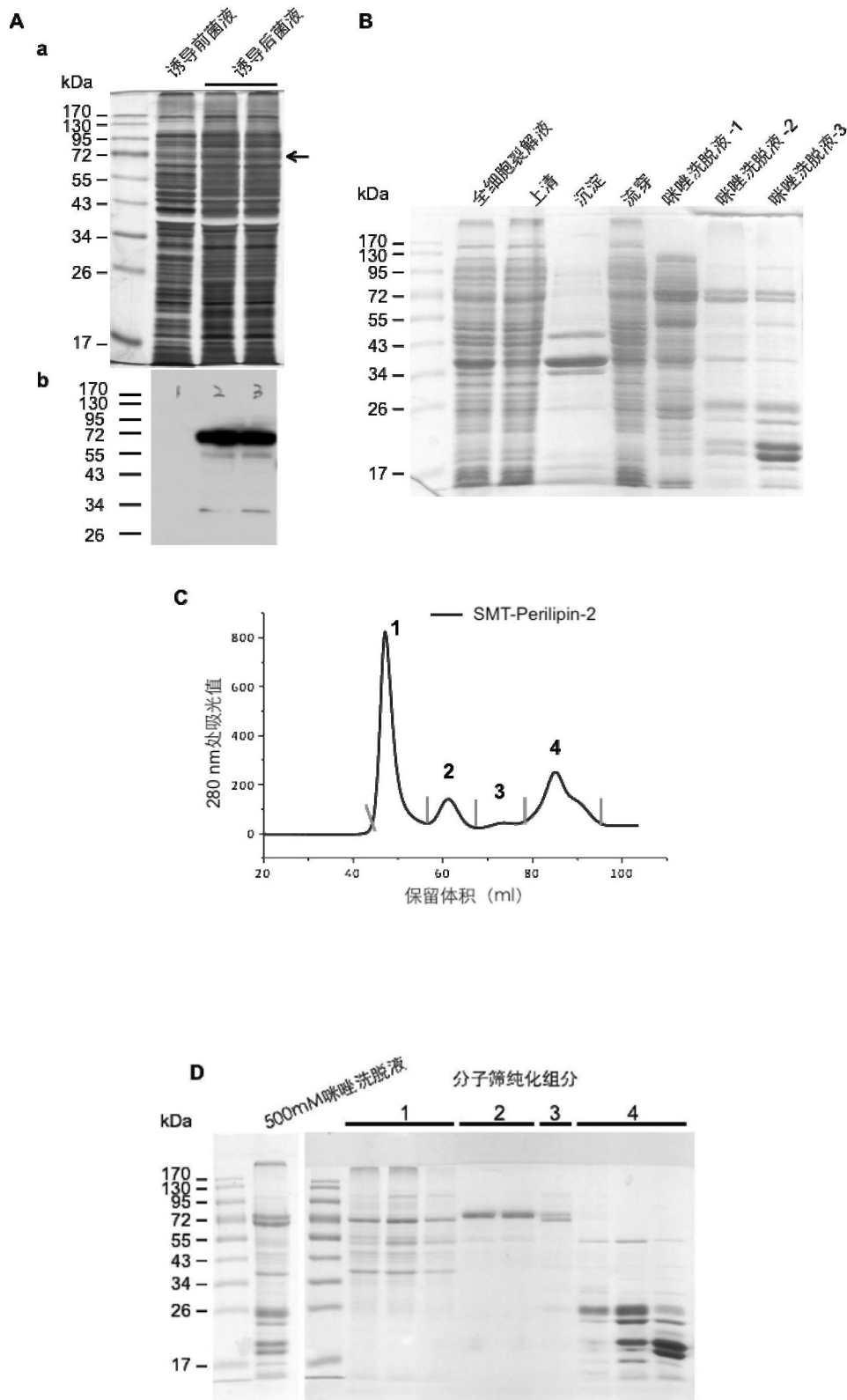


图5

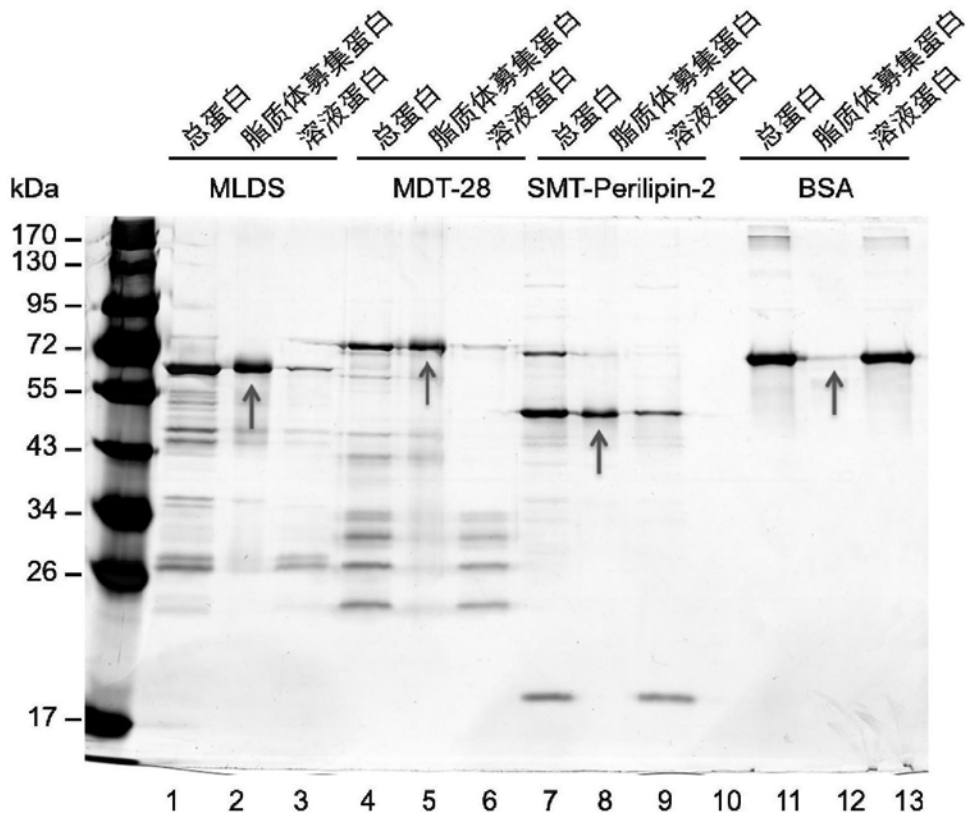


图6

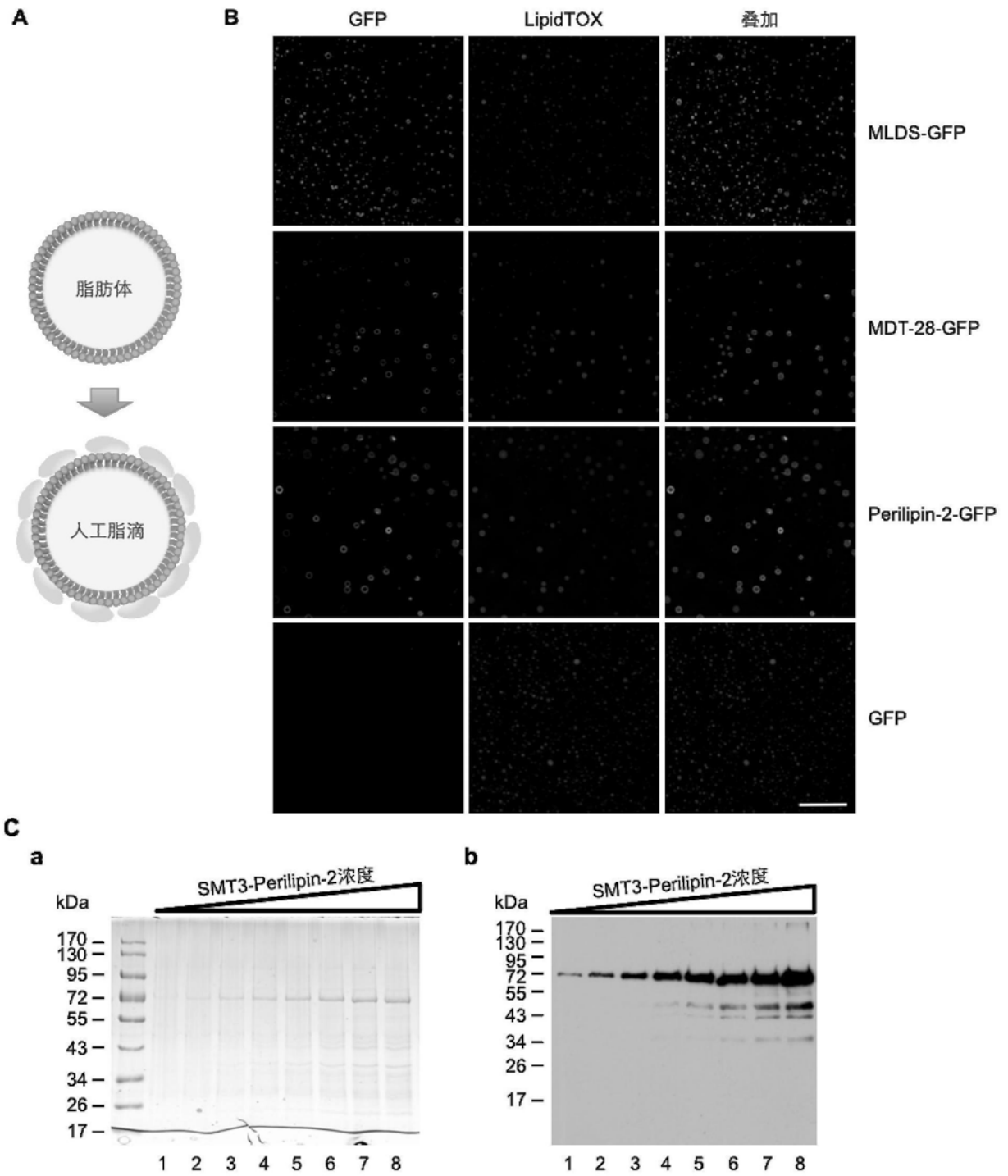


图7

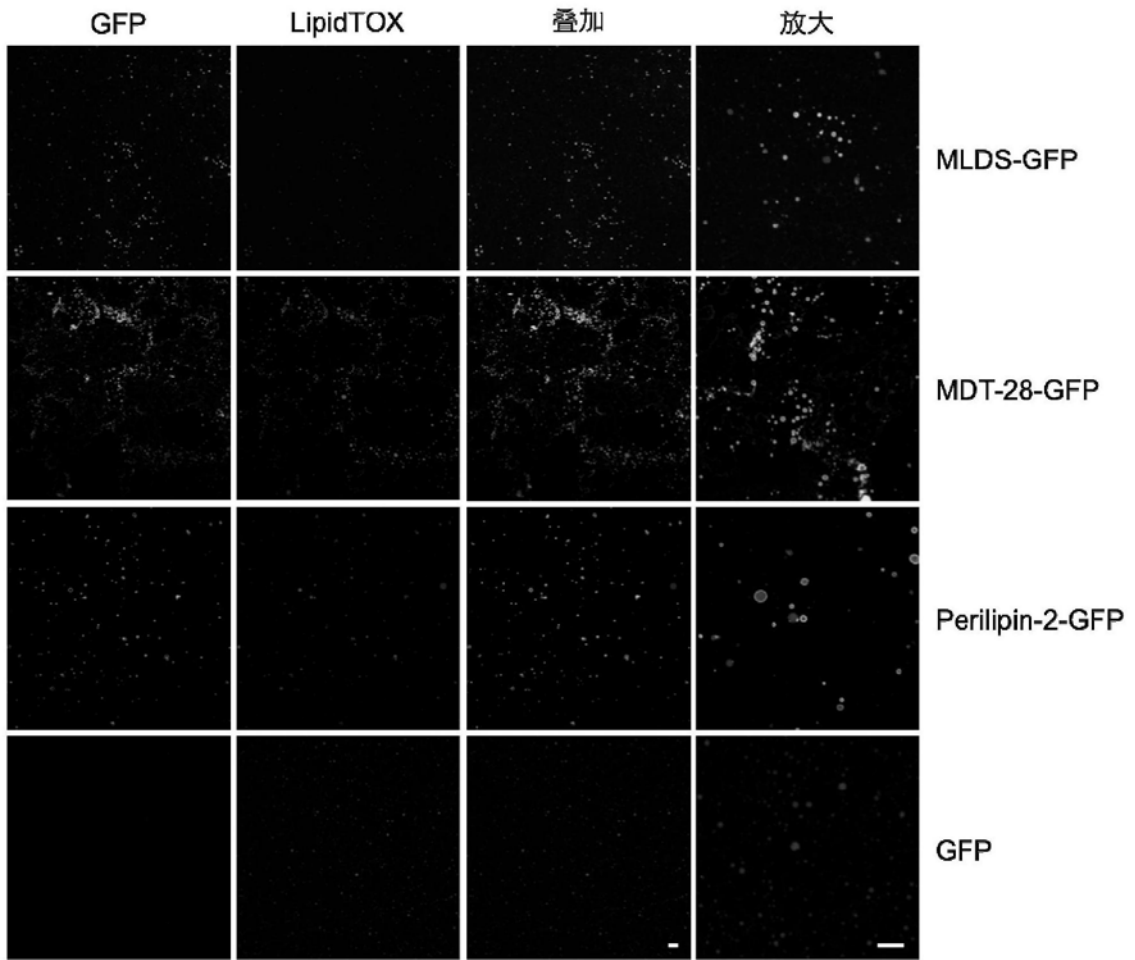


图8

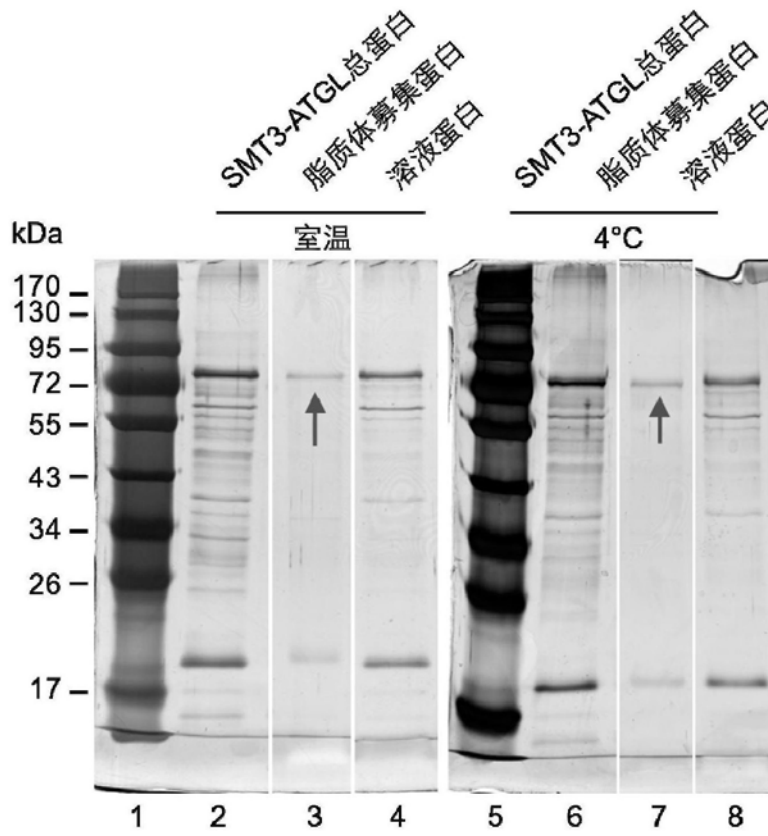


图9

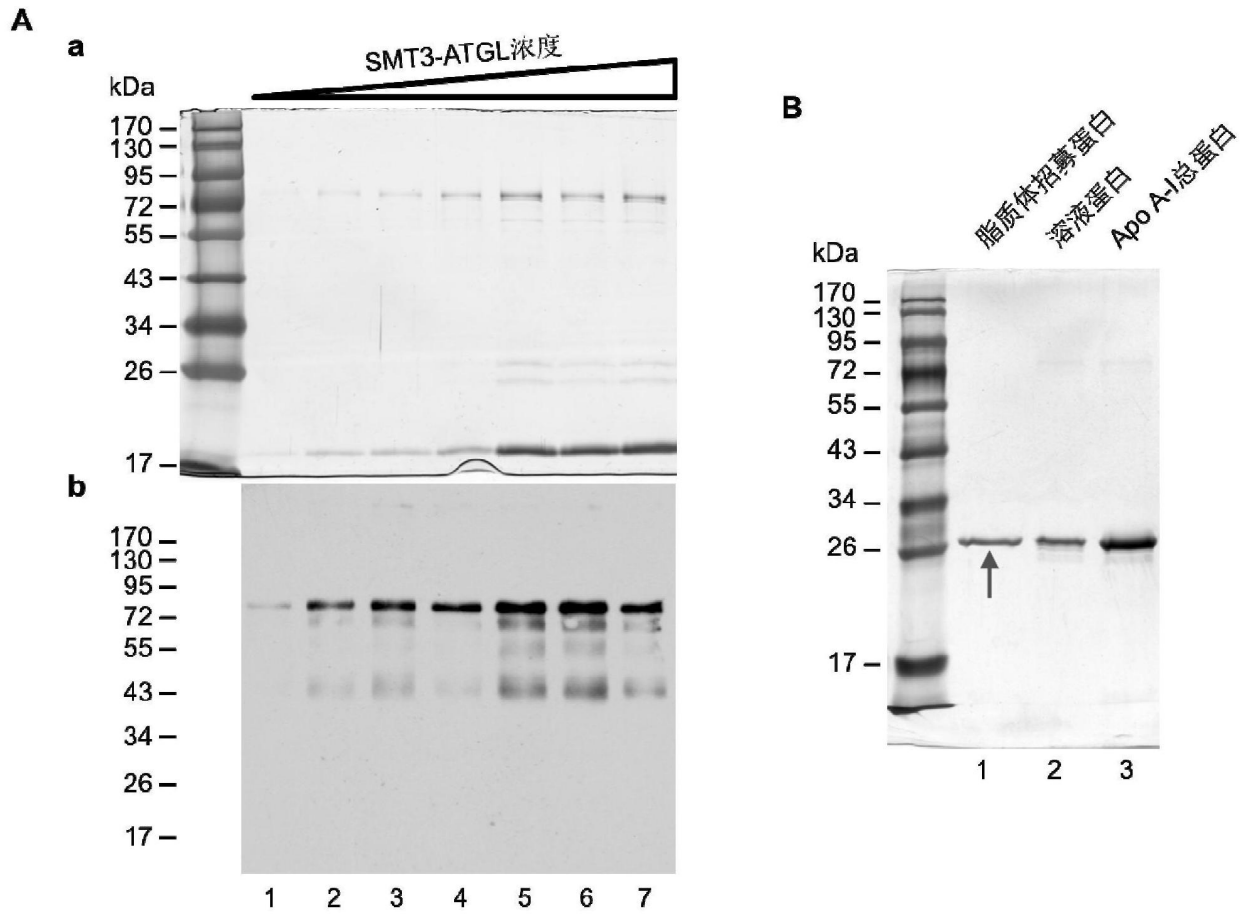


图10