



[12] 发明专利申请公开说明书

[11] CN 87 1 01862 A

[43] 公开日 1987 年 10 月 21 日

(21) 申请号 87 1 01862

(22) 申请日 87.3.13

(30) 优先权

(32)86.3.14 (33)JP (31)57919/86

(32)86.4.9 (33)JP (31)82699/86

(32)86.9.29 (33)JP (31)231428/86

(71) 申请人 武田药品工业株式会社

地址 日本大阪府大阪市

(72) 发明人 黑川勉 佐佐田玲子

岩根里 五十岚贞

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利代理部

代理人 顾柏棣 辛敏忠

(54) 发明名称 多肽, DNA 及其应用

(57) 摘要

人类初级成纤维细胞生长因子(hbFGF), 应用于灼伤等症治疗促进剂, 血栓形成等症治疗药物, 或促进细胞培养的试剂。可通过培养一转化子而大量生产, 该转化子是用一含编码 hbFGF 的 DNA 的载体转化得到的。

权 利 要 求 书

1. 一种生产人类初级成纤维细胞生长因子的方法，该因子为一多肽，其含有下列氨基酸顺序：

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

其中包括于一培养基中培养一转化子，该转化体是作为宿主细胞通过

一含一段DNA的载体转化得到，该DNA含有编码这个生长因子的碱基顺序，并回收产生和积累于培养基的该因子。

2. 根据权项1 的方法，其中DNA包括下列碱基顺序：

CCCGCCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGC
GCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGACCCCAA
GCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCC
TGCGCATCCACCCCGACGGCCGAGTTGACGGG
TCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTA
CAACTTCAAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTC
TATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGG
CTATGAAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCT
AAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGA
ACGATTGAATCTAATAACTACAATACTTACCG
GTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCAC
TGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCC
AAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT
TCTTCCAATGTCTGCTAAGAGC

3. 根据权项1 所述方法，其中宿主细胞为 E. Coli 。

4. 根据权项1 所述方法，其中转化子是 E. Coli K12MM294/p
T B669 (FERM BP-1281)。

5. 一种产生转化子的方法，包括用一载体使宿主细胞发生转化，该载体含有一段编码人类初级的纤维细胞生长因子的碱基顺序的DNA，这个因子是一多肽，其含有下列氨基酸顺序：

Pro- Ala- Leu- Pro- Glu- Asp- Gly-
Gly- Ser- Gly- Ala- Phe- Pro- Pro-
Gly- His- Phe- Lys- Asp- Pro- Lys-

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

6. 根据权项5 所述方法，其中宿主细胞为 E. Coli 。

7. 根据权项5 的方法，其中DNA含有下列碱基顺序：

CCCGCCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGC
 GCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGACCCCAA
 GCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGGCTTCTTCC
 TGCGCATCCACCCCGACGGCCGAGTTGACGGG
 TCCGGGAGAAGAGCGACCCTCACATCAAGCTA
 CAACTTCAAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTC

TATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGG
CTATGAAGGAAGATGGAAGATTA CTGGCTTCT
AAATGTGTTACGGATGAGTGTTTCTTTTTTGA
ACGATTGAATCTAATAACTACAATACTTACCG
GTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCAC
TGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCC
AAAA CAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT
TCTTCCAATGTCTGCTAAGAGC

8. 一种生产一基本纯的人类初级成纤维细胞生长因子(hb FGF)蛋白质的方法, 包括将由遗传工程技术产生的hb FGF用一肝素柱的高分辨率液相层析纯化。

9. 根据权项8 所述方法, 其中人类初级成纤维细胞生长因子蛋白质含量不低于95% (W/W)。

10. 根据权项8 所述方法, 其中人类初级成纤维细胞生长因子蛋白质含量不低于98% (W/W)。

多肽，DNA及其应用

本发明关系到一人类初级成纤维细胞生长因子(本文中有时称为“hb.FGF”)及用遗传工程技术产生hb.FGF的一种方法。

初级成纤维细胞生长因子(b.FGF)是一种初级多肽激素，主要从脑下垂体分泌，分子量约17,000。首先是作为一种因子分离到，其对例如BALB/C3T3细胞的成纤维细胞显示出潜在的生长促进作用。

(D. Gospodarowicz: Nature, 249,123 (1974))。然而，后来发现它几乎对所有中胚层衍生细胞均显现出生长促进作用。

(D. Gospodarowicz et al.: National Cancer Institute Monograph, 48,109 (1978))在另一些细胞中b.FGF的维管活性以及它的细胞生长促进活性表明它可用作病灶治疗剂，以及作为血栓形成，动脉狭窄及类似病症的预防和治疗剂的可能性，然而，天然存在的hb.FGF量非常少，许多限制使得从人类组织中得到这种因子遇到严重困难。因而，hb.FGF的氨基酸顺序尚未确定。

另一方面，动物产生的b.FGF，(相对人类b.FGF较易得到)，已经从例如牛垂体纯化得到，其氨基酸顺序也已确定。[F. Esch et al.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A), 82, 650 (1985)]。然而，在这种情况下，大量生产也非常困难。

如上所述，hb.FGF的特性氨基酸顺序，相关基因，还大部分未弄清楚。因此，为能将它作为药物使用，迫切需要寻找编码该因子的基因，研究出一种采用基因工程技术大量生产该蛋白质的方法。

通常，从接近于人类的动物体内得到的蛋白质的氨基酸顺序与人类的相应蛋白质具有高度同源性，并且，在大多数情况下，差异的氨基酸是由密码子点突变衍生而得。因此，很有可能，上述牛b FGF氨基酸顺序推演得到的DNA顺序与hb FGF基因的DNA顺序某种程度上应非常相似，尽管由于密码子兼并可能有许多DNA顺序。基于这种假设，本发明合成了具有可能的核苷酸顺序的b FGF基因的一部分，用这部分b FGF基因作为DNA探针从人类细胞中克隆出hb FGF的c DNA，并构造了一种含有所述hb FGF c DNA的重组DNA。这样就发现，培养从上述DNA转化得到的转化子可以产生hb FGF。本发明者在这些发现的基础上进行进一步的研究，结果现已完成了本发明。

因此，本发明提供：(1) 人类初级成纤维细胞生长因子(II)，其为一多肽，氨基酸顺序如下：

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

Glu- Ser- Asn- Asn- Tyr- Asn- Thr-
Tyr- Arg- Ser- Arg- Lys- Tyr- Thr-
Ser- Trp- Tyr- Val- Ala- Leu- Lys-
Arg- Thr- Gly- Gln- Tyr- Lys- Leu-
Gly- Ser- Lys- Thr- Gly- Pro- Gly-
Gln- Lys- Ala- Ile- Leu- Phe- Leu-
Pro- Met- Ser- Ala- Lys- Ser (I)

(2) 重组DNA(III) 其含有编码人类初级成纤维细胞生长因子(II) 的碱基顺序;

(3) 一转化子, 用包括DNA(III) 的载体, 象一宿主细胞一样被转化;

(4) 产生转化子的一种方法, 包括用包含DNA(III) 的载体使一宿主细胞转化;

(5) 一种产生人类初级成纤维细胞生长因子(II) 的方法, 包括培养

(3) 所述转化子于一培养基中, 在流体培养基中生产、积累并再生该因子;

(6) 一基本纯的人类初级成纤维细胞生长因子蛋白质, 用遗传工程技术方法得到的该因子; 以及

(7) 一产生基本纯的人类初级成纤维细胞生长因子蛋白质的方法, 其中包括将用遗传工程技术得到的初级成纤维细胞生长因子通过肝素柱高分辨率液相层析进行纯化。

据此发明, hb FGF(II) 至少含有式(I) 多肽。

上述DNA(III) 优选含一碱基顺序(V), 该碱基顺序为:

CCCGCCTTGCCCGAGGATGGCGGCAGCGGC
GCCTTCCCGCCCGGCCACTTCAAGGACCCCAA
GCGGCTGTACTGCAAAAACGGGGCTTCTTCC
TGCGCATCCACCCCGACGGCCGAGTTGACGGG

TCCGGGAGAAGAGCGACCCCTCACATCAAGCTA
CAACTTCAAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTC
TATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGG
CTATGAAGGAAGATGGAAGATTACTGGCTTCT
AAATGTGTTACGGATGAGTGTTTTCTTTTTTGA
ACGATTGAATCTAATAACTACAATACTTACCG
GTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCAC
TGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTTGGATCC
AAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTTTT
TCTTCCAATGTCTGCTAAGAGC

本发明中优选的hb FGF是具有上述氨基酸序列的hb FGF(II)。

一个含有具备编码hb FGF蛋白质的多肽的碱基顺序的DNA的表达载体(被用来完成本发明的方法)可用下列方式产生:

- (a) 分离编码hb FGF的RNA;
- (b) 根据该RNA合成一单链互补DNA(cDNA),再合成相应的双链DNA;
- (c) 将该互补DNA插入质粒;
- (d) 用所得到的重组质粒转化宿主;
- (e) 培养得到的转化子,用适当方法从转化子中分离有所需DNA的质粒,例如,用一DNA探针的菌落杂交的方法;
- (f) 从该质粒中切下克隆的所需要的DNA并且;
- (g) 将所述克隆化DNA在起动子下游位点插入载体。

编码hb FGF的RNA可从一系列产生hb FGF的细胞中得到,例如人类垂体衍生细胞或人类成纤维细胞。如果是人类成纤维细胞,可以是W I38(ATCC No. CCL-75)和IMR 90(ATCC No. CCL-186)。所述细胞系W I38和IMR 90列于the Catalogue

of Cell Lines & Hybridomas , 5 th edition , 1985 ,
Published by The American Type Culture Collection

至于从产生hb FGF细胞中制备RNA的方法,值得提及的例如硫氰酸胍方法[J. M. Chirgwin et al.: Biochemistry , 18,5294 (1979)] 。

用如此得到的RNA作为模板与反转录酶一起,用H. Okayama et al 方法合成cDNA[Molecular and Cellular Biology, 2,161 (1982)] , 所得到的cDNA被插入质粒。

所插入cDNA的质粒是,例如,大肠杆菌衍生质粒如pBR322 [Gene , 2,95 (1977)] , pBR325 [Gene , 4,121 (1978)] , pUC12[Gene , 19,259 (1982)] 或pUC13[Gene , 19,259

(1982)] 或枯草杆菌衍生质粒如pUB110 [Biochemical and Biophysical Research Communications , 112,678(1983)] ,其它任何能在所采用的宿主中复制和保持的质粒均可采用。

至于插入质粒的方法,如Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Page 239(1982)中T. Maniatis et al 叙述的方法。

插入了上述cDNA的质粒是这样得到的:采用cDNA文库,该文库是通过将合成的cDNA插入pCD载体[cf. Okayama et al. : Molecular and Cellular Biology, 3,280 (1983)] 用大肠杆菌×1776 作为宿主而产生,而这些合成的cDNA是在从正常人类双倍体细胞衍生的mRNA基础上合成的。[这些基因文库可从 Dr. Okayama处得到, the National Institute of Child Health

and Human Development, Bethesda, U S A)。

以这种方式得到的质粒被导入一适当宿主,例如大肠杆菌或枯草杆菌属内的细菌。

大肠杆菌属例如大肠杆菌 K12 DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A, 60,160(1968)], M103 [Nucleic Acids Research, 9,309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, 120,517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, 41,459(1969)] 和 C600 [Genetics, 39,440 (1954)]。

枯草杆菌属如枯草杆菌 M 1114 [Gene, 24,255 (1983)] 和 207-21 [Journal of Biochemistry, 95,87 (1984)]。

实现转化的方法如 T. Maniatis et al. 在 Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Page 249 (1982) 中叙述的 $CaCl_2$ 或 $CaCl_2/RuCl$ 方法。

在这样得到的转化子中,用本质上已知的方法选择所需要的克隆,例如菌落杂交方法 [Gene, 10,63 (1980)] 加上 DNA 碱基顺序确定方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 74,560(1977); Nucleic Acids Research, 9,309(1981)]。

用这种方法,得到了含有一载体的微生物,该载体含有克隆化的 DNA,该 DNA 含有编码 hbFGF 的碱基顺序。

从例1(1)中得到的转化子大肠杆菌 K12 DH1 / p T B627 将在后面叙述。被这个转化子所保护的质粒 p T B627 具有这样一 DNA,其含有编码 hbFGF(I) 碱基顺序。在所述 DNA 上限制酶切割的位点图2 示出,如图2 所示,该 DNA 含有约4,000 碱基对,被限制酶 Pst I 或 Hind III 切割为4 片段。编码 hbFGF(II) 的碱基顺序位于 Hind III 片段的最上游端(图2 的左端)。

该质粒是从上述微生物中分离得到。

对于这样的质粒分离，可以用例如碱性抽提方法[H. C.

Birnboim et al. : Nucleic Acids Research , 1, 1513 (1979)] 。

上述质粒，具有含bb F G F碱基编码顺序的克隆DNA，可象上述那样使用，或用来被限制酶处理，切下该DNA。

表达载体可这样得到：将克隆化c DNA插入一适合于该c DNA表达的载体，在起动子下游位点。

所述载体包括，上面提到的大肠杆菌衍生质粒(e.g.p B R322 , p B R325 , p U C12, p U C13) 如枯草杆菌衍生质粒(如p U B110 , p T P5 , p C194) 以及酵母衍生质粒(p S H19, p S H15) 噬菌体如 λ 噬菌体，动物病毒如还原病毒和疫苗病毒。

该c DNA可以A T G作为5'端转译起始密码子，还可具有T A A , T G A或T A G作为3'端转译终止密码子，为实现该c DNA的表达，一起动子被连接到该c DNA上游位点。本发明实际所用起动子可以是任何适合于表达该c DNA所采用的宿主的起动子。

当要转化的宿主是大肠杆菌属时，优选trp 起动子，lac 起动子，rec A起动子， λ p L起动子和lpp 起动子。当宿主是枯草杆菌属，优选如 spo1 起动子，spo2起动子和pen P起动子。当宿主是酵母菌属，优选 P H05起动子，G A P起动子和A D H起动子。特别优选宿主是大肠杆菌属，起动子为trp 起动子或 λ p l起动子。

当宿主是动物细胞系，可采用 S V40衍生起动子和还原病毒起动子。特别优先选用 S V40衍生起动子。

如此构造的含有DNA(III)的载体用来产生转化子。

宿主的例子包括大肠杆菌属，枯草杆菌属，酵母和动物细胞。代表性的大肠杆菌属和枯草杆菌菌属的例子是前面叙述的那些。

酵母，举例有(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22 R⁻, NA87-11 A和DKD-5 D。

动物细胞，最好采用细胞系，可提到的如猴子 COS-7 [Gluzman, Y, cell 23,157 (1981)] 及 Vero 细胞，中国仓鼠 CHO 细胞，小鼠 L 细胞和人类 FL 细胞。

上面提到的大肠杆菌属的转化采用下述方法：Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 69,2110 (1972) 或 Gene, 17,107 (1982)。

枯草杆菌属的转化用下述方法进行：Molecular and General Genetics, 168,111 (1979)。

酵母的转化可用下述方法进行：Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 75,1929 (1978)。

动物细胞的转化按下列方法：Virology, 52,456 (1973)。

以这种方式，得到了含 DNA(II) 的载体转化得到的转化子。

用来培养从大肠杆菌属宿主或枯草杆菌属宿主得到的转化子的培养基最好为液体，其含有该转化子生长所需的物质例如碳源，氮源和无机营养物质。葡萄糖，糊精，可溶淀粉和蔗糖等可以作为碳源。氨盐，硝酸盐，玉米浆，豚、酪蛋白、肉膏、豆饼和土豆膏可作为氮源。氯化钙，磷酸二氢钠和氯化镁可作为无机营养。酵母提取物，维生素生长起动力类也可额外加入。

培养基 PH 值最好介于 6 ~ 8 。

例如，含有葡萄糖和酪蛋白氨基酸的 M9 培养基(Miller : Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431 — 433, Cold Springs Harbor Laboratory, New York, 1972)，是用于培养大肠杆菌属微生物的最好的培养基。为充分发挥起动力作用，在 trp 起动力情况下，须加入 3- β - 吲哚丙烯酸。

当宿主是大肠杆菌属微生物，培养一般在约 15 ~ 43 °C 进行约 3 ~ 24 小

时，如果需要的话可通气和/或搅拌。

当宿主是枯草杆菌属微生物，培养一般在约30~40℃进行约6~24小时，如果需要的话可通气和/或搅拌。

当宿主是酵母转化子，可以用例如 Burkholder 最低限度培养基 [Bostian, K. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 77,4505(1980)]。培养基的 PH 最好调至5~8。培养一般在约20~35℃进行24~72小时，如果需要可进行通气和/或搅拌。

培养动物细胞转化子所用培养基最好为 MEM 培养基 [*Science*, 122,501(1952)]，DMEM 培养基 [*Virology*, 8,396(1959)]。RPMI1640 培养基 [*Journal of the American Medical Association*, 199,519(1967)] 或 199 培养基 [*Proceedings of the Society for the Biological Medicine*, 73,1(1950)]，另外加入5~20% 小牛血清。该培养基 PH 值最好为6~8。培养一般在30~40℃进行约15~60小时，如果需要可进行通气和/或搅拌。

hbFGF 蛋白质可以从上述培养产物中以纯化形式分离得到，例如采用下述方法：

从培养细胞中抽提 hbFGF 蛋白质，培养后用已知方法收集该细胞，然后用合适方法加工，例如悬浮液细胞于含有盐酸胍类蛋白质变性剂的缓冲溶液以得到含所需蛋白质的细胞外液，或者通过 French 挤压，声处理，溶菌酶处理破碎细胞和/或冰冻、融冻、然后离心，重获 hbFGF 蛋白质。特别建议采用 French 挤压处理或结合使用溶菌酶和声处理。

为了从上面得到的上清液中纯化 hbFGF 蛋白质，可以适当结合使用已知的分离纯化方法。作为这种已知分离和纯化方法，所能提到利用溶解度差别，例如盐析方法和溶剂沉淀方法；利用主要成分的分子量差别，例如透析方法，超滤方法，凝胶过滤方法以及 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法；利用电荷差别，例如离子交换层析方法；利用特异亲和性，例如亲和

层析方法，利用亲水性差别，例如反相高分辨率液相层析方法；以及利用等电点差别，如等电聚焦方法等。

更特别的是，污染核酸和酸性蛋白可从上面叙述的上清液中移去，只要将该上清液通过DEAE-纤维素离子交换层析柱或其类似物即可，例如，将上清液通过用接近中性的缓冲液（例如Tris缓冲液）平衡的DEAE纤维素柱，然后收集流出组分是有效的。当该流出组分通过CM-纤维素离子交换层析柱或其类似物时，hbFGF蛋白质（其为碱性蛋白质）被吸附于载体上，可被盐溶液冲洗下来。

CM纤维素或其类似的酸性树脂柱层析可用来从细菌提取物中直接纯化hbFGF。

例如，将上清液通过用微酸性缓冲液（如磷酸盐缓冲液）平衡过的CM-纤维素柱是有效的。用同样缓冲液洗过柱子后，hbFGF就可被加了盐的（如NaCl）同样缓冲液洗该柱子而重新得到。洗脱液在透析后冷冻干燥。

用肝素-琼脂糖进行亲和层析可用于从大肠杆菌提取物中纯化hbFGF。因此，例如，hbFGF蛋白可这样纯化：将上述洗脱液通入用近中性缓冲液（如Tris或磷酸盐缓冲液）平衡的肝素-琼脂糖柱，彻底冲洗柱子，用含NaCl及其类似盐的缓冲液进行线性梯度洗脱。

用于高分辨率液相层析的肝素柱（e.g. Shodex AF-pak HR-894，从Showa Denko, Japan买到特别有效。

在这种情况下，hbFGF可以作为均一产品重新得到，象用上述肝素-琼脂糖柱的方法一样，即，用近中性缓冲液加样于肝素柱，彻底冲洗柱子，用含NaCl的线性洗脱液洗脱。

这样得到的产品可通过透析和冷冻干燥而做成干粉。需用额外载体（e.g.血清清蛋白）保护产品，可以防止产品在容器壁的吸收。

此外，建议在纯化和保存过程中加微量还原剂，以防止产品的氧化。

作为还原剂的例子，提到如 β - 巯基乙醇，二硫苏糖醇，谷胱甘肽等。

以这种方法得到基本纯的hb FGF。根据此项发明，基本纯的hb FGF包括这样的产品，其hb FGF蛋白质含量不低于95% (W/W) 顶好不低于98% (W/W)。

据本发明，用遗传工程技术得到的hb FGF的例子，如包括具有图1所示的氨基酸顺序的多肽的蛋白质。该多肽在N末端可含有蛋氨酸。

这样形成的hb FGF的活性可以用例如BALB/C3 T3 细胞生长促进效应来测量。

据本发明当基因感染的或用DNA转化的不同细胞，(其本质上不能合成hb FGF或只能微量合成，)能大量合成hb FGF，并可方便地诱导hb FGF。

引入多种细胞时，据本发明，含有编码hb FGF蛋白质的cDNA的表达质粒可以使该细胞生产hb FGF，如此可大量得到hb FGF。这样产生的hb FGF可以作为灼伤，创伤，手术后组织等的治愈促进剂，或作为血栓形成，动脉狭窄等病的治疗药物，这些作用基于它的维管组织效应。此外还可用作促进细胞培养的试剂。

至于其药学应用，据本发明，hb FGF产品可安全施用于温血动物(例如人类，小鼠，大鼠，仓鼠，兔子，狗，猫)肠道或口腔服用，以粉末状或以药物组成形成(例如注射，片状，胶囊，溶液，软膏)与药理学可接受的载体，囊被剂和/或稀释剂一起制备。

注射用制剂可用方便方法生产，例如生理盐水或含葡萄糖和/或其它佐剂的水溶液或佐剂。药片，胶囊和其它药物组成也可用方便方法制备。

据本发明，当hb FGF用作促进细胞培养的试剂时，建议hb FGF加入量为0.01~10 μg ，顶好每升培养基0.1~10 μg 。

据本发明，hb FGF用作治愈促进剂或治疗试剂时，施加给温血动物

的hb FGF要少量，选择合适剂量为每天1 μ ~100 μ g/kg，据服用疗程和症状而不同。

hb FGF可通过在培养基中培养转化子大量生产，（据此发明），因此，作为药物的hb FGF及其类似物可大量提供。

在发明详述部分及权项和图表中，碱基缩写，氨基酸缩写等是根据 the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 介绍的写法或那些文献中的常用词。例子如下。可能有光学异构物的氨基酸，除了特别标记以外，均为L型。

DNA：脱氧核糖核酸

cDNA：互补脱氧核糖核酸

A：腺嘌呤

T：胸腺嘧啶

G：鸟嘌呤

C：胞嘧啶

RNA：核糖核酸

dATP：脱氧三磷酸腺苷

dTTP：脱氧三磷酸胸苷

dGTP：脱氧三磷酸鸟苷

dCTP：脱氧三磷酸胞苷

ATP：三磷酸腺苷

Tdr：胸苷

EDTA：乙二胺四乙酸

SPS：十二烷基磺酸钠

Gly：甘氨酸

Ala：丙氨酸

Val：缬氨酸

Leu: 亮氨酸

Ile: 异亮氨酸

Ser: 丝氨酸

Thr: 苏氨酸

Cys: 半胱氨酸

Met: 蛋氨酸

Glu: 谷氨酸

Asp: 天冬氨酸

Lys: 赖氨酸

Arg: 精氨酸

His: 组氨酸

Phe: 苯丙氨酸

Tyr: 酪氨酸

Trp: 色氨酸

Pro: 脯氨酸

Asn: 天门冬酰胺

Gln: 谷氨酰胺

例1 (1) 中得到的并将在后面叙述的转化子大肠杆菌 K12 DH1 / p T B627 存放在发酵研究所 Osaka (I F O) , Japan Since March 13, 1986 , 保藏号为 I F O 14494 。此微生物也在下述地方存放 the Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology , Ministry of International Trade and Industry (F R I) , Japan Since April 2, 1986 登录号 F E R M P- 8726 , 该保存物已转移至 Budapest Treaty 下存放, 该微生物在 F R I 存于登录号 F E R M B P-1280 。

在例1中得到的转化子(后面将叙述)大肠杆菌 K12MM294/p T B 669 已在 I F O 于1986年8月11日以登录号 I F O 14532, 存放。该微生物还在 F R I, Since August 21, 1986 存放, 登录号 F E R M P- 8918, 该存放物已转至 Budapest Treaty, 该微生物贮于 F R I, 登录号 F E R M B P- 1281。

在例5(3)中得到的转化子小鼠 L-b F G F-5 细胞, 后面, 后面将叙述, 已存放在 I F O, 保藏日为1986年7月30日, 保藏号 I F O 50092。

图表简示

图1 表明例1(3)中得到的c D N A的碱基顺序及从它预测出的氨基酸顺序。

图2 表明c D N A部分(约4.3 kbp)的限制性酶切图谱及从例1(5)中得到的质粒p T B627 的邻近区域。

图3 表示从例3(1)中得到的质粒p T B669 的构建图。

图4 表示例4(1)中得到的质粒p T B735 的构建图。

图5 表示例5(1)中得到的质粒p T B663 的构建图。

图6 表示例6 中得到的 H P L C- 肝素柱洗脱图。

图7 表示例6 中得到的峰 I 部分 S D S- 聚丙烯酰胺凝胶电泳图。

图8 表示例7 中所得到的反相层析结果。

图9 表示例7 得到的 S D S 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。

图10 表示例8 得到的 C M- 纤维素柱层析洗脱图。

图11 表示例8 得到的 C M- 纤维素柱层析洗脱液在 H P L C- 肝素柱上的洗脱图。

图12 表示例10 中得到的 H P L C- 肝素柱洗脱图。

下述例子详细叙述了本发明, 但并不是本发明的限制范围。

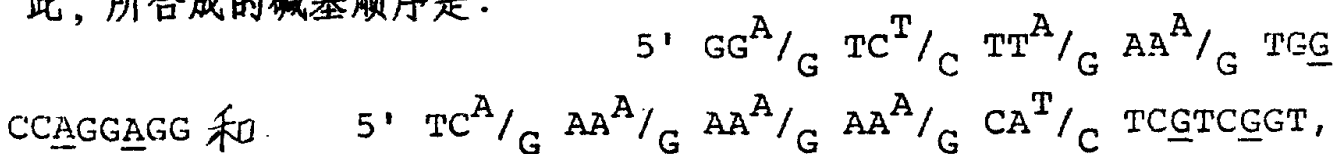
例1 (构造质粒)

(1) 分离含有c DNA的质粒:

—c DNA文库, 用大肠杆菌×1776作为宿主, 将根据人类上皮衍生初级培养细胞m RNA合成的c DNA插入p CD载体而产生(Okayama et al.:Molecular Cell Biology, 3,280 (1983)], 研究者是Dr. Okayama at the National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, U S A. 用碱性提取方法从这个c DNA文库中提取出质粒DNA [Biorboim, H. C. & Doly. J.:Nucleic Acids Research, 1,1513(1979)], 用这个DNA去感染大肠杆菌DH1。这样—c DNA文库就通过大肠杆菌DH1 宿主产生, 所述基因文库含约 2×10^6 克隆。

上述采用了大肠杆菌DH1 的c DNA文库置于10张硝酸纤维素滤膜上(Millipore's H A T F filter)约每张滤膜约有 5×10^4 克隆。用这些滤膜作为主滤膜, 在10对相应于主滤膜的滤膜上制备20张复制滤膜。这些复制滤膜上的大肠杆菌细胞用0.5 N Na OH裂解, 暴露的和变性的质粒DNA固定在滤膜上[Grunstein, M. & Hogness, D. S. : Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 72,3961 (1975)]。

另一方面, 根据由F. Esch et al. 所报告的[Proc.Natl. Acad. Sci. U S A, 82,6507 (1985)], 牛初级成纤维细胞生长因子的氨基酸顺序, 分别化学合成了对应两段氨基酸顺序的碱基顺序, 一段是13~20氨基酸(Pro- Pro- Gly- His- Phe- Lys- Asp- P ro), 另一段是89~96 (Thr- Asp- Glu- Cys- Phe- Phe- Phe - Glu)。(在兼并密码子的第三个位置选出了唯一的一个核苷酸。)因此, 所合成的碱基顺序是:



和每个下面有划线的碱基是选出的一个。这些寡聚核苷酸在5'端用 ^{32}P 标

记, 即将该寡聚核苷酸置于50 μ l 反应混合物中[0.1 μ g 寡聚核苷酸, 50m M Tris-HCl, PH8.0, 10m M Mg Cl₂, 10m M 巯基乙醇, 50 μ Ci γ -³²P ATP (> 5,000 Ci/mmole), 3 单位 T₄ 聚核苷酸激酶(Takara Shuzo, Japan)] 37 °C 1 小时。

这样标记的上述两段寡聚核苷酸单独作为探针与复制滤膜杂交。杂交反应在下列情况下进行: 10ml 100 μ g/ml 变性的鲑精子 DNA 溶液, 其在 5 倍 ss PE 中含有 10 μ Ci 探针[180 mM NaCl, 10m M Na H₂PO₄, 1 m M EDTA (PH7.4)] 和 5 倍 Denhardt's (带有 0.1 % SDS), 35 °C 16 小时。反应后, 滤膜用 5 倍 SSC 含 0.1 % SDS 冲洗[5 \times SSC 即: 0.15M NaCl, 0.015 M 柠檬酸钠] 三次, 每次均在室温下 30 分钟, 然后在 45 °C 下冲洗两次, 每次 30 分钟。[T. Maniatis et al.: "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Page 309 (1982)]。

冲洗的滤膜进行放射自显影, 寻找能与两类探针反应的菌种, 即迭加每对复制滤膜的放射自显影照片。以这种方式, 从 5 \times 10⁵ 个菌落中得到了能与两种探针反应的一个菌落[大肠杆菌 K12 DH1/p TB627 (IF O14494, FERM BP- 1280)]。

(2) 从(1) 中得到的菌种[大肠杆菌 K12 DH1 / p TB627 (IF O14494, FERM BP- 1280)] 中用碱提取方法(见上文) 提取并纯化质粒 DNA (p TB627))。该质粒 DNA 的 c DNA 部分用限制酶 BamH I (Takara Shuzo) 切割并用琼脂糖凝胶电泳使之分开。限制酶 BamH I 将 c DNA 部分切成 5 个片段(2.6 Kbp, 650 bp, 430 bp, 250 bp, 和 150 bp)。这些 DNA 片段从琼脂糖凝胶转移至硝酸纤维素滤膜上(S' & S's BA85) [Southern blotting 方法; T. Maniatis et al.: "Molecular Cloning", Cold Spring H

arbor Laboratory , p.382 (1982)] 。此滤膜与上文提到的两种³²P标记寡聚核苷酸探针以上述同样方式杂文。得到的放射自显影表明两种探针均与430 bp的DNA片段发生反应。因此,认为人类初级成纤维细胞生长因子(Ⅱ)的氨基酸顺序的中间部分的大部分应编码在430 bp的片段上。

(3) 然后, (2) 中提到的c DNA部分的碱基顺序, 即5段BamH I DNA片段, 用双脱氧核苷酸合成链终止方法确定[J. Messing et al. : Nucleic Acids Research , 9,309 (1981)] 。

基于碱基顺序分析结果, 整个人类初级成纤维细胞生长因子氨基酸顺序便可以确定。

该c DNA的碱基顺序和从该碱基顺序推断的氨基酸顺序示于图1。在图1中, 缩写“trm”表示“终止密码子”。在(A)_n中数字n是任意数。该氨基酸顺序非常接近于所报道的牛初级成纤维细胞生长因子的氨基酸顺序。这表示该c DNA是编码人类初级成纤维细胞生长因子(Ⅱ)的一个。

在图1中, N末端氨基酸(氨基酸号1 Pro是从Esch et al. [Proc. Natl. n Acad. Sci. U S A , 82,6507 (1985)] 报道的牛初级成纤维细胞生长因子的氨基酸顺序中推断得到的。

从所述N-末端氨基酸上游的九个氨基酸可能含有一类信号肽。

(4) 在(2)中得到的质粒p T B627用BamH I消化, 分离出编码人类初级成纤维初步生长因子的430 bp DNA片段。这个DNA片段用缺刻翻译方法标记³²P[Rigby, P. W. J. et al. : Journal of Molecular Biology , 113 , 237 (1977)] 。

用10张滤膜(用例1中提到的c DNA文库置于滤膜上, 质粒DNA固着其上, 用大肠杆菌DH1作为宿主)进行杂文反应, 另一方面, 上述³²P标记的DNA片段作为探针。杂交应于下述溶液进行: 10ml 50% 甲酰

胺溶液，含有 $10 \mu\text{Ci}$ 热变性探针（放射活性比强 $5 \times 10^7 \text{cpm}/\mu\text{g}$ DNA），5 倍ss PE（ 180mM NaCl ， $10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$ ， 1mM EDTA ， $\text{pH}7.4$ ），5 倍Denhardt's， 0.1% SDS和 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 变性鲑精子DNA， 42°C 16小时。反应完毕，滤膜用 $2 \times \text{SSC}$ （ 0.15M NaCl ， 0.015M 柠檬酸钠）， 0.1% SDS溶液室温下洗三次，每次30分钟，然后用 $0.5 \times \text{SSC}$ ， 0.1% SDS溶液在 60°C 冲洗30分钟。

洗后滤膜进行放射自显影，挑出与探针反应的四个菌种。用上文提到的碱性方法从每个菌种中提取质粒DNA，纯化，并检测其cDNA部分的链长。所获得的所有cDNA链长度为 $500 \sim 700 \text{bp}$ 那样短。质粒F7-1，在四个质粒中cDNA链长度最长，确定其cDNA部分的碱基顺序。

发现F7-1始于编码第15个氨基酸Gly的密码子的中间（ $\text{CCACTTC} \dots \dots$ ）然后通过翻译终止密码子进入3'非翻译区，终止于-聚(A)链之后（约 150bp ），这个聚(A)链从终止密码子下游约 100bp 开始，在图1中用V标示。聚A链的额外信号的识别，即AATAA顺序（在图1中划有双线），大约位于翻译终止因子下游 80bp 处，被认为是为了引导加上聚(A)链。因此，这表明人类初级成纤维细胞生长因子mRNA可能含有在3'非翻译区有所不同的多重结构。

此外，Northern blotting 杂交（Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 200, 1982）从人类包皮衍生初级培养Flow 7000细胞（Flow USA）或人类胎儿肺脏衍生初级培养HEL细胞中提取的mRNA，用上面提到的 ^{32}P 标记的BamHI 430bp片段作为探针，可以检测至少5种mRNA分子种类。

(5)cDNA部分（约 4.3kbp ）的限制性酶图谱及含有编码人类初级

成纤维细胞生长因子(Ⅱ)的cDNA的质粒pTB627的邻近区域示于图2。图2中，H，X，B，P，E分别表示HindⅢ，xhoⅠ，BamHⅠ，PstⅠ和EcoRⅠ切割位点。

例2.(在动物细胞中表达编码hbFGF基因)。

类人猿Cos7细胞以单层培养方式(Falcon Plastic dish直径60mm)于含10%小牛血清的DMEM培养基中培养，然后用同样新鲜培养基置换该培养基。换培养基后四小时，用已知方法制备含有10 μg质粒pTB627 DNA的磷酸钙凝胶[Graham et al.: Virology, 52,456 (1973)]，加入培养细胞以产生pTB627感染的Cos-7细胞，再过4小时，用丙三醇处理细胞，然后继续用含0.5%小牛血清的培养基培养pTB-627感染的Cos-7细胞。培养70~72小时后，收集含有产生的hbFGF的培养基。

然后用DMEM培养基(含5%牛血清)接种BALB/C3T3细胞(每盘 2×10^4 细胞)于直径35mm的Falcon塑料盘中。第二天，用含0.5%牛血清的DMEM培养基取代该培养基。再培养二天，上述含有hbFGF的培养基加入每盘100 μl，两天以后，计数细胞。

如表1所述，发现用来培养含hbFGF的pTB627感染Cos-7细胞的培养基能诱导其余BALB/C3T3细胞的细胞分裂。

相反，在一对比实验中，采用未感染细胞的培养基，完全没有检测到hbFGF产生。纯化的牛脑FGF购买于Takara Shuzo, Japan。

表 1 hb FGF用质粒p T B627 DNA转染产生

BALB/ C3 T3 细胞 加入培养基的样品	每盘细胞数
培养p T B627 感染的 Cos-7细胞的培养基	2.1×10^5
培养未感染细胞的培养基	1.2×10^5
牛脑 FGF (0.2 ng/ml)	1.9×10^5

例3 (在 E. Coli 中表达hb FGF编码基因, 其中采用trp 启动子)

(1) 构造hb FGF表达质粒p T B669

在例1(2)中得到的质粒p T B627 (见上文), 其含有hb FGF c DNA, 用限制酶Ava I和 Bal I切, 得到含有编码hb FGF区域的0.44kb DNA片段, - Bgl II连接物, p CAGATCTG, 用T₄DNA连接酶在其 Bal I切割位置(平整末端) 与该DNA连接, 用 Bgl II消化后, 分离出-0.44kb Ava I- Bgl II DNA片段。使T₄DNA连接酶与这个0.44kb Ava I- Bgl II片段反应, 使得 Bgl II切割位点之间连接起来。然后, DNA聚合酶(Klenow 片段) 反应在d × T Ps 存在下进行, 并使Ava I切割位点变为平整末端。这个DNA片段与磷酸化合成的寡聚核

昔酸 5'AATTCTATGCCAGCATTGC3' 和 5'GCAATGCTGGCATAG3', 在 T_4 DNA 连接酶存在下连接。一约 0.46kb DNA 片段通过 Eco R I- Bgl II 切割而得到。分别进行, 含 trp 启动子的质粒 ptrp781 [Kurokawa, T. et al.: Nucleic Acids Res., 11, 3077-3085 (1983)] 用 Pst I 切割, 用 T_4 DNA 聚合酶反应使变为平整末端。Bgl II 连接物 p CAGATCTG 通过 T_4 DNA 连接酶反应与上述切割产物在平整末端连接, 连接产物用 Eco R I- Bgl II 切割, 分离出含有 trp 启动子, 四环素抗性基因和质粒复制起点的 3.2kb DNA 片段。这一 3.2kb 片段再与上面提到的 0.46kb Eco R I- Bgl II DNA 片段通过 T_4 DNA 连接酶反应连接, 0.46kb 这一片段含有 hbFGF 编码基因区, 这样就构建了 -hbFGF 表达质粒 pTB669 (图3)。

这个质粒 pTB669 用来转化 E. Coli DH1 以给出一载有质粒 pTB669 的转化子, 即 E. Coli DH1 / pTB669。

pTB669 还用于同样方式转化 E. Coli K12 MM294 和 C600 以分别得到 E. Coli K12 MM294 / pTB669 (IFO14532, FERM BP-1281) 和 E. Coli C600 / pTB669。

(2) 制备细胞提取物

上述每种转化子在 M9 培养基中培养, 其中含有 1% 葡萄糖, 0.4% 酪蛋白氨基酸和 8 μ g/ml 四环素。当 Klett 值约 200 时, 加入 3- β - 吲哚丙烯酸至 25 μ g/ml, 培养再持续 4 小时。以后, 收集细胞并悬浮于二十分之一体积的 10% 蔗糖溶液, 20mM Tris-HCl, PH7.6 在此悬浮液中加入氟苯甲磺酸 (DM SF) 至 1mM (终浓度), EDTA 至 10mM, NaCl 至 0.1M, 盐酸亚精胺 10mM, 溶菌酶 100 μ g/ml。0 $^{\circ}$ C 45 分钟后, 用声处理整个混合液 30 分钟, 声处理产物在 18,000rpm 离心 30 分钟 (Servall centrifuge, ss34roter, U. S. A) 得到上清液即细胞提取物。

(3) 细胞提取物中hbFGF活性

hbFGF活性以一纯化的牛脑FGF参照标准重量(Takara Shuzo)表示,其显示样品抗BALB/C3T3细胞生长促进活性相同水平。

用DMEM培养基(含5%牛血清(0.2 ml每孔))接种λNunc 96-孔微孔板(平底)小鼠BALB/C3T3细胞(2×10^3 细胞每孔),培养该细胞。第二天,用含0.5%牛血清的DMEM培养基取代该培养基。培养三天后,将用含0.5%BSADME培养基连续5倍稀释的细胞提取物稀释液加入每孔10 μl。继续培养20小时后,每孔加入2 μl ^3H -Tdr(5 Ci/mmol, 0.5mCi/ml RCC Amersham)。6小时以后,用含0.2% trypsin和0.02% EDTA的磷酸盐缓冲液处理,刮出每孔中的细胞,用Titertek细胞采集器收集于一玻璃滤器,用一闪烁计数器测量细胞含有的 ^3H Tdr量。已知量的牛胞FGF的活性(Takara Shuzo)用下述同样程序确定。根据这样得到的实验曲线,计算出样品中hbFGF含量。所得结果示于表2。

在对比实验中,确定了转化子E. Coli DH1 /ptrp781中hbFGF的产生,这个转化子是用质粒ptrp781转化E. Coli DH1而得到的。

表2 hb F G F生产

转化子	hb F G F产量(每升培养基)
E. Coli DH1 / p T B669	2.95mg
E. Coli MM294 / p T B669	23.15
E. Coli C600 / p T B669	8.15
E. Coli DH1 / ptrp781	< 0.0005

例4 (E. Coli 中hb F G F编码基因的表达其中采用 X P L起动机。

)

(1) 构建hb F G F表达质粒p T B735

由例3 (1) 中得到的质粒p T B669 用限制酶 E. Coli 和 Bgl II 切割, 得到- 0.46kb DNA 片段。该片段有一 A T G 起始密码子和编码 hb F G F 序列。

另一方面, 一质粒p T B281 (一具有 λ 噬菌体 P L 起动子的质粒, 见例子 European Patent Publication No.177915 A2.) 用 Eco R I 和 BamH I 切, 分离得到一DNA 片段, 其含有 λ P L 起动机, 氨苄青霉素抗性基因和复制起点。

这个DNA 片段通过 T_4 DNA 连接酶与上述0.46kb Eco R I- Bgl II DNA 片段相连接, 构建了一个hb F G F 表达质粒p T B735 (图4) 。

这个p T B735 质粒用来转化 E. Coli N4830 C I857(ts) 以得到一载有质粒p T B735 的转化子, 称为 E. Coli N4830 C I857(ts) / p T B735 。

(2) 细胞提取物制备及其促有丝分裂的活性:

上面(1)中得到的转化子用例3(2)中使用的培养基在35°C培养。

当培养基kett值达200 时, 培养温度转换为42°C, 继续培养2 小时。培养后, 采集细胞, 以例3(2)中相似的方式制备细胞提取物。

也就是细胞悬浮于二十分之一体积的10% 蔗糖溶液20m M Tris HCl, PH7.6, 在此悬浮液内加入 PM SF至1mM, EDTA至10m M, Na Cl 至0.2 M, 溶菌酶至100 µg/ml。

0 °C45分钟后, 用声处理混合物30分钟。声处理过的混合物在18000 rpm 离心(Servall centrifuge, ss34 roter, U. S. A) 30分钟得到一上清液, 即细胞提取物。

本细胞提取物的促有丝分裂的活性用与例3(3)一致的方法抗 B A L B / C3 T3 细胞测量, 得到与 E. Coli K12MM294/p T B669 一样的值。

例5 (生产hb F G F的动物细胞转化子的产生)

(1) 构建质粒p T B663

例1(2)得到的含有hb F G F编码基因的质粒p T B627 用限制酶 Sal I切割。另外, 质粒p T B399 (Japanese tin Laid Open No. 61-63282, Which Corresponds to European Patent Publication No.172619) 用 Sal I- Xho I切割, 分离纯化出 1.1kb DNA 片段, 其含有 Abelson Murine Lenkemia Virus (A- Mu L V) 长末端重复区域(L T R)。将这二者混合并通过 T DNA 连接酶反应连接起来(Sal I切割和 Xho I切割产生均一的粘性末端), 经过下述过程选择出一重组质粒并命名为p T B663 (图5),

即将1.1kb Sal I- Xho I DNA片段在 Sal I切割位点插入p T B627 而得到此质粒，留在1.1kb DNA片段的 L T R具有与发生在hb F G F基因上游的 S V40早期起动机相同的方向性。

(2) 小鼠 L细胞的转化

Eagle's MEM培养基含有10% 小牛血清，置于 Falcon 盘(直径6 cm) 培养小鼠 TK(胸腺嘧啶激酶)- 缺失的 L细胞(LTK⁻系) 过夜 37°C 培养。培养后，采用 Graham et al. 方法[Virology, 52, 456-467 (1973)]用 10 μg p T B663 以及 0.2 μg 质粒 p T K61

(Japanese Patent Applicatio Laidopen No.61-63282 Which Corresponds to E. P. Publication No.172619; 含有 H S V的 TK基因) 对这些细胞(7×10^5 细胞每盘) 进行并发转染。37°C 培养4 小时后，培养基用新鲜同样培养基取代，继续培养过夜。第二天，用 H A T培养基取代(MEM培养基含 15 μg/ml 次黄嘌呤，1 μg/ml 氨基喋呤，5 μg/ml 胸昔如 0.25 μg/ml 甘氨酸)，37°C 培养继续进行，3 或 4 天间隔换一次培养基。2 ~ 3 星期以后，转化为 TK⁺ 的细胞生长成为菌落。

(3) 转化子克隆化，检测hb F G F

例5(2)中得到的转化子细胞用有限稀释方法克隆，得到转化子小鼠细胞系 L-b F G F- 5 (I F O50092) 和 L-b F G F- 6 。完成克隆以后的克隆化细胞于含10% 小牛血清的 Eagle's MEM培养基中培养。分离到的每个克隆细胞接种于 Linbro 盘，当细胞长到80% 饱和度时，培养基用含0.5 % 小牛血清的 Eagle's MEM培养基代换。继续培养48小时后，培养上清液用来检测 F G F活性。检测方法与例1(3)中的相同。结果示于表 3 。

表 3 hb F G F产量

转化子(克隆)	hb F G F产量
L-b F G F-5	4.8 ng/ml
L-b F G F-6	3.5 ng/ml
L T K ⁻ strain	< 0.01ng/ml

(4) 小鼠 B A L B/ C3 T3 细胞的转化和转化子的性质

小鼠 B A L B/ C3 T3 A31细胞用例5(2)中同样方式转化得到转化子。

在培养基和转化的细胞裂解物中分泌所产生的hb F G F量以例3(3)相同方式测量，结果示于表4。

从结果中可见，相对于其分泌在培养基中的量，大部分hb F G F贮存于细胞中。

这些转化的细胞表现出特异的形态学变化，正如在 A31细胞中加入纯化的hb F G F情况一样。

此外，这些转化体在软琼脂中形成菌落。

表 4

转化子	hb F G F产量 (ng/dish*)	
	培养基	细胞提取物
A-b F G F-1	< 0.5	134
A-b F G F-4	3.2	238
A31	< 0.5	< 0.02

* 注：指 9cm直径每盘的hb F G F的量。

例6 (hb F G F纯化)

按照例3(2)所述程序，培养 E. Coli K12 MM294/p T B669 (I F O14532 , F E R M B P- 1281) 并制备细胞提取物。—25ml部分提取物(从500ml培养基中制备)通过- D E A E- 纤维素(D E 52 , Whatman , England) 柱(直径2 × 10cm) , 该柱已用0.2 M Na Cl 溶液于20m M Tris-H Cl , PH7.6 平衡过，除去提取物中的核酸部分。柱子的流出液和用0.2 M Na Cl 20m M Tris-H Cl PH 7.6 洗柱流出液收集并混合(D E A E流出液44ml) 。

14ml这种组分加入高分辨率液相层析柱(Gilson , France) , 该柱装有肝素柱 Shodex A F-pak H R-894 (8mm ID × 5 cm , Showa Denko , Japan) 。该柱用20m M Tris-H Cl PH7.6 冲洗，然后用

0.5 M Na Cl , 20m M Tris-H Cl PH7.6 冲洗。然后, 用线性梯度洗脱液0.5 ~2 M Na Cl , 20m M Tris-H Cl 缓冲液 PH 7.6 洗脱。(洗脱体积60ml, 流速1.0ml/min)。

洗脱图示于图6, 图6 中, 纵座标表示 OD₂₈₀吸收以及梯度中 Na Cl 的浓度。横座标表示时间。在时间 0, 开始梯度洗脱。收集峰组分, 测量其 FGF 活性。这个纯化过程中该蛋白的比活和hb FGF 产率示于表5。

在表5 中, 比活值相对于牛脑产生 FGF (Takara Shuzo; 纯度不低于95%) 的活性(取作1)。

表 5 从重组子中纯化hb FGF 及其比活

	蛋白质	比活	产率(%)
细胞提取物	34.2mg	0.051	100
DEAE纤维素柱	29.3mg	0.032	53.4
流出液			
肝素柱洗脱组分			
峰 I	200 μg	2.9	33.0
峰 II	50 μg	0.66	1.9
峰 III	27 μg	1.03	1.6

峰IV 10 μg 0.34 0.2

测量了小鼠 BALB/ C3 T3 细胞生长促进活性以及 FGF 的量，如果最大值定为一单位，该活性为50%，在这些条件下，0.02ng所述的 Takara Shuzo's FGF 表示活性1 单位(1ng = 50单位。)

峰I 组分表现出最高比活，比商品 FGF(bovine brain-derived FGF, parity not less than 95%, Takara Shuzo) 高 2.9 倍。FGF 活性也在峰II, III, IV 中发现，尽管其活性低于峰I 。

用17.25 % SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析峰I 组分。在某位置找到一条单一带(分子量约17,000) 与从hb FGF 氨基酸顺序计算值极为吻合(图7) 。

峰II, III, IV 也在同样位置给出单一条带，与峰I 情况一样，在生I, II, III 之间的分布认为是由于该蛋白质立体结构的不同所致。

在图7 中，电泳图a 对应峰I 的组分，图b 是分子量标志。蛋白用 Coumassie Brilliant Blue R250 染色。

例7(hb FGF 特性)

(i) 该组分(峰I) 100 μg ，(上述例5 中用肝素亲和柱层析得到) ，经透析去盐，蒸干。残余物悬浮于0.1 % 三氟乙酸，用反相层析法分析(Chromatopacking Center, Vlttron 300 C-4, Japan) 分析条件如下：流速1.0ml/min 。样品引入时溶剂为0.1 % 三氟乙酸。10分钟后，乙腈浓度线性增加，这样，60分钟后溶剂含有90% 乙腈和0.1 % 三氟乙酸。结果，在约40% 乙腈处观察到一峰，示于图8 。

上述反相层析中得到的峰附近的洗脱组分以每分钟间隔分步收集，并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。得到的结果示于图9 。图9 中，图形1 是分子

量标记物，图形2 是第35分钟，图形3 是第36分钟，图形4 是第37分钟，图形5 是第38分钟，图形6 是第39分钟，图形7 是第40分钟时的洗脱组分。

这些峰的级分(4 , 5 和6)，当进行聚丙烯酰胺凝胶电泳时，出现一单一条带。这个图形说明以这种方式得到的hb F G F纯度达99% 。回收相应于这些峰的洗脱组分，得到的产品用于分析其氨基酸组成及 N末端氨基酸顺序。

(ii)氨基酸组成

纯化的蛋白质(14 μg)，例7(i)中得到，置于玻璃试管中水解，加入200 体积(v/w) 含4 % 巯基乙酸的恒沸点盐酸，减压密封试管。110 $^{\circ}\text{C}$ 下水解24小时。水解以后，打开试管，减压下除去盐酸，残留物溶于0.02 N盐酸，在 Hitachi model 835 高分辨氨基酸分析仪(Japan) 上分析氨基酸，未检测到半胱氨酸和胱氨酸。基于这样发现的摩尔比，假设天冬氨酸为12，计算每种氨基酸的残基数目。得到的结果示于表6 。

检测到的氨基酸	残基数目	氨基酸组成*
天冬氨酸	12.0	12
苏氨酸	4.8	5
丝氨酸	8.3	10
谷氨酸	11.8	12
脯氨酸	8.5	9
甘氨酸	14.7	15
丙氨酸	8.9	9
胱氨酸	-	4
缬氨酸	6.4	7
蛋氨酸	2.1	2
异亮氨酸	3.8	4
亮氨酸	12.6	13
酪氨酸	6.9	7
苯丙氨酸	7.8	8
赖氨酸	14.3	14
组氨酸	2.9	3
精氨酸	10.8	11
色氨酸	1.2	1

* 注：表6中“氨基酸组成”栏中的数字是从c DNA碱基顺序推断的hb F G F氨基酸组成理论值。

表6 中所示氨基酸残基数目与从c DNA碱基顺序推断的人类初级成纤维细胞生长因子氨基酸组成非常吻合。

(iii) 氨末端部分氨基酸顺序

例7 (i) 中得到的纯化蛋白质28 μg 用气相蛋白质顺序仪(Applied Biosystems Inc., model 470 A, U. S. A.) 分析其N末端氨基酸顺序。形成的苯基乙内酰脲- 氨基酸(PTH- 氨基酸) 在 Varian 高分辨率液相层析, Micropak SP C-18-3 柱(Varian, U. S. A.) 上识别并分析。这样得到的结果示于表7。

基于上述结果, 纯化蛋白质的氨端氨基酸顺序确定为 Pro- Ala- Leu- Pro- Glu。这个顺序与从表达质粒DNA碱基顺序中推断结果相吻合。

表 7

周期	PTH- 氨基酸 (nmol)
1	Pro (0.49), Met (0.10)
2	Ala (0.51), Pro (0.05)
3	Leu (0.46), Ala (0.07)
4	Pro (0.33), Leu (0.09)
5	Glu (0.53), Pro (0.10)

例8 (hb FGF 纯化)

在1升20mM Tris-HCl PH7.4, 1mM EDTA, 0.2 M NaCl 和1mM PMSF溶液中悬浮已用例3方法培养过的 E. Coli K12MM294/pTB669 细胞。

此悬浮液在4 °C进行 French press 挤压处理以使细胞裂解。

裂解物于18000 rpm 4 °C离心45分钟, Serval Centrifuge, ss 34 roter, 得到1.2 l 上清液。

该上清液用0.1 M磷酸盐缓冲液 PH6.0 稀释, 得到3 l 溶液, 其中2.4 l 加入CM-纤维素柱(Whatman, CM50, 直径5 cm×30cm)。在用0.1 M磷酸盐缓冲液 PH6.0 冲洗柱子后, 用含0.6 M NaCl 的0.1 M磷酸盐缓冲液洗脱, 得到hbFGF洗脱液, 测量洗脱液在280 nm处的吸收值, 收集含有蛋白质的组分。图10示出洗脱图。

在图10中用←→表示的集中组分用20mM Tris-HCl PH7.4 稀释3倍, 加至高分辨率液相层析(Gilson), 该柱装有肝素柱 Shodex AF-pak HR-894 (8 mm ID×25cm, Showa Deuko)。

CM-纤维素洗脱物通过注射泵以4 ml/min流速加入该柱。

用缓冲液A(20mM Tris-HCl PH7.4, 含1mM EDTA)以6 ml/min流速冲洗柱子后, 按下述条件进行洗脱:

用下列缓冲液进行线性梯度洗脱蛋白质:

0 分钟: 70% 缓冲液 A, 30% 缓冲液 B;

200 分钟: 0 % 缓冲液 A, 100 % 缓冲液 B;

200 分钟后: 100 % 缓冲液 B。

流速: 6 ml/min

组分: 4.5 ml每管。

洗脱图形示于图11, 在这次层析中, 得到峰 I, II, III, IV 组分。用这套程序, 能得到约20mg hbFGF。

例9 (峰Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ的定性)

按例8中肝素柱亲和层析法得到的峰Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ组分各100 μg 透析, 冻干。干燥产品悬浮于0.1% 三氟乙酸, 该悬浮液进行反相层析。(Chromatopacking Center, Ultron 300 C-4, Japan)。洗脱条件与例6(i)一致。即, 流速为0.1 ml/min, 溶剂为0.1% 三氟乙酯(在样品加入时。)

10分钟后, 乙腈浓度线性增加, 这样60分钟后溶剂含有90% 乙腈和0.1% 三氟乙酸。

结果表明这三个峰, 峰Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ在与峰 I 相同位置洗脱出一尖锐单峰, 大约在40% 乙腈浓度洗脱出来。

回收峰组分, 根据例7(ii), (iii) 方法进行氨基酸组成分析和N末端氨基酸顺序分析, 结果示于表8 和表9。

峰Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ蛋白质在氨基酸组成和N末端氨基酸顺序上未表现有与峰 I 蛋白质不同之处, 并与从表达质粒中c DNA推断的碱基序列结果一致。

氨基酸	残基数			氨基酸组成*
	峰Ⅱ	峰Ⅲ	峰Ⅳ	
Asp& Asn	12.0	12.0	12.0	12
Thr	4.7	4.7	4.8	5
Ser	8.6	8.5	8.5	10
Glu& Glr	12.6	12.5	12.4	12
Pro	9.3	9.2	9.2	9
Gly	14.8	14.6	14.7	5
Ala	9.2	9.1	9.3	9
Gys*	-	-	-	4
Val	6.5	6.7	7.0	7
Met	2.1	2.1	2.4	2
Ile	3.9	4.0	4.0	4
Leu	13.3	13.4	13.4	13
Tyr	7.1	7.3	7.3	7
Phe	8.2	8.4	8.5	8
Lys	13.6	13.8	14.0	14
His	2.8	3.0	3.2	3
Arg	11.0	11.0	11.2	11
Trp	0.9	1.2	1.6	1

* 注：上表8中“氨基酸组成”栏中数字表示从c DNA碱基顺序推断得到的理论氨基酸组成值。

表 9

周期	P T H- 氨基酸 (nmol*)		
	峰 II	峰 III	峰 IV
1	Pro (0.57)	Pro (1.87)	Pro (0.54)
2	Ala (0.89)	Ala (3.14)	Ala (0.97)
3	Leu (1.13)	Leu (3.84)	Leu (1.20)
4	Pro (0.52)	Pro (1.64)	Pro (0.52)
5	Glu (0.92)	Glu (3.21)	Glu (0.99)

* 注：用作分析的蛋白质量为：

峰 II 43 μg ， 峰 III 80 μg ， 峰 IV 63 μg 。

例10

E. Coli K12 MM294/p T B669 (I F O14532 ， F E R M B P- 1281) 培养于500 ml与例3(2)中相同的培养基中。

收集的细菌细胞悬浮于30ml，20m M Tris-H Cl (P H 7.6) 含10% 蔗糖。

该悬浮液被制成终浓度5 m M E D T A ， 0.2 M N a C l ， 1mM P M S F ， 并被分为两部分(A 和 B) 。

对其中一份(B) 悬浮液，加入二硫苏糖醇(D T T) 至0.5mM浓度。

对两份悬浮液均加入溶菌酶至浓度100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，悬浮液在0 $^{\circ}\text{C}$ 下放置45分钟。然后对它们进行声处理。

这些溶液在20000 rpm (Serval Centrifuge S S- 34 roter) 离心40分钟。

细胞提取液(A) 和(B) 各7 ml分别加入柱层析 Shodex A F -pak H R- 894 (8 mm ID \times 5 cm) 。

载上样品后，该柱用缓冲液A冲洗[0.6 M Na Cl 20m M Tris-H Cl PH7.4 , 1mM EDTA] ，直至洗脱液在280 nm吸收值达到背景水平。

然后用线性梯度洗脱液A到B洗脱，B为2 M Na Cl , 20m M Tris-H Cl , 1mM EDTA] ，流速为1ml/min ，(洗脱体积60ml) 。

提取物(A) 和(B) 的洗脱图形示于图12。

从加了D T T的 B提取物的洗脱图形可见，几乎所有洗出蛋白质是峰I，极少检测到有其它峰(峰II，III，IV) 。这可能是由于D T T的作用，它阻止了在纯化步骤中由于氧化而引起的蛋白质变性。

所以，这个程序对峰I级份有高收率。从提取物(A) 和(B) 分别得到的峰I的促有丝分裂活性对 B A L B/ C3 T3 细胞测定，而且确信两种纯化蛋白质具有相同的比活。

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说明书	1 1	1 5	hbFGF 可以作为灼伤，	hbFGF 具强促细胞生长作用且毒性低，可以作为灼伤，

图 1-1

10	20	30	40	50	60	
GCCAGATTAGCGGACGGTGCCCGGGTTGCAACGGGATCCGGGGCGCTGCAGCTTGGGA						60
GGCGGCTCTCCACAGGCGGTCCGGGAGACAACCATCCGTGAACCCAGGTCCCGGGC						120
CGCCGGCTCGCCGGCACACAGGGCCGGACAGAGCGGCGGAGCGGCTCGAGGCT						180
GGGGACCCGGCGGCGGCTGCCGGGCGGAGGCTGGGGGCGGGGGCGGCGC						240
TGCCCGGAGCGGGTCGGAGGCCGGGCGGGGACGGGGCTCCCCGGCGGGC						300
			-9			
			MetAlaAlaGlySerIleThr			
TCCAGGGCTCGGGGATCCCGGGCCCGGACCATGGCAGCCGGAGCATCACC						360
			1			
ThrLeuProAlaLeuProGluAspGlyGlySerGlyAlaPheProProGlyHisPheLys						
ACGTGCCCGCCTTGCCCGAGGATGGCGGACGGGCGCTTCCCGCCGGCCACTTCAAG						420
			20			
AspProLysArgLeuTyrCysLysAsnGlyGlyPhePheLeuArgIleHisProAspGly						
GACCCCAAGCGGCTGTACTGCAAAACGGGGGCTTCTTCTGCGCATCCACCCCGACGGC						480
			40			
ArgValAspGlyValArgGluLysSerAspProHisIleLysLeuGlnLeuGlnAlaGlu						
CGAGTTGACGGGTCGGGAGAGAGCGACCCTCACATCAAGCTACAACACTTCAAGCAGAA						540

图. 1-2

60
GluArgGlyValValSerIleLysGlyValCysAlaAsnArgTyrLeuAlaMetLysGlu
GAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAAGGAGTGTGTGCTAACCGTTACCTGGCTATGAAGGAA 600
80
AspGlyArgLeuLeuAlaSerLysCysValThrAspGluCysPhePheGluArgLeu
GATGGAAGATTACTGGCTTCTAAATGTGTACGGATGAGTGTTCCTTTTGAACGATTG 660
100
GluSerAsnAsnTyrAsnThrTyrArgSerArgLysTyrThrSerTrpTyrValAlaLeu
GAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCAAGGAAATACACCAGTTGGTATGTGGCACTG 720
120
LysArgThrGlyGlnTyrLysLeuGlySerLysThrGlyProGlyGlnLysAlaIleLeu
AAACGAACTGGGCAGTATAAACCTTGGATCCAAACAGGACCTGGGCAGAAAGCTATACTT 780
146
PheLeuProMetSerAlaLysSertrm.
TTTCTTCCAATGTCTGCTAAGAGCTGATTTTAAATGGCCACATCTAATCTCATTTCACATG 840

图. 1-3

AAAGAAGAAGTATATTTTAGAAATTTGTTAATGAGAGTAAAGAAAAIAAAATGTGTATAG
CTCAGTTTGGATAATTGGTCAAACAATTTTTATCCAGTAGTAAAAATATGTACCATTGT
CCCAGTAAAGAAAAAACAACAAGTTGTAATAATGTATATCTCCCTTTTATATTGCATCT
GCTGTTACCCAGTGAAGCTTACCCTAGAGCAATGATCTTTTTACGGCATTTCCTTTATTCG
AAAAGAGGCTTTTAAAATGTGCATGTTTAGAAACAATAATTTCTTCATGGAAATCATCATA
TACATTAGAAAATCACAGTCAGATGTTTAAATCAATCCAAAATGTCCACTATTTCTTATGT
CATTGTTAGTCTACATGTTTCTAAACATAAAATGTGAATTTAATCAATTCCTTTTCATA
GTTTTATAATTCTGGCAGTTCCTTATGATAGAGTTTATAAACACAGTCTGTGTAAACT
GCTGGAAGTTCTCCACAGTCAGGTCAAATTTGTCAAACCTTCTCTGTACCCATACAGC
AGCAGCCTAGCAACTCTGCTGGTGATGGGAGTTGTATTTTCAGTCTTCGCCAGGTCATTG
AGATCCATCCACTCACATCTTAAGCATCTCCGGCAAAAATTTATGGTGAATGAATAT
GGCTTTAGGCGGCAGATGATATACATATCTGACTTCCCAAAGCTCCAGGATTTGTGTGC
TGTTGCCGAATACTCAGGACCGACCTGAATTTCTGATTTTATACCAGTCTTCAAACCT
TCTCGAACCGCTGTCTCCTACGTAAAAAAGAGATGTACAAATCAATAAATTACAC
TTTTAGAAACTGTATCATCAAGATTTTCAGTTAAAGTAGCATTATGTAAAGGCTCAAAA
CATTACCCTAACAAGTAAAGTTTTCAATACAAAATTCCTTGGCCTTGTGGATATCAAGAAA

900
960
1020
1080
1140
1200
1260
1320
1380
1440
1500
1560
1620
1680
1740
1800

图. 1-4

TCCCAAATAATTTCTTACCACCTGTAATTC AAGAAGCTTTTGAAATGCTGAATATTTCT 1860
TTGGCTGCTACTTGGAGGCTTATCTACCTGTACATTTTGGGGTCAGCTCTTTTTAACTT 1920
CTTGTGCTGTTTTTCCCAAAGGTAAAATAATAGATTGAAAAGTTAAAACATTTTGCAT 1980
GGCTGCAGTTCCTTTGTTCTTGAGATAAGATCCCAAAGACTTAGATTTATTTCTTCAA 2040
CACCGAAATGCTGGAGGTGTTGATCAGTTTTCAAGAAACTTGGAAATAAATAATTTTA 2100
TAATTCACAACAAGGTTTTACATTTTATAAGGTTGATTTTTTCAATTAATGCAAAATTTAT 2160
GTGGCAGGATTTTATTGCCATTAAACATAATTTTGTGGCTGCTTTTTCTACACATCCAGA 2220
TGGTCCCCTAACCTGGGCTTTCCTAAATTTTGTGATGTTCTGTGCATTTGTCTCCCAAAGTA 2280
TTTAGGAGAAGCCCTTTAAAAGCTGCCCTCCCTACCACCTTGGCTGAAAGCTTCACAAT 2340
TGTACAGACAAGATTTTGTTCCAATACTCGTTTTTGCCCTCTATTTTACTTGTTTGICA 2400
AATAGTAAATGATAATTTGCCCTTGCAGTAATTTCTACTGGTGAAAACATGCAAGAAGAG 2460
GAAGTCACAGAAACATGTCCTCAATTCCCAATGTGCTGTGACTGTAGACTGCTTACCATAG 2520
ACTGTCCTTACCCCATCCCTGGATAATGCTCTTGTTTTTTCCCTCTAATAGCTATGGAAGA 2580
TGCATAGAAAGAGTATAATGTTTTAAAACATAAGGCATTCGTCGCCATTTTTCAATTAC 2640
ATGCTGACTTCCCTTACAAATGAGATTTGCCCATAGGTTAAACATGGTTAGAAACAACCTG 2700
AAAGCATAAAAGAAAATCTAGGCCGGGTGCAGTGGCTCATGCCCATATTCCTGCACCTT 2760
TGGGAGGCCAAAGCAGGAGGATCGCTTGAGCCCAGGAGTTCAAGACCACCTGGTGAAC 2820

图 1-5

CCCGTCCTACAAAACACAAAAATAGCCAGGCATGGTGGGTGTACATGTGGTCTC 2880
 AGTACTTGGGAGGCTGAGGTGGAGGGTTGATCACTTGAGGCTGAGAGGTCAAGGTTAC 2940
 AGTGAGCCATAATCGTGCCACTGCAGTCCAGCTAGGCAACAGAGTGAGACTTTGTCTCA 3000
 AAAAAAGAGAAATTTCCCTTAATAAGAAAAGTAAATTTACTCTGATGTGCAATACATTT 3060
 GTTATTAATTAATTAAGATGGTAGCACCTAGTCTTAAATTTGATATAAAATATCCCCCT 3120
 AACATGTTTAAATGTCCATTTTTATTCAATATGCTTTGAAAAATAATTTATGGGAAATAC 3180
 ATGTTTGTATTAAATTTATTATTAAAGATAGTACTAGTCTTAAATTTGATATAACA 3240
 TCTCCTAACTTGTTAAATGTCCATTTTATTCTTTATGTTTGAATAAATAATTTATGGGA 3300
 TCCTATTTAGCTCTTAGTACCCTAATCAAAGTTCGGCATGTAGCTCATGATCTATGCT 3360
 GTTCTATGTCGTGGAGCACCCGGATGGGGTAGTGAGCAAATCTGCCCTGCTCAGCAGT 3420
 CACCATAGCAGCTGACTGAAAATCAGCACCTGCCCTGAGTAGTTTGTATCAGTTTAACTTGA 3480
 ATCACTAACTGACTGAAAATTTGAATGGGCAATAAGTGCITTTGTCTCCAGAGTATGCCGG 3540
 GAGACCCCTTCCACCTCAAGATGGATAATTTCTCCCAAGGATTTCAAGATGAATTGAAAT 3600
 TTTTAAACAAGATAGTGTGCTTTATTCTGTTGTATTTTATTATTTAATAATACTGTAA 3660
 GCCAAACTGAAATAACATTTGCTGTTTTATAGGTTTGAAGACATAGGAAACCTAAGAGG 3720
 TTTTGTTTTATTTTGTGATGAGAGATATGTTTAAATACCTGTTGTATTGTTTGTTT 3780
 AGTTACAGGACAATAATGAAATGGAGTTTATATTGTTATTTCTATTTTGTATATTTTAA 3840
 TAATAGAAATTAGATTGAAATAAAATAATGGGAAAT(A)_n

图. 2

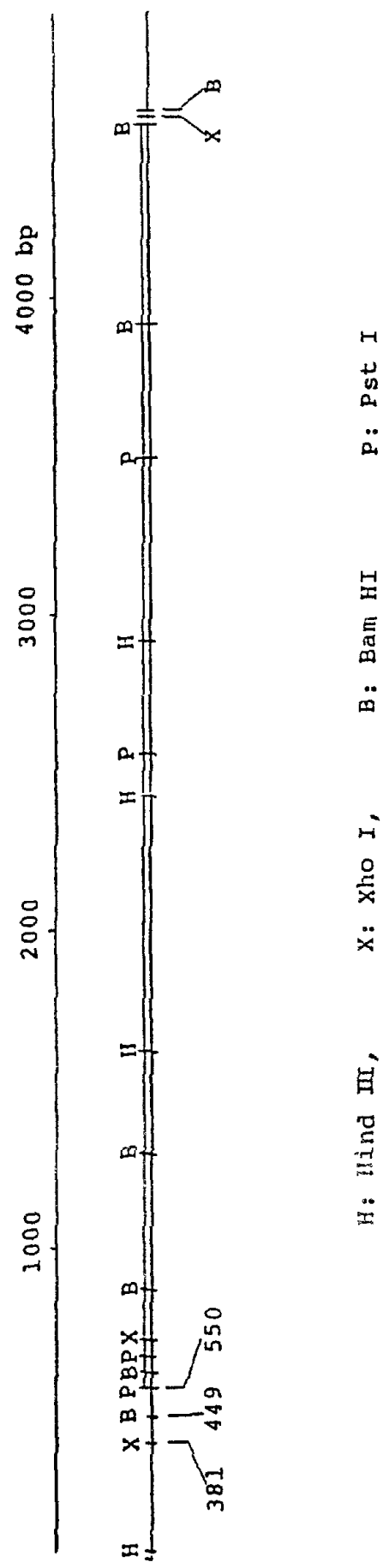


图 3

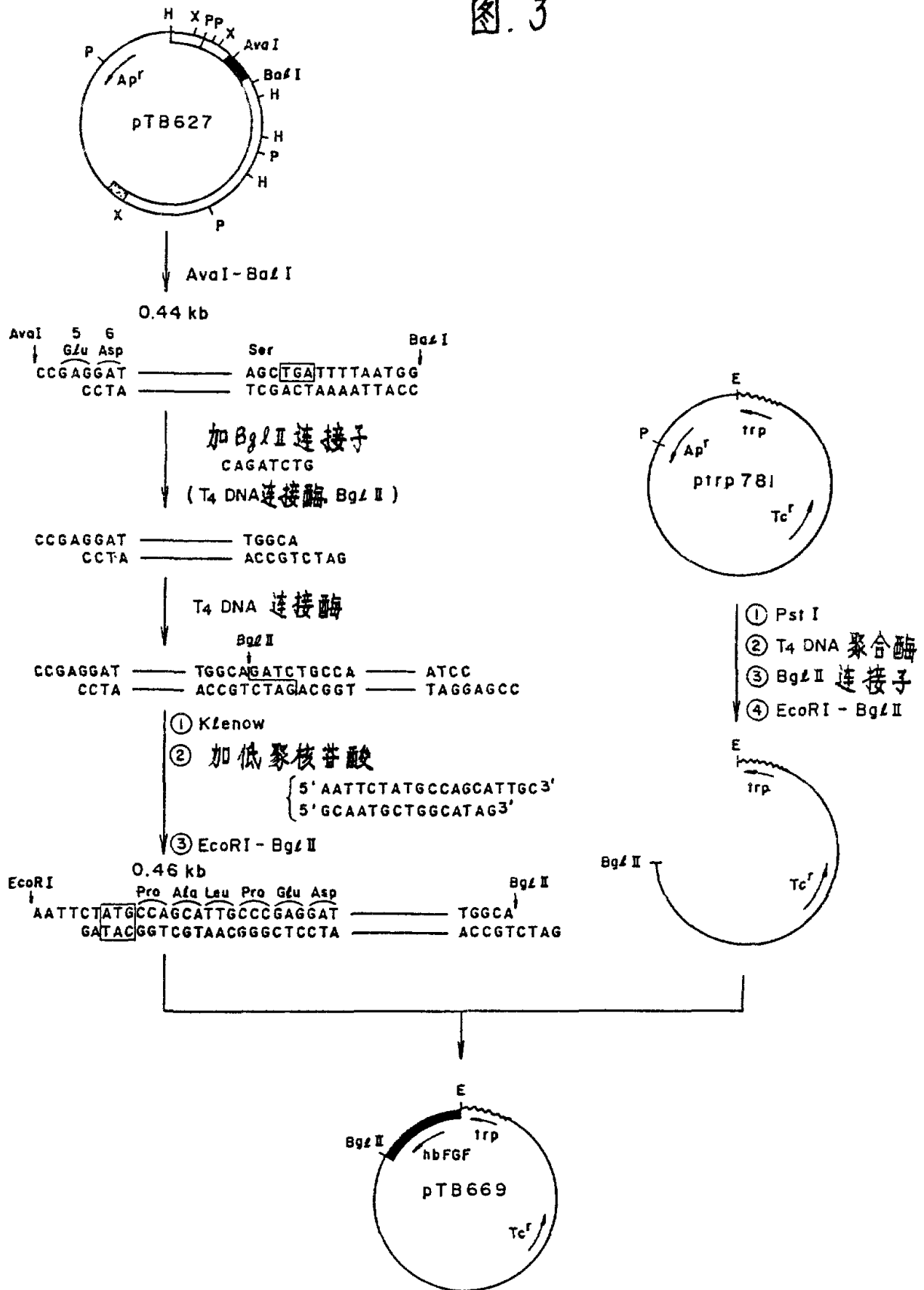


图. 4

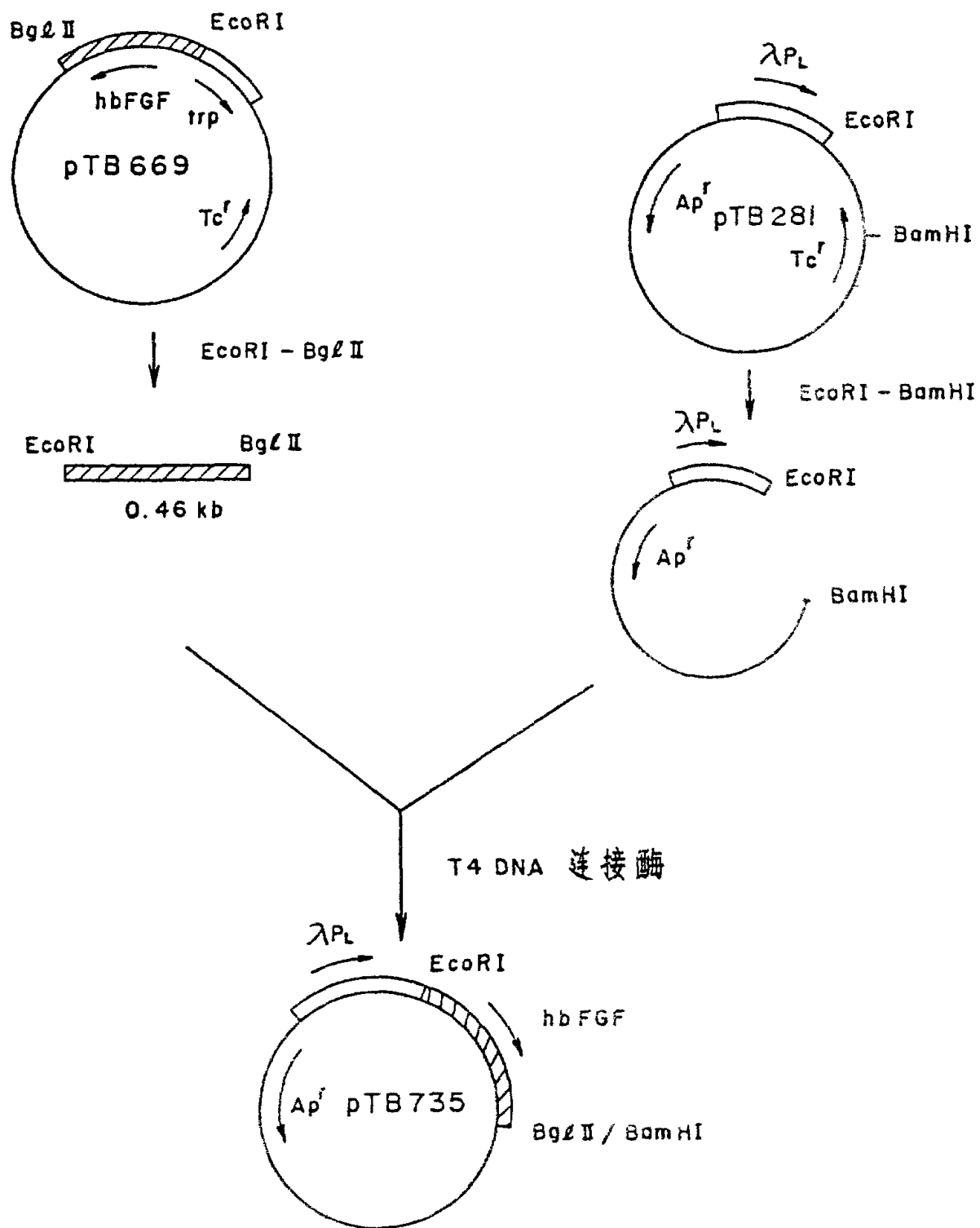


图. 5

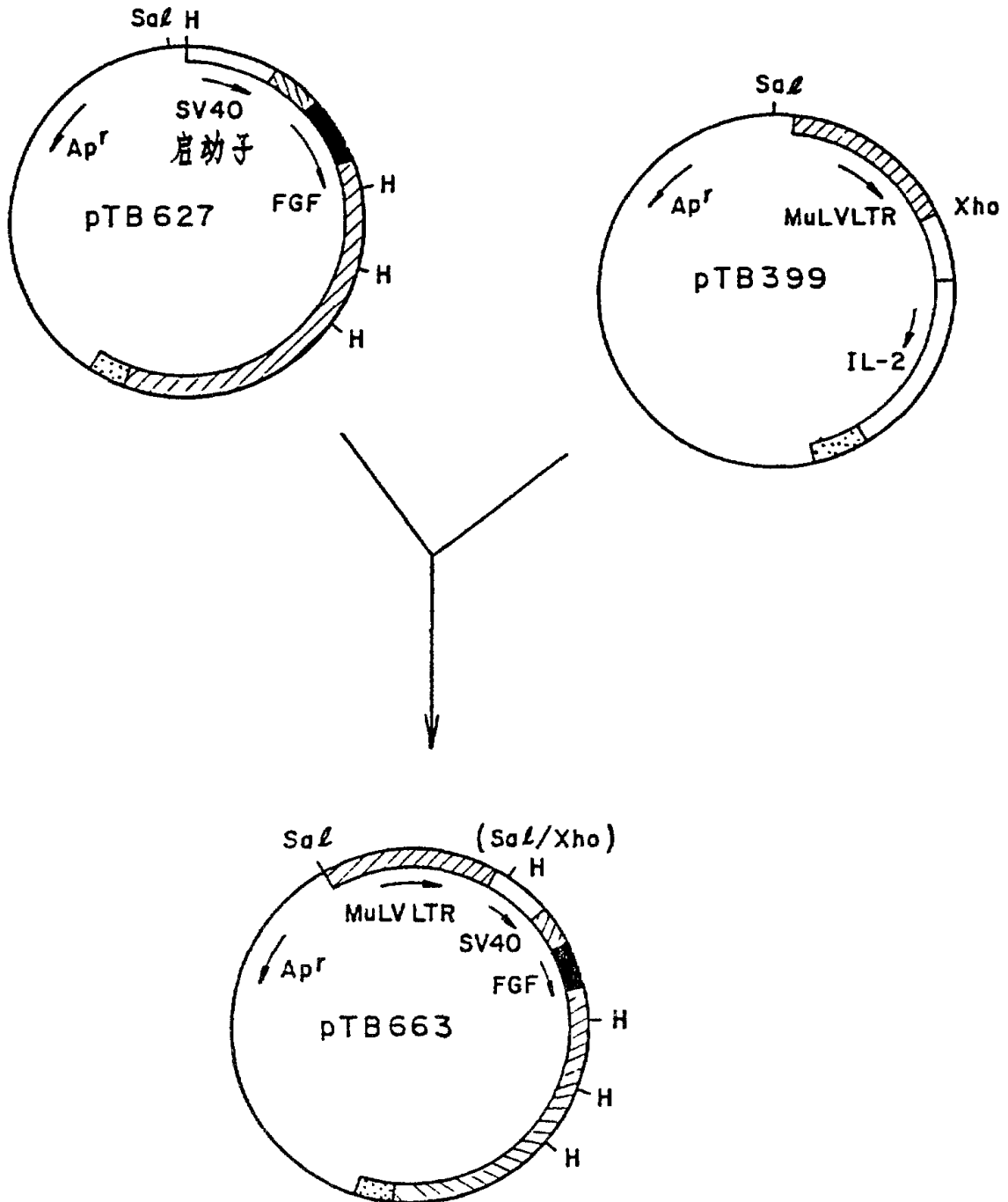


图. 6

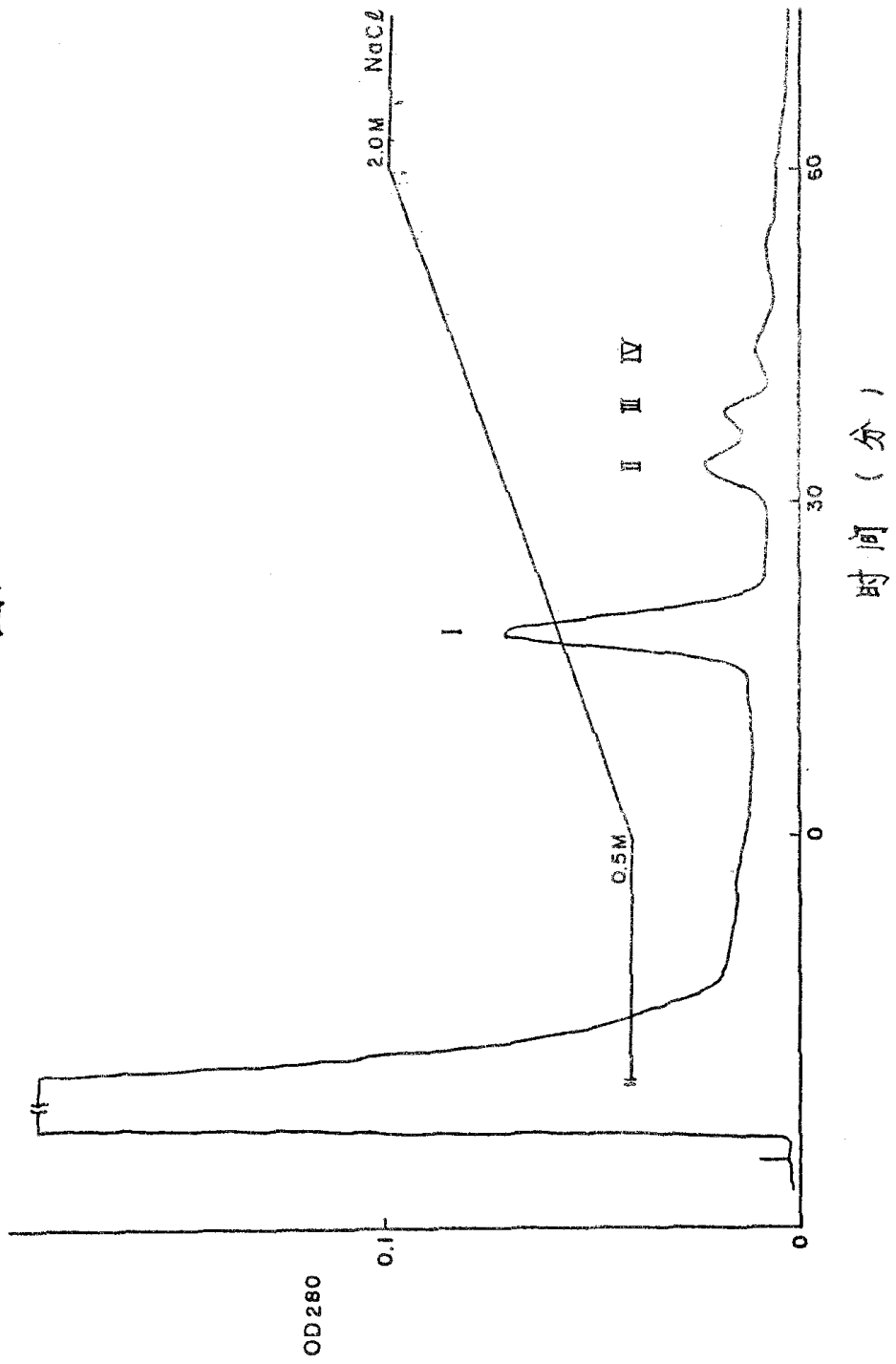


图. 7

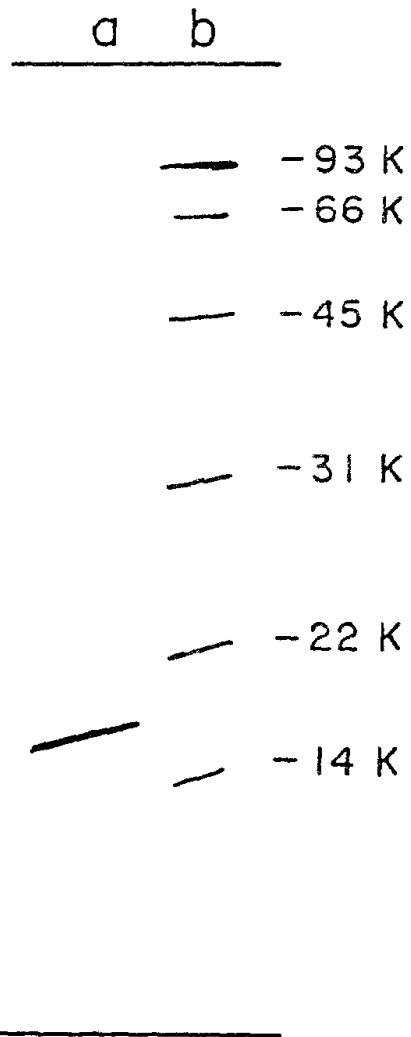


图. 8

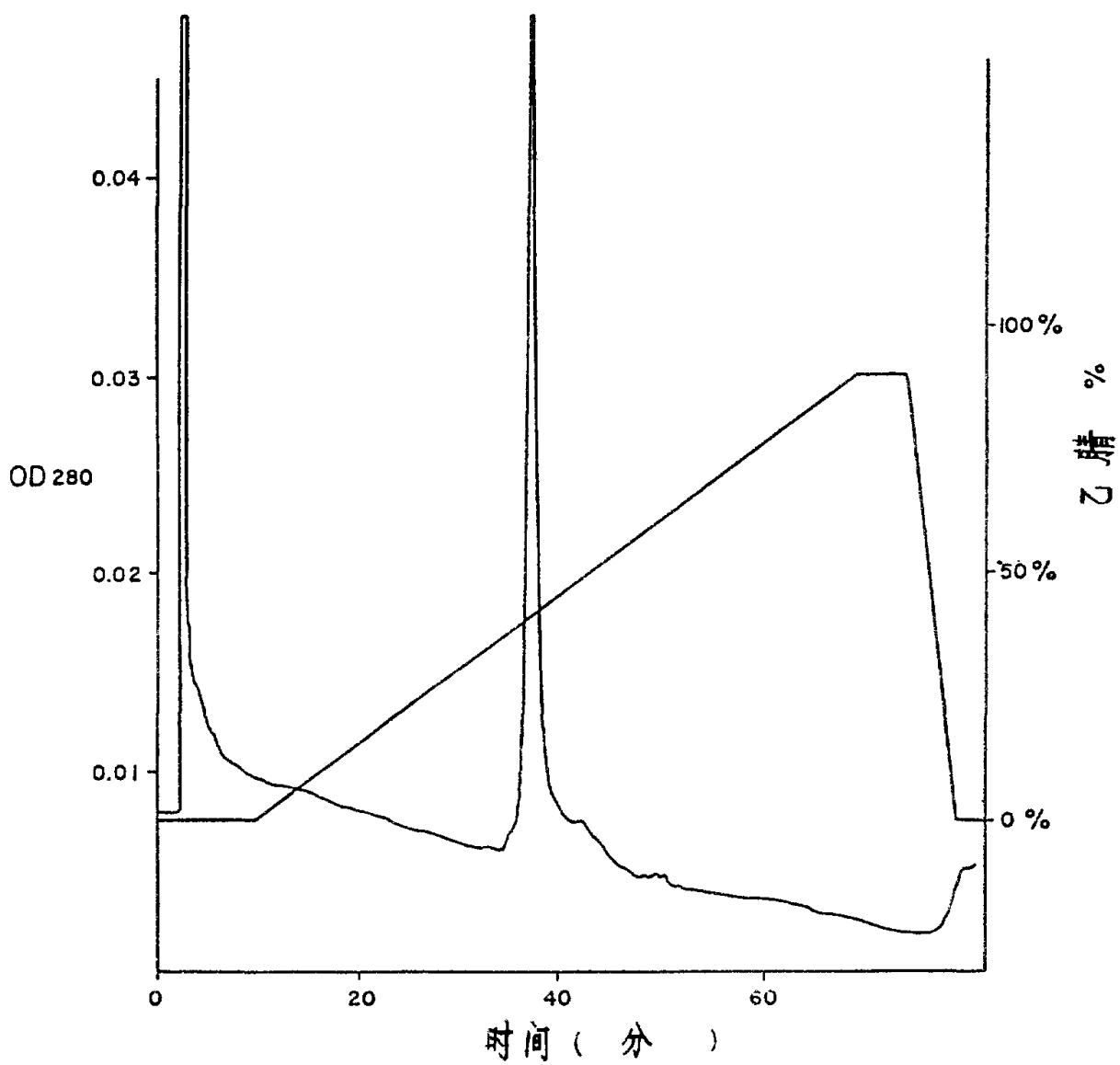


图. 9

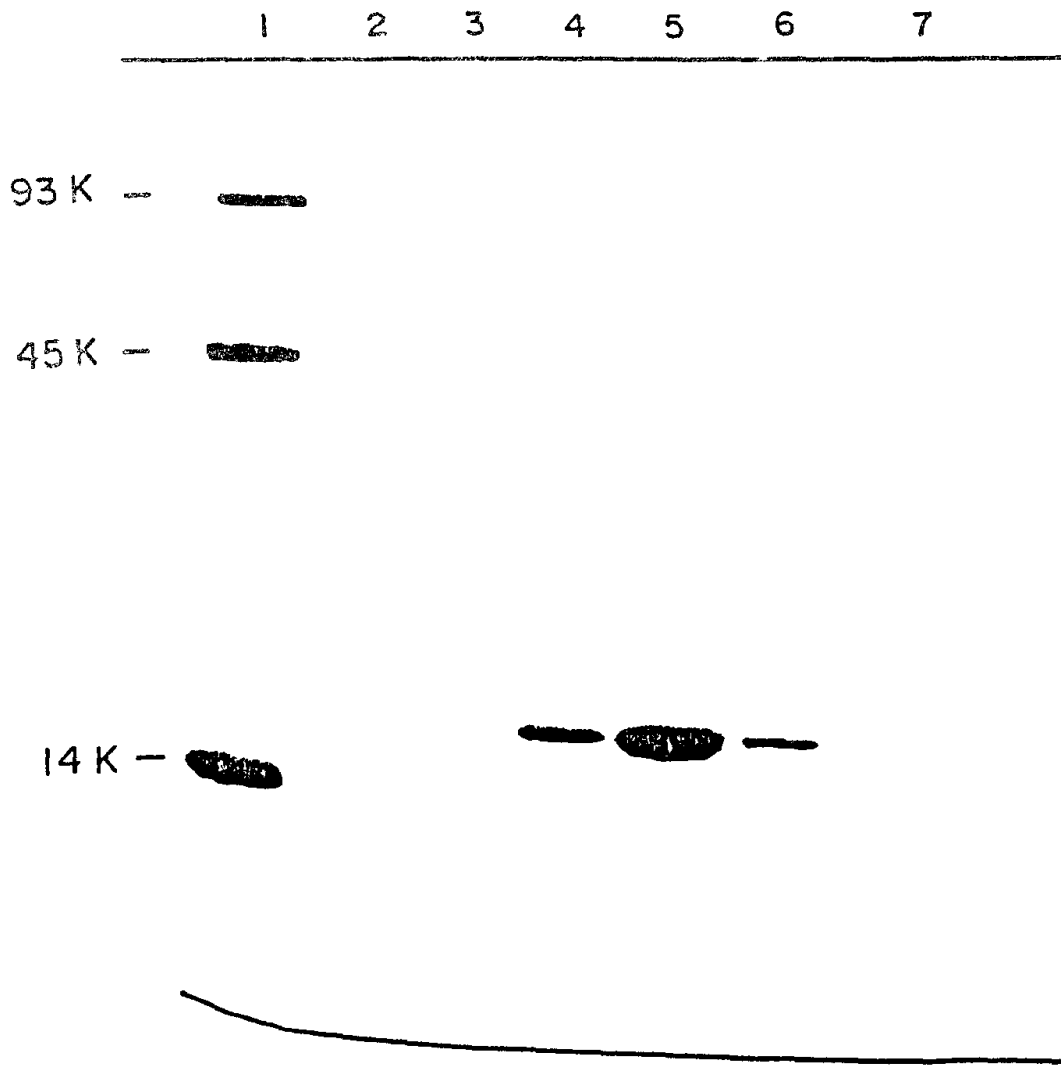


图. 10

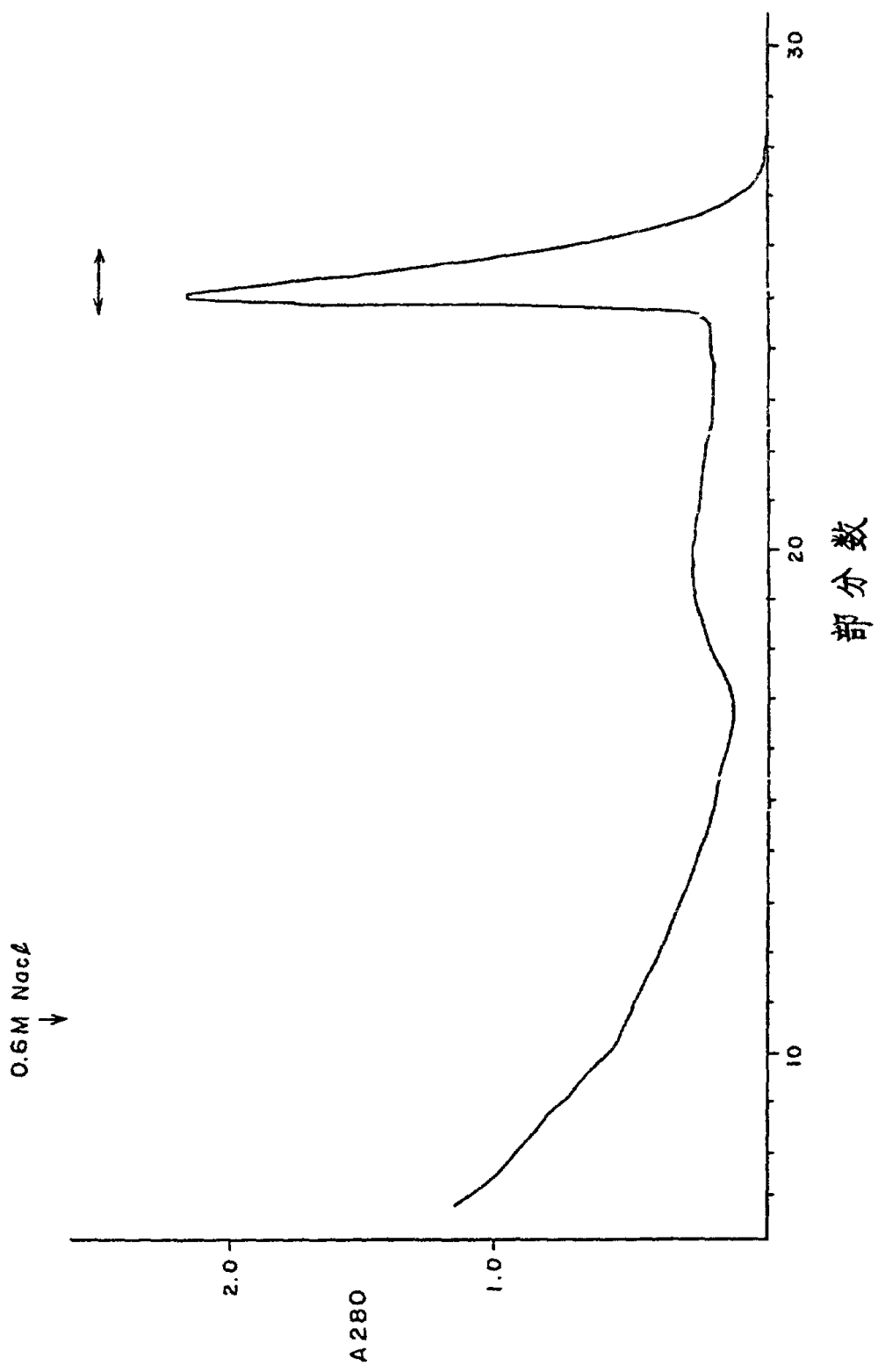


图. 11

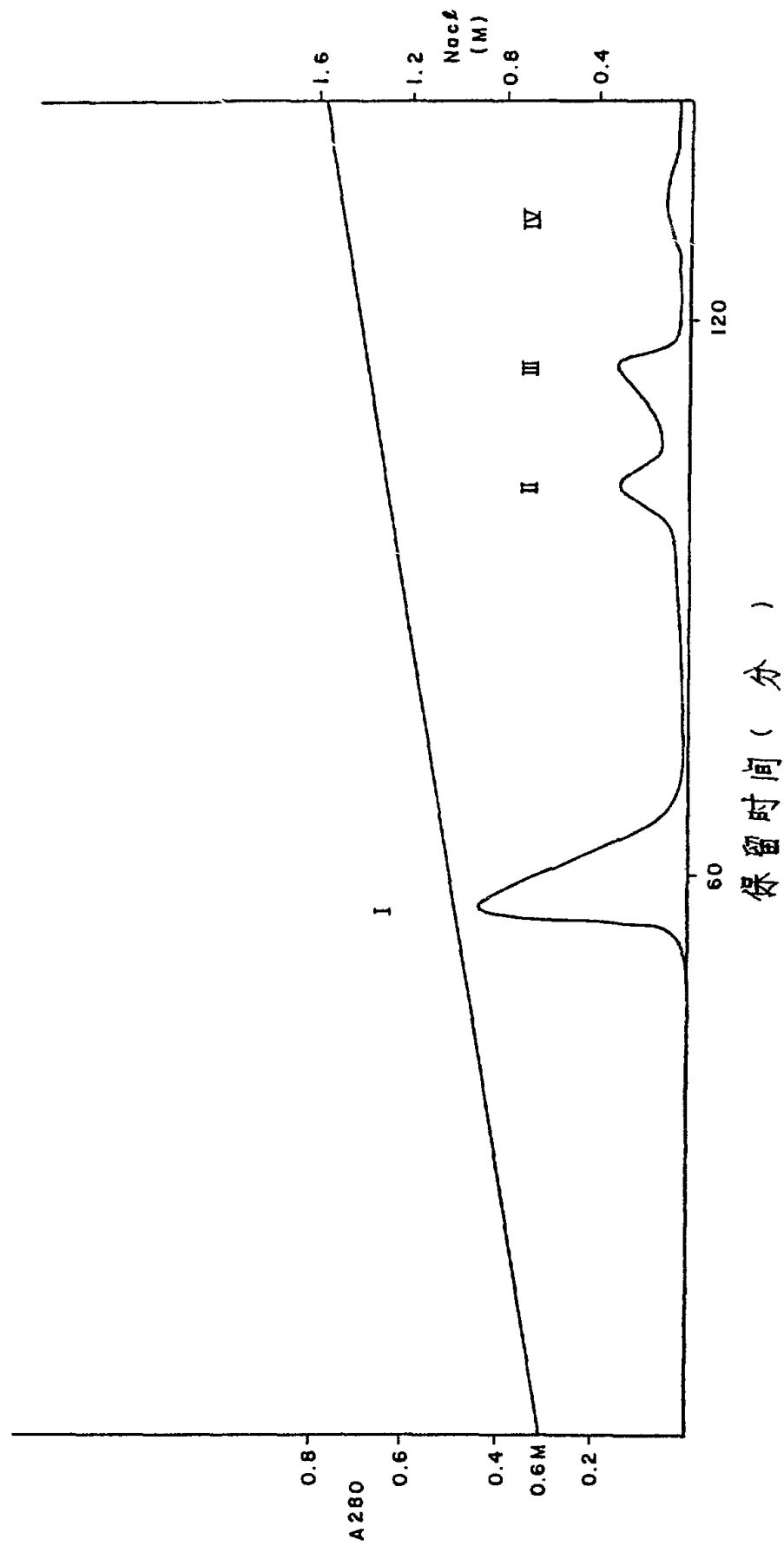


图. 12

