



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1978652 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 17

(21) 申请号 200510126157. X

(22) 申请日 2005. 11. 30

(73) 专利权人 华北制药集团新药研究开发有限
责任公司

地址 050000 河北省石家庄市和平东路 388
号

(72) 发明人 王富强 郑桂珍 赵颖 任志红
穆岷 丰玫玫 苏彩云 张春珍
贾茜 贺建功

(74) 专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理
有限公司 11006

代理人 黄韧敏

(51) Int. Cl.

C12N 15/54 (2006. 01)

C12N 9/10 (2006. 01)

C12N 15/63 (2006. 01)

C12P 37/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 9735013 A1, 1997. 09. 25, 全文.

王富强等. 产黄青霉转化载体 pPIPKA 的构建
及青霉素工业生产菌株的转化研究. 菌物学报 23

1. 2004, 23(1), 66-72.

TAM&S EMRI et al.. Does the
detoxification of penicillin side-
chain precursors depend on microsomal
monooxygenase and glutathione S-transferase
in *Penicillium chrysogenum*? . Journal of
Basic Microbiology 43 4. 2003, 43(4), 287-
300.

审查员 刘俊

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

编码产黄青霉谷胱甘肽转移酶的基因及其应
用

(57) 摘要

本发明涉及来自产黄青霉的新的编码谷胱甘
肽转移酶的基因 (PcGSTA), 该基因编码的多肽及
含有该基因的表达载体。本发明同时提供了苯乙
酸对本发明的新基因 PcGSTA 的表达的影响, 进而
提供了将本发明的新基因 PcGSTA 应用于产黄青
霉菌改造以提高青霉素产量的途径。

1. 一种分离的多核苷酸,其序列为 SEQ ID No :1 所示的序列。
2. 一种分离的多核苷酸,其序列为编码 SEQ ID No :2 所示的蛋白质序列的多核苷酸序列。
3. 一种分离的多核苷酸,其序列为与权利要求 1 或 2 所示的核苷酸序列互补的核苷酸序列。
4. 由权利要求 1 或 2 所述的核苷酸序列编码的多肽。
5. 权利要求 4 所述的多肽,其序列为如 SEQ ID No. 2 所示的序列,具有谷胱苷肽转移酶活性。
6. 含有权利要求 1 或 2 所述的多核苷酸的表达载体。
7. 权利要求 6 所述的表达载体,其中所述的表达载体为原核表达载体。
8. 含有权利要求 6 所述的表达载体的宿主细胞。
9. 权利要求 1 或 2 所述的分离的多核苷酸在提高产黄青霉菌的青霉素产量中的应用。

编码产黄青霉谷胱甘肽转移酶的基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及新的分离的多核苷酸,具体地说涉及来自产黄青霉的新的编码谷胱甘肽转移酶的基因 (PcGSTA)。

[0002] 本发明还涉及该基因编码的多肽。

[0003] 本发明还涉及含有该基因的表达载体。

[0004] 本发明也提供了新基因在提高产黄青霉菌的青霉素产量中的应用。

背景技术

[0005] 青霉素是一种重要的 β -内酰胺抗生素。在工业生产中,生产菌株 *Penicillinchrysogenum* 必需利用苯乙酸作为前体生成青霉素 G。苯乙酸要加入到青霉素中首先须经苯乙酰-CoA 连接酶激活形成 CoA 的形式,然后与异青霉素 N 发生酰基交换,生成终产物青霉素 G。该步反应由 acyl-CoA:6APA 转酰基酶催化,由于该酶有很广的底物特异性,苯乙酸必须过量的加入到培养基中以促进青霉素 G 的生成而不是生成其他的青霉素。侧链前体的利用效率很大程度上依赖于其毒性和对氧化作用的抗性。在工业发酵条件下,并不是所有的苯乙酸都流向青霉素,还有一部分通过其他的途径代谢掉,如可被细胞色素 P450 家族的 phenylacetate 2-hydroxylase 氧化,从而进一步被分解。

[0006] 有研究表明,谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 相关的代谢途径可能与苯乙酸的解毒过程有关 (Monks et al.1990, Toxicol. Appl. Pharmacol. 106 :1-19 ;Commandeur et al.1995, Pharmacol. Rev. 47 :271-330 ;Emri et al.2000, J. Basic. Microbiol. 40 :93-104)。另一方面, GSH 在结构上类似于青霉素生物合成途径中的关键中间体 - δ -(L- α -氨基己二酰)-L-半胱氨酰-D-缬氨酸 (LLD-ACV),高浓度的 GSH 可能会对 LLL-ACV 产生竞争性抑制,从而影响青霉素的合成。

[0007] 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST;EC 2.5.1.18) 是以二聚体形式存在的 II 期脱毒酶,可使许多有潜在毒性的异生物质与谷胱甘肽 (GSH) 连接,然后使带有 GSH 分子“标签”的代谢物被液泡膜或质膜上的“ATP 结合性盒型”转运蛋白识别,并运进液泡或质外体,从而起到解毒作用。GSTs 在许多需氧的真核生物和原核生物中存在,根据其基本结构和三级结构,底物和抑制剂的特异性及免疫学特征,哺乳动物的胞质 GSTs 已被很好的定性并分为 α (α)、 μ (μ)、 π (π) 和 θ (θ) 类。一些新的 GSTs 种类从各种生物中发现,如: σ 、 κ 、 ζ 及 ω 。 ϕ 和 τ 及 β 类分别是植物和细菌所特有的种类。来自昆虫的各种 GSTs 均与对抗生素的耐药性有关。但关于真菌 GSTs 的分子系统发育只有很少报道。然而现已很清楚 GSTs 同工酶在许多真菌存在,如:*Schizosaccharomyces Pombe*, *Aspergillus nidulans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Issathchenbia orientales*, *Yarrowia lipolytica*, *Cunninghamella elegans*, *Mucor circinelloides* 及 *Phanerochaete chrysosporium*, *Emericella nidulans*, *Aspergillus fumigatus*。真菌的 GSTs 具不同的表达模式,在代谢过程中有不同的功能,如在异生物质解毒、真菌耐药性、抗氧化胁迫及重金属毒性中起作用。

[0008] EMRI 等人从酶学角度对产黄青霉 *P. chrysogenum* 的 GSH 代谢及 GST 进行了广泛研究, 试图揭示细胞中 GSH 的浓度、GSH 相关的 PA 代谢及青霉素产量的关系, 从而开发出新的高产发酵工艺。研究结果显示, 在青霉素的生物合成过程中在培养基中增加 PA 会增大 GSTs 的表达量, 但所有有利于提高青霉素产量的培养基成分的改变同样也有利于 GSH 的形成。

[0009] 至今还未见到产黄青霉中 GST 相关基因研究的报道。

[0010] 因此, 产黄青霉中谷胱甘肽转移酶编码基因的克隆及深入研究将进一步揭示苯乙酸的代谢机制, 为青霉素生产菌种的基因工程改造提供新的方向和靶点。

[0011] 本发明的一个目的在于提供新的编码产黄青霉谷胱甘肽转移酶的基因, 定名为 PcGSTA。

[0012] 本发明的另一个目的在于提供上述基因编码的多肽。

[0013] 本发明的再一个目的在于提供含有上述基因序列的表达载体。

[0014] 根据本发明的一方面, 编码产黄青霉谷胱甘肽转移酶的基因, 来源于产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*), 名称为 PcGSTA, 其编码 238 个氨基酸, 分子量 26.9kDa 的蛋白质, 如序列表中 SEQ ID NO. 2 所示。序列比对, 其氨基酸序列具有谷胱甘肽转移酶 (GST) 的保守结构域, 与真菌 GST 家族的蛋白高度相似, 其中与 *Botryotinia fuckeliana* 谷胱甘肽转移酶 (AAG43132) 有 54% 的一致性, 与 *Emericella nidulans* GST (AAM48104) 有 52% 的一致性, 与 *Aspergillus fumigatus* gstA (AAX07321)、gstB (AAX070318) gstC (AAX070319) 的氨基酸序列一致性分别为 52%, 45%, 37%, 与 *Schizosaccharomyces Pombe* GST-II (059827) 的序列一致性为 41%。采用基因工程技术, 将本发明分离的基因在表达载体中表达时, 其表达的蛋白具有谷胱甘肽转移酶活性。具体地说, 本发明提供了含有下述序列之一的分离的多核苷酸:

[0015] (1) 序列表中的 SEQ ID No: 1;

[0016] (2) 编码序列表中 SEQ ID No: 2 蛋白质序列的多核苷酸;

[0017] (3) 与序列表中 SEQ ID No: 1 限定的 cDNA 序列具有 90% 以上同源性, 且编码相同功能蛋白质的 cDNA 序列;

[0018] 序列表中 SEQ ID No: 1 的 cDNA 序列长度为 717bp。

[0019] 上述涉及的多核苷酸还包括取代、缺失、和插入变体以及等位变体、剪接变体、片段、衍生物等, 其中可以通过取代、缺失、插入或衍生一个或多个核苷酸。优选的这些多核苷酸是那些编码具有生物学活性的谷胱甘肽转移酶的多核苷酸。

[0020] 本领域技术人员可以理解的是, 上述的分离的多核苷酸也包括那些与 SEQ ID NO. 1 所示序列具有较高同源性的序列, 例如同源性大于 90%、甚至 95%、甚至 98% 的序列; 还包括那些在严谨条件下可与 SEQ ID NO. 1 所示序列杂交的序列; 或者可与 SEQ ID NO. 1 所示序列互补的序列。

[0021] 根据本发明的另一方面, 提供新的多肽, 其含有上述核苷酸序列所编码的氨基酸序列, 即含有 SEQ ID NO. 2 所示的序列, 编码蛋白为产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 的一种 GST, 名称为 PcGSTA, 是具有序列表中 SEQ

[0022] ID No: 2 的氨基酸残基序列的蛋白质或将 SEQ ID No: 2 的氨基酸残基序列经过一个或几个氨基酸残基的取代、缺失或添加且具有与 SEQ ID No: 2 相同活性的由 SEQ ID No: 2 衍生的蛋白质。序列表中的 SEQ ID No: 2 是由 239 个氨基酸残基组成。

[0023] 根据本发明的另一方面,本发明亦提供包括一种或多种上述多核苷酸的重组载体,以及包含上述多核苷酸的载体的基因工程宿主细胞。在优选的实施方案中,这种重组载体包括上述的多核苷酸,它编码含 SEQ ID NO:2 的多肽,其含 SEQ ID NO:1 的序列所示的多核苷酸。在本发明的一个具体实施方案中,构建了含本发明多核苷酸的原核表达载体并成功地表达出具有 GST 活性的蛋白。

[0024] 本发明也涉及到包括任何一种上述重组载体的宿主细胞。在已经构建载体之后,可以插入全部或部分载体至适合的宿主细胞,以便扩增和/或多肽表达。宿主细胞可以是原核生物宿主细胞(例如 E. coli)或者真核生物宿主细胞(例如丝状真菌细胞、酵母细胞,昆虫细胞,或脊椎动物细胞)。

[0025] 本发明同时提供了苯乙酸对本发明的新基因 PcGSTA 的表达的影响,进而提供了将本发明的新基因 PcGSTA 应用于产黄青霉菌改造以提高青霉素产量的途径。

[0026] 本发明从产黄青霉中成功地分离获得了编码新的产黄青霉谷胱甘肽转移酶的基因,并构建了基因工程载体和宿主,表达出了有 GST 活性的蛋白,而且证明了该基因的表达与苯乙酸的补加相关,本发明为利用基因工程手段改造产黄青霉菌从而提高青霉素产量提供了方向和靶点,对于青霉素的生产具有重要意义。

[0027] 附图的简要说明

[0028] 图 1 为 PcGSTA 蛋白的表达及纯化后的 SDS-PAGE 结果图;

[0029] 其中泳道 1,2,3,4,5,6 分别为诱导前总蛋白、诱导后总蛋白、诱导后上清蛋白,诱导后沉淀蛋白,纯化后 PcGSTA,蛋白分子量标准;

[0030] 图 2 为苯乙酸对不同产量菌株的 PcGSTA 表达影响的定量 PCR 分析结果。

[0031] 发明的具体实施方式

[0032] 下面结合附图,通过对本发明较佳实施例的描述,详细说明本发明。

[0033] 在下面使用的试剂材料如无特别说明,均为市售分析纯试剂,购自天津试剂公司。

[0034] 【实施例 1】PcGSTA 基因的克隆

[0035] 将产黄青霉 WIS 54-1255(ATCC28089)在 YPD(1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖)培养基中培养 24 小时,过滤收集菌丝,取 0.1 克湿菌丝液 N₂ 研磨,加 1ml Trizol 试剂(Invitrogen 公司,15596-260)抽提产黄青霉总 RNA,将所得产黄青霉总 RNA 溶解于 DEPC 水中,-70℃下保存备用。另取 0.1 克菌丝,加液 N₂ 磨碎后用 Easy-DNA kit(Invitrogen 公司,K1800-01)提取产黄青霉基因组 DNA。

[0036] 为去除 RNA 中可能的 DNA 污染,取产黄青霉总 RNA 5 μg,在 100 μl 反应体系中加入 5 μl RQ1 RNase-free DNase(Promega 公司,M6101),10 μl RQ1RNase-free DNase 反应缓冲液(10X),37℃保温 30 分钟,用酚:氯仿抽提,乙醇沉淀,溶于 10 μl DEPC 水。取 5 μl 去除 DNA 的 RNA 样品,用随机引物(Random Hexamers, Promega 公司,C1181)进行反转录,得 cDNA,所用反转录酶为 SuperscriptTM II RNase H-(Invitrogen 公司,18064-022)。

[0037] 以 cDNA 为模板进行,以 pg1:5' -catATG TCT TCAAAC ATTACC CTG-3' 和 pg2:5' -ggatttc TCA ATG CTG ATC GGA AGT AG-3' 为引物做 PCR 扩增,PCR 条件为 94℃ 5 分钟;94℃ 1 分钟,56℃ 1 分钟,72℃ 1 分钟 -35cycles;72℃ 7 分钟。

[0038] 将 RT-PCR 产物按常规方法克隆到 pGEM-T 载体(Promega 公司)并测序,结果表明该 RT-PCR 产物具有 SEQ ID NO.1 的开放阅读框架,长度为 717bp。将其命名为 PcgstA。

[0039] 以基因组 DNA 为模版,以 pg1/pg2 为引物做 PCR,得到 PcgstA 的基因组序列,通过与 cDNA 序列比较,证明该基因有 2 个内含子,长度分别为 64bp,59bp。

[0040] PcgstA 编码 238 个氨基酸,分子量 26.9kDa 的蛋白质,如序列表中 SEQ IDNO.2 所示。序列比对,其氨基酸序列具有谷胱甘肽转移酶 (GST) 的保守结构域,与真菌 GST 家族的蛋白高度相似,其中与 *Botryotinia fuckeliana* 谷胱甘肽转移酶 (AAG43132) 有 54% 的一致性,与 *Emericella nidulans* GST(AAM48104) 有 52% 的一致性,与 *Aspergillus fumigatus* gstA(AAX07321)、gstB(AAX070318)gstC(AAX070319) 的氨基酸序列一致性分别为 52%,45%,37%,与 *Schizosaccharomyces Pombe* GST-II(059827) 的序列一致性为 41%。

[0041] 【实施例 2】:PcGSTA 的原核表达

[0042] 原核表达载体 pET-11a 购自 Stratagene 公司。

[0043] 用限制性内切酶 Nde I, BamH I 将 PcgstA 从载体 pGEM-T 上切下,与用同样酶切得的载体 pET-11a 连接,得到质粒 pET/GSTA。将构建好的质粒 pET/GSTA 转化表达宿主菌 BL21 (DE3)-RP,挑取阳性克隆至 LB 培养基 (酵母粉蛋白胨 NaCl) 37℃ 培养至 $OD_{600} = 0.6$,加入 0.5mmol/L IPTG 诱导外源基因表达,37℃ 200rpm 继续培养 3.5 小时,收集菌体,SDS-PAGE 分析。

[0044] 称取菌体 0.4g 用 16ml Buffer A(50mmol/L Tris-HCl pH7.5,0.5mmol/L EDTA, 50mmol/L NaCl,5% 甘油) 重悬,超声破碎,10,000g 4℃ 10min 离心,分别取上清和沉淀,SDS-PAGE 电泳分析,结果表明重组表达的 PcGSTA 只有少部分为可溶性蛋白,绝大多数为包涵体的形式存在,结果见图 1。

[0045] 【实施例 3】:重组 PcGSTA 蛋白的纯化

[0046] 将包涵体用含 2% 的脱氧胆酸钠的 Buffer A 洗 2 次,每次均先室温放置 10min,然后 10,000g 4℃ 10min 离心,弃上清。沉淀溶于含 0.3% 十二烷基肌氨酸钠的 Buffer A,室温放置 30min,4℃ 透析过夜,SDS-PAGE 检验纯度达 80% 以上。

[0047] 【实施例 4】:PcGSTA 的活性测定

[0048] PcGSTA 的活性测定按照 (Habig W.H.&Jakoby W.B.Methods Enzymol 77: 398-405.1981) 方法

[0049] 选用底物为 CDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene),100 μ l 反应体系,反应基质为 0.1mol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH6.5),CDNB 和 GSH 的终浓度分别为 1mol/L 和 0.5mol/L,加入纯化的 PcGSTA 约 5.38 μ g,按 OD_{340} 的增加值测定反应速度,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,结果表明透析后的 PcGSTA 比活性为 9.67U/mgProtein, K_m CDNB 为 7.52 μ mol/L, V_{max} CDNB 为 78.9 μ mol/min.mgProtein。

[0050] 【实施例 5】:苯乙酸对 PcgstA 表达的影响

[0051] 选用产黄青霉菌株 WIS54-1255 在 YPD 培养基中培养 68h,分两种处理方法,一种在培养过程中补加 0.2ml13% 的苯乙酸 (PA) 三次,另一种不补 PA。收集菌丝,提取 RNA,用 RNase free 的 DNase 处理后作定量 PCR,试剂为 SYBR Green,仪器为 ABI PRISM 7000 定量 PCR 仪。结果显示,加入 PA 对 PcgstA 表达均有明显的抑制作用。结果见图 2。

[0052] 以上对本发明的详细描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明做出各种改变和变形,只要未脱离本发明的精神,均应属于本发明权利要求所定义的范围。

[0053] SEQUENCE LISTING

[0054] <110> 华北制药集团新药研究开发有限责任公司

[0055] <120> 编码产黄青酶谷胱甘肽转移酶的基因及其应用

[0056] <130> 05P101405

[0057] <160> 2

[0058] <170> PatentIn version 3.1

[0059] <210> 1

[0060] <211> 717

[0061] <212> DNA

[0062] <213> 产黄青霉菌 (Penicillium chrysogenum)

[0063] <220>

[0064] <221> CDS

[0065] <222> (1).. (717)

[0066] <223> 编码谷胱甘肽转移酶

[0067] <400> 1

[0068] atg tct tca aac att acc ctg tat agc tgg cct acg ccg aat ggc gtc 48

[0069] Met Ser Ser Ash Ile Thr Leu Tyr Ser Trp Pro Thr Pro Asn Gly Val

[0070] 1 5 10 15

[0071] aaa gcc tcc atc acc ctc gaa gaa ctt ggg ctg tct tat aaa gcc gaa 96

[0072] Lys Ala Ser Ile Thr Leu Glu Glu Leu Gly Leu Ser Tyr Lys Ala Glu

[0073] 20 25 30

[0074] ggc ctt gat atc tcc tcc agc tca aat ccc cag aag gaa gaa tgg ttc 144

[0075] Gly Leu Asp Ile Ser Ser Ser Ser Asn Pro Gln Lys Glu Glu Trp Phe

[0076] 35 40 45

[0077] ctg aag att aat ccc aat ggc cgc atc ccc gcc cta ctc gat ggt tcg 192

[0078] Leu Lys Ile Asn Pro Asn Gly Arg Ile Pro Ala Leu Leu Asp Gly Ser

[0079] 50 55 60

[0080] cag cgc gtt ttc gag agc gga gca atc atg aca tat cta gtt gac aag 240

[0081] Gln Arg Val Phe Glu Ser Gly Ala Ile Met Thr Tyr Leu Val Asp Lys

[0082] 65 70 75 80

[0083] tac gac acc gac cgc aag atc agt tac gct ccc ggc atc cct gag cac 288

[0084] Tyr Asp Thr Asp Arg Lys Ile Ser Tyr Ala Pro Gly Ile Pro Glu His

[0085] 85 90 95

[0086] gcc gaa caa acc tcc tgg ttg atg ttc cag atg gct ggt ctc ggg cct 336

[0087] Ala Glu Gln Thr Ser Trp Leu Met Phe Gln Met Ala Gly Leu Gly Pro

[0088] 100 105 110

[0089] att caa gga caa gcg aac cat ttc cgt ctc ttc gcc aac acg cgc tcc 384

[0090] Ile Gln Gly Gln Ala Asn His Phe Arg Leu Phe Ala Asn Thr Arg Ser

[0091] 115 120 125

[0092]	gac tac gct att aag cgg ttt gtc gat gag aca aga cgt ctc tac tcg	432
[0093]	Asp Tyr Ala Ile Lys Arg Phe Val Asp Glu Thr Arg Arg Leu Tyr Ser	
[0094]	130 135 140	
[0095]	gtc ctc gag tcg cgg ttg aac gaa agc cct tac ctc gcg ggt gag aag	480
[0096]	Val Leu Glu Ser Arg Leu Asn Glu Ser Pro Tyr Leu Ala Gly Glu Lys	
[0097]	145 150 155 160	
[0098]	tat act att gcc gat att gcg agt ttc tct tgg gtt cgc ggt tct cct	528
[0099]	Tyr Thr Ile Ala Asp Ile Ala Ser Phe Ser Trp Val Arg Gly Ser Pro	
[0100]	165 170 175	
[0101]	att tcc ttg gaa att gat ctg tcc gag ttc ccc gct ttg aag aag tgg	576
[0102]	Ile Ser Leu Glu Ile Asp Leu Ser Glu Phe Pro Ala Leu Lys Lys Trp	
[0103]	180 185 190	
[0104]	gta gat gag att gat aag cgt gct gct gtt caa agg ggg ctg gat att	624
[0105]	Val Asp Glu Ile Asp Lys Arg Ala Ala Val Gln Arg Gly Leu Asp Ile	
[0106]	195 200 205	
[0107]	cct cac tcg act tgg act cct gag caa aag gct gaa att ttc cgg aat	672
[0108]	Pro His Ser Thr Trp Thr Pro Glu Gln Lys Ala Glu Ile Phe Arg Asn	
[0109]	210 215 220	
[0110]	tgc cgg gcc aag att gat gcg atg act act tcc gat cag cat tga	717
[0111]	Cys Arg Ala Lys Ile Asp Ala Met Thr Thr Ser Asp Gln His	
[0112]	225 230 235	
[0113]	<210>2	
[0114]	<211>238	
[0115]	<212>PRT	
[0116]	<213>产黄青霉菌 (Penicillium chrysogenum)	
[0117]	<400>2	
[0118]	Met Ser Ser Asn Ile Thr Leu Tyr Ser Trp Pro Thr Pro Asn Gly Val	
[0119]	1 5 10 15	
[0120]	Lys Ala Ser Ile Thr Leu Glu Glu Leu Gly Leu Ser Tyr Lys Ala Glu	
[0121]	20 25 30	
[0122]	Gly Leu Asp Ile Ser Ser Ser Ser Asn Pro Gln Lys Glu Glu Trp Phe	
[0123]	35 40 45	
[0124]	Leu Lys Ile Asn Pro Asn Gly Arg Ile Pro Ala Leu Leu Asp Gly Ser	
[0125]	50 55 60	
[0126]	Gln Arg Val Phe Glu Ser Gly Ala Ile Met Thr Tyr Leu Val Asp Lys	
[0127]	65 70 75 80	
[0128]	Tyr Asp Thr Asp Arg Lys Ile Ser Tyr Ala Pro Gly Ile Pro Glu His	
[0129]	85 90 95	
[0130]	Ala Glu Gln Thr Ser Trp Leu Met Phe Gln Met Ala Gly Leu Gly Pro	

[0131]	100	105	110
[0132]	Ile Gln Gly Gln Ala Asn His Phe Arg Leu Phe Ala Asn Thr Arg Ser		
[0133]	115	120	125
[0134]	Asp Tyr Ala Ile Lys Arg Phe Val Asp Glu Thr Arg Arg Leu Tyr Ser		
[0135]	130	135	140
[0136]	Val Leu Glu Ser Arg Leu Asn Glu Ser Pro Tyr Leu Ala Gly Glu Lys		
[0137]	145	150	155
[0138]	Tyr Thr Ile Ala Asp Ile Ala Ser Phe Ser Trp Val Arg Gly Ser Pro		
[0139]	165	170	175
[0140]	Ile Ser Leu Glu Ile Asp Leu Ser Glu Phe Pro Ala Leu Lys Lys Trp		
[0141]	180	185	190
[0142]	Val Asp Glu Ile Asp Lys Arg Ala Ala Val Gln Arg Gly Leu Asp Ile		
[0143]	195	200	205
[0144]	Pro His Ser Thr Trp Thr Pro Glu Gln Lys Ala Glu Ile Phe Arg Asn		
[0145]	210	215	220
[0146]	Cys Arg Ala Lys Ile Asp Ala Met Thr Thr Ser Asp Gln His		
[0147]	225	230	235

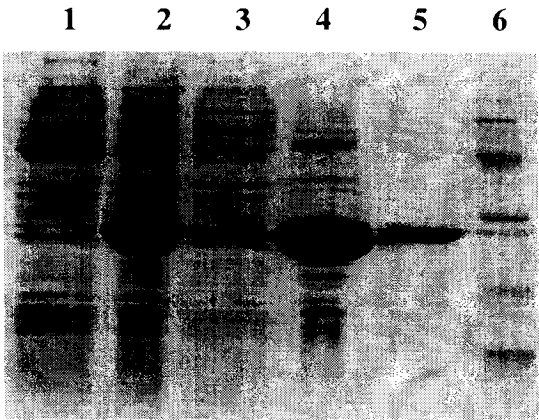


图 1

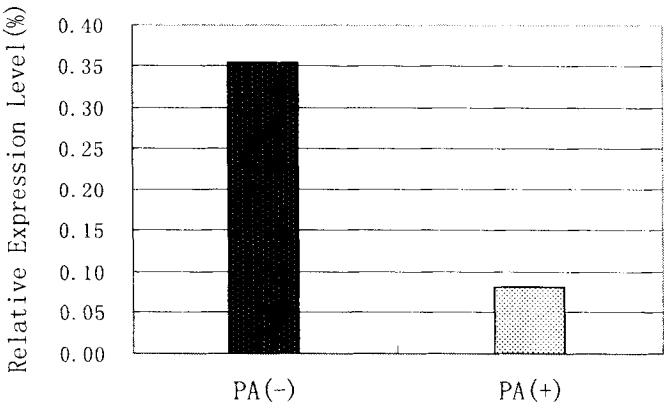


图 2