

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98813321.0

[51] Int. Cl.

C12N 15/21 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/66 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 7 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1325645C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/35 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A23L 1/015 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

[22] 申请日 1998.11.26 [21] 申请号 98813321.0

[30] 优先权

[32] 1997.11.26 [33] GB [31] 9725046.8

[32] 1998.6.26 [33] GB [31] 9813917.3

[86] 国际申请 PCT/GB1998/003530 1998.11.26

[87] 国际公布 WO1999/027104 英 1999.6.3

[85] 进入国家阶段日期 2000.7.26

[73] 专利权人 发展技术有限公司

地址 英国牛津

[72] 发明人 P·A·纳塔尔 G·C·佩森

[56] 参考文献

CN1225683 1997.5.19

WO9611271A 1996.4.18

WO9744451A2 1997.5.19

审查员 欧阳石文

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 谭明胜

权利要求书 3 页 说明书 34 页 附图 31 页

[54] 发明名称

组胺及血清素结合分子

[57] 摘要

本发明涉及血清素结合分子，该分子拥有具有为该分子提供组胺高亲和力所必需的精确分子构象的结合位点。本发明包括具有此种分子构象因而以高亲和力与组胺结合的蛋白，肽和化学复合物，这些分子可用于组胺和血清素活动的调节，组胺和血清素的检测和定量，以及治疗多种疾病和变应反应，该分子可用作针对吸血性体表寄生虫的疫苗的组分。

1. 一种血清素结合化合物在制备用于治疗或预防与血清素有关的疾病状况的药物中的用途,

其中所述疾病状况是血压异常、偏头痛、心理障碍、呼吸系统疾病或冠心病, 并且

其中所述血清素结合化合物是包含图 1、图 2、图 3 或图 4 中的氨基酸序列的蛋白、或含有图 1-4 的序列的氨基酸取代、插入或缺失的所述蛋白之一的变体,

其中所述化合物能够以小于 $10^{-7}M$ 的解离常数与血清素结合, 并且具有一个位置 I 所含氨基酸残基为苯丙氨酸、异亮氨酸或亮氨酸, 位置 II 所含氨基酸残基为色氨酸, 位置 III 和位置 IV 所含氨基酸残基为天冬氨酸或谷氨酸的结合位点, 其中 I-IV 残基的定位基本上各自相同于图 1 或 2 中的第 108、42、39 和 82 位残基, 或图 3 中的第 107、41、38 和 78 位残基或图 4 中的第 122、54、50 和 95 位残基, 其中氨基酸残基的编号指缺乏前导序列的成熟蛋白质序列。

2. 一种血清素结合化合物在制备用于治疗或预防与血清素有关的疾病状况的药物中的用途,

其中所述疾病状况是血压异常、偏头痛、心理障碍、呼吸系统疾病或冠心病, 并且

其中所述血清素结合化合物是包含图 1、图 2、图 3 或图 4 中的氨基酸序列的蛋白、或含有图 1-4 的序列的氨基酸取代、插入或缺失的所述蛋白之一的变体,

其中所述化合物能够以小于 $10^{-7}M$ 的解离常数与血清素结合, 并且具有一个位置 I 所含氨基酸残基为苯丙氨酸或异亮氨酸, 位置 II 所含氨基酸残基为色氨酸, 位置 III 和位置 IV 所含氨基酸残基为天冬氨酸或谷氨酸的结合位点, 其中 I-IV 残基的定位基本上各自相同于图 1 或 2 中的第 98、137、24 和 120 位残基, 或图 3 中的第 95、138、23 和 120 位残基或图 4 中的第 112、149、35 和 135 位残基, 其中氨基酸残基的编号指缺乏前导序列的成熟蛋白质序列。

3. 一种血清素结合化合物在制备治疗或预防与血清素有关的疾病状况的药物中的用途,

其中所述疾病状况是血压异常、偏头痛、心理障碍、呼吸系统疾病或冠心病，并且

其中所述血清素结合化合物是包含图 1、图 2、图 3 或图 4 中的氨基酸序列的蛋白、或含有图 1-4 的序列的氨基酸取代、插入或缺失的所述蛋白之一的变体，

其中所述化合物能够以小于 10^{-7} M 的解离常数与血清素结合并且具有两个结合位点，第一结合位点的位置 I 所含氨基酸残基为苯丙氨酸、异亮氨酸或亮氨酸，位置 II 所含氨基酸残基为色氨酸，位置 III 和位置 IV 所含氨基酸残基为天冬氨酸或谷氨酸，其中 I-IV 残基的定位基本上各自相同于图 1 或 2 中的第 108、42、39 和 82 位残基，或图 3 中的第 107、41、38 和 78 位残基或图 4 中的第 122、54、50 和 95 位残基，第二结合位点的位置 I 所含氨基酸残基为苯丙氨酸或异亮氨酸，位置 II 所含氨基酸残基为色氨酸，位置 III 和位置 IV 所含氨基酸残基为天冬氨酸或谷氨酸，其中 I-IV 残基的定位基本上各自相同于图 1 或 2 中的第 98、137、24 和 120 位残基，或图 3 中的第 95、138、23 和 120 位残基或图 4 中的第 112、149、35 和 135 位残基，其中氨基酸残基的编号指缺乏前导序列的成熟蛋白质序列。

4. 权利要求 1 或 3 的用途，其中所述化合物另外在残基 V 包含一个酪氨酸残基，其中残基 V 的定位基本上相同于图 1 或 2 的序列中的第 100 位残基，或图 3 中的第 97 位残基或图 4 中的第 114 位残基，其中氨基酸残基的编号指缺乏前导序列的成熟蛋白质序列。

5. 权利要求 2 或 3 的用途，其中所述化合物另外在残基 V 包含一个酪氨酸残基，其中残基 V 的定位基本上相同于图 1 或 2 的蛋白序列中的第 29 位残基，或图 3 中的第 28 位残基或图 4 中的第 40 位残基，其中氨基酸残基的编号指缺乏前导序列的成熟蛋白质序列。

6. 权利要求 1-3 中任意一项的用途，其中所述化合物被图 1 或 2 的蛋白序列中的第 48 和 169 位半胱氨酸之间以及第 148 和 119 位半胱氨酸之间形成的二硫键，或图 3 中的第 47 和 175 位半胱氨酸之间以及第 151 和 119 位半胱氨酸之间形成的二硫键，或图 4 中的第 162 和 134 位半胱氨酸之间形成的二硫键中的二者或二者之一所稳定，其中氨基酸残基的编号指缺乏前导序列的成熟蛋白质序列。

7. 权利要求 1-3 中任意一项的用途, 其中所述血清素结合化合物由重组 DNA 技术产生。

8. 权利要求 1-3 中任意一项的用途, 其中所述血清素结合化合物具有一种附着于其上的效应分子或报道分子。

9. 权利要求 1-3 中任意一项的用途, 其中所述血清素结合化合物来自壁虱。

10. 权利要求 9 的用途, 其中所述血清素结合化合物来自硬蜱壁虱。

11. 权利要求 9 的用途, 其中所述血清素结合化合物来自 *Rhipicephalus appendiculatus*、*D. reticulatus*、*Amblyomma variegatum*、*Boophilus microplus* 或 *Ixodes hexagonus*。

12. 权利要求 1-3 中任意一项的用途, 其中所述血清素结合化合物通过遗传学方法或化学方法与一种或多种肽或多肽融合。

13. 权利要求 1-3 中任意一项的用途, 其中所述血清素结合化合物与一种标记或毒素相连。

14. 权利要求 1-3 中任意一项的用途, 其中所述血清素结合化合物与一种支持物相结合。

15. 一种用于治疗或诊断选自血压异常、偏头痛、心理障碍、呼吸系统疾病或冠心病的疾病状况的治疗或诊断组合物, 该组合物包含权利要求 1-14 的任一项中指出的血清素结合化合物, 另外包含有血清素。

16. 权利要求 15 的治疗或诊断组合物, 该组合物另外包含半胱氨酰白细胞三烯、血小板激活因子, 或血栓烷。

组胺及血清素结合分子

本发明涉及组胺及血清素结合分子。更详细而言，本发明涉及的分子具有一种有精确分子构型的结合位点，这种构型是赋予分子对组胺的高亲合性所必需的。那些具有这种分子构型，从而能够以高亲合力与组胺结合的蛋白、肽和化合物均作为本发明的实施方案而被包括在内。本发明所述分子可用于组胺或血清素的功能调节，从而可有效用于组胺或血清素的检测和定量以及各种疾病和过敏反应的治疗。

血管活性胺，如组胺和血清素，是包括人类在内的各种动物体内的炎症介体和某些生理过程的调节剂。组胺存在于肥大细胞和嗜碱细胞的分泌颗粒中，由组氨酸经脱羧形成。另外，组胺也存在于麦角和植物中，可由组氨酸或柠檬酸合成。

组胺在人体内的主要功能是刺激胃液分泌，使大多数平滑肌组织收缩，刺激心脏，使血管舒张并提高血管通透性。组胺除了在免疫反应和炎症过程中具有调节作用外，还可调节体内多种细胞因子的产生（包括调节炎症的那些细胞因子），并影响细胞因子受体的表达。此外，组胺可促进伤口愈合。

组胺的主要病理生理学作用是作为胃酸分泌的刺激物和诸如荨麻疹及花粉热等 I 型过敏性反应的介体。组胺及其受体还具有病理学方面的功能。它们在诸如哮喘、过敏性鼻炎、遗传过敏性皮炎以及食物和药物过敏反应等多种过敏反应中具有极为重要的作用，这些过敏反应可使许多人受到影响，并且是导致疾病和死亡的重要原因。组胺或其受体还直接或间接参与关节炎等自身免疫疾病以及肿瘤生长(Falus, 1994)。

血清素激素（亦称为 5-羟色胺）既是一种血管收缩剂，也是一种神经递质。它还能提高血管的通透性，引起毛细血管扩张及非血管性平滑肌的收缩。血清素存在于脑组织和肠组织中，由松果体及血小板产生。与血清素有关的病理现象包括血压异常、偏头痛、心理障碍、呼吸系统疾病和冠心病等方面。血清素显效药及拮抗药可用于其中某些病症的治疗，但又常具有不良的副作用。

抗组胺剂目前被广泛使用，尤其是用于过敏反应的治疗。这些药物大多是结构上与组胺相关，并且能够与其受体结合，从而阻断组胺与其受体相互作用的化合物。目前可利用的这些药物常具有不良副作用（如嗜睡），而且并不总是有效。

组胺是通过对特异组胺受体的作用而发挥其功能，利用选择性拮抗药和显效药可把这些受体区分为 H_1 、 H_2 和 H_3 三种主要类型。组胺 H_1 和 H_2 拮抗药具有临床用途，但组胺 H_3 拮抗药目前仅主要用作研究工具。胞内组胺似乎可参与细胞生长（促进肿瘤生长）和组织修复。一些目前未确定的胞内组胺受体被认为参与了这些过程（Falus, 1994）。

多年来，组胺受体一直是研究的焦点课题。但所获得的有关这些分子中活性位点结构的信息依然欠缺—— H_3 受体事实上还仍未克隆出来。这些蛋白的任何直接结构信息的缺乏原因可能是由于组胺受体蛋白属于膜蛋白，它们在没有脂类的情况下会变性，因此使之结晶异常困难。

H_1 和 H_2 型受体属于包括七种 G 蛋白偶联跨膜受体的广泛类型，在此基础上可设想它们主要为 α -螺旋。针对这些受体所进行的许多定点诱变研究表明，某些残基对组胺结合至关重要。在 H_2 受体中，Asp¹¹、Asp¹¹⁶ 和 Thr¹¹⁰ 被认为在组胺结合袋中发挥作用（Gantz 等., 1992）。

传统的 H_1 受体拮抗药作为抗组胺剂被广泛用于诸如过敏性鼻炎（花粉热）、荨麻疹、昆虫咬伤和药物过敏等过敏反应的治疗。不具有镇静作用或毒蕈碱受体拮抗作用的药物为优选药物。 H_1 受体拮抗药还作为止吐药用于运动病或严重早孕反应等其它恶心成因的预防。某些抗组胺剂的毒蕈碱受体拮抗作用可能会提高疗效，但也可引起副作用。一些 H_1 受体拮抗药属于很强的镇静剂，并且可就此功效加以应用。

但是，目前使用的 H_1 受体拮抗药具有许多不良作用。当纯粹使用其抗组胺功能时，所有的 CNS 影响都是多余的。当使用其镇静或止吐作用时，诸如头晕、耳鸣和疲劳等某些 CNS 影响则是不必要的。剂量过多可导致儿童兴奋并引起抽搐。其外周抗毒蕈碱作用都是不必要的。其中最常见的是口干，但也可产生视力模糊、便秘及尿潴留等。此外还可见到一些与药物的药理学作用无关的不必要影响。因此，出现

胃肠道失调非常普遍，而局部使用这些药物还可引起过敏性皮炎。

H₂拮抗药常用作胃酸分泌的抑制剂。它们被用作胃溃疡治疗的特选药以及佐-埃综合症治疗的二线药物，并且还用于逆流食道炎的治疗。已报道的副作用包括腹泻、头晕、肌肉疼痛、短暂性疹和高胃泌素血症等。一些 H₂受体拮抗药可在男人中引起男子女性型乳房，在老年人中则引起精神错乱。

除这些副作用之外，某些组胺拮抗药若与酒精或药物共用时会带来麻烦。例如，抗组胺剂特非那定 (Seldane) 与抗生素和抗真菌药结合使用会引起致命的副作用。

由此可看出，用于调控组胺功能的药物并非总是有效的。其疗效有限的原因可能与它们仅特异识别某一亚类的组胺受体有关，尤其当某类病情需要对更多类型的受体加以干预时显得更为明显。能够与组胺本身真正结合的分子将与所有受体竞争结合组胺，因而能够更适合于某些病情的治疗。

因此，我们非常需要一些有效的组胺及血清素拮抗剂，它们能够不产生使其在人类和动物病症治疗中的应用性降低的副作用。

我们也非常需要将例如食品、各种体液（如血浆或尿）或细胞培养物上清液中的组胺加以定量，以监控如某些变应原的影响，或找到一种用于过敏反应的潜在特异拮抗疗法。目前使用的系统（放射免疫分析和 ELISAs）均采用抗组胺或组胺衍生物的抗体。但组胺的免疫原性并不强，从而难以产生高亲和力的抗组胺抗体，而目前使用的大多数定量系统都不太灵敏，或是需要将所测组胺加以修饰（如甲基化或酰化）。在这些测试中采用能够与天然组胺结合的分子来代替抗体将可提供一种测定未修饰组胺的高灵敏系统。与此类似，能够与血清素结合的分子可用于血清素的定量。

在此之前，已从食血外寄生虫中鉴定出能够与组胺结合的分子。例如，在锥蝱 *Rhodnius prolixus* 中发现一种唾液性氧化氮运载血蛋白（载硝基蛋白）可与组胺结合 (Ribeiro and Walker, 1994)。在由本发明申请人拥有的共同未决的国际专利申请号 PCT/GB97/01372 中对从壁虱中分离四种血管活性胺结合蛋白 (VABPs) 进行了描述。本申请则将 PCT/GB97/01372 的内容全面包括在内。

这些蛋白可与组胺结合，并且相互之间联系密切。它们被命名为 MS-HBP1、FS-HBP1、FS-HBP2 和 D.RET6。这些分子中有些还能够结合血清素（如 FS-HBP2）。在其它情况下，例如 D.RET6，与血清素的结合被认为可改变分子与组胺的亲合力。编码这些蛋白的 DNA 序列目前被用于从同一科的不同物种中分离其它相关蛋白。

这些分子看来与 H₁、H₂ 或 H₃ 家族的任何组胺结合蛋白有着明显的不同，并且似乎以不同的方式与组胺结合。阐明这些分子中组胺结合位点的结构会显著加快有效的组胺拮抗药的合理设计，这些拮抗药可不产生传统抗组胺剂所具有的那些副作用。

发明简述

第一方面，本发明提供了一种组胺或血清素结合化合物（binding compound），该化合物能够以小于 10^{-7} M 的解离常数与组胺或血清素结合，并且具有一个位置 I 所含氨基酸残基为苯丙氨酸、异亮氨酸或亮氨酸，位置 II 所含氨基酸残基为色氨酸，位置 III 和位置 IV 所含氨基酸残基为天冬氨酸或谷氨酸的结合位点或其功能等价物，其中 I-IV 残基的定位基本上各自相同于序列鉴定号 1 或 2 中的第 108、42、39 和 82 位残基，或序列鉴定号 3 中的第 107、41、38 和 78 位残基或序列鉴定号 4 中的第 122、54、50 和 95 位残基。下文中将该结合位点称为“第一结合位点”。序列鉴定号 1-4 所确定的蛋白则分别称为 FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP 和 D.RET6。

第二方面，本发明提供了一种组胺或血清素结合化合物，该化合物能够以小于 10^{-7} M 的解离常数与组胺或血清素结合，并且具有一个位置 I 所含氨基酸残基为苯丙氨酸或异亮氨酸，位置 II 所含氨基酸残基为色氨酸，位置 III 和位置 IV 所含氨基酸残基为天冬氨酸或谷氨酸的结合位点或其功能等价物，其中 I-IV 残基的定位基本上各自相同于序列鉴定号 1 或 2 中的第 98、137、24 和 120 位残基，或序列鉴定号 3 中的第 95、138、23 和 120 位残基或序列鉴定号 4 中的第 112、149、35 和 135 位残基。下文中将该结合位点称为“第二结合位点”。

第三方面，本发明提供了一种组胺或血清素结合化合物，该化合物能够以小于 10^{-7} M 的解离常数与组胺或血清素结合，并且同时含有上

文所述的第一及第二结合位点或其功能等价物。就某些同时含有第一及第二结合位点的组胺结合化合物（如 D. RET6）而言，与血清素的结合被认为可改变该化合物与组胺的亲合力。

与血清素的功能相关的其它化合物同样可影响组胺与同时含有第一及第二结合位点的组胺结合化合物的结合。这些相关化合物包括半胱氨酰白细胞三烯（如白细胞三烯 D₄ 和白细胞三烯 E₄）、血小板激活因子及血栓烷。

第四方面，本发明提供了一种组胺或血清素结合化合物，该化合物能够以小于 10^{-7} M 的解离常数与组胺或血清素结合，并且含有 D. RET6（序列鉴定号 4）序列或其片段，且同时含有上文所述的第一及第二结合位点或其功能等价物，其中化合物与血清素的结合可增加其与组胺的亲合力。

就结合位点而言，其含义是指化合物中对组胺或血清素分子的结合起直接作用的特定区域。其中，结合于该位点包括结合位点和组胺或血清素分子间的分子识别事件，它由形状、大小、电荷、氢键、疏水性和 π 相互作用以及范德华力的功能互补性加以调控。相互作用还可包括化学共价键。

就术语“功能等价物”而言，其含义是指具有所需结合位点的化合物，并且该化合物包括任何能够以 10^{-7} M 或更小的解离常数与组胺或血清素结合，且形状互补性与序列鉴定号 1-4 中任意一种确定的组胺或血清素结合分子结合位点的形状互补性相等价的大分子或分子实体。功能等价的形状互补性可由定位与文中公开的结构基本相同的任何氢原子、氧原子、磷原子和氮原子提供。

直到最近，对特定分子具有亲和力的化合物的产生方法仍比较原始。但组合化学观念和组合库形成的高速发展使具有所需特性的分子的合理设计和改良更加容易。这些技术可用来产生具有相同或相似于文中确定的组胺或血清素结合位点的分子。

通过合理设计，利用如标准合成技术，并结合分子模拟和计算机可视化程序可产生这些化合物。借助这些技术可将具有与组胺或血清素结合位点相类似结构的“引导”化合物通过加入不同的支架和取代基组件而加以优化。

作为选择,也可利用组合化学通过在支架周围产生同类组合排列来创造或改进模拟组胺或血清素结合化合物中组胺或血清素结合位点的化合物的结构,这是以结构为导向的分子实体设计的步骤之一。这些步骤可能包括利用固相裂解及重组方法进行肽或有机分子的标准合成,或利用固相或溶液技术进行类似组合单位的合成(例如,见 Hogan, 1997 及其引用的参考文献)。

作为选择,功能等价物可包括图 1-4 确定的蛋白的片段或变体,或具有显著序列同源性的紧密相关蛋白,这是本发明所述组胺或血清素结合分子的一部分。就片段而言,其含义是仍保持以 10^{-7} M 或更小的解离常数与血管活性胺相结合能力的整个蛋白序列的任意部分。因此,从蛋白的任一端或一级氨基酸序列的内部链上缺失单个或多个氨基酸的片段亦构成本发明的一个方面。变体则包括,例如,图 1-4 所示野生型序列的包含氨基酸替代、插入或缺失的突变型。

本领域的技术人员将了解,文中明确指定的四种蛋白中对结合血管活性胺起作用的残基都保留在蛋白构架中与组胺或血清素结合的相应位置上。因此,蛋白的构架残基决定结合氨基酸的确切位置。

因此,能够在组胺或血清素结合所必需的位置处保留这些氨基酸侧链的所有分子构架都可被认为适合于本发明所述的应用。通过连接基团和连接键而保持一种精确构架的环肽将尤其适合。这些氨基酸侧链保持的位置与天然组胺或血清素结合化合物的组胺或血清素结合位点中的位置基本相同。优选的环肽包含 6-30 个氨基酸,更优选的则包含 8-20 个氨基酸。尤其适合的为环状八肽 Ala-Glu-Ala-Phe-Ala-Glu-Ala-Trp。

利用噬菌体文库可产生具有本发明所述组胺或血清素结合位点的生物活性肽。编码那些被确定参与组胺或血清素结合的氨基酸残基的核酸可与编码周围的构架残基的核酸相融合,使多肽单位具有 10-1000 个残基,优选的为 25-100 个残基。通过将该核酸片段与编码一种噬菌体蛋白,如 fd 噬菌体的 pIII 蛋白,的核酸相融合,可使融合分子出现在噬菌体的表面。利用组胺或血清素筛选噬菌体文库可鉴定出那些所需的克隆。然后可对这些克隆进行反复诱变和筛选,以提高所产生的分子对组胺或血清素的亲合力。

与组胺或血清素结合位点所含残基的物理性质相似的残基也可用来构成本发明所述分子的一部分。例如，就蛋白 FS-HBP2 而言，序列中第 39 位和第 82 位可以是谷氨酸或天冬氨酸这两种带电残基中的任意一种。如果结合位点的分子构型能够满足其空间排列问题，那么可考虑用任意一种疏水性氨基酸来占据序列的第 108 位。该位置的优选残基则是苯丙氨酸、异亮氨酸和亮氨酸。第 42 位的优选残基为色氨酸。

此外，组胺结合化合物序列第 100 位的优选残基为酪氨酸。该分子被认为可稳定结合位点上的组胺。在此位置保持该氨基酸侧链或其等价物的任何一种分子结构亦构成本发明的一个方面。

由于文中明确描述的四种蛋白具有不同的长度和序列，因而各蛋白间的残基计数方法也不相同。但参照图 22 的序列对比可一目了然，图中的残基编号与按照 FS-HBP2 序列的编号相对应。

可以预见，结构中出现二硫键可稳定本发明所述的蛋白。例如，在 FS-HBP2 第 48、169、119 和 148 位发现的半胱氨酸在迄今为止发现的所有四种组胺结合蛋白中都是保守的。FS-HBP2 中可形成两个二硫键，一个在第 48 和 169 位半胱氨酸之间，另一个在第 148 和 119 位半胱氨酸之间。因此，对任何设计用来模拟天然组胺或血清素结合化合物的结合位点结构的蛋白片段而言，其序列中都可出现这些半胱氨酸残基，以使蛋白结构内部可形成一个二硫键，或两个都形成。

优选而言，除本发明所述化合物能够以高亲和力与组胺或血清素结合之外，这种结合现象对组胺或血清素还具有特异性。对本领域的技术人员而言，这种特异性为化合物所带来的优势是显而易见的。例如，当用作药物或用于溶液中组胺含量的定量时，本发明所述化合物不与组胺以外的其它化合物结合则显得至关重要。当用作药物时，缺乏特异性可导致不必要的副作用；而用于组胺定量时，非特异性将会产生误导和不太精确的结果。

第五方面，本发明提供了一种蛋白，该蛋白包含序列鉴定号 5 所示氨基酸序列。该序列编码一种名为 Ra-Res 的 *Rhipicephalus appendiculatus* 唾液蛋白。其一级序列由利用已产生抗 *R. appendiculatus* 壁虱抗性的豚鼠抗血清筛选 *R. appendiculatus* 唾液腺 cDNA 文库所得到的 cDNA 推断而来。

第六方面，本发明提供了一种蛋白，该蛋白包含序列鉴定号 6 所示氨基酸序列。该序列编码一种名为 Av-HBP、来自 *Amblyomma variegatum* 蜱的蛋白。组胺结合研究的初步结果提示其平衡解离常数 (Kd) 为 7.3 nM。

第七方面，本发明提供了一种蛋白，该蛋白包含序列鉴定号 7 或序列鉴定号 8 所示的氨基酸序列。这些序列分离自 *Boophilus microplus*/*Ixodes hexagonus* 混合 cDNA 表达文库，分别编码名为 Ih/Bm-HBP1 和 Ih/Bm-HBP2 的蛋白。文库筛选所采用的探针是利用基于 *R. appendiculatus* HBPs (FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP1 和 D. RET6) 的保守区域而设计的简并引物，由 *Boophilus microplus*/*Ixodes hexagonus* 唾腺 RNA 的 RT-PCR 产物构建而来。

第八方面，本发明提供了一种蛋白，该蛋白包含序列鉴定号 9、序列鉴定号 10 或序列鉴定号 11 所示的氨基酸序列。这些序列分别编码名为 Ih/Bm-HBP3、Ih/Bm-HBP4 和 Ih/Bm-HBP5 的蛋白。这些序列同样分离自上述的 *Boophilus microplus*/*Ixodes hexagonus* 混合 cDNA 表达文库。其序列与 *R. appendiculatus* HBPs (FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP1 和 D. RET6) 有明确的序列相似性，但也包含传统序列中不曾出现的大量区域 (见图 22)。

本领域的技术人员都将了解，本发明包括序列鉴定号 6-11 所示蛋白序列的功能等价衍生物和片段。本文中使用的“功能等价物”是指保持血管活性胺结合能力，或包含的抗原决定簇可用于产生针对 Ra-Res、Av-HBP、Ih/Bm-HBP1、Ih/Bm-HBP2、Ih/Bm-HBP3、Ih/Bm-HBP4 或 Ih/Bm-HBP5 中任意一种蛋白的抗体疫苗的衍生物或片段。衍生物的来源可以是这些蛋白野生型序列的单个或多个氨基酸的取代、添加、插入和/或缺失，或单个或多个氨基酸的化学修饰，如糖基化形式的脱糖基化。

本发明还包括与 Ra-Res、Av-HBP、Ih/Bm-HBP1、Ih/Bm-HBP2、Ih/Bm-HBP3、Ih/Bm-HBP4 或 Ih/Bm-HBP5 属于同一家族的蛋白。若一种蛋白与这些蛋白中的任意一种有 40% 或更多的氨基酸序列为保守的，那么则认为该蛋白与其属于同一家族。例如，用 GCG 的 pileup 指令即能够以这种方式对蛋白进行比较 (Wisconsin 软件包程序手册，

1994; 缺口产生扣分 = 2.50; 缺口延伸扣分 = 0.05)。

本发明这些方面的蛋白将包括产生这些蛋白的物种体内的天然生物变体或地理变体。

例如, 衍生物中可包含一段融合于这些蛋白之一的氨基端或羧基端或加入序列内部的附加蛋白或多肽。附加多肽的目的可以是辅助蛋白的检测、表达、分离或纯化, 或是给蛋白附加上所需性质。

设计用来模拟 Ra-Res、Av-HBP、Ih/Bm-HBP1、Ih/Bm-HBP2、Ih/Bm-HBP3、Ih/Bm-HBP4 或 Ih/Bm-HBP5 蛋白的三级结构或活性位点的合成分子构成本发明的另一方面。

在多种应用过程中, 本发明所述化合物可与一种效应分子或报道分子, 如标记分子、毒素分子或生物活性分子, 相融合。这些分子可包含一段融合于组胺或血清素结合化合物的氨基端或羧基端或添加于内部的附加蛋白或多肽。附加多肽的目的可以是辅助组胺或血清素结合化合物的检测、表达、分离或纯化, 或是给化合物附加上所需性质。

特别适合于融合的选择物有荧光素酶、绿色荧光蛋白或辣根过氧化物酶等报道分子。精选的标记则是可利用光谱方法检测的放射性标记或分子, 如荧光或磷光化学基团。另外也可采用链霉抗生物素蛋白或生物素等连接分子。此外, 还有其它肽或多肽可与组胺或血清素结合化合物相融合。合适的肽有, 例如, β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽-S-转移酶、荧光素酶、多聚组氨酸标记、分泌型信号肽、抗体的 Fc 区域、FLAG 肽、纤维素结合区、钙调蛋白以及麦芽糖结合蛋白。可使组胺或血清素结合化合物更有效地靶向某个功能位点的抗体或肽(例如抗肥大细胞膜蛋白的抗体)也可与组胺或血清素结合化合物相融合。

这些融合分子可利用化学交联等方法加以化学融合。对本领域的技术人员而言, 哪些为适当的方法则是众所周知的, 这些方法包括, 例如, 半胱氨酸残基的巯基交联或通过甲醛交联。在大多数情况下, 如环肽及标记等非蛋白化合物的融合将采用化学交联方法。

当要融合两种蛋白分子时, 常采用遗传学方法作为融合分子的精选方法。为产生重组融合蛋白, 可设计编码所需蛋白或蛋白片段的基因或部分基因以形成一种经排列可使两种基因序列的密码子以同一框架进行转录的连续基因。

本发明所述化合物还包括与一种支持物结合的组胺或血清素结合化合物，该支持物可用来去除、分离或提取身体组织、血液或食品中的组胺或血清素。该支持物可包含任何适当的情性材料，如凝胶、磁性小珠和其它小珠、微球体、结合柱以及树脂等。

如果组胺或血清素结合化合物属于蛋白质，那么它们可来自任何含有与目前确认的组胺或血清素结合化合物属于同一蛋白家族的蛋白的生物。就蛋白家族而言，其含义是指均具有一种共同功能，并且在多肽序列的基序之间有共同序列同源性的一组多肽。就序列同源性而言，其含义是多肽序列是由共同祖先趋异而来的相关序列。

优选的蛋白或蛋白片段来自食血外寄生虫、蜘蛛、蝎子或蛇或其它分泌毒液的动物。更优选的蛋白或蛋白片段来自壁虱，最优选的则来自诸如 *Rhipicephalus appendiculatus* 等硬蜱壁虱。

最优选而言，本发明所述蛋白化合物来自 FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP1、D.RET6、Ra-Res、Av-HBP、Ih/Bm-HBP1、Ih/Bm-HBP2、Ih/Bm-HBP3、Ih/Bm-HBP4 或 Ih/Bm-HBP5 蛋白中的任意一种。

本发明所述蛋白或肽化合物的优选表达方法是通过在宿主细胞内表达连接于表达载体的编码 DNA 的方式进行重组形式表达。这些表达方法对本领域的技术人员而言是众所周知的，并且大多在 DNA 克隆：实验方法，第 II 卷：表达系统，D.M. Glover 编辑 (IRL 出版，1995) 或 DNA 克隆：实验方法，第 IV 卷：哺乳动物系统，D.M. Glover 编辑 (IRL 出版，1995) 中都有详细描述。蛋白化合物的制备还可采用，例如，分子克隆：实验室手册：第二版 (Sambrood 等., 1989, 冷泉港实验室出版) 或蛋白质工程：实验方法 (A.R. Rees 等编辑，IRL 出版 1993) 中描述的诸如定向突变或随机突变等已知基因工程技术。

对特定的宿主可选择适当的表达载体。载体中可包含一种经操作与表达调控序列相连的编码本发明所述化合物的重组 DNA 分子，或包含一种含有受启动子调控的该重组 DNA 分子的重组 DNA 克隆媒介物或载体，该启动子可被宿主转录机制所识别。

适当的宿主包括常用的原核类生物，如大肠杆菌，或能够高水平表达重组蛋白并易于大量培养的真核酵母。体外培养的哺乳动物细胞系也同样适用，尤其是采用诸如杆状病毒表达系统等涉及将昆虫细胞

作为宿主细胞的病毒介导的表达系统时。化合物也可进行体内表达，例如在昆虫幼虫或哺乳动物组织中。

第九方面，本发明提供了一种药用组合物，该组合物包含有本发明的第一或第二方面所述的组胺或血清素结合化合物或本发明的第三、第四、第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白，以及一种药学上可接受的赋形剂。适当的赋形剂对本领域的技术人员而言是众所周知的，其中可包括，例如，磷酸缓冲盐溶液（0.01 M 磷酸盐，0.138 M NaCl，0.0027 M KCl，pH 7.4）。药用组合物中还可包含一些添加防腐剂以确保具有较长的保存期。

另一方面，本发明提供了该发明的第一、第二、第三或第四方面所述的组胺或血清素结合化合物或该发明的第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白或该发明的第九方面所述的药用组合物在治疗中的应用。这些组胺或血清素结合化合物、蛋白或组合物可用作消炎剂或用于在哺乳动物体内结合组胺或血清素，从而调控其功能和病理学作用。这可造成其隔离并由此降低体内组胺或血清素的有效浓度。由此将导致生理反应的缓和甚至完全终止，这将取决于所使用的剂量。本发明所述组胺或血清素结合化合物还可用作消炎剂或对抗体内过敏反应影响的药剂。

根据本发明的这一方面，这些组胺或血清素结合化合物、蛋白或组合物可与血清素连同使用，以改变化合物对组胺的亲合力。例如就化合物 D. RET6 而言，文中显示血清素可显著提高该化合物与组胺的亲合力。另外还可使用与血清素的功能相关的化合物，如半胱氨酰白细胞三烯（如白细胞三烯 D₄ 或白细胞三烯 E₄）、血小板激活因子，或血栓烷。

本发明的第一、第二、第三或第四方面所述的组胺或血清素结合化合物或本发明的第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白可作为组合物的唯一活性成分，或作为治疗药剂包的一部分，如作为一种乳膏成分用于毒虫、毒蛇或蝎子咬伤，或受皮炎感染的皮肤的局部给药。这些蛋白还可在乳膏、油、粉剂或丸剂中用作组胺、血清素以及组胺或血清素相关化合物的载体分子，以使结合的组胺或血清素缓慢释放。

本发明还包括本发明所述化合物在（例如，血液、鼻灌洗液、组织或食品中的）组胺或血清素水平检测或定量试剂盒中作为组胺或血清素结合成分方面的应用。这种试剂盒与放射免疫测定试剂盒相似，并将包括一种本发明所述的组胺或血清素结合化合物，其中检测的含义是允许精确定量流体中组胺或血清素的量。将规定剂量的放射标记组胺或血清素，如氘化组胺或氘化血清素，加入要测量的样品中。于是样品中的组胺或血清素将与标记的组胺或血清素竞争结合到同样在样品中存在的组胺或血清素结合化合物所具有的有限量结合位点上。由此可精确估计样品中存在的组胺或血清素的量。

作为一个方面，本发明将这类试剂盒与本发明所述组胺或血清素结合化合物一同包含在内。组胺或血清素结合化合物可与磁性小珠、琼脂糖小珠相结合，或固定多孔板的底部。这样将能够把保温后样品中的未结合标记组胺或血清素去除。作为选择，可将蛋白与 SPA（闪烁近似测定）小珠结合，这样将可以不必去除未结合的配体。利用一套未标记组胺或血清素标准，可将采用这些标准所得的结果与待测样品所得的结果进行比较。

还可将本发明的第一、第二、第三或第四方面所述的组胺或血清素结合化合物或本发明的第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白用于组胺或血清素的检测。其检测方法可采用任何该领域常用的技术，其中包括采用印迹技术（Towbin 等，1979）、结合柱、凝胶滞留、层析法，或任何在该领域广泛使用的其它适当方法。在另一实施方案中，组胺或血清素结合化合物可通过遗传学方法或合成方法与诸如碱性磷酸酶、荧光素酶或过氧化物酶等其它蛋白相融合，以利于其检测。

优选而言，可根据本发明的该方面将血清素或一种相关化合物包括在试剂盒中，以改变组胺结合化合物对组胺的亲和力。这类相关化合物包括半胱氨酰白细胞三烯（如白细胞三烯 D₄ 或白细胞三烯 E₄）、血小板激活因子以及血栓烷。当采用化合物 D. RET6 或其功能等价物作为试剂盒的活性组胺结合化合物时，这将称为特别优选方案。

本发明还包括将本发明的第一、第二、第三或第四方面所述的组胺或血清素结合化合物或本发明的第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白作为与一种支持物相结合的组胺或血清素结合实体方面的应

用，该支持物可用来去除、分离或提取（身体组织、血液或食品中的）组胺或血清素。该支持物可包含任何适当的材料，其中包括凝胶、小珠、微球体、结合柱以及树脂。组胺或血清素结合化合物可通过，例如，化学法或酶法，与这些支持物的反应基连接。

本发明还包括将本发明的第一、第二、第三或第四方面所述的组胺或血清素结合化合物或本发明的第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白作为研究过敏反应、过敏反应相关过程或诸如组胺在胃溃疡形成中的作用等血管活性胺的其它生理效应的工具方面的应用。例如，组胺或血清素结合化合物可用于细胞培养或发炎动物组织中组胺或血清素的耗损，以研究组胺或血清素在这些系统中的重要性。组胺或血清素结合化合物可与血清素或一种相关化合物预保温，以提高该化合物对组胺的亲合力。

本发明还规定了本发明的第一、第二、第三或第四方面所述的组胺或血清素结合化合物或本发明的第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白作为免疫原用作后生动物寄生虫疫苗，尤其是在控制节肢动物和其它后生动物寄生虫引起的疾病中用作保护性免疫原方面的应用。可供选择的适当接种疫苗包括牛、山羊、绵羊、狗、猫等家养动物和其它需要保护以免受后生动物寄生虫，尤其是壁虱，的影响的动物。疫苗可包含该领域所熟知的那些类型的佐剂。

包含有编码本发明的第一、第二、第三或第四方面所述的组胺或血清素结合化合物，或编码本发明的第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白的核苷酸序列的核酸分子构成了本发明的其它方面。这些分子包括 DNA、cDNA 和 RNA，以及合成的核酸种类。

文中图 1-11 公开的是编码 FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP1、D. RET6、Ra-Res、Av-HBP、Ih/Bm-HBP1、Ih/Bm-HBP2、Ih/Bm-HBP3、Ih/Bm-HBP4 或 Ih/Bm-HBP5 蛋白等特定组胺或血清素结合分子的互补 DNA（核苷酸及氨基酸按其标准的单字母缩写形式给出）。

按照本发明所述，优选的核酸分子包含一段与图 1-11 所示编码组胺或血清素结合化合物的任意一种核苷酸序列的任意部分相同或互补的核苷酸片段，或包含一段与之简并或基本同源，或能够与所述序列杂交的序列。就“基本同源”而言，其含义是指序列间至少具有 60%

的序列同源性。被包括在本发明范围内的“杂交序列”是指那些在标准非严格条件（ $6 \times \text{SSC}$ /50%甲酰胺，室温）下结合并在低严格条件（ $2 \times \text{SSC}$ ，室温，或 $2 \times \text{SSC}$ ， 42°C ）或优选的在更严格的标准条件，如 $0.1 \times \text{SSC}$ ， 65°C ，下洗脱的序列（其中 $\text{SSC}=0.15\text{M NaCl}$ ， 0.015M 柠檬酸钠， $\text{pH } 7.2$ ）。

本发明的核酸序列可以是单链或双链 DNA、cDNA 或 RNA。优选的核酸序列为 DNA。

本发明还包括含有本发明所述 DNA 序列的克隆载体和表达载体。这些表达载体将包括与本发明所述核酸分子以同一框架连接的适当转录调控序列及翻译调控序列，如增强子元件、启动子-操纵子区、末端终止序列、mRNA 稳定序列、起始密码子和终止密码子或核糖体结合位点。

此外，在蛋白序列中不包含天然有效的信号肽的情况下亦可方便地使重组蛋白由特定宿主分泌。因此，这些载体的其它部件还包括编码分泌型信号序列或加工序列的核酸序列。

本发明所述载体包括质粒和病毒（包括噬菌体和真核生物病毒）。这些载体和表达系统大多为该领域所熟知并有文献记录。特别适合的病毒载体包括基于杆状病毒、腺病毒和牛痘病毒的载体。

该领域具有完善的在大肠杆菌等原核细胞中表达异源性多肽及多肽片段的方法，例如，见分子克隆：实验室手册；第二版，Sambrood 等，1989，冷泉港实验室出版或 DNA 克隆：实验方法，第 II 卷：表达系统，D.M. Glover 编辑（IRL 出版 1995）。本领域的技术人员也可选择在培养的真核细胞中表达产生异源性蛋白，例如，见 O'Reilly 等，（1994）杆状病毒表达载体 - 实验室手册（牛津大学出版）或 DNA 克隆：实验方法，第 IV 卷：哺乳动物系统，D.M. Glover 编辑（IRL 出版，1995）。

表达组胺或血清素结合蛋白时，可选择或构建包含适当调控序列的适当载体，适当情况下的这些调控序列包括启动子序列、终止子序列、多腺苷酸序列、增强子序列、标记基因和其它序列。适当情况下的载体可以是质粒、病毒如噬菌体，或噬菌粒。欲更详细了解，可参考分子克隆：实验室手册。许多有关核酸操作，如核酸构建体的制备、诱变、测序、将 DNA 引入细胞和基因表达，以及蛋白分析的已知技术

和规程在分子生物学简明方案,第二版, Ausubel 等编辑, (John Wiley & Sons, 1992)或蛋白质工程: 实验方法(A. R. Rees 等编辑, IRL 出版 1993)中均有详细描述。例如, 在真核细胞中, 基于病毒的载体为优选载体。

另一方面, 本发明提供了一种宿主细胞, 该细胞包含一种编码本发明的第一、第二、第三或第四方面所述的组胺或血清素结合化合物的核酸, 或编码本发明的第五、第六、第七或第八方面所述的蛋白的核酸。另一方面, 本发明规定一种将所述核酸引入宿主细胞或生物体的方法。

核酸的引入可采用任意一种可利用的技术。在真核细胞情况下, 适当的技术包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染, 或利用逆转录病毒, 或诸如牛痘病毒或对昆虫细胞采用的杆状病毒等其它病毒进行转导。在细菌细胞情况下, 适当的技术包括氯化钙转化、电穿孔或利用噬菌体转染。

核酸引入后即可促成或允许核酸表达, 如通过在基因表达条件下培养细胞。

在一项实施方案中, 本发明所述核酸被整合到宿主细胞的基因组(如染色体)内。按照标准技术, 引入可促进与基因组重组的序列将能够促进整合的发生。

目前有多种技术, 如 Watson 等, (1994) 重组 DNA (第二版), Scientific American Books 中所阐述的技术, 可用来将转基因引入生物体的胚胎或种系内。

有多种已知技术可用来将本发明所述载体引入原核或真核细胞。在文献分子克隆: 实验手册: 第二版, (Sambrood 等, 1989, 冷泉港实验室出版)中很好的描述了适当的转化或转染技术。在原核细胞情况下, 可根据系统的需要选择瞬时型(即游离型)或永久型(染色体整合)表达系统。例如, 见分子生物学简明方法, Ausubel 第二版, 等编, (John Wiley & Sons, 1992)。

正文中提到的所有文献将在此作为参考文献引用。

现在将通过实施例对本发明的各方面及各实施方案加以更详细地描述, 其中将特别提到由壁虱分离的蛋白性组胺或血清素结合化合

物。应意识到的是，可能会在不脱离本发明范围的情况下对细节进行修改。

附图简述

图 1 为 FS-HBP1 的序列（序列鉴定号 1），显示测序引物及测序策略。

图 2 为 FS-HBP2 的序列（序列鉴定号 2），显示测序引物及测序策略。

图 3 为 MS-HBP1 的序列（序列鉴定号 3），显示测序引物及测序策略。

图 4 为 D.RET6 的序列（序列鉴定号 4），显示测序引物及测序策略。

图 5 为 ra-RES 的序列（序列鉴定号 5）。假定为部分糖基化识别位点的天冬酰胺被加上下划线并以斜体字显示。波浪线指示可能的酰胺化位点 I；下划双线指示假定的多腺苷酸信号，polyA 尾巴则以粗体字母显示。

图 6 为 Av-HBP 的序列（序列鉴定号 6）。Av-HBP cDNA 序列和其推断的一级结构。该 cDNA 在终止密码子的下游具有一段显著的长非编码区。

图 7 为 Ih/Bm-HBP1 的序列（序列鉴定号 7）。

图 8 为 Ih/Bm-HBP2 的序列（序列鉴定号 8）。

图 9 为 Ih/Bm-HBP3 的序列（序列鉴定号 9）。

图 10 为 Ih/Bm-HBP4 的序列（序列鉴定号 10）。

图 11 为 Ih/Bm-HBP5 的序列（序列鉴定号 11）。

图 12 为银染的 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶，显示大肠杆菌中制备的 D.RET 蛋白的组分。

图 13 为昆虫细胞中过表达的 D.RET6 的银染 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶。A 和 B 道显示单体（25kDa）、二聚体（50kDa）和三聚体（85kDa）的纯化 D.RET6，C 道为脱糖基化后的纯化 D.RET6。裂解下来的低聚糖滞留在积层胶中，并且可在 C 道的顶部看到。过量的 PNGase-F 显示为分子量约 30kDa 的一条带。D 道显示纯化的

D. RET6 单体.

图 14 显示 *Dermacentor reticulatus* 唾腺提取物中天然组胺结合蛋白的蛋白印迹测定。A 道, 非还原形式; B 道, 还原形式; C 道, 脱糖基化形式。

图 15: 通过产生重组 D. RET6 的竞争性结合曲线对三种未标记竞争物, 如组胺、1-甲基组胺和 3-甲基组胺, 进行 IC_{50} 测定。由图表推出, 将 50%放射性组胺从结合位点上替代的未标记配体的 IC_{50} 分别为 133nM、750 μ M 和 365 μ M。

图 16 显示在血清素存在 (虚线) 或不存在 (实线) 情况下的组胺结合饱和曲线。◆无血清素, ■2.4 μ M 血清素, △23.8 μ M 血清素。

图 17: 重组 D. RET6 在血清素不存在 (A) 和血清素以 2.4 μ M (B) 及 23.8 μ M (C) 的浓度存在情况下的放射性组胺结合测定。

图 18: 结合在环肽组胺结合位点的结合袋内的组胺描绘。

图 19: 结合在环肽组胺结合位点的结合袋内的组胺的三维描绘。

图 20: (a) 带状图显示 FS-HBP2 的不对称单元内 A 分子和 B 分子的排列。13 个折叠标为 A-I, α -螺旋标为 1-3。组胺配体与 Tyr100 一同以球-棍表示法显示。箭头指明 (b) 的观察方向, 加框区域显示 (c) 中放大的部分。(b) 该图显示封闭桶的入口的螺旋和伸展环。(c) A 和 B 分子内残基间的个别氢键接触的立体图。(d) A 和 B 分子的 C- α 叠加轨迹[利用 SHP 实现, (Stuart 等, 1979)]。

图 21: 组胺结合位点 H (a)、L (b) 和 apo-L (c) 的立体图。所有图中均在配体周围显示 $2|Fo|-|Fc|$ 映象。该图显示蛋白 (管) 的核心结构; 接触残基和二级结构的元件被标出。(c) 中将结合结构 L (透明方式绘制) 叠加在 apo 的坐标上。

图 22: 由 cDNA 推导的各种 HBPs 的氨基酸序列的序列对比, 利用 Genetics Computer Group (1994) 的 pileup 指令创建。Wisconsin Package 程序手册, 第 8 版 (575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711)。

实施例

壁虱

壁虱饲养是根据 Jones 等(1988)按照共同未决的国际专利申请 PCT/GB97/01372 中的详细描述进行, 其内容在此被全面包括在内。

蛋白 FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP1 和 D.RET6 的鉴定以及编码基因的克隆亦在 PCT/GB97/01372 中有所描述(见实施例 1、2 和 3)。

Ra-d0 (*Rhipicephalus appendiculatus*) 文库是利用不喂食的 *R. appendiculatus* 壁虱(127 只雄性, 124 只雌性)的唾腺所获得的 mRNA 加以构建。Av-文库 (*Amblyomma variegatum*) 是利用由不完全喂食的成体 *A. variegatum* 壁虱(50 只雄性, 喂食 6-7 天, 和 50 只雌性, 喂食 4-5 天)的唾腺分离的 mRNA 加以构建。Ih/Bm 文库(*Ixodes hexagonus* 和 *Boophilus microplus* 混合文库)是利用不完全喂食的 *Boophilus microplus* (30 只雌性)的唾腺和喂食三天的 *Ixodes hexagonus* 壁虱(20 只雄性/20 只雌性)的唾腺所获得的混合 mRNA 加以构建。

实施例 1: *Amblyomma variegatum*、*Ixodes hexagonus* 和 *Boophilus microplus* 文库的克隆及测序

利用 RNase Total Pure 提取试剂盒 (Bioline Ltd., UK) 从不完全喂食的 *Amblyomma variegatum*、*Ixodes hexagonus* 和 *Boophilus microplus* 壁虱的唾腺中分离总 RNA。利用 Titan One-Tube RT-PCR 系统 (Boehringer Mannheim) 和简并引物:

5'-AAYGGNGARCAYCARGAYGCNTGGAA 和 5'-KTRTMRTCNGTNRYYCCANARYTCRTA 对 RNA 样品进行反转录聚合酶链反应 (RT-PCR), 引物是基于 *Rhipicephalus appendiculatus* HPBs 的保守区域而设计。

根据厂商建议设置循环条件, 但退火温度采用 48℃。将 RT-PCR 产物与 pGEM-T 载体 (Promega) 连接, 并利用位于克隆位点旁边的 SP6 和 T7 引物位点进行部分测序。利用 High Prime DNA 标记试剂盒 (Boehringer Mannheim) 把与最初的 *Rhipicephalus* HBPs 相似的推

导氨基酸序列的插入片段标记上地高辛，并作为探针对文库进行筛选。利用与碱性磷酸酶相连的抗地高辛抗体显示杂交探针。Ra-d0 文库则采用经反复侵染后已获得抗 *R. appendiculatus* 壁虱抗性的豚鼠抗血清进行筛选（根据 Mierendorf 等，1987）。

按照 Short 等(1988)的描述利用 R408 辅助噬菌体对阳性克隆的 pBluescript SK (-) 噬菌粒进行体内切除。

实施例 2：重组蛋白表达

PCT/B97/01372 的实施例 3 中详细描述了 FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP1 的表达和纯化。

1) 用于 D. RET6 的克隆的构建

采用基于大肠杆菌的表达系统，利用 PCR 技术通过以下引物 5'-TATATGATCAGAAAACCCGCTCTGGG-3' 和 5'-TATACTCGAGCCAGGGTTCGCCGT-3'（加下划线的为酶识别位点）将编码 D. RET6（从 Glu29 到 Leu109）的 DNA 序列的 BclI/XhoI 酶切片段亚克隆到经 BamHI/XhoI 消化的 pET-23a(+) 内，阅读框应与 6×His 标记的阅读框相同。将重组质粒转化到采用 T7 系统的 AD494(DE3) pLysS 宿主菌株内，并通过测序确定该过程成功与否。

此外还在细菌内表达了 D. RET6。于 37℃ 下在含有氨苄青霉素和氯霉素的 Luria-Bertani 培养基中培养细菌转化体。当培养物处于指数生长期时（OD₆₀₀ 约为 0.5）用 0.5-1mM 的异丙基β-D-硫代吡喃半乳糖苷（IPTG）诱导并继续培养至少 4 小时，然后通过离心（4500×g，4℃，5 分钟）收集菌体。将沉淀重悬于含 6M 脲、20mM Tris pH8 和 500mM NaCl 的溶菌缓冲液中，并在冰浴中简短超声，然后加入数滴 Triton-X 100，在 4℃ 下旋转 5 分钟以混匀。通过 7500×g 和 4℃ 条件下离心 30 分钟收集上清液。

此外还利用杆状病毒表达系统表达了 D. RET6。利用寡核苷酸：5'-TATGAAGATGCAGGTAGTGC-3' 和 5'-ATATGATCAGCCAGGGTTCGCCGT-3' 将包含 D. RET6 完整编码序列的 DNA 片段加以扩增。

所得 PCR 产物为平末端，用 BclI 消化，并与转移载体 pAcCL29-1-6×His 连接（Livingstone, 1989），该转移载体被制备成在 SacI

位点处有一个平末端，在 BamHI 位点处有一个粘末端。然后将连接产物转移到大肠杆菌（XL1-Blue）内，培养转化体以产生质粒。通过完整测序确认质粒中不含有任何不需要的突变。按不同比率用重组转移载体和 Bsu36I 剪切的 *Autographa californica* 多角体病毒（BacPAK 6）DNA 共转染 Sf9 细胞，其中每 24 μ l 反应物中含有 8 μ g 的 Lipofectin（Gibco BRL）。

表达时，将重组杆状病毒接种在 Seaplaque 琼脂下以鉴定半乳糖苷酶阴性噬斑。将假定的重组克隆再进行一次噬斑纯化。克隆则来自侵染的 Sf21 细胞裂解物，该裂解物在利用抗细菌表达 D. RET6 的多克隆抗血清进行的蛋白印迹测定中显示阳性结果，将克隆扩增并用于重组蛋白的生产。在随后的各融合蛋白的生产中均采用这些杆状病毒感染 Sf9 细胞，其 MOI 约为 5，细胞培养 2-3 天后通过 1000 $\times$ g 离心 5 分钟收集上清液。上清液用 60%硫酸铵沉淀，弃沉淀。再用 100%硫酸铵沉淀，并将所得沉淀重溶于缓冲液 A（50mM 磷酸钠，300mM NaCl 和 10%甘油，pH8）。

2) 蛋白纯化及抗血清的产生

细菌表达系统和杆状病毒表达系统所采用的纯化步骤相同。简而言之，即将由缓冲液 A 预平衡的 Ni²⁺-次氨基三醋酸树脂加入上清液或溶液中。在滚轮上保温（4℃，2 小时），然后将树脂转移到柱内并用 20 体积的磷酸缓冲液（50mM 磷酸钠，300mM NaCl 和 10%甘油，pH6.5）清洗。蛋白用 5 体积的 300mM 咪唑 pH8 洗脱，浓缩，并利用 Centricon-10（Amicon）过滤装置将溶剂置换为磷酸缓冲盐溶液。利用 50mM MES pH6.2 中 0.1-0.6M 的 NaCl 梯度在 HiTrap SP 柱（Pharmacia）上进一步纯化重组 D. RET6。

要确定表达蛋白在大肠杆菌中的定位和溶解性，可将细菌转化体培养物在 IPTG 诱导前和诱导 4 小时后取样，并按照 Qiaexpressionist 小册子（QIAGEN）中描述的规程进行处理。简而言之，即样品经离心沉淀，通过一个冷冻和解冻的循环使细胞溶解，再简短超声，然后离心以分离不溶性蛋白和胞质可溶性蛋白组分。在另一份培养物样品中，将细胞沉淀并进行渗透压休克，其步骤是，首先重悬于含 20%蔗糖的 30mM Tris 溶液（pH8）中，并在含有 1mM EDTA 的情况下振荡保温

于室温。然后收集细胞并重悬于冰预冷的低渗透溶液(5mM 硫酸镁)中。通过离心收集释放到溶液中的蛋白。利用 12% SDS-PAGE 将所有组分与诱导前组分一同进行分析。

用于产生抗体的融合蛋白的制备技术以及利用少量抗原进行免疫的技术在 Sambrook 等, 1989 中均有所描述。简要而言, 即利用包含毫克量纯化 D. RET6 的匀化 10% SDS-PAGE 凝胶条通过对豚鼠反复的($\times 3$)腹膜内免疫来制备抗-D. RET6 豚鼠抗血清, 该纯化 D. RET6 由细菌表达并溶于磷酸缓冲盐溶液中。

3) 电穿孔及蛋白印迹

PCT/GB97/01372 对显示 FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP1 表达的 SDS-PAGE 凝胶及蛋白印迹进行了论述(见图 6 和图 7)。

在喂养期的不同时间点切除壁虱的唾腺(和其它组织), 并匀化于 PBS 中。匀浆在 10,000g 下离心 5 分钟, 取上清液进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE; Laemmli, 1970)。

图 8 和图 9 分别显示 D. RET6 在大肠杆菌和昆虫细胞中的表达。

进行蛋白印迹测定时, 利用从 p.a. 第一天直至喂养期末的 AE-6675 Horizblot MS-HBP1 通过半干电印迹方法(Kyhse-Anderson, 1984)将蛋白转移到硝酸纤维素膜(Gelman Sciences)上。

图 14 所示蛋白印迹结果显示 D. RET6 蛋白的表达。

4) Av-HBP 蛋白的表达和纯化

将 Av-HBP cDNA 的编码区进行 PCR 扩增(95℃为 30 秒, 50℃为 30 秒, 72℃为 30 秒, 18 个循环), 采用的正向引物被设计为在起始密码子上游添加了一个 SacI 位点(5'-TATGAGCTCATGAACTCTGCCTTGTGG; 加下划线的为 SacI 位点), 采用的反向引物(5'-TATGGATCCGGGGTGGCCTCACCG)则包含一个 BamHI 位点(加下划线部分)。产物被连接在 pAcC129.1 转移载体(Livingstone 和 Jones, 1989)的 SacI 位点和 BamHI 位点之间, 该转移载体经过改良在 BamHI 识别位点的下游插入了六个组氨酸密码子和一个终止密码子(见原版专利)。这导致 Av-HBP 的羧基端增加了 Ile-(His)₆ 的序列。

按照 Kitts 和 Possee(1993)用转移载体和杆状病毒(BacPak6)

共转染 Sf21 *Spodoptera* 细胞，并扩增重组病毒。蛋白表达采用 *Trichoplusia ni* 细胞 (High Five, Invitrogen) 和含有 10% 胎牛血清 (Gibco BRL) 的 TC100 培养基。于 28℃ 保温 60 小时后，用硫酸铵 (45-80% 饱和度部分) 将分泌蛋白从培养基中沉淀，并重溶于含有 300mM NaCl 和 10% 甘油的 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH8.0) (缓冲液 A) 中。加入 Talon 小珠 (Clontech) 以捕获含有寡聚组氨酸标记的蛋白 (4℃ 保温 1 小时)。将小珠装入 10ml 柱，并用缓冲液 A 清洗 (20 体积)，再用含有 300mM NaCl 和 10% 甘油的 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 清洗 (20 体积)，最后用 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 清洗 (20 体积)。利用溶于磷酸钠缓冲液 (100mM, pH 调至 8.0) 的 200mM 咪唑洗脱蛋白。

实施例 3: 蛋白特性鉴定

1) 组胺结合测定

按照 Warlow 和 Bernard (1987) 对纯化重组蛋白进行组胺结合测定。该方法利用蛋白沉淀作用通过加入聚乙二醇 (分子量 8000) 并离心而将游离配体与结合配体 (放射性标记组胺) 分离开来。所有实验均于四小时保温期后在醋酸胺溶剂系统中进行薄层层析，以确保没有发生组胺代谢。

作出 ^3H -组胺与 FS-HBP1、FS-HBP2、MS-HBP1、rHBPs 的可饱和结合曲线 (见 PCT/GB97/01372 图 20)。

对 Av-HBP 而言，则将不完全纯化的重组蛋白与不同量的氚标记的组胺保温，并利用液体闪烁计数法确定结合的放射性标记的量。按照 Warlow 和 Bernard (1987) 中描述的利用聚乙二醇 (PEG 8000) 沉淀蛋白的方法将游离配体与结合配体分开。结果 (未显示) 表明组胺的平衡解离常数 (K_d) 约为 7.3 nM。

2) D. RET6 的放射性配体结合测定

重组 D. RET6 用 1.5% γ -球蛋白 (Sigma) 稀释并用于一组实验。在未标记组胺浓度逐渐提高或不提高的情况下，将 50 μl 蛋白溶液与 [2, 5- ^3H] 组胺 diHCl (1Ci/ μl) 溶液 (Amersham) 的 1:2500 稀释物 50 μl 于室温保温至少 3 小时。所有测定的总体积为 200 μl 。经过加入 125 μl PEG8000 (以 36% 的 w/v 浓度溶于 PBS) 终止保温，然后在

microfuge 中以最大速度离心 12 分钟以收集结合蛋白。在不搅乱沉淀的情况下将管再次离心以去除所有上清液。然后将沉淀重溶于 PBS。加入 3ml 液体闪烁合剂(Beckman)并利用液体闪烁计数仪(Wallac, 1217 Rackbeta)测量放射性。

在第二组实验中, 采用竞争性结合测定法比较三种未标记竞争配体(组胺、1-甲基组胺和 3-甲基组胺)。

在每 200 μ l 结合测定物中加入 10 μ l PBS(作为对照实验)或 10 μ l 血清素(50 μ M 或 500 μ M)以研究血清素对组胺结合活性的影响。

对数据进行分析时, 根据此前 Hulme, 1992, 受体-配体的相互作用, IRL 出版, Oxford 的描述由 Scatchard 分析图估计出配体的亲和常数。利用非线性回归对数据进行拟合(Motulsky, 1987, FASEB J, 1: 365-374), 并按照其它文献的描述作出两条渐近直线(Feldman, 1972, 分析生物化学 48: 317)。

由图示曲线可看出, 根据 Feldman (1972) 画出的两条渐近直线表明两个组胺结合位点的 K_d 约为 6×10^{-9} M 和 2×10^{-6} M。对组胺和其甲基衍生物取代放射性组胺的能力加以比较可看出, D. RET6 对组胺的结合具有特异性(图 15)。令人惊奇的是, 在血清素存在情况下的组胺结合饱和曲线以及对应的 Scatchard 分析图揭示出一种显著的协同效应(图 15 和 16)。当血清素终浓度为 2.38 μ M 时, 两个结合位点对组胺的 K_d 为 1.1×10^{-9} M 和 1×10^{-6} M, 血清素为 23.8 μ M 时则分别为 1.3×10^{-9} M 和 1×10^{-6} M。

因此在血清素存在的情况下, 可发现 D. RET6 对其配体, 组胺, 的结合亲和力提高了 60 倍。最近报道, 外部刺激(包括血清素)可调节哺乳动物 H1 受体的活性, 促进与配体亲和力的提高(Bloemers, S. M., Verheule, S., Peppelenbosch, M. P., Smit, M. J., Tertoolen, L. G. J., and De Laat, S. (1998) 生物学化学杂志 273(4), 2249-2255)。尽管分子细节仍不清楚, 但还是认为血清素诱导了 H1 受体的构象变化, 并以此来解释对组胺亲和力的提高(Bloemers, 1998)。因此, 血清素对壁虱的组胺结合蛋白的协同效应很可能得到发展为对抗由血清素诱导的 H1 受体结合亲和力的增强。因此, 这种机制可使摄食点处的壁虱蛋白在与宿主经血清素敏化的组胺受体的竞争

中胜出。当成体 *D. reticulatus* 以诸如狗、马、牛、绵羊、鹿、狐狸、野兔和刺猬等多种家养和野生哺乳动物为食时，血清素的协同效应可借助广泛的宿主特异性止血反应使壁虱的组胺结合蛋白的性能灵活可变。

这一发现对具有组胺结合活性的分子的设计有着重要的意义，并使我们更加了解这些壁虱蛋白和设计用来模拟其功能的分子的作用机制。例如，为改变这些分子对组胺的亲合力，可同时提供适当量的血清素。

实施例 4: 蛋白结晶

将纯化 FS-HBP2 对 10mM 组胺水溶液（用 NaOH 将组胺溶液的 pH 调至 6.8）透析，并利用 Centricon 的 10 号离心组件（Amicon）浓缩至蛋白终浓度为 20 μ g/ μ l。将含有 3 μ l 蛋白/组胺溶液和 2 μ l 母液的悬滴在室温下用 1ml 母液[含有 0.01M 六水氯化钴和 1.8M 硫酸铵（Hampton Research）的 0.1M MES 缓冲液（pH6.5）]平衡。

利用与 Rigaku 旋转阳极发生器相连的内部 Mar-research 成像底片探测器在室温下采集 2.24 $\text{\AA}$ 分辨率的天然数据和 3 $\text{\AA}$ 分辨率的衍生数据。利用 Brandeis 单模块 CCD 探测器于 Brookhaven National Laboratory 同步加速器采集凝结天然物数据和半脱辅基物数据（分别达 1.24 $\text{\AA}$ 和 1.35 $\text{\AA}$ 分辨率）（见表 1）。通过浸没于不含组胺的母液制备半脱辅基晶体，在数据收集前的一星期内，母液需更换数次。凝结液为含 30%甘油的母液。用低温气流（Oxford Cryosystems）使晶体保持在 100K。凝结导致晶胞大小明显改变，与室温下相比，b 和 c 轴更小而 a 轴稍大。衍射数据用 DENZO 和 SCALEPACK (Otwinowski 和 Minor, 1997) 处理。

定相及模型建立

用顺铂和三甲基醋酸铅（Holden and Rayment, 1991）衍生物经 MIR 分辨结构（表 1）。首先采集每种新衍生物的 10-15 $^\circ$ 数据。对具有明显同晶差异的晶体则继续进行数据采集，其它的则转回母液进行下一次浸透实验。

通过观测发现，采用每种重金属可由 Patterson 差分图定位两个

结合位点。其它位点以及两种衍生物的共用原点则通过 Fourier 差分技术发现。三甲基醋酸铅引起了一定程度的非同晶现象(见表1)。同晶差异的数据简化、定标和计算采用 3DSCALE 和 DIFFER 内部程序(Stuart 等, 1979)。MIR-相位的计算采用 MLPHARE (Otwinowski, 1991), 并利用 GAP 程序经溶剂补偿加以改进(Grimes and Stuart, 未发表)。

初图表明, 不对称单元中存在两个分子。从重金属结合位点的坐标和电子密度图的选定标记位置开始, 利用 GAP 确定与这些分子相关的非结晶对称性算子并将其求精。由非结晶对称性平均得到易于解释的高质量电子密度图。解电子密度图采用 FRODO (Jones, 1985) 和 0 (Jones 等, 1991)。

表 1

	晶胞 (a, b, c)	分辨率 (Å)	总反射 数	单反射 数	完整性 (%)	R- 合并	同晶差 异%	位点 数	定相功率
天然物 1	77.0, 77.8, 80.1	20- 2.27	127, 02 8	22, 22 2	94.8	5.2	-	-	-
顺铂	76.9, 77.8, 80.1	20-3	35, 045	9, 898	97.6	8.0	20.5	6	1.6/1.3
TML	76.2, 78.9, 80.1	20-3	41, 086	9, 938	97.1	7.7	32.6	2	1.0/0.8

(a) 结构确定及求精

	天然物 2	Apo
晶胞 (a, b, c)	77.5, 74.8, 78.6	77.5, 74.4, 77.9
分辨率范围 (Å)	20.0-1.24	20-1.35
反射数	108, 735	76, 301
R 因子	18.4%	18.7%
蛋白原子数	2744	2744
水分子数	529	537

RMS 键长偏差	0.013Å	0.014Å
RMS 键角偏差	1.5°	1.6°
平均 B 因子 (蛋白: A—B)	11Å ²	20 ²
平均 B 因子 (配体, H 位点)	5Å ²	17 Å ²
平均 B 因子 (配体, L 位点)	5 Å ²	§
平均 B 因子 (水)	26 Å ²	36 Å ²

(b) 求精统计

求精及分析

初图直接表明 FS-HBP2 具有 lipocalin 拓扑结构。将视黄酸结合蛋白 (IRBP) 的坐标作为模型建立的最初框架。利用 XPLOR (Brtinger, 1992) 将最初模型针对室温数据集 (天然物 1, 表 1) 加以求精 (刚体、位置和 B-因子求精)。将所得模型针对更高分辨率 (天然物 2) 的数据加以求精。刚体求精得出改进的 NCS 算子, 它可使位置 B-因子及位置求精达到 1.24 Å 的分辨率。进一步求精包括非均质性 B-因子全面求精和模拟退火。然后把水和组胺分子考虑在内对体积溶剂加以校正。在求精过程中调整立体化学限制, 以使最终的指标函数不把静电力和范德华力考虑在内。

结构确认采用 PROCHECK (Laskowski 等, 1993)。二级结构赋值采用 DSSP (Kabsch 和 Sander, 1983)。结构叠加采用 SHP (Stuart 等., 1979)。由 Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory 获得用于比较的原子坐标。

rFS-HBP2 的结构确定

FS-HBP2-组胺化合物以斜方晶空间群 (P2₁2₁2₁) 结晶, 每个不对称单元中含两个分子。其晶胞大小各不相同, 凝结时尤其如此 (表 1)。通过两种重金属原子衍生物解结构, 并利用 XPLOR (Brunger, 1992) 求精, 所得最终模型具有适当的立体化学结构 (RMS 键偏差 0.013Å), R-因子为 18.4%, 所有数据的分辨率范围为 20-1.24Å (表 1)。91.1%

的残基处在 Ramachandran 图的最理想区域, 禁止区内没有残基存在。两个在晶体学上不同的分子 (A 和 B) 非常相似 (C α -原子的 rms 偏差为 0.6 Å)。晶体接触点的环袂则有显著差异 (图 20) (A 和 B 分子 Val121 残基的侧链构象也不同, 但这可能不影响其生物功能)。两种分子均包含两个组胺, 分别结合在记为 H 和 L 的位点上。多数非氢原子坐标的误差小于 0.2 Å (Luzzatti, 1952)。

晶体中的 A 和 B 分子间有一个广泛的接触, 主链氢键将 A 分子的 α 3-螺旋后的一个短链连接到 B 分子的 B 链末端 (B54 至 B57 残基) (图 20a, c)。其它氢键则连接 A150 ND2 和 B250, 以及 A167 OG 和 B59 OD1。这些分子并不对二重轴相关。蛋白表面的某些残基在晶体中具有多种构象, 但它们在下文讨论的结构及功能相互作用中并不发挥作用。分子的结晶学 B-因子值非常小 (表 1), 表明分子具有一个有相当刚性的核心, 这符合极佳的衍射结果。A 分子的精细模型中包含天然蛋白的 A1-A171 残基和经操作在羧基端加入的 Ile-(His)6 标记。尽管可以描绘该区域的多肽链线路, 但还有三个 His 侧链的位置仍不清楚, 因此它们被当作 Ala 建模。B 分子中则没有观测到 (His)6 的电子密度 (由于无序, 还忽略了 B1 残基)。

整体结构

分子的容积 (近似大小 33 Å × 38 Å × 45 Å) 呈八链反平行 β -桶状, 其拓扑结构使 FS-HBP2 归为 lipocalin 大家族 (图 13, Flower, 1996)。Lipocalin 通常为胞外蛋白, 能够以不同程度的特异性转运亲水性小配体。HBP 的 β -桶可容纳两个组胺分子, 并最终使蛋白的部分螺旋状氨基端和羧基端伸展为 β -桶 (图 13a)。由序列的高度相似性推断, 所有三种 Ra-HBPs 的整体结构均非常相似 (C α 原子间的 RMS 偏差约为 1 Å)。

独特特性

FS-HBP2 的一些重要功能特性使它与其它 lipocalins 有所不同。

与众不同的是, FS-HBP2 的氨基端最初沿着桶结构伸展, 并在形成 α 1 和 α 2 螺旋之前与 β -链 F 和 G 形成氢键相互作用。坚固的 α 2 螺旋位于桶口处, 并与边缘的残基相互作用, 成为结合袋和外部之间的有效屏障 (图 20a, b)。螺旋的一侧通过氢键被适当控制在参与 B 链和 C

链的环袂处。螺旋的另一侧则与 F 链和 G 链形成氢键（HBPs 中的 F-G 环袂非常突出，这与其功能作用相符）。

与其它 lipocalins 相同，在接近桶的中点处有一个 $\alpha 3$ 螺旋。在 FS-HBP2 中，该螺旋的末端通过两个二硫键（Cys119 至 Cys148 和 Cys48 至 Cys168）被固定在桶上。

结构中三个非常靠近的结构保守区（SCRs）被确定为 lipocalin 折叠的决定簇（Flower, 1996）。A 链中的 SCR1 包括一个 3/10 螺旋，后面紧接一段 Gly-X-Trp 序列。在 FS-HBP2 中，3/10 螺旋则被 α 螺旋替代，而标志序列则被 Asn-Val-Tyr（27-29 位残基）替代。某些 lipocalins 中的 SCR2 包含一种 Thr-Asp-Tyr 基序。而 FS-HBP2 不含该标志序列，但该区域的构象却具有相似性（如 F 链特有的一种纽结）。H 链和 $\alpha 3$ 之间的最终保守区在靠近 SCR1 的 Trp 残基处包含一个 Arg 残基或一个 Lys 残基。HBP2 的该环袂则含有 Thr-Asp-Tyr 三肽（139-141），该三肽通常出现在 SCR2 中。令人惊奇的是，HBP2 中还包含其它一些序列元件，这些元件常使人联想起误放的 lipocalin 片段（尽管 D 链中的 Glu-Lys-Val-Thr-Ala 序列与附睾视黄酸结合蛋白中的相应部分非常吻合；Newcomer, 1993）。

桶状核心内具有两个配体结合位点，这可能是 HBP 结构最显著的独特特性。组胺分子之一横穿结合袋整个宽度的结合需要将 G 链和 H 链从其余折叠片中去除，这需要打乱氢键的常规模式。

与组胺的亲合力不同的两个结合位点

为仔细研究两个组胺结合位点的相对亲和力并查明组胺结合的构象本质，我们试图从已形成的晶体中去除组胺。以一种严格的方式将晶体浸没在母液（无组胺）中，然后在 100K 下采集数据。衍射数据表明，晶体学上相独立的两个分子中的结合位点之一均与组胺脱离，而第二个位点仍全部被占据。由此我们推断，晶体中的一个位点具有比另一个位点小得多的脱离率。两种分子在晶体内不同环境下具有相似的特性，这有力地表明一个位点，称为 H，具有比另一个位点，称为 L，高得多的内在亲和力。观测到的配体-蛋白相互作用也支持该结果。

结合位点位于桶结构的反向末端偏离中心的位置（图 20a）。两个结合袋隔绝了桶内部的多个带电残基，这在 lipocalin 中并不常见（但

与配体的亲水性属性相符)。这些残基是组胺结合位点的关键组成部分(图 21a, b)。A 分子和 B 分子中稳定氢键长度间的 RMS 差异为 0.08 Å; 因此在这一点上, 两分子间没有区别。Tyr100 残基的侧链和一个成键水分子形成隔离 H 和 L 位点的壁。尽管如此, 仍有氢键网络将两个位点连接起来, 在不同的 HBPs 中, 这两个位点的组成几乎完全保守。H 位点的组胺配体处于与桶的长轴相垂直的状态, 这可使 HBP 的结构与其它 lipocalins 相比产生变形。Trp42 和 Phe108 残基芳香族侧链呈偏心平行排列, 它们能够与组胺分子内的咪唑形成强烈的 II-II 堆积相互作用 (McGaughey et al., 1998)。Tyr100 的苯环与组胺的咪唑环平面垂直, 可进一步促进 II-II 相互作用。组胺的氮原子与 Glu (82 和 135) 和 Asp (39 和 110) 残基的羧基间存在广泛的氢键网络, 其中既有直接成键的, 也有通过成键水分子成键的。由其环境可推测, H 位点的组胺以双阳离子形式结合。

L 位点的组胺分子与桶平行, 其咪唑部分指向桶的中心。L 位点的相互作用类型与 H 位点相似, 但特异性更低。组胺的咪唑环与 Phe98 的侧链苯环几乎垂直, 它们之间具有碱基堆积相互作用。此外, 与 Tyr29 的苯环之间还有范德华力相互作用, 而且 Ser20、Asp24 OE1、Tyr100 OH、和 Asp120 OE2 还与组胺的氮原子形成氢键。

因此, Tyr100 在两个组胺分子的结合中均发挥作用, 尽管它采用了不同的相互作用形式。L 位点中没有出现有序的水分子, 并且体积计算表明, 组胺在该位点被包裹的紧密程度稍低。但 B-因子分析证实, 两种组胺配体均为紧密结合(表 1)。组胺在 L 位点的适应性较弱, 这使人们怀疑是否有一种除组胺以外的化合物可作为该结合袋的天然配体。

结合一分子组胺的 FS-HBP2 的结构

L 位点不含组胺的 FS-HBP2 在 A 分子和 B 分子处的结构均已确定, 尽管在 B 分子处还可发现残留的组胺(约有 10%被占据)。这种“半脱辅基”结构模型的 R 因子为 18.7% (表 1)。A 分子和 B 分子的结构细节几乎相同。将 L 位点的组胺用四个水分子替代, 其中一个位于组胺 C β 原子的位置(图 21c), 其它的则通过占据组胺中氮原子的相应位置来缓解不稳定作用。从 L 位点去除组胺仅造成(十分之几埃数量级的)

轻微偏差 (Cot 位置的 RMS 变化仅为 0.1 Å)，并且侧链构象几乎保持不变 (图 21c)。H 位点则仍保持完全与组胺结合，这与它具有更高的亲和力相符。

HBP 家族存在序列差异的本质

三种 HBP 之间存在序列差异，甚至在直接参与组胺结合的残基之间依然如此，尤其是那些在 L 结合袋中发挥作用的残基。总的来说，FS-HBP2 比 MS-HBP1 更类似于 FS-HBP1，但与 FS-HBP1 相比，FS-HBP2 的 L-袋事实上更类似于 MS-HBP1，尽管 FS-HBP2 从总体上更类似于 FS-HBP1。在 FS-HBP1 中，Ser20 和 Asp120 分别被组氨酸和酪氨酸代替。这些变化必然从实质上改变结合袋的形状和电荷特性。与 L 位点的众多变化相比，只有 Phe108 替代为 Leu 可影响 FS-HBP1 的 H 位点。FS-HBP2 和 MS-HBP1 的 Kds 相似，并且比 FS-HBP1 的 Kds 小十倍，这表明 L 位点的改变可调节观测到的结合亲和力。FS-HBP1 结构模拟表明，芳香族残基的丧失可打开一个内部孔穴，它可能使特异性发生改变。

与 FS-HBP2 相比，雄性特异蛋白 MS-HBP3 有更多的实质性改变，其中包括环祥区域的插入和缺失。MS-HBP1 包含一个附加的 Cys (150)，它可能位于分子的表面并负责上述共价二聚体的形成。假定糖基化位点 Asn61 可能也暴露于溶剂 (图 13)。

实施例 5: 具有组胺结合活性的合成环肽的设计

图 17 和图 18 确定的组胺结合蛋白均包含 A 和 B 两条链。每条链可结合两分子组胺，一个的量为 μmol 级，另一个的量为 $\rho\text{ mol}$ 级。下表 2 和表 3 总结了四种结合位点的几何学研究结果。

这些数据表明， $\rho\text{ mol}$ 级结合袋中的组胺所具有的带正电荷的季氮尾巴与两个带负电荷的残基 (Asp110 和 Glu135) 相结合。与此类似，带正电荷的咪唑环通过环上的两个氮原子与两个带负电荷的残基 (Glu82 和 Asp39) 相结合。此外，咪唑环氮原子还与 Trp42 和 Phe108 上的两个芳香环产生正电相互作用。

1) 肽的设计

活性位点分析表明，模拟组胺结合位点还需考虑两类相互作用。

第一类相互作用产生于带正电荷的中心（氮尾和咪唑环）和带负电荷的残基之间。第二类相互作用产生于带正电荷的咪唑环和芳香环之间。

这导致设计某些环肽系统时加入了带负电荷的残基，如 Glu，和芳香族残基，如 Phe。最初的模拟研究表明，环形六肽不具有足以使组胺识别的柔性。环形八肽系统的模拟表明，它们也许可与组胺结合。

所述的环形八肽的序列为：Ala-Glu-Ala-Phe-Ala-Glu-Ala-Trp

图 17 和图 18 显示环形八肽/组胺系统的最小化构象。这些图揭示出提到的组胺与环肽间的结合模型。环肽的两“端”有两个带负电荷的 Glu 残基，能够与带正电荷的氮尾和咪唑环相互作用。位于咪唑环对侧的 Phe 和 Trp 残基能够与带正电荷的芳香族残基相互作用。

不同中心（正电荷到负电荷和正电荷到芳香基）的相互作用距离显示于表 2。

表 2. Hst-肽的平均距离

相互作用	距离 Å
Hst 尾 - 谷氨酸 C	3.66
咪唑环 - 谷氨酸 C	3.53
咪唑环 - 苯丙氨酸矩心	4.91
咪唑环 - 苯丙氨酸矩心	4.94

原子编号系统

表 3. 强结合位点

Hst 原子	残基	原子	A 链 Å	B 链 Å
1	Tyr36	OH	3.32	3.4
1	Asp110	酸 C	3.67	3.66
1	Glu135	“	3.88	3.84
2	Glu82	“	3.33	3.37
3	Asp39	“	3.44	3.35
3	Trp42	环的矩心	3.7	3.97
3	Phe108	“	4.1	4.21

表 4. Hst 弱结合位点

Hst 原子	残基	原子	A 链 Å	B 链 Å
1	Ser20	C=O	2.85	2.83
1	Ser20	OH	3.07	3.13
1	Asp24	酸 C	2.88	3.12
1	Tyr29	矩心	3.23	3.21
1	Asp120	O	3.64	2.71
2	Asp24	O	2.64	2.66
3	Tyr100	OH	2.80	2.78

参考文献:

Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J., Gotschlich, E. C. (1984) 一种在蛋白免疫印迹膜上快速检测碱性磷酸酶偶联的抗-抗体的灵敏方法. Anal. Biochem. 136, 175-179.

D.M. Glover, ed., DNA 克隆: 第 II 卷: 表达系统, (IRL Press, 1995).

D.M. Glover, ed., DNA 克隆: 第 IV 卷: 哺乳动物系统, (IRL Press, 1995).

Falus A. (1994) 组胺与炎症, R.G. Landes Company, Austin, 139.

Gantz I., DelValle J., Wang L-d., Tashiro T., Munzert T., Guo Y-J., Konda Y. and Yamada T. (1992) J. Biol. Chem. 267, 20840-20843.

Goode, B.L. and Feinstein, S.C. (1992) 双链 DNA 测试中的“Speedprep”模板纯化. Bio Techniques 12, 374-375.

Hogan J.C. (1997) Nature Biotech. 15, 328-330.

Holden H.M. and Rayment I. (1991) Archives of Biochemistry and Biophysics 291, 187-194.

Janknecht R., de Martynoff G., Lou L, Hipskind R.A., Nordheim A. and Stunnenberg H.G. (1991) 由重组痘苗病毒表达的组胺标记蛋白的快速高效纯化. PNAS USA 88, 8972-8976.

Jones L.D., Davies C.R., Steele G.M. and Nuttall P.A. (1988). 硬蜱与 Argasid 壁虱的实验室培养及抚养. *Animal Technology* 39, 99-106.

Kitts P.A. and Possee R.D. (1993) 一种高频率产生重组杆状病毒表达载体的方法. *BioTechniques* 14, 810-817.

Kyhse-Anderson J. (1984) 多块胶体电印迹: 一种使蛋白由聚丙烯酰胺胶快速转换至硝酸纤维素膜的无缓冲槽型简易仪器. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.

Laemmli V.K. (1970) T4 细菌噬菌体头部组装期间的结构蛋白裂解. *Nature* 227, 680-685.

Livingstone C. and Jones I. (1989) 能够以单链形式存在的杆状病毒表达载体. *Nucleic Acids Res.* 17, 2366.

Maley F., Trimble R.B., Tarentino A.L. and Plummer T.H. Jr. (1989) 利用糖苷内切酶确定糖蛋白及其相关寡糖的特性. *Anal. Biochem.* 180, 195-204.

Matsudaira P. (1987). 电印迹到 PVDF 膜上的皮摩尔量蛋白的序列. *J. Biol. Chem.* 262, 10035-10038.

Mierendorf R.C. and Pfeffer D. (1987) 变性质粒 DNA 的直接测序. *Methods Enzymol.* 152, 556-562.

O'Reilly et al., (1994) 杆状病毒表达载体 - 实验手册, Oxford University Press.

Program Manual for the Wisconsin Package, version 8 (1994) Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711.

Protein Expression in Current Protocols in Molecular Biology (Chapter 16). Editors: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. Published by John Wiley and Sons, Inc.

Rees A.R. et al., eds, 蛋白质工程: 实验方法, IRL Press 1993.

Ribeiro J.M. and Walker F.A. (1994) *Rhodnius prolixus* 的唾液性一氧化氮运载血蛋白 (载硝基蛋白) 的组胺结合高亲和活性及

抗组胺活性. J. Exp. Med. 180, 2251-2257.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) 分子克隆: 实验手册. Cold Spring Harbour Laboratory.

Sanger F. and Coulson A.R. (1975). 一种通过 DNA 聚合酶初级合成来快速测定 DNA 序列的方法. J. Mol. Biol. 94, 441-448.

Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) 利用 Tricine-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 1-100kDa 范围的蛋白. Anal. Biochem. 166, 368-379.

Short J.M., Fernandez J.M., Sorge J. A. and Juse W.D. (1988) 一种具有体内切除特性的细菌噬菌体表达载体. Nucl. Acids Res. 16, 7583-7600.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) 蛋白由聚丙烯酰胺凝胶至硝酸纤维素膜的电泳转移: 过程及应用. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

Wang H. and Nuttal P.A. (1995). 雄性 *Rhipicephalus appendiculatus* 壁虱中的免疫球蛋白 G 结合蛋白. Parasite Immunology 17, 517-524.

Warlow R.S. and Bernard C.C.A. (1987). 人血液单核细胞上中亲合力与高亲合力组胺结合位点的增溶及特性. Molec. Immun. 24, 27-37.

Watson et al., Recombinant DNA (2nd edition), Scientific American Books.

FS-HBP1

T3→

```

1  AGAAAGCCAACATGAAGCTTCTGCTCTCTCTTGCCTTCGTCTTAGCTCTCAGCCAAGTTA  60
    M K L L L S L A F V L A L S Q V K

61  AAGCCGATAAGCCAGTTTGGGCGGATGAAGCGGCAACGGGGAACACCAAGACGCTTGA  120
    A D K P V W A D E A A N G E H Q D A W K
    ↑

121 AGCATCTCCAAAACTCGTTGAAGAGAATTACGACTTGATAAAAGCCACCTACAAGAAG  180
    H L Q K L V E E N Y D L I K A T Y K N D

181 ACCCAGTTTGGGGTAACGACTTCACTTSCGTGGGTACTGCAGCGCAGAAATTGAAAGAGG  240
    P V W G N D F T C V G T A A Q N L N E D
    T3a→←T7c

241 ACGAGAAGAACGTTGAAGCATGGTTTATGTTTATGAATAATGCTGATACCGTATACCAAC  300
    E K N V E A W F M F M N N A D T V Y Q H

301 ATACTTTTGAAAAGGCGACTCCTGATAAAATGTACGGTTACAATAAGGAAAACGCCATCA  360
    T F E K A T P D K M Y G Y N K E N A I T

361 CATATCAAACAGAGGATGGGCAAGTTCTCACAGACGTCCCTTGCAATTCTCTGACGACAATT  420
    Y Q T E D G Q V L T D V L A F S D D N C

421 GCTATGTCATCTACGCTCTTGGCCCCAGATGGAAGTGGAGCAGGTTACGAACTCTGGGCTA  480
    Y V I Y A L G P D G S G A G Y E L W A T

481 CCGATTACACGGATGTTCCAGCCAGTTGTCTAGAGAAGTTCAATGAGTATGCTGCAGGTC  540
    D Y T D V P A S C L E K F N E Y A A G L
    T3b→←T7d

541 TGCCGGTACGGGACGTATACACAAGTGATTGCCTCCCAGAATAACTTGGGCATATCGTAA  600
    P V R D V Y T S D C L P E *

601 TTTCAACTTCAAAGTGTGTTATTGTCAGCATATGTCTCGAGTGTTTGATGTAGTGCGTTC  660

661 GATGATGCCATTCATCTAGGTTTCGGGTGTTTCGGTACTTTATGSTCACTGCCGACGGCCA  720

721 GCACGAGTACTCGAAATAAAGTATTCTGAAATCGGAAAAAAAAAAAAAA  770
    ←T7

```

图 1

FS-HBP2

T3→

1 CCGCGACGGAACCTTCGAAGGAAGTCAGCATGAAGCTTCTCATACTCTCTCTTGCCTCG 60
M K L L I L S L A L V

61 TCCTCGCCCTCAGCCAGGTTAAGGGAATCAGCCAGATTGGGCCGATGAAGCGGCAAATG 120
L A L S Q V K G N Q P D W A D E A A N G
↑

121 GTGCACACCAAGACGCCTGGAAGAGTCTGAAAGCGGACGTTGAAAACGTTTACTACATGG 180
A H Q D A W K S L K A D V E N V Y Y M V

181 TGAAGGCCACCTATAAGAATGACCCAGTGTGGGGCAATGACTTCACCTTGCCTGGGTGTTA 240
K A T Y K N D P V W G N D F T C V G V M

T3b → ← T7a

241 TGGCAAATGATGTCAACGAGGATCAGAAGAGCATTCAAGCAGAGTTTTTGTATTGAATA 300
A N D V N E D E K S I Q A E F L F M N N

301 ATGCTGACACAAACATGCAATTCGCCACTGAAAAGGTGACTGCTGTAAAATGTATGGTT 360
A D T N M Q F A T E K V T A V K M Y G Y

361 ACAATAGGGAAAACGCCCTTCAGATACGAGACGGAGGATGGCCAAGTTTTACAGACGTCA 420
N R E N A F R Y E T E D G Q V F T D V I

421 TTGCATACTCTGATGACAACTGCGATGTCATCTACGTTCTTGGCACAGACGGAAATGAGG 480
A Y S D D N C D V I Y V P G T D G N E E
→

481 AAGGTTACGAACTATGGACTACGGATTACGACAACATTCCAGCCAATTGTTTAAATAAGT 540
G Y E L W T T D Y D N I P A N C L N K F
←

541 TTAATGAGTACGCTGTAGGTAGGGAGACAAGGGATGTATTACAAAGTGCTTGCCTAGAGT 600
N E Y A V G R E T R D V F T S A C L E *

601 AATAACTTCAGAAATGTCGTTCTTTCAAAGCGAAAACCAACAATGTGAACATCGGCTTGC 660
→ ←

661 TGTGCTCGACGTAGCCAGCGATAATGTTGTTTTCTGGGTTTCTGGGTTTGGATACTTTT 720

721 AGCCACTGCCGAAGAGCTGTAAAGGTAATGAAAAAATAAATGTTCAAGAGTGTGAAAAA 780

← T7

781 AAAAAAAAAAAAAA 793

图 2

T3→

1 AAAGCACTCAACATGAAGGTTCTTTTGTGGTTCTTGGAGCTGCTCTTTGCCAGAATGCA 60
M K V L L L V L G A A L C Q N A

61 GATGCAAAACCCAAACATGGGCGAACGAAGCTAAATTGGGATCCTACCAAGACGCCTGGAAG 120
D A N P T W A N E A K L G S Y Q D A W K
↑

121 AGCCTTCAGCAAGACCAAAACAAGAGATACTATTTGGCACAAGCGACACAAACGACTGCAC 180
S L Q Q D Q N K R Y Y L A Q A T Q T T D

181 GCGTATGGGGTGAAGAGTTTACTTGTGTGAGTGTGTACGGCTGAGAAGATTGGAAAGAAA 240
G V W G E E F T C V S V T A E K I G K K

241 AAACTTAACGCTACGATCCTCTATAAAAAATAAGCACCTTACTGACCTGAAAGAGAGTCAT 300
K L N A T I L Y K N K H L T D L K E S H

301 GAAACAATCACTGTCTGGAAAGCATACGACTACACAACGGAGAATGGCATCAAGTACGAG 360
E T I T V W K A Y D Y T T E N G I K Y E

361 ACGCAACGGACAAGGACGCGAGACTTTCGAAGATGTCTTTGTATTCTCTGATTACAAGAAC 420
T Q G T R T Q T F E D V F V F S D Y K N

421 TGCGATGTAATTTTCGTTCCCAAAGAGAGAGGAAGCGACGAGGGCGACTATGAATTGTGG 480
C D V I F V P K E R G S D E G D Y E L W

481 GTTAGT3AAGACAAGATTGACAAGATTCCCGATTGCTGCAAGTTTACGATGGCGTACTTT 540
V S E D K I D K I P D C C K F T M A Y F

541 GCCCAACAGCAGGAGAAGACGGTTTCGTAATGTATACACTGACTCATCATGCAAAACCAGCA 600
A Q Q Q E K T V R N V Y T D S S C K P A

601 CCACCTCAGAACTGATATTCTGGTAATGCTTGAACCGTAATGGTTGCACCTGCAGTCTAG 660
P A Q N

661 AAACATTTACCACCATCACGGTGATTATCTTACCGTAGTTTCTTAGGTCTTGTCTTTGA 720

721 ATAAAAATAGTTCCCTGCATTGACAAAAAAAAAAAA 753
←T7

41

T3→

1	ATGAAGATGCAGGTAGTGCTCTTACTTACCTTTGTTAGCGCCGCCCTCGCCACTCAAGCG	60
1	M K M Q V V L L L T F V S A A L A T Q A	20
61	GAGACTACATCTGCGAAAGCAGGAGAAAACCCGCTCTGGGCGCATGAGGAACTACTTGGG	120
21	E T T S A K A G E N P L W A H E E L L G	40
	↑	
121	AAATATCAAGATGCCTGGAAAAGCATCGATCAGGGCGTGTGGTGACTTATGTCTTGCA	180
41	K Y Q D A W K S I D Q G V S V T Y V L A	60
	→ ←	
181	AAGACAACATATGAGAATGACACAGGATCATGGGGATCCCGTTTAAAGTGCCTCCAGGTA	240
61	K T T Y E N D T G S W G S Q F K C L Q V	80
241	CAAGAAATAGAAAGAAAGGAAGAAGACTATACAGTTACATCTGTTTTACCTTTAGAAAT	300
81	Q E I E R K E E D Y T V T S V F T F R N	100
301	GCGTCTTCTCCAATCAAGTATTACAACGTGACAGAAACAGTGAAGGCCGTTTTTCAATAT	360
101	A S S P I K Y Y N V T E T V K A V F Q Y	120
361	GGATACAAAAACATAAGGAATGCAATTGAATACCAAGTGGGCGSTGGACTTAACATAAC	420
121	G Y K N I R N A I E Y Q V G G G L N I T	140
	→ ←	
421	GACACGCTCATTTTCACTGATGGAGAATTATGCGATGTTTTCTATGTTCCCAATGCAGAT	480
141	D T L I F T D G E L C D V F Y V P N A D	160
481	CAAGGTTGTGAGCTCTGGGTCAAAAAGAGTCACTACAAACACGTACCAGACTACTGCACG	540
161	Q G C E L W V K K S H Y K H V P D Y C T	180
541	TTCGTGTTCAATGTTTTCTGTGCGAAAGACAGGAAAACCTACGATATATTTAATGAAGAA	600
181	F V F N V F C A K D R K T Y D I F N E E	200
601	TGTGTTTATAACGGCGAACCCCTGGCTTTAAAGGCAAAAAATCTATAAAATACGGTTTCTG	660
201	C V Y N G E P W L *	220
661	TAGTAAGTACTAATAGCAAGTAGTTGAATAAATAAAGATTGTAAGTGCAAAAAAAAAA 719	←T7

图 4

Ra-Res

1 CAACTGATCACTAAAATGTTCCCTGCGGGCTTTCTTCATTTTCGGCGCTGCGCTCCTCTCA 60
 M F L A S F F I P G A A V L S
 61 GTTTTGGCTGAGGAGACACCTAATGATAGATGTACTACACACACTCCTAATGGATGGCAG 120
 V L A E E T P N D R C T T H T P N G W Q
 121 TTTCTCAAGAAAGGCAAGAGATACGATATGAAACAGAGAACCTTCCAAACACCTAACTCA 180
 F L K K G K R Y D M K Q R T F Q T P N S
 181 GACGACACTAAATGCCTGTCCAGTACTATCGACGGAAAGAATGAAAATAACCATACAGTA 240
 D D T K C L S S T I D G K N E N N H T V
 241 CAAGCAACGATAAGATATCGAAATGGTTATGAAGGAAAATGGGACACCATCCGCCAGGAG 300
 Q A T I R Y F N G Y E G K W D T I R Q E
 301 TACGAGTTCCCCAACTACACTGCAGGAGACTACAACCTCATGAAGACAACAGACAAATCC 360
 Y E F P N Y T A G D Y N S M K T T D K S
 361 CCGCCTCCGCCGGCATCATACCTGTTTGGATATACTGGAAGCTCTTGTGCCGTGGTGTAC 420
 P P P P A S Y L F G Y T G S S C A V V Y
 421 GTGAATTCCATTGGACCTGTTTCGTAGCAATTCTGAAAACCCACCAGAAAGACTCACAGCA 480
 V N S I G P V R S N S E N P P E R L T A
 481 AGTCAGGAAAGTGCACAACGCGATTGCGTCCTTTGGGTCGATCACGATGAAAAAGCTACC 540
 S Q E S A Q R D C V L W V D H D E K A T
 541 CAAGAACAATGCTGTGAAGATTTCTTCAAGACCCACTGCAAAGAGACTGTCCATGTCATA 600
 Q E Q C C E D F F K T H C K E T V H V I
 601 TACGACGTGAATAGATGCAAGGAGAATGGCAGTGAATAACACGATGCCGGGAATGGCATG 660
 Y D V N R C K E N G S E *
 661 GCGACTTCATTTATGAAGGAAGACTTCCACAGATGTGAAACTTGCCTTCATTTTGCTTGT 720
 721 TACTTTAGACCAACATATTCTTCCTTTTCCGACTTCAATGATATGATCTAGGTTGTAAAA 780
 781 AGAGCGTTTTATAAAGAAAGTATTAGCATCGATGATGGAAATATAAAAAAA 832

图 5

Av-HBP

1 GCGACCGCGCCCAGCCGTACAGAACAATAGCCTTCGTTGCAAACGTGCAGCGTAGTCGG 60
 61 ATGCCTAGTTAAACACCACACACACGTA~~AAAA~~AGTAGACGAAACTGGCTTCGCTTCCAGCA 120
 121 CCAAGCAGGTCATCGTCTGGTCCACTGACGATGA~~ACTCTGCCTTGTGGGTTT~~ACTAGGA 180
 M N S A L W V L L G
 181 TCATCCTTATGGCTGCATACGGTAGCGTTCATGATTC~~CC~~CACATGGGCAGATGAAGGCAGG 240
 S S L W L H T V A F M I P T W A D E G R
 241 TTTGGCAAGTACCAGAACGCCTGGAAGGCCCTGAATCAGCGGATTAACACAACACATGTC 300
 F G K Y Q N A W K A L N Q R I N T T H V
 301 CTTGTGAGGTCAACGTATATCGACAATCCATATTTATGGGGCAAGAACTTCTCATGCGTA 360
 L V R S T Y I D N P Y L W G K N F S C V
 361 CGCGCTCGAACTGTCGAAGTCTTTCCAGCAGCAAGACTGTGGAACTGGAGTTT~~AGTTTC~~ 420
 R A R T V E V F P S S K T V E L E F S F
 421 AGAAACAGGACTGGTATATTGTGCATGAGAAATCAAACGGTTCGAGCTGGAAAGGATTAC 480
 R N R T G I L C M R N Q T V R A G K D Y
 481 TTTTATCATCAGCCTAACGCCTTCGAATTCATGCTGAGAGGTAACAGGTCGTTTCTAAC 540
 F Y H Q P N A F E P M L R G N R S F S N
 541 GCTGTCATGTTTACCGACGGAATGACATGTAATCTGCTCAGCTTTCATACCAGCGCAAC 600
 A V M F T D G M T C N L L S F P Y Q R N
 601 AAACCACAATGCGAACTATGGGTGAAGGACACGCGGTCGACAACATTCCCCCTTGTTCG 660
 K P Q C E L W V K D T R V D N I P P C C
 661 TCGTTCATGTTTCGACTATTTGTGCCCACAGCCTCGTCCATTCATCATTTACGACAAAGCA 720
 S F M F D Y L C P Q P R P F I I Y D K A

图 6

721 ATGTGCACGGTGAGGCCACCCGCTAGAAAGAAAAGGATGAAAAGGCTACTCGAAGAAG 780
 M C T V R P P R *

781 CAACAACCAATCAGTGCCCAAGAGAACCGTTCCAGTCCTGCGAAAGTTGCGCCTCCCA 840

841 AAACACATACATTTCACTGCAAAGATGACCGATGCAGTCGCAAATTCGTGTCCTAGAACT 900

901 CAAGTGCTGTTTTGGAAGCTCGGAAAGGAGACAGTAGAAGCTAACTGCTGTGATACCTAG 960

961 GCCAGGCATTTCCGTCGGGCACTGTTTTTTATGAATAGGGTAGGGTGAAAGTATTTTGGC 1020

1021 TTTGCTGTGGCCCAATAAATAGCGTATATTAGCGGACTAGCATCGAAGTTCCAGATGCTA 1080

1081 TAAAGCAGCTAAAACCTCACTTCTGCCTGGAACCTCGATAGGTATTGAATAGATCATGCGC 1140

1141 GCACAGAAAAGAAAAGTATCAATCAAAAACATAAAAAGCATTCTTCGCATGTGCGCAAAGC 1200

1201 ATTCCCTAAGTCCACGCTAAAAATAGGTGTCATTTTCATATAGCATCGAGTTCTATACGTT 1260

1261 CTTAAGATGCTACCGGTCATTCATTCCTTTCTCGTCTATGCCTCATGGATCTGAACCAAG 1320

1321 TTCTTCTATTGCCTCCTTGTTTTCCGGTAGCTACAGAGTTCAGCAGCACCATTGCTAGTG 1380

1381 CATATTTTATCTTCGTGCTGTGTTTGTCGCAGTATATTTTCTGCCTATTCACGATATTT 1440

1441 GCACAATGTAATAAAACATTTGCCTGCCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1488

图 6(续)

1	CTCCAGCTCTGCTTCGACGATGAAGGCTCTCCTGATCGCTGTTCGGCTACCTGGGCTGCCGT	60
	M K A L L I A V G Y L A A V	
61	CACAGCGGCACCCCCAAGCTTCGCCTTCCTCTCCGAGGAACGAACCACTCAAGAATACTAC	120
	T A A P Q A S P S S P R N E P L K <u>N</u> T T	
121	GTGGCACAGCAAGGAACTGAAAAATTATCAAGATGCGTGGAAGTCCATCAATCAAAACGT	180
	W H S K E L K N Y Q D A W K S I N Q <u>N</u> V	
181	CAGCACTACCTACTACTTCCTCAGATCAACCTACAACAACGACAGTGTCTGGGGTAAAAA	240
	S T T Y Y F L R S T Y N <u>N</u> D S V W G K <u>N</u>	
241	TTTCACCTGTCTTAGCGTCACGGTGACATCGAAACATGAATCAACGTTACCGTTCGAATA	300
	F T C L S V T V T S K H E S T F T V E Y	
301	TACACCACGTACAAAAATCAGAGCCAACAATGGGTCAGCATGACGGAAAACGTCACGGC	360
	<u>N</u> T T Y K <u>N</u> Q S Q Q W V S M T E <u>N</u> V T A	
361	CGTGCAGGAGGAGGGCTACGACGTTAAAAATATCATTCAGTGGACAACAGAGAATAACAC	420
	V Q E E G Y D V K N I I Q W T T E <u>N</u> N T	
421	AAAGTTCAATGATACTGTTGTTTTTACGGACGGCCAGACTTGTGATCTGTTGTACATCCC	480
	K F <u>N</u> D T V V F T D G Q T C D L L Y ₄ I P	
481	GTACAAAGAAAACGGTTACGAGCTGTGGGTGCGTTCCGATTACCTGCAGAACACTCCAAC	540
	Y K E N G Y E L W V R S D Y L Q N T P T	
541	GTGCTGCCAGTTCATCTTTGACCTCGTCGCATTGGGACGTACCACGTACAATATCTCCAC	600
	C C Q F I F D L V A L G R T T Y <u>N</u> I S T	
601	TCCTGACTGCGTGACCAAAACCTCTCGTTAGACCGTGAAAGCCGCGGCTTATGCTACTCG	660
	P D C V T K T S R *	
661	ACTGCTCAGGTTGGAAGAGTAGGGAGCCCCGACGCGCACTACTACTAAAAATGATTCCAA	720
721	ATAAAGTATTCAAACATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	760

图 7

1 AGTGACTCCTGCTCTGCTTCGACGATGAAGGCTCTCCTGATCGCTGTCGTCTACCTGACT 60
M K A L L I A V V Y L T

1 GCCGTACAGCGGCAGACCAAGCTCCGCCTTCCTCTACGAGGAATGAACCACTCGAGAAA 120
A V T A A D Q A P P S S T R N E P L E K

1 ACTACCTGGCACAACCAGACACTGGGACGTTATCAAGATGCGTGGAAGTCCATCAATCAA 180
T T W H N Q T L G R Y Q D A W K S I N Q

1 AGCGTCGGCACTACCTACTACTTCCTCAGATCAACCTACAACAACGACAGCGTGTGGGGT 240
S V G T T Y Y F L R S T Y N N D S V W G

1 AAAAATTTACCTGTCTTAGCGTCAAGGTGACATCGAAATATGAATCAACGTTACCGTC 300
K N F T C L S V T V T S K Y E S T F T V

1 GAATATAACACCACGTACAAAAATCAGAGCCAACAATGGGTGAGCATGTCGGAAAACGTC 360
E Y N T T Y K N Q S Q Q W V S M S E N V

ACGGCCGTGCAGGAGGGCGGCTACAGTGTTAAAAACATCATTCAGTGGACAACGGAGAAT 420
T A V Q E G G Y S V K N I I Q W T T E N

AACACAAAGTTCAATGATACTGTTGTTTTTACGGACGGCCAGACTTGTGATGTGTTATAC 480
N T K F N D T V V F T D G Q T C D V L Y

ATCCCGTACAAAGAAGACGTTACGAGCTGTGGGTGCGTTCCGAATACCTGCAGAACACT 540
I P Y K E D G Y E L W V R S E Y L Q N T

CCAACGTGCTGCCAGTTCATCTTTGACCTCGTCGCATTGGGACGTACCACGTACAATATC 600
P T C C Q F I F D L V A L G R T T Y N I

TCCACTCCTAACTGCGTGGCCACCACCGCTGGTTAGACAATGCAAGCCGCGGCTTAATTT 660
S T F N C V A T T A G *

ACTCGACCGCTCAGGTTGGAAGTGCCGGGAGCCTCGACGGGCACTACTACTTAAAATGAT 720

TTCGAATAAAGTATTCAAGCATTTCTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 765

图 8

Ih/Bm-HBP-3

1 GATGGCGCTCAGATTGCACTTCTGCTGGCGTGCATCGTCACGGCATGTGGCTGGAGAAC 60
M A L R F A L L I A C I V T A C G W R T

61 ACGGATTCAAGAGAAAGGTCCCGAGAACACCCCTCTCATGAACACCCACGTTTGGGAAA 120
R I Q E K G P E N N P L M N T Q R L G K

121 AATGCAAGACGCATGGAAGAGTCTGGAAAAGGCAACAAATCAGTCGTATGTCTTGGTGTT 180
M Q D A W K S L E K A T N Q S Y V L V F

181 CCGCTCAAGAAATCACGAACCCAGAGATATCCTGCGGTGACGTGAGGGCTAGTAATATAAA 240
R S R N H E P E I S C V Y V R A S N I N

241 TAATGACACTAAAAC TGCAACTTATACCAGAACATATTACAATATGACGGSCAAACGCAAC 300
N D T K T A T Y T R T Y Y N M T A N A T

301 CATGACGGTGAATTATACTGCAAGAGCTCTGAAGCAAGTGGACTATCAGTCGGAAAAATGT 360
M T V N Y T A R A L K Q V D Y E S E N V

361 CGTACGAGTAAACCTGACAGGTGGGTCCCGCAGCAACGATACAGTTCCTCTTGGAGGCTA 420
V R V N L T G G V P S N D T V P L G S Y

421 CGAATACGTCGAGTACGGTAATTACTCCTCGCAATAGCTCATCGACACCCCTTTTGGATGC 480
E Y V E Y G N Y S C N S S S T P F L D A

481 TGTGCAAAATGGCATCGCAAGGGCAATCCAGAGGGCCGGATATCGAAGGGCGGCACATATCT 540
V Q M A S Q G Q S R G P D I E G R T Y L

541	AGACTTCTACGTCGTCTACAATCAACCATCGTGCAATGTCCTGAAGTCCCCCGCTCCTGGG	600
	D F Y V V Y N Q P S C N V L K S P L L G	
601	AGGTGCTTGTAAGTTTGGGTGACAGAAATCCGAGTTGCAAAAAAGCACTAAATAAGACATC	660
	G A C D F W V T E S E L Q K A L N K T S	
661	AGAGAAGAAAAAACAAGCTAGAGCGAGAGCAAGGAAAGCTGGAGGAGATTCCGATGA	720
	E K K K T K L E A R A R K A G G D S D D	
721	CCAGGGACCTGAAGTGGAGGTCGTCCTCAAAAAATCTGCCCCCTCCCGCGCAGCGTT	780
	Q G P E L E V V F K N L P P C R A A F	
781	CATAACTTCCTGGGCTATCCAACTTTCTTATGTACAACAAGACCATCTGTAATCGAAC	840
	I T S C G Y P T F L M Y N K T I C N R T	
841	GGATTCTGTCGGGTGTGAACGTCCTCGGAGCAAGTAGAACGTCCTGGTGAAGACAGCAG	900
	D S A A V *	
901	GAAGATAGTTGACTGTTTTGTTGGCGGAATGTGACTACTAGTCTGATCATTAATAAAGAT	960
961	TCNGCTGACGGGTGTGGCGGGAACTTTTTTAAATGAAATTGGTCATACTTGTGTGAAAGAC	1020
1021	<u>AAAAATAAAAA</u> CAATATGTTACTCCTC	1046

图 9(续)

lh/Bm-HBP4

1 GGAAACCAGGATGGCGCTCAGATTTGCACTTCTGCTGGCGTGCATCGTCACGGCATGTGG 60
M A L R F A L L L A C I V T A C G

61 CTGGAGAACACGGATTCAAGAGAAAGGTCCCAGAACCAACCCTCTCATGAACACCCAACG 120
W R T R I Q E K G P E N N P L M N T Q R

121 TTTGGGAAAAATGCAAGACGCATGGAAGAGTCTGGAAAAGGCAGCAAATCAGACGTATGT 180
L G K M Q D A W K S L E K A A N Q T Y V

181 CTTGGTGTTCCGCTCAAGAAATCACGAACCAGATATATCCTGCGTCTACGTGAGAGCTAG 240
L V F R S R N H E P D I S C V Y V R A S

241 TAATTTAGATAATGCAACTAAACTGCAGATTATACCAGAACATATTACAATATGACGGC 300
N L D N A T K T A D Y T R T Y Y N M T A

301 AAAACAAAACGTGTTCGGTAAATTATACTGCAAGAGCTCTGAAGCAAGTGGACTATGAGTC 360
K Q N V S V N Y T A R A L K Q V D Y E S

361 GGAAAATGTCGTACGAGTAAACCTGACAGGTGGGGTCCCCAGTAACGATACAGTTCCTCC 420
E N V V R V N L T G G V P S N D T V P P

421 TGGAAGCTTCGAATACGTCGAGTACGGTAATTACTCCTGCAATAGCTCATCGACACCCTT 480
G S F E Y V E Y G N Y S C N S S S T P F

481 TTTGGATGCTGTGCAAATGGCATCGCAAGGGCAATCCTGGGGGCCGGATGTGCAAGGGCG 540
L D A V Q M A S Q G Q S W G P D V E G R

图 10

541 CACATATCTAGATTTCTACGTCGTCTACAATCAACCGTCGTGCAATGTCCTGAAGTCCCC 600
T Y L D F Y V V Y N Q P S C N V L K S P

601 GCTCCTGGGAGGTGCTTGTGACTTCTGGGTGCCACAATCAGAGTTGGACAAGGTACTAA 660
L L G G A C D F W V P Q S E L D K V L N

661 CAAAAAAGGAGATAAGAAAAAGCCAGCTAAGTCAAGCAGTCAAAATGGAGACGAAGGTT 720
K K G D K K K P A K S S S Q N G D E G S

721 TGATGCCGAGCAACCTGAACTGGAGGCCATCTTTAAACATCTACCCCTCCCTGCCGCGC 780
D A E Q P E L E A I F K H L P P P C R A

781 AGCGTTCATAACTTCCTGCGGCTATCCAAATTTTCTCATGTACAACAAGACGATCTGTAA 840
A F I T S C G Y P N F L M Y N K T I C N

841 TGCAGCGGGTCATGCTGCGAACTGAACGTCCTCTGCGAACGAGTAGAGCGTGCGTAAAA 900
A A G H A A N *

901 CAACTGGTCTGAATCTTTTAAGAAATTCGGCAAAGTGGGGTGGCGCGAACTTTTATCAA 960

961 ACTGGTCATACATGTGAAAGAAAAAAATAAAACAAAATGTGCATAAAAAAAAAAAAAAAA 1020

1021 **AAAAA** 1025

图 10(续)

Ih/Bm-HBP-5

```

1  CGAAGAGCAGGTACGATTGGAATCTTTGCAATGGACATTGCGACGCGCTGTTTGTTCGCG 60
    M D I R S A V L F A

61  TGCATCGTCTCGGCGTGTGTGGCTTTTGGCGCTGGACAACACGAGGGTAACTAAAAAG 120
    C I V S A C C G F W R W T T R R V T K K

121  CCTGATAACAGCCCTCTGTTGAACAACCAACATCTTGGTCTTTTCCAGGACGCGATGGAAG 180
    P D N S P L L N N Q H L G L F Q D A W K

181  ACTATAGAAGAGACGTCCAATGATACGTATGTCCTGATGTTCCGCTCAAAACATTACGAC 240
    T I E E T S N D T Y V L M F R S K H Y D

241  CACGAGAACAAGGCTAAATGTGTCTTCGTAACGGCAAAATATTACTGACTCCCGGAACAAA 300
    H E N K A K C V F V T A N I T D S R N K

301  ACTGCCAATTACACAATAACGTATTACGATACACAAATACATCCACAATTTTACA 360
    T A N Y T I T Y Y D T T T N T S N N F T

361  ATCCCAGTGAGAGCTCTGAACCAAACTGACTACTCACTAGAAAAATGTGATTCGAGCAAGC 420
    I P V R A L N Q T T D Y S L E N V I R A S

421  TTCAACGGCGACACTCCAAGTCTACTCCAGCCCTCCCGGAAGCAGCGGTGATTCAG 480
    F N G D T P S S T P A P P G S S V Y I Q

481  TATAATAATGTTACCTGCTACGCCCAATATCACCATTTCATAATAATGGAATCAGTGCA 540
    Y N N V T C Y A Q Y H P F S N N G I S A

```

图 11

```

541 AAATATGATGAAATGCCCGGGATGGCCGAAATTACTTGTTCGACAATTTTATTTGGTGCT 600
    K Y D E M P R D G R N Y L F D N F I G A

601 TACTTGGACTTCTACGTGTGTTTCAGCCAGCCGACATGCAACGTTCTCAGAGTCCGAGAA 660
    Y L D F Y V V F S Q P T C N V L R V R E

661 GGATGTGACTTCTGGCTAAGGAAAACAGTTGCCAAGCCTACTGAAAGCACCAGAAAAT 720
    G C D F W L R K T E L P S L L K A A E N

721 GATGACAAACGATAACACGGAAATCGCTGAAGAACTATTGGGAAAGAAATAAATAACT 780
    D D N D N T E S L K N Y W E R R I N N T

781 AAAACAAGATTTCGACATAATACTAAGAAATGTAAGATGTACGTACAACGTTATCAATT 840
    K T R F R H N T K K C K M Y V Q R Y S I

841 GAGAAGGCTGAAGATGCTTTTAAAAAACACTGCTTTTAAACACCTCCCTCCGACTGCCGC 900
    E K A E D V F K N T A F K H L P S D C R

901 TTTCCTTCCCTGGCGGCTTGTGGAAATCCAGCATTCACAATATACGACCCAGAAACATGT 960
    F A F L A A C G N F A F T I Y D P E T C

961 AATAGCTCCCTGCCAGCTAATATGGCAGAAAGTTAAATGAGCTATTTCACTTCATGTCG 1020
    N S S L P A N M A E S +

1021 ACCGTATGCTGCTGATGCAAGAAGGTGAGTTGGACAGGATACCTCCGAAATTATTTTTC 1080

1081 AGTCTGCTGTGTACGCACGAAATAACAATAATATCTGTTGAGCCNNCAACNNNNNAANA 1140

1141 ANAAAAAAAAAAAAAA 1156

```

图 11(续)

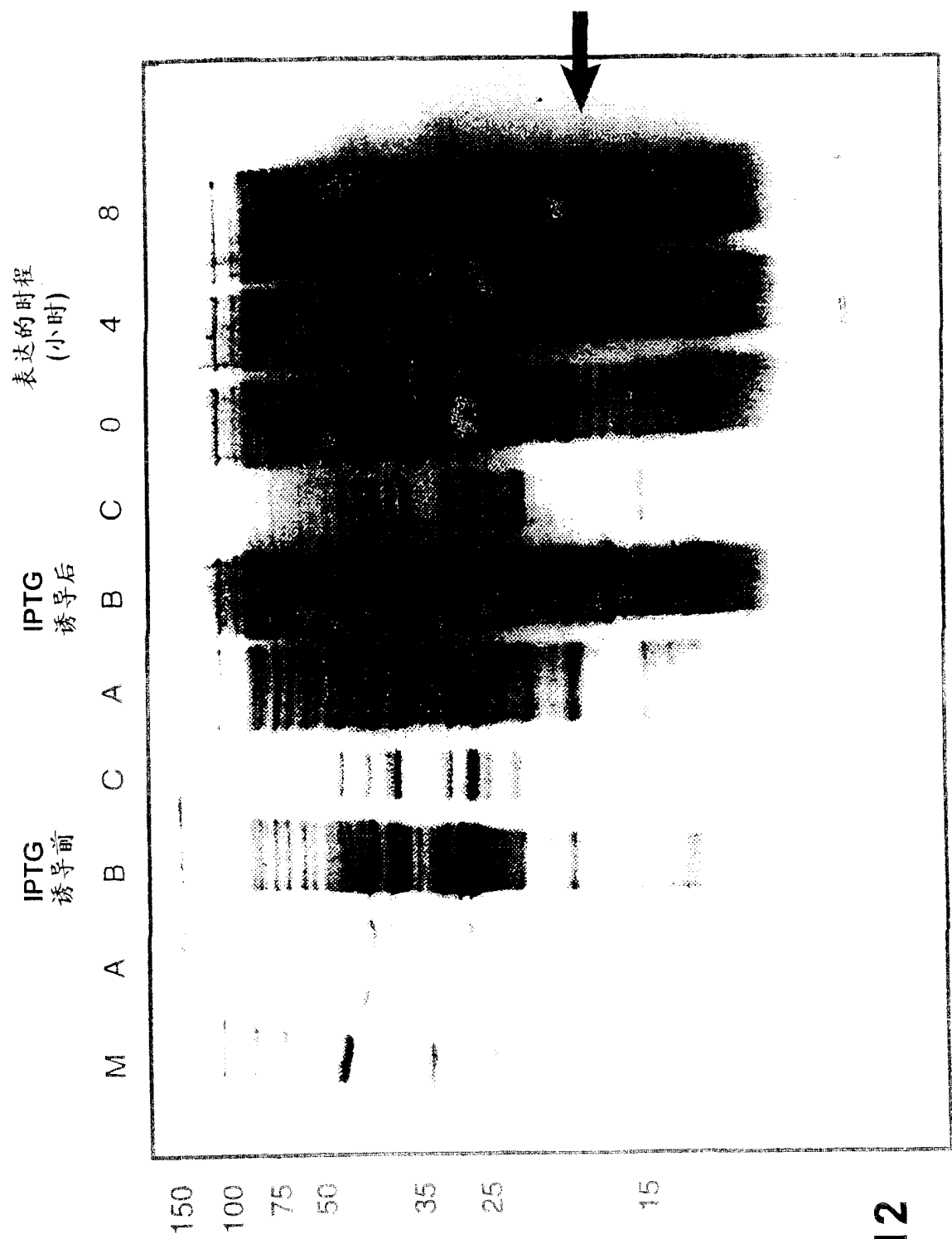


图 12

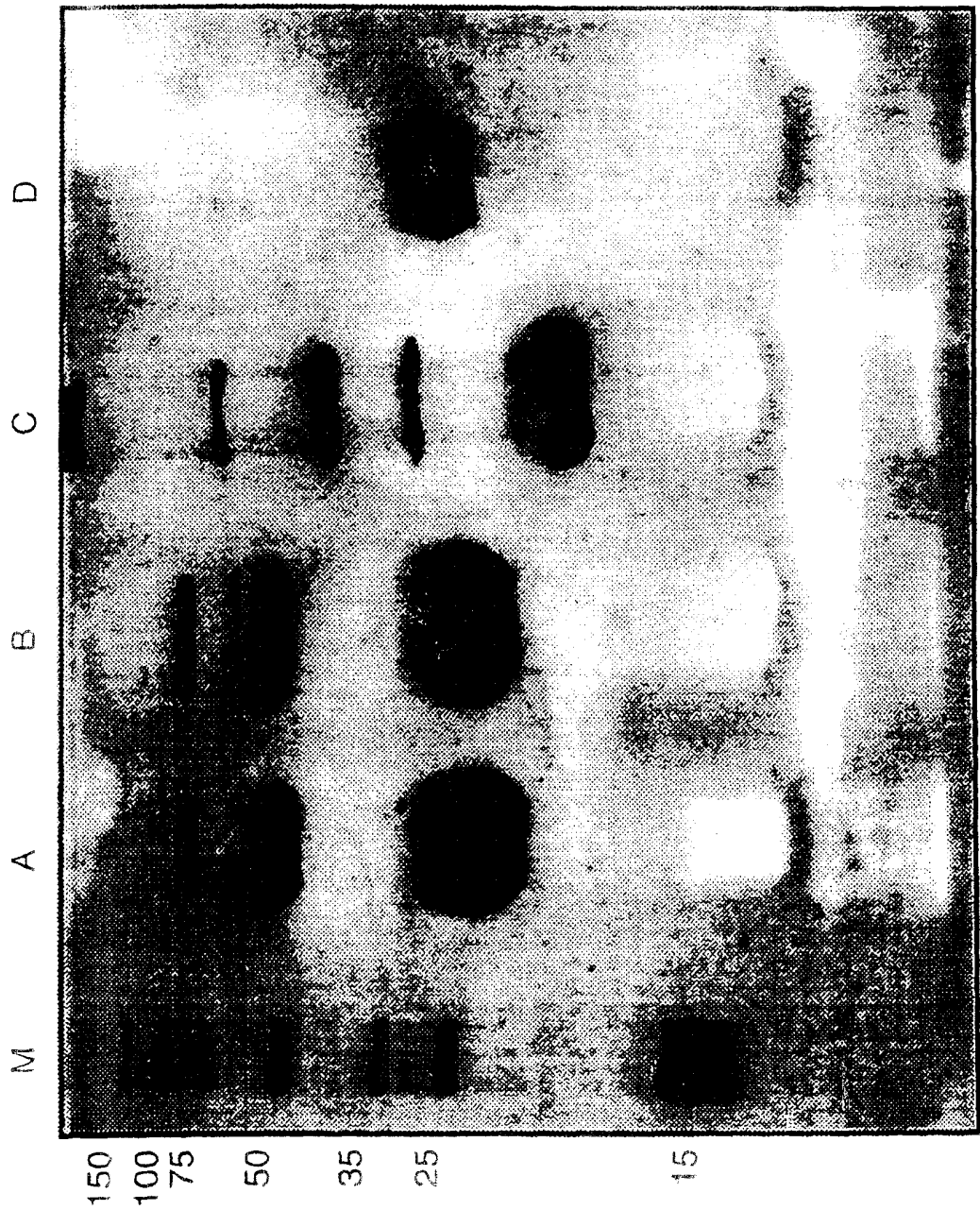


图 13

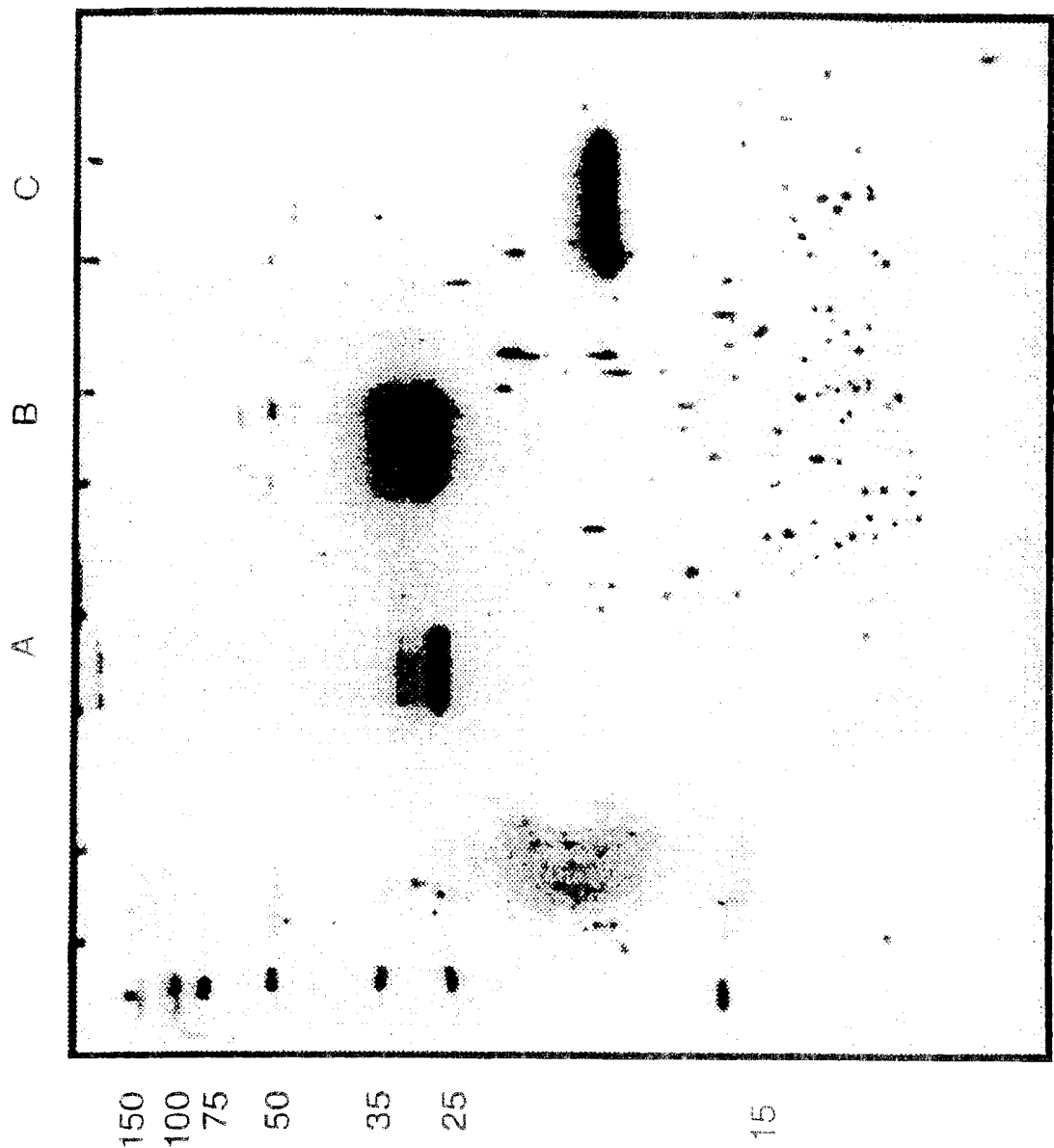
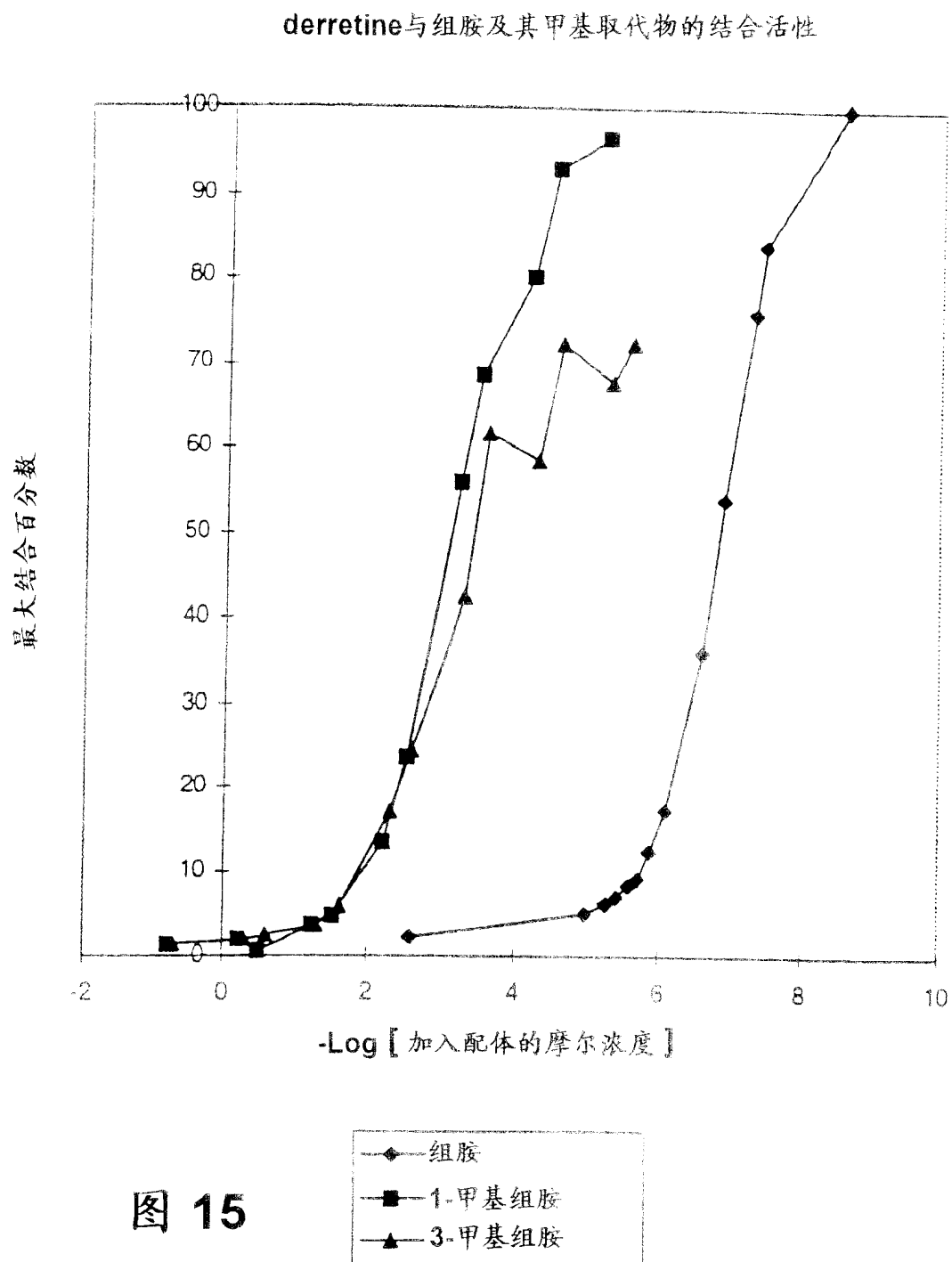


图 14



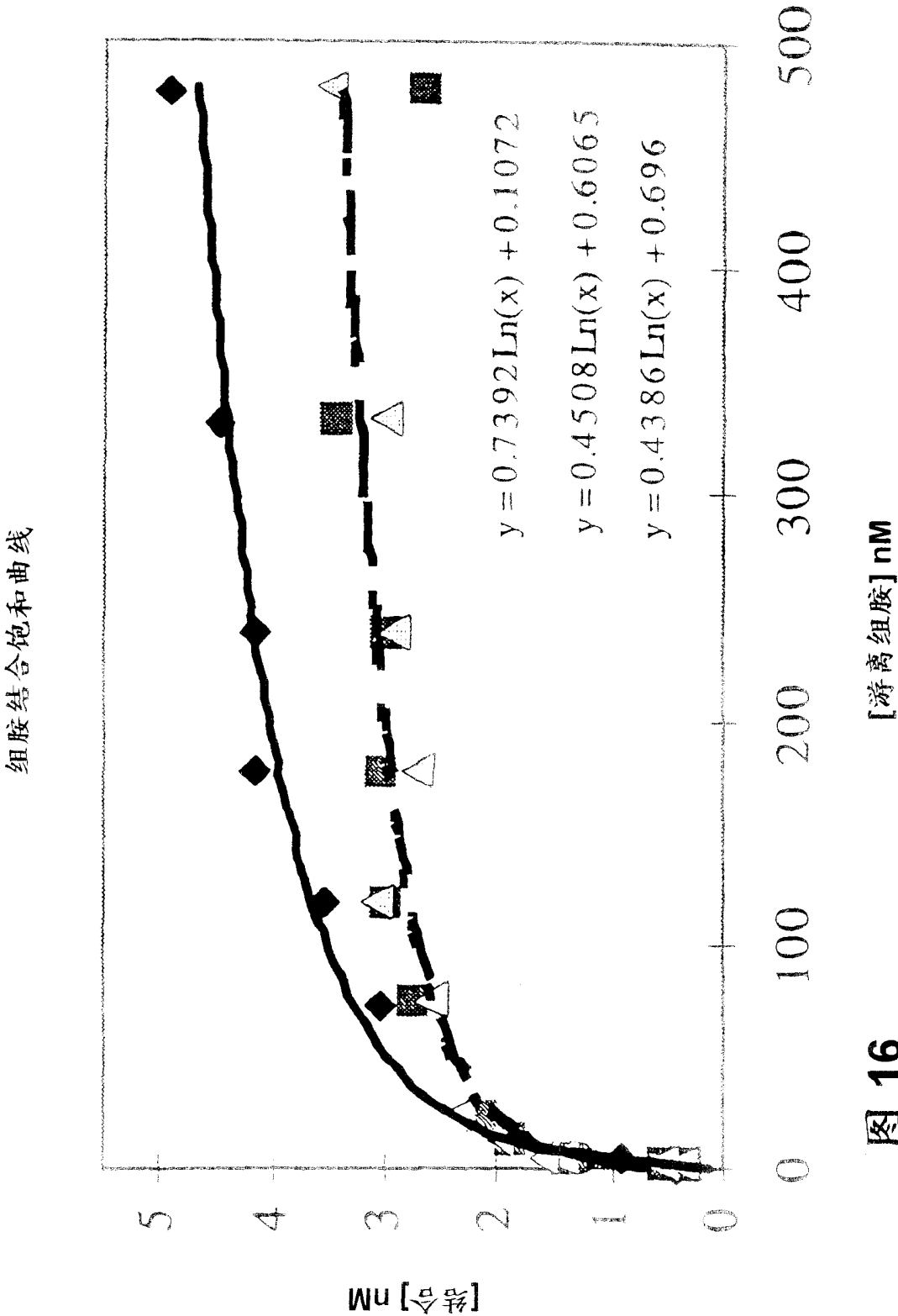


图 16

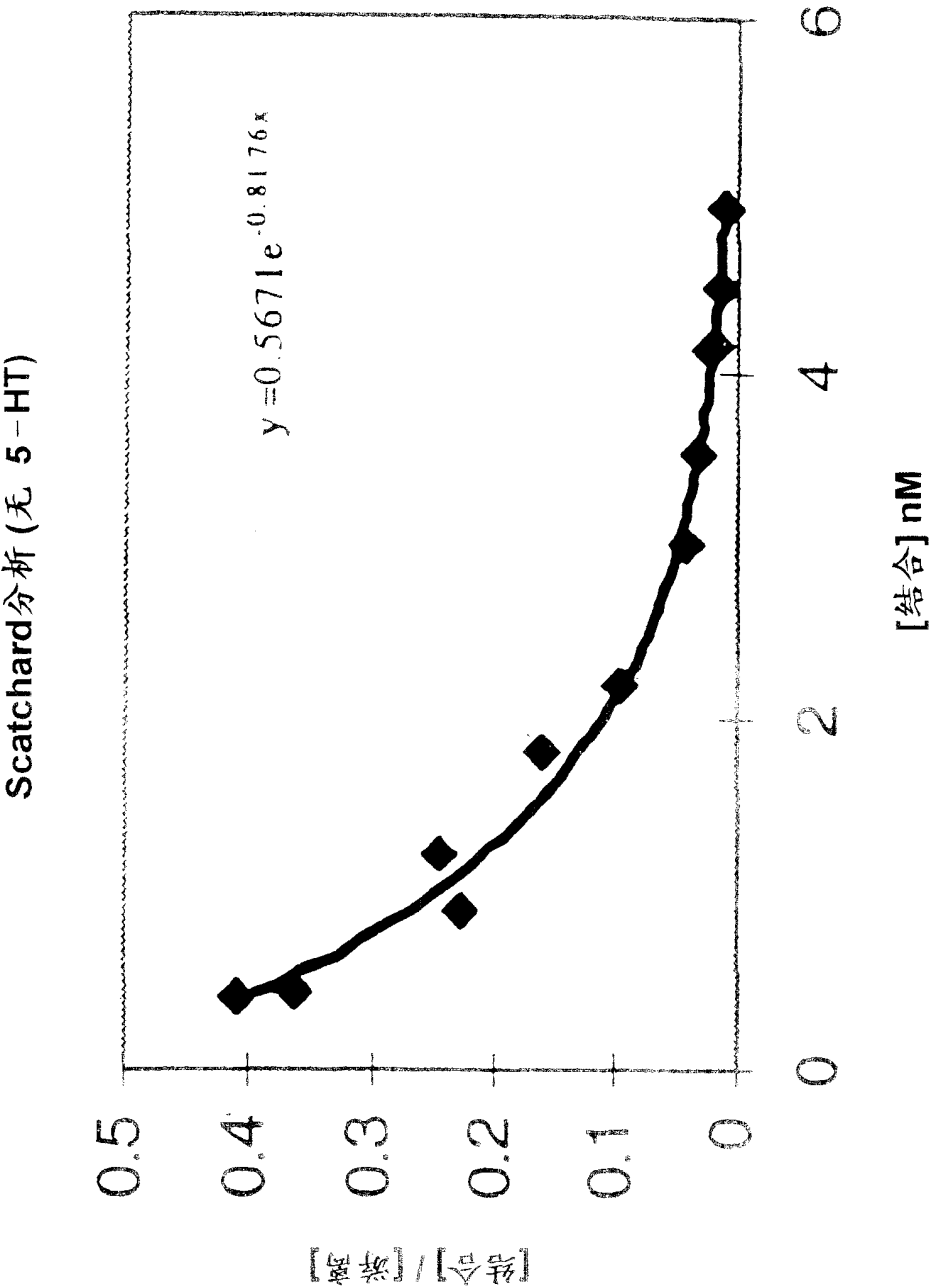


图 17

Scatchard分析 (加2.38mM 5-HT)

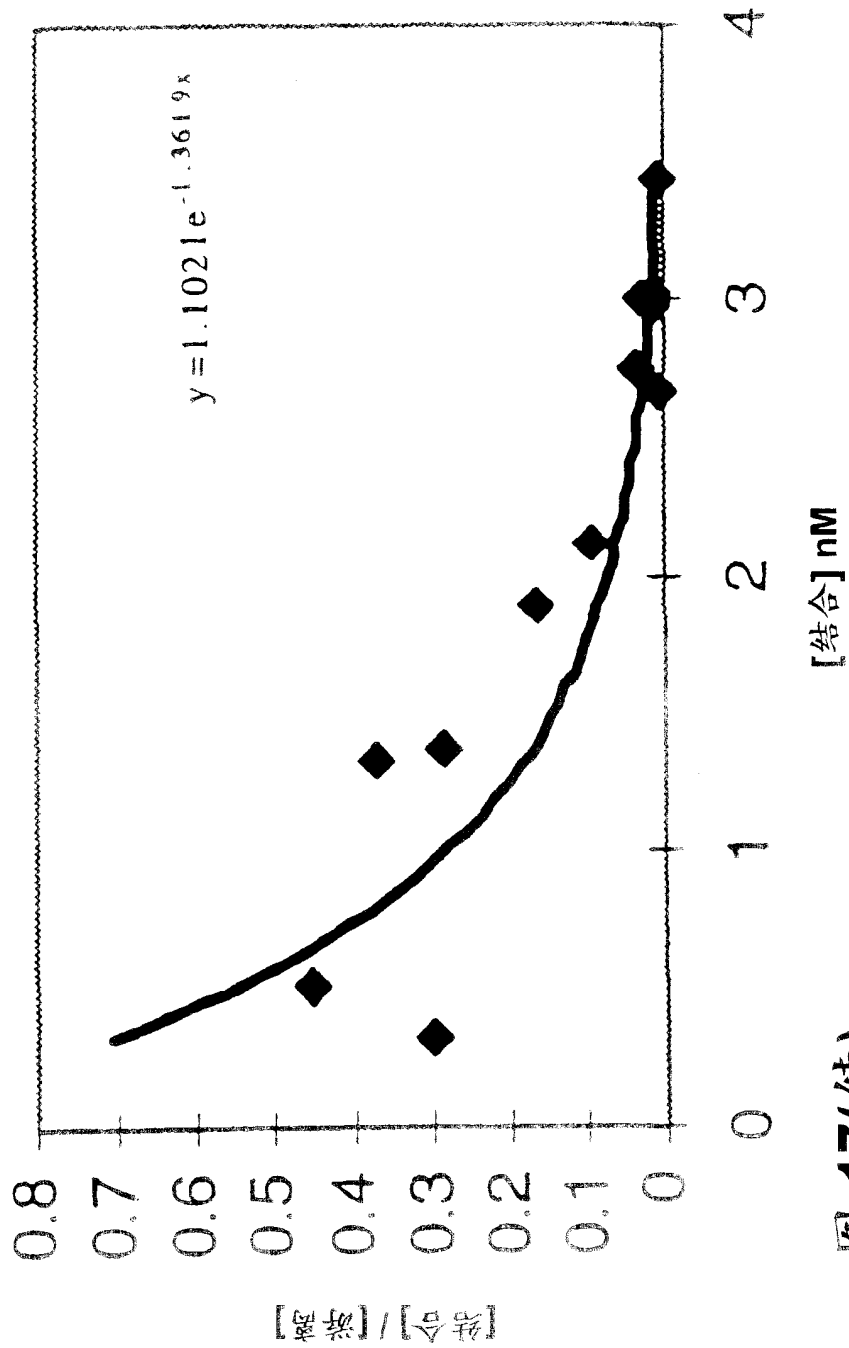


图 17(续)

Scatchard分析 (加2.38mM 5-HT)

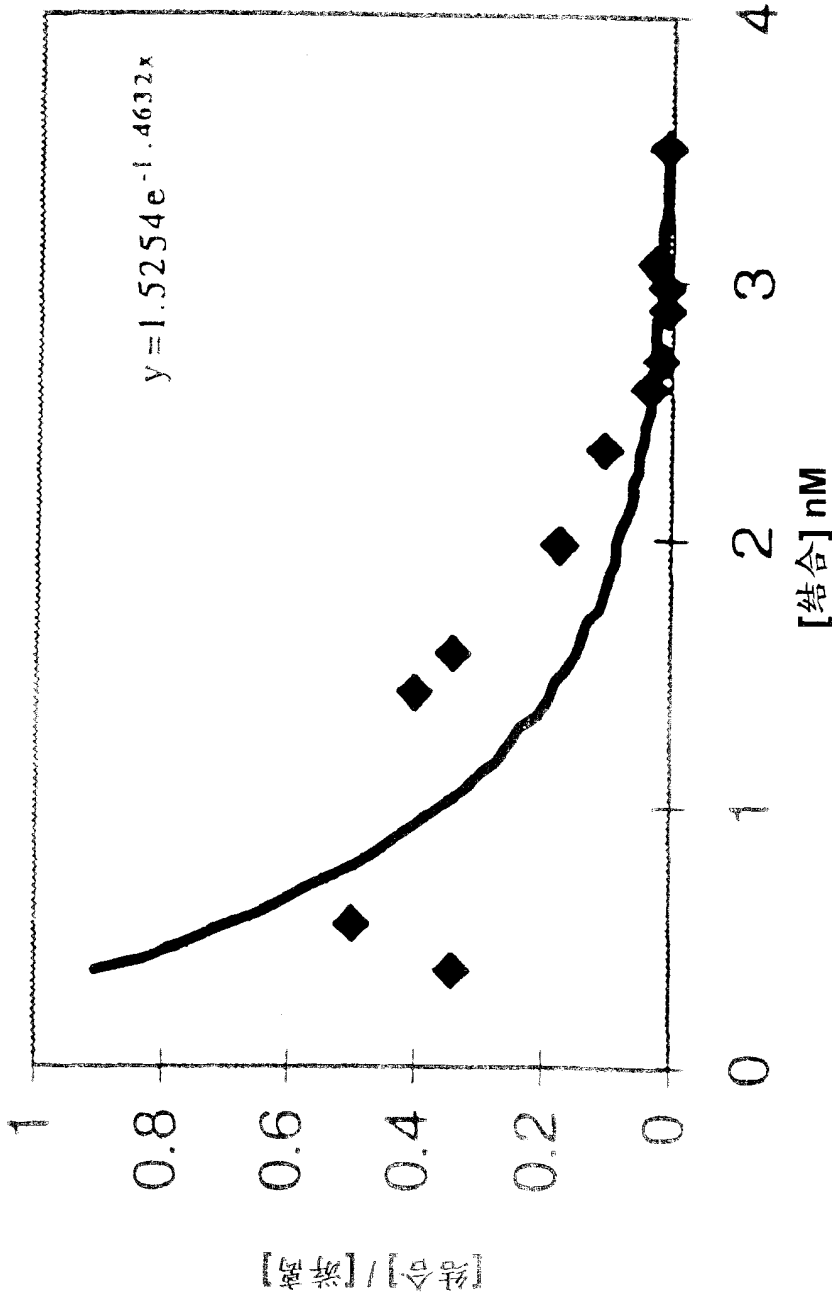


图 17(续)



图 18

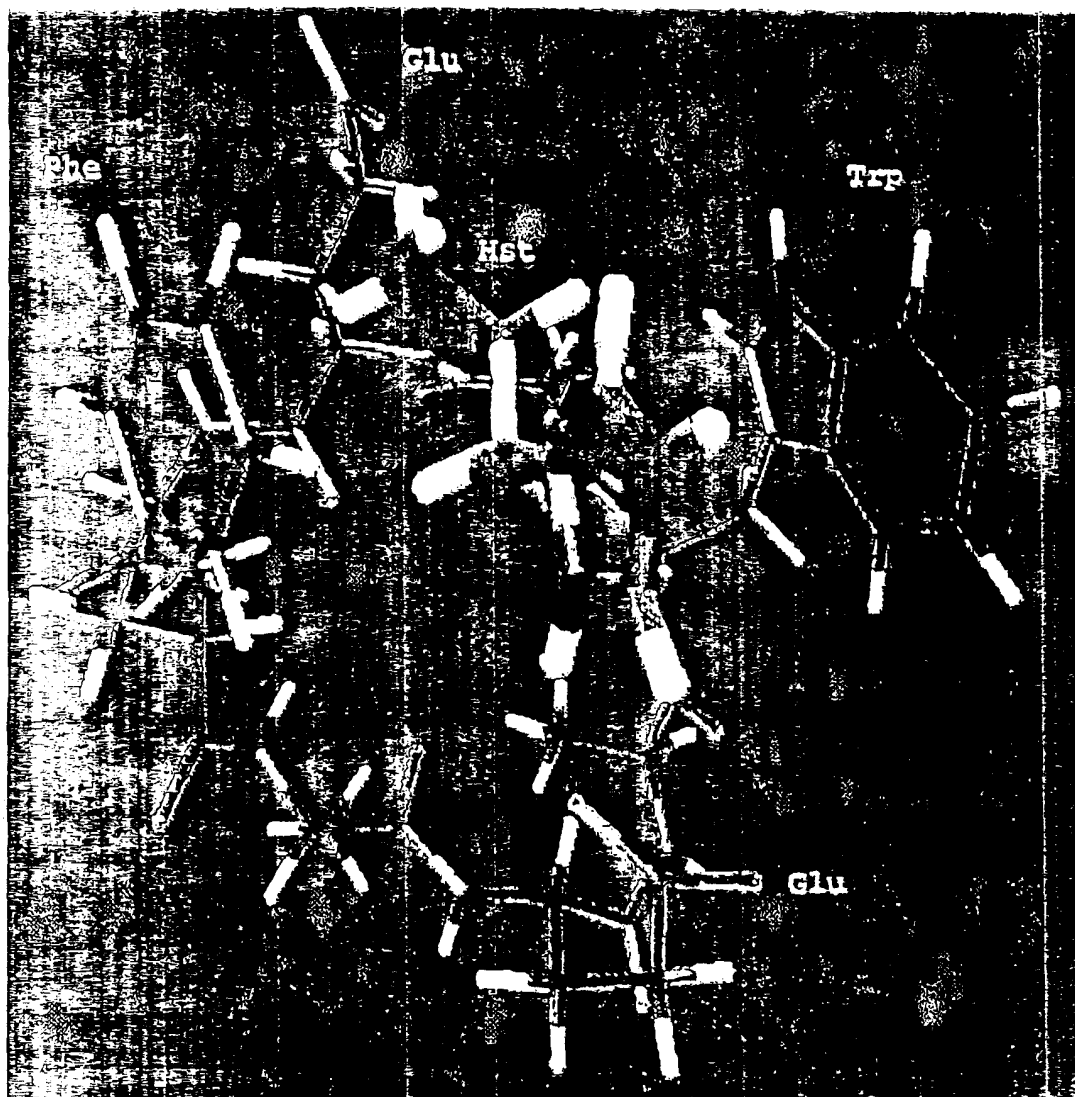


图 19

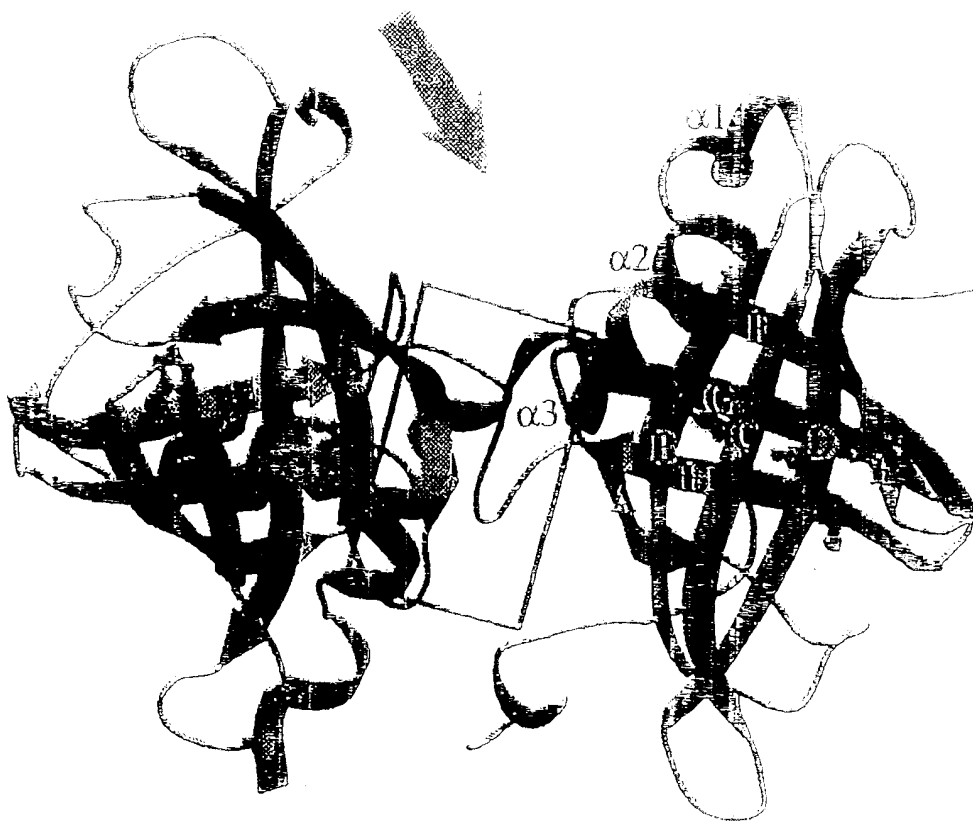


图 20(a)

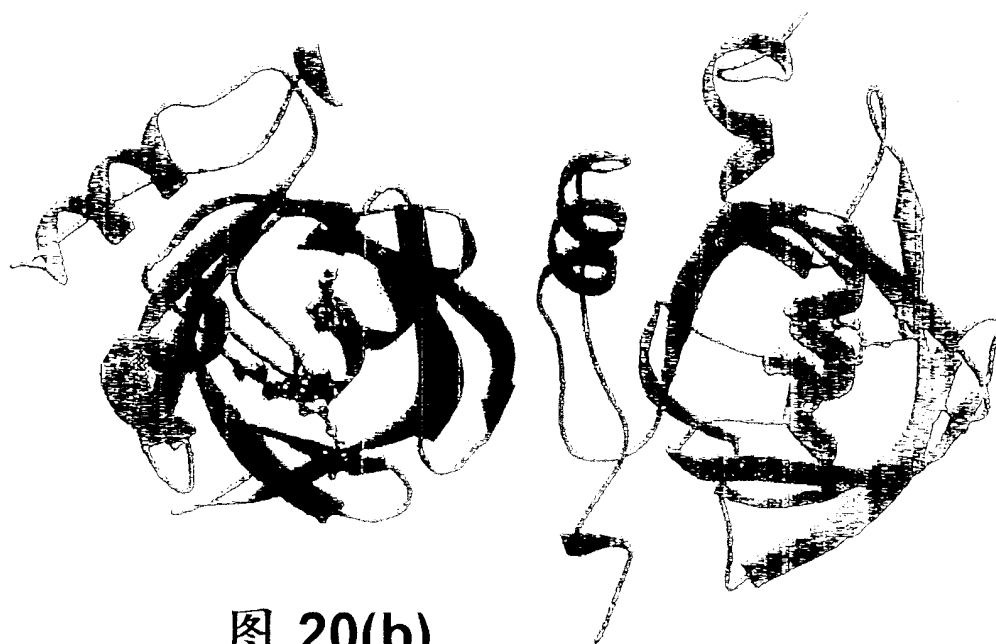


图 20(b)

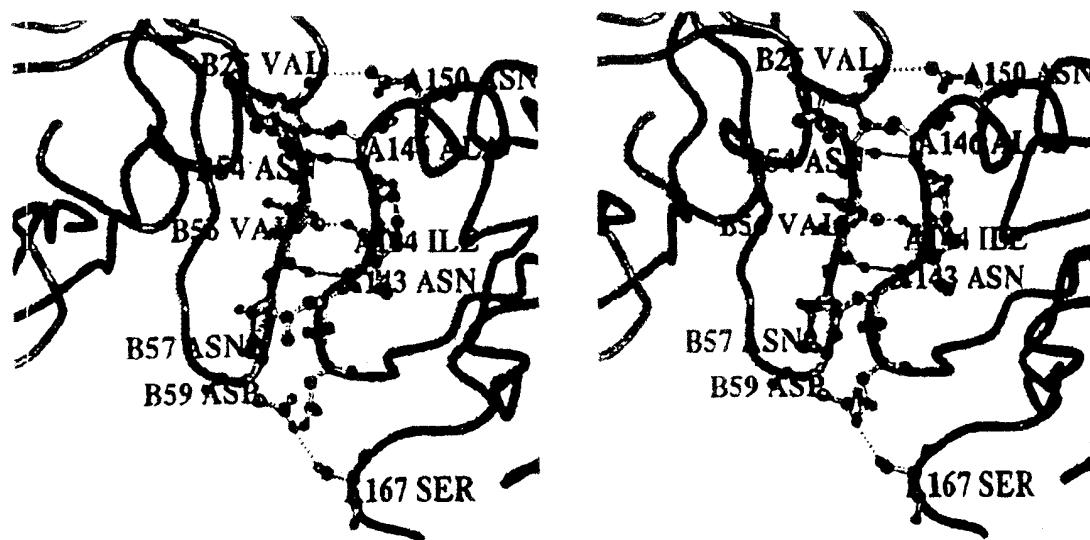


图 20(c)

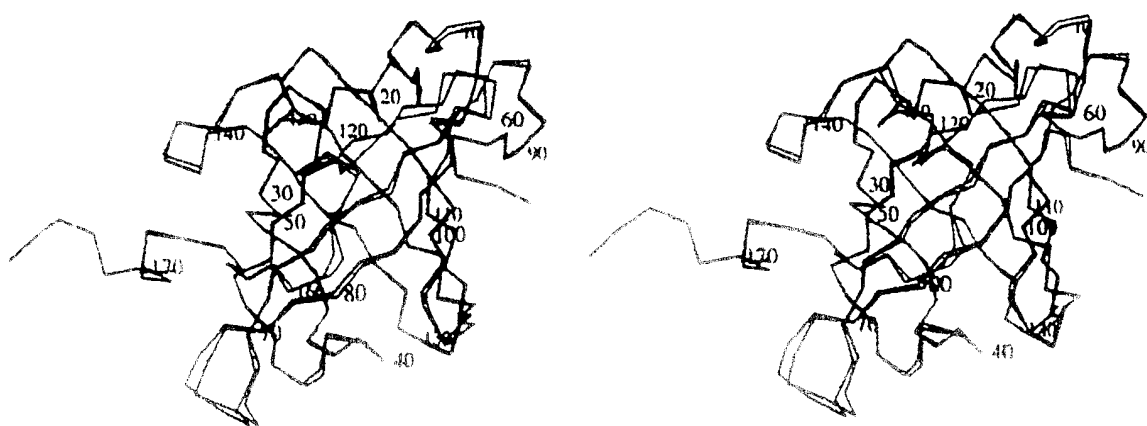


图 20(d)

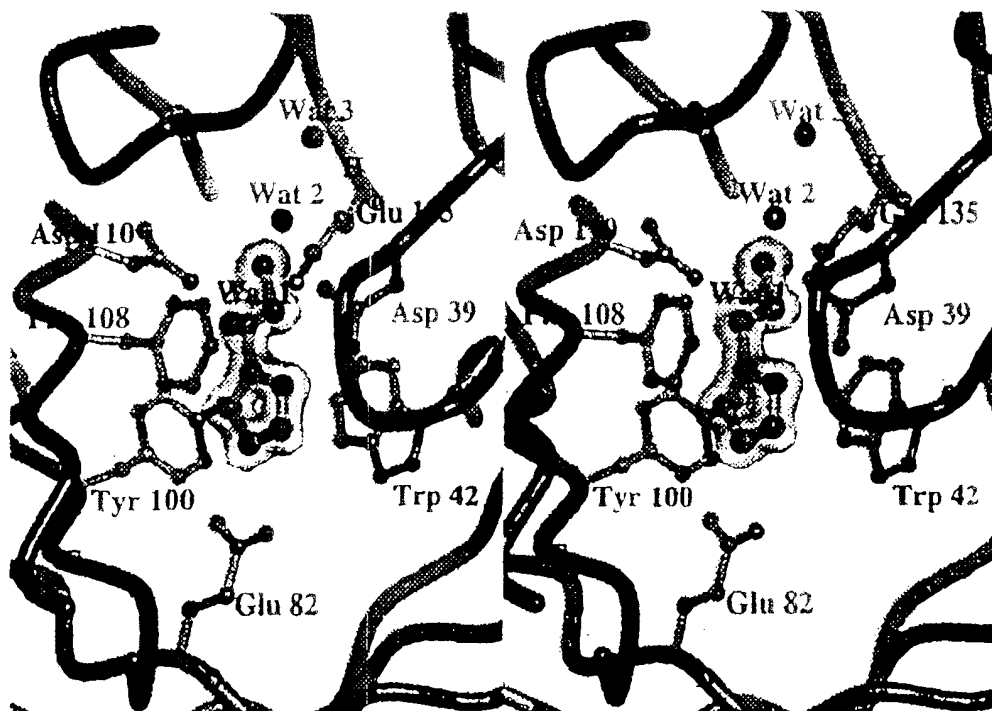


图 21(a)

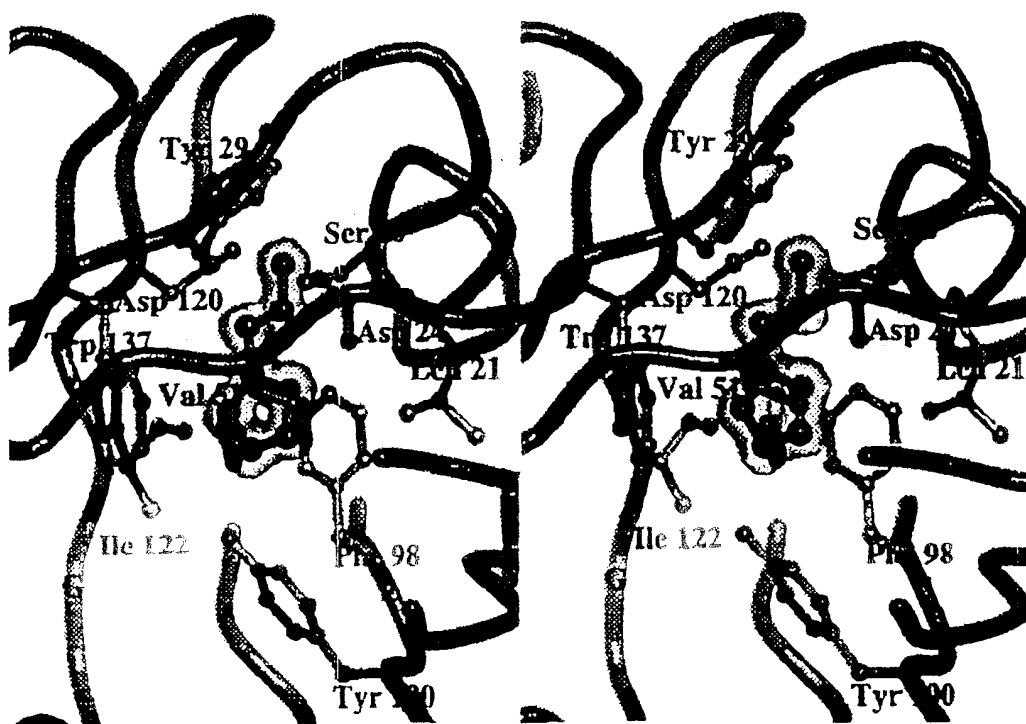


图 21(b)



图 21(c)

[illegible]

i	h	b	h	b	3
i	h	b	h	b	4
i	h	b	h	b	5
s	-	H	B	P	1
s	-	H	B	P	2
s	-	H	B	P	1
i	h	b	h	b	1
i	h	b	h	b	2
d	-	R	E	T	6
a	v	h	b	r	e
r	a	-	r	e	s

ihhbp3	VNNY	TTAA	ARRA	LRKA	QVQD	DDYY	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	157
ihhbp4	VNNY	TTAA	ARRA	LRKA	QVQD	DDYY	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	158
ihhbp5	TTFT	IPV	RRRA	LNQ	TKM	YGY	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	159
S-HBP1	TTFE	EKA	TPD	DKM	YGY	Y	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	160
S-HBP2	TTFE	EKA	TPD	DKM	YGY	Y	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	161
ihhbp1	TTEN	VT	TTA	VQ	EEG	Y	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	162
ihhbp2	TTEN	VT	TTA	VQ	EEG	Y	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	163
d-ret6	VTEN	VT	TTA	VQ	EEG	Y	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	164
avhbp	VTEN	VT	TTA	VQ	EEG	Y	Y	EESS	ENEN	VVVR	VNVL	GTG	GGV	PSN	DTV	PP	LG	SVY	VEY	YGN	YSC	SS	ST	PP	165
a-res	VNQT	IT	RR	Q	EY	EP	N	Y	TA	GD	Y	N	SS	PP	AS	Y	LF	GY	TC	SS	CA	V	V	Y	166

22

[illegible]

22(续)