



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106977609 B

(45)授权公告日 2020.07.28

(21)申请号 201710257101.0

(22)申请日 2017.04.19

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106977609 A

(43)申请公布日 2017.07.25

(73)专利权人 刘崇东
地址 100020 北京市朝阳区白家庄路甲8号

(72)发明人 朱志清 张震宇

(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
A61K 38/38(2006.01)
A61K 47/68(2017.01)
A61P 15/00(2006.01)
A61P 9/12(2006.01)

(56)对比文件
WO 2009/125423 A2,2009.10.15,

US 2003/195154 A1,2003.10.16,
US 5869057 A,1999.02.09,
CN 1361181 A,2002.07.31,
US 2005/191742 A1,2005.09.01,
US 7767422 B2,2010.08.03,
WO 2010/091253 A1,2010.08.12,
US 2011/243943 A1,2011.10.06,
Nadaud, Philippe等.Expression and
purification of a recombinant
amyloidogenic peptide from transthyretin
for solid-state NMR spectroscopy.《PROTEIN
EXPRESSION AND PURIFICATION》.2010,第70卷
(第1期),

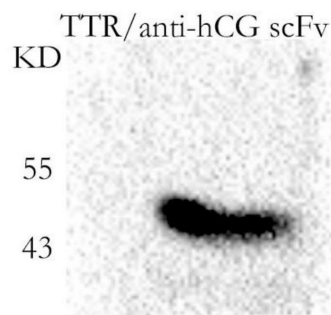
刘崇东等.转甲状腺蛋白在重度子痫前期及
胎儿生长受限孕妇血清中的表达及意义.《现代
妇产科进展》.2016,第25卷(第11期),

审查员 修旺珊

权利要求书1页 说明书11页
序列表2页 附图9页

(54)发明名称
一种融合蛋白、制备方法及其应用

(57)摘要
本发明提供一种融合蛋白、制备方法及其应
用。本发明所述融合蛋白包括anti-hCG scFv与
TTR蛋白融合后的蛋白。本发明通过将anti-hCG
scFv与TTR蛋白进行融合,既能避免抗体分子量
过大无法正确折叠的问题,又能特异性结合体内
hCG,将TTR蛋白靶向到胎盘局部起作用。本发明
所述的融合蛋白可以用于治疗子痫前期疾病。



1. 一种融合蛋白,其特征在于,所述融合蛋白为anti-hCG scFv、连接肽、转甲状腺素蛋白融合后的蛋白;所述融合蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。
2. 一种编码权利要求1所述融合蛋白的核苷酸。
3. 一种包括权利要求1所述融合蛋白的载体、重组细胞或重组菌。
4. 一种融合蛋白的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:构建含有权利要求1所述融合蛋白的表达系统,利用该表达系统表达融合蛋白。
5. 根据权利要求4所述融合蛋白的制备方法,其特征在于,还包括对表达系统表达融合蛋白的纯化步骤。
6. 根据权利要求4所述融合蛋白的制备方法,其特征在于,构建表达系统的具体步骤为:将表达SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的核苷酸序列克隆到proEM系统中,并转化到大肠杆菌中制备转染级质粒,之后将转染质粒转染到哺乳动物细胞 HEK293中进行瞬时表达;或构建表达系统的具体步骤为:构建含有表达SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的基因的慢病毒表达载体与慢病毒包装载体共转染到293T细胞中,经慢病毒包装、复制后,收获含有慢病毒的上清液,利用慢病毒的上清液感染滋养细胞,利用感染慢病毒的滋养细胞表达融合蛋白。
7. 一种权利要求1所述的融合蛋白在制备治疗子痫前期疾病药物中的应用。

一种融合蛋白、制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,尤其涉及一种融合蛋白、制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 妊娠期高血压疾病包括妊娠期高血压、子痫前期、子痫、慢性高血压并发子痫前期、妊娠合并慢性高血压病。多发生于妊娠20周以后,以高血压、蛋白尿为主要特征,妊娠32周左右迅速发展,可伴全身多器官功能损害或功能衰竭;严重者可出现脑水肿、抽搐、昏迷,甚至死亡。我国妊娠期高血压疾病发病率为9.4-10.4%,国外为7%-12%。

[0003] 妊娠期高血压疾病的基础病变是不同程度的全身小动脉痉挛,血管内皮细胞损伤及缺血、缺氧等;严重者出现子痫前期或子痫,常累及脑、心、肺、肝、肾等器官,临床表现多样性、病情骤变,危及孕、产妇生命;影响胎盘功能,导致胎儿宫内生长受限等;威胁母婴健康,是导致孕产妇和围生儿病率和死亡的重要原因之一。

[0004] 妊娠期高血压疾病病因尚未完全阐明,发病机制复杂,炎症、细胞凋亡、免疫、氧化应激等均参与疾病的发生与发展。子痫前期的发病大致可归纳为两个阶段:(1) 胎盘形成不良:子痫前期病变时,滋养细胞侵蚀不完全,螺旋小动脉“血管重铸”障碍,引起管腔狭窄可导致胎盘血流减少;(2) 氧化应激:胎盘缺血、缺氧后,氧化应激反应释放的炎性因子等进入母体循环可血管内皮细胞受损,从而产生一系列的子痫前期的临床表现。

[0005] 妊娠期高血压疾病现有治疗方法:一般处理、镇静、解痉、降压、利尿、终止妊娠等,终止妊娠是治疗妊娠期高血压疾病的有效措施。

[0006] 存在的问题:现有治疗方法为一般对症治疗,不具有特异性,无法在妊娠早期改善胎盘血管重铸及胎盘浅着床问题,无法阻止疾病的进展,同时带来了早产等一系列问题。近年来国内外专家致力于寻找妊娠期高血压疾病的预测因子以及治疗方法,以期改善母胎预后。

[0007] 转甲状腺素蛋白(Transthyretin, TTR)是一种分子量为55KDa的前白蛋白,是由四个完全相同的亚基聚合而成的四聚体蛋白。主要由肝脏、脉络丛、卵黄囊、胰腺、肠道等合成,妊娠期可由胎盘滋养细胞合成分泌。主要作用为转运甲状腺激素和视黄醇。TTR在血管壁的异常沉积与淀粉样变性相关疾病有关,如老年性系统性淀粉样变(SSA)、家族性淀粉样多神经病(FAP)、家族性淀粉样心肌病(FAC)、中枢神经系统相关淀粉样变(CNSA)等。

[0008] 融合蛋白技术是一项是通过DNA重组技术得到的两个基因重组后的表达产物。作为生物治疗的一种,融合蛋白技术在肿瘤治疗中已经成为继手术、化疗、放疗后第四种重要的治疗方法,根据融合的形式以及内容不同,它具备靶向运输、调节免疫等作用,效能高、副作用少,在临床上取得非常显著的疗效。然而生物治疗较少涉及肿瘤以外领域,在子痫前期疾病当中更是前所未有的。

[0009] DNA疫苗。目前,疫苗已经经历了三代:第一代疫苗是用减毒或杀死的病原体来激活机体免疫系统;第二代疫苗是用生物技术和重组DNA技术研制的组分疫苗注射机体诱导免疫应答;第三代疫苗是直接注射基因重组的抗原基因来激活人体免疫系统,即DNA疫苗。

DNA疫苗与传统疫苗相比有着明显的优势,如易于生产,稳定性强,成本低廉等,并可同时诱导体液与细胞免疫应答。目前利用基因工程成功制成的多价重组抗体融合蛋白CYF196(国内尚未上市)就是一种DNA疫苗,它能有效防治下呼吸道感染和哮喘。因为CYF196对病毒的主要受体-位于呼吸道上皮中的细胞间黏附分子有高度亲和力,对鼻病毒感染有较强的防御功能。

[0010] 疫苗为免疫性生物制剂,应用的前提为机体必须存在正常的免疫应答机制,疫苗注射为一种主动免疫,只用于疾病前预防,且效能与机体状态及个体差异相关。DNA重组技术使得获取大量纯抗原分子成为可能。这与以病原体为原料制备的疫苗相比在技术上发生了革命性变化,使得质量更易控制。从效果来看,有些疫苗的免疫力较低,要求比铝盐更强的佐剂。肽疫苗通常由化学合成技术制造。但随着免疫原分子量和结构复杂性的降低,免疫原性也显著降低。因此,这些疫苗一般需要特殊的结构设计、特殊的递送系统或佐剂。此外疫苗只有预防作用,并无治疗作用,如对于疾病已经存在的状态注射疫苗无效。

[0011] 靶向药物一般由两部分组成:一部分是药物;另一部分是可以与病灶特异性结合的配基。通过融合蛋白技术将这两部分融合在一起,即可构成一个具有独特构象与功能的蛋白质。由配基将药物带到靶点,在靶器官周围形成局部高药物浓度,从而起到治疗作用。

[0012] 靶向药物将配基与药物结合,无论是配体还是药物都存在一定问题:配基:很难找到特异性配体受体,从而达到特异性结合目的,将药物带到靶器官,往往是机体多个部位、器官、组织、细胞都存在同样受体或受体亚型或竞争性,各器官、组织因部位不同、受体表达情况不同、机体状态不同而对配体有不同亲和力,由于这种不特异的情况存在,往往导致配体无法将药物准确带目的受体处发挥作用,从而导致“脱靶”现象存在,药效降低,机体负担增加,更有甚者发挥治疗相反的作用产生有害结果。药物:药物若无特殊处理,进入血液中会导致药物溶解、释放、后随血液到达全身各处,丧失作为靶向作用的意义,此时就需要工程学方面的特殊处理,使药物避免肝脏首过消除,避免不必要的血液运输过程中的浪费,但此技术需要探讨和完善,另外,这样的处理会增加极大的费用负担。

发明内容

[0013] 鉴于现有技术所存在的问题,本发明提供一种融合蛋白、制备方法及其应用,通过将anti-hCG scFv与ttr蛋白进行融合,既能避免抗体分子量过大无法正确折叠的问题,又能特异性结合体内hCG,将ttr蛋白靶向到胎盘局部起作用。

[0014] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:

[0015] 一种融合蛋白,所述融合蛋白包括anti-hCG scFv与TTR蛋白融合后的蛋白。

[0016] 本研究的关键问题是特异性目标蛋白的分离及其与hCG抗体的融合,寻找高纯度的目标蛋白可以称为该研究领域内的制高点,蕴藏深远的学术价值和巨大商机。西方发达国家凭借其强大的生物、医学基础,合作方在此领域内已经开始了广泛探索,细胞抗原的提纯、分离技术居世界前列,可以分离到细胞的单个抗原,但是鲜有文章和技术标准发表,这种沉默状态意味着技术垄断和封闭,疾病特异蛋白的分离与制备相关知识产权是各国科学家和医药企业争夺的焦点,我国虽有庞大的患病人群,但在此领域的研究尚未突破,此项研究将解决关键瓶颈技术。妊娠期高血压患者特异性致病蛋白的识别、分离、制备技术极为复杂,我国鲜有独立发现疾病致病蛋白的报道,为此,建立妊娠期高血压特异性蛋白分离、提

纯方法和融合蛋白制备技术体系,为我国妊娠期高血压疾病的防治技术发展提供基础。

[0017] 利用hCG抗体与胎盘合体滋养细胞合成的hCG特异性结合,且hCG胎盘局部高浓度分布的特点,将hCG抗体与TTR蛋白进行融合,以期待hCG抗体蛋白可将TTR蛋白特异性靶向作用在胎盘局部,使胎盘局部TTR浓度升高,起到特异性添加胎盘局部TTR蛋白的作用,从而观察TTR补充后对胎盘的影响,以及在高血压疾病中起到的作用。由于anti-hCG抗体为IgG抗体,分子量约270KD左右,比较大,难以在原核、真核系统中合成并正确折叠,而IgG抗体中与抗原特异性结合的位置在可变区,包括重链可变区和轻链可变区,即VH+VL (Variable area Heavy, Variable area Light),因此,将anti-hCG scFv与TTR蛋白进行融合,既能避免抗体分子量过大无法正确折叠的问题,又能特异性结合体内hCG,将TTR蛋白靶向到胎盘局部起作用。

[0018] 进一步,上述蛋白对应的氨基酸序列中还包括连接肽序列。通过连接肽序列将各部分氨基酸序列串联在一起,从而获得anti-hCG scFv与TTR的融合蛋白。

[0019] 进一步,所述融合蛋白包括SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

[0020] 进一步,anti-hCG scFv序列为鼠抗人hCG。

[0021] 抗体一般都是某种动物抗人产生的,制备过程大概原理是以人的某种抗原免疫某种动物,然后动物产生抗这种抗原的抗体,进行单克隆制备。

[0022] anti-hCG scFv的含义为抗hCG的scFv。

[0023] hCG即人绒毛膜促性腺激素是由胎盘的滋养层细胞分泌的一种糖蛋白,它是由 α 和 β 二聚体的糖蛋白组成。

[0024] scFv为单链抗体(single-chain antibody fragment的简写),scFv由抗体重链可变区和轻链可变区通过15~20个氨基酸的短肽(linker)连接而成。

[0025] anti-hCG scFv即能够特异性识别hCG抗原的抗体可变区。

[0026] 本发明还提供一种编码上述融合蛋白的核苷酸序列。

[0027] 进一步,所述核苷酸序列还包括密码子优化序列。

[0028] 密码子优化是基因表达优化的关键步骤之一。其中涉及mRNA二级结构、稀有密码子、核糖体结合位点等关键因素。简单说,基因能否顺利表达蛋白与稀有密码子含量、mRNA结构是否阻碍翻译有很大关系。

[0029] 可以采用密码子优化软件对提供的anti-hCG scFv-ttr蛋白氨基酸序列进行优化,遗传密码有64种,但是绝大多数生物倾向于利用这些密码子中的一部分。那些被最频繁利用的称为最佳密码子(optimal codons),那些不被经常利用的称为稀有或利用率低的密码子(rare or low-usage codons)。重新设计合成基因可以去除或改变这些序列,导致高水平表达。消除稀有密码子、去除任何去稳定序列和利用最佳密码子的基因的重新设计都可能增加蛋白产量,使的蛋白生产更有效和经济。

[0030] 进一步,所述核苷酸序列包括SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。

[0031] SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列为密码子优化后的序列,采用该序列有利于提高融合蛋白的产量。

[0032] 本发明提供一种包括上述融合蛋白的载体、重组细胞或重组菌。

[0033] 本发明提供一种融合蛋白的制备方法,构建含有上述融合蛋白的表达系统,利用该表达系统表达融合蛋白。

[0034] 进一步,还包括对表达系统表达融合蛋白的纯化的步骤。

[0035] 进一步构建表达系统的具体步骤为:将表达SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的核苷酸序列克隆到proEM系统中,并转化到大肠杆菌中制备转染级质粒,之后将转染质粒转染到哺乳动物细胞HEK293中进行瞬时表达。

[0036] 进一步,构建表达系统的具体步骤为:构建含有上述融合蛋白的基因的慢病毒表达载体与慢病毒包装载体共转染到293T细胞中,经慢病毒包装、复制后,收获含有慢病毒的上清液,利用慢病毒的上清液感染滋养细胞,利用感染慢病毒的滋养细胞表达融合蛋白。

[0037] 本发明还提供一种上述的融合蛋白在制备治疗子痫前期疾病药物中的应用。

[0038] 本发明所述的融合蛋白可以填补子痫前期治疗方面药物应用的空白;将子痫前期治疗干预时间窗提前,在早期靶向补充融合蛋白,定向提高胎盘局部TTR浓度,改善胎盘血管重铸,从病因上纠正疾病。

附图说明

[0039] 图1为表达质粒测序结果。

[0040] 图2为表达质粒双酶切的结果图。

[0041] 图3为提取转染级质粒并用1%琼脂糖进行凝胶分析的结果。LaneM:DNA marker; Lane 1:3000-5000bp之间的条带转染级质粒,大约4171bp。

[0042] 图4为利用Native-PAGE分析TTR/anti-hCG scFv融合蛋白纯化的结果。Lane M:SDS-PAGE Protein marker;Lane1:离心后上清;Lane 2:上清同Ni-IDA孵育后流出液;Lane 3-6:洗脱组分,非变性胶不含去污剂和强还原剂,在电泳的过程中,蛋白质能够保持完整四聚体状态,目标条带位于超过120kD位置,分子量大约为180kD。

[0043] 图5为利用SDS-PAGE分析TTR/anti-hCG scFv融合蛋白纯化的结果。Lane M:SDS-PAGE Protein marker;Lane1:离心后上清;Lane 2:上清同Ni-IDA孵育后流出液;Lane 3-6:洗脱组分,由于变性胶中有强还原剂和去污剂SDS,蛋白变性,四聚体蛋白解聚为单体,目的条带位于40-60kD之间,分子量约为45kD。

[0044] 图6为利用Bradford法测蛋白浓度的结果。根据吸光度对BSA浓度的关系曲线为 $y = 3.3065x + 0.6539$, $R^2 = 0.9984$,根据蛋白OD值,通过公式计算蛋白浓度为0.259mg/ml。

[0045] 图7为TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白Western-blot鉴定。一抗为兔抗人TTR单抗(Abcam;1:2500),二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Abcam;1:2000)。Lane 1-3分别加入1 μ l、2 μ l、3 μ l TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白,制胶过程不加SDS,蛋白未经变性处理且加入不含强还原剂的蛋白上样缓冲液。目的条带位于170-210kD之间,约180kD。

[0046] 图8为TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白的Western-blot鉴定结果。一抗为兔抗人TTR单抗(Abcam;1:2500),二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(Abcam;1:2000)。目标蛋白上样前经过变性处理且加入含强还原剂的蛋白上样缓冲液,四聚体蛋白解聚为单体,目的条带位于43-55kD之间,约45kD。

[0047] 图9.1为验证TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进HTR-8/Svneo细胞迁移的实验结果。Transwell迁移实验用来评估不同浓度各组蛋白对细胞迁移能力的影响,图A-D是添加TTR蛋白组,E-H是添加anti-hCG抗体组,I-L是添加TTR/anti-hCG scFv融合蛋白组,各组添加蛋白浓度从左至右、由上到下依次为A.100ng/ μ l,B.10ng/ μ l,C.1ng/ μ l,D.0ng/ μ l,

E.100ng/ul,F.10ng/ul,G.1ng/ul,H.0ng/ul,I.100ng/ul,J.10ng/ul,K.1ng/ul,L.0ng/ul。

[0048] 图9.2为验证TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进HTR-8/Svneo细胞迁移的实验结果;图a.TTR能促进滋养细胞迁移,且迁移能力随在蛋白浓度为100ng/ul时最高,*表示两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。图b.anti-hCG不能促进滋养细胞迁移,各组间无明显差异。图c.TTR/anti-hCG scFv能够促进滋养细胞迁移,且迁移能力随蛋白浓度增加而提高,*表示两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。图d.100ng/ul浓度各组蛋白相比较,TTR和TTR/anti-hCG scFv均能促进细胞迁移,且二者之间无差异。

[0049] 图10.1为验证TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进HTR-8/Svneo细胞侵袭的结果。Transwell迁移实验用来评估不同浓度各组蛋白对细胞侵袭能力的影响,图A-D是添加TTR蛋白组,E-H是添加anti-hCG抗体组,I-L是添加融合蛋白组,各组添加蛋白浓度从左至右依次为A.100ng/ul,B.10ng/ul,C.1ng/ul,D.0ng/ul,E.100ng/ul,F.10ng/ul,G.1ng/ul,H.0ng/ul,I.100ng/ul,J.10ng/ul,K.1ng/ul,L.0ng/ul。

[0050] 图10.2为验证TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进HTR-8/Svneo细胞侵袭的结果。图a.TTR能促进滋养细胞侵袭,且蛋白浓度为100ng/ul时侵袭能力最强,*表示两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。图b.anti-hCG不能促进滋养细胞侵袭,各组间无明显差异。图c.TTR/anti-hCG scFv能够促进滋养细胞侵袭,且蛋白浓度为100ng/ul时侵袭能力最强,*表示两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。图d.100ng/ul浓度各组蛋白相比较,TTR和TTR/anti-hCG scFv均能促进细胞侵袭,且二者之间无差异。

[0051] 图11为用CCK-8法评估不同浓度各组蛋白对细胞增殖能力的影响。图a.为100ng/ul浓度下各组蛋白对HTR-8/Svneo细胞增殖能力影响,其中TTR组能够明显促进细胞增殖,*表示两组间差异有统计学意义($P<0.05$),TTR/anti-hCG scFv融合蛋白对细胞增殖能力有促进作用,但与TTR组相比效果不显著。图b.为10ng/ul浓度下各组蛋白对HTR-8/Svneo细胞增殖能力影响,各组差异不明显。图c.为1ng/ul浓度下各组蛋白对HTR-8/Svneo细胞增殖能力影响,各组差异不明显。

[0052] 图12为慢病毒表达载体构建过程图。

[0053] 图13为慢病毒转染至滋养细胞的过程图。

[0054] 图14为慢病毒转染至滋养细胞后TTR/anti-hCG scFv融合蛋白基因在细胞中表达的过程图。

具体实施方式

[0055] 以下结合附图对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0056] TTR蛋白序列来源于NCBI,NCBI Reference Sequence:NP_000362.1。

[0057] anti-hCG scFv序列为鼠抗人hCG。分别选取anti-hCG scFv中的重链部分和轻链部分。

[0058] Heavy Chain:Link:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1SBS_H。简称为包含VH的序列,其具体氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0059] SEQ ID NO.2所示氨基酸序列如下:

1 evnleesggg lvqpggsmkl scvasgftfs nywmnwvrqs pekglewvad irlksnnyat
 61 lyaesvkgrf tisrddskss vylqmnlnra edtgiyyctr gayrydyam dywgqgtsvt
 [0060] 121 vssakttpps vyplapgsaa qtnsmvtlgc lvkgyfpepv tvtnwsgsls sgvhtfpavl
 181 qsdytlss vtvpsprps etvtcnvahp asstkvdkki vp

[0061] 在SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列中选取了具有下划线部分的氨基酸序列,该部分序列为可变区的序列,作为VH序列。

[0062] Light Chain:Link:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1SBS_L。简称为包含VL的序列,其具体氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0063] SEQ ID NO.3所示氨基酸序列具体如下:

1 divmsqspss lavsvgekv mtckssqsl yssnqmnyla wyqqkpgqsp klliywastr
 61 esgvpdrftg sgsdtdftlt issveaedla vycqyhsy pftfgsgtkl eikradaapt
 [0064] 121 vsifppsseq ltsggasvvc flnnfypkdi nvkwkidgse rqnqvlswt dqskdstys
 181 msstltltdk eyerhnsytc eathktstsp ivksfnrnc

[0065] 在SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列中选取了具有下划线部分的氨基酸序列,该部分序列为可变区的序列,作为VL序列。

[0066] 将VL序列、VH序列和ttr序列组合到一起,并在VL序列和VH序列之间设置连接肽序列GGGGSGGGSGGGGS、在VH序列和ttr序列之间设置连接肽序列GGGGSGGGGS,组合成VL+VH+ttr序列,即SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

[0067] VL+VH+ttr序列的氨基酸序列信息如下:

1 divmsqspss lavsvgekv mtckssqsl yssnqmnyla wyqqkpgqsp klliywastr
 61 esgvpdrftg sgsdtdftlt issveaedla vycqyhsy pftfgsgtkl eikr
 [0068] GGGGSGGGSGGGGS

1 evnleesggg lvqpggsmkl scvasgftfs nywmnwvrqs pekglewvad irlksnnyat
 61 lyaesvkgrf tisrddskss vylqmnlnra edtgiyyctr gayrydyam dywgqgtsvt
 121 vss GGGGSGGGGS
 [0069] GPTGTGESKCLPMVKVL DAVRGSPAIN VAVHVFRKAA DDTWEPFASG KTSESGELHG LTTEEFVEG

301 IYKVEIDTKS YWKALGISPF HEHAEVFTA NDSGPRRYTI AALLSPYSYS TTAVVTNPKE

[0070] 其中氨基酸序列GGGGSGGGSGGGGS和氨基酸序列GGGGSGGGGS均为连接肽,通过这些序列可以将VL和VH以及ttr进行连接,这是融合蛋白串联融合设计的步骤,必须以连接肽将各部分串联,这段连接肽不能太长,也不能太短,序列过长或过短都会影响蛋白折叠。

[0071] 为了提高目标蛋白的表达量以及稳定性,通常需要优化目标蛋白序列,在真核体内,蛋白成熟过程中,信号肽会被自动切除,信号肽的存在,会使蛋白没活性,所以在重组表

达设计时,会先删除信号肽,即信号肽的序列并未包含在VL+VH+ttr序列中。

[0072] 根据VL+VH+ttr序列的氨基酸序列信息并通过密码子优化的方法获得SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。

[0073] 利用全基因合成方法,将目标基因序列(即SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列)切割成大小不等(28-50bp左右)的片段,采用化学合成的方法(该步骤由德泰(南京)生物技术公司完成)得到序列设计全长拼接引物,将目标基因亚克隆到proEM系统中,并转化到大肠杆菌中制备转染级质粒,之后将转染质粒转染到哺乳动物细胞HEK293 (Life Technologies购买)中进行瞬时表达。

[0074] 实施例1构建并表达目标序列(即VL+VH+ttr序列)

[0075] VL+VH+ttr序列的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列如下。

[0076]

```

1      DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT MTCKSSQSLL YSSNQMNyla WYQQKPGQSP KLLIYWASTR
61     ESGVPDRFTG SSGTDFTLT ISSVEAEDLA VYYCQQYHSY PFTFGSGTKL EIKRGGGGSG
121    GGGSGGGGSE VNLEESGGGL VQPGGSMKLS CVASGFTFSN YWMNWVRQSP EGGLEWADI
181    RLKSNNYATL YAESVKGRFT ISRDDSKSSV YLQMNNLRAE DTGIYYCTRG AYYRYDYAMD
[0077] 241    YWGQTSVTV SSGGGGSGGG GSGPTGTGES KCPLMVKVLD AVRGSPAINV AVHVFRKAAD
301    DTWEPFASGK TSESGELHGL TTEEEFVEGI YKVEIDTKSY WKALGISPFH EHAEVVFTAN
361    DSGPRRYTIA ALLSPYSYST TAVVTNPKE

```

[0078] 能够表达上述氨基酸的序列的核苷酸序列为SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列。

[0079] 将SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列克隆到表达载体ProEM(德泰(南京)生物技术公司)中构建表达质粒,表达质粒命名为pGH-DT1555。表达质粒经测序后利用BLAST进行比对。比对结果如图1所示,从图1可以看出,测序结果与原始序列100%匹配。

[0080] 将表达质粒利用Hin dIII双酶切验证。如图2所示,为表达质粒的双酶切后利用1%琼脂糖凝胶分析的结果示意图。从图2中可以看出,经双酶切后可以获得大约1278bp和2000-3000bp的条带,与预期结果一致。

[0081] 实施例2制备转染级质粒

[0082] 以pGH-DT1555表达质粒为模板,设计全长拼接引物,将目标基因(即包括SEQ ID NO.4的核苷酸序列)亚克隆到proEM系统中,载体为pcDNA3.1载体(德泰(南京)生物技术公司),并转化到大肠杆菌中制备转染级质粒,命名为TTR/anti-hCG scFv转染质粒。TTR/anti-hCG scFv转染质粒的DNA测量结果如表1所示。

[0083] 表1

[0084]

检测内容	转染级质粒标准	目标质粒检测结果
A260/280	1.8-2.0	1.86
内毒素 (EU/mg) *	<50	<50
无菌检测**	无菌	无菌

[0085] 表1中,*代表利用鲎试剂检测,**代表利用LB平板检测。

[0086] 转染级质粒扩增抽提:将抽提后的TTR/anti-hCG scFv转染质粒用1%琼脂糖凝胶分析,结果如图3所示。从图3中可以看出,TTR/anti-hCG scFv转染质粒的大小大约为4171bp。

[0087] 实施例4scFv-ttr蛋白纯化

[0088] TTR/anti-hCG scFv转染质粒转染HEK293细胞:将抽提后的TTR/anti-hCG scFv转染质粒通过转染试剂转染到1L的HEK293细胞中,置于培养箱中,37℃,5%CO₂培养,6天后取样纯化。

[0089] 转染有TTR/anti-hCG scFv转染质粒的HEK293细胞表达的蛋白命名为TTR/anti-hCG scFv融合蛋白。

[0090] 纯化的方法为:

[0091] 取转染培养6天后的细胞培养液离心,上清用0.22um膜过滤,在4℃环境下透析至缓冲液25mM Tris,150mM NaCl,pH8.0中,透析结束后再用Ni-IDA柱纯化。

[0092] 经Ni-IDA亲和层析纯化,目标蛋白(即TTR/anti-hCG scFv融合蛋白)主要存在于洗脱组分,收集上述目标蛋白将其透析到1XPBS,20%Glycerol,pH 7.4中,透析结束后用0.22um膜过滤,并分装冻于-80℃,备用。

[0093] 分别采用Native-PAGE和SDS-PAGE分析TTR/anti-hCG scFv融合蛋白纯化的结果。

[0094] 操作方法为:取分装冻于-80℃目标蛋白中的留样20ul,加入20ul的2xSDS还原性上样缓冲液迅速在100℃加热样品10min使蛋白变性;再取分装冻于-80℃蛋白中的留样20ul,加入20ul的2xSDS非还原性上样缓冲液,然后一并12000rpm x 5min x 4℃离心取上清电泳。电泳前10min 100V稳压电泳,之后溴酚蓝指示剂进入分离胶200V稳压电泳至溴酚蓝带迁移至凝胶底部1cm。取出凝胶用考马斯亮兰染色液染色,随后转入脱色液中,脱色至背景清晰。

[0095] TTR/anti-hCG scFv融合蛋白纯化后Native-PAGE检测融合蛋白的分子量。图4为Native-PAGE分析TTR/anti-hCG scFv融合蛋白纯化的结果,Lane M为SDS-PAGE Protein marker;Lane1为离心后上清;Lane 2为上清同Ni-IDA孵育后流出液;Lane 3-6分别为洗脱组分。电泳过程中采用是Native-PAGE,Native-PAGE是不含强还原剂和去污剂,是非变性胶。从图4中可以看出,在电泳的过程中,TTR/anti-hCG scFv融合蛋白质能够保持完整四聚体状态,目标条带位于超过120kD位置,分子量大约为180kD。

[0096] 图5为SDS-PAGE分析TTR/anti-hCG scFv融合蛋白纯化的结果。Lane M为SDS-PAGE Protein marker;Lane1为离心后上清;Lane 2为上清同Ni-IDA孵育后流出液;Lane 3-6:分别为洗脱组分。从图5中可以看出,由于变性胶中有强还原剂和去污剂SDS,TTR/anti-hCG scFv融合蛋白变性,四聚体蛋白解聚为单体,目的条带位于40-60kD之间,分子量约为45kD。

[0097] 通过上述实验可以说明TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够被表达和提纯。

[0098] 实施例5 TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白质检。

[0099] 实施例5.1 TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白稳定性试验

[0100] 取一支分装后冻于-80℃的TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白,放置于冰水混合物中待其缓慢融化,观察融化后并无异常现象,说明本发明获得的TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白具有稳定性好的优点。

[0101] 实施例5.2 TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白浓度测定

[0102] 表2 BSA标准品配制及OD值测定

[0103] BSA浓度 (mg/ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
OD _{595nm}	0.998	0.914	0.854	0.780	0.727	0.652

[0104] 图6为利用Bradford法测蛋白浓度结果。根据吸光度对BSA浓度的关系曲线为 $y = 3.3065x + 0.6539$, $R^2 = 0.9984$, 根据蛋白OD值, 通过公式计算蛋白浓度为0.259mg/ml。

[0105] 实施例5.3 TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白Western-blot鉴定

[0106] 图7为TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白Western-blot鉴定。一抗为兔抗人TTR单抗 (Abcam; 1:2500), 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (Abcam; 1:2000)。Lane 1-3 分别加入1 μ l、2 μ l、3 μ l TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白, 制胶过程不加SDS, 蛋白未经变性处理且加入的蛋白上样缓冲液中不含强还原剂。从图7可以看出, 目的条带位于170-210kD之间, 约180kD。

[0107] 图8为TTR/anti-hCG ScFvWestern-blot鉴定。一抗为兔抗人TTR单抗 (Abcam; 1:2500), 二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 (Abcam; 1:2000)。目标蛋白TTR/anti-hCG scFv融合蛋白上样前经过变性处理且加入的蛋白上样缓冲液中含强还原剂。从图8中可以看出, 四聚体蛋白解聚为单体, 目的条带位于43-55kD之间, 约45kD。

[0108] 通过Western-blot实验证明了所述TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白即目标蛋白。

[0109] 实施例6 TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白增强HTR-8/Svneo细胞迁移能力的验证

[0110] 图9.1和图9.2均表明TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进HTR-8/Svneo细胞迁移能力的结果。利用Transwell迁移实验用来评估不同浓度各组蛋白对细胞迁移能力的影响, 图9.1中的A-D是分别添加TTR蛋白组, E-H是分别添加anti-hCG抗体组, I-L是分别添加TTR/anti-hCG scFv融合蛋白组, 各组添加蛋白浓度从左至右、从上到下依次为A. 100ng/ μ l, B. 10ng/ μ l, C. 1ng/ μ l, D. 0ng/ μ l, E. 100ng/ μ l, F. 10ng/ μ l, G. 1ng/ μ l, H. 0ng/ μ l, I. 100ng/ μ l, J. 10ng/ μ l, K. 1ng/ μ l, L. 0ng/ μ l。

[0111] 根据图9.2的TTR/anti-hCG scFv融合蛋白促进HTR-8/Svneo细胞迁移能力的结果。图9.2中的图a. 可以看出TTR能促进滋养细胞迁移, 且迁移能力随在蛋白浓度为100ng/ μ l时最高, *表示两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。图9.2中的图b. 可以看出anti-hCG不能促进滋养细胞迁移, 各组间无明显差异。图9.2中的图c. 可以看出TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进滋养细胞迁移, 且迁移能力随蛋白浓度增加而提高, *表示两组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。图9.2中的图d. 为100ng/ μ l浓度各组蛋白相比较的结果, TTR和TTR/anti-hCG scFv均能促进细胞迁移, 且二者之间无差异。

[0112] 实施例7 TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白增强HTR-8/Svneo细胞侵袭能力的验证

[0113] 图10.1和图10.2均可以表明TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进HTR-8/Svneo细胞侵袭。

[0114] Transwell迁移实验用来评估不同浓度各组蛋白对细胞侵袭能力的影响, 图10.1中, 图A-D是添加TTR蛋白组, E-H是添加anti-hCG抗体组, I-L是添加TTR/anti-hCG scFv融合蛋白组, 各组添加蛋白浓度从左至右、由上到下依次为A. 100ng/ μ l, B. 10ng/ μ l, C. 1ng/ μ l, D. 0ng/ μ l, E. 100ng/ μ l, F. 10ng/ μ l, G. 1ng/ μ l, H. 0ng/ μ l, I. 100ng/ μ l, J. 10ng/ μ l, K. 1ng/ μ l, L. 0ng/ μ l。

[0115] 图10.2中图a. 表明TTR能促进滋养细胞侵袭, 且蛋白浓度为100ng/ μ l时侵袭能力

最强,*表示两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。图10.2中图b.表明anti-hCG不能促进滋养细胞侵袭,各组间无明显差异。图10.2中图c.表明TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进滋养细胞侵袭,且蛋白浓度为100ng/u1时侵袭能力最强,*表示两组间差异有统计学意义($P<0.05$)。图10.2中图d.表明100ng/u1浓度各组蛋白相比较,TTR和TTR/anti-hCG scFv均能促进细胞侵袭,且二者之间无差异。

[0116] 实施例8 TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白增强HTR-8/Svneo细胞增殖能力的验证

[0117] 图11可以看出TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够促进HTR-8/Svneo细胞增殖,但与空白对照组相比无统计学意义。

[0118] 用CCK-8法评估不同浓度各组蛋白对细胞增殖能力的影响。图11中的图a表明100ng/u1浓度下各组蛋白对HTR-8/Svneo细胞增殖能力影响,其中TTR组能够明显促进细胞增殖,*表示两组间差异有统计学意义($P<0.05$),TTR/anti-hCG scFv融合蛋白对细胞增殖能力有促进作用,但与TTR组相比效果不显著。图11中的图b表明10ng/u1浓度下各组蛋白对HTR-8/Svneo细胞增殖能力影响,各组差异不明显。图11中的图c表明1ng/u1浓度下各组蛋白对HTR-8/Svneo细胞增殖能力影响,各组差异不明显。

[0119] 综上所述,根据实施例1至实施例8可以看出TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白能够增强HTR-8/Svneo细胞迁移能力、增强HTR-8/Svneo细胞侵袭能力以及促进HTR-8/Svneo细胞增殖。

[0120] HTR-8/Svneo细胞株是人早孕滋养细胞株,TTR/anti-hCG scFv融合蛋白能够增强HTR-8/Svneo细胞侵袭、迁移和增殖,说明融合蛋白能够有利于改善胚胎早期浅着床问题,从而证明本申请制备的融合蛋白可能为子痫前期的治疗提供了新的方向和思路。

[0121] 通过将anti-hCG scFv与TTR蛋白进行融合,既能避免抗体分子量过大无法正确折叠的问题,又能特异性结合体内hCG,将TTR蛋白靶向到胎盘局部起作用。通过上述的实验证明了TTR/anti-hCG scFv融合蛋白确实有促进滋养细胞侵袭能力、迁移能力、增殖能力的作用,因此此融合蛋白可能为子痫前期的治疗提供了新的可能性。

[0122] 子痫前期的发病与胎盘的浅着床有关系,这在前边已经提到过,胎盘的浅着床就是因为滋养细胞的侵袭能力不足,而TTR/anti-hCG scFv融合蛋白在体外实验中可以促进滋养细胞HTR-8/Svneo细胞的侵袭、迁移、增殖能力,因此我们考虑TTR/anti-hCG scFv能够改善胎盘浅着床,从而为子痫前期疾病的治疗提供了新的可能。因此,本发明所述TTR/anti-hCG ScFv融合蛋白可以用于制备治疗子痫前期疾病的药物。也可以作为由胎盘的浅着床引起的疾病的治疗药物。

[0123] 上述实施例1至实施例8是采用转染质粒的方式来构建hCG抗体与TTR融合蛋白体系并进行的蛋白功能的验证。本申请还可以通过慢病毒介导的方式来构建hCG抗体与TTR融合蛋白体系。之后,对构建好的hCG抗体与TTR融合蛋白体系进行功能验证。

[0124] 构建表达系统的步骤为:构建含有上述融合蛋白的基因的慢病毒表达载体与慢病毒包装载体共转染到293T细胞中,经慢病毒包装、复制后,收获含有慢病毒的上清液,利用慢病毒的上清液感染滋养细胞,利用感染慢病毒的滋养细胞表达融合蛋白。

[0125] 如图12-图14,更为详细的步骤如下:

[0126] 1. 构建慢病毒表达载体:(1)hCG抗体anti-hCG scFv全基因合成;(2)慢病毒介导的hCG抗体过表达工程体系构建;(3)慢病毒表达载体质粒;(4)慢病毒感染活性检测,收集

病毒上清,该病毒上清中含有anti-hCG scFv基因;(5) ELISA或WESTERN BOLT检测hCG抗体anti-hCG scFv的表达;(6) 获取TTR基因序列,并利用anti-hCG scFv,构建TTR/anti-hCG scFv融合蛋白基因;(7) 慢病毒介导的TTR/anti-hCG scFv融合蛋白过表达工程体系构建;(8) 获得携带TTR/anti-hCG scFv融合蛋白的慢病毒表达载体质粒;(9) 慢病毒感染活性检测;(10) 获得含有TTR/anti-hCG scFv融合蛋白的病毒上清。

[0127] 2. 将慢病毒转染至滋养细胞:

[0128] 病毒转染293T细胞,复制、包装,感染滋养细胞,目标基因TTR/anti-hCG scFv融合蛋白基因与滋养细胞基因整合,滋养细胞恒定表达融合蛋白。具体步骤为:

[0129] (1) 携带TTR/anti-hCG scFv融合蛋白基因的慢病毒表达载体与慢病毒包装载体共转染到293T细胞中,病毒复制包装,72小时后收获包装病毒,离心过滤,收集病毒上清;

[0130] (2) 将收集的病毒上清感染滋养细胞,目标基因(TTR/anti-hCG scFv融合蛋白基因)与滋养细胞基因组整合,滋养细胞恒定表达TTR/anti-hCG scFv融合蛋白。

[0131] 3. TTR/anti-hCG scFv融合蛋白基因在细胞中表达,并观察TTR/anti-hCG scFv融合蛋白基因对滋养细胞功能影响。观察恒定表达anti-hCG scFv-TTR融合蛋白基因的滋养细胞形态、功能变化。TTR/anti-hCG scFv融合蛋白基因在细胞中表达的步骤为:结合或融合、穿入、逆转录、运输、整合、转录、运输和翻译。

[0132] 采用上述方法获得的TTR/anti-hCG scFv融合蛋白经验证也与实施例1至实施例8的结论一致。

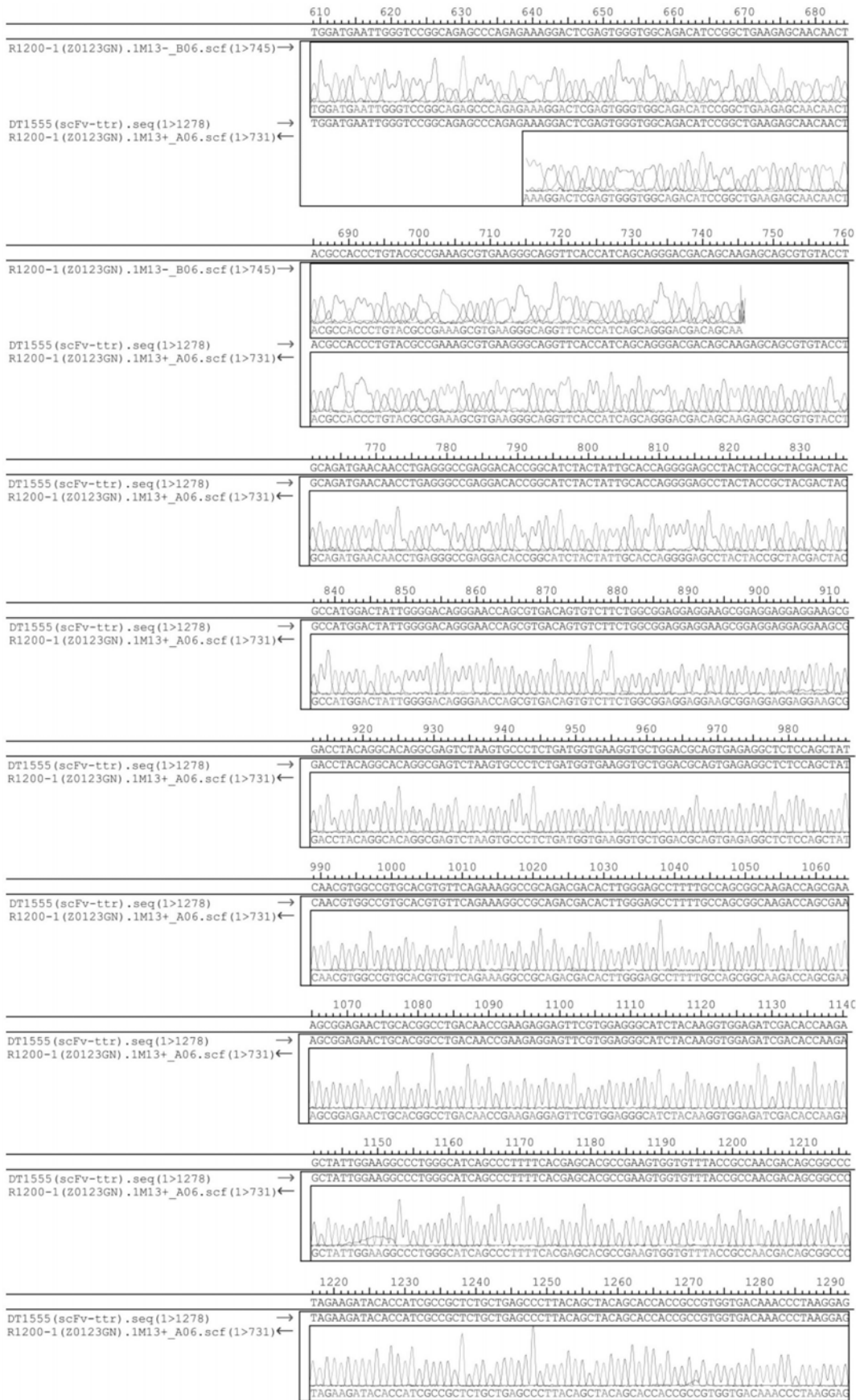
[0133] 本申请中,anti-hCG是大分子免疫球蛋白IgG,分子量多在270KD左右,而以往研究表明,只有两种或多种小分子蛋白才能进行融合,融合后分子量多不超过60-70KD,若融合蛋白分子量过大,将影响正常的转录、翻译等过程,影响蛋白四级结构形成,导致蛋白无功能。因此根据免疫球蛋白IgG的特点,发明人选择可变区进行融合,即anti-hCG scFv,分子量多在30KD左右,既能特异性识别hCG抗原,结构又相对简单。

[0134] TTR是一种分子量为55KDa的前白蛋白,是由四个完全相同的亚基聚合而成的四聚体蛋白。将TTR与anti-hCG scFv基因融合,转录、翻译后形成anti-hCG scFv-TTR单体,而既往研究表明TTR单体形式可能与TTR在组织器官局部沉积,导致淀粉样变性相关。因此转录、翻译后anti-hCG scFv-TTR能否正确聚合成四聚体尤为重要。前期实验发明人采用原核细胞中进行表达,结果并不理想,只能得到单体结构,无法形成四聚体,而后期改为转染真核细胞,在真核体系中进行表达,提纯后对蛋白进行western-blot验证,发现单倍体蛋白在真核体系中可正常折叠成天然构象,形成四聚体。经查阅文献,在既往的融合蛋白研究中未曾出现过这种情况。

[0135] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] <110>刘崇东
- [0002] <120>一种融合蛋白、制备方法及其应用
- [0003] <160>4
- [0004] <210>1
- [0005] <211>389
- [0006] <212>PRT
- [0007] <213> 人工合成
- [0008] <220>
- [0009] <221>VL + VH + ttr氨基酸序列
- [0010] <400>1
- [0011] 1 DIVMSQSPSS LAVSVGKVT MTCKSSQSL L YSSNQMNyla WYQQKPGQSP KLLIYWASTR
- [0012] 61 ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVEAEDLA VYCCQQYHSY PFTFGSGTKL EIKRGGGGSG
- [0013] 121 GGGSGGGGSE VNLEESGGGL VQPGGSMKLS CVASGFTFSN YWMNWVRQSP EKGLEWVADI
- [0014] 181 RLKSNNYATL YAESVKGRFT ISRDDSKSSV YLQMNLRAE DTGIYYCTRG AYYRYDYAMD
- [0015] 241 YWQQGTSVTV SSGGGGSGGG GSGPTGTGES KCPLMVKVL D AVRGSPAINV AVHVFRKAAD
- [0016] 301 DTWEPFASGK TSESGELHGL TTEEFVEGI YKVEIDTKSY WKALGISPFH EHAEVVFTAN
- [0017] 361 DSGPRRYTIA ALLSPYSYST TAVVTNPKE
- [0018] <210>2
- [0019] <211>222
- [0020] <212>PRT
- [0021] <213> 人工合成
- [0022] <220>
- [0023] <221> 包含VH的序列
- [0024] <400>2
- [0025] 1 EVNLEESGGG LVQPGGSMKL SCVASGFTFS NYWMNWVRQS PEKGLEWVAD IRLKSNNYAT
- [0026] 61 LYAESVKGRF TISRDDSKSS VYLQMNLR A EDTGIYYCTR GAYRYDYAM DYWQQGTSVT
- [0027] 121 VSSAKTTPPS VYPLAPGSA QTNMVTLCG LVKGYFPEPV TWTWNSGSL S SGVHTFPVAVL
- [0028] 181 QSDLYTLSS VTPSSPRPS ETVTCNVAHP ASSTKVDKKI VP
- [0029] <210>3
- [0030] <211>220
- [0031] <212>PRT
- [0032] <213>
- [0033] <220>
- [0034] <221>包含VL的序列
- [0035] <400>3
- [0036] 1 DIVMSQSPSS LAVSVGKVT MTCKSSQSL L YSSNQMNyla WYQQKPGQSP KLLIYWASTR
- [0037] 61 ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVEAEDLA VYCCQQYHSY PFTFGSGTKL EIKR ADAAPT
- [0038] 121 VSIFPPSSEQ LTSGGASVVC FLNNFYPKDI NVKWKIDGSE RQNGVLNSWT DQDSKDSTYS
- [0039] 181 MSSTLTLTKD EYERHNSYTC EATHKTSTSP IVKSFNRNEC
- [0040] <210>4
- [0041] <211>1278

[0042] <212>DNA
 [0043] <213>人工合成
 [0044] <220>
 [0045] <221> VL + VH + ttr核苷酸序列
 [0046] <400>4
 [0047] gaattcccgc cgccgccacc atgggctgga gctgcatcat cctgttctc gtggccacag 60
 [0048] ctacaggagt gcacagcgat atcgtgatga gccagagccc ctctagcctg gcagtgtccg 120
 [0049] tgggcgagaa agtgaccatg acctgcaaga gcagccagag cctgctgtac agcagcaacc 180
 [0050] agatgaacta cctggcttgg taccagcaga agccaggaca gagccccaag ctgctgatct 240
 [0051] attgggccag caccagggag agcggcgtgc cagatagatt caccggaagc ggaagcggca 300
 [0052] ccgatttcac cctgaccatc tcttcagtgg aggccgaaga tctggccgtg tactactgcc 360
 [0053] agcagtacca cagctacccc ttcacctcg gcagcggaac caagctggag atcaagagag 420
 [0054] gcggcggcgg aagcggagga ggaggaagcg gaggaggagg cagcgaagtg aatctggagg 480
 [0055] agagcggagg aggactggtg cagccaggcg gaagcatgaa gctgtcttgc gtggccagcg 540
 [0056] gcttcacctt cagcaactac tggatgaatt gggctccgca gagcccagag aaaggactcg 600
 [0057] agtgggtggc agacatccgg ctgaagagca acaactacgc caccctgtac gccgaaagcg 660
 [0058] tgaaggcag gttcaccatc agcaggagc acagcaagag cagcgtgtac ctgcagatga 720
 [0059] acaacctgag ggccgaggac accggcatct actattgcac caggggagcc tactaccgct 780
 [0060] acgactacgc catggactat tggggacagg gaaccagcgt gacagtgtct tctggcggag 840
 [0061] gaggaaagcg aggaggagga agcggacctc cagccacagg cgagtctaag tgccctctga 900
 [0062] tggtgaaggt gctggacgca gtgagaggct ctccagctat caacgtggcc gtgcacgtgt 960
 [0063] tcagaaagcg cgacagcagc acttgggagc cttttgccag cggcaagacc agcgaagcg 1020
 [0064] gagaactgca cggcctgaca accgaagagg agttcgtgga gggcatctac aaggtggaga 1080
 [0065] tcgacaccaa gagctattgg aagccctgg gcatcagccc ttttcacgag cacgccgaag 1140
 [0066] tggtgtttac cgccaacgac agcggcccta gaagatacac catcgcctct ctgctgagcc 1200
 [0067] cttacageta cagcaccacc gccgtggtga caaacctaa ggagcaccac caccaccatc 1260
 [0068] accaccactg ataagctt 1278



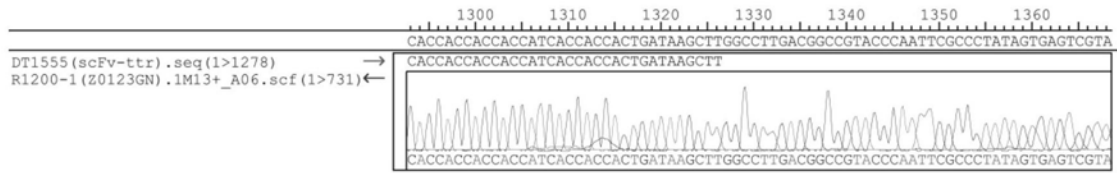


图1

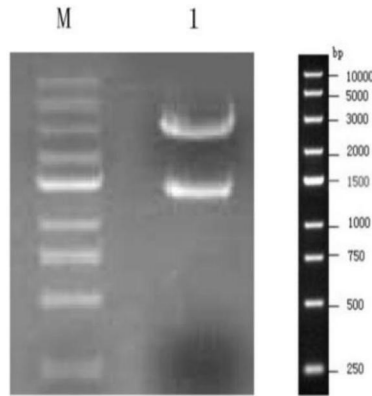


图2

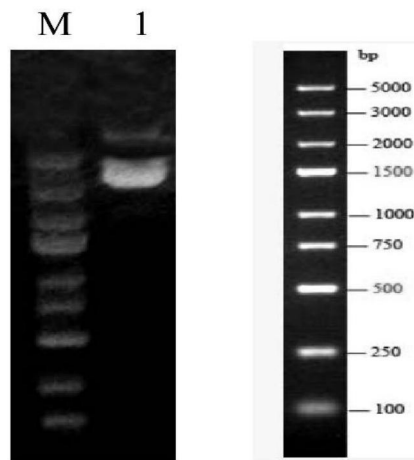


图3

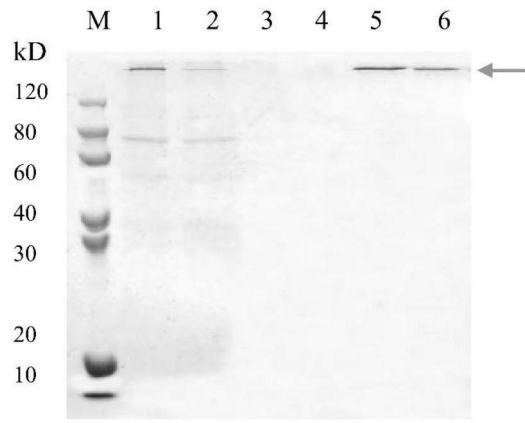


图4

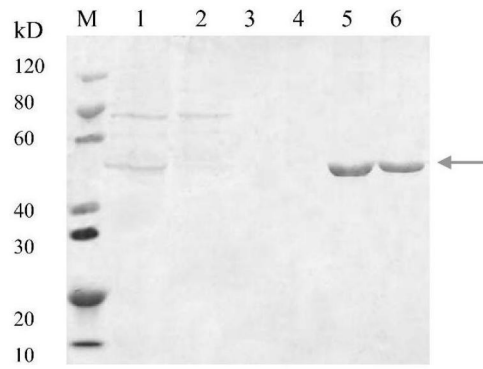


图5

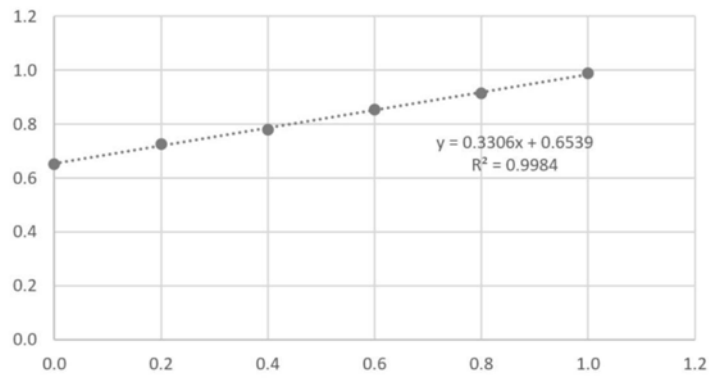


图6

1 2 3

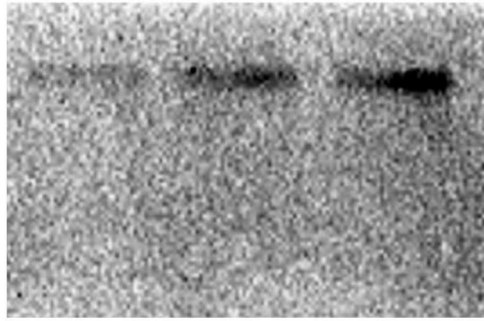


图7

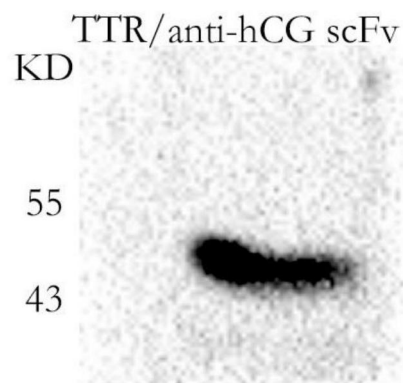


图8

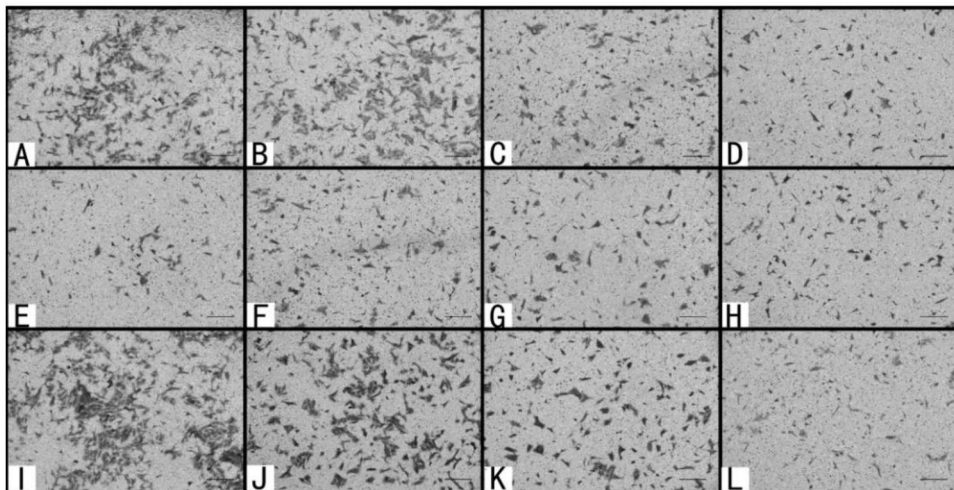


图9.1

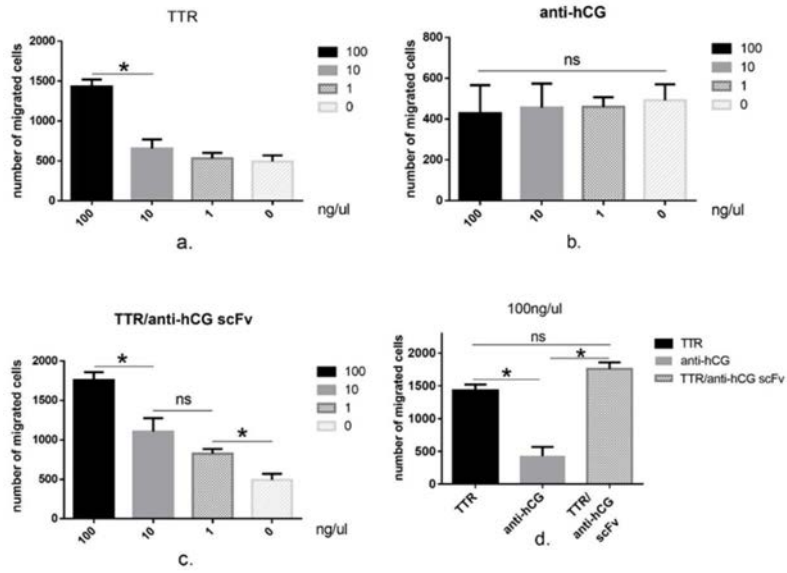


图9.2

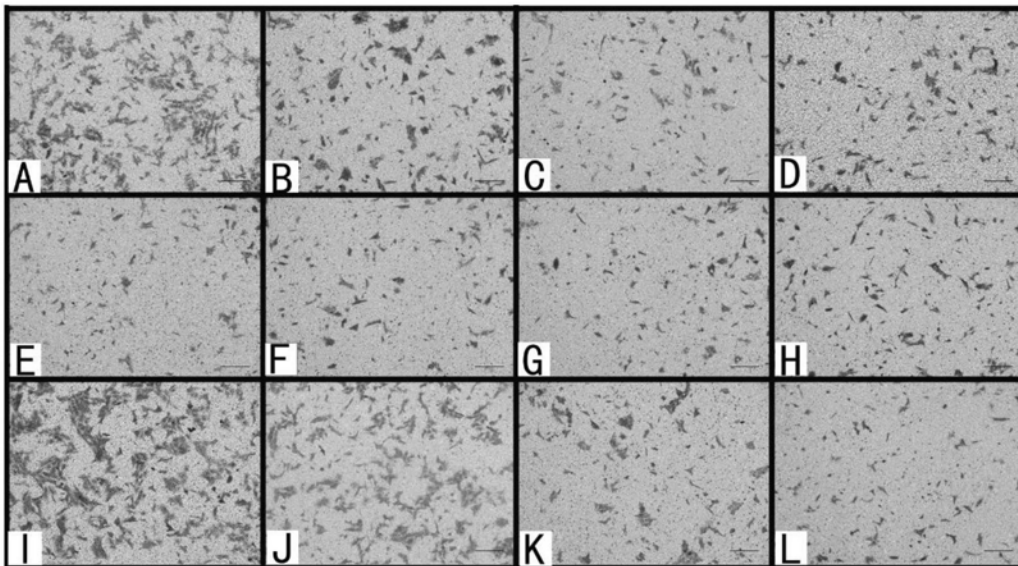


图10.1

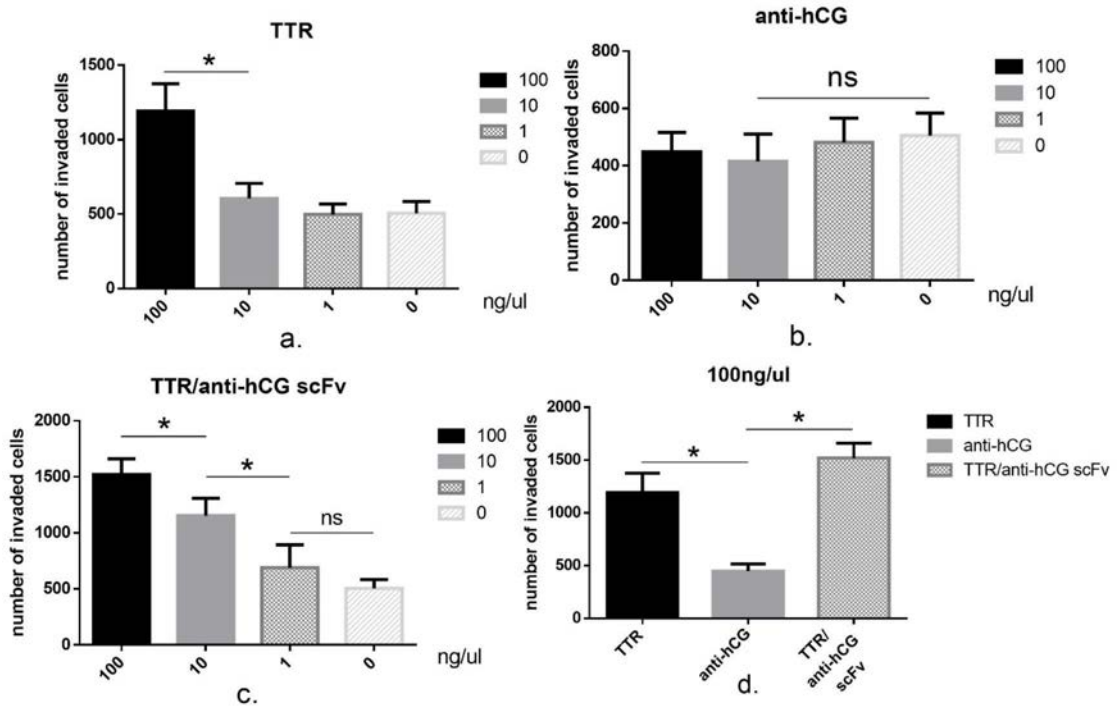


图10.2

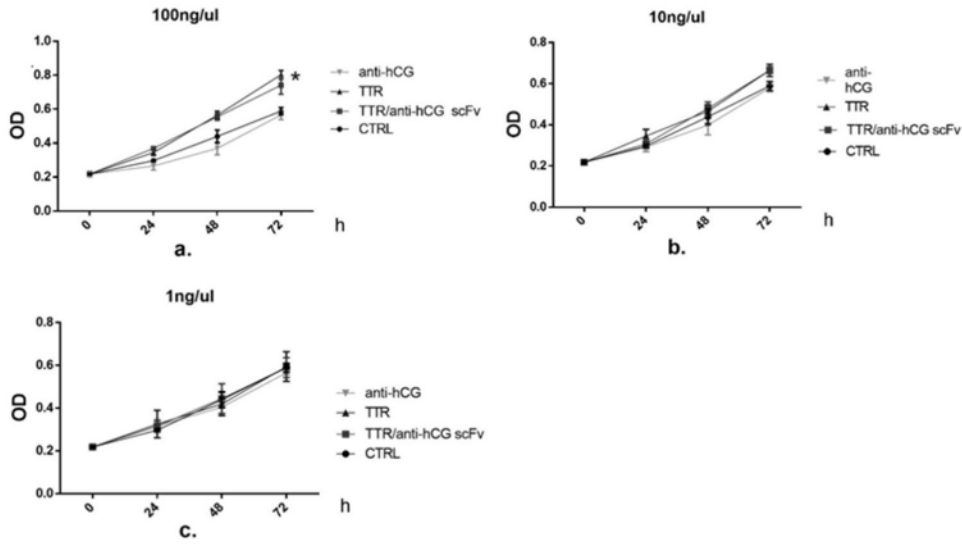


图11

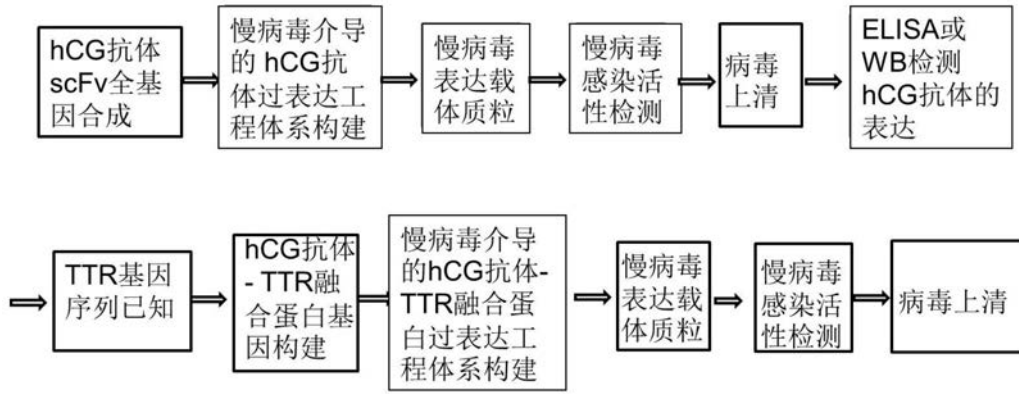


图12

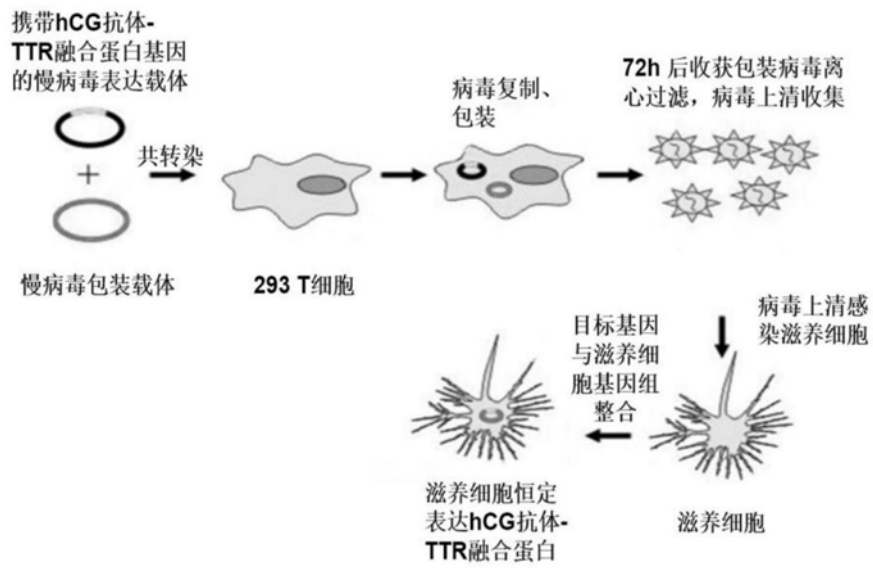


图13

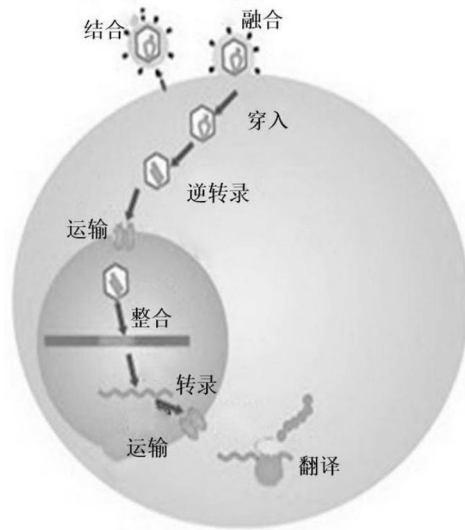


图14