

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12Q 1/66



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99811958. X

C12Q 1/00 C12P 21/06
C07H 21/04 G01N 33/53
G01N 33/567 G01N 33/573
G01N 33/58 G01N 33/60
G01N 33/531 G01N 33/533
G01N 21/00 G01N 21/76

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1160470C

[22] 申请日 1999. 9. 2 [21] 申请号 99811958. X
[30] 优先权
[32] 1998. 9. 3 [33] US [31] 60/099,068
[32] 1999. 5. 24 [33] US [31] 60/135,835
[86] 国际申请 PCT/US1999/020207 1999. 9. 2
[87] 国际公布 WO2000/014271 英 2000. 3. 16
[85] 进入国家阶段日期 2001. 4. 9
[71] 专利权人 洛马林达大学
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 A · A · 加雷 王玉葆
G · 王 - 普鲁斯基
审查员 周 霞

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 20 页

[54] 发明名称 研究体内蛋白质相互作用的方法
[57] 摘要

一种用来测定活细胞内第一种蛋白质和另一种蛋白质是否相互作用的方法。 该方法包含在细胞内提供与供体荧光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质。 允许复合的第一种蛋白质和复合的第二种蛋白质在细胞内彼此相互靠近。 然后检测由供体荧光素酶发光共振能量传递导致受体荧光团发出的任何荧光， 这里来自受体荧光团的荧光表明第一种蛋白质与第二种蛋白质已经发生了相互作用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种测定活细胞内第一种蛋白质和第二种蛋白质是否相互作用的方法，方法包括：

a) 在细胞内提供与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质；

b) 在细胞内放置复合的第一种蛋白质和复合的第二种蛋白质使之相互靠近；和

c) 检测来自受体荧光团的任何荧光；

当第一种蛋白质靠近第二种蛋白质时，供体萤光素酶能够将发光共振能量传递给受体荧光团；以及

供体萤光素酶发光共振能量传递导致受体荧光团发出荧光，则表明第一种蛋白质与第二种蛋白质已经发生了相互作用。

2. 权利要求1的方法，其中提供与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质，包括基因工程化DNA以及将基因工程化的DNA转入活细胞，这引起细胞产生与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质。

3. 权利要求1的方法，其中提供了与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质的细胞为哺乳动物细胞。

4. 权利要求1的方法，其中提供了与受体荧光团复合的第二种蛋白质的细胞为哺乳动物细胞。

5. 权利要求1的方法，其中所提供的供体萤光素酶为Renilla萤光素酶。

6. 权利要求1的方法，其中所提供的受体荧光团为绿色荧光蛋白质。

7. 权利要求1的方法，其中所提供的受体荧光团为水母绿色荧光蛋白质。

8. 权利要求1的方法，其中采用分光荧光测定法检测来自供体萤光素酶的任何荧光。

9. 一种测定第一种蛋白质和第二种蛋白质是否相互作用的方法，方

法包括:

a) 提供与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质;

b) 将复合的第一种蛋白质和复合的第二种蛋白质相互靠近; 和

c) 检测来自受体荧光团的任何荧光;

当第一种蛋白质靠近第二种蛋白质时, 供体萤光素酶能够将发光共振能量传递给受体荧光团; 以及

供体萤光素酶发光共振能量传递导致受体荧光团发出荧光, 则表明第一种蛋白质与第二种蛋白质已经发生了相互作用。

10. 权利要求 9 的方法, 其中提供与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质, 包括基因工程化 DNA 以及将基因工程化的 DNA 导入活细胞, 这引起细胞产生与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质以及与受体荧光团复合的第二种蛋白质。

11. 权利要求 10 的方法, 其中提供了与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质的细胞为哺乳动物细胞。

12. 权利要求 10 的方法, 其中提供了与受体荧光团复合的第二种蛋白质的细胞为哺乳动物细胞。

13. 权利要求 9 的方法, 其中所提供的供体萤光素酶为 Renilla 萤光素酶。

14. 权利要求 9 的方法, 其中所提供的受体荧光团为绿色荧光蛋白质。

15. 权利要求 9 的方法, 其中所提供的受体荧光团为水母绿色荧光蛋白质。

16. 权利要求 9 的方法, 其中使用分光荧光测定法检测来自供体萤光素酶的任何荧光。

17. 一种胞外测定第一种分子和第二种分子是否相互作用的方法, 方法包括:

a) 提供与供体萤光素酶复合的第一种分子和与受体荧光团复合的第二种分子;

b) 将复合的第一种分子和第二种分子相互靠近; 和

c) 检测来自受体荧光团的任何荧光;

当第一种分子与第二种分子靠近时, 供体萤光素酶能够将发光共振能量传递给受体荧光团; 和

供体萤光素酶发光共振能量传递导致受体荧光团发出荧光, 则表明第一种分子和第二种分子已经发生了相互作用。

18. 权利要求 17 的方法, 其中第一种分子为第一种蛋白质而第二种分子为第二种蛋白质; 以及

其中提供与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质, 包括基因工程化 DNA 和将基因工程化的 DNA 转入活细胞, 这引起细胞产生与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质。

19. 权利要求 18 的方法, 其中提供了与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质的细胞为哺乳动物细胞。

20. 权利要求 18 的方法, 其中提供了与受体荧光团复合的第二种蛋白质的细胞为哺乳动物细胞。

21. 权利要求 17 的方法, 其中所提供的供体萤光素酶为 Renilla 萤光素酶。

22. 权利要求 17 的方法, 其中所提供的受体荧光团为绿色荧光蛋白质。

23. 权利要求 17 的方法, 其中所提供的受体荧光团为水母绿色荧光蛋白质。

24. 权利要求 17 的方法, 其中采用分光荧光测定法检测来自供体萤光素酶的荧光。

研究体内蛋白质相互作用的方法

背景

对活细胞内蛋白质间相互作用的研究往往对于理解蛋白质功能及其作用机制非常必要。这些相互作用目前采用免疫沉淀、酵母双杂交方法和 β -gal互补方法进行研究。

然而，这些方法具有一些缺陷。例如，这些方法带有假阳性。第二，这些方法不可以测定关于相互作用的定量化信息。此外，它们不可能体内实时监测相互作用。

因此，获得另一种没有这些缺点的研究体内蛋白质间相互作用的方法将非常有利。更优选地，本方法可以在多种多样的活细胞内用于广泛的蛋白质。同样优选地，本方法能够用来测定除蛋白质以外的其它分子间的相互作用。

概述

根据本发明的一个实施方案，提供一种测定活细胞内第一种蛋白质和第二种蛋白质是否发生相互作用的方法。本方法包括在细胞内提供与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质。当第一种蛋白质靠近第二种蛋白质时供体萤光素酶能够将发光共振能量传递给受体荧光团。然后复合的第一种蛋白质和复合的第二种蛋白质在细胞内允许相互靠近。接下去检测任何来自受体荧光团的荧光。由供体萤光素酶发光共振能量传递给受体荧光团导致受体荧光团产生荧光，表明第一种蛋白质与第二种蛋白质已经发生了相互作用。

在一个优选的实施方案中，提供了与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质，包括基因工程化DNA以及将基因工程化的DNA转移到活细胞内，这导致细胞产生与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质和与受体荧光团复合的第二种蛋白质。在一

个特别优选的实施方案中，含有与供体萤光素酶复合的第一种蛋白质的细胞以及含有与受体荧光团复合的第二种蛋白质的细胞均为哺乳动物细胞。

在另一个优选的实施方案中，所提供的供体萤光素酶为 *Renilla* 萤光素酶。而在另一种优选的实施方案中，所提供的受体荧光团为一种水母 (*Aequorea*) 绿色荧光蛋白质。

在一个特别优选的实施方案中，使用分光荧光测定法检测受体荧光团所发出的荧光。

描述

本发明包括一种运用发光共振能量传递(LRET)测定活细胞内一种蛋白质和另一种蛋白质是否发生相互作用的方法。发光共振能量传递是由于供体萤光素酶能量的激发态向受体荧光团的传递。为了 LRET 的发生，在供体萤光素酶的发射光谱和受体荧光团的激发光谱之间必须有重叠。

发光共振能量传递的效率在诸多变量中尤其取决于分隔供体萤光素酶和受体荧光团的距离。一般来说，明显的能量传递仅当供体萤光素酶和受体荧光团彼此之间小于 80Å 时才发生。这种短距离大大小于用常规显微镜观察两个实体所需的光学分辨距离。因此，检测到在供体萤光素酶和受体荧光团之间发生发光共振能量传递，表明供体萤光素酶和受体荧光团已经靠近并处于 LRET 发生所需的距离之内，即彼此之间大约小于 80 Å。

本发明运用发光共振能量传递来测定活细胞内一种蛋白质和另一种蛋白质之间是否发生相互作用。它的完成是依靠将第一种蛋白质与供体萤光素酶复合和将第二种蛋白质与受体荧光团复合，并将复合的第一种蛋白质和复合的第二种蛋白质放入细胞内并处于适合第一种蛋白质与第二种蛋白质发生相互作用的条件下。如果第一种蛋白质与第二种蛋白质相互作用，供体萤光素酶将足够靠近受体荧光团从而发生发光共振能量传递，受体荧光团将发出荧光。由此，检测到来自受体荧光团的荧光将表明第一种蛋白质已经与第二种蛋白质发生了相互作

用。有利地是，这种方法也可用于检测即使用例如常规显微镜的光学方法无法检测到的第一种蛋白质与第二种蛋白质之间的相互作用。

根据本发明运用发光共振能量传递检测两种蛋白质之间相互作用的方法具有几个优点。首先，活细胞内蛋白质的特异标记可通过基因工程的方法获得，而将荧光染料导入活细胞非常困难。此外，如果供有底物和氧，酶促反应导致如 *Renilla* 的萤光素酶发光相对稳定，而荧光染料则迅速光漂白。

如此处公开所用的方法，“将第一种蛋白质与供体萤光素酶复合”是指将供体萤光素酶和第一种蛋白质以如此方式结合在一起，使得当第一种蛋白质与第二种蛋白质相互作用时供体萤光素酶和第一种蛋白质基本上相互同样靠近。相似地，“将第二种蛋白质与受体荧光团复合”是指将受体荧光团与第二种蛋白质以如此方式结合在一起，使得当第一种蛋白质与第二种蛋白质相互作用时受体荧光团和第二种蛋白质基本上相互同样靠近。例如，可通过基因工程化使细胞生产包含供体萤光素酶和第一种蛋白质的融合蛋白以及包含受体荧光团和第二种蛋白质的融合蛋白来进行这种复合。

在一个优选的实施方案中，本发明使用 *Renilla* 萤光素酶作为供体萤光素酶，使用“人源化的”水母绿色荧光蛋白(人源化 GFP)作为受体荧光团。*Renilla* 萤光素酶是一种从 *Renilla reniformis* 中纯化出的 34kDa 的酶。有氧时该酶催化 coelenterazine 的氧化脱羧作用，产生发射波长最大值为 471nm 的蓝光。*Renilla* 萤光素酶用作供体萤光素酶是因为它除外源光以外需要外源底物进行激活。这样可有利地除去来自外源光源和自发荧光产生的背景噪音，从而允许容易而准确地定量测定所产生的光。

“人源化”GFP 是一种激发最大值在 480nm 荧光的 27kDa 的蛋白质荧光团。它与野生型水母绿色荧光蛋白相比有一个氨基酸差异。之所以选择“人源化”GFP 作为受体荧光团是因为它的激发光谱与 *Renilla* 萤光素酶的发射光谱相重叠。此外，“人源化”GFP 发出的光在活细胞内是可见的。并且，“人源化”GFP 在用于证明这种方法的“人源化”GFP cDNA 转染的哺乳动物细胞中可获得良好的表达。

根据本发明用于测定一种蛋白质与另一种蛋白质是否相互作用的方法显示如下。简而言之，胰岛素样生长因子结合蛋白 6(IGFBP6)和胰岛素样生长因子 II(IGF-II)选作第一种蛋白质和第二种蛋白质。已知 IGFBP6 是一种对 IGF-II 具有明显结合亲和力的蛋白质。

Renilla 萤光素酶的 cDNA 与 IGFBP6 的 cDNA 相融合，“人源化” GFP cDNA 与 IGF-II cDNA 相融合。融合的 cDNA 转染活细胞，且表达融合蛋白。产生并混合细胞提取物。加入融合的 Renilla 萤光素酶-IGFBP6 蛋白质中的 Renilla 萤光素酶部分的底物。最终，检测由融合的“人源化” GFP-IGF-II 蛋白质中“人源化” GFP 部分发出的荧光。现在更加详细地描述根据本发明显示的一种方法。

A) 克隆融合的 IGFBP-6 cDNA-Renilla 萤光素酶 cDNA、融合的 IGF-II cDNA-“人源化” GFP cDNA 和融合的胰岛素 cDNA-“人源化” GFP cDNA:

首先，生产三种融合的 cDNA: 1) 融合的 IGFBP-6 cDNA 和 Renilla 萤光素酶 cDNA; 2) 融合的 IGF-II cDNA 和“人源化” GFP cDNA; 和 3) 融合的胰岛素 cDNA 和“人源化” GFP cDNA. IGFBP-6 cDNA, SEQ NO:1, Genbank 收录号 M69054, 编码用作第一种蛋白质的 SEQ NO: 2 的 IGFBP-6. Renilla 萤光素酶 cDNA, SEQ NO: 3, Genbank 收录号 M63501, 编码用作供体萤光素酶的 SEQ NO: 4 的 Renilla 萤光素酶. IGF-II cDNA, SEQ NO: 5, 编码用作第二种蛋白质的 SEQ NO: 6 的 IGF-II. “人源化” GFP cDNA, SEQ NO: 7, Genbank 收录号为 U50963, 编码用作受体荧光团的 SEQ NO: 8 的“人源化” GFP. 胰岛素 cDNA, SEQ NO: 9, Genbank 收录号为 AH002844, 编码 SEQ NO: 10 的胰岛素. 与“人源化” GFP 融合的胰岛素用作蛋白质对照，因为胰岛素与 IGF-II 同源，但不与 IGFBP-6 结合. SEQ NO: 1 的 IGFBP-6 cDNA、SEQ NO: 5 的 IGF-II cDNA 和 SEQ NO: 9 的胰岛素 cDNA 用 PCR 如下进行修饰。

首先，将由 EcoRI 片段携带的前原-IGF-II cDNA 克隆进 pBluescript KS(+)II 载体。插入片段由 T₇ 和 T₃ 引物进行测序，确定包

含已知的前原-IGF-II cDNA 序列。IGF-II 前体的 5' 端与 pBluescript KS (+)II 载体中的 T₇ 启动子相连。设计 IGF-II 3' 引物以产生一个允许可察觉的 (Notice of Allowance) 限制性位点, 从而去除前原-IGF-II 的 D 和 E 结构域, 保持“人源化”GFP 的允许可察觉的片段处于 IGF-II 开放阅读框架中。

其次, IGF-II 片段使用 T₇ 启动子引物和 IGF-II 3' 引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增的 IGF-II 片段由 EcoR I 和 Not I 消化, 克隆入 pCDNA 3.1(+) 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国), 产生 pCDNA-IGF-II。然后, “人源化”GFP 的允许可察觉的片段插入 pCDNA-IGF-II 的 Not I 位点, 产生 pC-IGF-II-GFP。

包含 B、C 和 A 结构域信号肽的前体胰岛素的 cDNA 按照以上相应于 IGF-II 片段的方式进行修饰。然后将“人源化”GFP 的 cDNA 连接到修饰的胰岛素 cDNA 之 3' 端相连, 产生 pC-INS-GFP。

最后, 利用 PCR 从一个名为大鼠标记的人 IGFBP6 质粒中扩增 IGFBP6 cDNA。IGFBP6 的终止密码子被去除, 其开放阅读框架符合来自 pCEP4-RVC 的 Renilla 萤光素酶 cDNA 的框架 (Mayerhofer R, Langridge WHR, Cormier MG 和 Szalay AA。重组 Renilla 萤光素酶在转基因植物中的表达导致高水平光发射。植物杂志, 1995; 7; 1031 ~ 8)。将 Renilla 萤光素酶 cDNA 连接到修饰的 IGFBP-6 cDNA 的 3' 末端, 产生 pC-IGFBP6-RUC。

所有构建体中插入 DNA 片段的序列通过 DNA 测试分析所证实。Qiagen Maxi 质粒试剂盒 (Qiagen, Inc., Valencia, CA) 用于纯化质粒 DNA。

B) 用磷酸钙沉淀方法将 pC-IGF-II-GFP、pC-INS-GFP 和 pC-IGFBP 6-RUC 瞬时转染哺乳动物细胞:

紧接着, 用克隆的融合 DNA 转染哺乳动物细胞。首先, COS-7 细胞 (非洲绿猴肾细胞, 美国典型培养物保藏中心 CRL 1651) 在含有 L-谷氨酰胺、10% 胎牛血清和包含终浓度为青霉素 100u/ml、链霉素 100mg/ml 和两性霉素 B 250ng/ml (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO,

美国)的抗霉菌抗生素溶液的 Dulbecco's 改良 Eagle 培养基(DMEM)中 37℃ 于 5% CO₂ 条件下生长。转染前一天将每组 1×10^6 细胞铺板, 转染时约有 50% ~ 60% 的汇集。

每一质粒融合 DNA 40mg 沉淀后用 Dulbecco's 磷酸缓冲盐溶液重悬, 然后用标准的磷酸钙沉淀法将质粒融合 DNA 导入哺乳动物细胞。24 小时后用荧光显微镜估计转染效率。在 pC-IGF-II-GFP DNA 转染细胞的平板、pC-INS-GFP DNA 转染细胞的平板以及用作阳性对照的只包含 GFP 的质粒 DNA 转染的平板中每个平板的绿色荧光细胞数目相类似。

C) 融合蛋白表达的证实

用 DNA 磷酸钙沉淀方法转染 DNA 24 小时以后, 用荧光显微镜通过检测 GFP 荧光可观察到质粒 DNA 转染的单个 COS-7 细胞。pC-IGF-II-GFP 和 pC-INS-GFP 转染的细胞显示出相类似的荧光模式, 即典型的分泌蛋白质从 ER 向高尔基体转移。pC-IGFBP6-RUC 转染的细胞不发荧光。然而, 加入 Coelenterazine 后用低光成像系统显示 pC-IGFBP 6-RUC 转染的细胞发光。

进一步, 预期分子量分别约为 36kDa 和 56kDa 的融合蛋白 IGF-II-GFP 和 IGFBP6-RUC 可用免疫印迹分析法检测。这样可以确证瞬时转染细胞中两种融合蛋白的存在。

D) 通过分光荧光测定法检测蛋白质相互作用:

已经确证了预期融合蛋白 IGF-II-GFP 和 IGFBP 6-RUC 的存在, 以及供体萤光素酶和受体荧光团的功能后, 这些瞬时转染细胞的细胞提取物可用于进行基于融合蛋白 Renilla 萤光素酶部分和“人源化”GFP 部分之间能量传递的蛋白质结合实验。钙转染 48 小时之后, COS 细胞用 PBS 洗 2 次, 然后用细胞刮刀将细胞收获于包含 0.5M NaCl、1mM EDTA 和 0.1M 磷酸钾 (pH7.5) 的萤光素酶分析缓冲液中。收获的细胞用 Fisher 550 型超声破碎仪(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, 美国)以 10 秒间隔进行 3 次 10 秒超声, 以产生细胞提取物。

接着，混合包含 IGF-II-GFP 和 IGFBP 6-RUC 的细胞提取物，立即加入 0.1 μ g coelenterazine。使用 SPEX Fluoro Max[®](仪器 S.A., Inc., Edison, NJ)进行分光荧光测定。光谱表明在 471nm 处有单一发射峰，其相应于已知的 Renilla 萤光素酶发射谱。

在第一次分光荧光测定之后，混合物室温保存 30 分钟，并加入新鲜的 Coelenterazine 重复示踪光谱。30 分钟后示踪显示在 471nm 和 503nm 处有 2 个最大发射峰值。细胞提取物的分光荧光测定进行更长的时间，但光谱模式不随时间发生改变。

作为对照的 pC-INS-GFP 和 pC-IGFBP 6-RUC 转染细胞的提取物混合物按类似方法制备并进行光谱示踪。示踪显示仅在 471nm 处有一个峰，其相应于 Renilla 萤光素酶的发射峰。光谱模式不随时间改变。

因此，这些数据表明 IGFBP-6 和 IGF-II 相互作用而胰岛素与 IGFBP 6 不发生相互作用。

除了以上公开的实施例，蛋白质-蛋白质相互作用也可以使用相应的方法在共转化的大肠杆菌和哺乳动物细胞中通过检测 LRET 进行检测。

尽管本发明已经相当详尽地讨论了有关的优选实施方案，其它实施方案同样可行。例如，除蛋白质以外的分子间相互作用可用相应的方法进行研究。其它分子可以靠扩散、输入和掺入或其他方式提供给活细胞。此外，基因工程化活细胞生产的融合蛋白可在研究相互作用之前进行翻译后修饰，如添加糖部分。同样，使用这些方法通过分光荧光测定法低光成像分析在细胞、集落和组织中观察活细胞。此外，可使用本发明方法结合微滴孔或多阵列检测的细胞分选术和低光成像分析，可完成高通量的集落筛选。因此，附加的权利要求的精髓和范围不应局限于这里包含的优选实施方案的描述。

序列表

<110> Szalay, Aladar A.

Wang, Yubao

Wang-Pruski, Gefu

Loma Linda University

<120> 用于研究蛋白质体内相互作用的方法

<130> 11785-3PCT

<140> 在此提交

<141> 1999-09-02

<150> 60/135,835

<151> 1999-05-24

<150> 60/099,068

<151> 1998-09-03

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 918

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (3) .. (719)

<400> 1

tg tgc ccc cac agg ctg ctg cca ccg ctg ctg ctg ctg cta gct ctg 47
Cys Pro His Arg Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

ctg ctc gct gcc agc cca gga ggc gcc ttg gcg cgg tgc cca ggc tgc 95
Leu Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Ala Leu Ala Arg Cys Pro Gly Cys
20 25 30

ggg caa ggg gtg cag gcg ggt tgt cca ggg ggc tgc gtg gag gag gag 143
Gly Gln Gly Val Gln Ala Gly Cys Pro Gly Gly Cys Val Glu Glu Glu
35 40 45

gat ggg ggg tcg cca gcc gag ggc tgc gcg gaa gct gag ggc tgt ctc 191
Asp Gly Gly Ser Pro Ala Glu Gly Cys Ala Glu Ala Glu Gly Cys Leu

50	55	60	
agg agg gag ggg cag gag tgc ggg gtc tac acc cct aac tgc gcc cca			239
Arg Arg Glu Gly Gln Glu Cys Gly Val Tyr Thr Pro Asn Cys Ala Pro			
65	70	75	
gga ctg cag tgc cat ccg ccc aag gac gac gag gcg cct ttg cgg gcg			287
Gly Leu Gln Cys His Pro Pro Lys Asp Asp Glu Ala Pro Leu Arg Ala			
80	85	90	95
ctg ctg ctc ggc cga ggc cgc tgc ctt ccg gcc cgc gcg cct gct gtt			335
Leu Leu Leu Gly Arg Gly Arg Cys Leu Pro Ala Arg Ala Pro Ala Val			
100	105	110	
gca gag gag aat cct aag gag agt aaa ccc caa gca ggc act gcc cgc			383
Ala Glu Glu Asn Pro Lys Glu Ser Lys Pro Gln Ala Gly Thr Ala Arg			
115	120	125	
cca cag gat gtg aac cgc aga gac caa cag agg aat cca ggc acc tct			431
Pro Gln Asp Val Asn Arg Arg Asp Gln Gln Arg Asn Pro Gly Thr Ser			
130	135	140	
acc acg ccc tcc cag ccc aat tct gcg ggt gtc caa gac act gag atg			479
Thr Thr Pro Ser Gln Pro Asn Ser Ala Gly Val Gln Asp Thr Glu Met			
145	150	155	
ggc cca tgc cgt aga cat ctg gac tca gtg ctg cag caa ctc cag act			527
Gly Pro Cys Arg Arg His Leu Asp Ser Val Leu Gln Gln Leu Gln Thr			
160	165	170	175
gag gtc tac cga ggg gct caa aca ctc tac gtg ccc aat tgt gac cat			575
Glu Val Tyr Arg Gly Ala Gln Thr Leu Tyr Val Pro Asn Cys Asp His			
180	185	190	
cga ggc ttc tac cgg aag cgg cag tgc cgc tcc tcc cag ggg cag cgc			623
Arg Gly Phe Tyr Arg Lys Arg Gln Cys Arg Ser Ser Gln Gly Gln Arg			
195	200	205	
cga ggt ccc tgc tgg tgt gtg gat cgg atg ggc aag tcc ctg cca ggg			671
Arg Gly Pro Cys Trp Cys Val Asp Arg Met Gly Lys Ser Leu Pro Gly			
210	215	220	
tct cca gat ggc aat gga agc tcc tcc tgc ccc act ggg agt agc ggc			719
Ser Pro Asp Gly Asn Gly Ser Ser Ser Cys Pro Thr Gly Ser Ser Gly			
225	230	235	
taaagctggg ggatagaggg gctgcagggc cactggaagg aacatggagc tgtcatcact			779

caacaaaaaa ccgagggccct caatccacct tcaggccccc ccccatgggc ccctcaccgc 839

tggttggaag gagtggtggt gttggctggg gtgtcaataa agctgtgctt ggggtcgctg 899

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 918

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Cys Pro His Arg Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15

Leu Ala Ala Ser Pro Gly Gly Ala Leu Ala Arg Cys Pro Gly Cys Gly
20 25 30

Gln Gly Val Gln Ala Gly Cys Pro Gly Gly Cys Val Glu Glu Glu Asp
35 40 45

Gly Gly Ser Pro Ala Glu Gly Cys Ala Glu Ala Glu Gly Cys Leu Arg
50 55 60

Arg Glu Gly Gln Glu Cys Gly Val Tyr Thr Pro Asn Cys Ala Pro Gly
65 70 75 80

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

Leu Leu Gly Arg Gly Arg Cys Leu Pro Ala Arg Ala Pro Ala Val Ala
100 105 110

Glu Glu Asn Pro Lys Glu Ser Lys Pro Gln Ala Gly Thr Ala Arg Pro
115 120 125

Gln Asp Val Asn Arg Arg Asp Gln Gln Arg Asn Pro Gly Thr Ser Thr
130 135 140

Thr Pro Ser Gln Pro Asn Ser Ala Gly Val Gln Asp Thr Glu Met Gly
145 150 155 160

Pro Cys Arg Arg His Leu Asp Ser Val Leu Gln Gln Leu Gln Thr Glu
165 170 175

Val Tyr Arg Gly Ala Gln Thr Leu Tyr Val Pro Asn Cys Asp His Arg
180 185 190

Gly Phe Tyr Arg Lys Arg Gln Cys Arg Ser Ser Gln Gly Gln Arg Arg
 195 200 205

Gly Pro Cys Trp Cys Val Asp Arg Met Gly Lys Ser Leu Pro Gly Ser
 210 215 220

Pro Asp Gly Asn Gly Ser Ser Ser Cys Pro Thr Gly Ser Ser Gly
 225 230 235

<210> 3

<211> 1196

<212> DNA

<213> *Renilla reniformis*

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(945)

<400> 3

agcttaaag atg act tcg aaa gtt tat gat cca gaa caa agg aaa cgg atg 51
 Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met
 1 5 10

ata act ggt ccg cag tgg tgg gcc aga tgt aaa caa atg aat gtt ctt 99
 Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu
 15 20 25 30

gat tca ttt att aat tat tat gat tca gaa aaa cat gca gaa aat gct 147
 Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala
 35 40 45

gtt att ttt tta cat ggt aac gcg gcc tct tct tat tta tgg cga cat 195
 Val Ile Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His
 50 55 60

gtt gtg cca cat att gag cca gta gcg cgg tgt att ata cca gat ctt 243
 Val Val Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu
 65 70 75

att ggt atg ggc aaa tca ggc aaa tct ggt aat ggt tct tat agg tta 291
 Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu
 80 85 90

ctt gat cat tac aaa tat ctt act gca tgg ttt gaa ctt ctt aat tta 339
 Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu
 95 100 105 110

cca aag aag atc att ttt gtc ggc cat gat tgg ggt gct tgt ttg gca	387
Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala	
115 120 125	
ttt cat tat agc tat gag cat caa gat aag atc aaa gca ata gtt cac	435
Phe His Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His	
130 135 140	
gct gaa agt gta gta gat gtg att gaa tca tgg gat gaa tgg cct gat	483
Ala Glu Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp	
145 150 155	
att gaa gaa gat att gcg ttg atc aaa tct gaa gaa gga gaa aaa atg	531
Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met	
160 165 170	
gtt ttg gag aat aac ttc ttc gtg gaa acc atg ttg cca tca aaa atc	579
Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile	
175 180 185 190	
atg aga aag tta gaa cca gaa gaa ttt gca gca tat ctt gaa cca ttc	627
Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe	
195 200 205	
aaa gag aaa ggt gaa gtt cgt cgt cca aca tta tca tgg cct cgt gaa	675
Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu	
210 215 220	
atc ccg tta gta aaa ggt ggt aaa cct gac gtt gta caa att gtt agg	723
Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg	
225 230 235	
aat tat aat gct tat cta cgt gca agt gat gat tta cca aaa atg ttt	771
Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe	
240 245 250	
att gaa tcg gat cca gga ttc ttt tcc aat gct att gtt gaa ggc gcc	819
Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala	
255 260 265 270	
aag aag ttt cct aat act gaa ttt gtc aaa gta aaa ggt ctt cat ttt	867
Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe	
275 280 285	
tcg caa gaa gat gca cct gat gaa atg gga aaa tat atc aaa tcg ttc	915
Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe	
290 295 300	

```

gtt gag cga gtt ctc aaa aat gaa caa taa ttactttggt tttttattta      965
Val Glu Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
      305                      310

catttttccc gggtttaata atataaatgt cattttcaac aattttattt taactgaata 1025

tttcacaggg aacattcata tatgttgatt aatttagctc gaactttact ctgtcatatc 1085

atattggaat attacctctt tcaatgaaac ttataaaca gtggttcaat taattaatat 1145

atattataat tacatttggt atgtaataaa ctcggtttta ttataaaaaa a          1196

```

<210> 4

<211> 311

<212> PRT

<213> Renilla reniformis

<400> 4

```

Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr
  1              5              10              15

```

```

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
      20              25              30

```

```

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
      35              40              45

```

```

Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
      50              55              60

```

```

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
      65              70              75              80

```

```

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
      85              90              95

```

```

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
      100             105             110

```

```

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His
      115             120             125

```

```

Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu
      130             135             140

```

```

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu

```

145	150	155	160
Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu	165	170	175
Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg	180	185	190
Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu	195	200	205
Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro	210	215	220
Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr	225	230	235
Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu	245	250	255
Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys	260	265	270
Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln	275	280	285
Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu	290	295	300
Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln	305	310	

<210> 5

<211> 543

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(543)

<400> 5

atg gga atc cca atg ggg aag tcg atg ctg gtg ctt ctc acc ttc ttg	48
Met Gly Ile Pro Met Gly Lys Ser Met Leu Val Leu Leu Thr Phe Leu	
1 5 10 15	

gcc ttc gcc tcg tgc tgc att gct gct tac cgc ccc agt gag acc ctg	96
---	----

Ala Phe Ala Ser Cys Cys Ile Ala Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu	
20 25 30	
tgc ggc ggg gag ctg gtg gac acc ctc cag ttc gtc tgt ggg gac cgc	144
Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg	
35 40 45	
ggc ttc tac ttc agc agg ccc gca agc cgt gtg agc cgt cgc agc cgt	192
Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg	
50 55 60	
ggc atc gtt gag gag tgc tgt ttc cgc agc tgt gac ctg gcc ctc ctg	240
Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu	
65 70 75 80	
gag acg tac tgt gct acc ccc gcc aag tcc gag agg gac gtg tcg acc	288
Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Lys Ser Glu Arg Asp Val Ser Thr	
85 90 95	
cct ccg acc gtg ctt ccg gac aac ttc ccc aga tac ccc gtg ggc aag	336
Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys	
100 105 110	
ttc ttc caa tat gac acc tgg aag cag tcc acc cag cgc ctg cgc agg	384
Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg Leu Arg Arg	
115 120 125	
ggc ctg cct gcc ctc ctg cgt gcc cgc cgg ggt cac gtg ctc gcc aag	432
Gly Leu Pro Ala Leu Leu Arg Ala Arg Arg Gly His Val Leu Ala Lys	
130 135 140	
gag ctc gag gcg ttc agg gag gcc aaa cgt cac cgt ccc ctg att gct	480
Glu Leu Glu Ala Phe Arg Glu Ala Lys Arg His Arg Pro Leu Ile Ala	
145 150 155 160	
cta ccc acc caa gac ccc gcc cac ggg ggc gcc ccc cca gag atg gcc	528
Leu Pro Thr Gln Asp Pro Ala His Gly Gly Ala Pro Pro Glu Met Ala	
165 170 175	
agc aat cgg aag tga	543
Ser Asn Arg Lys	
180	

<210> 6

<211> 180

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Met Gly Ile Pro Met Gly Lys Ser Met Leu Val Leu Leu Thr Phe Leu
 1 5 10 15

Ala Phe Ala Ser Cys Cys Ile Ala Ala Tyr Arg Pro Ser Glu Thr Leu
 20 25 30

Cys Gly Gly Glu Leu Val Asp Thr Leu Gln Phe Val Cys Gly Asp Arg
 35 40 45

Gly Phe Tyr Phe Ser Arg Pro Ala Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg
 50 55 60

Gly Ile Val Glu Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Ala Leu Leu
 65 70 75 80

Glu Thr Tyr Cys Ala Thr Pro Ala Lys Ser Glu Arg Asp Val Ser Thr
 85 90 95

Pro Pro Thr Val Leu Pro Asp Asn Phe Pro Arg Tyr Pro Val Gly Lys
 100 105 110

Phe Phe Gln Tyr Asp Thr Trp Lys Gln Ser Thr Gln Arg Leu Arg Arg
 115 120 125

Gly Leu Pro Ala Leu Leu Arg Ala Arg Arg Gly His Val Leu Ala Lys
 130 135 140

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

Leu Pro Thr Gln Asp Pro Ala His Gly Gly Ala Pro Pro Glu Met Ala
 165 170 175

Ser Asn Arg Lys
 180

<210> 7

<211> 717

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (717)

<223> 人工序列描述: 人源化绿色荧光蛋白质 cDNA

<400> 7

```

atg agc aag ggc gag gaa ctg ttc act ggc gtg gtc cca att ctc gtg   48
Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
   1             5             10            15

gaa ctg gat ggc gat gtg aat ggg cac aaa ttt tct gtc agc gga gag   96
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
          20            25            30

ggt gaa ggt gat gcc aca tac gga aag ctc acc ctg aaa ttc atc tgc  144
Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
        35            40            45

acc act gga aag ctc cct gtg cca tgg cca aca ctg gtc act acc ttc  192
Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
        50            55            60

tct tat ggc gtg cag tgc ttt tcc aga tac cca gac cat atg aag cag  240
Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
        65            70            75            80

cat gac ttt ttc aag agc gcc atg ccc gag ggc tat gtg cag gag aga  288
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
          85            90            95

acc atc ttt ttc aaa gat gac ggg aac tac aag acc cgc gct gaa gtc  336
Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
        100            105            110

aag ttc gaa ggt gac acc ctg gtg aat aga atc gag ctg aag ggc att  384
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
        115            120            125

gac ttt aag gag gat gga aac att ctc ggc cac aag ctg gaa tac aac  432
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
        130            135            140

tat aac tcc cac aat gtg tac atc atg gcc gac aag caa aag aat ggc  480
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
        145            150            155            160

atc aag gtc aac ttc aag atc aga cac aac att gag gat gga tcc gtg  528
Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
          165            170            175

```

cag ctg gcc gac cat tat caa cag aac act cca atc ggc gac ggc cct 576
 Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 180 185 190

gtg ctc ctc cca gac aac cat tac ctg tcc acc cag tct gcc ctg tct 624
 Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
 195 200 205

aaa gat ccc aac gaa aag aga gac cac atg gtc ctg ctg gag ttt gtg 672
 Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
 210 215 220

acc gct gct ggg atc aca cat ggc atg gac gag ctg tac aag tga 717
 Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 225 230 235

<210> 8

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 8

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
 50 55 60

Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
145 150 155 160

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val
165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser
195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val
210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
225 230 235

<210> 9

<211> 333

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(333)

<400> 9

atg gcc ctg tgg atg cgc ctc ctg ccc ctg ctg gcg ctg ctg gcc ctc 48
Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
1 5 10 15

tgg gga cct gac cca gcc gca gcc ttt gtg aac caa cac ctg tgc ggc 96
Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
20 25 30

tca cac ctg gtg gaa gct ctc tac cta gtg tgc ggg gaa cga ggc ttc 144
Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe
35 40 45

ttc tac aca ccc aag acc cgc cgg gag gca gag gac ctg cag gtg ggc 192
Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
50 55 60

cag gtg gag ctg ggc ggg ggc cct ggt gca ggc agc ctg cag ccc ttg 240
 Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
 65 70 75 80

gcc ctg gag ggg tcc ctg cag aag cgt ggc att gtg gaa caa tgc tgt 288
 Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 85 90 95

acc agc atc tgc tcc ctc tac cag ctg gag aac tac tgc aac tag 333
 Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100 105 110

<210> 10

<211> 110

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly
 20 25 30

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

Phe Tyr Thr Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly
 50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu
 65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys
 85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
 100 105 110