

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12Q 1/34 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200310122706.7

[45] 授权公告日 2007 年 3 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1303218C

[22] 申请日 2003.12.19

[21] 申请号 200310122706.7

[73] 专利权人 中国科学院上海药物研究所

地址 201203 上海市浦东张江高科技园区
祖冲之路 555 号

共同专利权人 上海先导药业有限公司

[72] 发明人 沈旭 蒋华良 沈建华 陈晴
陈静 郭红霞 陈帅 罗小民
庄贤韩

[56] 参考文献

WO 03062427 A1 2003.7.31

US 6365361 B1 2002.4.2

US 5283173 A 1994.2.1

WO 03005025 A1 2003.1.16

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 上海开祺知识产权代理有限公司

代理人 张萍 费开逵

权利要求书 10 页 说明书 30 页 附图 7 页

[54] 发明名称

过氧化物酶体增长因子活化受体拮抗剂和激动剂的筛选方法

[57] 摘要

本发明涉及利用酵母双杂交系统，通过测定 α -半乳糖苷酶的活性大小筛选 PPAR 拮抗剂和激动剂的方法。该方法包括(1)CBP 和酵母 GAL4AD 融合蛋白 (pGADT7 - CBP) 的质粒构建；(2) PPAR γ LBD 和酵母 GAL4BD 融合蛋白 (pGBKT7 - PPAR γ LBD) 的质粒构建；(3) 将质粒 pGBKT7 - PPAR γ LBD 与质粒 GADT7 - CBP 依次转入酵母细胞 AH109；(4) 通过测定 α -半乳糖苷酶的活性筛选化合物。

1、一种 PPAR 拮抗剂和激动剂的筛选方法，其特征在于利用酵母双杂交系统，采用酵母 AH109 基因组自带的 MEL1 基因作为双杂交的报告基因，通过测定 α -半乳糖苷酶的活性来检测小分子化合物对 PPAR 与其共激活因子相互作用程度的影响，从而筛选 PPAR 拮抗剂和激动剂，包括如下步骤：

- (1)小鼠共激活因子 CBP 和酵母转录因子 GAL4AD 融合蛋白的表达质粒 pGADT7-CBP 的构建；
- (2)PPAR γ LBD 和酵母转录因子 GAL4BD 融合蛋白的质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 的构建；
- (3)将质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 与质粒 pGADT7-CBP 转入酵母细胞 AH109，得到酵母 PPAR γ LBD-CBP_AH109（保藏号为 CGMCC No.1075，菌种于 2003 年 12 月 15 日保藏在北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心）；
- (4)通过测定 α -半乳糖苷酶的活性筛选化合物。

2、根据权利要求 1 所述的 PPAR 拮抗剂和激动剂的筛选方法，其特征在于将质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 与质粒 pGADT7-CBP 依次转入酵母细胞 AH109 的方法为：

采用 LiAc 转化法，先将 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒转入酵母细胞中，用色氨酸缺陷的培养基筛选阳性克隆，然后将 pGADT7-CBP 质粒转入含有 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒的酵母中，用色氨酸，亮氨酸双缺陷的培养基筛选阳性克隆，得到同时含有 pGADT7-CBP 质粒和 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒的酵母细胞；

3、根据权利要求 1 所述的 PPAR 拮抗剂和激动剂的筛选方法，其特征在于通过测定 α -半乳糖苷酶的活性筛选化合物的方法为：

在得到的含 pGADT7-CBP 和 pGBKT7-PPAR γ LBD 双质粒的阳性酵母细胞中分别加入阳性对照物、阴性对照物及待筛选的化合物，孵育后，测定 α -半乳糖苷酶的活性，并计算其激动率，根据各个待筛选药物的激动率的比较，筛选出 PPAR 拮抗剂和激动剂。

4、根据权利要求 3 所述的 PPAR 拮抗剂和激动剂的筛选方法，其特征在于通过测定 α -半乳糖苷酶的活性筛选化合物时，药物孵育时间为 12-14 小时。

5、根据利用权利要求 1 所述的 PPAR 拮抗剂和激动剂的筛选方法，其特征在于该方法筛选 PPAR 拮抗剂和激动剂所利用的酵母筛选系统包括：(1)小鼠共激活因子 CBP 和酵母转录因子 GAL4-AD 融合蛋白表达质粒 pGADT7-CBP 菌种保藏号为 CGMCC No.1076，菌种于 2003 年 12 月 15 日保藏在北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；(2)含人 PPAR γ LBD 和酵母转录因子 GAL4-BD 融合蛋白表达质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 菌种保藏号为 CGMCC No. 1077，菌种于 2003 年 12 月15日保藏在北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；(3) 宿主酵母 AH109。

6、根据权利要求 5 所述的 PPAR 拮抗剂和激动剂的筛选方法，其特征在于小鼠共激活

因子 CBP 和酵母转录因子 GAL4-AD 融合蛋白表达质粒 pGADT7-CBP 具有如下序列：

(1) 利用载体 pGADT7 构建的 pGADT7-CBP 质粒具有如下核苷酸序列：

TGCATGCCTGCAGGTCGAGATCCGGGATCGAAGAAATGATGGTAAATGAAATAGG
 AAATCAAGGAGCATGAAGGCAAAGACAAATATAAGGGTCGAACGAAAAATAAAGTG
 AAAAGTGTTGATATGATGTATTTGGCTTTGCGGCGCCGAAAAACGAGTTTACGCAATT
 GCACAATCATGCTGACTCTGTGGCGGACCCGCGCTCTTGCCGGCCCGGCGATAACGCT
 GGGCGTGAGGCTGTGCCCGGCGGAGTTTTTTGCGCCTGCATTTTCCAAGGTTTACCCTG
 CGCTAAGGGGCGAGATTGGAGAAGCAATAAGAATGCCGGTTGGGGTTGCGATGATGAC
 GACCACGACAACCTGGTGTCAATTATTAAGTTGCCGAAAGAACCTGAGTGCATTTGCAA
 CATGAGTATACTAGAAGAATGAGCCAAGACTTGCGAGACGCGAGTTTGCCGGTGGTGC
 GAACAATAGAGCGACCATGACCTTGAAGGTGAGACGCGCATAACCGCTAGAGTACTTT
 GAAGAGGAAACAGCAATAGGGTTGCTACCAGTATAAATAGACAGGTACATACAACACT
 GGAAATGGTTGTCTGTTTGAGTACGCTTTCAATTCATTTGGGTGTGCACTTTATTATGTT
 ACAATATGGAAGGGAACCTTACACTTCTCCTATGCACATATATTAATTAAGTCCAATGC
 TAGTAGAGAAGGGGGTAACACCCCTCCGCGCTCTTTCCGATTTTTTTCTAAACCGTG
 GAATATTTTCGGATATCCTTTTGTTGTTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCTCTTTTCTGG
 CAACCAAACCCATACATCGGGATTCTATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGG
 TGCGGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATACCAGACAAGACATAATGGGCTAAACA
 AGACTACACCAATTACACTGCCTCATTGATGGTGGTACATAACGAACATAACTGTAGC
 CCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTACCCTTTTTCCATTTGCCATCTA
 TTGAAGTAATAATAGGCGCATGCAACTTCTTTCTTTTTTTTTCTTTCTCTCTCCCCCGT
 TGTTGTCTCACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAA
 ATTAACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATC
 TCGAAGCACACGAAACTTTTTCTTCCTTCATTCACGCACACTACTCTCTAATGAGCAA
 CGGTATACGGCCTTCTTCCAGTTACTTGAATTTGAAATAAAAAAAGTTTGCTGTCTT
 GCTATCAAGTATAAATAGACCTGCAATTATTAATCTTTTGTTTCTCCTCGTCATTGTTCTCGT
 TCCCTTTCTTCTTGTCTTTTTCTGCAATATTCAAGCTATACCAAGCATAACAATCA
 ACTCCAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGCGGAATTAATCCCGAGCCTCCAAAAAAGA
 AGAGAAAGGTGCAATTGGGTACCGCCGCCAATTTAATCAAAGTGGGAATATTGCTG
 ATAGCTCATTGTCCTTCACTTTCACTAACAGTAGCAACGGTCCGAACCTCATAACA
 ACTCAAACAATTCTCAAGCGCTTTCACAACCAATTGCCTCCTCTAACGTTTCATGA
 TAACTTCATGAATAATGAAATCACGGCTAGTAAATTTGATGATGGTAATAATTCAA
 ACCACTGTCACCTGGTTGGACGGACCAAACTGCGTATAACGCGTTTGGAACTCACT
 ACAGGGATGTTTAATACCACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTCGATGAT
 GAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTTTAATACGACTCACTATAGGGCG
 AGCGCCGCATGGAGTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGatggccgagaacttget
 ggacggaccgcccaccccaaacgagccaaactcagctcgcccggctctccgcaatgacaacaagattttggatcattgttgac
 ttggaaaatgaccttctgatgagctgatecccaatggagaattaagecttttaaacagtggaaccttgttcagatgctgegtccaa

acataaacaactgcagagcttcttagaggaggcagcggctctagcatcaaccagggataggcaatgtgagtgccagcagccctgt
 gcaacagggccttgggtggccaggctcaggggcagccgaacagtacaaacatggccagcttaggtgccatgggcaagagccctetga
 accaaggagactcatcaacacceaacctgcecaaacaggcagccagcactctgggcccactccccctgectcecaagcactgaatc
 cacaagcacaaaagcaagtagggetggtgaccagtagtctgccacatcacagactggacctgggatctgeatgaatgetaactca
 accagaccaccaggcettctcaatagtaactctggccatagettaatgaatcaggctcaacaagggaagctcaagctatgaatg
 gatctcttggggctgctggaagaggaaggggagctggaatgccctaccctgctccagccatgcagggggccacaagcagtgtgctg
 ggggagacctgacacaggtttccccacaaatggctggccatgctggactaaatacagcaagcagggagggatgaaccaagatggg
 aatgactggtaccaacaagtcatttggacaaccccttagtcaaacctggagggcagcagatgggagccactggagtgaacccccagtt
 agccagcaaacagagcattgtaaatagtttacctgctttctacagatatcaagaatactcagtcaccaactgtgcaaatatgccc
 agttgcaaacatcagtggaattgtaccacacaaagcaattgcaacagggcccacagcagaccctgaaaaagcacaactgatacag
 cagcagctgggttctactgcttcatgcccacaaatgtcagagacgagagcaagcaaatggagaggttcgagcctgttctctcccact
 gtgcaacctgaaaaagcttttgaatcacatgacacattgtcaggctcccaaagcctgccaagtggccattgtgcatcttcaegacaa
 atcatctctcattggaagaactgcacagacatgactgtctgtttgctcccttgaaaaatgccagtgacaagcgaaccaacaaa
 ccatctgggatctccagctagtggaaattcaaaacacaattggttctgttgggtgcagggcaacagGGATCCATCGAGCTC
 GAGCTGCAGATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACCTCAACTGTGCAT
 CGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATTTATACATCGTTTTGCCTTCTTTTATGTAACCTATACT
 CCTCTAAGTTTCAATCTTGGCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGA
 ATTAATGCCCATCTTTTTTTTTGGACCTAAATTCTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTAT
 TCAGAAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTGC
 GCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAG
 ATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATTAAT
 AAGTTATAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTAAAACGA
 AAATTCTTATTCTTGAGTAACCTTTTCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGCAT
 GAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCCGGTCGAAATTCCCCTACCCTATGAA
 CATATTCCATTTTGTAATTTTCGTGTCGTTTCTATTATGAATTTCAATTTATAAAGTTTATGTA
 CAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTTTAAGCAAGGATTTTCTTAACCTCTTCGGCGA
 CAGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACCTAAATCACCAGTTCTGATACCT
 GCATCCAAAACCTTTTTAACTGCATCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAAT
 GACAATTTCAACATCATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTTGACCTTATTCTT
 TGGCAAATCTGGAGCAGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAATGCGGTGTTCTTG
 TCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCCAAGGAACCTGGGATAACG
 GAGGCTTCATCGGAGATGATATACCAAACATGTTGCTGGTGATTATAATACCATTAGG
 TGGGTTGGGTTCTTAAGTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTTGAACCTT
 CAATGTAGGAAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCTTGAAGA
 GGCCAAAACATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTCATGTTGTAGGG
 CCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTGCACTTCTGGAACGGTGTATTGTTCACTAT
 CCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTTACCAAAGTAAATACCTCCCCTA
 ATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTAGCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAG

TCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTACATGGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTC
TTTACGGATTTTTAGTAAACCTTGTTTCAGGTCTAACACTACCTGTACCCCATTTAGGACC
ACCCACAGCACCTAACAAAACGGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCT
GGAAGTGGGACACCTGTAGCGTCGATAGCAGCACCACCAATTAATGATTTTCGAAATC
GAACTTGACATTGGAACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTG
TGATTTCTTGACCAACGTGGTCACCTGGCAAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATT
AGAATGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCTGAAATGTAAAAGGTAAGAAAAGTT
AGAAAGTAAGACGATTGCTAACCACCTATTGGAAAAACAATAGGTCCTTAAATAATAT
TGTCAACTTCAAGTATTGTGATGCAAGCATTTAGTCATGAACGCTTCTCTATTCTATATG
AAAAGCCGGTTCGGCGCTCTCACCTTTCCTTTTTCTCCAATTTTTTCAGTTGAAAAAG
GTATATGCGTCAGGCGACCTCTGAAATTAACAAAAAATTTCCAGTCATCGAATTTGATTC
TGTGCGATAGCGCCCCTGTGTGTTCTCGTTATGTTGAGGAAAAAATAATGGTTGCTAA
GAGATTCGAACTCTTGCACTTACGATACCTGAGTATTCCCACAGTTGGGGATCTCGAC
TCTAGCTAGAGGATCAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATGTTAT
CCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG
CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCG
GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATTAGGT
CTGAAGAGGAGTTTACGTCCAGCCAAGCTAGCTTGGCTGCAGGTCGAGCGGCCGCGAT
CCGGAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATCAGCTGCATTAAT
GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTC
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA
AAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG
AAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG
CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTC
CAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGT
AACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA
CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTG
GTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG
TAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA
GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTA
AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
CTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTG
ACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG

CAATGATACCGCGAGACCCACGCTACCCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCA
GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA
TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCGCAACGTT
GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC
TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG
TTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTC
ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGCAGCCGAGTT
GCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTG
CTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAG
ATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCAC
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAG
GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTAT
CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAATA
GGGGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTAT
CATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCG
GTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCT
GTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGG
GTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATA
ACGCATTTAAGCATAAACACGCACTATGCCGTTCTTCTCATGTATATATATACAGGCAA
CACGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAGCTGTATGTGCGCAGCTCGCGTTGCATT
TTCGGAAGCGCTCGTTTTTCGGAAACGCTTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCT
AGCTAGAAAGTATAGGAACTTCAGAGCGCTTTTGAAAACCAAAAAGCGCTCTGAAGAC
GCACTTTCAAAAACCAAAAACGCACCGGACTGTAACGAGCTACTAAAATATTGCGAA
TACCGCTTCCACAAACATTGCTCAAAAGTATCTCTTTGCTATATATCTCTGTGCTATATCC
CTATATAACCTACCCATCCACCTTTCGCTCCTTGAACCTTGCATCTAACTCGACCTCTAC
ATTTTTTATGTTTATCTCTAGTATTACTCTTTAGACAAAAAATTGTAGTAAGAACTATTC
ATAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAATGTAAACATTTCCCTATACGTAGTATATAGAGA
CAAAATAGAAGAAACCGTTCATAATTTCTGACCAATGAAGAATCATCAACGCTATCAC
TTTCTGTTCAAAAGTATGCGCAATCCACATCGGTATAGAATATAATCGGGGATGCCTTT
ATCTTGAAAAATGCACCCGCAGCTTCGCTAGTAATCAGTAAACGCGGGAAGTGGAGT
CAGGCTTTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAGTAGCCTTCTTCTAACCTTAAACG
GACCTACAGTGCAAAAAGTTATCAAGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAGGAGAAAA
AAAGTAATCTAAGATGCTTTGTTAGAAAATAGCGCTCTCGGGATGCATTTTTGTAGAA
CAAAAAGAAGTATAGATTCTTTGTTGGTAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTCTGTTC
TGTA AAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTTG
TTTTACAAAATGAAGCACAGATTCTTCGTTGGTAAAATAGCGCTTTCGCGTTGCATTT
CTGTTCTGTAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGAAAATAGCGCTCTCGCGTTGC

ATTTTGTCTACAAAATGAAGCACAGATGCTTCGTTGCT

(2) 利用载体 pGADT7 构建的 pGADT7-CBP 质粒表达的氨基酸序列如下:

Met Asp Lys Ala Glu Leu Ile Pro Glu Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Leu Gly Thr Ala
 Ala Asn Phe Asn Gln Ser Gly Asn Ile Ala Asp Ser Ser Leu Ser Phe Thr Phe Thr Asn Ser Ser
 Asn Gly Pro Asn Leu Ile Thr Thr Gln Thr Asn Ser Gln Ala Leu Ser Gln Pro Ile Ala Ser Ser
 Asn Val His Asp Asn Phe Met Asn Asn Glu Ile Thr Ala Ser Lys Ile Asp Asp Gly Asn Asn Ser
 Lys Pro Leu Ser Pro Gly Trp Thr Asp Gln Thr Ala Tyr Asn Ala Phe Gly Ile Thr Thr Gly
 Met Phe Asn Thr Thr Thr Met Asp Asp Val Tyr Asn Tyr Leu Phe Asp Asp Glu Asp Thr Pro
 Pro Asn Pro Lys Lys Glu Ile Phe Asn Thr Thr His Tyr Arg Ala Ser Ala Ala Met Glu Tyr Pro Tyr
 Asp Val Pro Asp Tyr Ala His Met Met Ala Glu Asn Leu Leu Asp Gly Pro Pro Asn Pro Lys Arg
Ala Lys Leu Ser Ser Pro Gly Phe Ser Ala Asn Asp Asn Thr Asp Phe Gly Ser Leu Phe Asp
Leu Glu Asn Asp Leu Pro Asp Glu Leu Ile Pro Asn Gly Glu Leu Ser Leu Leu Asn Ser Gly
Asn Leu Val Pro Asp Ala Ala Ser Lys His Lys Gln Leu Ser Glu Leu Leu Arg Gly Gly Ser Gly
Ser Ser Ile Asn Pro Gly Ile Gly Asn Val Ser Ala Ser Ser Pro Val Gln Gln Gly Leu Gly Gly
Gln Ala Gln Gly Gln Pro Asn Ser Thr Asn Met Ala Ser Leu Gly Ala Met Gly Lys Ser Pro
Leu Asn Gln Gly Asp Ser Ser Thr Pro Asn Leu Pro Lys Gln Ala Ala Ser Thr Ser Gly Pro
Thr Pro Pro Ala Ser Gln Ala Leu Asn Pro Gln Ala Gln Lys Gln Val Gly Leu Val Thr Ser Ser
Pro Ala Thr Ser Gln Thr Gly Pro Gly Ile Cys Met Asn Ala Asn Phe Asn Gln Thr His Pro
Gly Leu Leu Asn Ser Asn Ser Gly His Ser Leu Met Asn Gln Ala Gln Gln Gly Gln Ala Gln
Val Met Asn Gly Ser Leu Gly Ala Ala Gly Arg Gly Arg Gly Ala Gly Met Pro Tyr Pro Ala
Pro Ala Met Gln Gly Ala Thr Ser Ser Val Leu Ala Glu Thr Leu Thr Gln Val Ser Pro Gln
Met Ala Gly His Ala Gly Leu Asn Thr Ala Gln Ala Gly Gly Met Thr Lys Met Gly Met Thr
Gly Thr Thr Ser Pro Phe Gly Gln Pro Phe Ser Gln Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ala Thr
Gly Val Asn Pro Gln Leu Ala Ser Lys Gln Ser Met Val Asn Ser Leu Pro Ala Phe Pro Thr Asp
Ile Lys Asn Thr Ser Val Thr Thr Val Pro Asn Met Ser Gln Leu Gln Thr Ser Val Gly Ile Val
Pro Thr Gln Ala Ile Ala Thr Gly Pro Thr Ala Asp Pro Glu Lys Arg Lys Leu Ile Gln Gln Gln
Leu Val Leu Leu Leu His Ala His Lys Cys Gln Arg Arg Glu Gln Ala Asn Gly Glu Val Arg
Ala Cys Ser Leu Pro His Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln
Ala Pro Lys Ala Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile Ile Ser His Trp Lys Asn
Cys Thr Arg His Asp Cys Pro Val Cys Leu Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Arg Asn Gln
Gln Thr Ile Leu Gly Ser Pro Ala Ser Gly Ile Gln Asn Thr Ile Gly Ser Val Gly Ala Gly Gln
Gln Gly Ser Ile Glu Leu Glu Leu Gln Met Asn Arg Arg Tyr ***。

7、根据权利要求 5 所述的 PPAR 拮抗剂和激动剂的筛选方法，其特征在于含人 PPAR γ LBD 和酵母转录因子 GAL4-BD 融合蛋白表达质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 具有如下序列:

(1) 利用载体 pGBKT7 构建的 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒，具有如下核苷酸序列:

CGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGATCCTTTTGTGTTTCCGGGTGTACAA
 TATGGACTTCCTCTTTTCTGGCAACCAAACCCATACATCGGGATTCCTATAATACCTTCG
 TTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGCGGAGGGGAGATATAACAATAGAACAGATACCAGAC

AAGACATAATGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACACTGCCTCATTGATGGTGGTACA
 TAACGAACTAATACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTAC
 CCTTTTCCATTTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGCATGCAACTTCTTTTCTTTTT
 TTTCTTTTCTCTCTCCCCGTTGTTGTCTACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATG
 GAAGACACTAAAGGAAAAAATTAACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTT
 CAGAGCTGATGAGGGGTATCTCGAAGCACACGAACTTTTTCCTTCCTTCATTACGCA
 CACTACTCTCTAATGAGCAACGGTATACGGCCTTCCTTCCAGTTACTTGAATTTGAAATA
 AAAAAAGTTTGCTGTCTTGCTATCAAGTATAAATAGACCTGCAATTATTAATCTTTTGT
 CCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTTTCTTCCTTGTTTCTTTTTCTGCACAATATTTCAAGCT
 ATACCAAGCATACAATCAACTCCAAGCTTGAAGCAAGCCTCCTGAAAGATGAAGCTAC
 TGTCTTCTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAGCTCAAGTGCTCC
 AAAGAAAACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTCGCTAC
 TCTCCCAAACCAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGAAT
 CAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACTGATTTTTCCTCGAGAAGACCT
 TGACATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTAAACAGGAT
 TATTTGTACAAGATAATGTGAATAAAGATGCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTG
 GAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCGACATCATCATC
 GGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCGGAATTTGTAA
 TACGACTCACTATAGGGCGAGCCGCCATCATGGAGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGA
 GGACCTGCATATGgcgagatctccagtgatctgaccagctgaatccagagtcgctgacctccggccctggcaaaaca
 tttgatgaetcatataaagtcttcccctgaccaaagcaagggcgagggcgatcttgacaggaaagacaacagacaaateacc
 attegttatctatgacatgaattccttaatgatgggagaagataaaatcaagttcaaacacatcacccccctgaggagcagagcaaa
 gaggtggccatccgcatcttccagggtgccagttctgctccgtggaggctgtgcaggagatcaagagtatgcaaaaagcattctg
 gttttgaaatcttgactgaacgaccaagtaactctctcaaatatggagtcacagagatctttacacaaatgctggcctcttgatga
 ataaagatggggttctcatatccgagggccaaggcttcatgacaagggagtttctaaagagcctgcgaaagccttttggtgactttatg
 gagcccaagtttgagtttgetgtgaagttcaatgcactggaattagatgacagcagcttgcaaatatttattgctgctcatttctcagtg
 gagaccgcccaggtttgetgaaatgtgaagcccattgaagacattcaagacaacctgctacaagccctggagctccagctgaagctga
 accaccctgagctctcagctgtttgcgaagctgctccagaaaatgacagacctcagacagattgtcagcgaacacgtgcagctact
 gcaggtgatcaagaagaeggagacagacatgagttctcaccgctctgagggagatctacaaggacttgactagGTCGACC
 TGCAGCGGCCGCATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT
 TTTTTGCGCGCTTGCAGCCAAGCTAATTCCGGGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTAT
 TATTAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTT
 AAAACGAAAATTCTTATTCTTGAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGT
 ATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCAAGCTTGCGTAATC
 ATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAACG
 AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGGTAACCTCACATTA
 ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA
 ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCC

TCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACT
CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTG
AGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG
CGAAACCCGACAGGACTATAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
GCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGA
AGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCG
CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCC
GGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG
CCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA
GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGC
TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCT
CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAC
GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATT
AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTGAGGCTATGGCAGGG
CCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTCACCCGAACTTGGGGGGTGGG
GTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTAT
CGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATGAACAAACGACCCAACAC
CGTGCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTATAGCGCGGGTTCCCTTCCGGTATTGTCTC
CTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGA ACTCCAGCATGAGATCCC
CGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCGAAAGCCCAACCTTTC
ATAGAAGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTGGTCG
GTTCAATTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGG
CGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATAACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCC
ATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGG
TCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCA
TGATATTCGGCAAGCAGGCATCGTCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATG
CTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCA
GATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGT
TTCGCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCATTG
CATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTG
CCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGC
ACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTT
GCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCCGGTCTTGACAAAAAGAACC GGGCGCCCCT
GCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTC
ATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTT
CAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG

CGGATACATAATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTC
CCGAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCATTTTGTAGAACAAAAATGCAA
CGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAA
TGCAACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAAGAATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAA
AAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAG
AACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTATTTTACCAACAAAGAATCTATACTTCTTTTTTG
TTCTACAAAATGCATCCCGAGAGCGCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGATTACTTTT
TTTCTCCTTTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTT
AAGTTAGAAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAAAAAAGCCTGACTC
CACTTCCCGCGTTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAAGATAAAGG
CATCCCCGATTATATTCTATAACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGAT
AGCGTTGATGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTAT
ATACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCGATTCACTCTATGAATAGTT
CTTACTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACATAAAAAATGTAGAGG
TCGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGTAGGTTATATAGGGATAT
AGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTCG
CAATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCCTTTTTGGTTTTTTGAAAGTGCCTCTTC
AGAGCGCTTTTGGTTTTCAAAGCGCTCTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGTTTCCGAAAACGAGCGCTTCCGAAAATGCAACGC
GAGCTGCGCACATACAGCTCACTGTTACGTCGCACCTATATCTGCGTGTTGCCTGTATA
TATATACATGAGAAGAACGGCATAGTGCGTGTTTATGCTTAAATGCGTACTTATATGCG
TCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATATTATCCCATTCATGCG
GGGTATCGTATGCTTCCTTCAGCACTACCCTTTAGCTGTTCTATATGCTGCCACTCCTCAA
TTGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTATCATTTCCTTTGATATTGGATCATATTAAGAAAC
CATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGC
GCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACA
GCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGT
GTTGGCGGGTGTGCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTIONGAGAG
TGCACCATAGATCAACGACATTACTATATATATAATATAGGAAGCATTTAATAGAACAGCA
TCGTAATATATGTGTACTTTGCAGTTATGACGCCAGATGGCAGTAGTGGAAGATATTCTT
TATTGAAAATAGCTTGTACCTTACGTACAATCTTGATCCGGAGCTTTTCTTTTTTTGC
CGATTAAGAATTAATTCGGTTCGAAAAAGAAAAGGAGAGGGCCAAGAGGGAGGGCAT
TGGTGACTATTGAGCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTAT
GTCTGTTATTAATTCACAGGTAGTTCTGGTCCATTGGTGAAAGTTTGCGGCTTGCAGA
GCACAGAGGCCGCAGAATGTGCTCTAGATTCCGATGCTGACTTGCTGGGTATTATATGT
GTGCCCAATAGAAAGAGAACAATTGACCCGGTTATTGCAAGGAAAATTTCAAGTCTTG
TAAAAGCATATAAAAATAGTTCAGGCACTCCGAAATACTTGGTTGGCGTGTTTCGTAAT
CAACCTAAGGAGGATGTTTTGGCTCTGGTCAATGATTACGGCATTGATATCGTCCAAC

GCATGGAGATGAGTCGTGGCAAGAATACCAAGAGTTCCTCGGTTTGCCAGTTATTA
 AGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGCAGCTTCACAGAAACCTCA
 TTCGTTTATTCCTTGTTTGATTGATTGAGAAGCAGGTGGGACAGGTGAACTTTTGGATTGGA
 ACTCGATTTCTGACTGGGTTGGAAGGCAAGAGAGCCCCGAAAGCTTACATTTTATGTTA
 GCTGGTGGACTGACGCCAGAAAATGTTGGTGATGCGCTTAGATTAAATGGCGTTATTGG
 TGTTGATGTAAGCGGAGGTGTGGAGACAAATGGTGTAAAAGACTCTAACAAAATAGCA
 AATTCGTCAAAAATGCTAAGAAATAGGTTATTACTGAGTAGTATTTATTTAAGTATTGTT
 TGTGCACTTGCCGATCTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATAC
 CGCATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAT
 CAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAAT
 AGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAA
 CGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGT
 GAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGA
 ACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGA
 GAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
 GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGT
 CCATTGCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGAT

(2) 利用载体 pGBKT7 构建的 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒表达的氨基酸序列如下:

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys
 Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg
 Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg
 Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu
 Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val
 Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg
 Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr
 Val Ser Pro Glu Phe Val Ile Arg Leu Thr Ile Gly Arg Ala Ala Ile Met Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 Glu Glu Asp Leu His Met Ala Glu Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp
Leu Arg Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu Thr Lys Ala Lys
Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser
Leu Met Met Gly Glu Asp Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu
Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala Val Gln Glu Ile Thr Glu
Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr
Gly Val His Glu Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu Ile Ser
Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe
Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu
Ala Ile Phe Ile Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys Pro Ile Glu
Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser
Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val
Gln Leu Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile
Tyr Lys Asp Leu Tyr ***。

过氧化物酶体增长因子活化受体拮抗剂和激动剂的筛选方法

技术领域

本发明涉及利用分子和细胞生物学技术筛选 PPAR 拮抗剂和激动剂的方法，具体涉及利用酵母双杂交技术，通过测定 α -半乳糖苷酶的活性大小筛选 PPAR 拮抗剂和激动剂的方法。

背景技术

近年来，在我国随着人们生活水平质量的不断提高，饮食结构及生活方式的变化，患有血脂代谢异常的人数在逐年升高，由此而引发的高血压病、高脂血症、冠心病、糖尿病、肥胖症等“富裕性疾病”的发病率亦明显上升，同时，这类疾病还是威胁中老年人健康的第一大杀手，已经引起了全社会的高度重视。有资料显示，目前，高脂血症、糖尿病、肥胖症等相关性十分密切的病症，其相加总发病率已达10%。我国90年代初期与80年代相比，人群血脂水平明显增加，尤其在北方大城市，约30~40%的人患有不同程度的超过边缘性标准的血脂和血糖代谢异常。因此，在全社会范围内重视、控制这类疾病已势在必行。

近十年来的研究表明，核受体 PPAR(Peroxisome Proliferator-activated Receptors)又称过氧化物酶体增长因子活化受体，是一类由配体激活的核转录因子，属 II 型核受体超家族成员，能被脂肪酸以及外源性过氧化物酶体增殖剂(Peroxisome Proliferator, PP) 激活。在两栖类、啮齿类动物及人类等 PPAR s 均有 3 种亚型，即 PPAR α 、PPAR β (亦称 PPAR δ 或 NUC 1) 和 PPAR γ 。人类 PPAR α 、 β 和 γ 分别含有 468、441 和 479 个氨基酸残基。作为甾体激素受体超家族成员之一，PPAR 共有 6 个区域(A-F)、4 个功能结构域。位于受体分子中部的 C 区是 DNA 结合区(DBD)；羧基端的 E/F 区是配基结合区(LBD)，在激素信号转换成转录激活信号过程中发挥重要作用；氨基端的 A/B 是调节区，PPAR γ 的活化可被 MAPK 介导的 A/B 区的一个丝氨酸残基的磷酸化而降低，而 PPAR α 的磷酸化可正调节受体-配体的亲和力。活化的 PPAR 与视黄酸类受体(RXR)形成异二聚体，然后与所调节基因的启动子上游的过氧化物酶体增殖物反应元件 (PPRE) 结合而发挥转录调控作用。同时，活化的 PPAR 能同一系列转录共激活因子 (如：CBP SRC-1; RIP140; TIF1; TIF2; SUG1; P300) 结合，从而激活转录。PPAR 介导的效应主要包括脂类代谢、免疫反应等，因此，动脉粥样硬化、肥胖、糖尿病、肿瘤以及炎症性疾病等的发生发展与 PPAR 有密切关系。

PPAR 的不同亚型具有不同的生物学作用，PPAR α 在肝脏脂类代谢中发挥重要作用，PPAR β 在脂肪细胞分化中的作用还存在着争议，而 PPAR γ 参与脂肪形成和免疫反应，与脂肪细胞分化、肥胖及胰岛素抵抗关系密切，被认为是治疗糖尿病、肥胖症、坏脂血症、炎症、

高血压和癌症药物设计的重要靶标分子，成为近年来研究热点。

对于PPAR γ 激动剂的研究主要集中在其在治疗II型糖尿病方面的应用。胰岛素增敏剂噻唑烷二酮类药物(TZDs)作为PPAR γ 的一类激动剂可以明显降低白色脂肪组织(WAT)中甘油三酯的含量，同时还可降低血浆中的葡萄糖，脂质和II型糖尿病实验动物的胰岛素水平。三类TZD类药物：罗格列酮rosiglitazone (Rezulin)，皮格列酮pioglitazone (ACTOS)，和曲格列酮Troglitazone (Avandia)已被FDA认证通过，作为治疗II型糖尿病的药物已经在市场上销售。至于PPAR γ 拮抗剂，理论上可减少脂肪、防治肥胖，但临床尚未应用。

目前国内在PPAR γ 激动剂和拮抗剂的高通量筛选上大都局限于蛋白质水平的小分子化合物的筛选，如SPR技术，而细胞水平的筛选则基本依赖于哺乳动物细胞，成本较高，操作也相对烦琐。酵母双杂交技术是一项采用报告基因来检测蛋白质与蛋白质间相互作用的技术(美国专利 No. 5,283,173；Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 88, pp. 9578-9582, 1991)。许多转录因子可以分为DNA结合域(DNA binding domain, DNA-BD)和转录激活域(transcriptional activation domain, AD)，而只有DNA-BD和AD这两个结构域共存的情况下，才能激活下游基因的表达。酵母双杂交系统中，将待检测的蛋白X、Y分别与DNA-BD、AD表达为融合蛋白DNA-BD-X、AD-Y，只有在X、Y有相互作用的情况下，DNA-BD、AD方形成完整的复合物，激活下游报告基因的表达。目前通常选用LacZ作为酵母双杂交的报告基因，然而 β -半乳糖苷酶是一种胞内酶，因此酵母细胞的裂解彻底与否会对酶活的测定造成直接影响，且操作相对复杂。

发明内容

本发明的目的在于提供一种利用酵母双杂交系统来筛选PPAR拮抗剂和激动剂的新方法。

本发明的另一个目的是提供一种通过测定 α -半乳糖苷酶的活性大小，来方便而快捷的检测小分子化合物对PPAR与共激活因子间相互作用影响的方法。

本发明的再一个目的是提供用于本发明方法筛选PPAR拮抗剂和激动剂的酵母筛选系统。该系统包括：(1)小鼠共激活因子CBP和酵母转录因子GAL4-AD融合蛋白表达质粒pGADT7-CBP (Escherichia E.coli DH5 α) 保藏号为CGMCC No.1076，保藏日期：2003年12月15日，地址：北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，邮编：100080；(2)含人PPAR γ LBD和酵母转录因子GAL4-BD融合蛋白表达质粒pGBKT7-PPAR γ LBD (Escherichia E.coli DH5 α) 保藏号为CGMCC No.1077，保藏日期：2003年12月15日，地址：北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，邮编：100080；(3)宿主酵母AH109。

本发明采用了酵母双杂交这一有利的研究蛋白质与蛋白质之间相互作用的技术，在PPARs与共激活因子的结合是配体依赖性前提下，实现了PPAR的激动剂和拮抗剂的筛选。

本发明采用 GAL4 转录因子,其 DNA-BD、AD 区域则已分别构建在酵母表达质粒 pGBKT7 与 pGADT7 中。本发明采用酵母 AH109 基因组自带的 MEL1 基因作为双杂交的报告基因,通过测定其分泌型的产物 α -半乳糖苷酶的活性来检测小分子化合物对 PPAR γ 与其共激活因子相互作用程度的影响。

本发明利用酵母双杂交系统来筛选 PPAR 拮抗剂与激动剂的方法由下列步骤组成:

1、CBP 和酵母 GAL4AD 融合蛋白 (pGADT7-CBP) 的质粒构建;

本步骤是借助细胞分子生物学方法,选用 pGADT7 载体构建 CBP 和酵母 GAL4AD 融合蛋白的质粒 (pGADT7-CBP)。

(1) 用 PCR 技术从 CMV-mCBP 中获得 CBP (1-464aa) 的 DNA 片段:

引物: FW: 5'AACATATGATGGCCGAGAACTTGCTGGACG 3'

RV: 5'AAGGATCCCTGTTGCCCTGCACCAACAG 3'

95°C 变性 8 min, 开始循环 95°C 1min, 65°C 1min, 72°C 1min30s, 重复 30 循环, 72°C 10min。

采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 回收 DNA。

(2) 将 CBP(1-464aa)的 PCR 产物克隆到 pGADT7 载体上: CBP(1-464aa)的 PCR 产物和 pGADT7 分别用 Nde I 和 BamH I 酶切;用试剂盒回收酶切产物,其中回收 CBP(1-464aa)的 PCR 酶切产物近 1400bp, pGADT7 酶切产物近 8.0kb。用 T₄ DNA 连接酶连接;连接产物转化入感受态细胞 DH5 α ; 通过酶切鉴定挑选正确的克隆。

2、PPAR γ LBD 和酵母 GAL4BD 融合蛋白 (pGBKT7-PPAR γ LBD) 的质粒构建;

本步骤是借助细胞分子生物学方法,选用 pGBKT7 载体构建 PPAR γ LBD 和酵母 GAL4 DNA-BD 融合蛋白的质粒 (pGBKT7-PPAR γ LBD)。

(1) 利用 PCR 技术从 pCDNA3.1-PPAR γ 中获得 PPAR γ LBD(193aa-475aa)的 DNA 片段:

引物: FW: 5'AACATATGGCGGAGATCTCCAGT 3'

RV: 5'AAGTCGACCTAGTACAAGTCCTT 3'

95°C 变性 5min, 开始循环 95°C 30s, 60°C 30s, 72°C 1min, 重复 30 循环, 72°C 10min。

采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 回收 DNA。

(2) 将 PPAR γ LBD 的 PCR 产物克隆到 pGBKT7 载体上: PPAR γ LBD 的 PCR 产物和 pGBKT7 分别用 Nde I 和 Sal I 酶切;用试剂盒回收酶切产物,其中回收 PPAR γ LBD 的 PCR 酶切产物近 850bp, pGBKT7 酶切产物近 7.3kb;用 T₄ DNA 连接酶连接;连接产物转化入感受态细胞 DH5 α ; 通过酶切鉴定挑选正确的克隆。

3、将质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 和 pGADT7-CBP 依次转入酵母细胞 AH109, 得到酵母

PPAR γ LBD-CBP_AH109 (*Saccharomyces cerevisiae* AH109) 保藏号为 CGMCC No.1075, 保藏日期: 2003 年 12 月 15 日, 地址: 北京中关村中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 邮编: 100080:

采用 LiAc 转化法。先将 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒转入酵母细胞 AH109, 用色氨酸缺陷 (T) 的培养基筛选阳性克隆, 然后将 pGADT7-CBP 质粒转入含有 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒的酵母中, 用色氨酸, 亮氨酸双缺陷 (TL) 的培养基筛选阳性克隆, 得到同时含有 pGADT7-CBP 质粒和 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒的酵母细胞。

4、通过测定 α - 半乳糖苷酶的活性筛选化合物:

在得到的含 pGADT7-CBP 和 pGBKT7-PPAR γ LBD 双质粒的阳性酵母细胞中分别加入阳性对照物、阴性对照物及待筛选的化合物, 孵育后测定 α - 半乳糖苷酶的活性, 并计算其激动率, 根据各个待筛选药物的激动率的比较, 筛选出 PPAR 拮抗剂和激动剂。

本发明提供了利用酵母双杂交系统定量检测小分子化合物对蛋白质相互作用强度影响方法: 采用酵母基因组自带的 MEL1 基因作为双杂交的报告基因, 通过测定其分泌型的产物 α - 半乳糖苷酶的活性来检测小分子化合物对 PPAR γ 与其共激活因子相互作用程度的影响。

本发明利用载体 pGADT7 构建的 pGADT7-CBP 质粒的核苷酸序列如下:

```
TGCATGCCTGCAGGTCGAGATCCGGGATCGAAGAAATGATGGTAAATGAAATAGG
AAATCAAGGAGCATGAAGGCAAAGACAAATATAAGGGTTCGAACGAAAAATAAAGTG
AAAAGTGTTGATATGATGTATTTGGCTTTGCGGCGCCGAAAAACGAGTTTACGCAATT
GCACAATCATGCTGACTCTGTGGCGGACCCGCGCTCTTGCCGGCCCGGCGATAACGCT
GGGCGTGAGGCTGTGCCCCGGCGGAGTTTTTTGCGCCTGCATTTTCCAAGGTTTACCCTG
CGCTAAGGGGCGAGATTGGAGAAGCAATAAGAATGCCGGTTGGGGTTGCGATGATGAC
GACCACGACAACCTGGTGTCATTATTTAAGTTGCCGAAAGAACCTGAGTGCATTTGCAA
CATGAGTATACTAGAAGAATGAGCCAAGACTTGCGAGACGCGAGTTTGCCGGTGGTGC
GAACAATAGAGCGACCATGACCTTGAAGGTGAGACGCGCATAACCGCTAGAGTACTTT
GAAGAGGAAACAGCAATAGGGTTGCTACCAGTATAAATAGACAGGTACATAACAACCT
GGAAATGGTTGTCTGTTTGAGTACGCTTTCATTCATTTGGGTGTGCACCTTTATTATGTT
ACAATATGGAAGGGAACCTTTACACTTCTCCTATGCACATATATTAATTAAGTCCAATGC
TAGTAGAGAAGGGGGTAACACCCCTCCGCGCTCTTTCCGATTTTTTTCTAAACCGTG
GAATATTTCCGATATCCTTTTGTGTTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCCCTTTTTCTGG
CAACCAAACCCATACATCGGGATTCTATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGG
TGGCGGAGGGGAGATATAACAATAGAACAGATACCAGACAAGACATAATGGGCTAAACA
AGACTACACCAATTACACTGCCTCATTGATGGTGGTACATAACGAACATAACTGTAGC
CCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTACCCTTTTTCCATTTGCCATCTA
TTGAAGTAATAATAGGCGCATGCAACTTCTTTTCTTTTTTTTCTTTTCTCTCTCCCCCGT
TGTTGTCTCACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAA
```

ATTAACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATC
 TCGAAGCACACGAAACTTTTTCTTCCTTCATTACGCACACTACTCTCTAATGAGCAA
 CGGTATACGGCCTTCCTTCAGTTACTTGAATTTGAAATAAAAAAAAAAGTTTGCTGTCTT
 GCTATCAAGTATAAATAGACCTGCAATTATTAATCTTTTGTTTCCTCGTCATTGTTCTCGT
 TCCCTTTCTTCCTTGTTTCTTTTTCTGCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATAACAATCA
 ACTCCAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGCGGAATTAATCCCGAGCCTCCAAAAAAGA
 AGAGAAAGGTTCGAATTGGGTACCGCCGCCAATTTTAATCAAAGTGGGAATATTGCTG
 ATAGCTCATTGTCCTTCACTTTCACTAACAGTAGCAACGGTCCGAACCTCATAACA
 ACTCAAACAAATTCTCAAGCGCTTTCACAACCAATTGCCTCCTCTAACGTTTCATGA
 TAACTTCATGAATAATGAAATCACGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATAATTCAAA
 ACCACTGTCACCTGGTTGGACGGACCAAACTGCGTATAACGCGTTTGGAACTACT
 ACAGGGATGTTTAATACCACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGAT
 GAAGATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTTTAATACGACTCACTATAGGGCG
 AGCGCCGCCATGGAGTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGatggccgagaacttget
 ggacggaccgcecaaceccaaacgagccaaactcagctcgeccggcttctcegeaatgacaacacagatttggatcattgtttgac
 ttggaaaatgaccttctgatgagctgatceccaatggagaattaagecttttaaacagtgggaaacctgttccagatgctgcgtccaa
 acataaacaactgtcagagcttcttagaggaggcagcggctctagcatcaaccagggataggcaatgtgagtgccagcagccctgt
 gcaacagggccttgggtggccaggtcaggggcagccgaacagtacaacatggccagcttaggtgccatgggcaagagccctctga
 accaaggagactcatcaacaccaacctgcccacacaggcagccagcactctgggcccactcccctgctcccaagcactgaatc
 cacaagcacaaaagcaagtagggctggtagccagtagtctgccaatcacagactggacctgggatctgcatgaatgtaactca
 accagacccaccagccttctcaatagtaactctggccatagcttaatgaatcaggetcaacaagggcaagctcaagtcagatg
 gatctcttggggctgctggaagaggaaggggagctggaatgccctacctgctccagccatgcagggggccacaagcagtgctg
 ggggagaccttgacacaggttccccacaaatggctggccatgctggactaaatacagcacaggcaggaggcatgaccaagatggg
 aatgactggtaccacaagtcatttggacaaccttttagtcaaaactggagggcagcagatgggagccactggagtgaacccccagt
 agccagcaaacagagcatggtcaatagttacctgctttctacagatatcaagaatacttcagtcaccactgtgccaatatgtccc
 agttgcaaacatcagtggaattgtaccacacaagcaattgcaacagggccccacagcagacctgaaaaacgcaactgatacag
 cagcagctgggttctactgcttcatgcccacaaatgtcagagacgagagcaagcaatggagaggttegagcctgttctctcccact
 gtegaacctgaaaaacgttttgaatcaatgacacattgtcaggetcccaaacgctgccaagtgtcccattgtcatcttcacgacaa
 atcatctctattggaagaactgcaacgacatgactgtctgtttgctccccttgaaaaatgccagtgacaagcgaaccaacaaa
 ccactctgggatctccagctagtggaaattcaaaacacaattggttctgttggcagggcaacagGGATCCATCGAGCTC
 GAGCTGCAGATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACTTCAACTGTGCAT
 CGTGCACCATCTCAATTTCTTTCATTATACATCGTTTTGCCTTCTTTTATGTAACATACT
 CCTCTAAGTTTCAATCTTGGCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGA
 ATTAATGCCCATCTTTTTTTTTGGACCTAAATTTCTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTAT
 TCAGAAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCG
 GCTTGTCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAG
 ATACGTTGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATTAAT
 AAGTTATAAAAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTTAAACGA

AAATTCTTATTCTTGAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGCAT
GAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCCGGTCGAAATCCCCTACCCTATGAA
CATATTCCATTTTGTAATTTTCGTGTCGTTTCTATTATGAATTTCAATTTATAAAGTTTATGTA
CAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTTTAAGCAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGCGA
CAGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACCTAAATCACCAGTTCTGATACCT
GCATCCAAAACCTTTTTAACTGCATCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAAT
GACAATTTCAACATCATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTTGACCTTATTCTT
TGGCAAATCTGGAGCAGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAATGCGGTGTTCTTG
TCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCCAAGGAACCTGGGATAACG
GAGGCTTCATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATTATAATACCATTTAGG
TGGGTGGGTTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTTGAACCTT
CAATGTAGGAAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCTTGAAGA
GGCCAAAACATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTCATGTTGTAGGG
CCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTGCACCTTCTGGAACGGTGTATTGTTCACTAT
CCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTCTTACCAAAGTAAATACCTCCCCTA
ATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTAGCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAG
TCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTACATGGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTC
TTTACGGATTTTTAGTAAACCTTGTTCAAGTCTAACACTACCTGTACCCCATTTAGGACC
ACCCACAGCACCTAACAAAACGGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCT
GGAAGTGGGACACCTGTAGCGTCGATAGCAGCACCACCAATTAATGATTTTCGAAATC
GAACTTGACATTGGAACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTG
TGATTTCTTGACCAACGTGGTCACCTGGCAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATT
AGAATGGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCTGAAATGTAAAAGGTAAGAAAAGTT
AGAAAGTAAGACGATTGCTAACCACCTATTGGAAAAACAATAGGTCCTTAAATAATAT
TGTCAACTTCAAGTATTGTGATGCAAGCATTAGTCATGAACGCTTCTCTATTCTATATG
AAAAGCCGGTTCGGCGCTCTCACCTTTCCTTTTTCTCCAATTTTTCAGTTGAAAAAG
GTATATGCGTCAGGCGACCTCTGAAATTAACAAAAAATTTCCAGTCATCGAATTTGATTC
TGTGCGATAGCGCCCCTGTGTGTTCTCGTTATGTTGAGGAAAAAATAATGGTTGCTAA
GAGATTCGAACTCTTGCATCTTACGATACCTGAGTATTCCCACAGTTGGGGATCTCGAC
TCTAGCTAGAGGATCAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT
CCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG
CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCG
GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATTAGGT
CTGAAGAGGAGTTTACGTCCAGCCAAGCTAGCTTGGCTGCAGGTCGAGCGGCCGCGAT
CCGGAACCCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATCAGCTGCATTAAT
GAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTC
GCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCA
AAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG

CAAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG
AAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAG
CGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTC
CAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGT
AACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA
CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTG
GTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG
TAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAA
GAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTA
AGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA
ATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
CTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTG
ACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTG
CAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCA
GCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA
TTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTT
GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGC
TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGG
TTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTC
ATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTT
GCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTG
CTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAG
ATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCAC
CAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAG
GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTAT
CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATA
GGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATATTAT
CATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCG
GTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCT
GTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGG
GTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGTGAGAGTGCACCATA
ACGCATTTAAGCATAAACACGCACTATGCCGTTCTTCTCATGTATATATATACAGGCAA
CACGCAGATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAGCTGTATGTGCGCAGCTCGCGTTGCATT
TTCGGAAGCGCTCGTTTTTCGGAAACGCTTTGAAGTTCCTATTCCGAAGTTCCTATTCTCT

AGCTAGAAAGTATAGGAACTTCAGAGCGCTTTTGA AAAACCAAAGCGCTCTGAAGAC
 GCACTTTCAAAAAACCAAACGCACCGGACTGTAACGAGCTACTAAAATATTGCGAA
 TACCGCTTCCACAAACATTGCTCAAAAGTATCTCTTTGCTATATATCTCTGTGCTATATCC
 CTATATAACCTACCCATCCACCTTTCGCTCCTTGA ACTTGCATCTAAACTCGACCTCTAC
 ATTTTTTATGTTTATCTCTAGTATTACTCTTTAGACAAAAAATTGTAGTAAGAACTATTC
 ATAGAGTGAATCGAAAACAATACGAAAATGTAAACATTTCC TATAACGTAGTATATAGAGA
 CAAAATAGAAGAAACCGTTCATAATTTTCTGACCAATGAAGAATCATCAACGCTATCAC
 TTTCTGTTCAAAAGTATGCGCAATCCACATCGGTATAGAATATAATCGGGGATGCCTTT
 ATCTTGAAAAAATGCACCCGCAGCTTCGCTAGTAATCAGTAAACGCGGGAAGTGGAGT
 CAGGCTTTTTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAGTAGCCTTCTTCTAACCTTAACG
 GACCTACAGTGCAAAAAGTTATCAAGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAGGAGAAAA
 AAAGTAATCTAAGATGCTTTGTTAGAAAATAGCGCTCTCGGGATGCATTTTTGTAGAA
 CAAAAAGAAGTATAGATTCTTTGTTGGTAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTCTGTTC
 TGTA AAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTGAAAAATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTTG
 TTTTACAAAATGAAGCACAGATTCTTCGTTGGTAAAATAGCGCTTTCGCGTTGCATTT
 CTGTTCTGTAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGA AAAATTAGCGCTCTCGCGTTGC
 ATTTTTGTTCTACAAAATGAAGCACAGATGCTTCGTTGCT

pGADT7-CBP 质粒表达的氨基酸序列为：

Met Asp Lys Ala Glu Leu Ile Pro Glu Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Leu Gly Thr Ala
 Ala Asn Phe Asn Gln Ser Gly Asn Ile Ala Asp Ser Ser Leu Ser Phe Thr Phe Thr Asn Ser Ser
 Asn Gly Pro Asn Leu Ile Thr Thr Gln Thr Asn Ser Gln Ala Leu Ser Gln Pro Ile Ala Ser Ser
 Asn Val His Asp Asn Phe Met Asn Asn Glu Ile Thr Ala Ser Lys Ile Asp Asp Gly Asn Asn Ser
 Lys Pro Leu Ser Pro Gly Trp Thr Asp Gln Thr Ala Tyr Asn Ala Phe Gly Ile Thr Thr Gly
 Met Phe Asn Thr Thr Thr Met Asp Asp Val Tyr Asn Tyr Leu Phe Asp Asp Glu Asp Thr Pro
 Pro Asn Pro Lys Lys Glu Ile Phe Asn Thr Thr His Tyr Arg Ala Ser Ala Ala Met Glu Tyr Pro Tyr
 Asp Val Pro Asp Tyr Ala His Met Met Ala Glu Asn Leu Leu Asp Gly Pro Pro Asn Pro Lys Arg
Ala Lys Leu Ser Ser Pro Gly Phe Ser Ala Asn Asp Asn Thr Asp Phe Gly Ser Leu Phe Asp
Leu Glu Asn Asp Leu Pro Asp Glu Leu Ile Pro Asn Gly Glu Leu Ser Leu Leu Asn Ser Gly
Asn Leu Val Pro Asp Ala Ala Ser Lys His Lys Gln Leu Ser Glu Leu Leu Arg Gly Gly Ser Gly
Ser Ser Ile Asn Pro Gly Ile Gly Asn Val Ser Ala Ser Ser Pro Val Gln Gln Gly Leu Gly Gly
Gln Ala Gln Gly Gln Pro Asn Ser Thr Asn Met Ala Ser Leu Gly Ala Met Gly Lys Ser Pro
Leu Asn Gln Gly Asp Ser Ser Thr Pro Asn Leu Pro Lys Gln Ala Ala Ser Thr Ser Gly Pro
Thr Pro Pro Ala Ser Gln Ala Leu Asn Pro Gln Ala Gln Lys Gln Val Gly Leu Val Thr Ser Ser
Pro Ala Thr Ser Gln Thr Gly Pro Gly Ile Cys Met Asn Ala Asn Phe Asn Gln Thr His Pro
Gly Leu Leu Asn Ser Asn Ser Gly His Ser Leu Met Asn Gln Ala Gln Gln Gly Gln Ala Gln
Val Met Asn Gly Ser Leu Gly Ala Ala Gly Arg Gly Arg Gly Ala Gly Met Pro Tyr Pro Ala
Pro Ala Met Gln Gly Ala Thr Ser Ser Val Leu Ala Glu Thr Leu Thr Gln Val Ser Pro Gln
Met Ala Gly His Ala Gly Leu Asn Thr Ala Gln Ala Gly Gly Met Thr Lys Met Gly Met Thr

Gly Thr Thr Ser Pro Phe Gly Gln Pro Phe Ser Gln Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ala Thr
Gly Val Asn Pro Gln Leu Ala Ser Lys Gln Ser Met Val Asn Ser Leu Pro Ala Phe Pro Thr Asp
Ile Lys Asn Thr Ser Val Thr Thr Val Pro Asn Met Ser Gln Leu Gln Thr Ser Val Gly Ile Val
Pro Thr Gln Ala Ile Ala Thr Gly Pro Thr Ala Asp Pro Glu Lys Arg Lys Leu Ile Gln Gln Gln
Leu Val Leu Leu Leu His Ala His Lys Cys Gln Arg Arg Glu Gln Ala Asn Gly Glu Val Arg
Ala Cys Ser Leu Pro His Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln
Ala Pro Lys Ala Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile Ile Ser His Trp Lys Asn
Cys Thr Arg His Asp Cys Pro Val Cys Leu Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Arg Asn Gln
Gln Thr Ile Leu Gly Ser Pro Ala Ser Gly Ile Gln Asn Thr Ile Gly Ser Val Gly Ala Gly Gln
Gln Gly Ser Ile Glu Leu Glu Leu Gln Met Asn Arg Arg Tyr ***

本发明利用载体 pGBKT7 构建的 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒，具有如下核苷酸序列：

CGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGATCCTTTTGTGTTTCCGGGTGTACAA
TATGGACTTCCTCTTTTCTGGCAACCAAACCCATACATCGGGATTCCTATAATACCTTCG
TTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGCGGAGGGGAGATATAACAATAGAACAGATACCAGAC
AAGACATAATGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACTGCCTCATTGATGGTGGTACA
TAACGAACTAATACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTAC
CCTTTTCCATTTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGCATGCAACTTCTTTTCTTTTTT
TTTCTTTTCTCTCTCCCCGTTGTTGTCTCACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATG
GAAGACACTAAAGGAAAAAATTAACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTC
CAGAGCTGATGAGGGGTATCTCGAAGCACACGAACTTTTTCCTTCCTTCATTACGCA
CACTACTCTCTAATGAGCAACGGTATAACGGCCTTCCTTCCAGTTACTTGAATTTGAAATA
AAAAAAGTTTGCTGTCTTGCTATCAAGTATAAATAGACCTGCAATTATTAATCTTTTGTTT
CCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTTTCTCCTTGTCTTTTCTGACACAATATTTCAAGCT
ATACCAAGCATACAATCAACTCCAAGCTTGAAGCAAGCCTCCTGAAAGATGAAGCTAC
TGTCTTCTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCC
AAAGAAAAACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTCGCTAC
TCTCCCAAACCAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGGAAT
CAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACTGATTTTTCTCCTCGAGAAGACCT
TGACATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTTAACAGGAT
TATTTGTACAAGATAATGTGAATAAAGATGCCGTACAGATAGATTGGCTTCAGTG
GAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCGACATCATCATC
GGAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCGGAATTTGTAA
TACGACTCACTATAGGGCGAGCCGCCATCATGGAGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGA
GGACCTGCATATGgcgagatctccagtgatctgaccagctgaatccagagtccgctgacctcgggacctggcaaaaca
tttgatgactcatacataaagtcttccgctgaccaaagcaaggcgagggcgatcttgacaggaaagacaacagacaaatcacc
attegttatctatgacatgaattccttaatgatgggagaagataaaatcaagttcaaacacatcaccccctgcaggagcagagcaaa
gaggtggccatccgcatcttccagggtgccagtttccgctcggaggctgtgcaggagatcacagagtatgccaaaagcattcctg
gttttgtaaatcttgacttgaacgaccaagtaactctctcaaatatggagtccacgagatcattacacaatgctggcctccttgatga

ataaagatggggttctatccgagggccaaggettcattgacaagggagtttctaaagagcctgcgaaagccttttggtgactttatg
 gagcccaagtttgagtttctgtgaagttcaatgcaactggaattagatgacagcgaacttggaatatttattgtctcattattctcagtg
 gagaccgcccagggttgctgaatgtgaagcccattgaagacattcaagacaacctgctacaagccctggagctccagctgaagctga
 accacctgagctctcacagctgtttgccaagctgctccagaaaaatgacagacctcagacagattgtcacggaaacagctgcagctact
 gcaggtgatcaagaagacggagacagacatgagttcaccctcctgcaggagatctacaaggactgtactagGTCGACC
 TGCAGCGGCCGCATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGT
 TTTTTCGCGCTTGCAGCCAAGCTAATTCGGGGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTAT
 TATTAAATAAGTTATAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTACTCTTAGGTTTT
 AAAACGAAAATTCCTTATTCTTGAGTAACCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGT
 ATAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCAAGCTTGCGCGTAATC
 ATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACG
 AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGGTAACCTCACATTA
 ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA
 ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCC
 TCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACT
 CAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTG
 AGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
 CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGG
 CGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGC
 GCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGA
 AGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCG
 CTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCC
 GGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG
 CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA
 GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA
 AGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACACCACCGC
 TGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCT
 CAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAC
 GTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATT
 AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGG
 CCTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTCACCCGAACCTGGGGGGTGGG
 GTGGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTAT
 CGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATGAACAAACGACCCAACAC
 CGTGCGTTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTC
 CTTCCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCC
 CGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTC
 ATAGAAGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTGGTCG
 GTTCATTTTGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGG

CGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGCCC
ATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGG
TCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCA
TGATATTCGGCAAGCAGGCATCGTCATGGGTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATG
CTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCA
GATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGT
TTCGCTTGGTGGTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCAATTG
CATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTG
CCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGC
ACAGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTT
GCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAGAACCAGGGCGCCCCCT
GCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTC
ATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTT
CAATCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAG
CGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTCCGCGCACATTTCC
CCGAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCATTTTGTAGAACAAAATGCAA
CGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAA
TGCAACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAAGAATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAA
AAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAG
AACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTATTTTACCAACAAGAATCTATACTTCTTTTTTG
TTCTACAAAATGCATCCCGAGAGCGCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGACTTTTT
TTTCTCCTTTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTT
AAGGTTAGAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAAAAAGCCTGACTC
CACTTCCCGCTTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAAGATAAAGG
CATCCCCGATTATATTCTATAACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGAT
AGCGTTGATGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTAT
ATACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCGATTCACTCTATGAATAGTT
CTTACTACAATTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACATAAAAAATGTAGAGG
TCGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGTAGGTTATATAGGGATAT
AGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTCG
CAATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCGTTTTTGGTTTTTTGAAAGTGCGTCTTC
AGAGCGCTTTTTGGTTTTCAAAGCGCTCTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAA
CTTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGTTTCCGAAAACGAGCGCTTCCGAAAATGCAACGC
GAGCTGCGCACATACAGCTCACTGTTACGTGCGCACCTATATCTGCGTGTTGCCTGTATA
TATATACATGAGAAGAACGGCATAAGTGCCTGTTTATGCTTAAATGCGTACTTATATGCG
TCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATATTATCCCATTCATGCG
GGGTATCGTATGCTTCCCTTCAGCACTACCCTTTAGCTGTTCTATATGCTGCCACTCCTCAA
TTGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTATCATTTCCTTTGATATTGGATCATATTAAGAAAC

CATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGC
 GCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACA
 GCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGT
 GTTGGCGGGTGTCTGGGGCTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAG
 TGCACCATAGATCAACGACATTACTATATATAATATAGGAAGCATTAAATAGAACAGCA
 TCGTAATATATGTGTACTTTGCAGTTATGACGCCAGATGGCAGTAGTGGAAGATATTCTT
 TATTGAAAAATAGCTTGTACCTTACGTACAATCTTGATCCGGAGCTTTTCTTTTTTGC
 CGATTAAGAATTAATTCGGTCGAAAAAAGAAAAGGAGAGGGCCAAGAGGGAGGGCAT
 TGGTGACTATTGAGCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTAT
 GTCTGTTATTAATTTACAGGTAGTTCTGGTCCATTGGTGAAAGTTTGCGGCTTGCAGA
 GCACAGAGGCCGCAGAATGTGCTCTAGATTCCGATGCTGACTTGCTGGGTATTATATGT
 GTGCCAATAGAAAGAGAACAATTGACCCGGTTATTGCAAGGAAAATTTCAAGTCTTG
 TAAAAGCATATAAAAATAGTTCAGGCACTCCGAAATACTTGGTTGGCGTGTTTTCGTAAT
 CAACCTAAGGAGGATGTTTTGGCTCTGGTCAATGATTACGGCATTGATATCGTCCAAC
 GCATGGAGATGAGTCGTGGCAAGAATACCAAGAGTTCCTCGGTTTGCCAGTTATTA
 AAGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGCAGCTTCACAGAAACCTCA
 TTCGTTTATTCCTTGTTTGATTCAGAAGCAGGTGGGACAGGTGAACCTTTTGGATTGGA
 ACTCGATTTCTGACTGGGTTGGAAGGCAAGAGAGCCCCGAAAGCTTACATTTTATGTTA
 GCTGGTGGACTGACGCCAGAAAATGTTGGTGATGCGCTTAGATTAAATGGCGTTATTGG
 TGTTGATGTAAGCGGAGGTGTGGAGACAAATGGTGTAAGACTCTAACAAAATAGCA
 AATTCGTCAAAAATGCTAAGAAATAGGTTATTACTGAGTAGTATTTATTTAAGTATTGTT
 TGTGCACTTGCCGATCTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATAC
 CGCATCAGGAAATTGTAACGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAT
 CAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAATCCCTTATAAATCAAAGAAT
 AGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAA
 CGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGT
 GAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGA
 ACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGA
 GAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
 GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGT
 CCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGAT

pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒表达的氨基酸序列如下:

**Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys
 Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg
 Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg
 Leu Glu Arg Leu Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu
 Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val
 Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg**

Gln His Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Pro Glu Phe Val Ile Arg Leu Thr Ile Gly Arg Ala Ala Ile Met Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His Met Ala Glu Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr ***

上述两个质粒的核苷酸序列中：带下划线的碱基表示的是克隆该基因时所用的酶切位点；加粗的碱基序列表示融合蛋白的序列；**ATG** 和 **TGA** 也加粗表示起始密码子和终止密码子；小写加粗的碱基序列表示插入基因的序列；**tag** 表示终止密码子。

上述两个质粒所表达的氨基酸序列中：加黑的氨基酸序列表示的是融合蛋白的氨基酸序列；加黑并带有下划线的氨基酸序列表示的是插入基因的氨基酸序列；***表示终止。

附图说明

图 1 为 pGADT7-CBP 质粒构建策略图。

图 2 为 CBP(1-464aa) PCR 产物琼脂糖电泳鉴定图谱，图谱左列为 CBP(1-464aa)PCR 产物电泳条带，该条带大小为 1400bp，右列为 100 bp DNA marker。

图 3 为 pGADT7-CBP 质粒酶切鉴定结果图，其中 0 号为 1kb DNA Marker；1 号—9 号为转化平板上挑出的克隆。

图 4 为 pGADT7-CBP 测序结果图。

图 5 为 PGBKT7-PPAR γ LBD 质粒构建策略图。

图 6 为 PPAR γ LBD(193aa-475aa)PCR 产物琼脂糖电泳鉴定图谱，图谱左列为 DNA 长度标记，右列为 PPAR γ LBD(193aa-475aa)PCR 产物电泳条带，该条带大小为 850bp。

图 7 为 PGBKT7-PPAR γ LBD 质粒酶切鉴定结果，图谱左列为转化平板上挑出的克隆 8 号，右列为 1 kb DNA 标记。

图 8 为 pGBKT7-PPAR γ LBD 测序结果图。

图 9 为质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 转化结果的 PCR 鉴定图，其中 1 为 100bp 的 DNA

ladder, 2-4 依次为所挑取的 1-3 号克隆, 5 为阳性对照(pGBKT7-PPAR γ LBD 为模板)。

图 10 为质粒 pGADT7-CBP 转化结果的 PCR 鉴定图, 其中 1 为 1kb 的 DNA 标记, 2 为阴性对照 (H₂O 为模板), 3 为阳性对照 (pGADT7-CBP 为模板), 4-5 为所挑取的 1-2 号克隆。

图 11 为罗格列酮对 CBP 与 PPAR γ 相互作用影响图, 其中 1 表示酵母菌株 P1 (含质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD)、2 表示加入二甲亚砜后的酵母菌株 P1、3 表示加入罗格列酮 (溶于二甲亚砜) 后的酵母菌株 P1、4 表示酵母菌株 P1C2 (含双质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 和 pGADT7-CBP)、5 表示加入二甲亚砜后的酵母菌株 P1C2、6 表示加入罗格列酮 (溶于二甲亚砜) 的酵母菌株 P1C2。

图 12 为药物作用时间对检测灵敏度的影响图。

图 13 为罗格列酮 EC₅₀ 的测定结果图。

图 14 为化合物筛选结果图。

有益效果:

1、利用本发明可进行 PPAR γ 拮抗剂和激动剂的高通量筛选, 本发明采用酵母基因组自带的 MEL1 基因作为双杂交的报告基因, 通过测定其分泌型的产物 α -半乳糖苷酶的活性来检测小分子化合物对 PPAR γ 与其共激活因子相互作用程度的影响, 无需裂解酵母细胞, 是一种非常方便快捷且准确的方法, 加之酵母细胞的易操作性有利于实现真核水平的高通量筛选。

2、利用本发明, 首次在酵母水平进行了已知 PPAR γ 激动剂—罗格列酮 EC₅₀ 的测定。

3、利用本发明可实现 PPAR γ 拮抗剂和激动剂的高通量筛选, 为药物的结构修饰和天然先导化合物的发现提供实验基础。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述, 但不限制本发明。

下述实施例中, 所用的试验材料及其来源包括:

酵母菌株 AH109 (基因型为 MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52,his3-200, gal4,gal80 \square ... LYS2: :GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3,MEL1UAS-MEL1TATA-MMEL1UAS-MEL1TATA-MEL1,GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2,URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ)、酵母表达质粒 pGBKT7 和 pGADT7 为中科院上海生命科学学院龚毅教授惠赠;

模板 CMV-mCBP 由 M.G.Rosenfeld 提供;

模板 pCDNA3.1-PPAR γ 由成都地奥公司提供;

限制性内切酶、DNA 聚合酶、连接酶、dNTP 等均购自 TaKaRa 公司;

10 \times buffer 随 pyrobestTM DNA 聚合酶一起购自 TaKaRa 公司;

胶回收试剂盒购自华舜公司;

氨苄西林、卡那霉素、LiAc、PEG 3500、PNP- α -Gal、各培养基的配制原料均购自 sigma 公司；

SS-carrier DNA 购自 Strategene；

DNA marker 购自鼎国生物公司；

引物合成与 DNA 测序由上海博亚公司完成；

96 孔板购自 Nunclon 公司。

下述实施例中常规的基因操作参照有关文献，其中限制性酶切方法参照分子克隆第二版：P259—P262；用 T₄ DNA 连接酶连接方法参照分子克隆第二版：P282—P283；连接产物转化入感受态细胞 DH5 α 方法参照分子克隆第二版：P55—P56；用酶切鉴定方法参照分子克隆第二版：P259—P262；琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物方法参照分子克隆第二版：P680-P682；胶回收按照华舜公司的试剂盒说明书；质粒提取方法参照 C.Hoffman and F.Winston, Gene 57: 267;1987；LB 培养基的配制方法参照分子克隆第二版：P908；酵母各培养基的配制方法参照 Yeast Protocol Handbook (CLONTECH)。

实施例 1 CBP 和酵母 GAL4AD 融合蛋白 (pGADT7-CBP) 的质粒构建：

(一) 试验方法：

1) 以 CMV-mCBP 为模板，用 PCR 技术复制扩增获得 CBP (1-464aa) 的 DNA 片段 (基因序列依据 S66385(GENE BANK))：

引物设计：FW: 5' AACATATGATGGCCGAGAACTTGCTGGACG 3'

RV: 5' AAGGATCCCTGTTGCCCTGCACCAACAG 3'

PCR 扩增反应 (100 μ l)：

CMV-mCBP 模板：2 μ l；10 \times buffer：10 μ l；dNTP(2.5mM)：8 μ l；FW：4 μ l；RV：4 μ l；pyrobestTM DNA 聚合酶：1 μ l；水：71 μ l。

反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 8 min，开始循环 95 $^{\circ}$ C 1min，65 $^{\circ}$ C 1min，72 $^{\circ}$ C 1min30s，重复 30 循环，72 $^{\circ}$ C 10min。

采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物，回收 DNA。

2) 将 CBP(1-464aa)的 PCR 产物克隆到 pGADT7 载体上

CBP(1-464aa)的 PCR 产物和 pGADT7 分别用 Nde I 和 BamH I 酶切；用试剂盒方法回收酶切产物，其中回收 CBP(1-464aa)的 PCR 酶切产物近 1400bp；pGADT7 酶切产物近 8.0kb；用 T₄ DNA 连接酶连接；连接产物转化入感受态细胞 DH5 α ；涂布在含氨苄西林 (100mg/l) 的平板上；用酶切鉴定挑选正确的克隆。

(二) 试验结果：

1、采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物的结果见图 2。

2、酶切鉴定结果：在载体上 1480bp, 2280bp 处有两个 Hind III 的酶切位点，1480bp—

2280bp 间存在着多克隆位点, CBP 就克隆在这个区域内, 因而正确的克隆应切出约 2200bp 和 7.2kb 左右的片段。如图 3 所示, 经进一步酶切鉴定结果显示确实有正确的克隆 (5 号和 9 号)。

3、DNA 测序报告: pGADT7-CBP 表达载体测序报告如图 4 所示, pGADT7-CBP DNA 测序结果和 CBP (1-464aa) 原 DNA 序列比较, 原序列 1131 处是一个未知碱基 N, 5 号在该处测出的是 A, 但这个位置是密码子的第三位, 所以无论是 AGCT 哪种, 都不影响氨基酸编码。

实施例 2 PPAR γ LBD 和酵母 GAL4BD 融合蛋白 (pGBKT7-PPAR γ LBD) 的构建:

(一) 试验方法:

以 pCDNA3.1-PPAR γ 为模板, 用 PCR 技术复制扩增获得 PPAR γ LBD(193aa-475aa) 的 DNA 片段 (基因序列依据 NM005037(GENE BANK)):

引物设计: FW: 5' AACATATGGCGGAGATCTCCAGT 3'

RV: 5' AAGTCGACCTAGTACAAGTCCTT 3'

PCR 扩增反应 (100 μ l):

pCDNA3.1-PPAR γ 模板: 2 μ l; 10 \times buffer: 10 μ l; dNTP(2.5mM): 8 μ l; FW: 4 μ l; RV: 4 μ l; pyrobest 聚合酶: 1 μ l; 水: 71 μ l。

反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 5min, 开始循环 95 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 重复 30 循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。

采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 回收 DNA。

2) 将 PPAR γ LBD 的 PCR 产物克隆到 pGBKT7 载体上:

PPAR γ LBD 的 PCR 产物和 pGBKT7 分别用 Nde I 和 Sal I 酶切; 用试剂盒方法回收酶切产物, 其中回收 PPAR γ LBD 的 PCR 酶切产物近 850bp; pGBKT7 酶切产物近 7.3kb; 用 T₄ DNA 连接酶连接; 连接产物转化入感受态细胞 DH5 α ; 涂布在含卡那霉素 (50mg/l) 的平板上用酶切鉴定, 挑选正确的克隆。

(二) 试验结果:

1、采用琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物的结果见图 6。

2、酶切鉴定结果: 在载体上 6313bp 处有一个 EcoRV 的酶切位点, PPAR γ LBD 基因内部 16bp 处也有一个 EcoRV 的酶切位点, 因而正确的克隆应切出约 2200bp 和 6kb 左右的片段。如图 7 所示, 经进一步酶切鉴定结果显示确实有正确的克隆 (8 号)。

3、DNA 测序报告: pGADT7-CBP 表达载体测序报告如图 8 所示, PPAR γ LBD DNA 测序结果和 PPAR γ LBD 原 DNA 序列比较, 结果完全一致。

实施例 3 将 pGADT7-CBP 与 pGBKT7-PPAR γ LBD 分步转入酵母细胞 AH109 中

(一) 试验方法

1) 按 LiAC 法将质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD 转入酵母细胞 AH109 :

接种酵母菌株 AH109 于约 3 ml YPDA 中, 30°C、250rpm 培养 16-18h (OD600 约为 1.4) ;

菌液按 1: 5 转接于新鲜的 YPDA 中, 30°C、200rpm 培养 5-7 h (OD600 至 0.8~1.2);

取 10 ml 菌液, 4000 rpm* 5 min 离心收集酵母细胞;

弃上清, 1 ml 无菌水重悬, 转移入另一离心管中, 再加入约 10 ml 无菌水, 混匀;

4000 rpm* 5 min 再次离心收集酵母细胞;

弃上清, 1 ml 无菌水重悬, 转移入 1.5 ml eppendorf 管中;

4000 rpm* 5 min 再次离心收集酵母细胞, 小心吸去上清;

依次加入: 240 μ l PEG 3500 (50% W/V)、36 μ l 1.0 M LiAc (pH7.5)、5 μ l 煮沸的 SS-carrier DNA (10 mg/ml)、60 μ l 无菌水和 10 μ l 待转化质粒。

剧烈振荡 1 min ;

30°C 静置 30 min ;

42°C 水浴静置 30 min , 每隔 5 min 颠倒混匀一次;

4000 rpm* 5 min 离心收集转化的酵母细胞;

吸去上清, 1 ml 无菌水重悬, 取 200 μ l 涂于涂布于色氨酸缺陷(以下简称为 T⁻) 的选择平板上, 30°C 培养 3-4 d ;

2) 鉴定携带 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒的阳性克隆:

以上 T⁻ 选择平板上长出的克隆中, 挑取 1-3 号至 T⁻ 液体培养基中, 30°C、250rpm 培养 16-18h ;

收集酵母, 提取质粒, PCR 鉴定所提质粒:

引物序列: FW: 5'GTAATACGACTCACTATAGGGCGA 3'

RV: 5'TCCGAGTCACTTTAAAATTTGTAT 3'

PCR 扩增反应 (20 μ l):

模板 (所提质粒): 14 μ l; 10 \times buffer: 2 μ l; dNTP(2.5mM): 2 μ l;

FW: 1 μ l; RV: 1 μ l; taq DNA polymerase: 0.5 μ l 。

反应条件为 95°C 变性 5min, 开始循环 95°C 45s; 50°C 45s; 72°C 1 min, 重复 35 循环, 72°C 变性 10min。

3) PCR 鉴定得到拥有 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒的阳性克隆 1, 结果如图 9 所示。

4) 将质粒 pGADT7-CBP 转入到上述 1 号克隆中

接种 1 号克隆于约 3 ml T⁻ 液体培养基中, 30°C、250rpm 培养 16-18h (OD600 约为 1.4); 菌液按 1: 5 转接于新鲜的 T⁻ 液体培养基中, 30°C、200rpm 培养 5-7 h (OD600 至 0.8~1.2);

按以上所述步骤转化 1 号克隆，最终涂布于色氨酸、亮氨酸双缺陷(以下简称为 TL⁻)平板，30℃ 培养 3-4 d ；

5) PCR 鉴定质粒 pGADT7-CBP 是否转入 1 号克隆

挑取 TL⁻ 平板上的 1-3 号克隆至 TL 液体培养基中，30℃、250rpm，培养 16-18h 后提质粒（方法同前），PCR 鉴定：

引物序列： FW: 5'GTAATACGACTCACTATAGGGCGA 3'

RV: 5'AGATGGTGCACGATGCACAGTT 3'

PCR 扩增反应 (20μl)：

模板 (所提质粒)： 14 μl； 10×buffer： 2μl； dNTP(2.5mM)： 2μl； FW： 1μl； RV： 1μl； taq DNA 聚合酶： 0.5μl 。

反应条件： 95℃ 变性 5min，开始循环 95℃ 45s； 50℃ 45s； 72℃ 1 min，重复 35 循环； 72℃ 变性 10min

6) 鉴定得到拥有 pGBKT7-PPAR γ LBD&pGADT7-CBP 两个质粒的阳性克隆 2 ， 结果如图 10 所示。

实施例 4 筛选化合物

1、罗格列酮（阳性化合物）对 CBP 与 PPAR γ 相互作用影响的鉴定：

1) 将拥有 pGBKT7-PPAR γ LBD 质粒的 1 号克隆（以下简称为 P1）和拥有双质粒 pGBKT7-PPAR γ LBD& pGADT7-CBP 的 2 号克隆（以下简称 P1C2）分别划线于 T⁻、TL⁻ 平板，30℃ 培养 3-4 d 后，取新鲜克隆（1-3 周），分别接种于 2 ml T⁻、TL⁻ 液体培养基中，30℃、250rpm，过夜培养 16-18h；

2) 分别用 T⁻、TL⁻ 液体培养基稀释 P1、P1C2 过夜菌（至 OD600 约 0.3），按 1:100 加入罗格列酮（自制合成，溶于二甲亚砜 (DMSO), 10 mM) 或 DMSO，实验分组情况如下表：

实验组号		1	2	3	4	5	6
菌株名称		P1	P1	P1	P1C2	P1C2	P1C2
所含质粒	pGBKT7-PPAR γ LBD	+	+	+	+	+	+
	pGADT7-CBP	-	-	-	+	+	+
所加药物	二甲亚砜 (DMSO)	-	+	+	-	+	+
	罗格列酮 (10 ⁻⁴ M)	-	-	+	-	-	+

* 每组均设三份平行。

30℃ 培养 6h 后，测定 α -半乳糖苷酶活性（按照 Yeast Protocol Handbook (CLONTECH) 进行）：

混匀酵母培养液，取 200μl 测定 OD 600 (HITACHI, 分光光度计 U-2010)；

另取 200μl 菌液于 1.5ml eppendorf 管中，10,000rpm* 5 min 离心；

取 16 μ l 上清于 96 孔板中 (T、TL 液体培养基分别用作空白对照), 每孔加入 48 μ l 分析缓冲液 (100 mM PNP-a-Gal 水溶液与 0.5 M 醋酸钠, pH 4.5 按体积比 1:2 混合); 30 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;

加入 136 μ l 10X 终止缓冲液 (1 M Na₂CO₃), 终止反应; 测定 410nm 处的 OD 值 (BIO-RAD 酶标仪 MODEL 550)。

α -半乳糖苷酶活性的计算公式为:

$$\alpha\text{-半乳糖苷酶活性 [mIU/(ml} \times \text{cell)]} = \text{OD}_{410} \times V_f \times 1,000 / [(\epsilon \times b) \times t \times V_i \times \text{OD}_{600}]$$

其中, t = 反应时间 (分)

V_f = 测值时的终体积 (200 μ l)

V_i = 加入酵母培养液上清的体积 (16 μ l)

OD₆₀₀ = 酵母培养液中酵母在 600nm 处的吸光度

$\epsilon \times b$ = 对-硝基苯酚在 410 nm 处的摩尔吸光度 \times 比色杯的底边边长 (cm)

= 10.5 (ml/ μ mol) (对于 200 μ l 菌液而言)

3) 试验结果, 各试验组的 α -半乳糖苷酶活性检测结果如图 11 所示

由图 11 可见, 加入罗格列酮能有效提高实验菌株 P1C2 的 α -半乳糖苷酶活性, 作为溶剂的 DMSO 对酶活则基本无影响; 而相同条件下对 P1 菌株进行 α -半乳糖苷酶活性检测, 结果均为阴性。可见, 罗格列酮作为一种已知的 PPAR. γ 激动剂, 其与 PPAR. γ 的结合改变了 PPAR. γ 的构象, 使得配体依赖性的 PPAR. γ 与 CBP 的结合得以增强, 最终促进了 GAL4 依赖的 MEL1 基因表达其产物 α -半乳糖苷酶。

2、药物孵育时间对检测灵敏性的影响:

由于目前尚无用 α -半乳糖苷酶做为报告基因来定量检测药物效力, 借以筛选新的先导化合物的相关报道, 而文献报道的采用 β -半乳糖苷酶做为酵母双杂交中的报告基因进行药物筛选时, 有关加药时间的确定也并不统一, 从 4-5 h 至过夜孵育不等, 更无人做过加药时间与灵敏度间相关性的有关工作。

接 P1C2 于 TL 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、250rpm 培养过夜, 基于更灵敏地检测, 用 T-L- 液体培养基对过夜菌作不同程度的稀释 (按下表), 以便测酶活时, 各组菌均能达到对数生长中期。

药物孵育时间 (h)	2	4	6	8	10	12	14
稀释后菌液的 OD ₆₀₀	0.60	0.40	0.30	0.24	0.12	0.08	0.05

按 1:100 加入 罗格列酮 (10 mM) 或 DMSO, 30 $^{\circ}$ C 孵育。在孵育 2h、4h、6h、8h、10h、12h、14h 时 (每隔 2 h) 取样, 按照试验 1 所述的方法, 测定各试验组 α -半乳糖苷酶活性。并计算 α -半乳糖苷酶相对活性, 其公式为:

加药物 P1C2 的酶 α - 半乳糖苷酶活

$$\alpha \text{ - 半乳糖苷酶相对活性} = \frac{\text{加药物 P1C2 的酶 } \alpha \text{ - 半乳糖苷酶活}}{\text{加 DMSO P1C2 的 } \alpha \text{ - 半乳糖苷酶活}}$$

结果如图 12 所示，延长药物作用的时间可提高该系统检测的灵敏度，12-14 小时的孵育时间可使本系统灵敏度足以满足药物筛选的需要。

由以上实验，可以看出，PPAR. γ 、CBP 间这种配体依赖性的相互作用在以上的实验系统中灵敏稳定地被定量检测与衡量，可用于筛选能充当 PPAR. γ 配体的天然化合物（激动剂或拮抗剂）。

3、罗格列酮（阳性化合物）EC₅₀ 的测定

接 P1C2 于 T-L 液体培养基中，30℃、250rpm 培养过夜，用 T-L 液体培养基稀释过夜菌至 OD600 约 0.08 后，以 1:100 分别加入不同浓度的罗格列酮（10⁻⁹M、10⁻⁸ M、10⁻⁷ M、10⁻⁶ M、10⁻⁵ M、10⁻⁴10⁻⁵ M）或 DMSO，30℃ 培养 12h 后，按照试验 1 所述的方法，测定各试验组 α - 半乳糖苷酶活性，并计算 α - 半乳糖苷酶相对活性。结果如图 13 所示，罗格列酮对 CBP 与 PPAR γ 间相互作用的促进作用是浓度依赖性的，并据此可得到其在该系统中 EC50 为 1.3E-6。由此，罗格列酮在本系统中可作为阳性化合物来衡量待筛药物的活性。

4、药物筛选

接 P1C2 于 T-L- 液体培养基中，30℃、250rpm 培养过夜，T-L- 液体培养基稀释后，按 1:100 分别加入 罗格列酮（10 mM）、DMSO 以及待筛药物（10 mM），30℃ 孵育 12 h 后，进行 α - 半乳糖苷酶活性测定，并计算其激动率：

$$\text{激动率} = \frac{\text{加药物的酶活力} - \text{加 DMSO 的酶活力}}{\text{加罗格列酮的酶活力} - \text{加 DMSO 的酶活力}} * 100\%$$

本试验中待筛药物包括：H001-H007: 为计算机药物辅助设计所得，并经 BIOCORE 筛选；

Z001-Z013: 为本实验室所提取的中药（初提物或纯化合物）；结果如图 14 所示：H007、Z007 表现出了强的激动效应，H001、H003、Z001、Z002 也表现出了较好的激动效应；而 H002、Z004 则表现出了强的抑制效应。活性强的化合物可进一步测试其细胞或动物水平上的药效，活性不强的则可通过计算机辅助设计进行结构修饰，以提高其活性。

序 列 表

(1) 一般信息

(i) 发明名称: PPAR 拮抗剂和激动剂的筛选方法

(ii) 序列数目: 4

(2) 序列 SEQ NO.1 的信息: (pGADT7-CBP 的 DNA 序列)

(i) 序列特征:

(A) 长度: 9337 bp

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链性: 双链

(D) 拓扑结构: 环状

(ii) 分子类型: DNA

(iii) 序列描述: SEQ NO.1

```
TGCATGCCTGCAGGTCGAGATCCGGGATCGAAGAAATGATGGTAAATGAAATAGGAAA
TCAAGGAGCATGAAGGCAAAGACAAATATAAGGGTTCGAACGAAAAATAAAGTGAAA
AGTGTTGATATGATGTATTTGGCTTTGCGGCGCCGAAAAACGAGTTTACGCAATTGCA
CAATCATGCTGACTCTGTGGCGGACCCGCGCTCTTGCCGGCCCGGCGATAACGCTGGG
CGTGAGGCTGTGCCCGGCGGAGTTTTTTGCGCCTGCATTTTCCAAGGTTTACCCTGCGC
TAAGGGGCGAGATTGGAGAAGCAATAAGAATGCCGGTTGGGGTTGCGATGATGACGAC
CACGACAACCTGGTGTCAATTATTAAGTTGCCGAAAGAACCTGAGTGCATTTGCAACATG
AGTATACTAGAAGAATGAGCCAAGACTTGCAGACGCGAGTTTGCCGGTGGTGCGAAC
AATAGAGCGACCATGACCTTGAAGGTGAGACGCGCATAACCGCTAGAGTACTTTGAAG
AGGAAACAGCAATAGGGTTGCTACCAGTATAAATAGACAGGTACATACAACACTGGAA
ATGGTTGTCTGTTTGAGTACGCTTTCAATTCATTTGGGTGTGCACTTTATTATGTTACAAT
ATGGAAGGGAACCTTACACTTCTCCTATGCACATATATTAATTAAGTCCAATGCTAGTA
GAGAAGGGGGGTAACACCCCTCCGCGCTCTTTTCCGATTTTTTTCTAAACCGTGGAATA
TTTTGGATATCCTTTTGTGTTTCCGGGTGTACAATATGGACTTCCCTCTTTTCTGGCAAC
CAAACCCATACATCGGGATTCCTATAATACCTTCGTTGGTCTCCCTAACATGTAGGTGGC
GGAGGGGAGATATACAATAGAACAGATACCAGACAAGACATAATGGGCTAAACAAGAC
TACACCAATTACACTGCCTCATTGATGGTGGTACATAACGAACTAATACTGTAGCCCTAG
ACTTGATAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTACCCTTTTTCCATTTGCCATCTATTGAA
GTAATAATAGGCGCATGCAACTTCTTTTCTTTTTTTTTCTTTTCTCTCTCCCCGTTGTTG
TCTCACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATGGAAGACACTAAAGGAAAAAATTA
CGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCAGAGCTGATGAGGGGTATCTCGAA
GCACACGAAACTTTTTCTTCCCTTCATTCACGCACACTACTCTCTAATGAGCAACGGTAT
```


ACGGCCTTCCTTCCAGTTACTTGAATTTGAAATAAAAAAAGTTTGCTGTCTTGCTATC
AAGTATAAATAGACCTGCAATTATTAATCTTTTGTTCCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTT
TCTTCCTTGTTTCTTTTTCTGCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATAACAATCAACTCCA
AGCTTTGCAAAGATGGATAAAGCGGAATTAATTCCCGAGCCTCCAAAAAAGAAGAGA
AAGGTCGAATTGGGTACCGCCGCCAATTTTAATCAAAGTGGGAATATTGCTGATAGC
TCATTGTCCTTCACTTTCACTAACAGTAGCAACGGTCCGAACCTCATAACAACCTCA
AACAAATTCTCAAGCGCTTTCACAACCAATTGCCTCCTCTAACGTTTCATGATAACT
TCATGAATAATGAAATCACGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATAATTCAAACCA
CTGTCACCTGGTTGGACGGACCAAACCTGCGTATAACGCGTTTGGGAATCACTACAG
GGATGTTTAATACCACTACAATGGATGATGTATATAACTATCTATTTCGATGATGAAG
ATACCCACCAAACCCAAAAAAGAGATCTTTAATACGACTCACTATAGGGCGAGCG
CCGCCATGGAGTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGatggccgagaacttgetggaegg
accgcecaacecaaaegagceaaactcagctcgeceggettctcegeaatgacaacacagattttgatcattgtttgacttgaa
aatgacettctgatgagctgatceccaatggagaattaagccttttaaacagtgggaaccttgtccagatgctgctgccaacataa
acaactgtcagagcttcttagaggaggcagcggtctagcatcaaccagggataggcaatgtgagtgccagcagccctgtgcaac
agggccttgggtggccaggetcaggggcagccgaacagtaacaacatggccagcttaggtgccatgggcaagaccctctgaaccaa
ggagactcatcaacaccaacctgcecaaacaggcagccagcaaccttgggcccactccccctgctcecaagcactgaatcecaaa
gcacaaaagcaagtagggctggtagaccagtagctctgccacatcacagactggacctgggatctgatgaatgctaaactcaaccag
accacccaggccttctcaatagtaactctggccatagcttaatgaatcaggetcaacaagggaagctcaagtcatgaatggatctc
ttggggctgctggaagaggaaggggagctggaatgcctaccctgctecagccatgcagggggccacaagcagtgctgctggcggag
acctgacacaggttccccacaaatggctggccatgctggactaaatacagcacaggcaggagcatgaccaagatgggaatgac
tggtaccacaagtcatttggaacaaccttagtcaaaactggaggcagcagatgggagccactggagtgaacccccagttagccag
caaacagagcatggtcaatagttacctgctttctacagatatcaagaatacttcagtcaccaactgtgccaatatgtcccagttgca
aacatcagtggaatgtgacccaacaagcaattgcaacaggecccaacagcagacctgaaaaacgcaaaactgatacagcagcag
ctggttctactgctcatgcccacaaatgtcagagacgagagcaagcaaatggagaggttegagcctgttctctcccactgtcgaa
ccatgaaaaacgtttgaaatcatgacacattgtaggetcecaaaagcctgccaagttgcccattgtgatcttcacgacaaatcate
tetcatggaagaactgcacacgacatgactgtctgtttgctcctttgaaaaatgccagtgacaagcgaaaccaacaacacatec
tgggatctccagctagtggaaattcaaaacacaattgggttctgttggtgcaaggcaacagGGATCCATCGAGCTCGAGC
TGCAGATGAATCGTAGATACTGAAAAACCCCGCAAGTTCACCTTCAACTGTGCATCGTG
CACCATCTCAATTTCTTTCATTTATACATCGTTTTGCTTCTTTTTATGTAACCTATACTCCTC
TAAGTTTCAATCTTGGCCATGTAACCTCTGATCTATAGAATTTTTTAAATGACTAGAAATTA
ATGCCATCTTTTTTTTGGACCTAAATTCTTCATGAAAATATATTACGAGGGCTTATTCAG
AAGCTTTGGACTTCTTCGCCAGAGGTTTGGTCAAGTCTCCAATCAAGGTTGTCGGCTTG
TCTACCTTGCCAGAAATTTACGAAAAGATGGAAAAGGGTCAAATCGTTGGTAGATACGT
TGTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTATTAATAAGTTA
TAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTAAAACGAAAATTC
TTATTCTTGAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTCTCAGGTATAGCATGAGGTC
GCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCCGGTCGAAATTCCCCTACCTATGAACATATTC

CATTTTGTAATTTTCGTGTCGTTTCTATTATGAATTTCAATTTATAAAAGTTTATGTACAAATAT
CATAAAAAAAGAGAATCTTTTTAAGCAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGCGACAGCATC
ACCGACTTCGGTGGTACTGTTGGAACACCTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCA
AAACCTTTTTAACTGCATCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACAATT
TCAACATCATTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTTGACCTTATTCTTTGGCAA
TCTGGAGCAGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCTTGTCTGGCA
AAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCAAGGAACCTGGGATAACGGAGGCTT
CATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATTATAATACCATTTAGGTGGGTTG
GGTTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTTGAACCTTCAATGTA
GGAAATTCGTTCTTGATGGTTTCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCTTGAAGAGGCCAA
AACATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTCATGTTGTAGGGCCATGA
AAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTCGACTTCTGGAACGGTGTATTGTTCACTATCCCAAG
CGACACCATCACCATCGTCTTCTTTCTTTACCAAAGTAAATACCTCCCCTAATTCTC
TGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTAGCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAA
AGAGAGTCGGATGCAAAGTTACATGGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACG
GATTTTTAGTAAACCTTGTTTCAGGTCTAACACTACCTGTACCCCATTTAGGACCACCCAC
AGCACCTAACAAAACGGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCTGGAAGT
GGGACACCTGTAGCGTCGATAGCAGCACCACCAATTAATGATTTTCGAAATCGAACTT
GACATTGGAACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATT
CTTGACCAACGTGGTCACCTGGCAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATTAGAAT
GGTATATCCTTGAAATATATATATATATTGCTGAAATGTAAAAGGTAAGAAAAGTTAGAA
AGTAAGACGATTGCTAACACCTATTGGAAAAACAATAGGTCCTTAAATAATATTGTC
AACTTCAAGTATTGTGATGCAAGCATTAGTCATGAACGCTTCTCTATTCTATATGAAAA
GCCGGTTCGGCGCTCTCACCTTTCTTTTTCTCCCAATTTTTTCAGTTGAAAAAGGTATA
TGCGTCAGGCGACCTCTGAAATTAACAAAAAATTTCCAGTCATCGAATTTGATTCTGTG
CGATAGCGCCCCTGTGTGTTCTCGTTATGTTGAGGAAAAAATAATGGTTGCTAAGAGA
TTCGAACTCTTGCATCTTACGATACCTGAGTATCCCACAGTTGGGGATCTCGACTCTAG
CTAGAGGATCAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
CACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAA
TGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCTTTCCAGTCGGGAAA
CCTGTCGTGCCAGCTGATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATTAGGTCTGAA
GAGGAGTTTACGTCCAGCCAAGCTAGCTTGGCTGCAGGTCGAGCGGCCGCGATCCGGA
ACCTTAATATAACTTCGTATAATGTATGCTATAACGAAGTTATCAGCTGCATTAATGAATC
GGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTTTCGCTTCTCGCTCA
CTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGC
GGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACAATGTGAGCAAAA
GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGC
TCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC

CGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT
GTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCC
GCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCT
GGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACCTATC
GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCT
AACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTAC
CTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGT
GGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC
CTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATT
TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGT
TTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC
AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGAT
ACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGA
AGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTG
TTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCA
TTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTT
CCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTC
CTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTAT
GGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGG
TGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCC
CGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATT
GGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTT
CTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACA
CGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTT
ATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAATAGGGGTTT
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACA
TTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGA
CGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCG
GATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCG
GGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATAACGCATT
TAAGCATAAACACGCACTATGCCGTTCTTCTCATGTATATATATACAGGCAACACGCA
GATATAGGTGCGACGTGAACAGTGAGCTGTATGTGCGCAGCTCGCGTTGCATTTTCGGA
AGCGCTCGTTTTTCGGAAACGCTTTGAAGTTCCTATTCGAAAGTTCCTATTCTCTAGCTAG
AAAGTATAGGAACTTCAGAGCGCTTTTGAACCAAAAAGCGCTCTGAAGACGCACTTT
CAAAAACCAAAAACGCACCGGACTGTAACGAGCTACTAAAATATTGCGAATACCGCT

TCCACAAACATTGCTCAAAAAGTATCTCTTTGCTATATATCTCTGTGCTATATCCCTATATAA
 CCTACCCATCCACCTTTCGCTCCTTGAACCTTGCATCTAAACTCGACCTCTACATTTTTTAT
 GTTTATCTCTAGTATTACTCTTTAGACAAAAAAATTGTAGTAAGAACTATTCATAGAGTG
 AATCGAAAACAATACGAAAATGTAAACATTTCTTATACGTAGTATATAGAGACAAAATA
 GAAGAAACCGTTCATAATTTTCTGACCAATGAAGAATCATCAACGCTATCACTTTCTGTT
 CACAAAGTATGCGCAATCCACATCGGTATAGAATATAATCGGGGATGCCTTTATCTTGAA
 AAAATGCACCCGCAGCTTCGCTAGTAATCAGTAAACGCGGGAAGTGGAGTCAGGCTTT
 TTTTATGGAAGAGAAAATAGACACCAAAGTAGCCTTCTTCTAACCTTAACGGACCTACA
 GTGCAAAAAGTTATCAAGAGACTGCATTATAGAGCGCACAAAGGAGAAAAAAAAGTAAT
 CTAAGATGCTTTGTTAGAAAAATAGCGCTCTCGGGATGCATTTTTGTAGAACAAAAAAG
 AAGTATAGATTCTTTGTTGGTAAAATAGCGCTCTCGCGTTGCATTTCTGTTCTGTAAAAA
 TGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGAAAAATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTGTGTTTACAA
 AATGAAGCACAGATTCTTCGTTGGTAAAATAGCGCTTTCGCGTTGCATTTCTGTTCTGT
 AAAAATGCAGCTCAGATTCTTTGTTTGAAAAATTAGCGCTCTCGCGTTGCATTTTGTTC
 TACAAAATGAAGCACAGATGCTTCGTTGCT

(3) 序列 SEQ ID NO.2 的信息: (pGADT7-CBP 表达的氨基酸序列)

(i) 序列特征:

(A)长度: 638AA

(B)类型: 氨基酸

(C)拓扑结构: 单链肽链

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 序列描述: SEQ NO.2

Met Asp Lys Ala Glu Leu Ile Pro Glu Pro Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Leu Gly Thr Ala Ala
Asn Phe Asn Gln Ser Gly Asn Ile Ala Asp Ser Ser Leu Ser Phe Thr Phe Thr Asn Ser Ser Asn
Gly Pro Asn Leu Ile Thr Thr Gln Thr Asn Ser Gln Ala Leu Ser Gln Pro Ile Ala Ser Ser Asn
Val His Asp Asn Phe Met Asn Asn Glu Ile Thr Ala Ser Lys Ile Asp Asp Gly Asn Asn Ser Lys
Pro Leu Ser Pro Gly Trp Thr Asp Gln Thr Ala Tyr Asn Ala Phe Gly Ile Thr Thr Gly Met
Phe Asn Thr Thr Thr Met Asp Asp Val Tyr Asn Tyr Leu Phe Asp Asp Glu Asp Thr Pro Pro
Asn Pro Lys Lys Glu Ile Phe Asn Thr Thr His Tyr Arg Ala Ser Ala Ala Met Glu Tyr Pro Tyr Asp
Val Pro Asp Tyr Ala His Met Met Ala Glu Asn Leu Leu Asp Gly Pro Pro Asn Pro Lys Arg Ala
Lys Leu Ser Ser Pro Gly Phe Ser Ala Asn Asp Asn Thr Asp Phe Gly Ser Leu Phe Asp Leu
Glu Asn Asp Leu Pro Asp Glu Leu Ile Pro Asn Gly Glu Leu Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn
Leu Val Pro Asp Ala Ala Ser Lys His Lys Gln Leu Ser Glu Leu Leu Arg Gly Gly Ser Gly Ser
Ser Ile Asn Pro Gly Ile Gly Asn Val Ser Ala Ser Ser Pro Val Gln Gln Gly Leu Gly Gly Gln
Ala Gln Gly Gln Pro Asn Ser Thr Asn Met Ala Ser Leu Gly Ala Met Gly Lys Ser Pro Leu
Asn Gln Gly Asp Ser Ser Thr Pro Asn Leu Pro Lys Gln Ala Ala Ser Thr Ser Gly Pro Thr Pro
Pro Ala Ser Gln Ala Leu Asn Pro Gln Ala Gln Lys Gln Val Gly Leu Val Thr Ser Ser Pro Ala

Thr Ser Gln Thr Gly Pro Gly Ile Cys Met Asn Ala Asn Phe Asn Gln Thr His Pro Gly Leu
Leu Asn Ser Asn Ser Gly His Ser Leu Met Asn Gln Ala Gln Gln Gly Gln Ala Gln Val Met
Asn Gly Ser Leu Gly Ala Ala Gly Arg Gly Arg Gly Ala Gly Met Pro Tyr Pro Ala Pro Ala
Met Gln Gly Ala Thr Ser Ser Val Leu Ala Glu Thr Leu Thr Gln Val Ser Pro Gln Met Ala Gly
His Ala Gly Leu Asn Thr Ala Gln Ala Gly Gly Met Thr Lys Met Gly Met Thr Gly Thr Thr
Ser Pro Phe Gly Gln Pro Phe Ser Gln Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Ala Thr Gly Val Asn
Pro Gln Leu Ala Ser Lys Gln Ser Met Val Asn Ser Leu Pro Ala Phe Pro Thr Asp Ile Lys Asn
Thr Ser Val Thr Thr Val Pro Asn Met Ser Gln Leu Gln Thr Ser Val Gly Ile Val Pro Thr Gln
Ala Ile Ala Thr Gly Pro Thr Ala Asp Pro Glu Lys Arg Lys Leu Ile Gln Gln Gln Leu Val Leu
Leu Leu His Ala His Lys Cys Gln Arg Arg Glu Gln Ala Asn Gly Glu Val Arg Ala Cys Ser
Leu Pro His Cys Arg Thr Met Lys Asn Val Leu Asn His Met Thr His Cys Gln Ala Pro Lys
Ala Cys Gln Val Ala His Cys Ala Ser Ser Arg Gln Ile Ile Ser His Trp Lys Asn Cys Thr Arg
His Asp Cys Pro Val Cys Leu Pro Leu Lys Asn Ala Ser Asp Lys Arg Asn Gln Gln Thr Ile Leu
Gly Ser Pro Ala Ser Gly Ile Gln Asn Thr Ile Gly Ser Val Gly Ala Gly Gln Gln Gly Ser Ile Glu
 Leu Glu Leu Gln Met Asn Arg Arg Tyr ***

(4) 序列 SEQ NO.3 的信息：(pGBKT7-PPAR γ LBD 的 DNA 序列)

(i) 序列特征：

(A)长度：8128bp

(B)类型：核苷酸

(C)链性：双链

(D)拓扑结构：环状

(ii) 分子类型：DNA

(iii) 序列描述：SEQ NO.3

CGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGATCCTTTTTGTTGTTCCGGGTGTACAATATG
 GACTTCCTCTTTTCTGGCAACCAAACCCATACATCGGGATTCTATAATACCTTCGTTGG
 TCTCCCTAACATGTAGGTGGCGGAGGGGAGATATAACAATAGAACAGATACCAGACAAG
 ACATAATGGGCTAAACAAGACTACACCAATTACTGCCTCATTGATGGTGGTACATAA
 CGAACTAATACTGTAGCCCTAGACTTGATAGCCATCATCATATCGAAGTTTCACTACCCT
 TTTTCCATTTGCCATCTATTGAAGTAATAATAGGCGCATGCAACTTCTTTCTTTTTTTTT
 CTTTTCTCTCTCCCCGTTGTTGTCTCACCATATCCGCAATGACAAAAAAATGATGGA
 AGACACTAAAGGAAAAAATTAACGACAAAGACAGCACCAACAGATGTCGTTGTTCCA
 GAGCTGATGAGGGGTATCTCGAAGCACACGAACTTTTTCTTCCTTCATTCACGCACA
 CACTCTCTAATGAGCAACGGTATACGGCCTTCCTTCCAGTTACTTGAATTTGAAATAAA
 AAAAGTTTGCTGTCTTGCTATCAAGTATAAATAGACCTGCAATTATTAATCTTTTGTTC
 TCGTCATTGTTCTCGTTCCTTTCTTCCTTGTTCTTTTTCTGCACAATATTTCAAGCTAT
 ACCAAGCATAACAATCAACTCCAAGCTTGAAGCAAGCCTCCTGAAAGATGAAGCTACT
 GTCTTCTATCGAACAAGCATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCA

AAGAAAACCGAAGTGCGCCAAGTGTCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTGCTACT
CTCCCAAACCAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCACATCTGACAGAAGTGGAAATC
AAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACTGATTTTCCTCGAGAAGACCTT
GACATGATTTTGAATAATGGATTCTTTACAGGATATAAAAGCATTGTTAACAGGATT
ATTTGTACAAGATAATGTGAATAAAGATGCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAGTGG
AGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCGACATCATCATCG
GAAGAGAGTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGTATCGCCGGAATTTGTAAT
ACGACTCACTATAGGGCGAGCCGCCATCATGGAGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAG
GACCTGCATATGgeggagatctccagtgatatcgaccagetgaatccagagtcetgacctcegggacctggcaaaacatt
tgatgactcatacataaagtccttcccetgaccaaagcaaggcgaggcgatcttgacaggaaagacaacagacaaatcacca
ttegttatctatgacatgaattccttaatgatgggagaagataaaaatcaagttcaaacacatcaccccctgcaggagcagagcaaag
aggtggccatccgeatctttcagggtgccagtttegetccgtggaggetgtgcaggagatcaagagatgccaaagcattctgg
ttttgaaatcttgactgaacgaccaagtaactctcaaatatggagtccaagagatcatttacacaatgetggcctccttgatgaat
aaagatggggtctcatalccgagggccaaggettcatgacaaggagtttctaaagacctgcaaaagccttttggtgactttatgg
ageccaagtttgagtttctgtgaagtcaatgcactggaatgatgacagcagactggcaatatttattgtgtcattattctcagtg
agaccgccaggtttgctgaatgtgaagccattgaagacattcaagacaacctgctacaagcctggagctccagctgaagctgaa
ccacctgagctctcaagctgtttgccaagctgctccagaaaatgacagacctcagacagattgtcacggaacaagctgcagctactg
caggtgatcaagaagacgggagacagacatgagtctcaccgctctcgaggagatctacaaggactgtactagGTCGACCT
GCAGCGGCCGCATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTT
TTTTGCGCCTTGACGCAAGCTAATTCCGGGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATT
ATTAAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTGACTCTTAGGTTTTA
AAACGAAAATTCTTATTCTTGAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTA
TAGCATGAGGTCGCTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCA
TGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGA
GCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGGTAACCTCACATTAA
TTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA
TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCT
CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
GCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC
GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCG
CTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAA
GCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGTTTCG
TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCG
GTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCC
ACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGT
GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAG

CCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTG
GTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCA
AGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTT
AAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAA
AATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCCTG
CCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTCACCCGAACCTGGGGGGTGGGGTG
GGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGA
CAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTATGAACAAACGACCAACACCGT
GCGTTTTATTCTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTT
CCGTGTTTCAGTTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCG
CGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTCAT
AGAAGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGGGCGTCGCTTGGTCCGGT
TCATTTTGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAAGTTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGC
GATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTACGCCAT
TCGCCGCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTC
CGCCACACCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATG
ATATTCGGCAAGCAGGCATCGTCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCT
CGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCTGATGCTCTTCGTCCAGA
TCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTT
CGCTTGGTGGTCAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCATTGCA
TCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCC
CCGGCACTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCAC
AGCTGCGCAAGGAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGC
AGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCCGTCTTGACAAAAAGAACCAGGGCGCCCCTGC
GCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTTGTGCCAGTCAT
AGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGGCCGGAGAACCCTGCGTGCAATCCATCTTGTTT
AATCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC
GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCC
CGAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCATTTTGTAGAACAAAAATGCAAC
GCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAAT
GCAACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAAGAATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAAA
AATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGA
ACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTATTTTACCAACAAAGAATCTATACTTCTTTTTTGT
TCTACAAAATGCATCCCGAGAGCGCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGATTACTTTTT
TTCTCCTTTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTTA
AGGTTAGAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAAAAAAGCCTGACTCC
ACTTCCCGCGTTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAAGATAAAGGC
ATCCCCGATTATATTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGATA

GCGTTGATGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTATA
TACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCGATTCACTCTATGAATAGTTC
TTACTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACATAAAAAATGTAGAGGT
CGAGTTTLAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGTAGGTTATATAGGGATATA
GCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTTCGC
AATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCGTTTTTGGTTTTTTGAAAGTGCGTCTTCA
GAGCGCTTTTGGTTTTCAAAGCGCTCTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAAC
TTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGTTTTCCGAAAACGAGCGCTTCCGAAAATGCAACGCG
AGCTGCGCACATACAGCTCACTGTTACGTTCGCACCTATATCTGCGTGTTGCCTGTATAT
ATATATACATGAGAAGAACGGCATAAGTGCCTGTTTATGCTTAAATGCGTACTTATATGCGT
CTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATATTATCCCATTCATGCGG
GGTATCGTATGCTTCCCTCAGCACTACCTTTAGCTGTTCTATATGCTGCCACTCCTCAAT
TGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTATCATTTCCTTTGATATTGGATCATATTAAGAAACC
ATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCG
CGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAG
CTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTG
TTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT
GCACCATAGATCAACGACATTACTATATATAATATAGGAAGCATTAAATAGAACAGCAT
CGTAATATATGTGTACTTTGCAGTTATGACGCCAGATGGCAGTAGTGGAAGATATTCTTT
ATTGAAAAATAGCTTGTACCTTACGTACAATCTTGATCCGGAGCTTTTCTTTTTTTGCC
GATTAAGAATTAATTCGGTCGAAAAAAGAAAAGGAGAGGGCCAAGAGGGAGGGCATT
GGTGACTATTGAGCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTAT
GTCTGTTATTAATTTACAGGTAGTTCTGGTCCATTGGTGAAAGTTTGC GGCTTGCAGA
GCACAGAGGCCGAGAAATGTGCTCTAGATTCCGATGCTGACTTGCTGGGTATTATATGT
GTGCCCAATAGAAAGAGAACAATTGACCCGGTATTGCAAGGAAAATTTCAAGTCTTG
TAAAAGCATATAAAAATAGTTCAGGCACTCCGAAATACTTGGTTGGCGTGTTTCGTAAT
CAACCTAAGGAGGATGTTTTGGCTCTGGTCAATGATTACGGCATTGATATCGTCCAAC
GCATGGAGATGAGTCGTGGCAAGAATACCAAGAGTTCCTCGGTTTGCAGTTATTA
AGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGCAGCTTCACAGAAACCTCA
TTCGTTTATTCCTTGTTTGATTCAGAAGCAGGTGGGACAGGTGAACTTTTGGATTGGA
ACTCGATTTCTGACTGGGTTGGAAGGCAAGAGAGCCCCGAAAGCTTACATTTTATGTTA
GCTGGTGGACTGACGCCAGAAAATGTTGGTGATGCGCTTAGATTAATGGCGTTATTGG
TGTTGATGTAAGCGGAGGTGTGGAGACAAATGGTGTAAGACTCTAACAAAATAGCA
AATTCGTCAAAAATGCTAAGAAATAGGTTATTACTGAGTAGTATTTATTTAAGTATTGTT
TGTGCACTTGCCGATCTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATAC
CGCATCAGGAAATTGTAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAT
CAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAAT
AGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAA

CGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGT
 GAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGA
 ACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGA
 GAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCG
 GTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGT
 CCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGAT

(5) 序列 SEQ NO.4 的信息：(pGBKT7-PPAR γ LBD 表达的氨基酸序列)

(i) 序列特征：

(A)长度：458AA

(B)类型：氨基酸

(C)拓扑结构：单链肽链

(ii) 分子类型：蛋白质

(iii) 序列描述：SEQ NO.4

**Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu Lys Lys Leu Lys Cys Ser
 Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys
 Thr Lys Arg Ser Pro Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
 Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile Leu Lys Met Asp Ser
 Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val
 Thr Asp Arg Leu Ala Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
 Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu Thr Val Ser Pro Glu Phe
 Val Ile Arg Leu Thr Ile Gly Arg Ala Ala Ile Met Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
 His Met Ala Glu Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg Ala Leu
Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile
Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met
Gly Glu Asp Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu Val Ala Ile
Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys
Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His
Glu Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu Ile Ser Glu Gly Gln
Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro
Lys Phe Glu Phe Ala Val Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile
Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys Pro Ile Glu Asp Ile Gln
Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu
Phe Ala Lys Leu Leu Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu
Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr Lys
Asp Leu Tyr *****

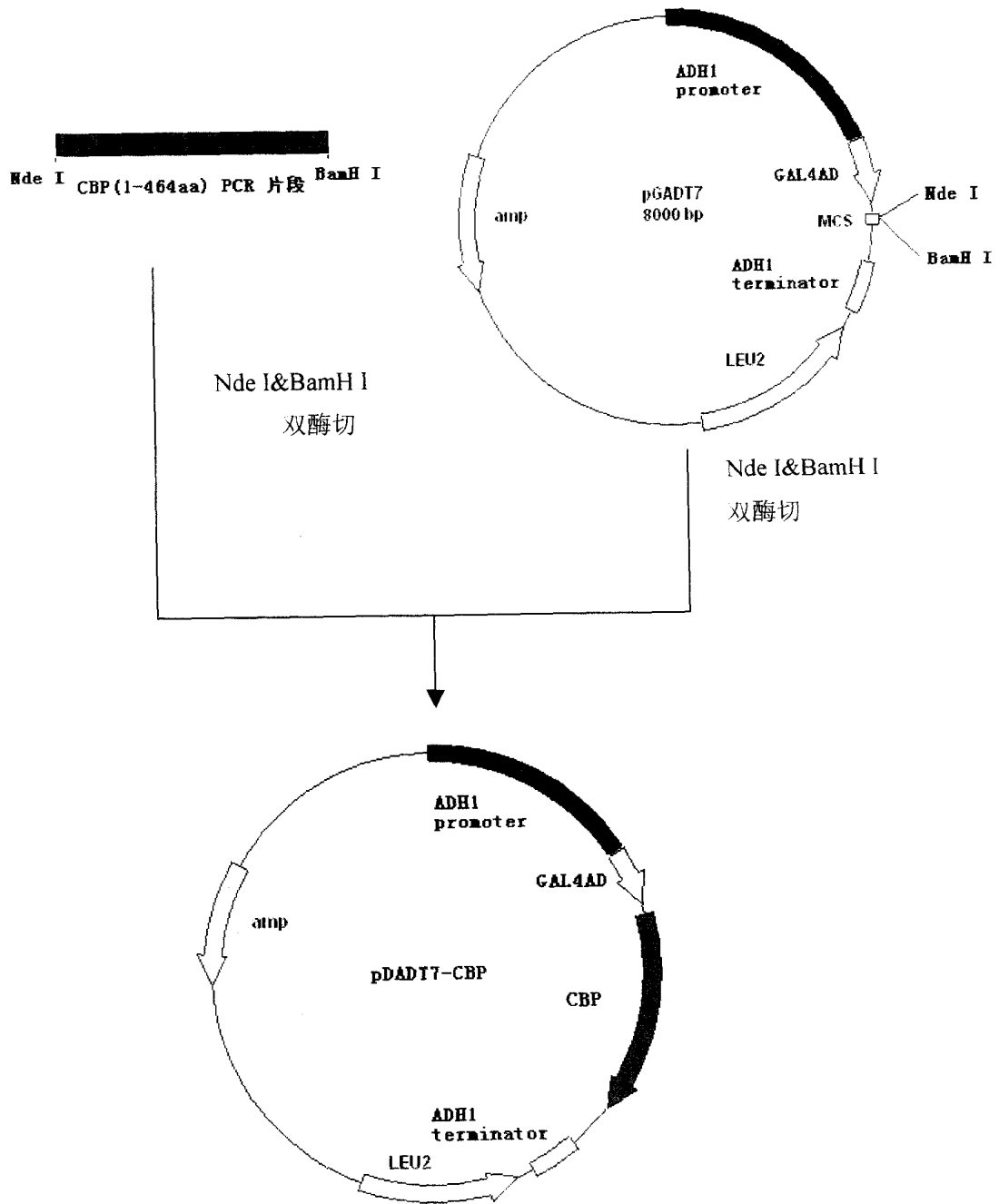


图 1

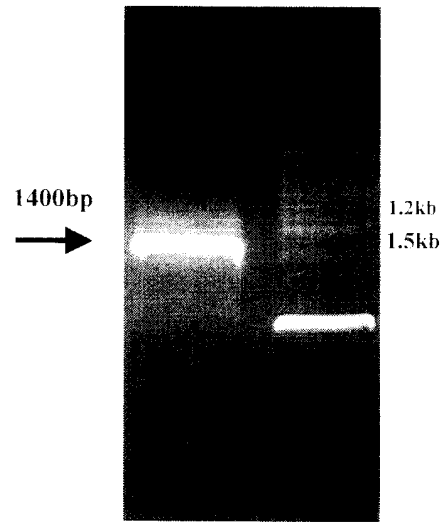


图 2

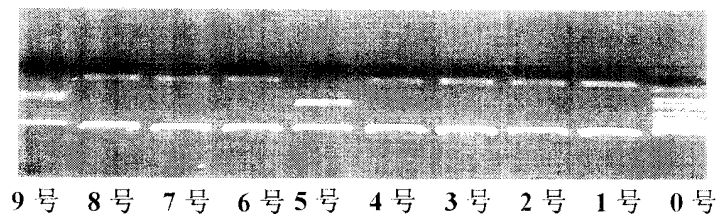


图 3

	10	20	30	40	50
1	GAATACCCAC	CATACGACGT	ACCAGATTAC	GCTCATATG	
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					
31					
32					
33					
34					
35					
36					
37					
38					
39					
40					
41					
42					
43					
44					
45					
46					
47					
48					
49					
50					
51					
52					
53					
54					
55					
56					
57					
58					
59					
60					
61					
62					
63					
64					
65					
66					
67					
68					
69					
70					
71					
72					
73					
74					
75					
76					
77					
78					
79					
80					
81					
82					
83					
84					
85					
86					
87					
88					
89					
90					
91					
92					
93					
94					
95					
96					
97					
98					
99					
100					
101					
102					
103					
104					
105					
106					
107					
108					
109					
110					
111					
112					
113					
114					
115					
116					
117					
118					
119					
120					
121					
122					
123					
124					
125					
126					
127					
128					
129					
130					
131					
132					
133					
134					
135					
136					
137					
138					
139					
140					
141					
142					
143					
144					
145					
146					
147					
148					
149					
150					
151					
152					
153					
154					
155					
156					
157					
158					
159					
160					
161					
162					
163					
164					
165					
166					
167					
168					
169					
170					
171					
172					
173					
174					
175					
176					
177					
178					
179					
180					
181					
182					
183					
184					
185					
186					
187					
188					
189					
190					
191					
192					
193					
194					
195					
196					
197					
198					
199					
200					

图 4

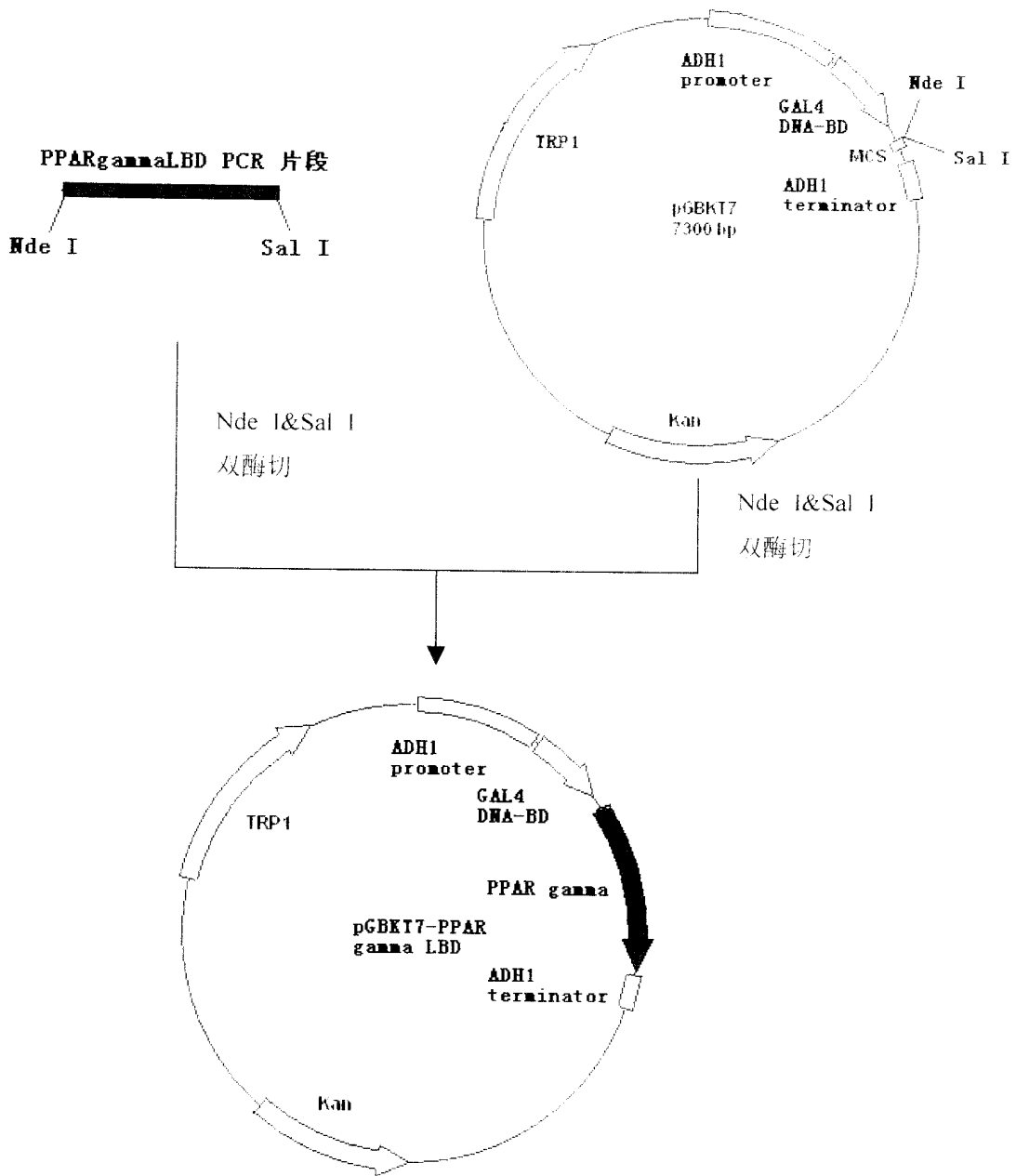


图 5

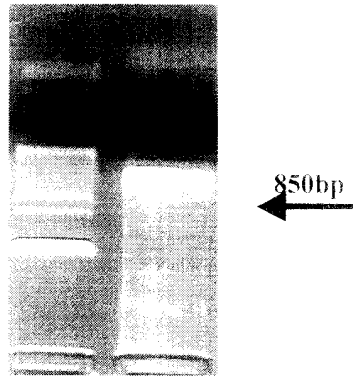


图 6

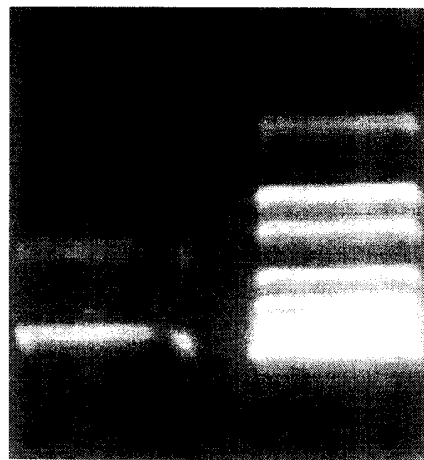


图 7

		10	20	30	40	50	
5'	1	GAGCAGAAGC	TCATCTCAGA	GGAGACCTG	CATATC	AGATTTAT	55
FFARGLED	1	-----	-----	-----	-----	AGATTTAT	50
		60	70	80	90	100	
5'	51	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	100
FFARGLED	51	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	100
		110	120	130	140	150	
5'	101	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	150
FFARGLED	101	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	150
		160	170	180	190	200	
5'	151	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	200
FFARGLED	151	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	200
		210	220	230	240	250	
5'	201	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	250
FFARGLED	201	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	250
		260	270	280	290	300	
5'	251	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	300
FFARGLED	251	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	300
		310	320	330	340	350	
5'	301	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	350
FFARGLED	301	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	350
		360	370	380	390	400	
5'	351	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	400
FFARGLED	351	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	400
		410	420	430	440	450	
5'	401	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	450
FFARGLED	401	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	450
		460	470	480	490	500	
5'	451	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	500
FFARGLED	451	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	500
		510	520	530	540	550	
5'	501	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	550
FFARGLED	501	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	550
		560	570	580	590	600	
5'	551	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	600
FFARGLED	551	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	600
		610	620	630	640	650	
5'	601	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	650
FFARGLED	601	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	650
		660	670	680	690	700	
5'	651	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	700
FFARGLED	651	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	700
		710	720	730	740	750	
5'	701	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	750
FFARGLED	701	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	750
		760	770	780	790	800	
5'	751	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	800
FFARGLED	751	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	800
		810	820	830	840	850	
5'	801	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	850
FFARGLED	801	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	850
		860	870	880	890	900	
5'	851	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	900
FFARGLED	851	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	TAATTTTAA	900
		910	920	930	940	950	
5'	901	CGCCCGCA	-----	-----	-----	-----	950
FFARGLED	901	-----	-----	-----	-----	-----	950

图 8

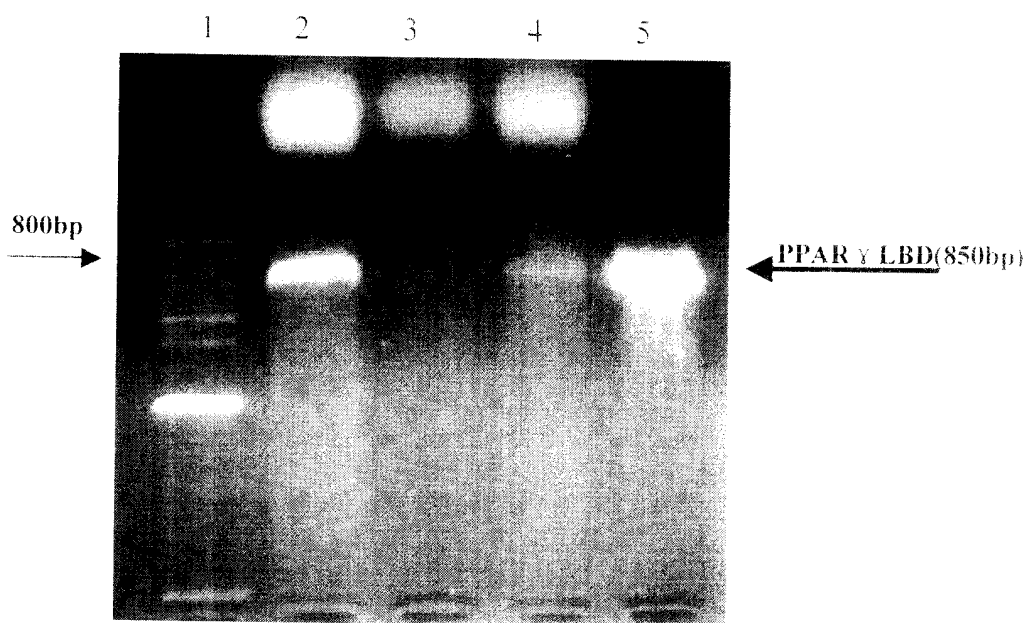


图 9

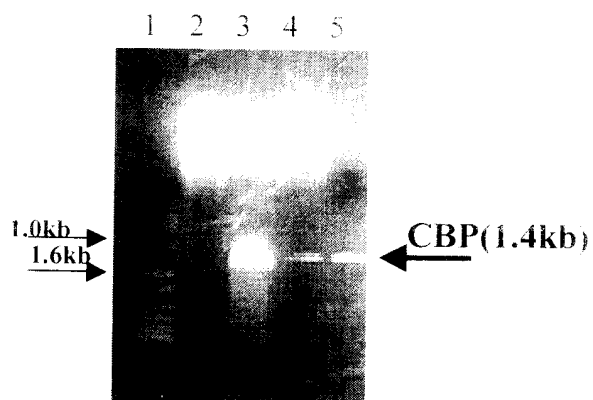


图 10

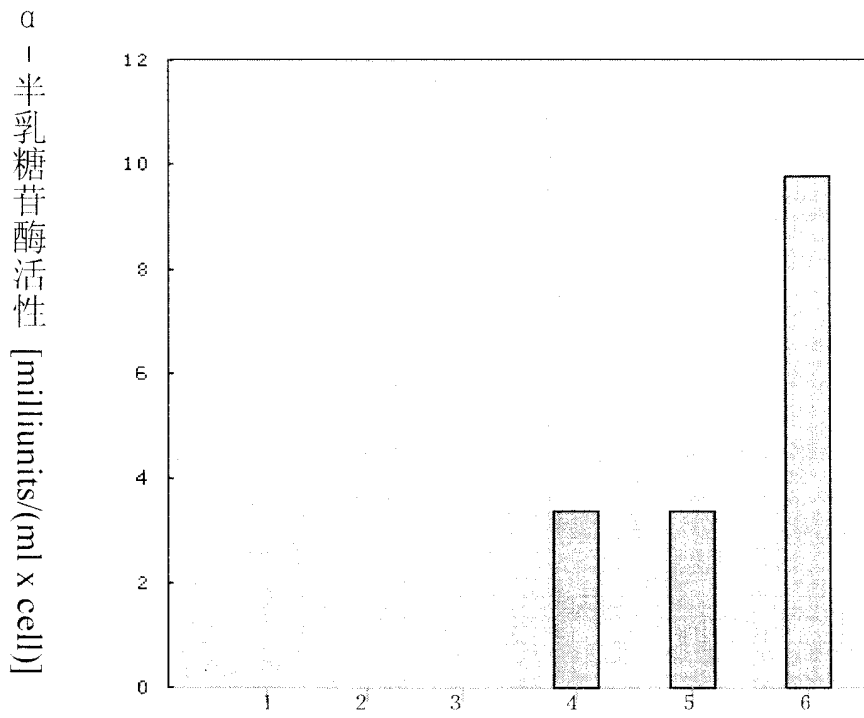


图 11

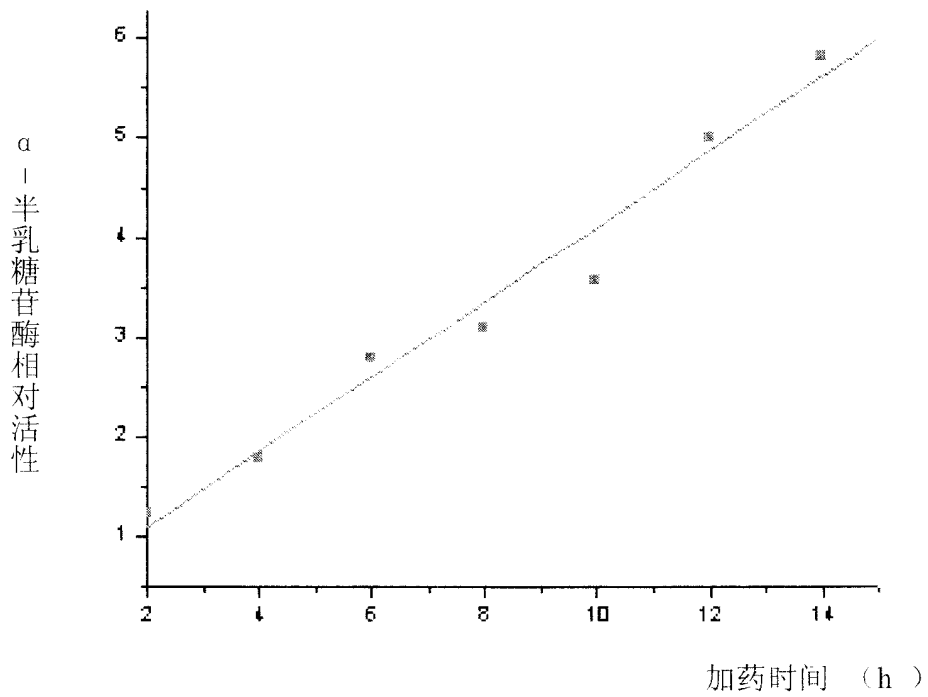


图 12

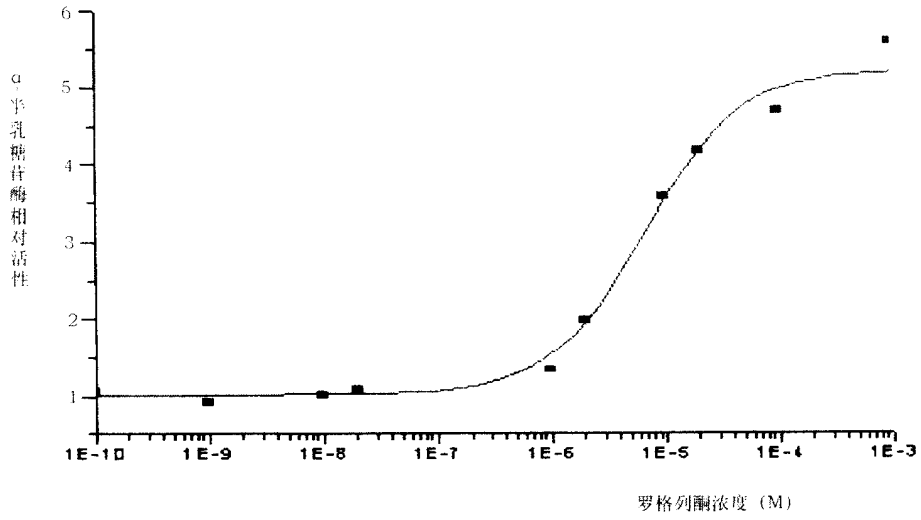


图 13

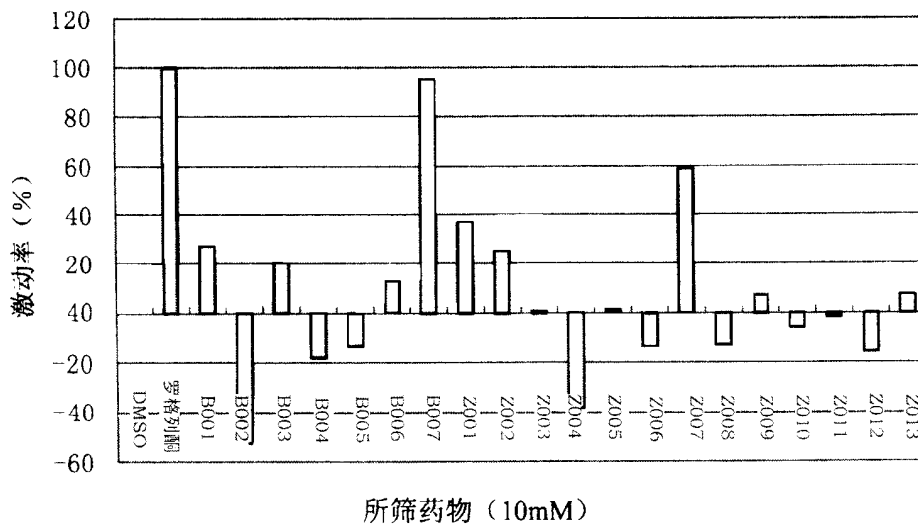


图 14