(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108779157 B
(45)授权公告日 2022.12.30

(21)申请号 201780018244.4
(22)申请日 2017.03.17
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108779157 A
(43)申请公布日 2018.11.09
(30)优先权数据
PA201670158 2016.03.18 DK
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/056436 2017.03.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/158181 EN 2017.09.21
(73)专利权人 卫士医疗国际公司
地址 瑞典斯德哥尔摩
(72)发明人 勒纳·韦斯特·罗森洛夫
安纳莉·爱德斯特罗姆·黑格尔瓦尔
布·阿克尔斯特罗姆
(74)专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有限公司 37101
专利代理师 阎斌斌 刘丹丹
(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
(56)对比文件
WO 2014047490 A1,2014.03.27
WO 2010006809 A2,2010.01.21
审查员 袁一方

权利要求书2页 说明书76页
序列表69页 附图21页

(54)发明名称

新α-1-微球蛋白衍生蛋白及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种用于医疗应用的α-1-微球蛋白衍生蛋白。

CN 108779157 B

1.一种α-1-微球蛋白衍生蛋白,其氨基酸序列为如下式I:

X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-GPVPTPPDNIQVQENF-X^{15}-ISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKI-X^{16}-DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTST-X^{17}-WRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKW-X^{18}-ITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR(SEQ ID NO : 10),

其中:

X^1是Met或N-甲酰基Met,

X^2、X^3、X^4、X^5、X^6、X^7是His

X^8和X^9不存在,

X^{10}、X^{11}、X^{12}和X^{13}是Asp,

X^{14} is Lys;

X^1是Met或N-甲酰基Met,

X^2、X^3、X^4、X^5、X^6、X^7、X^8和X^9是His

X^{10}、X^{11}、X^{12}和X^{13}是Asp,

X^{14}是Lys;

或

X^1是Met

X^2、X^3、X^4、X^5、X^6、X^7、X^8、X^9、X^{10}、X^{11}、X^{12}、X^{13}和X^{14}不存在;

且其中:

X^{15}代表Asp;

X^{16}代表Met或Lys;

X^{17}代表Arg或His;

X^{18}代表Asp;

其中如果X^{16}代表Lys,则X^{17}不能代表His,

或其药学上可接受的盐,其中所述α-1-微球蛋白衍生蛋白具有与人野生型α-1-微球蛋白(SEQ ID NO : 1)相比提高的热稳定性。

2.根据权利要求1所述的α-1-微球蛋白衍生蛋白,其中

X^1为Met

X^2、X^3、X^4、X^5、X^6、X^7、X^8、X^9、X^{10}、X^{11}、X^{12}、X^{13}和X^{14}不存在

X^{15}为Asp,

X^{16}为Met,

X^{17}为His,且

X^{18}为Asp。

3.根据权利要求2所述的α-1-微球蛋白衍生蛋白,其氨基酸序列由SEQ ID NO : 3组成。

4.根据权利要求1所述的α-1-微球蛋白衍生蛋白,其中

X^1为Met或N-甲酰基Met,

X^2、X^3、X^4、X^5、X^6、X^7为His

X^8和X^9不存在,

X^{10}、X^{11}、X^{12}和X^{13}为Asp，

X^{14}为Lys，

X^{15}为Asp，

X^{16}为Met，

X^{17}为His，且

X^{18}为Asp。

5.根据权利要求4所述的α-1-微球蛋白衍生蛋白，其氨基酸序列由SEQ ID NO : 5组成。

6.根据权利要求1所述的α-1-微球蛋白衍生蛋白，其中

X^{1}为Met或N-甲酰基Met，

X^{2}、X^{3}、X^{4}、X^{5}、X^{6}、X^{7}、X^{8}和X^{9}为His

X^{10}、X^{11}、X^{12}和X^{13}为Asp，

X^{14}为Lys，

X^{15}为Asp，

X^{16}为Met，

X^{17}为His，且

X^{18}为Asp。

7.根据权利要求6所述的α-1-微球蛋白衍生蛋白，其氨基酸序列由SEQ ID NO : 7组成。

8.一种药物组合物，其包含根据权利要求1-7中任一项所述的α-1-微球蛋白衍生蛋白和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

9.根据权利要求1-7中任一项所述的α-1-微球蛋白衍生蛋白在制备用于治疗疾病的药物中的用途。

新α-1-微球蛋白衍生蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及具有改善特性的人α-1-微球蛋白蛋白质的修饰的变体，以及这些变体在医学治疗和诊断中的应用。发明人惊讶地发现，引入特定的氨基酸取代和/或添加特定的N端延伸(N-terminal extension)会在稳定性、溶解性、以及与血红素的结合这些方面赋予α-1-微球蛋白改善的特性。

背景技术

[0002] A1M(α_1-微球蛋白)是具有胞外组织清洁功能的低分子量蛋白(Ekström等人，1977；Åkerström和Gram，2014)。它存在于鱼类、鸟类、啮齿类、哺乳动物和其他脊椎动物的所有组织和器官中。A1M主要在肝脏中合成，但也以更低的速率在身体的大部分其他细胞中合成。它由α_1-微球蛋白-bikunin前体基因(AMBP)编码，并在所有细胞和物种中翻译为与另一种蛋白bikunin一起的连续肽前体(Kaumeyer等人，1986)。但是，两种蛋白通过蛋白酶切割分离，加工，并作为具有不同功能的两种不同蛋白分泌到血液中(Lindqvist等人，1992；Bratt等人，1993)。普遍存在的A1M和bikunin的共合成的原因仍然是未知的。在血液中，约50％的A1M以游离的单体形式存在，剩余的50％以与免疫球蛋白A、白蛋白和凝血酶原共价结合的高分子量络合物存在(Berggård等人，1997)。

[0003] A1M是单结构域的183-氨基酸的糖基化蛋白。最近公布了大肠杆菌中表达的A1M的巨大片段的晶体结构(Meining和Skerra，2012)。基于其结构，A1M属于脂质运载蛋白家族，具有50个或更多个成员，来自动物、植物和细菌(Flower，1996；Åkerström等人，2006)。脂质运载蛋白具有一个共同的三维结构，其由8条反平行的β链组成，形成具有一个封闭端(底部)和一个敞开端(顶部)的桶。该桶在大部分脂质运载蛋白中充当疏水性配体的口袋。组成该桶敞开端边沿的4条环(环1-4)在各种脂质运载蛋白之间的长度变化和组成变化很大。在A1M中，位于这些环上或者位于该桶内侧的少量氨基酸侧基团已经显示对于该蛋白确定的功能是重要的。因此，位于环1短螺旋上游离的半胱氨酸C34具有负还原电势，并赋予A1M还原酶特性(Allhorn等人，2005)。两个酪氨酸残基Y22和132显示被自由基氧化产物体外共价修饰(Åkerström等人，2007)。4个赖氨酸残基K69、92、118和130调节还原酶活性(Allhorn等人，2005)，影响与游离血红素基团的结合(Rutardottir等人，2015)，并在从具有低分子量黄棕色不均匀物质的人尿和羊水纯化的A1M上共价修饰(Berggård等人，1999；Sala等人，2004)。

[0004] 采用还原酶活性、自由基清除特性和血红素结合特性，A1M充当保护细胞和组织免受氧化性损害的抗氧化剂。A1M显示会保护体外血细胞培养物、胎盘组织和皮肤免受血红蛋白、血红素和活性氧物质(ROS)的氧化性损害(Olsson等人，2008；May等人，2011；Olsson等人，PloS One 2011；Olsson等人，ARS2012)。A1M还在大鼠和兔中显示出在输注血红蛋白之后针对胎盘和肾脏组织损伤的体内保护作用(Sverrison等人，2014；Nääv等人，2015)。在一系列报道中，显示血红蛋白和氧化应激参与先兆子痫(一种严重的妊娠并发症)的发病机

理(Centlow等人,2008;Hansson等人,2013),并且肝脏、胎盘和血浆中的A1M-mRNA水平和蛋白水平在患有先兆子痫的孕妇中升高(Olsson等人,2010;Anderson等人,2011)。因此,建议可使用A1M作为治疗剂来治疗患有先兆子痫的孕妇以缓解氧化性损害,并因此缓解该疾病的临床症状(Olsson等人,2010)。

[0005] 在大肠杆菌中开发了一种重组人A1M的产生方法,并显示具有还原酶特性、自由基结合特性和血红素结合特性(Kwasek等人,Allhorn等人,2002;2005;Åkerström 等人,2007)。该重组A1M变体在先兆子痫绵羊模型中确实显示出体内治疗效果(Wester-Rosenlöf 等人,2014)。然而,尽管会起作用,但是大肠杆菌表达的重组A1M缺乏糖基化,并且与从尿或血浆纯化的人A1M相比具有差的溶解性和稳定性。蛋白缺乏稳定性和溶解性会限制其作为用于人类使用的药物的应用,这主要是由于难以获得高度浓缩的溶液和在生理pH和盐条件下的缓冲液中长期储存的条件。

[0006] 因此,需要开发与人A1M结构类似、但是在稳定性和溶解性上具有改善的特性的蛋白。另外,该蛋白应该相对容易以适合医疗应用的量制备。

具体实施方式

[0007] 本发明涉及新的α-1-微球蛋白,其具有改善的稳定性和溶解性。

[0008] 使用定点诱变和加成诱变来工程化A1M-物质,其具有保留的或者可能增强的功能特性,但是具有改善的蛋白稳定性和溶解性,其容许在生理缓冲液中在高浓度下长期储存。

[0009] 从本文的各实例可以看出,在选择突变的氨基酸侧基团的位置和标识时遵循四条推理路线:

[0010] 1)在氧化应激、温度、氧压方面具有不同的预期环境压力的各种物种的动物同源物被表达(N=12);

[0011] 2)在位于疏水性口袋的环1-4或内表面的位置处的56个依次排列的A1M-同源物中频繁发生的单氨基酸取代被引入人类基因构建体中并进行表达(N=3);以及

[0012] 3)对位于有利位置的赖氨酰基或酪氨酸基残基进行添加或去除,这是基于它们可影响C35硫醇基的pKa(Allhorn等人,2005)或充当自由基捕获位点(Berggård 等人,1999;Sala等人,2004;Åkerström 等人2007)的假设(N=5);4).

[0013] 另外,N端带电荷的亲水性延伸的影响在一些A1M变体上进行了测试。所测试的N端延伸的设计所依据的基本原理是添加:1)用于进行纯化的标记(标签,tag)(例如His-标记),2)接头,以便将标记与A1M蛋白核心分离,3)几个(1-5个)带电荷的氨基酸侧基团,它们赋予蛋白亲水性特性以便在水溶液中获得最大的稳定性和溶解性,4)不损害A1M的生理功能。

[0014] 该项目分为3个主要的阶段:

[0015] I期)对以上27种A1M变体进行表达,接着对溶解性、稳定性和功能进行分析;

[0016] II期)基于1期的结果对具有预期最佳特性的几种A1M变体进行设计、表达和分析;以及

[0017] III期)对未突变的野生型(wt)-A1M以及具有或者不具有N端带电荷的亲水性延伸的突变最成功的A1M变体进行设计、表达和分析。

[0018] 如在此处将更详细地进行解释的，本发明提供A1M衍生的蛋白，其具有式I氨基酸序列：

[0019] X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-GPVPTPPDNIQVQENF-X^{15}-ISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKI-X^{16}-DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTST-X^{17}-WRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKW-X^{18}-ITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR(式I)

[0020] 其中至少存在一个X并且(在括号中是进一步取代的建议)

[0021] X^1不存在或者代表Met或N-甲酰基Met；

[0022] X^2不存在或者代表His；

[0023] X^3不存在或者代表His；

[0024] X^4不存在或者代表His；

[0025] X^5不存在或者代表His；

[0026] X^6不存在或者代表His；

[0027] X^7不存在或者代表His；

[0028] X^8不存在或者代表His；

[0029] X^9不存在或者代表His；

[0030] X^{10}不存在或者选自Asp和Glu、Lys和Arg；

[0031] X^{11}不存在或者选自Asp和Glu、Lys和Arg；

[0032] X^{12}不存在或者选自Asp和Glu、Lys和Arg；

[0033] X^{13}不存在或者选自Asp和Glu、Lys和Arg；

[0034] X^{14}不存在或者代表Lys、Glu、Asp或Arg或者Met或N-甲酰基Met；

[0035] X^{15}代表Asp或Asn或Glu；

[0036] X^{16}代表Met或Lys或Arg；

[0037] X^{17}代表Arg或His或Lys；

[0038] X^{18}代表Asp或Asn或Glu；

[0039] 或其药学上可接受的盐，

[0040] 条件是当所有X^1-X^{14}都不存在，X^{15}代表Asn，X^{16}代表Met，并且X^{17}代表Arg时，那么X^{18}不能代表Asn。

[0041] 本发明还提供一种A1M的衍生物，即X^1-X^{14}-A1M，其中A1M可以是从表2(即人类、小鼠、裸鼹鼠、青蛙、鸡、兔、松鼠猴、海象、海牛、比目鱼和猩猩)所列物种获得的任何A1M。本发明发明人发现，包括X^1-X^{14}至少赋予人A1M改善的特性，因此可以设想，该起始序列也可能会赋予其他物种的A1M或者物种重组的A1M重要的改善特性。

[0042] 本发明还提供一种A1M衍生的蛋白，其具有式II氨基酸序列：

[0043] X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}-X^{11}-X^{12}-X^{13}-X^{14}-GPVPTPPDNIQVQENF-X^{15}-ISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKI-X^{16}-DRMTVSTLVLGEGATEAEISMTST-X^{17}-WRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKW-X^{18}-ITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPI(式II)

[0044] 其中至少存在一个X并且(在括号中是进一步取代的建议)

[0045] X^1不存在或者代表Met或N-甲酰基Met；

[0046] X^2不存在或者代表His；

[0047] X^3不存在或者代表His；

[0048] X^4不存在或者代表His；

[0049] X^5不存在或者代表His；

[0050] X^6不存在或者代表His；

[0051] X^7不存在或者代表His；

[0052] X^8不存在或者代表His；

[0053] X^9不存在或者代表His；

[0054] X^{10}不存在或者选自Asp和Glu、Lys和Arg；

[0055] X^{11}不存在或者选自Asp和Glu、Lys和Arg；

[0056] X^{12}不存在或者选自Asp和Glu、Lys和Arg；

[0057] X^{13}不存在或者选自Asp和Glu、Lys和Arg；

[0058] X^{14}不存在或者代表Lys或Glu、Asp或Arg或者Met或N-甲酰基Met；

[0059] X^{15}代表Asp或Asn或Glu；

[0060] X^{16}代表Met或Lys或Arg；

[0061] X^{17}代表Arg或His或Lys；

[0062] X^{18}代表Asp或Asn或Glu；

[0063] 或其药学上可接受的盐，

[0064] 条件是当所有X^1-X^{14}都不存在，X^{15}代表Asn，X^{16}代表Met，并且X^{17}代表Arg时，那么X^{18}不能代表Asn。

[0065] 本发明还提供一种A1M的衍生物，即X^1-X^{14}-A1M，其中A1M可以是从表2(即人类、小鼠、裸鼹鼠、青蛙、鸡、兔、松鼠猴、海象、海牛、比目鱼和猩猩)所列物种获得的任何A1M，其中A1M在C端被截短，以便C端四肽序列LIPR不会形成蛋白的一部分。

[0066] 从本文中的各实例可以看出，本发明发明人发现：

[0067] i)初始序列X^1-X^{14}似乎会赋予A1M改善的特性，

[0068] ii)A1M分子的点突变M41K、R66H或N17,96D会赋予改善的稳定性，并保持A1M的功能，

[0069] iii)突变(M41K+R66H)、(M41K+N17,96D)、(R66H+N17,96D)和/或(M41K+R66H+N17,96D)显示增加的溶解性和/或稳定性，并保持功能，

[0070] iv)突变(R66H+N17,96D)在所进行的实验中具有最佳的总体性能，

[0071] v)对具有突变(R66H+N17,96D)并具有初始序列MHHHHHHHHHGGGGGIEGR(M8H5GIEGR)、MHHHHHHHHDDDDK(M8H4DK)、MHHHHHHDDDDK(M6H4DK)或MHHHHHHHH(M8H)作为N端序列的A1M进行了测试，具有M8H4DK作为N端序列的蛋白变体与其他N端延伸相比显示出更高的溶解性和/或稳定性。

[0072] vi)将A1M的C端截短似乎会赋予改善的血红素结合和降解。

[0073] 值得注意的是，该N端延伸序列与具有肠激酶切割位点的His-标记类似，但是由于未包括氨基酸Ala，因此它没有将His-标记从A1M切割的能力。DDDKA中存在Ala表明肠激酶切割位点。因此可以设想，当接着重复的His-残基之后是5个带有电荷的氨基酸时，N端序列本身会赋予A1M改善的蛋白稳定性和溶解性特性。

[0074] 基于这些观察结果，可以设想A1M蛋白沿以上所示线路的变化会为蛋白提供A1M功能，但在稳定性和/或溶解性方面具有改善的特征。

[0075] 因此，本发明涉及如上的含有X^1-X^{18}的A1M的所有可能组合。

[0076] 更具体地，以下A1M衍生的蛋白在本发明的范围内，以便所有蛋白可全长都对应于人野生型A1M；或者可以是截短的C端，即无LIPR：

[0077]

标记	hA1M 突变中的位置	化合物	X1	X2	X3	X4
最宽的主张		1	Met/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在
6-His	'顺次（in sequence）'突变可以是任何位置	2	(甲酰基)Met	His	His	His
8-His	顺次'突变可以是任何位置	3	(甲酰基)Met	His	His	His
无标记；	顺次'突变可以是任何位置	4	不存在	不存在	不存在	不存在
任何标记	**M41K**	5	Met/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在
任何标记	**N17,96D**	6	Met/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在
无标记	**N17D**	7	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D**	8	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N96D**	9	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，R66H**	10	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K**	11	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**R66H**	12	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，M41K，R66H**	13	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17D，R66H**	14	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**R66H，N96D**	15	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，R66H**	16	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，M41K**	17	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17D，M41K**	18	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，N96D**	19	不存在	不存在	不存在	不存在
任何标记	**N17,96D，R66H**	20	Met/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在
无标记	**N17D，M41K，R66H**	21	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，R66H，N96D**	22	不存在	不存在	不存在	不存在
6 His	**N17D**	23	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**N17,96D**	24	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**N96D**	25	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**N17,96D，R66H**	26	(甲酰基)Met	His	His	His

标记	hA1M 突变中的位置	化合物	X1	X2	X3	X4
6 His	**M41K**	27	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**R66H**	28	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**N17,96D，M41K，R66H**	29	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**N17D，R66H**	30	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**R66H，N96D**	31	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**M41K，R66H**	32	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**N17,96D，M41K**	33	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**N17D，M41K**	34	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**M41K，N96D**	35	(甲酰基)Met	His	His	His
6 His	**N17D，M41K，R66H**	36	(甲酰基)Met	His	His	His

[0078]

6 His	**M41K，R66H，N96D**	37	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N17D**	38	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N17,96D**	39	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N96D**	40	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N17,96D，R66H**	41	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**M41K**	42	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**R66H**	43	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N17,96D，M41K，R66H**	44	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N17D，R66H**	45	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**R66H，N96D**	46	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**M41K，R66H**	47	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N17,96D，M41K**	48	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N17D，M41K**	49	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**M41K，N96D**	50	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**N17D，M41K，R66H**	51	(甲酰基)Met	His	His	His
8 His	**M41K，R66H，N96D**	52	(甲酰基)Met	His	His	His

[0079]

标记	hA1M 突变中的位置	续化合物	N 端'标记' X5	X6	X7	X8	X9	X10
最宽的主张		1	His/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg
6-His	'顺次'突变可以是任何位置	2	His	His	His	不存在	不存在	Asp
8-His	顺次'突变可以是任何位置	3	His	His	His	His	His	Asp
无标记；	顺次'突变可以是任何位置	4	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
任何标记	**M41K**	5	His/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg
任何标记	**N17,96D**	6	His/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg
无标记	**N17D**	7	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D**	8	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N96D**	9	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，R66H**	10	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K**	11	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**R66H**	12	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，M41K，R66H**	13	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17D，R66H**	14	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**R66H，N96D**	15	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，R66H**	16	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，M41K**	17	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17D，M41K**	18	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，N96D**	19	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
任何标记	**N17,96D，R66H**	20	His/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在	His/不存在	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg
无标记	**N17D，M41K，R66H**	21	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，R66H，N96D**	22	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在	不存在
6 His	**N17D**	23	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**N17,96D**	24	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**N96D**	25	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**N17,96D，R66H**	26	His	His	His	不存在	不存在	Asp

[0080]

标记	hA1M 突变中的位置	续化合物	N 端'标记' X5	X6	X7	X8	X9	X10
6 His	**M41K**	27	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**R66H**	28	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**N17,96D，M41K，R66H**	29	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**N17D，R66H**	30	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**R66H，N96D**	31	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**M41K，R66H**	32	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**N17,96D，M41K**	33	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**N17D，M41K**	34	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**M41K，N96D**	35	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**N17D，M41K，R66H**	36	His	His	His	不存在	不存在	Asp
6 His	**M41K，R66H，N96D**	37	His	His	His	不存在	不存在	Asp
8 His	**N17D**	38	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**N17,96D**	39	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**N96D**	40	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**N17,96D，R66H**	41	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**M41K**	42	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**R66H**	43	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**N17,96D，M41K，R66H**	44	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**N17D，R66H**	45	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**R66H，N96D**	46	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**M41K，R66H**	47	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**N17,96D，M41K**	48	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**N17D，M41K**	49	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**M41K，N96D**	50	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**N17D，M41K，R66H**	51	His	His	His	His	His	Asp
8 His	**M41K，R66H，N96D**	52	His	His	His	His	His	Asp

[0081]

标记	hA1M 突变中的位置	续化合物	X11	X12	X13
最宽的主张		1	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg
6-His	'顺次'突变可以是任何位置	2	Asp	Asp	Asp
8-His	顺次'突变可以是任何位置	3	Asp	Asp	Asp
无标记；	顺次'突变可以是任何位置	4	不存在	不存在	不存在
任何标记	**M41K**	5	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg
任何标记	**N17,96D**	6	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg
无标记	**N17D**	7	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D**	8	不存在	不存在	不存在
无标记	**N96D**	9	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，R66H**	10	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K**	11	不存在	不存在	不存在
无标记	**R66H**	12	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，M41K，R66H**	13	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17D，R66H**	14	不存在	不存在	不存在
无标记	**R66H，N96D**	15	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，R66H**	16	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17,96D，M41K**	17	不存在	不存在	不存在
无标记	**N17D，M41K**	18	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，N96D**	19	不存在	不存在	不存在
任何标记	**N17,96D，R66H**	20	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg	Asp/不存在/Glu/Lys/Arg
无标记	**N17D，M41K，R66H**	21	不存在	不存在	不存在
无标记	**M41K，R66H，N96D**	22	不存在	不存在	不存在
6 His	**N17D**	23	Asp	Asp	Asp
6 His	**N17,96D**	24	Asp	Asp	Asp
6 His	**N96D**	25	Asp	Asp	Asp
6 His	**N17,96D，R66H**	26	Asp	Asp	Asp

[0082]

标记	hA1M 突变中的位置	续 化合物	X11	X12	X13
6 His	**M41K**	27	Asp	Asp	Asp
6 His	**R66H**	28	Asp	Asp	Asp
6 His	**N17,96D，M41K，R66H**	29	Asp	Asp	Asp
6 His	**N17D，R66H**	30	Asp	Asp	Asp
6 His	**R66H，N96D**	31	Asp	Asp	Asp
6 His	**M41K，R66H**	32	Asp	Asp	Asp
6 His	**N17,96D，M41K**	33	Asp	Asp	Asp
6 His	**N17D，M41K**	34	Asp	Asp	Asp
6 His	**M41K，N96D**	35	Asp	Asp	Asp
6 His	**N17D，M41K，R66H**	36	Asp	Asp	Asp
6 His	**M41K，R66H，N96D**	37	Asp	Asp	Asp
8 His	**N17D**	38	Asp	Asp	Asp
8 His	**N17,96D**	39	Asp	Asp	Asp
8 His	**N96D**	40	Asp	Asp	Asp
8 His	**N17,96D，R66H**	41	Asp	Asp	Asp
8 His	**M41K**	42	Asp	Asp	Asp
8 His	**R66H**	43	Asp	Asp	Asp
8 His	**N17,96D，M41K，R66H**	44	Asp	Asp	Asp
8 His	**N17D，R66H**	45	Asp	Asp	Asp
8 His	**R66H，N96D**	46	Asp	Asp	Asp
8 His	**M41K，R66H**	47	Asp	Asp	Asp
8 His	**N17,96D，M41K**	48	Asp	Asp	Asp
8 His	**N17D，M41K**	49	Asp	Asp	Asp
8 His	**M41K，N96D**	50	Asp	Asp	Asp
8 His	**N17D，M41K，R66H**	51	Asp	Asp	Asp
8 His	**M41K，R66H，N96D**	52	Asp	Asp	Asp

[0083]

	hA1M 突变中的位置	续	标记'/第一个 AA	17	41	66	96
标记		化合物	X14	X15	X16	X17	X18
最宽的主张		1	Lys/(甲酰基)Met/不存在/Glu/Asp/Arg	Asp/Asn	Met/Lys/Arg	Arg/His/Lys	Asp/Asn
6-His	'顺次'突变可以是任何位置	2	Lys	Asp/Asn	Met/Lys/Arg	Arg/His/Lys	Asp/Asn
8-His	顺次'突变可以是任何位置	3	Lys	Asp/Asn	Met/Lys/Arg	Arg/His/Lys	Asp/Asn
无标记：	顺次'突变可以是任何位置	4	不存在	Asp/Asn	Met/Lys/Arg	Arg/His/Lys	Asp/Asn
任何标记	**M41K**	5	Lys/(甲酰基)Met/不存在/Glu/Asp/Arg	Asn	Lys	Arg	Asn
任何标记	**N17,96D**	6	Lys/(甲酰基)Met/不存在 Glu/Asp/Arg	Asp	Met	Arg	Asp
无标记	**N17D**	7	(甲酰基)Met	Asp	Met	Arg	Asn
无标记	**N17,96D**	8	(甲酰基)Met	Asp	Met	Arg	Asp
无标记	**N96D**	9	(甲酰基)Met	Asn	Met	Arg	Asp
无标记	**N17,96D，R66H**	10	(甲酰基)Met	Asp	Met	His	Asp
无标记	**M41K**	11	(甲酰基)Met	Asn	Lys	Arg	Asn
无标记	**R66H**	12	(甲酰基)Met	Asp	Met	His	Asn
无标记	**N17,96D，M41K，R66H**	13	(甲酰基)Met	Asp	Lys	His	Asp
无标记	**N17D，R66H**	14	(甲酰基)Met	Asp	Met	His	Asn
无标记	**R66H，N96D**	15	(甲酰基)Met	Asn	Met	His	Asp
无标记	**M41K，R66H**	16	(甲酰基)Met	Asn	Lys	His	Asn
无标记	**N17,96D，M41K**	17	(甲酰基)Met	Asp	Lys	Arg	Asp
无标记	**N17D，M41K**	18	(甲酰基)Met	Asp	Lys	Arg	Asn
无标记	**M41K，N96D**	19	(甲酰基)Met	Asn	Lys	Arg	Asp
任何标记	**N17,96D，R66H**	20	Lys/(甲酰基)Met/不存在 Glu/Asp/Arg	Asp	Met	His	Asp
无标记	**N17D，M41K，R66H**	21	(甲酰基)Met	Asp	Lys	His	Asn
无标记	**M41K，R66H，N96D**	22	(甲酰基)Met	Asn	Lys	His	Asp
6 His	**N17D**	23	Lys	Asp	Met	Arg	Asn
6 His	**N17,96D**	24	Lys	Asp	Met	Arg	Asp
6 His	**N96D**	25	Lys	Asn	Met	Arg	Asp
6 His	**N17,96D，R66H**	26	Lys	Asp	Met	His	Asp

[0084]

	hA1M 突变中的位置	续	标记'/第一个 AA	17	41	66	96
标记		化合物	X14	X15	X16	X17	X18
6 His	**M41K**	27	Lys	Asn	Lys	Arg	Asn
6 His	**R66H**	28	Lys	Asn	Met	His	Asn
6 His	**N17,96D，M41K，R66H**	29	Lys	Asp	Lys	His	Asp
6 His	**N17D，R66H**	30	Lys	Asp	Met	His	Asn
6 His	**R66H，N96D**	31	Lys	Asn	Met	His	Asp
6 His	**M41K，R66H**	32	Lys	Asn	Lys	His	Asn
6 His	**N17,96D，M41K**	33	Lys	Asp	Lys	Arg	Asp
6 His	**N17D，M41K**	34	Lys	Asp	Lys	Arg	Asn
6 His	**M41K，N96D**	35	Lys	Asn	Lys	Arg	Asp
6 His	**N17D，M41K，R66H**	36	Lys	Asp	Lys	His	Asn
6 His	**M41K，R66H，N96D**	37	Lys	Asn	Lys	His	Asp
8 His	**N17D**	38	Lys	Asp	Met	Arg	Asn
8 His	**N17,96D**	39	Lys	Asp	Met	Arg	Asp
8 His	**N96D**	40	Lys	Asn	Met	Arg	Asp
8 His	**N17,96D，R66H**	41	Lys	Asp	Met	His	Asp
8 His	**M41K**	42	Lys	Asn	Lys	Arg	Asn
8 His	**R66H**	43	Lys	Asn	Met	His	Asn
8 His	**N17,96D，M41K，R66H**	44	Lys	Asp	Lys	His	Asp
8 His	**N17D，R66H**	45	Lys	Asp	Met	His	Asn
8 His	**R66H，N96D**	46	Lys	Asn	Met	His	Asp
8 His	**M41K，R66H**	47	Lys	Asn	Lys	His	Asn
8 His	**N17,96D，M41K**	48	Lys	Asp	Lys	Arg	Asp
8 His	**N17D，M41K**	49	Lys	Asp	Lys	Arg	Asn
8 His	**M41K，N96D**	50	Lys	Asn	Lys	Arg	Asp
8 His	**N17D，M41K，R66H**	51	Lys	Asp	Lys	His	Asn
8 His	**M41K，R66H，N96D**	52	Lys	Asn	Lys	His	Asp

[0085]

标记	hA1M 突变中的位置	续 化合物	说明	
最宽的主张		1	**条件：**	**当所有 X1-X14 都不存在，X15 代表 Asn，X16 代表 Met，**
6-His	'顺次'突变可以是任何位置	2		**并且 X17 代表 Arg 时，那么 X18 不能代表 Asn.**
8-His	'顺次'突变可以是任何位置	3		
无标记：	'顺次'突变可以是任何位置	4	**条件：**	**当 X15 代表 Asn，X16 代表 Met，**
任何标记	**M41K**	5		**并且 X17 代表 Arg 时，那么 X18 不能代表 Asn**
任何标记	**N17,96D**	6		
无标记	**N17D**	7		
无标记	**N17,96D**	8		
无标记	**N96D**	9		
无标记	**N17,96D，R66H**	10	优选突变，无标记	
无标记	**M41K**	11		
无标记	**R66H**	12		
无标记	**N17,96D，M41K，R66H**	13	全部突变	
无标记	**N17D，R66H**	14		
无标记	**R66H，N96D**	15		
无标记	**M41K，R66H**	16		
无标记	**N17,96D，M41K**	17		
无标记	**N17D，M41K**	18		
无标记	**M41K，N96D**	19		
任何标记	**N17,96D，R66H**	20		
无标记	**N17D，M41K，R66H**	21		
无标记	**M41K，R66H，N96D**	22		
6 His	**N17D**	23		
6 His	**N17,96D**	24		
6 His	**N96D**	25		
6 His	**N17,96D，R66H**	26	**6 His 的优选突变**	

[0086]

续	化合物	标记	hA1M突变中的位置	说明
	27	6 His	M41K	
	28	6 His	R66H	
	29	6 His	N17,96D，M41K，R66H	
	30	6 His	N17D，R66H	
	31	6 His	R66H，N96D	
	32	6 His	M41K，R66H	
	33	6 His	N17,96D，M41K	
	34	6 His	N17D，M41K	
	35	6 His	M41K，N96D	
	36	6 His	N17D，M41K，R66H	
	37	6 His	M41K，R66H，N96D	
	38	8 His	N17D	
	39	8 His	N17,96D	
	40	8 His	N96D	
	41	8 His	N17,96D，R66H	优选突变，具有 8 个 His
	42	8 His	M41K	
	43	8 His	R66H	
	44	8 His	N17,96D，M41K，R66H	
	45	8 His	N17D，R66H	
	46	8 His	R66H，N96D	
	47	8 His	M41K，R66H	
	48	8 His	N17,96D，M41K	
	49	8 His	N17D，M41K	
	50	8 His	M41K，N96D	
	51	8 His	N17D，M41K，R66H	
	52	8 His	M41K，R66H，N96D	

[0087] A-1-微球蛋白-一般背景

[0088] A1M在心脏中高速合成，分泌到血流中并穿过血管壁运输到所有器官的血管外空间。该蛋白还在其他组织(血细胞、大脑、肾脏、皮肤)中合成，但是速率更低。由于尺寸小，游离的A1M迅速从肾脏中的血液过滤。

[0089] A1M是脂质运载蛋白超家族的一个成员，脂质运载蛋白超家族是一组来自动物、植

物和细菌的蛋白，其具有保守的三维结构但具有非常不同的功能。每种脂质运载蛋白均由折叠为具有疏水性内部的β-桶口袋的160-190个氨基酸的链组成。已知至少12种人脂质运载蛋白基因。A1M是26kDa的血浆和组织蛋白，其到目前为止已经在哺乳动物、鸟类、鱼类和青蛙中发现。通过X射线晶体分析法确定的A1M的三维结构在图10中示出。A1M在肝脏中高速合成，分泌到血液中，并迅速($T^1/_2$＝2-3分钟)穿过血管壁运输到所有器官的血管外空间。A1M在血液和间质组织中以游离的单体形式和与较大分子的共价络合物(IgA、白蛋白、凝血酶原)存在。由于尺寸小，游离的A1M迅速从肾脏中的血液过滤。然后主要部分被再吸附，但是大量的A1M被排泄到尿中。

[0090] 抗氧化剂是保护性因子，其会消除氧化物或者防止有害的氧化反应。人类生物体可响应于氧化应激而产生抗氧化剂。这种内源性的抗氧化剂包括超氧化物降解酶超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢降解酶过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化酶、以及血红素降解酶血红素加氧酶-1(HO-1)。最近显示，A1M通过作为自由基和血红素的清除剂以及氧化的还原酶和抑制剂起作用来参与防止氧化性的组织损害。几篇最近的文章显示，A1M会部分通过在线粒体中积累并保护线粒体功能来保护细胞培养物和器官外植体免受氧化性损害。确实，输注人重组A1M已经成功地用来在动物模型中对氧化应激相关的疾病先兆子痫和血红蛋白引起的肾小球损伤进行体内治疗。

[0091] A1M的序列和结构特性

[0092] 人A1M的全序列是已知的。该蛋白由具有183个氨基酸残基的多肽组成。许多另外的A1M cDNA和/或蛋白已经从其他哺乳动物、鸟类、两栖动物和鱼类检测、分离和/或测序。A1M肽链的长度在各物种之间稍有区别，这主要是由于C端的变化而引起。不同的推断的氨基酸序列的比对对比显示，同一性百分比从啮齿动物或原蹄动物与人之间的约75-80％，向下到鱼类与哺乳动物之间的约45％。位置34处游离的半胱氨酸侧链是保守的。显示该基团在与其他血浆蛋白的络合物的形成中和与黄棕色生色团的结合中参与氧化还原反应(参见以下)。A1M的三维结构显示，C34与溶剂接触，并位于脂质运载蛋白口袋的开口附近(参见图10)。

[0093] 在本文中，术语“α_1-微球蛋白”旨在包括如在SEQ ID NO:1(人A1M)、SEQ ID NO:2(人重组A1M)和其他物种的A1M中标识的α_1-微球蛋白，包括具有类似治疗活性的其同源物、片段或变体。因此，如本文所使用的A1M意思是与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少80％的序列同一性的蛋白。优选的是，如本文所使用的A1M与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少90％的序列同一性。甚至更优选的是，如本文所使用的A1M与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2具有至少95％(例如99％或100％)的序列同一性。在一个优选方面，α_1-微球蛋白与如本文所确定的SEQ ID NO:1或2一致。在序列表中给出了人A1M和人重组A1M的氨基酸序列(分别为SEQ ID No 1和2)。但是，具有如以下确认的蛋白重要部分的A1M的同源物、变体和片段也包含在如本文所使用的术语A1M中。关于比对/同一性参见以下段落。

[0094] 关于比对/同一性的详细信息

[0095] 本文的氨基酸残基位置是指如人血血浆中存在的人wt A1M(SEQ ID NO:1)中的位置。当提及重组A1M(其含有蛋氨酸或N-甲酰基蛋氨酸残基，其N端与wt-A1M(SEQ ID NO:2)中的初始残基-甘氨酸残基-连接)中的氨基酸残基时，或者提及突变的人A1M或其他物种的A1M中的氨基酸残基时，即使各位置由于(例如)缺失或插入而迁移，本领域技术人员也应理

解如何确认与人wt-A1M(SEQ ID NO:1)中的残基对应的残基。

[0096] 当产生重组蛋白时,它们最通常开始于初始Met残基,其可使用(例如)蛋氨酸氨肽酶或者具有类似活性的另一种酶除去。此处给出的A1M变体可具有或者不具有初始Met残基。

[0097] A1M的同源物

[0098] 如上,还可根据本文的描述使用A1M的同源物。理论上针对本文目的所有物种的A1M均可使用,包括目前发现的最原始的A1M,其来自鱼类(比目鱼)。A1M还可以分离形式从人类、猩猩、松鼠猴、速率、裸鼹鼠、小鼠、兔、豚鼠、母牛、青蛙、鸡、海象、海牛和比目鱼得到。

[0099] 就A1M的同源物、变体和片段而言,以下已经确认为蛋白抗氧化作用的重要部分:

[0100] Y22(酪氨酸,位置22,碱基对64-66)

[0101] C34(半胱氨酸,位置34,碱基对100-102)

[0102] K69(赖氨酸,位置69,碱基对205-207)

[0103] K92(赖氨酸,位置92,碱基对274-276)

[0104] K118(赖氨酸,位置118,碱基对352-354)

[0105] K130(赖氨酸,位置130,碱基对388-390)

[0106] Y132(酪氨酸,位置132,碱基对394-396)

[0107] L180(亮氨酸,位置180,碱基对538-540)

[0108] I181(异亮氨酸,位置181,碱基对541-543)

[0109] P182(脯氨酸,位置182,碱基对544-546)

[0110] R183(精氨酸,位置183,碱基对547-549)

[0111] 在整个文件中氨基酸和核苷酸的编号是指SEQ ID 1;如果采用来自其他物种的其他A1M、A1M类似物或其重组序列,那么本领域技术人员应理解如何确认与SEQ ID NO:1中的氨基酸对应的氨基酸。

[0112] 因此,在那些情况下,在例如A1M与SEQ ID NO:1或2之一具有80%(或者90%或95%)的序列同一性时,分子中的适当位置优选存在以上氨基酸。

[0113] 人A1M在3个位置被寡糖取代,两个可能双触角碳水化连接到N17和N96的唾液酸化络合物形式的寡糖和一个连接到T5的更简单的寡糖。但是来自不同物种的A1M蛋白的碳水化合物含量变化很大,从爪蟾中完全没有糖基化到一系列不同的糖基化模式。但是,对应于人中的N96的一个糖基化位点在哺乳动物中是保守的,表明这一特定的碳水化合物可能是蛋白中比其他两个寡糖更重要的成分。

[0114] 当从血浆或尿纯化时A1M是黄棕色的。该颜色由与主要位于口袋入口处的各种氨基酸侧基团共价结合的各种化合物引起。这些修饰代表被A1M体内共价捕获的有机氧化物的氧化降解产物,例如血红素、犬尿氨酸和酪氨酸基自由基。

[0115] A1M在电荷和尺寸上也是不均匀的,棕色更深的A1M分子负电荷更多。该不均匀性的可能解释是,不同的侧基团以不同的程度被不同自由基修饰,并且各修饰会改变蛋白的净电荷。共价连接的有色物质位于C34,以及K92、K118和K130,后者具有100与300Da之间的分子质量。色氨酸代谢物犬尿氨酸被发现与来自血液透析患者的尿的A1M中的赖氨酰基残基共价连接,并且在这种情况下似乎是蛋白棕色的来源[6]。合成的自由基ABTS(2,2′-连氮基-二-(3-乙基苯并噻唑啉)-6-磺酸)的氧化片段与Y22和Y132的侧链连接。

[0116] C34是A1M的反应中心。它变得非常电负性，意味着它具有由带正电荷的侧链K69、K92、K118和K130的邻近给出电子的高可能性，其会引起C34巯基的去质子化，这是氧化硫原子的先决条件。初步数据显示，C34是已知的最具有电负性的基团之一。

[0117] 将在以下进行更详细的描述的具有A1M的特性的氨基酸(C34、Y22、K92、K118、K130、Y132、L180、I181、P182、R183)理论上可在另一个骨架上(例如具有相同全局折叠的蛋白(另一种脂质运载蛋白)，或者完全人造的有机分子或无机分子(例如塑性聚合物、纳米颗粒或金属聚合物))上以类似的三维构型排列。

[0118] 这些氨基酸中的一些的三维排列(蓝色椭圆形，赖氨酸描绘为"+")、A1M-骨架(桶)、电子流动和自由基捕获在图10中示出。

[0119] 因此，如上包含包括反应中心及其周边的结构的同源物、片段或变体是优选的。

[0120] 在本公开的多肽结构中进行了修饰和改变，并仍然产生具有与原始多肽类似的功能特征的分子(例如保守的氨基酸取代)。例如，某些氨基酸可取代某一序列中的其他氨基酸而又不会显著损失活性。由于确定多肽生物功能活性的是多肽相互作用能力和性质，因此可在多肽序列中进行某些氨基酸序列取代但仍然会获得具有类似功能活性的多肽。

[0121] 在进行这种改变时，可考虑氨基酸的亲水性指数。亲水性氨基酸指数在赋予多肽相互作用生物功能中的重要性在本领域中是公知的。已知某些氨基酸可取代具有类似亲水性指数或分值的其他氨基酸，而又仍然产生具有类似生物活性的多肽。基于其疏水性和电荷特征赋予每种氨基酸一个亲水性指数。那些指数为：异亮氨酸(+4.5)；缬氨酸(+4.2)；亮氨酸(+3.8)；苯丙氨酸(+2.8)；半胱氨酸/半胱氨酸(+2.5)；蛋氨酸(+1.9)；丙氨酸(+1.8)；甘氨酸(-0.4)；苏氨酸(-0.7)；丝氨酸(-0.8)；色氨酸(-0.9)；酪氨酸(-1.3)；脯氨酸(-1.6)；组氨酸(-3.2)；谷氨酸(-3.5)；谷氨酰胺(-3.5)；天冬氨酸(-3.5)；天门冬酰胺(-3.5)；赖氨酸(-3.9)；精氨酸(-4.5)。

[0122] 据信，氨基酸的相对亲水性特征确定所得多肽的二级结构，其反过来限定多肽与其他分子(例如酶、底物、受体、抗体、抗原等)的相互作用。本领域中已知氨基酸可由具有类似亲水性指数的另一种氨基酸取代，而又仍然获得功能等价的多肽。在这种改变中，亲水性指数在±2内的氨基酸的取代是优选的，在±1内的那些是特别优选的，在±0.5内的那些是甚至更特别优选的。

[0123] 还可基于亲水性进行类似氨基酸的取代，特别是在如此产生的生物功能等价的多肽或肽旨在用于免疫实施例时。氨基酸残基被赋予了以下亲水性值：精氨酸(+3.0)；赖氨酸(+3.0)；天冬氨酸(+3.0±1)；谷氨酸(+3.0±1)；丝氨酸(+0.3)；天门冬酰胺(+0.2)；谷氨酰胺(+0.2)；甘氨酸(0)；脯氨酸(-0.5±1)；苏氨酸(-0.4)；丙氨酸(-0.5)；组氨酸(-0.5)；半胱氨酸(-1.0)；蛋氨酸(-1.3)；缬氨酸(-1.5)；亮氨酸(-1.8)；异亮氨酸(-1.8)；酪氨酸(-2.3)；苯丙氨酸(-2.5)；色氨酸(-3.4)。应理解一种氨基酸可取代具有类似亲水性值的另一种氨基酸，而又仍然获得生物等价的多肽，特别是免疫等价的多肽。在这种改变中，其亲水性值在±2内的氨基酸的取代是优选的，在±1内的那些是特别优选的，在±0.5内的那些是甚至更特别优选的。

[0124] 如以上所列出的，氨基酸取代通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性，例如其疏水性、亲水性、电荷、尺寸等。将一种或多种以上特征考虑在内的示范性取代对于本领域技术人员而言是熟知的，并且包括(但不限于)(原始残基：示范性取代)：(Ala：GIy、Ser)、

(Arg:Lys)、(Asn:GIn$_1$His)、(Asp:GIu、Cys、Ser)、(GIn:Asn)、(GIu:Asp)、(GIy:Ala)、(His:Asn、GIn)、(Ile:Leu、Val)、(Leu:Ile、Val)、(Lys:Arg)、(Met:Leu、Tyr)、(Ser:Thr)、(Thr:Ser)、(Trp:Tyr)、(Tyr:Trp、Phe)、以及(Val:Lle、Leu)。因此本公开的实施例考虑如上多肽的功能或生物等价物。特别地，多肽的实施例可包括与目标多肽具有约50％、60％、70％、80％、90％、以及95％的序列同一性的变体。

[0125] 在本文中，两个氨基酸序列之间或者两个核酸序列之间的同源性通过参数“同一性”表达(同样参见以上)。序列的比对和同源性分值的计算可使用可用来进行蛋白比对和DNA比对的完全Smith-Waterman比对进行。分别使用缺省得分矩阵BLOSUM50和同一性矩阵来进行蛋白和DNA的比对。空位中第一个残基的罚分对于蛋白为-12，对于DNA为-16，而空位中另外的残基的罚分对于蛋白为-2，对于DNA为-4。比对可使用v20u6版FASTA包进行。

[0126] 可使用“ClustalW”进行蛋白序列的多重比对。可使用蛋白比对作为模板进行DNA序列的多重比对，将氨基酸替代为DNA序列相应的密码子。

[0127] 可替代地，可以使用不同软件来比对氨基酸序列和DNA序列。两个氨基酸序列的比对使用(例如)2.8.0版的EMBOSS包的Needle程序(http://emboss.org)确定。Needle程序执行中的全局比对算法描述于。所使用的取代矩阵为BLOSUM62，空位开放罚分为10，空位延伸罚分为0.5。

[0128] 一个氨基酸序列(例如SEQ ID NO:1)与不同氨基酸序列(例如SEQ ID NO:2)之间的同一性程度计算为两个序列的比对中准确匹配的数量除以“SEQ ID NO:1”的长度或者“SEQ ID NO:2”的长度中最短的长度。结果表达为同一性百分比。关于比对和同一性参见以上。

[0129] 准确匹配在两个序列在重叠的相同位置中具有相同的氨基酸残基时发生。

[0130] 如果相关，两个核苷酸序列之间的同一性程度可通过Wilbur-Lipman方法使用LASER-GENE™MEGALIGN™软件(DNASTAR，Inc.，威斯康辛州麦迪逊)使用同一性表和以下多重比对参数来确定：空位罚分10，空位长度罚分10。双序列对比参数为Ktuple＝3，空位罚分＝3，窗口＝20。

[0131] 某一多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:1的氨基酸的同一性的百分比可通过以下确定：i)使用Needle程序使用BLOSUM62取代矩阵、空位开放罚分10和空位延伸罚分0.5比对两个氨基酸序列；ii)对比对中准确匹配的数量进行计数；iii)将准确匹配的数量除以两个氨基酸序列中的最短序列的长度，iv)将iii)的相除结果转化为百分比。与本发明其他序列的同一性的百分比以类似的方式计算。

[0132] 以示例的方式，一个多肽序列可与参考序列相同，即100％相同，或者它可包括与参考序列相比高达某一整数数量的氨基酸改变，以便％同一性小于100％。这种改变选自：至少一个氨基酸缺失、取代(包括保守的和非保守的取代)或插入，并且其中改变可在参考多肽序列的氨基-端或羧基-端位置或者那些末端位置之间的任何位置(其单独地散布于参考序列中的氨基酸中或者散布于参考序列中的一个或多个相邻基团中)发生。

[0133] 保守的氨基酸变体还可包含非天然存在的氨基酸残基。非天然存在的氨基酸非限制性地包括反式-3-甲基脯氨酸、2,4-甲醇基脯氨酸、顺式-4-羟基脯氨酸、反式-4-羟基脯氨酸、N-甲基-甘氨酸、别苏氨酸、甲基苏氨酸、羟基-乙基半胱氨酸、羟基乙基高半胱氨酸、硝基-谷氨酰胺、高谷氨酰胺、哌可酸、噻唑烷羧酸、脱氢脯氨酸、3-甲基脯氨酸和4-甲基脯

氨酸、3,3-二甲基脯氨酸、叔亮氨酸、正缬氨酸、2-氮杂苯基-丙氨酸、3-氮杂苯丙氨酸、4-氮杂苯丙氨酸、以及4-氟苯丙氨酸。将非天然存在的氨基酸残基引入蛋白中的几种方法在本领域中是已知的。例如,可采用其中使用化学氨酰基化的抑制物tRNA抑制无义突变的体外系统。用来合成氨基酸和氨酰基化tRNA的方法在本领域中是已知的。含有无义突变的质粒的转录和翻译在包含大肠杆菌(E.coli)S30提取物以及可商购的酶和其他试剂的无细胞系统中进行。蛋白通过色谱法纯化。在第二种方法中,在爪蟾卵母细胞中通过显微注射突变mRNA和化学氨酰基化的抑制物tRNA进行翻译。在第三种方法中,在不存在待替代天然氨基酸(例如苯丙氨酸)而存在期望的非天然存在的氨基酸(例如2-氮杂苯丙氨酸、3-氮杂苯丙氨酸、4-氮杂苯丙氨酸或4-氟苯丙氨酸)的情况下培养大肠杆菌细胞。非天然存在的氨基酸被引入蛋白中替代其天然的对应物。天然存在的氨基酸残基可通过体外化学修饰转化为非天然存在的氨基酸残基。化学修饰可与定点诱变结合,以进一步延伸取代范围。提供足以支持A1M的抗氧化特性的三维结构的可替代化学结构可通过其他技术(例如人造支架、氨基酸取代等)提供。另外,模仿如上的A1M活性位点的结构被设想具有与A1M相同的治疗功能或生理功能。

[0134] 药物组合物和剂量

[0135] 本发明还提供一种试剂盒,其包含:

[0136] i)包含造影剂(contrast medium)的药物组合物,以及

[0137] ii)包含A1M、SEQ ID NO:1-10和17中的任一个或者本文所提及的A1M衍生蛋白(或者如本文所定义的突变体、类似物、片段或变体)中的任一个的药物组合物。

[0138] 在以下给出了序列表。本发明包括所有可能的变型,例如本文所示的那些。

[0139] SEQ ID NO:1:wt hA1M

[0140] SEQ ID NO:2:rhA1M(即Met-A1M)

[0141] SEQ ID NO:3:优选突变,无“延伸”-N17,96D,R66H

[0142] SEQ ID NO:4:无延伸,M41K

[0143] SEQ ID NO:5:优选突变,具有6个His,N17,96D,R66H

[0144] SEQ ID NO:6:6个His,M41K

[0145] SEQ ID NO:7:优选突变,具有8个His延伸,N17,96D,R66H

[0146] SEQ ID NO:8:8个His,M41K

[0147] SEQ ID NO:9:延伸+wt hA1M

[0148] SEQ ID NO:10:通用的A1M,具有可能的延伸。

[0149] SEQ ID NO:11-16:wt hA1M的片段

[0150] SEQ ID NO:17:通用的C端被截短的A1M,具有可能的延伸

[0151] SEQ ID NO:18:优选突变,无“延伸”-N17,96D,R66;C端被截短。

[0152] SEQ ID NO:19:无延伸,M41K;C端被截短。

[0153] SEQ ID NO:20:优选突变,具有6个His,N17,96D,R66H;C端被截短。

[0154] SEQ ID NO:21:6个His,M41K;C端被截短。

[0155] SEQ ID NO:22:优选突变,具有8个His延伸,N17,96D,R66H;C端被截短。

[0156] SEQ ID NO:23:8个His,M41K;C端被截短。

[0157] 试剂盒为一个包装的形式,其含有以上的两种组合物。

[0158] 包含造影剂的药物组合物通常是已经投放市场的组合物。

[0159] 包含A1M(或者如本文所定义的其类似物、片段或变体)的药物组合物旨在用于静脉内给药。因此,A1M可配制为液体(例如在溶液中)、分散体、乳液、悬浮液等。

[0160] 对于肠胃外使用,合适的溶剂包括水、植物油、丙二醇、以及通常批准用于这种目的有机溶剂。一般而言,本领域技术人员可在由Gennaro等人编辑的《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Science)》(Mack Publishing Company)、由Rowe等人编辑的《药物赋形剂手册(Handbook of Pharmaceutical Excipients)》(PhP Press)、以及与用于特定制剂类型的相关赋形剂相关和与用来制备特定制剂的方法相关的官方专著(例如Ph.Eur.或USP)中找到指导。

[0161] A1M将根据施用造影剂施用一次或多次剂量。优选地,每个剂量将静脉内施用:以单次剂量施用,以单次剂量施用接着在至多60分钟的短时间段过程中进行缓慢输注,或者仅仅在至多60分钟的短时间段过程中进行缓慢输注。第一剂可与造影剂同时施用,或者在注射造影剂之前0-60分钟到0-30分钟之后的时段内施用。注射造影剂之后可添加更多的A1M-剂量,但是可能不是必要的。每个剂量含有某个量的A1M,其与患者体重相关:1-15mg A1M/kg患者。

[0162] 序列表自由文本

[0163] SEQ ID NO:1

[0164] <223>野生型人A1M,无突变

[0165] SEQ ID NO:2

[0166] <223>rhA1M,即N端Met

[0167] SEQ ID NO:3

[0168] <223>hA1M,无标记,N端Met,N17,96D;R66H

[0169] SEQ ID NO:4

[0170] <223>hA1M,非标记,N端Met,M41K

[0171] SEQ ID NO:5

[0172] <223>6His,N17,96D;R66H

[0173] SEQ ID NO:6

[0174] <223>hA1M,6His,M41K

[0175] SEQ ID NO:7

[0176] <223>8His,N17,96D;R66H

[0177] SEQ ID NO:8

[0178] <223>hA1M,8His,M41K

[0179] SEQ ID NO:9

[0180] <223>hA1M,8His,无突变

[0181] SEQ ID NO:10

[0182] <211>193

[0183] <212>PRT

[0184] <213>智人

[0185] <220>

[0186] <221>变体

[0187] <222>1

[0188] <223>Xaa＝Met或不存在

[0189] <220>

[0190] <221>变体

[0191] <222>1

[0192] <223>Xaa＝Met或不存在

[0193] <220>

[0194] <221>变体

[0195] <222>2

[0196] <223>Xaa＝His或不存在

[0197] <220>

[0198] <221>变体

[0199] <222>2

[0200] <223>Xaa＝His或不存在

[0201] <220>

[0202] <221>变体

[0203] <222>3

[0204] <223>Xaa＝His或不存在

[0205] <220>

[0206] <221>变体

[0207] <222>3

[0208] <223>Xaa＝His或不存在

[0209] <220>

[0210] <221>变体

[0211] <222>4

[0212] <223>Xaa＝His或不存在

[0213] <220>

[0214] <221>变体

[0215] <222>4

[0216] <223>Xaa＝His或不存在

[0217] <220>

[0218] <221>变体

[0219] <222>5

[0220] <223>Xaa＝His或不存在

[0221] <220>

[0222] <221>变体

[0223] <222>5

[0224] <223>Xaa＝His或不存在

[0225] <220>

[0226] <221>变体

[0227] <222>6

[0228] <223>Xaa＝His或不存在

[0229] <220>

[0230] <221>变体

[0231] <222>6

[0232] <223>Xaa＝His或不存在

[0233] <220>

[0234] <221>变体

[0235] <222>7

[0236] <223>Xaa＝His或不存在

[0237] <220>

[0238] <221>变体

[0239] <222>7

[0240] <223>Xaa＝His或不存在

[0241] <220>

[0242] <221>变体

[0243] <222>8

[0244] <223>Xaa＝His或不存在

[0245] <220>

[0246] <221>变体

[0247] <222>8

[0248] <223>Xaa＝His或不存在

[0249] <220>

[0250] <221>变体

[0251] <222>9

[0252] <223>Xaa＝His或不存在

[0253] <220>

[0254] <221>变体

[0255] <222>9

[0256] <223>Xaa＝His或不存在

[0257] <220>

[0258] <221>变体

[0259] <222>10

[0260] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0261] <220>

[0262] <221>变体

[0263] <222>10

[0264] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0265] <220>

[0266] <221>变体

[0267] <222>11

[0268] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0269] <220>

[0270] <221>变体

[0271] <222>11

[0272] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0273] <220>

[0274] <221>变体

[0275] <222>12

[0276] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0277] <220>

[0278] <221>变体

[0279] <222>12

[0280] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0281] <220>

[0282] <221>变体

[0283] <222>13

[0284] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0285] <220>

[0286] <221>变体

[0287] <222>13

[0288] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0289] <220>

[0290] <221>变体

[0291] <222>14

[0292] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0293] <220>

[0294] <221>变体

[0295] <222>14

[0296] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0297] <220>

[0298] <221>变体

[0299] <222>31

[0300] <223>Xaa＝Asn或Asp

[0301] <220>

[0302] <221>变体

[0303] <222>55

[0304] <223>Xaa＝Met或Lys

[0305] <220>

[0306] <221>变体

[0307] <222>80

[0308] <223>Xaa＝Arg或His

[0309] <220>

[0310] <221>变体

[0311] <222>110

[0312] <223>Xaa＝Asn或Asp

[0313] SEQ ID NO:11

[0314] <223>Y1

[0315] SEQ ID NO:12

[0316] <223>Y2

[0317] SEQ ID NO:13

[0318] <223>Y3

[0319] SEQ ID NO:14

[0320] <223>Y4

[0321] SEQ ID NO:15

[0322] <223>Y5

[0323] SEQ ID NO:16

[0324] <223>Y5

[0325] SEQ ID NO:17

[0326] <211>197

[0327] <212>PRT

[0328] <213>智人(Homo sapiens)

[0329] <220>

[0330] <221>变体

[0331] <222>1

[0332] <223>Xaa＝Met或不存在

[0333] <220>

[0334] <221>变体

[0335] <222>1

[0336] <223>Xaa＝Met或不存在

[0337] <220>

[0338] <221>变体

[0339] <222>2

[0340] <223>Xaa＝His或不存在

[0341] <220>

[0342] <221>变体

[0343] <222>2

[0344] <223>Xaa＝His或不存在

[0345] <220>

[0346] <221>变体

[0347] <222>3

[0348] <223>Xaa＝His或不存在

[0349] <220>

[0350] <221>变体

[0351] <222>3

[0352] <223>Xaa＝His或不存在

[0353] <220>

[0354] <221>变体

[0355] <222>4

[0356] <223>Xaa＝His或不存在

[0357] <220>

[0358] <221>变体

[0359] <222>4

[0360] <223>Xaa＝His或不存在

[0361] <220>

[0362] <221>变体

[0363] <222>5

[0364] <223>Xaa＝His或不存在

[0365] <220>

[0366] <221>变体

[0367] <222>5

[0368] <223>Xaa＝His或不存在

[0369] <220>

[0370] <221>变体

[0371] <222>6

[0372] <223>Xaa＝His或不存在

[0373] <220>

[0374] <221>变体

[0375] <222>6

[0376] <223>Xaa＝His或不存在

[0377] <220>

[0378] <221>变体

[0379] <222>7

[0380] <223>Xaa＝His或不存在

[0381] <220>

[0382] <221>变体

[0383] <222>7

[0384] <223>Xaa＝His或不存在

[0385] <220>

[0386] <221>变体

[0387] <222>8

[0388] <223>Xaa＝His或不存在

[0389] <220>

[0390] <221>变体

[0391] <222>8

[0392] <223>Xaa＝His或不存在

[0393] <220>

[0394] <221>变体

[0395] <222>9

[0396] <223>Xaa＝His或不存在

[0397] <220>

[0398] <221>变体

[0399] <222>9

[0400] <223>Xaa＝His或不存在

[0401] <220>

[0402] <221>变体

[0403] <222>10

[0404] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0405] <220>

[0406] <221>变体

[0407] <222>10

[0408] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0409] <220>

[0410] <221>变体

[0411] <222>11

[0412] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0413] <220>

[0414] <221>变体

[0415] <222>11

[0416] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0417] <220>

[0418] <221>变体

[0419] <222>12

[0420] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0421] <220>

[0422] <221>变体

[0423] <222>12

[0424] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0425] <220>

[0426] <221>变体

[0427] <222>13

[0428] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0429] <220>

[0430] <221>变体

[0431] <222>13

[0432] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0433] <220>

[0434] <221>变体

[0435] <222>14

[0436] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0437] <220>

[0438] <221>变体

[0439] <222>14

[0440] <223>Xaa＝Asp、Glu、Lys、Arg,或不存在

[0441] <220>

[0442] <221>变体

[0443] <222>31

[0444] <223>Xaa＝Asn或Asp

[0445] <220>

[0446] <221>变体

[0447] <222>55

[0448] <223>Xaa＝Met或Lys

[0449] <220>

[0450] <221>变体

[0451] <222>80

[0452] <223>Xaa＝Arg或His

[0453] <220>

[0454] <221>变体

[0455] <222>110

[0456] <223>Xaa＝Asn或Asp

[0457] SEQ ID NO:18

[0458] <223>hA1M,无标记,N端Met,N17,96D;R66H;被截短

[0459] SEQ ID NO:19

[0460] <223>hA1M,无标记,N端Met,M41K;被截短

[0461] SEQ ID NO:20

[0462] <223>6His,N17,96D;R66H;被截短

[0463] SEQ ID NO:21

[0464] <223>hA1M,6His,M41K;被截短

[0465] SEQ ID NO:22

[0466] <223>8His,N17,96D;R66H;被截短

[0467] SEQ ID NO:23

[0468] <223>hA1M,8His,M41K;被截短

[0469] SEQ ID NO:24

[0470] <223>1.M8H5GIEGR-小鼠

[0471] SEQ ID NO:25

[0472] <223>2.M8H5GIEGR-裸鼹鼠

[0473] SEQ ID NO:26

[0474] <223>3.M8H5GIEGR-青蛙

[0475] SEQ ID NO:27

[0476] <223>4.M8H5GIEGR-鸡

[0477] SEQ ID NO:28

[0478] <223>5.M8H5GIEGR-兔

[0479] SEQ ID NO:29

[0480] <223>6.M8H5GIEGR-松鼠猴(SQ Monkey)

[0481] SEQ ID NO:30

[0482] <223>7.M8H5GIEGR-海象

[0483] SEQ ID NO:31

[0484] <223>8.M8H5GIEGR-海牛

[0485] SEQ ID NO:32

[0486] <223>9.M8H5GIEGR-比目鱼

[0487] SEQ ID NO:33

[0488] <223>10.M8H5GIEGR-猩猩

[0489] SEQ ID NO:34

[0490] <223>11.M8H5GIEGR-人P35K

[0491] SEQ ID NO:35

[0492] <223>12.M8H5GIEGR-人M41K

[0493] SEQ ID NO:36

[0494] .M8H5GIEGR-人R66H

[0495] SEQ ID NO:37

[0496] <223>14.M8H5GIEGR-人T75K

[0497] SEQ ID NO:38

[0498] <223>15.M8H5GIEGR-人T75Y

[0499] SEQ ID NO:39

[0500] <223>16.M8H5GIEGR-人M99K

[0501] SEQ ID NO:40

[0502] <223>17.M8H5GIEGR-人S101Y

[0503] SEQ ID NO:41

[0504] <223>18.M8H5GIEGR-人K69.92.118.130R

[0505] SEQ ID NO:42

[0506] <223>19.M8H5GIEGR-空棘鱼

[0507] SEQ ID NO:43

[0508] <223>21.M8H5GIEGR-人L89T

[0509] SEQ ID NO:44

[0510] <223>22.M8H5GIEGR-人N1796D

[0511] SEQ ID NO:45

[0512] <223>23.M8H5GIEGR-人T45K

[0513] SEQ ID NO:46

[0514] <223>24.M8H5GIEGR-人A135E

[0515] SEQ ID NO:47

[0516] <223>25.M8H5GIEGR-人V170S

[0517] SEQ ID NO:48

[0518] <223>26.M8H5GIEGR-人

[0519] SEQ ID NO:49

[0520] <223>27.M8H5GIEGR-人G172Q

[0521] SEQ ID NO:50

[0522] <223>33.M8H4DK-人M41K+

[0523] SEQ ID NO:51

[0524] <223>34.M8H4DK-人M41K+N1796D34

[0525] SEQ ID NO:52

[0526] <223>35.M8H4DK-人R66H+N1796D

[0527] SEQ ID NO:53

[0528] <223>36.M8H4DK-人M41K+R66H+N1796D

[0529] SEQ ID NO:54

[0530] <223>38.M8H4DK-人R66H

[0531] SEQ ID NO:55

[0532] <223>39.M8H4DK-人

[0533] SEQ ID NO:56

[0534] <223>40.M8H-人wt

[0535] SEQ ID NO:57

[0536] <223>41.M8H-人R66H+N1796D

[0537] SEQ ID NO:58

[0538] <223>60.M8H4DK-人wt

[0539] SEQ ID NO:59

[0540] <223>1.M8H5GIEGR-小鼠

[0541] SEQ ID NO:60

[0542] <223>2.M8H5GIEGR-裸鼹鼠

[0543] SEQ ID NO:61

[0544] <223>3.M8H5GIEGR-青蛙

[0545] SEQ ID NO:62

[0546] <223>4.M8H5GIEGR-鸡

[0547] SEQ ID NO:63

[0548] <223>5.M8H5GIEGR-兔

[0549] SEQ ID NO:64

[0550] <223>6.M8H5GIEGR-松鼠猴

[0551] SEQ ID NO:65

[0552] <223>7.M8H5GIEGR-海象

[0553] SEQ ID NO:66

[0554] <223>8.M8H5GIEGR-海牛

[0555] SEQ ID NO:67

[0556] <223>9.M8H5GIEGR-比目鱼

[0557] SEQ ID NO:68

[0558] <223>10.M8H5GIEGR-猩猩

[0559] SEQ ID NO:69

[0560] <223>11.M8H5GIEGR-人P35K

[0561] SEQ ID NO:70

[0562] <223>12.M8H5GIEGR-人M41K

[0563] SEQ ID NO:71

[0564] <223>13.M8H5GIEGR-人R66H

[0565] SEQ ID NO:72

[0566] <223>14.M8H5GIEGR-人T75K

[0567] SEQ ID NO:73

[0568] <223>15.M8H5GIEGR-人T75Y

[0569] SEQ ID NO:74

[0570] <223>16.M8H5GIEGR-人M99K

[0571] SEQ ID NO:75

[0572] <223>17.M8H5GIEGR-人S101Y

[0573] SEQ ID NO:76

[0574] <223>18.M8H5GIEGR-人K69.92.118.

[0575] SEQ ID NO:77

[0576] <223>19.M8H5GIEGR-空棘鱼

[0577] SEQ ID NO:78

[0578] <223>21.M8H5GIEGR-人L89T

[0579] SEQ ID NO:79

[0580] <223>22.M8H5GIEGR-人N1796D

[0581] SEQ ID NO:80

[0582] <223>23.M8H5GIEGR-人T45K

[0583] SEQ ID NO:81

[0584] <223>24.M8H5GIEGR-人A135E

[0585] SEQ ID NO:82

[0586] <223>25.M8H5GIEGR-人V170S

[0587] SEQ ID NO:83

[0588] <223>26.M8H5GIEGR-人V148D

[0589] SEQ ID NO:84

[0590] <223>27.M8H5GIEGR-人G172Q

[0591] SEQ ID NO:85

[0592] <223>33.M8H4DK-人M41K+R66H

[0593] SEQ ID NO:86

[0594] <223>34.M8H4DK-人M41K+N1796D

[0595] SEQ ID NO:87

[0596] <223>35.M8H4DK-人R66H+N1796D

[0597] SEQ ID NO:88

[0598] <223>36.M8H4DK-人M41K+R66H+N1796D

[0599] SEQ ID NO:89

[0600] <223>37.M8H4DK-人M41K

[0601] SEQ ID NO:90

[0602] <223>38.M8H4DK-人R66H

[0603] SEQ ID NO:91

[0604] <223>39.M8H4DK-人N1796D

[0605] SEQ ID NO:92

[0606] <223>40.M8H-人wt

[0607] SEQ ID NO:93

[0608] <223>41.M8H-人R66H+N1796D

[0609] SEQ ID NO:94

[0610] <223>42.未标记的-人R66H+N1796D

[0611] SEQ ID NO:95

[0612] <223>61.未标记的-人wt

[0613] 缩写

[0614] A1M:α-1-微球蛋白,IB:包涵体,wt:野生型,R66H:在位置66引起His的表达而不是

Arg的表达的A1M-基因中的点突变,N17,96D:在位置17和96引起Asp的表达而不是Asn的表达的A1M-基因中的点突变,M8H4DK:具有氨基酸序列MHHHHHHHHDDDDK的肽,M6H4DK:具有氨基酸序列MHHHHHHDDDDK的肽,M8H:具有氨基酸序列MHHHHHHHH的肽,M8H5GIEGR:具有氨基酸序列MHHHHHHHHGGGGGIEGR的肽,CV:柱体积,SEC:尺寸排除色谱法,DLS:动态光散射,DSF:差示扫描荧光测定法,Gu-HCl:盐酸胍,ORAC:氧自由基抗氧化能力,SD:标准偏差,PAGE:聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0615] 定义

[0616] 在描述所公开的主题和要求保护所公开的主题时,将根据以下给出的定义使用以下术语。除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语均具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。在一些情况下,本文中对具有通常理解的含义的术语进行了定义,用以澄清和/或易于参考,并且本文中包括这种定义不应必须解释为表示与本领域通常所理解实质上的不同。本文描述或提及的技术和程序通常是众所周知的,并且通常由本领域技术人员使用常规方法来利用。适当时,涉及可商购的试剂盒和试剂的使用的程序通常根据制造商确定的方案和/或参数进行,除非另外指出。尽管在本公开的实践或测试中还可以使用与本文描述的那些类似或等同的任何方法和材料,但是本文中描述了优选的方法和材料。

[0617] 在该说明书中,除非另外指出,否则“一种(a或an)”或“一个(a或an)”意思是“一种或多种(或者“一个或多个”)”。

[0618] 涉及本发明的各种语法形式的术语“治疗或预防”是指预防、治愈、逆转、减弱、减轻、缓解、抑制、最小化、压制或中断(1)疾病的有毒作用、(2)疾病进展或(3)疾病致病因素。

[0619] 涉及本发明的术语“有效量”是指该量为给定的状况和给药方案提供治疗效果。这是经计算联合必要的添加剂和稀释剂(即载体,或者给药载体)会产生期望的治疗效果的活性材料的预定的量。另外,它旨在表示足以减小、最优选防止临床显著缺乏活性和宿主响应的量。可替代地,治疗有效量足以在宿主中引起临床显著的状况的改善。本领域技术人员应理解,化合物的量可取决于其特定的活性而改变。合适的剂量可含有经计算联合必要的稀释剂(即载体,或者添加剂)会产生期望的治疗效果的预定量的活性成分。此外,施用剂量会取决于将使用的一种或多种活性成分、待治疗患者的年龄、重量等而改变,但是通常会在从0.001到1000mg/kg体重/天的范围内。另外,剂量还取决于给药途径。

[0620] 术语“多肽”包括蛋白及其片段。多肽在本文中公开为氨基酸残基序列。那些序列从左到右以从氨基端到羧基端的方向写出。根据标准命名法,氨基酸残基序列通过如下所示的三字母码或单字母码命名:丙氨酸(Ala,A)、精氨酸(Arg,R)、天门冬酰胺(Asn,N)、天门冬氨酸(Asp,D)、半胱氨酸(Cys,C)、谷氨酰胺(Gln,Q)、谷氨酸(Glu,E),甘氨酸(Gly,G)、组氨酸(His,H)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、赖氨酸(Lys,K)、蛋氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、脯氨酸(Pro,P)、丝氨酸(Ser,S)、苏氨酸(Thr,T)、色氨酸(Trp,W)、酪氨酸(Tyr,Y)以及缬氨酸(Val,V)。

[0621] “变体”是指与参考多肽或参考多核苷酸不同但又保留基本特性的多肽或多核苷酸。典型的多肽变体在氨基酸序列上与另一种参考多肽不同。通常差别是有限的,以便参考多肽与变体的序列总体上非常相似(同源的),并且在许多区域中是相同的。变体和参考多肽可在氨基酸序列上相差一个或多个修饰(例如取代、添加和/或缺失)。取代的或插入的氨

基酸残基可以是或者可以不是由遗传密码编码的氨基酸残基。多肽的变体可以是天然存在的变体(例如等位变体),或者它可以是尚不清楚是天然存在的变体。

[0622] 在(但不限于)附图中对本发明进一步说明。

附图说明

[0623] 图1.来自12个不同物种的A1M的氨基酸序列比对。

[0624] 在项目I期研究的人wt A1M和11种另外的物种的氨基酸序列使用http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/软件进行比对。不同序列与人类序列的同一性以百分比给出。在该批中所有物种之间相同的氨基酸标记为黄色。另外,据信在人A1M中重要的氨基酸如此标记:对于还原特性和抗氧化剂特性(Allhorn等人,2005)以及血红素结合重要的未配对的半胱氨酸残基(C34)标记为粉红色(Mening和Skerra,2012)。已知被糖基化的天冬酰胺(N17和96)标记为绿色(Escribano等人,1990)。发现在尿A1M中被修饰(Åkerström等人,1995;Berggård等人,1999)并且被认为对还原酶活性(Allhorn等人,2005)重要的4种赖氨酸(K69、92、118和130)标记为淡蓝色。被认为参与血红素-结合(Meining和Skerra,2012)的H123标记为灰色,最后,显示参与自由基清除(Åkerström等人,2007)的酪氨酸(Y22和132)标记为深蓝色。

[0625] 图2.III期中表达的蛋白的SDS-PAGE。

[0626] 来自未诱导样品(标记为0)和诱导后1到4小时的样品(标记为1、2、3、4)的等量的细菌裂解物通过SDS-PAGE分离。在这些样品中,略微低于25kDa的条带以随时间递增的量表达。各条带的强度在诱导3小时之后达到顶点。M8H标记的wt-A1M和R66K+N17,96D-A1M以比M8H4DK条带略微更小的分子量表达,但是此处的表达水平也在3小时左右达到顶点。未标记的wt-A1M和R66H+N17,96D-A1M显示为甚至更小的条带,但是此处的条带强度在4小时比在3小时更强,表明表达稍微延迟,特别对于wt A1M而言。

[0627] 图3.III期变体的产率、纯度和聚集。

[0628] A.对纯化的所有III期A1M变体的产率进行对比。所有变体均得到良好产率,未标记的wt-A1M的产率稍低。B.通过在SDS-PAGE上分离10μg的所有变体对纯度进行研究。使用Bio-Rad的Image软件通过将主要单体条带与所有条带的光密度进行分析确定纯度。所有组氨酸标记的变体均显示出很高的纯度,而未标记的变体的密度则稍低(约90%)。C.通过非变性PAGE分离20μg的每种变体从而对大聚集物的存在进行分析。通过光密度分析法确定主要单体条带的强度和保留在施加细缝中的材料(聚集非常大)。大部分变体显示出少量的大聚集物,除了M8H-wt-A1M和未标记的变体,其显示稍高的百分比。所有变体均通过图片A给出的数字进行编码。

[0629] 图4.各种缓冲液中100μM和1mM的III期变体溶液的聚集分析。

[0630] 通过非变性PAGE分析对在不同缓冲液中从100μM浓缩到1mM之后的聚集倾向性进行研究。在每条泳道中分离20μg蛋白。使用单独条带强度的光密度分析法分析计算大聚集物的百分比。

[0631] A.所有变体均在pH 8.0或7.4的Tris-缓冲液中从100μM浓缩到1mM并通过PAGE进行分离。M8H4DK-wt、R66H+N1796D、M41K、R66H、N1796D分别标记为60、35、37、38和39,M8H-wt

和M8H-R66H+N1796D标记为40和41，未标记的wt和R66H+N1796D标记为61和42。

[0632] B.各变体在pH 8.0和7.4的TRIS-缓冲液中和pH 7.4的PBS中浓缩到1mM，进行一次冻融循环，然后通过PAGE分离，并如进行分析。

[0633] 图5.III期变体的还原酶和抗氧化剂能力的分析。

[0634] A.还原酶活性分析为对ABTS自由基的还原。0-2μM的A1M一式两份加入56μM的ABTS自由基。随着在95秒过程中405nm下吸光度的减小对还原进行追踪。计算每个浓度下曲线下的面积(AUC)，并通过扣除单独的缓冲液的AUC来计算净AUC。各份的平均净AUC+/-SEM相对于浓度作图。所有的M8H4DK-变体均具有与wt A1M大致相同的活性，M41K和R66H倾向于具有更低的活性。M8H和未标记的变体也显示完全活性，R66H+N1796D变体与wt A1M相比稍微倾向于具有更高的活性。

[0635] B.在ORAC分析中对抗氧化能力进行研究。将A1M变体的活性与Trolox标准物的活性进行对比，并表达为Trolox当量的数量。每个分析一式三份进行，并将M84DK-wt的结果设定为100％。所有其他变体的抗氧化能力相对于其进行表达。M8H4DK-R66H+N17,96D变体显示出比M8H4DK-wt A1M显著更高的能力。当各标记被缩短或者被除去时，差别更小。所给出的数据是两个独立实验的综合结果。

[0636] 图6.III期变体的还原酶活性和血红素结合的分析。

[0637] A.通过将稀释系列(0-10μM)的A1M与100μM的细胞色素c+100μM的NADH混合，并追踪550nm下吸光度的增加20分钟来对A1M变体还原细胞色素c的能力进行研究。该分析一式两份进行。计算每个浓度的AUC，并通过扣除单独的缓冲液的AUC来计算净AUC。数据以两个独立实验的净AUC+/-SEM给出。卵白蛋白用作阴性对照。大部分A1M变体与wt相比在更低的浓度下显示出稍低的还原能力。对于N17,96D-A1M和R66H+N17,96D-A1M，它是显著的(0.3-0.6μM)。标记的缩短和去除对该特性无影响。

[0638] B.通过410与420nm之间的吸收峰的出现和该峰的红移的幅度对血红素与A1M变体的结合进行分析(Karnaukhova等人，2014;Rutardottir等人，2016)。一式两份将44μM的蛋白溶液与40μM的血红素混合，并在室温下孵育2小时。通过270与450nm之间的波长扫描对各混合物进行分析。计算最高峰的位置和413:386的比例。所有的M8H4DK-变体均具有与wt-A1M大致相同的红移和比例，而M8H标记的变体则具有显著更高的比例。未标记的变体缺乏红移活性，从而证实之前的结果(Karnaukhova等人，2014)。

[0639] C.A1M与血红素琼脂糖的结合。通过将稀释系列的A1M或者对照卵白蛋白与血红素-琼脂糖或对照琼脂糖混合对A1M的特异性结合进行分析。该分析一式两份进行。使用BCA对原料以及血红素-琼脂糖和对照琼脂糖孵育物的流过液的蛋白定量进行测定。可从这些数据确定每个样品与血红素琼脂糖特异性结合的蛋白的量。结合蛋白相对于添加的蛋白作图，所有变体均观察到线性相关。通过线性回归计算线的斜率，并显示各份之间的平均值。在该方法中，所有变体均以大致相同的程度与血红素结合。

[0640] 图7.保护K562细胞免于血红素引起的细胞死亡。

[0641] 在稀释系列的A1M(0-10μM)的存在下将K562细胞暴露于100μM的血红素1小时。然后，随着向培养基中释放LDH对细胞死亡进行监控。将活细胞的吸光度值扣除，并将在不存A1M的情况下经血红素孵育的细胞的信号设定为100％。相对于其计算各A1M孵育物的值。该分析一式两份进行。图中示出了三个独立实验的平均结果(平均值+/-SEM)。在任何变体之

间未能观察到显著差别,除了未标记的R66H+N17,96D-A1M,其具有比未标记的wt-A1M更低的活性。

[0642] 图8.在+4℃和室温下储存之后M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M和M8H4DK-wt-A1M的尺寸分布和还原酶活性。

[0643] M8H4DK-wt-A1M和M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M分别描述为“wt”和“变体35”,并分别显示于上部图片和下部图片中。通过SEC-FPLC对聚集进行分析。单体A1M和大聚集物分别于约15ml和8ml洗脱。在约13-14ml观察到的小肩峰最有可能是二聚的A1M。大聚集物的百分比由8ml峰下的面积与总的峰面积的对比来计算。应激接触(stress exposure)之后的蛋白回收率(%;以斜体显示)由总的峰面积与原料总的峰面积的对比来计算。在2μM的A1M溶液中分析ABTS的还原活性。数据显示为各份的平均值。(A)中显示新融化的100μM的A1M溶液,(B)中显示进行5次冻融循环的100μM的A1M,(C)中显示在+4℃下储存过夜的1mM的A1M,(D)中显示在+4℃下储存一周的1mM的A1M,(E)中显示在室温下储存一周的100μM的A1M,(F)中显示在室温下储存一周的1mM的A1M。数据显示M8H4DK-R66H+N1796D更好的耐受浓度,可到1mM(C和D),并更好地耐受储存,可在室温下储存(E和F)。

[0644] 图9.在+37℃下储存之后1mM的M8H4DK-wt-A1M和M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M的尺寸分布和还原酶活性。

[0645] Wt-A1M和R66H+N17,96D-A1M分别描述为“ht2014”和“35”并分别显示于上部图片(panel)和下部图片中。通过SEC-FPLC对聚集进行分析。单体A1M和大聚集物分别在20分钟和12分钟洗脱。在约18-19分钟观察到的小肩最可能是二聚的A1M。大聚集物的百分比由12分钟峰下的面积与总的峰面积的对比来计算。应激接触之后的蛋白回收率(%;显示为斜体)由总的峰面积与原料总的峰面积的对比来计算。在2μM的A1M溶液中分析ABTS的还原活性。数据显示为各份的平均值。储存1.5小时(B)、2.5小时(C)和4.5小时(D)的1mM的A1M溶液与1mM的A1M原料(A)对比。4.5小时的M8H4DK-wt完全沉淀,不能进行分析。数据显示M8H4DH-R66H+N1796D在+37℃下比M8H4DK-wt更好地耐受储存。

[0646] 图10.A1M的结构模型。模型如所描述的那样制作(参考29)。显示为条带的8条β链形成具有疏水性内部的略微锥形的圆柱体:“脂质运载蛋白口袋”。脂质运载蛋白口袋的一侧是敞开的(通过箭头显示),即它容许小分子进入。相对侧是关闭的。2条α-螺旋显示为圆柱体。3个碳水化合物基团(T5;N17;N96)和涉及还原酶活性的4条侧链(C34;K92;K118;K130)的位置被示出。

[0647] 图11

[0648] 通过非变性PAGE上的迁移偏移/荧光淬灭(A和B)和UV-吸光度分光光度法(C)对血红素-结合进行分析。A.15μg的M8H4DK-wtA1M(wt-A1M)或M8H4DK-35-A1M(35-A1M)在20℃下用不同量的血红素孵育30分钟,通过非变性PAGE分离,并在Coommassie染色(Stain)之后通过色氨酸荧光(Flourescence)和光密度扫描进行凝胶分析。B.使用Image Lab™ Software(Bio-Rad)将图像数字化。测量为荧光淬灭(黑色)和迁移距离(蓝色)的血红素结合相对于摩尔比A1M:血红素作图。重复实验的平均值显示为wt-A1M(实心符号)和35-A1M(空心符号)。C.将A1M与血红素混合(分别为32μM和19μM),在20℃下孵育2小时,并扫描。显示32μM下单独的蛋白的吸光度作为对比。将缓冲液(pH 8.0的20mM的Tris-HCl+0.15M的NaCl)的吸光度作为空白从所有扫描扣除。

[0649] 图12

[0650] M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)和M8H4DK-35-A1M(35-A1M)的酶特性的对比。A.新纯化的各种浓度下的wt-A1M(■)或35-A1M(○)与56μM的ABTS-自由基在微量滴定板各孔中pH 8.0的25mM的磷酸钠缓冲液中混合,通过在95秒过程中读取405nm下的吸光度对还原速率进行追踪。每个浓度的吸光度相对于时间作图,计算每个浓度曲线下0秒与95秒之间的面积(AUC)。通过扣除单独的缓冲液的AUC计算净AUC。示出了三次重复的平均值+/-SEM。B.ABTS的还原速率如A中确定,但是在4℃或室温下储存7天之后使用wt-A1M(■)或35-A1M(○)和0.1mM或1mM。示出了各个单独的实验。

[0651] C.通过将稀释系列(0-10μM)的wt-A1M(■)或35-A1M(○)与100μM的细胞色素c+100μM的NADH混合并追踪550nm下的吸光度增加20分钟对细胞色素c的还原进行研究。该分析一式两份进行。计算每个浓度的AUC,并通过扣除单独的缓冲液的AUC计算净AUC。数据以两个独立实验的净AUC+/-SEM给出。卵白蛋白用作阴性对照。

[0652] D.在ORAC分析中对抗氧化能力进行研究。将5μM下A1M变体的活性与Trolox标准物进行对比,并表达为Trolox当量的数量。每个分析一式三份进行,并将wt-A1M的结果设为100%。所给出的数据是两个独立实验的平均值+/-SEM。

[0653] 图13

[0654] K562细胞在96孔微量滴定板中以10^5个细胞每孔进行培养,在稀释系列的M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)或M8H4DK-35-A1M(35-A1M)(0-10μM)的存在下与100μM的血红素接触1小时。随着LDH释放到培养基中对细胞死亡进行监控。将活细胞的LDH-值扣除,将不具有A1M的血红素孵育的细胞的信号设为100%,并相对于其计算A1M孵育物的值。该分析一式两份进行。示出了三个独立实验的平均结果(平均值+/-SEM)。Wt-A1M(■)或35-A1M(○)。

[0655] 图14

[0656] 在同时添加或者不添加0-20μM的M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)(示为■和黑色柱)或M8H4DK-35-A1M(35-A1M)(示为○和白色柱)的情况下将HK-2细胞暴露于200μM的$(NH_4)Fe(SO_4)_2$、400μM的过氧化氢和2mM的抗坏血酸盐的混合物(Fenton反应,在A和B中示出)或者暴露于0-30μM的血红素(在C和D中示出)6小时。孵育之后,如材料和方法中使用WST-1(在A和C中示出)或HO-1和Hsp70的mRNA表达(在B和D中示出)对细胞分析细胞存活率。相对于来自未处理细胞的对照样品将细胞存活率(A和C)归一化。各结果来自三个重复实验,并以平均值±SEM给出。相对于GAPDH将HO-1和Hsp70的mRNA表达(B和D)归一化,并以倍数变化给出。通过相对于来自未处理细胞的对照样品归一化来计算倍数变化值。各结果来自三个重复实验,并以平均值±SEM给出。相应的暴露条件与对照条件之间的差别使用具有事后Bonferroni校正的单向方差分析进行分析。*表示相对于Fenton(在B中示出)或血红素(在D中示出)的统计比较。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。当wt-A1M与35-A1M对比时未观察到显著差别。

[0657] 图15

[0658] 静脉内注射到动物中的M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)和M8H4DK-35-A1M(35-A1M)的血浆清除率(药代动力学,在A中示出)和生物分布(在B中示出)。A.向Wistar大鼠中注射(5mg/kg)Wt-A1M(■)或35-A1M(○)并在规则间隔收集血液。使用特定的A1M变体作为标准物通过RIA确定A1M-浓度。每个点均来自3只动物,并以平均值±SEM给出。B.向C57BL/6NRj-小鼠中

静脉内注射(5mg/kg)Wt-A1M或35-A1M,注射10分钟和30分钟后将小鼠处死。对器官进行采样,称量并均化。通过夹心ELISA确定注射的(人)A1M的浓度。每个柱均来自3个动物,并以平均值±SD给出。Wt-A1M,10分钟(黑色)和30分钟(深灰色);35-A1M,10分钟(白色)和30分钟(浅灰色)。

[0659] 图16

[0660] 将雌性C57BL/6小鼠暴露于甘油(2.0ml/kg,肌肉内),接着在注射甘油30分钟后静脉内施用M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)(深灰色柱,n=10)、M8H4DK-35-A1M(35-A1M)(白色柱,n=10)或载体缓冲液(假对照,灰色柱,n=6)。在4小时(施用甘油之后),将动物安乐死,将肾脏剪除,急速冷冻,并随后如材料和方法中使用实时PCR分析HO-1(A)和Hsp70(B)的mRNA表达。相对于GAPDH的那些将mRNA表达归一化,并通过相对于来自未处理动物的对照样品(对照)归一化来计算倍数变化值。各结果以箱形图给出,显示中间值以及第25和第75个百分位。通过具有事后Bonferroni校正的方差分析进行各组之间的统计比较。*表示相对于甘油的统计比较。*P<0.05,**P<0.01。当wt-A1M与35-A1M对比时未观察到显著差别。

[0661] 在以下实例中进一步对本发明进行说明。各实例都是说明性的,并不以任何方式限制本发明的范围。

[0662] 实验

[0663] 实验工作分成3个主要阶段:

[0664] I期)对以上27种A1M变体进行表达,接着分析溶解性、稳定性和功能;

[0665] II期)对根据1期结果具有预期的最佳特性的几种A1M变体进行设计、表达和分析;

[0666] III期)对wt-A1M以及具有或不具有N端标记的突变最成功的A1M变体进行设计、表达和分析。

[0667] 在I期中,在选择突变氨基酸侧基团的位置和标识时使用了四条推理路线:1)在氧化应激、温度、氧压方面具有不同的预期环境压力的各种物种的动物同源物被表达(N=12);2)在位于疏水性口袋的环1-4或内表面的位置处的56个依次排列的A1M-同源物中频繁发生的单氨基酸取代被引入人类基因构建体中并进行表达(N=3);3)对位于有利位置的赖氨酰基或酪氨酸基残基进行添加或去除,这要基于它们可影响C35硫醇基的pKa(Allhorn等人,2005)或者充当自由基捕获位点(Berggård 等人,1999;Sala等人,2004;Åkerström 等人2007)的假设(N=5);4)蛋白表面上的疏水性→亲水性取代,预计不会影响功能或折叠(N=7)。

[0668] 材料和方法

[0669] 表达

[0670] 将A1M变体的序列提供给DNA2.0,Inc.(美国),其合成基因并将其克隆到其PJ401表达载体中(T5启动子,卡那霉素抗性)。通过测序对DNA序列进行确定。根据制造商的说明将各载体转化到感受态大肠杆菌(BL21Star(DE3)(Invitrogen,Lifetechnologiescorp,美国))中,并对每个变体的四个单独的克隆测试微观表达。每种变体具有最高表达的克隆制备为甘油储备,其用来产生表达。

[0671] A1M变体表达克隆在完全NYAT(15mM的$(NH_4)_2SO_4$,84mM的K_2HPO_4,23mM的$NaH_2PO_4xH_2O$,2.2mM的柠檬酸氢二铵,1%(w/v)的葡萄糖,2mM的$MgSO_4$,9μM的$CaCl_2x2H_2O$,85μM的$FeCl_3x6H_2O$,1.3μM的$ZnSO_4x7H_2O$,1.3μM的$CuSO_4x5H_2O$,1.8μM的$MnSO_4xH2O$,1.5μM的

$CoCl_2x6H_2O$,108μM的EDTA,50μg/ml的卡那霉素)中生长到OD_{600}为1.5。然后通过添加1mM的IPTG诱导蛋白的表达。产生进行4小时。在诱导之前以及诱导1小时、2小时、3小时和4小时之后取样进行SDS-PAGE分析。

[0672] 纯化

[0673] 来自培养物的细菌通过在5000rpm下离心分离收集15分钟。细菌沉淀通过5次冻融循环裂解,在pH 8.0的20mM的Tris-HCl中稀释3次,并进行超声处理。包涵体(IB)通过在6000rpm下离心分离收集30分钟,并通过3次更多循环的再悬浮和离心分离进行洗涤。为了进行提取,将IB再悬浮于6M的盐酸胍、pH 8.0的20mM的Tris-HCl(6M的Gu-HCl)中,并在+4℃下搅拌孵育过夜。通过在26000g下高速离心分离将提取物澄清60分钟。保存上清液以便进行进一步的澄清,同时将沉淀进行另一循环的提取。将提取物的上清液合并,并通过深度过滤器过滤(置于KS50P过滤器顶部的K700P过滤器,PallCorp.,美国)进一步澄清。澄清后的提取物中的A1M使用Ni-琼脂糖树脂(Sigma-Aldrich,美国)纯化。简而言之,将树脂装填到10-ml一次性色谱柱(Bio-Rad,美国)中,并用6M的Gu-HCl平衡。使用所收集的自由流液和流通液将A1M提取物上样到柱上。该柱用5倍柱体积的6M的Gu-HCl洗涤,然后用4倍体积的6M的Gu-HCl+0.5M的咪唑洗脱。原料、流通液和洗脱的级分使用乙醇沉淀,溶解在1xSDS-PAGE加载缓冲液中,并通过SDS-PAGE分离。如果流通液含有显著量的A1M,那么就重复该纯化程序。提取物的蛋白含量通过280nm下的吸光度确定。

[0674] 将Ni-琼脂糖洗脱液稀释到A_{280}大约为5.0,并在重折叠之前冷却到+4℃。然后将洗脱液与2/3体积的pH 9.5的20mM的Tris-HCl+0.1M的NaCl中0.275M的L-半胱氨酸混合。然后迅速添加16.7倍体积的重折叠缓冲液。最终的缓冲液浓度为:(0.2mg/ml A1M,0.1M的Tris,0.6M的NaCl,0.45M的L-精氨酸,2mM的EDTA,10mM的L-半胱氨酸和1mM的L-半胱氨酸,pH 9.5)。然后在+4℃下将该混合物搅拌1小时,并使用Centricon plus 70,10K Ultrafiltration Devices(Merck Millipore;美国)将溶液浓缩到A1M溶液的初始体积。浓缩之后,使用同样的装置通过10次连续的2.5x稀释/浓缩循环将A1M溶液渗滤到pH 8.0的20mM的Tris-HCl中。渗滤之后,通过在15000g下离心分离将该溶液澄清15分钟,然后通过0.2μm的过滤器。

[0675] 立即将重折叠的A1M施加到5ml Bio-Scale Mini UNOsphere Q Cartridge(Bio-Rad),用pH 8.0的20mM的Tris-HCl平衡。根据Bio-Rad针对盒的说明将柱在ÄKTA纯化器10仪器(GE Healthcare,美国)上运行。将样品上样之后,将柱用5倍柱体积(CV)的pH 8.0的20mM的Tris-HCl洗涤,然后用20倍CV的从0M的NaCl到0.35M的NaCl的线性梯度洗脱。最后,将柱用3倍CV的1M的NaCl洗涤。在线性梯度过程中收集的流通液和所选级分通过SDS-PAGE进行分析。立即将具有剩余的A1M的流通液在新的柱上再次运行,并将含A1M的级分合并,浓缩到100μM,无菌过滤,并在-20℃下等份冷冻。

[0676] 凝胶电泳

[0677] SDS-PAGE根据Laemmli(Laemmli,1970)使用标准方案运行。蛋白在300V下在无染色的4-20%TGX凝胶(Bio-Rad)上分离17分钟。非变性PAGE在无SDS并且无染色的4-20%TGX凝胶上无还原剂的情况下在200V下运行40分钟。在Chemidoc MP仪器(Bio-Rad)上对凝胶进行分析。

[0678] 圆二色性

[0679] 在2-mm小池中pH 8.0的20mM的Tris-HCl+0.15M的NaCl中10μM的溶液的Jasco-J180荧光分光计仪器(JASCOInc.,日本)上记录圆二色性光谱。溶液在+22℃下在190nm与260nm之间扫描。将每个样品三次运行的结果重叠。使用http://k2d3.ogic.ca软件计算α螺旋和β折叠结构的百分比。

[0680] SEC-FPLC

[0681] 在ÄKTA纯化器10仪器上使用24-ml Superose 12 10/30 GL柱(GE Healthcare)通过尺寸排除对蛋白进行分析。使用1ml/min的流速将柱用pH 8.0的20mM的Tris-HCl+0.15M的NaCl平衡。以100μl的体积将100-200μg蛋白上样到柱上,并使用0.75ml/min的流速使用pH 8.0的20mM的Tris-HCl+0.15M的NaCl洗脱。通常,单体A1M在15ml/20分钟之后被洗脱,二聚A1M在13-14ml/18-19分钟之后被洗脱,大聚集物在8ml/12分钟之后被洗脱。大聚集物的百分比由8-ml峰下的面积与总的峰面积的对比来计算。压力处理(参见以下)之后从柱上收回的总蛋白的百分比通过将经处理样品的总的峰面积与未处理样品的总的峰面积对比来计算。

[0682] RP-HPLC

[0683] 在Agilent 1260Infinity Binary LC系统上使用Aeris Wildpore 3.6μM的XP-C8柱(Phenomenex Inc.,美国)运行反相HPLC。该柱在+25℃下使用1ml/min的流速运行,并使用70%H_2O+0.1%TFA和30%乙腈+0.1%TFA的混合物平衡。上样10μl(=10μg蛋白),并在20分钟内使用30-50%的乙腈的线性梯度洗脱。通过使用95%的乙腈洗涤10分钟将柱再生。

[0684] 动态光散射

[0685] 未受应激(stress)的样品和受到剪切应激的样品的动态光散射(DLS)分析使用SARomics Biostructure AB,Lund的服务进行。在+20℃下在Malvern APS仪器上对pH 8.0的10mM的Tris-HCl+0.125M的NaCl中稀释为10μM的A1M样品进行分析。各样品一式两份制备,每个样品检查3次。

[0686] 差示扫描荧光测定法

[0687] 使用SARomics Biostructure AB,Lund的服务通过差示扫描荧光测定法(DSF)对A1M变体的热稳定性进行分析。将pH 8.0的10mM的HEPES+0.125M的NaCl中稀释为4.4μM的A1M与SYPRO Orange混合(总共1000x的SYPRO Orange稀释)。分析一式两份进行,并计算平均熔融温度(T_m)。

[0688] 通过剪切力引入应激

[0689] 使用0-10μl吸液头通过多通道吸液管吸液80次将10μl的100-μM的A1M溶液暴露于剪切力应激。应激处理一式多份进行。吸液之后,将各份合并,并稀释10倍,然后如使用DLS进行分析。

[0690] 高浓度-引起的应激

[0691] 在高浓度下分析A1M的溶解性和稳定性。使用Amicon Ultra-0.5,10K Devices(Merck Millipore)通过在14000g下离心分离10分钟将500μl的100μM的A1M溶液浓缩10倍到50μl。浓缩之后,使用相应的流通液将体积校正到恰好50μl。在非变性PAGE上对浓缩的样品和未浓缩的样品(10μg)进行并排对比。在浓缩之前通过将样品渗滤检查不同缓冲液的影响。这通过在Amicon Ultra-15,10K Devices中5个循环的10倍稀释/浓缩来进行。

[0692] 游离硫醇的定量

[0693] A1M变体的游离硫醇使用Molecular Probes的“硫醇和硫化物的定量试剂盒”确定。该分析在96孔板中根据试剂盒手册进行。将某一体积的3μl标准物或A1M(100μM)与3μl胱胺工作溶液(worksolution)、100μl木瓜蛋白酶-SSCH、100μl L-BAPNA混合。该分析读取为405nm下的吸光度。

[0694] ABTS还原分析

[0695] 该分析是(Åkerström等人2007)的改写。7mM的2,2连氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(Sigma-Aldrich)用2.45mM的$K_2S_2O_8$过夜氧化,然后在pH 8.0的25mM的磷酸钠缓冲液中稀释到56μM。向96孔板的每孔中添加100μl的ABTS工作溶液。使用Perkin Elmer Plate Reader在A_{405}下进行零时间点测量。通过多通道吸液管迅速添加2μl的A1M溶液(0-100μM)。迅速追踪405nm下吸光度降低的动力学,进行95秒。为了切实可行,这时只分析8个孔。A1M稀释系列一式两份或者一式三份进行。如果待分析样品的数量需要几个板来进行,那就将新的ABTS储备稀释成用于每个板的工作储备,并在所有板中包括wt-A1M参考样品。每个浓度的吸光度相对于时间作图,计算每个浓度曲线下的面积(AUC)。通过扣除单独的缓冲液的AUC计算净AUC。

[0696] 氧自由基抗氧化能力(ORAC)分析

[0697] 商用试剂盒OxySelect™ Oxygen Radical Antioxidant Capacity(ORAC)活性分析(CellBiolabs,Inc。美国)基于过氧基自由基对荧光探针的氧化和破坏。当存在抗氧化剂时,该破坏就会受到抑制。作为标准物,使用水溶性的维他命E衍生物Trolox。按照试剂盒手册进行操作、分析和计算,2.5-5μM的A1M浓度很好地拟合到标准曲线。卵白蛋白(Sigma-Aldrich)用作阴性蛋白对照。

[0698] 细胞色素c的还原分析

[0699] 该分析是(Allhorn等人2005)的改写。通过将100μM的细胞色素c(Sigma-Aldrich)与100μM的NADH在pH 8.0的10mM的Tris-HCl+0.125M的NaCl中混合制备工作溶液。一式两份向96孔板中添加11μl的A1M溶液(0-100μM)。使用多通道吸液管迅速向每孔中添加100μl的细胞色素c工作溶液。追踪550nm下吸光度增加的动力学,进行20分钟。这时分析一个板。未能观察到时间偏差。如果要分析几个板,那么全部使用同样的工作溶液,该程序不会导致任何可观察到的人为缺陷。测量之后,如ABTS分析对各结果进行分析。

[0700] 红移分析

[0701] 将游离血红素结合到A1M中会产生Soret条带吸收峰的红移(Karnaukhova等人,2014;Rutardottir等人,2016),并在A1M-突变体中评估为A_{413}/A_{386}比。将pH 8.0的20mM的Tris-HCl+0.25M的NaCl中44μM的A1M与40μM的游离血红素(Applichem)混合。孵育一式两份进行,并在室温下孵育2小时。通过在Beckman分光光度计中进行波长扫描在稀释4倍的样品中对红移进行分析。计算各份的平均最高峰以及413与386nm下的吸光度的平均比例。卵白蛋白和单独的缓冲液用作阴性对照。

[0702] A1M与血红素-琼脂糖的特异性结合

[0703] 通过如改善(Rutardottir等人,2016)的(Larsson等人,2004)的方法对A1M与血红素-琼脂糖的结合进行分析。血红素-琼脂糖(Sigma-Aldrich)和对照Sepharose 4B(Sigma-Aldrich)用pH 8.0的20mM的Tris-HCl+0.25M的NaCl平衡,并制备为50%的浆液。将75μl的A1M稀释系列(0-13.3μM)添加到两个96孔板中(一个板用于血红素琼脂糖,一个用于对照

Sepharose)。通过小心吸液以确保转移类似的量将20μl的血红素-琼脂糖och对照Sepharose浆液添加到各孔中,并在旋转搅拌过程中在室温下孵育30分钟。将该混合物小心转移到AcroPrep Advance 96孔过滤板-1.2μm Supor Membrane(Pall Corp)中。在1000g下将各板离心2分钟,从而将流通液收集到低结合微板中。使用Pierce BCA Protein Assay试剂盒(Thermo Scientific Inc.,美国)分析25μl的每个流通液以及未孵育的原料的蛋白含量。对于血红素-孵育的样品和对照Sepharose孵育的样品将蛋白的量重新计算为结合的量(流通液中增加的减少的量(added minus amount))。扣除与对照Sepharose结合的量之后,与血红素琼脂糖特异性结合的量相对于增加的量作图。通过线性回归计算曲线的斜率。使用各份的标准偏差来评估各A1M变体之间的差异显著性。

[0704] M8H4DK-wt A1M(Wt-A1M)和M8H4DK-35-A1M(35-A1M)的血红素结合

[0705] 如前所描述的,通过非变性PAGE(Karnaukhova等人,2014)和UV-分光光度法(Ruttarsdottir等人,2016)对血红素结合进行分析。简而言之,对于非变性PAGE,A1M和各种浓度的血红素在室温下在pH 8.0的Tris-缓冲液中孵育30分钟,通过非变性PAGE在200V下在无染色的12%Criterion TGX凝胶上分离40分钟。各凝胶条带在用于色氨酸荧光的Chemidoc MP仪器(Bio-Rad)上使用无染色设置进行分析,使用Coommassie Brilliant Blue染色,脱色,并再次使用Coommassie设置在Chemidoc上成像。然后使用Image Lab™ Software(Bio-Rad)对两组条带进行定量。然后将血红素结合估算为Coommassie染色之后相对于总蛋白量淬灭色氨酸荧光的量。在22℃下在Beckman(Beckman Instruments,加利福尼亚州富勒顿)DU800分光光度计上使用600nm/min的扫描速率在250nm与700nm之间的UV-VIS区对吸收光谱进行测量。A1M和血红素的浓度分别为32μM和19μM,在pH 8.0的20mM的Tris-HCl、0.15M的NaCl中。从DMSO中10mM的储备溶液添加血红素。混合2小时之后对蛋白溶液进行扫描。

[0706] 血浆清除率和生物分布

[0707] 对于血浆清除率研究,将每种A1M变体静脉内(i.v)注射到6只雄性Wistar大鼠中(5.0mg/kg;储备溶液,在pH 8.0的20mM的Tris-HCl中),在注射后1分钟、5分钟、15分钟、30分钟,和1小时、3小时、6小时、16小时和24小时取血液样品到EDTA管中,在三只大鼠的组中使用不同的采样间隔以避免过采样。在140xg下离心分离10分钟之后抽吸血浆,并如(Gram等人2015)使用特定的A1M变体作为标准物通过辐射免疫检验(RIA)确定A1M的浓度。对于生物分布研究,将A1M变体静脉内注射到C57BL/6NRj小鼠中(5.0mg/kg;储备溶液,在pH 8.0的20mM的Tris-HCl中)。注射10分钟(n=3)和30分钟(n=3)之后将小鼠处死。对器官进行采样,称量,并在5:1(体积:重量)的Cell Extraction Buffer(Invitrogen,目录号FNN0011)中均化,Cell Extraction Buffer含有50μl/ml的cOmplete Mini,不含EDTA的蛋白酶抑制剂鸡尾酒片剂(Roche,目录号11836170001)。通过内部开发的夹心ELISA确定A1M-浓度。简而言之,96孔微量滴定板在4℃下用小鼠单克隆抗-A1M(克隆35.14,5μg/ml,在PBS中)包被过夜,洗涤,然后在室温下用A1M-标准物(如在我们的实验室纯化(Åkerström等人,1995)的人尿A1M,或者均化的组织样品,在孵育缓冲液(PBS+0.05%Tween20+0.5%牛血清白蛋白)中稀释)孵育60分钟。洗涤之后,各孔在室温下用辣根过氧化物酶-缀合的小鼠单克隆抗-A1M(克隆57.10,5ng/ml,在孵育缓冲液中)孵育60分钟。将各板洗涤,并通过使用SureBlue TMB Microwell Peroxidase Substrate(KPL)在黑暗中孵育20分钟来显色,最终

用1M的硫酸终止。在Wallac 1420 Multilabel Counter中在450nm下读取吸光度。AgriSera AB(瑞典文奈斯)生产了两种抗人尿A1M的小鼠单克隆抗体。ELISA对于人A1M是特异性的,未与内源性的小鼠血浆A1M交叉反应,与人尿A1M、M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)和M8H4DK-35-A1M(35-A1M)同样好地反应。

[0708] 横纹肌溶解症引起的肾脏损害

[0709] 该研究由Malmö-Lund的动物研究伦理委员会批准,no.M21-15。从Taconic(丹麦)获得的体重为20.5±0.7g的雌性C57BL/6小鼠以12小时的光照黑暗循环在恒定的温度下圈养在带有铁丝盖的III型笼子中。在整个研究中维持温度(20±0.5℃)和相对湿度(50±5%)。所有动物自由接触食物(RM1(E)SQC,SDS,英格兰)、饮用水和笼富集物。禁水过夜(15小时)之后,将动物称量,并使用异氟烷麻醉,然后分配到以下四组中:1)对照(n=6),不接受肌肉内(i.m.)或静脉内(i.v.)给药;2)甘油(n=10),肌肉内施用50%的消毒甘油(Teknova,Hollister,CA,USA)(2.0ml/kg体重,单次剂量,分到两条后肢中);3)甘油+M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)(n=10),肌肉内施用甘油(2.0ml/kg体重)30分钟之后静脉内施用wt-A1M(7mg/kg体重,单次剂量);4)甘油+M8H4DK-35-A1M(35-A1M)(n=10),肌肉内施用甘油(2.0ml/kg体重)30分钟之后静脉内施用35-A1M(7mg/kg体重,单次剂量)。肌肉内给药之后,在醒来过程中将动物置于头垫上,然后放回它们的笼子中,并提供可自由接触的食物和水。4小时(甘油注射之后)之后,使用异氟烷将动物麻醉,收集肾脏,以便如下所描述的提取RNA并评估mRNA。

[0710] RNA分离和实时PCR

[0711] 使用由Zymo Research(Irvine,CA,USA)提供的Direct-zol™ RNA MiniPrep从HK-2细胞分离总RNA,或者使用NucleoSpin RNA/Protein(Machery-Nagel,Duren,Germany)接着使用RNeasy® Mini Kit(QIAGEN,Germantown,MD,USA)从小鼠肾脏分离总RNA。RNA的OD比(260nm/280nm下的光学密度比例)一直都高于1.9。根据制造商使用iScript™ cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad,CA,USA)在1.0μg总RNA上进行逆转录。使用RT^{2}qPCR Primer Assay(人类(HK-2细胞)和小鼠(肾脏)引物,来自QIAGEN)对血红素加氧酶1(HO-1)和热休克蛋白70(Hsp70)的mRNA表达进行定量。数据归一化为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(人类(HK-2细胞)和小鼠(肾脏)的GAPDH,来自QIAGEN的RT^{2}qPCR Primer Assay)。数据以柱给出,对于体外数据和箱形图显示平均值±SEM,对于体内数据显示中间值以及第25和第75个百分位。通过相对于来自未处理细胞或动物的对照样品(对照)进行归一化来计算倍数变化值。使用iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix(Bio-Rad)对表达进行分析。如制造商(Bio-Rad)在iCycler Thermal Cycler(Bio-Rad)中扩增40个循环,并使用iCycler iQ Optical System Software(Bio-Rad)对数据进行分析。

[0712] 保护K562细胞免于血红素引起的细胞死亡

[0713] 之前显示A1M会抑制血红素引起的人红细胞系K562细胞的细胞死亡(Olsson等人,2008)。根据ATCC的指导将细胞在DMEM中用Glutamax+10%FCS和抗生素(Gibco,Life Technologies Corp.,美国)培养。将细胞洗涤,并再悬浮于无酚红和FCS但是用Glutamax I和抗生素(Gibco)补充的DMEM中。将细胞以10^5个细胞每孔种到96孔板中,并在0-10μM的A1M稀释系列的存在下暴露于100μM的血红素。作为细胞死亡的阳性对照,添加10μl来自LDH检测试剂盒的裂解溶液(参见以下)。将细胞在37℃的CO_2-保温箱中孵育1小时。迅速在350g下

将各板离心4分钟，然后将50μl培养基转移到96孔微板中，以便根据制造商的指导使用cytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay(Promega Biotech AB，瑞典)对LDH的释放进行分析。血红素诱导的细胞通常给出比活细胞高7倍的信号和完全裂解的细胞的信号的70％。将在不添加血红素或者不添加A1M的情况下孵育的细胞的平均信号从全部信号扣除，并将仅使用血红素孵育的细胞的信号设为100％。所有其他信号与该值相关。该程序使得能够对几个独立的实验进行对比。

[0714] HK-2细胞的保护

[0715] 人肾皮质层近端小管上皮细胞(HK-2，ATCC®CRL-2190，ATCC，Teddington，UK)在用牛垂体提取物(BPE，0.05mg/ml)和表皮生长因子(5ng/mL)(全部来自Invitrogen，Paisley，UK)补充的无角化细胞血清的培养基(K-SFM)中培养。当细胞达到大约80-90％的汇合时，在同时添加或者不同时添加A1M(0-20μM，M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)和M8H4DK-35-A1M(35-A1M))的情况下添加血红素(0-30μM，来自新制的10mM的储备溶液)或者$(NH_4)Fe(SO_4)_2$、过氧化氢和抗坏血酸盐的混合物(0-200μM，Fenton反应)，并将细胞孵育6小时。孵育之后，根据制造商的说明使用WST-1对细胞分析细胞存活率(测量的细胞新陈代谢活性，例如WST-1稳定的四唑盐切割为可溶甲染料的细胞切割的测量与存活细胞的数量直接相关)(RocheDiagnostics GmbH，Mannheim，Germany)。细胞存活率相对于未处理细胞的对照样品进行归一化。使用Qiazol™ Lysis Reagent(用于提取RNA，QIAGEN，Germantown，MD，USA)收集平行培养物。从细胞提取总RNA，以便如下对mRNA的表达进行评估。

[0716] 统计

[0717] 通过具有事后Bonferroni校正的方差分析进行不相关的各组之间的对比。P-值<0.05被认为是显著的。

[0718] 结果与讨论

[0719] 项目概览

[0720] 该研究的目的是确定更稳定和更可溶的功能特性保留的A1M变体。该项目以三个阶段进行。在I期中，对不同物种的A1M和人A1M的点突变进行筛选，以确定对稳定性具有积极作用而又不会对功能造成损害的单独氨基酸。在II期中，将在I期中显示具有积极作用的各氨基酸结合，以便找到甚至更佳的组合。最后在III期中，对I期和II期的数据进行确认，并研究不同N端标记的作用。在所有3个阶段中，各蛋白使用相同的载体和纯化方案在相同的大肠杆菌系统中表达。在每个阶段中使用类似的方案和程序对所有变体平行进行表达、纯化和分析。每期的分析组合概括于表1中。所有构建体的氨基酸序列和DNA序列均可在以下找到。

[0721] 表1.在A1M变体项目的不同阶段中进行的分析

[0722]

	分析	I 期	II 期	III 期
1	SDS-PAGE（识别，纯度）	x	x	x
2	280 nm 下的吸光度（量）	x	x	x
3	圆二色性（同一性）	x		
4	PAGE（聚集分析）	x	x	x
5	SEC-FPLC（聚集分析）		x	
6	DLS（聚集分析）	x		x
7	RP-HPLC（纯度，聚集分析）			x
8	DSF（热稳定性）	x		x
9	剪切稳定性（DLS 分析）	x		x
10	浓度稳定性（PAGE 分析）	x	x	x
11	浓度稳定性其他缓冲液（PAGE 分析）			x
12	冻融稳定性，冰箱中的储存延长，室温，+37°C（SEC-FPLC，ABTS 还原）*		x	
13	游离硫醇的定量	x		
14	ABTS 自由基的还原能力	x	x	x
15	氧自由基抗氧化能力（ORAC）			x
16	细胞色素 c 的还原能力			x
17	游离血红素的还原/结合能力	x	x	x
18	血红素-琼脂糖的结合能力	x	x	x
19	防止 K562 细胞免于血红素引起的细胞死亡		x	x

[0723] *仅在人wt和M8H4DK-R66H+N1796D变体上进行。

[0724] 所有构建体的氨基酸序列：

[0725] 60.M8H4DK-人wt(rhA1M)(SEQ ID NO:9)

[0726] MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0727] 1.M8H5GIEGR-小鼠(SEQ ID NO:24)

[0728] MHHHHHHHHGGGGGIEGRDPASTLPDIQVQENFSESRIYGKWYNLAVGSTCPWLSRIKDKMSVQTLVLQEGATETEISMTSTRWRRGVCEEITGAYQKTDIDGKFLYHKSKWNITLESYVVHTNYDEYAIFLTKKSSHHHGLTITAKLYGREPQLRDSLLQEFKDVALNVGISENSIIFMPDRGECVPGDREVEPTSIAR

[0729] 2.M8H5GIEGR-裸鼹鼠(SEQ ID NO:25)

[0730] MHHHHHHHHGGGGGIEGRNPVPMPPDNIQVQENFDESRIYGKWFNLATGSTCPWLKRIKDRLSVSTMVLGKGTTETQISTTHTHWRQGVCQETSGVYKKTDTAGKFLYHKSKWNVTMESYVVHTNYDEYAIILTKKFSHHHGPTITAKLYGREPRLRDSLLQEFREMALGVGIPEDSIFTMANRGECVPGDQAPESTPAPR

[0731] 3.M8H5GIEGR-青蛙(SEQ ID NO:26)

[0732] MHHHHHHHHGGGGGIEGRCSPIQPEDNIQIQENFDLQRIYGKWYDIAIGSTCKWLKHHKEKFNMGTLELSDGETDGEVRIVNTRMRHGTCSQIVGSYQKTETPGKFDYFNARWGTTIQNYIVFTNYNEYVIMQMRKKKGSETTTTVKLYGRSPDLRPTLVDEFRQFALAQGIPEDSIVMLPNNGECSPGEIEVRPRR

[0733] 4.M8H5GIEGR-鸡(SEQ ID NO:27)

[0734] MHHHHHHHHGGGGGIEGRTPVGDQDEDIQVQENFEPERMYGKWYDVAVGTTCKWMKNYKEKFSMGTLVLGPGPSADQISTISTRLRQGDCKRVSGEYQKTDTPGKYTYYNPKWDVSIKSYVLRTNYEEYAVILMKKTSNFGPTTTL

KLYGRSPELREELTEAFQQLALEMGIPADSVFILANKGECVPQETATAPER

[0735] 5.M8H5GIEGR-兔(SEQ ID NO:28)

[0736] MHHHHHHHHGGGGGIEGRDPVPTLPDDIQVQENFELSRIYGKWYNLAVGSTCPWLKRIKDRMAVSTLVL GEGTSETEISMTSTHWRRGVCEEISGAYEKTDTDGKFLYHKAKWNLTMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRRHGPTIT AKLYGREPQLRESLLQEFREVALGVGIPENSIFTMIDRGECVPGQQEPKPAPVLR

[0737] 6.M8H5GIEGR-松鼠猴(SEQ ID NO:29)

[0738] MHHHHHHHHGGGGGIEGRSPVPTPPEGIQVQENFNLSRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRLKVSTLVL EEGATEAEISMTSTRWRKGFCEQTSWAYEKTDTDGKFLYHEPKWNVTMESYVAHTNYEEYAIFLTKKFSRHHGPTIT AKLYGREPQLRESLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMANRGECVPGEQEPQPILHRR

[0739] 7.M8H5GIEGR-海象(SEQ ID NO:30)

[0740] MHHHHHHHHGGGGGIEGRSPVLTPPDAIQVQENFDISRIYGKWFHVAMGSTCPWLKKFMDRMSMSTLVL GEGATDGEISMTSTRWRRGTCEEISGAYEKTSTNGKFLYHNPKWNITMESYVVHTDYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT AKLYGRQPQLRESLLEEFRELALGVGIPEDSIFTMANKGECVPGEQEPEPSPHMR

[0741] 8.M8H5GIEGR-海牛(SEQ ID NO:31)

[0742] MHHHHHHHHGGGGGIEGRSPVKTPLNDIQVQENFDLPRIYGKWFNIAIGSTCQWLKRLKAGPTMSTLVL GEGATDTEISTTSTRWRKGFCEEISGAYEKTDTAGKFLYHGSKWNVTLESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRYGLTITA KLYGRQPQVRESLLEEFREFALGVGIPEDSIFTTADKGECVPGEQEPEPTAALR

[0743] 9.M8H5GIEGR-比目鱼(SEQ ID NO:32)

[0744] MHHHHHHHHGGGGGIEGRLPVLPEPLYPTQENFDLTRFVGTWHDVALTSSCPHMQRNRADAAIGKLVLE KDTGNKLKVTRTRLRHGTCVEMSGEYELTSTPGRIFYHIDRWDADVDAYVVHTNYDEYAIIIMSKQKTSGENSTSLK LYSRTMSVRDTVLDDFKTLVRHQGMSDDTIIIKQNKGDCIPGEQVEEAPSQPEPKR

[0745] 10.M8H5GIEGR-猩猩(SEQ ID NO:33)

[0746] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRRHGPTIT AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0747] 11.M8H5GIEGR-人P35K(SEQ ID NO:34)

[0748] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCKWLKKIMDRMTVSTLVL GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0749] 12.M8H5GIEGR-人M41K(SEQ ID NO:35)

[0750] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVL GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0751] 13.M8H5GIEGR-人R66H(SEQ ID NO:36)

[0752] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL GEGATEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0753] 14.M8H5GIEGR-人T75K(SEQ ID NO:37)

[0754] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL

GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEEKSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT
AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0755] 15.M8H5GIEGR-人T75Y(SEQ ID NO:38)

[0756] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL
GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEEYSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT
AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0757] 16.M8H5GIEGR-人M99K(SEQ ID NO:39)

[0758] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL
GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITKESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT
AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0759] 17.M8H5GIEGR-人S101Y(SEQ ID NO:40)

[0760] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL
GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMEYYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT
AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0761] 18.M8H5GIEGR-人K69.92.118.130R(SEQ ID NO:41)

[0762] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL
GEGATEAEISMTSTRWRRGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHRSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKRFSRHHGPTIT
ARLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0763] 19.M8H5GIEGR-空棘鱼(SEQ ID NO:42)

[0764] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGSPLRDEDIQVQENFDLPRIYGKWYEIAIASTCPWVKNHKDKMFMGTMVLQ
EGEQSDRISTTSTRIRDGTCSQITGYYTLTTTPGKFAYHNSKWNLDVNSYVVHTNYDEYSIVMMQKYKSSNSTTTVR
LYGRTQELRDSLHAEFKKFALDQGIDEDSIYILPKRDECVPGEPKAESLMAR

[0765] 21.M8H5GIEGR-人L89T(SEQ ID NO:43)

[0766] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL
GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFTYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT
AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0767] 22.M8H5GIEGR-人N1796D(SEQ ID NO:44)

[0768] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL
GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT
AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0769] 23.M8H5GIEGR-人T45K(SEQ ID NO:45)

[0770] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMKVSTLVL
GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT
AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0771] 24.M8H5GIEGR-人A135E(SEQ ID NO:46)

[0772] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL
GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT
AKLYGREPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0773] 25.M8H5GIEGR-人V170S(SEQ ID NO:47)

[0774] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECSPGEQEPEPILIPR

[0775] 26.M8H5GIEGR-人V148D(SEQ ID NO:48)

[0776] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT AKLYGRAPQLRETLLQDFRDVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0777] 27.M8H5GIEGR-人G172Q(SEQ ID NO:49)

[0778] MHHHHHHHHGGGGGIEGRGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVL GEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTIT AKLYGRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPQEQEPEPILIPR

[0779] 33.M8H4DK-人M41K+R66H(SEQ ID NO:50)

[0780] MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVLGEGA TEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLY GRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0781] 34.M8H4DK-人M41K+N1796D(SEQ ID NO:51)

[0782] MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVLGEGA TEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLY GRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0783] 35.M8H4DK-人R66H+N1796D(SEQ ID NO:52)

[0784] MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGA TEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLY GRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0785] 36.M8H4DK-人M41K+R66H+N1796D(SEQ ID NO:53)

[0786] MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVLGEGA TEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLY GRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0787] 37.M8H4DK-人M41K(SEQ ID NO:8)

[0788] MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIKDRMTVSTLVLGEGA TEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLY GRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0789] 38.M8H4DK-人R66H(SEQ ID NO:54)

[0790] MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGA TEAEISMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLY GRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0791] 39.M8H4DK-人N1796D(SEQ ID NO:55)

[0792] MHHHHHHHHDDDDKGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGA TEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLY GRAPQLRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0793] 40.M8H-人wt(SEQ ID NO:56)

[0794] MHHHHHHHHGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEAEI SMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQ LRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0795] 41.M8H-人R66H+N1796D(SEQ ID NO:57)

[0796] MHHHHHHHHGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEAEI SMTSTHWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQ LRETLLQDFRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0797] 42.未标记的-人R66H+N1796D(SEQ ID NO:3)

[0798] MGPVPTPPDNIQVQENFDISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTHWR KGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWDITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQD FRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0799] 61未标记的-人wt(SEQ ID NO:2)

[0800] MGPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLVLGEGATEAEISMTSTRWR KGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITMESYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQD FRVVAQGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR

[0801] 所有构建体的DNA序列：

[0802] 60.M8H4DK-人wt(SEQ ID NO:58)

[0803] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAAC ATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCC CTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCA GCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGG AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGC CATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGC TGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATG GCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0804] 1.M8H5GIEGR-小鼠(SEQ ID NO:59)

[0805] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGACCCTGCGTCAACA CTGCCAGATATCCAGGTTCAGGAGAACTTCAGTGAGTCCCGGATCTATGGAAAATGGTACAACCTGGCGGTGGGATC CACCTGCCCGTGGCTGAGCCGCATTAAGGACAAGATGAGCGTGAGCACGCTGGTGCTGCAGGAGGGGGCGACAGAAA CAGAGATCAGCATGACCAGTACTCGATGGCGGAGAGGTGTCTGTGAGGAGATCACTGGGGCGTACCAGAAGACGGAC ATCGATGGAAAGTTCCTCTACCACAAATCCAAATGGAACATAACCTTGGAATCCTATGTGGTCCACACCAACTATGA CGAATATGCCATTTTCCTTACCAAGAAGTCCAGCCACCACCACGGGCTCACCATCACTGCCAAGCTCTATGGTCGGG AGCCACAGCTGAGGGACAGCCTTCTGCAGGAGTTCAAGGATGTGGCCCTGAATGTGGGCATCTCTGAGAACTCCATC ATTTTTATGCCTGACAGAGGGGAATGTGTCCCTGGGGATCGGGAGGTGGAGCCCACATCAATTGCCAGATGA

[0806] 2.M8H5GIEGR-裸鼹鼠(SEQ ID NO:60)

[0807] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCAATCCTGTGCCGATG CCGCCAGACAACATCCAAGTGCAGGAGAACTTTGATGAATCCCGGATCTATGGGAAATGGTTCAACCTGGCTACGGG CTCCACGTGCCCGTGGCTGAAGAGGATCAAAGACAGGCTGAGTGTGAGCACAATGGTGCTGGGCAAGGGGACCACGG

AGACACAGATCAGCACAACCCACACCCACTGGCGGCAAGGGGTGTGCCAGGAGACCTCAGGGGTTTACAAGAAAACA
GACACGGCTGGGAAGTTCCTCTACCACAAGTCCAAATGGAATGTAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATCATTCTAACTAAGAAGTTCAGCCACCACCATGGACCGACCATTACTGCCAAGCTCTATGGGA
GAGAGCCGCGGCTGAGAGACAGCCTCCTGCAGGAATTCAGGGAGATGGCCCTGGGCGTAGGCATCCCCGAGGATTCC
ATCTTCACAATGGCCAACAGAGGGGAATGTGTCCCTGGTGACCAGGCACCAGAGTCCACCCCAGCCCCGAGGTGA

[0808] 3.M8H5GIEGR-青蛙(SEQ ID NO:61)

[0809] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCTGCAGCCCAATCCAG
CCAGAGGACAATATCCAGATCCAGGAGAACTTTGATCTCCAGAGGATTTATGGCAAATGGTACGACATTGCCATCGG
CTCCACCTGCAAATGGCTGAAGCACCACAAGGAAAAGTTCAACATGGGGACACTGGAGCTTAGCGATGGGGAGACCG
ACGGGGAGGTGCGGATTGTGAACACAAGGATGAGGCACGGAACCTGCTCTCAGATTGTTGGGTCCTATCAGAAGACA
GAGACCCCAGGGAAGTTCGACTATTTCAACGCACGGTGGGGAACCACGATCCAAAACTACATTGTCTTCACTAACTA
CAATGAGTATGTCATCATGCAGATGAGGAAGAAGAAGGGATCGGAGACCACCACGACCGTCAAGCTGTATGGGCGGA
GCCCAGACTTGCGTCCGACCCTCGTTGATGAATTCAGGCAGTTTGCCTTGGCTCAGGGCATTCCTGAAGACTCCATC
GTGATGCTACCTAACAATGGTGAGTGCTCTCCAGGGGAAATAGAAGTGAGACCACGGAGATGA

[0810] 4.M8H5GIEGR-鸡(SEQ ID NO:62)

[0811] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCACGCCTGTTGGGGAC
CAGGATGAGGACATTCAAGTGCAAGAGAATTTTGAGCCTGAGCGGATGTATGGGAAATGGTATGACGTAGCTGTTGG
CACCACCTGCAAGTGGATGAAGAACTACAAGGAGAAGTTCAGCATGGGCACACTGGTGCTGGGCCCCGGCCCCAGCG
CTGACCAGATCAGTACCATCAGCACCAGGCTGCGGCAAGGTGACTGCAAACGTGTCTCAGGAGAGTACCAGAAAACT
GACACCCCTGGCAAATACACCTACTATAACCCCAAGTGGGATGTGTCTATCAAGTCCTACGTGCTTCGCACCAACTA
TGAAGAATACGCAGTCATTCTGATGAAGAAGACAAGTAATTTTGGCCCAACCACCACACTGAAGCTGTATGGGAGAA
GCCCAGAGCTGCGGGAAGAGCTCACCGAGGCTTTCCAGCAGCTGGCTCTGGAGATGGGCATCCCTGCAGATTCCGTC
TTCATCCTGGCCAACAAAGGTGAATGTGTCCCACAGGAGACTGCCACTGCCCCTGAGAGGTGA

[0812] 5.M8H5GIEGR-兔(SEQ ID NO:63)

[0813] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGACCCCGTGCCCACC
CTGCCGGACGACATCCAAGTGCAGGAGAACTTCGAGCTCTCTCGGATCTACGGGAAATGGTACAACCTGGCTGTGGG
GTCCACCTGCCCGTGGCTGAAGAGGATCAAGGACAGGATGGCCGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGGACGAGCG
AGACGGAGATCAGCATGACCAGCACGCACTGGCGGAGGGGCGTCTGTGAGGAGATCTCCGGGGCCTATGAGAAAACG
GACACTGACGGGAAGTTCCTGTACCACAAAGCCAAATGGAACTTAACCATGGAGTCCTACGTGGTGCACACCAACTA
CGATGAGTATGCCATTTTTCTCACCAAGAAATTCAGCCGCCGCCACGGCCCCACCATCACCGCCAAGCTCTATGGGC
GGGAGCCGCAGCTGAGGGAGAGCCTCCTGCAGGAGTTCAGGGAGGTGGCTCTCGGGGTGGGGATCCCCGAGAACTCC
ATCTTCACCATGATCGACAGAGGGGAATGTGTGCCCGGGCAGCAGGAACCAAAGCCTGCCCCCGTGTTGAGATGA

[0814] 6.M8H5GIEGR-松鼠猴(SEQ ID NO:64)

[0815] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCAGCCCAGTGCCGACG
CCGCCCGAAGGCATTCAAGTGCAGGAAAACTTCAATCTCTCTCGGATCTACGGCAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTAAAGAAGATCATGGACAGGTTGAAAGTGAGCACGCTGGTGCTGGAAGAGGGCGCCACGG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGCTGGCGGAAAGGTTTCTGTGAGCAGACCTCTTGGGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACGAACCCAAATGGAACGTAACCATGGAGTCCTATGTGGCCCACACCAACTA
TGAGGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTATGGGC

GGGAGCCACAGCTGAGGGAAAGCCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGATTCC
ATCTTCACCATGGCTAACCGAGGTGAATGCGTCCCTGGGGAGCAGGAACCACAGCCCATCCTACACCGGAGATGA

[0816] 7.M8H5GIEGR-海象(SEQ ID NO:65)

[0817] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCAGTCCCGTGCTGACG
CCGCCTGACGCCATCCAAGTGCAAGAGAACTTCGACATCTCTCGGATCTACGGGAAGTGGTTTCATGTGGCCATGGG
CTCCACCTGCCCGTGGCTGAAGAAGTTCATGGACAGGATGTCCATGAGCACGCTGGTGCTGGGCGAGGGGGCGACGG
ATGGGGAGATCAGCATGACCAGCACACGTTGGCGGAGAGGCACCTGTGAGGAGATCTCTGGGGCTTATGAGAAAACC
AGCACTAACGGAAAGTTCCTCTATCATAATCCCAAATGGAACATCACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCGACTA
TGATGAGTACGCCATCTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCACCATGGGCCCACCATTACTGCCAAGCTCTATGGGC
GACAGCCGCAGCTTCGAGAAAGCCTGCTGGAGGAGTTCAGGGAGCTTGCCTTGGGTGTGGGCATCCCCGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCCAACAAAGGTGAGTGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCTCTCCACACATGAGGTGA

[0818] 8.M8H5GIEGR-海牛(SEQ ID NO:66)

[0819] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCAGCCCAGTGAAAACA
CCACTCAACGACATCCAAGTGCAGGAGAACTTTGACCTCCCTCGGATCTACGGGAAATGGTTCAACATAGCCATTGG
CTCCACCTGCCAATGGCTGAAGAGGTTGAAGGCCGGGCCGACCATGAGCACCCTGGTCCTGGGAGAGGGAGCTACAG
ACACAGAGATCAGCACAACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGCTTCTGTGAGGAGATCTCTGGGGCATATGAGAAAACA
GACACAGCTGGGAAGTTCCTTTATCACGGATCCAAATGGAATGTAACCTTGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTACGCCATTTTTCTGACCAAGAAATTCAGCCGCTATGGACTCACCATTACTGCTAAGCTCTATGGGCGGC
AGCCTCAGGTGAGGGAGAGCCTCCTGGAGGAGTTCAGGGAATTTGCCCTGGGTGTGGGCATCCCTGAGGATTCCATC
TTCACCACGGCCGACAAAGGTGAGTGTGTCCCTGGAGAGCAGGAGCCAGAACCCACCGCAGCCCTGAGATGA

[0820] 9.M8H5GIEGR-比目鱼(SEQ ID NO:67)

[0821] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCCTCCCTGTGCTCCCT
GAACCTCTTTACCCGACACAGGAGAACTTTGATCTGACCCGGTTTGTGGGGACATGGCACGATGTTGCCTTGACGAG
CAGCTGCCCCCATATGCAGCGTAACAGGGCGGATGCAGCCATTGGTAAACTGGTTCTGGAGAAAGACACTGGAAACA
AACTCAAGGTGACACGAACTAGACTCAGACATGGAACATGTGTGGAGATGTCTGGAGAATATGAGTTAACCAGCACA
CCAGGACGAATCTTCTACCATATTGACAGGTGGGATGCAGACGTGGACGCCTACGTGGTTCACACCAACTACGACGA
GTACGCAATTATAATAATGAGCAAACAGAAAACATCGGGGGAGAACAGCACCTCACTCAAGCTGTACAGTCGGACGA
TGTCTGTGAGAGACACTGTGCTGGATGACTTCAAAACTCTGGTCAGACATCAGGGAATGAGTGACGACACCATTATC
ATCAAGCAGAACAAAGGTGACTGTATTCCTGGAGAGCAGGTGGAAGAAGCACCATCTCAGCCAGAGCCCAAGCGGTG
A

[0822] 10.M8H5GIEGR-猩猩(SEQ ID NO:68)

[0823] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCGACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACCCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACATCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCGTCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACCCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAACAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0824] 11.M8H5GIEGR-人P35K(SEQ ID NO:69)

[0825] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCAAATGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0826] 12.M8H5GIEGR-人M41K(SEQ ID NO:70

[0827] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0828] 13.M8H5GIEGR-人R66H(SEQ ID NO:71)

[0829] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0830] 14.M8H5GIEGR-人T75K(SEQ ID NO:72)

[0831] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGAAATCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0832] 15.M8H5GIEGR-人T75Y(SEQ ID NO:73)

[0833] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG

TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGTATTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0834] 16.M8H5GIEGR-人M99K(SEQ ID NO:74)

[0835] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCAAAGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0836] 17.M8H5GIEGR-人S101Y(SEQ ID NO:75)

[0837] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTATTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0838] 18.M8H5GIEGR-人K69.92.118.130R(SEQ ID NO:76)

[0839] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGCGTGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACCGTTCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGCGTTTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCCGTCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0840] 19.M8H5GIEGR-空棘鱼(SEQ ID NO:77)

[0841] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGAAGTCCCCTTCGA
GATGAAGACATCCAAGTGCAGGAGAACTTTGACCTTCCCAGGATTTATGGAAAATGGTACGAAATTGCAATCGCTTC
GACCTGTCCCTGGGTGAAGAATCACAAGGATAAGATGTTCATGGGAACTATGGTGCTACAAGAGGGAGAGCAGAGTG
ACCGGATCAGTACCACCTCCACCCGAATCAGGGATGGAACCTGCTCACAGATCACTGGATATTACACGTTAACCACA
ACACCTGGGAAGTTCGCTTATCACAATTCTAAATGGAACTTGGATGTCAACAGTTATGTTGTTCACACTAACTATGA

CGAATACTCGATTGTGATGATGCAGAAATACAAAAGCTCTAACTCTACCACTACAGTCCGACTCTATGGAAGAACTC
AAGAGCTACGAGACAGCTTGCATGCCGAGTTCAAAAAGTTTGCTCTGGATCAGGGAATAGATGAGGACTCCATTTAC
ATTCTGCCAAAAAGAGATGAATGTGTACCTGGTGAACCTAAAGCAGAATCTCTCATGGCACGTTGA

[0842] 21.M8H5GIEGR-人L89T(SEQ ID NO:78)

[0843] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTACCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0844] 22.M8H5GIEGR-人N1796D(SEQ ID NO:79)

[0845] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0846] 23.M8H5GIEGR-人T45K(SEQ ID NO:80)

[0847] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGAAAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0848] 24.M8H5GIEGR-人A135E(SEQ ID NO:81)

[0849] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGAACCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0850] 25.M8H5GIEGR-人V170S(SEQ ID NO:82)

[0851] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTTCTCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0852] 26.M8H5GIEGR-人V148D(SEQ ID NO:83)

[0853] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGATGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0854] 27.M8H5GIEGR-人G172Q(SEQ ID NO:84)

[0855] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGTGGAGGAGGGGGTATCGAGGGCCGCGGCCCTGTGCCAACG
CCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGG
TTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAG
AGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACA
GATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTA
TGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGC
GGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCC
ATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTCAGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0856] 33.M8H4DK-人M41K+R66H(SEQ ID NO:85)

[0857] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAAC
ATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCC
CTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCA
GCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGG
AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGC
CATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGC
TGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATG
GCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0858] 34.M8H4DK-人M41K+N1796D(SEQ ID NO:86)

[0859] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAAC
ATCCAAGTGCAGGAAAACTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCC

CTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCA
GCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGG
AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGC
CATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGC
TGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATG
GCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0860] 35.M8H4DK-人R66H+N1796D(SEQ ID NO:87)

[0861] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAAC
ATCCAAGTGCAGGAAAACTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCC
CTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCA
GCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGG
AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGC
CATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGC
TGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATG
GCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0862] 36.M8H4DK-人M41K+R66H+N1796D(SEQ ID NO:88)

[0863] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAAC
ATCCAAGTGCAGGAAAACTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCC
CTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCA
GCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGG
AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGC
CATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGC
TGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATG
GCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0864] 37.M8H4DK-人M41K(SEQ ID NO:89)

[0865] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAAC
ATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCC
CTGGCTGAAGAAGATCAAAGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCA
GCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGG
AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGC
CATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGC
TGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATG
GCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0866] 38.M8H4DK-人R66H(SEQ ID NO:90)

[0867] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAAC
ATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCC
CTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCA
GCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGG
AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGC

CATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGC
TGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATG
GCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0868] 39.M8H4DK-人N1796D(SEQ ID NO:91)

[0869] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGATGACGATGACAAGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAAC
ATCCAAGTGCAGGAAAACTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCC
CTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCA
GCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGG
AAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGC
CATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGC
TGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATG
GCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0870] 40.M8H-人wt(SEQ ID NO:92)

[0871] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAA
AACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGAT
CATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTC
GTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
AAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAA
GAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCC
TGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAA
TGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0872] 41.M8H-人R66H+N1796D(SEQ ID NO:93)

[0873] ATGCATCACCATCACCATCACCATCACGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAA
AACTTCGATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGAT
CATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTC
ATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCAC
AAATCCAAATGGGATATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAA
GAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCC
TGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAA
TGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0874] 42.未标记的-人R66H+N1796D(SEQ ID NO:94)

[0875] ATGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCGATATCTCTCGGATCTAT
GGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCAC
GCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCATTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGG
AGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGGATATAACCATG
GAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACC
CACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCC
AGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCA
GAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0876] 61.未标记的-人wt(SEQ ID NO:95)

[0877] ATGGGCCCTGTGCCAACGCCGCCCGACAACATCCAAGTGCAGGAAAACTTCAATATCTCTCGGATCTATGGGAAGTGGTACAACCTGGCCATCGGTTCCACCTGCCCCTGGCTGAAGAAGATCATGGACAGGATGACAGTGAGCACGCTGGTGCTGGGAGAGGGCGCTACAGAGGCGGAGATCAGCATGACCAGCACTCGTTGGCGGAAAGGTGTCTGTGAGGAGACGTCTGGAGCTTATGAGAAAACAGATACTGATGGGAAGTTTCTCTATCACAAATCCAAATGGAACATAACCATGGAGTCCTATGTGGTCCACACCAACTATGATGAGTATGCCATTTTCCTGACCAAGAAATTCAGCCGCCATCATGGACCCACCATTACTGCCAAGCTCTACGGGCGGGCGCCGCAGCTGAGGGAAACTCTCCTGCAGGACTTCAGAGTGGTTGCCCAGGGTGTGGGCATCCCTGAGGACTCCATCTTCACCATGGCTGACCGAGGTGAATGTGTCCCTGGGGAGCAGGAACCAGAGCCCATCTTAATCCCGAGATGA

[0878] A1M变体构建体的基本原理(Rationale)

[0879] 在I期中对人wt-A1M、来自各种物种的11种A1M-同源物以及15种具有点突变的A1M变体进行构件、表达、纯化和分析,即总共27种A1M变体(表2)。11种A1M-同源物如下选择。A1M在各物种之间保守性良好。不同物种的A1M序列在数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov和www.uniprot.org)中进行搜索。找到67种不同物种的AMBP序列。对各序列研究A1M-特异性的官能团(K69、K92、K118、K130、Y22;Y132、H122和H123)、脂质运载蛋白基序(SCR1、2、3)(参见介绍中的参考)和预测的碳水化合物结合位点(Escribano等人,1990)的存在。5种被分类为非-A1M,并且由于它们缺乏半胱氨酸34而被放弃,3种由于它们缺乏半胱氨酸169而被放弃,4种由于它们不完整而被放弃,2种由于它们具有长的有问题的插入而被放弃。将剩余的53种同源物的氨基酸序列比对,并且通过将其氨基酸序列投射到人A1M的晶体结构上来模拟它们建议的3D结构(Meining和Skerra,2012),以确定单独的氨基酸侧链在脂质运载蛋白环中的位置或者在口袋内部或外部上的位置。它的结果如下用来构件影响A1M-功能的点突变。用来选择最后11种同源物(参见表2)的基本原理是广泛的进化表现、方法可能性、物种的生活栖息地中可能增加的环境氧化应激、A1M-特异性官能团的存在或者缺乏、以及糖基化的缺乏的组合。如下选择了15种具有点突变的A1M变体。8种变体针对功能特性在关键氨基酸处突变,7种变体在暴露的位置突变,以改善稳定性/溶解性(表2)。之所以选择8种功能突变是由于它们1)在其他物种中发生在3D-结构模型中可能会影响A1M的功能的位置(参见以上)并且/或者2)理论上会降低半胱氨酸34的pKa并且/或者3)理论上会提供额外的自由基捕获位点。对于所有变体预测的数据使用http://www.αlyse.com/gpmaw_lite.html工具来计算(表3)。

[0880]

表 2. A1M 变体项目 I 期中表达和分析的变体。

编号*	名称	系统名称	蛋白序列	基因信号标识符	突变目标	根本原因	N 端标记
60	**人 wt**	*智人（Homo sapiens）*	NP_001624	gi:4502067			**M8H4DK**
1	**小鼠**	*小家鼠（Mus musculus）*	NP_031469	gi:311703	物种	仅有的啮齿动物，实验室动物，我们有抗体	M8H5GIEGR
2	**裸鼹鼠**	*裸鼹鼠（Heterocephalus glaber）*	XP_004885260	gi:512843527	物种	长寿，低肿瘤发生率表明良好的内源性抗氧化作用	M8H5GIEGR
3	**青蛙**	*非洲爪蟾（Xenopus laevis）*	NP_001080820	gi:147905774	物种	无预测的碳水化合物，表明多肽的高溶解性，1 个额外的 Cys，高 pI	M8H5GIEGR
4	**鸡**	*家鸡（Gallus gallus）*	NP_001264627	gi:478732996	物种	仅有的鸟类	M8H5GIEGR
5	**兔**	*家兔（Oryctolagus cuniculus）*	XP_008271622	gi:655878696	物种	实验室动物，我们有抗体	M8H5GIEGR
6	**松鼠猴**	*亚马逊松鼠猴（Saimiri boliviensis）*	XP_0039252551	gi:403266141	物种	两种灵长类动物，与人类相比取代更少，更容易读数	M8H5GIEGR
7	**海象**	*海象（Odobenus rosmarus）*	XP_004397010	gi:472354701	物种	由于潜水充氧不均匀	M8H5GIEGR
8	**海牛**	*美洲海牛（Trichechus manatus）*	XP_004372191	gi:0471363267	物种	由于潜水充氧不均匀	M8H5GIEGR
9	**比目鱼**	*鲽鱼（Pleuronectes platessa）*	2021284A	gi:1091607	物种	由于潜水充氧不均匀	M8H5GIEGR
10	**猩猩**	*苏门达腊猩猩（Pongo abelii）*	NP_001127069	gi:197102775	物种	一个取代-H122R-在目标位置：还原酶和血红素-结合	M8H5GIEGR
11	**人 P35K**				功能	a）发生在鸟类和青蛙中，b）可降低 C34 的 pKa，c）可能是自由基捕获位点	M8H5GIEGR
12	**人 M41K**				功能	a）发生在许多物种中，b）可降低 C34 的 pKa，c）可能是自由基捕获位点	M8H5GIEGR
13	**人 R66H**				功能	发生在许多物种中，c.f.啮齿类和兔	M8H5GIEGR

[0881]

14	**人 T75K**				功能	a）可降低 C34 的 pKa，b）可能是自由基捕获位点	M8H5GIEGR
15	**人 T75Y**				功能	可能是自由基捕获位点	M8H5GIEGR
16	**人 M99K**				功能	a）可降低 C34 的 pKa，b）可能是自由基捕获位点	M8H5GIEGR
17	**人 S101Y**				功能	可能是自由基捕获位点	M8H5GIEGR
18	**人 K69，92，118，130R**				功能	可能是自由基捕获位点	M8H5GIEGR
19	**空棘鱼**	*腔棘鱼*	XP_005994505.1	gi:556972695	物种	所找到的最原始的 A1M-序列	M8H5GIEGR
21	**人 L89T**				溶解性	暴露的位置，增加的亲水性，发生在许多物种中	M8H5GIEGR
22	**人 N17,96D**				溶解性	碳水化合物位点，增加的亲水性	M8H5GIEGR
23	**人 T45K**				溶解性	暴露的位置，增加的电荷，发生在许多物种中	M8H5GIEGR
24	**人 A135E**				溶解性	暴露的位置，增加的电荷，发生在许多物种中	M8H5GIEGR
25	**人 V170S**				溶解性	暴露的位置，增加的亲水性，发生在许多物种中	M8H5GIEGR
26	**人 V148D**				溶解性	暴露的位置，增加的亲水性，发生在许多物种中	M8H5GIEGR
27	**人 G172Q**				溶解性	暴露的位置，增加的亲水性，发生在鸟类中	M8H5GIEGR

- 编号对应于以上的序列

[0882] 表3.预测的I期变体数据

[0883]

#	变体	#氨基酸	mw (Da)	pI	净电荷 (D+E) - (R+K)	延伸系数 280 nm (cm^{-1})	疏水性指数
60	人 wt	197	22561	6.4	-5	1.47	-0.64
1	小鼠	200	22732	6.6	-4	1.46	-0.60
2	裸鼹鼠	201	22741	9.2	2	1.40	-0.73
3	青蛙	197	22660	8.0	0	1.22	-0.79
4	鸡	197	22302	6.5	-3	1.40	-0.76
5	兔	201	22911	6.9	-2	1.45	-0.61
6	松鼠猴	201	23066	7.3	-1	1.68	-0.69
7	海象	201	22837	6.6	-4	1.39	-0.63
8	海牛	200	22469	6.6	-3	1.47	-0.54
9	比目鱼	202	22896	6.6	-4	0.89	-0.71
10	猩猩	201	22733	7.2	-1	1.46	-0.58
11	人 P35K	201	22745	7.2	-1	1.46	-0.58
12	人 M41K	201	22711	7.2	-1	1.46	-0.60
13	人 R66H	201	22695	6.7	-3	1.46	-0.57
14	人 T75K	201	22741	7.2	-1	1.46	-0.59
15	人 T75Y	201	22776	6.9	-2	1.51	-0.58
16	人 M99K	201	22711	7.2	-1	1.46	-0.60
17	人 S101Y	201	22790	6.9	-2	1.51	-0.57
18	人 K69.92. 118.130R	201	22826	6.9	-2	1.45	-0.58
19	空棘鱼	198	22741	6.7	-3	1.38	-0.78
21	人 L89T	201	22702	6.9	-2	1.46	-0.59
22	人 N17.96D	201	22716	6.5	-4	1.46	-0.57
23	人 T45K	201	22741	7.2	-1	1.46	-0.59
24	人 A135E	201	22772	6.7	-3	1.45	-0.60
25	人 V170S	201	22702	6.9	-2	1.46	-0.60
26	人 V148D	201	22730	6.7	-3	1.46	-0.61
27	人 G172Q	201	22785	6.9	-2	1.45	-0.59

[0884] I期

[0885] 变体在平行的摇瓶中表达。表达水平有所变化，对于几种A1M变体表达必须重复几次，以获得合理的蛋白量。对于小鼠、松鼠猴、海象、猩猩、M41K、R66H、T75Y、M99K、N17,96D、T45K和V148D在纯化之后获得良好的表达和较大的量(>10mg/L培养物)。纯化的蛋白的表达和量与之前在类似条件下表达和纯化的人wt A1M的产率(12mg/L)类似。具有更低表达水平并产生更低产率(1-10mg/L)的变体是裸鼹鼠、青蛙、兔、海牛、P35K、T75K、S101Y、L89T、V170S和G172Q。鸡、比目鱼和空棘鱼的A1M显示出次优的表达水平，从而得到纯化产率<1mg/L培养物。四重人突变体K69,92,118,130R表达地很好，但是不可能成功地再折叠。T75K-A1M在纯化过程中也显示出增加的沉淀倾向性。

[0886] 根据SDS-PAGE所有变体均被纯化到>99％的纯度，除了鸡和空棘鱼的A1M，其被纯化到95％的纯度。根据SDS-PAGE，所有变体均含有最多0.5％的共价二聚体，各变体之间没

有主要差别。圆二色性显示所有变体均具有约2％的α螺旋结构和40％的β折叠结构而没有主要差别，这是A1M的预期值(Kwasek等人，2007)。纯化之后，所有变体如表4所概括进行分析。首先对稳定性和溶解性进行分析。通过动态光散射(DLS)、PAGE(聚集)和差示扫描荧光测定法(DSF)(热稳定性)对新融化的未受应激的0.1mM的蛋白溶液的聚集倾向性和热稳定性进行分析。另外，对响应于剪切力或者浓缩到1mM而聚集的倾向性进行了研究。人wt A1M在这些分析中表现得较好(表4)，但是一些变体在稳定性/溶解性特性方面甚至表现得更好：鸡A1M、海牛A1M和N17,96D-A1M。鸡A1M和海牛A1M在太多的位置与人wt A1M不同，以至于不能够设想对于人A1M有益的单独氨基酸，并且未用于进一步的研究。当研究功能特性时，发现M41K和R66H具有相同(R66H)或者改善的(M41K)功能。由于这些变体还具有比大部分其他变体更高的热稳定性以及仅仅略微更高的聚集倾向性，因此选择它们进行进一步的研究。因此，N17,96D-A1M、M41K-A1M和R66H-A1M持续到项目II期。

[0887]

表 4.I 期变体的溶解性、稳定性和功能特性。

		稳定性和溶解性特性							功能特性			
		0.1 mM 下的聚集			热稳定性	0.1 mM 下的剪切稳定性		1 mM 下的聚集	游离硫醇	血红素的结合	血红素的还原	ABTS 的还原
		PAGE	DLS		DSF	DLS		PAGE				
		聚集物（%）	平均半径（nm）	所用测量值（个数，总共6个）	T_m	平均半径（nm）	所用测量值（个数，总共6个）	聚集物（%）	nmol L-半胱氨酸/nmol A1M	μM 结合/μM 添加	峰值λ（380-420 nm）	平均最大净AUC
编号	名称											
60	人 wt	4.8	3.2	6	46.6	3.8	4	22.3	0.6	0.81	405	-1.84 到-2.04
1	小鼠	45.8	20	6	43	32.8	6	93.7	0.3	0.71	393	-1.43
2	裸鼹鼠	54.8	2.7	6	51.6	3	6	80.1	0.1	0.69	397	-1.42
3	青蛙	9.9	2.8	5	NM	3	1	24.1	0.1	0.81	410	-1.33
4	鸡	2.4	3.3	5	67.5	3.4	6	3.5	0.1	0.66	391	-1.98
5	兔	50.2	33	6	48.7	43.4	6	28.2	0.1	0.65	395	-1.50
6	松鼠猴	20.2	3.2	6	49.9	3	6	38.3	0.3	0.72	407	-1.98
7	海象	4,0	3.8	3	NM	3.9	1	52.3	0.3	0.81	398	-1.33
8	海牛	1.7	3.5	6	53.2	3.6	5	2.0	0.1	0.80	391	-1.81
9	比目鱼	6.6	3.1	6	NM	3.1	6	30.0	0.0	0.73	388	-1.25
10	猩猩	18.3	3.1	6	45.9	3	4	29.7	0.6	0.77	401	-2.06
11	人 P35K	94.5	29.2	6	44.6	40.9	6	86.7	0.1	0.81	396	-1.29
12	人 M41K	20.5	3.2	3	47.9	3.2	5	27.5	0.4	0.92	414	-1.87
13	人 R66H	13.6	3.1	4	47.8	19	6	37.0	0.7	0.79	405	-2.19
14	人 T75K	60.0	42.3	6	43.3	82	6	96.3	0.3	0.76	393	-1.28
15	人 T75Y	36.1	35.7	6	49.8	32.4	6	45.7	0.4	0.87	392	-2.08
16	人 M99K	37.7	65.8	6	45.9	56.4	6	44.8	0.4	0.69	397	-1.71

[0888]

17	人 S101Y	36.8	2.7	6	46.1	3	3	70.7	0.4	0.79	403	-1.63
		稳定性和溶解性特性							功能特性			
		0.1 mM 下的聚集			热稳定性	0.1 mM 下的剪切稳定性		1 mM 下的聚集	游离硫醇	血红素的结合	血红素的还原	ABTS 的还原
		PAGE	DLS		DSF	DLS		PAGE				
		聚集物（%）	平均半径（nm）	所用测量值（个数，总共 6 个）	T_m	平均半径（nm）	所用测量值（个数，总共 6 个）	聚集物（%）	nmol L-半胱氨酸/nmol A1M	μM 结合/μM 添加	峰值λ（380-420 nm）	平均最大净 AUC
编号	名称											
60	人 wt	4.8	3.2	6	46.6	3.8	4	22.3	0.6	0.81	405	-1.84 到-2.04
19	空棘鱼	4.1	3.7	6	NM	3.8	6	38.2	0.2	0.68	396	-2.00
21	人 L89T	42.1	2.9	1	46.1	25.7	6	51.6	0.5	0.96	403	-1.69
22	人 N17.96D	2.9	3.1	6	49.6	3.7	4	9.9	0.6	0.80	409	-2.48
23	人 T45K	91.2	48.5	6	42.8	86.9	6	89.9	0.3	0.94	394	-1.29
24	人 A135E	54.6	23.9	6	46.1	17.5	6	90.7	0.3	0.70	400	-1.47
25	人 V170S	40.1	3	6	46	23.7	6	58.8	0.4	0.90	399	-2.04
26	人 V148D	35.8	3	6	46	3	2	44.9	0.6	0.86	402	-2.16
27	人 G172Q	93.4	36.1	6	44.1	34.2	6	89.5	0.2	0.81	396	-1.95

被认为与人 wt A1M 相比对于变体更佳的特性以深蓝色加白色粗体文本标记。被认为与人 wt A1M 相比对于变体更差的特性以红色标记。所有其他特性均被认为与人 wt A1M 类似。
在 PAGE 中，具有显著更高百分比的大聚集物的变体被评价为比人 wt A1M 更差。
在 DLS 中，平均半径>>3 nm 被认为是聚集物的指示，并且难以记录测量值（看作更低数量的用于计算的测量值）。
在 DSF 中，T_m>3 人 wt A1M 的标准偏差被认为是更高或更低。
人 wt A1M 的游离硫醇通常在 0.6-0.8 的范围内，显著低于它的任何变体都被看作是较差的。
在血红素结合分析中，人 wt A1M 在该分析中与≈80%结合。其他变体的结合低于 75%和高于 85%被看作是不同的。
在血红素还原分析中，Soret 条带峰顶点<400 nm 被看做比人 wt A1M 更差，迁移≥409 nm 被看作比人 wt A1M 更佳。
在 ABTS 分析中，T-测试 p-值<0.2 被认为表明更差的 ABTS 还原能力。

[0889] II期

[0890] 项目II期的目标是将有益的突变(M41K、R66H和N17,96D)结合，以便研究是否可以构建具有类似或改善的功能并且甚至更稳定的变体。另外，引入了相同的N端标记

(M8H4DK)，其用于人wt A1M(表5)。这样，新结合的M8H4DK-变体被与M8H4DK-人wt对比。

[0891] 表5.II期中表达的变体以及预测的数据

[0892]

#	变体	#氨基酸	mw (Da)	pI	净电荷 (D+E) -(R+K)	延伸系数 280 nm (cm^{-1})	疏水性指数
12	**M8H5GIEGR-M41K**	201	22711	7.2	-1	1.46	-0.60
13	**M8H5GIEGR-R66H**	201	22695	6.7	-3	1.46	-0.57
22	**M8H5GIEGR-N17,96D**	201	22716	6.5	-4	1.46	-0.57
60	**M8H4DK-wt**	197	22561	6.4	-5	1.47	-0.64
33	**M8H4DK-M41K+R66H**	197	22539	6.4	-5	1.47	-0.67
34	**M8H4DK-M41K+N17,96D**	197	22560	6.2	-6	1.47	-0.67
35	**M8H4DK-R66H+N17,96D**	197	22544	6.1	-8	1.47	-0.64
36	**M8H4DK-M41K-R66H+N1796D**	197	22541	6.2	-7	1.47	-0.67

[0893] 所有四种新的变体(M8H4DK-M41K+R66H、M8H4DK-M41K+N17,96D、M8H4DK-R66H+N17,96D和M8H4DK-M41K+R66H+N17,96D)均非常好地表达，并获得29、13、37和15mg纯蛋白/L的产率。根据SDS-PAGE，四种新的变体被纯化到>99％的纯度，并且显示出相同或者更低的共价二聚体百分比，除了M8H4DK-M41K+R66H，其显示出大约2％的共价二聚体。

[0894] 对增溶作用/稳定性特性进行了分析(表6a)。数据显示，M41K与R66H的组合对于热稳定性是次优的。另一方面，N17,96D突变对于增溶作用和稳定性通常是有益的，并且与R66H的组合(即M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M)产生甚至更佳的增溶作用和稳定性。

[0895] 对功能特性进行了分析(表6b)。数据显示，M41K突变具有增加的血红素还原能力，但是血红素结合降低。但是，当M41K突变与N17,96D组合时，它显示出更低的保护细胞免于血红素引起的细胞死亡的潜力。R66H+N17,96D的组合与wt-A1M相比在所研究的全部功能方面均产生类似的结果。因此，M8H4DK标记的R66H+N17,96DA1M是II期之后一个有前景的候选物，而M41K-突变则没那么有用。

[0896]

表 6a.II 期变体的溶解性、稳定性和功能特性。

		稳定性和溶解性特性								
		0.1 mM 下的聚集				热稳定性	0.1 mM 下的剪切稳定性		1 mM 下的聚集	
		PAGE	DLS		SEC-FPLC	DSF	DLS		PAGE	SEC-FPLC
		聚集物（%）	平均半径（nm）	所用测量值（个数，总共6个）	单体（%）	T_m	平均半径（nm）	所用测量值（个数，总共6个）	聚集物（%）	单体（%）
编号	**名称**									
60	**M8H4DK-wt**	1-2	3.0	6	87-94	46.6	3.0	2	8	80-87
12	**M8H5GIEGR-M41K**	34	6.0	3	ND	**51.8**	4.1	2	33	ND
13	**M8H5GIEGR-R66H**	25	3.2	6	ND	47.3	10.3	1	51	ND
22	**M8H5GIEGR-N1796D**	1	3.0	4	94	**49.9**	6.5	2	4.2	82
33	**M8H4DK-M41K+R66H**	19	3.4	1	ND	34.3	13.7	**5**	42.9	ND
34	**M8H4DK-M41K+N1796D**	1	3.4	6	96	**52.7**	3.2	**5**	**1.0**	77
35	**M8H4DK-R66H+N1796D**	**0.4**	3.3	6	93	**51.6**	3.1	**6**	**0.4**	**89**
36	**M8H4DK-M41K+R66H+N1796D**	**0.8**	3.3	5	82	37.4	3.6	**6**	**1.1**	63

被认为与人 wt A1M 相比对于变体更佳的特性以深蓝色加白色粗体文本标记。被认为与人 wt A1M 相比对于变体更差的特性以红色标记。所有其他特性均被认为与人 wt A1M 类似。

在 PAGE 中，具有显著更高百分比的大聚集物的变体被评价为比人 wt A1M 更差。

在 DLS 中，平均半径>>3 nm 被看作是聚集物的指示，并且难以记录测量值（看作更低数量的用于计算的测量值）。

在 DSF 中，T_m>3 人 wt A1M 的标准偏差被认为更高或者更低。

[0897]

表 6b. II 期变体的功能特性。

编号	名称	功能特性 与血红素-琼脂糖的结合	血红素-结合峰的红移	ABTS 的还原	防止血红素引起的细胞死亡
		μM 结合/μM 添加	峰值λ（nm）	平均最大净 AUC	目视观察两个分离实验的图
60	**M8H4DK-wt**	0.85	415	-2.1	
12	**M8H5GIEGR-M41K**	0.81	408	-1.2	与 wt 类似
13	**M8H5GIEGR-R66H**	0.84	ND	-1.5	与 wt 类似
22	**M8H5GIEGR-N1796D**	0.82	415	-2.2	与 wt 类似
33	**M8H4DK-M41K+R66H**	0.68	417	-1.8	与 wt 类似
34	**M8H4DK-M41K+N1796D**	0.74	419	-2.2	比 wt 更弱
35	**M8H4DK-R66H+N1796D**	1.07	413	-2.1	与 wt 类似
36	**M8H4DK-M41K+R66H+N1796D**	1.13	412	-2.0	与 wt 类似

在血红素-琼脂糖结合分析中，人 wt A1M 与≈80%结合。与其他变体的结合低于 75%和高于 85%被看作是不同的。

在血红素-结合吸收分析中，红移到<400 nm 被认为比人 wt A1M 更差，红移≥417 nm 被认为比人 wt A1M 更佳。

在 ABTS 分析中，T-测试 p-值<0.2 被认为表明更差的 ABTS 还原能力。

[0898]　III期

[0899]　III期的第一个目标是在在相同条件下平行表达时将M8H4DK标记的R66H+N17,96D-A1M与wt-A1M以及I期和II期有前景的M8H4DK标记的单个突变进行对比。第二个目标是研究标记对稳定性、溶解性和功能的影响。人wt A1M的N端标记(M8H4DK)包括8个组氨酸的标记，接着是一个肠激酶切割位点。切割位点使得能够在表达和纯化之后切割组氨酸标记。因此，wt-A1M和R66H+N17,96D-A1M在表达后具有N端的M8H4DK-标记和M8H-标记，也可能没

有标记。第三个目标是更详细地将M8H4DK-wt A1M(Wt-A1M)的特性与M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M(35-A1M)的特性进行对比。III期所有表达的变体以及预测的数据在表7中示出。

[0900] 表7.III期中表达的变体以及预测的数据

[0901]

#	变体	#氨基酸	mw (Da)	pI	净电荷 (D+E)-(R+K)	延伸系数 280 nm (cm^{-1})	疏水性指数
60	**M8H4DK-wt**	197	22561	6.4	-5	1.47	-0.64
35	**M8H4DK-R66H+N1796D**	197	22544	6.1	-8	1.47	-0.64
37	**M8H4DK-M41K**	197	22558	6.5	-4	1.47	-0.67
38	**M8H4DK-R66H**	197	22542	6.3	-8	1.47	-0.64
39	**M8H4DK-N17.96D**	197	22563	6.1	-7	1.47	-0.64
40	**M8H-wt**	192	21973	6.9	-2	1.51	-0.57
41	**M8H-R66H+N1796D**	192	21956	6.4	-5	1.51	-0.56
42	**M-R66H+N1796D**	184	20859	5.6	-5	1.59	-0.45
61	**M-wt**	184	20876	6.3	-2	1.59	-0.45

[0902] 平行表达和纯化容许对表达水平和纯化产率进行更精确的对比。发现所有表达A1M变体的细菌均以相同的速率(未显示)和相同的较好产率生长(图2)。仅有的差别是未标记的变体(#60和#42)与其他变体相比表达更慢。从2x750ml表达物能够纯化20-60mg的每种变体(图3a)。所有组氨酸标记的变体均被纯化到>99%的纯度,而未标记的变体(#61和#42)则显示出略微更低的纯度(约90%)(图3b)。全部都显示出少量的共价二聚体。PAGE分析显示所有变体均具有小于1-2%的大聚集物,除了M8H-wt(40)和未标记的wt-A1M(#61)(图3c)。因此,所有单独的和多种M8H4DK标记的、M8H标记的和未标记的A1M变体都能够产生。

[0903] 通过反相HPLC、动态光散射和差示扫描荧光测定法对100μM的溶液的聚集和热稳定性进行了分析(表8)。在RP-HPLC中,M8H4DK标记的变体在大约12分钟被洗脱,主峰中具有87-90%的蛋白。唯一的例外是M8H4DK-M41K,它出现在9.8分钟的保留时间处,并且主峰中只有80%的蛋白。该数据再一次表明,M41K突变产生出乎意料的A1M蛋白特性,是次优的。将标记变为M8H或者完全去除标记分别导致保留时间增加到12.2分钟和12.9分钟,表明是疏水性更高的分子,这正是所预料的。对于M8H-wt和两种未标记的变体,主峰中存在更少的蛋白,可能反映这些变体的SDS-PAGE中观察到的略微更低的纯度。DLS-数据显示,所有变体的平均半径约为3,并且可以从所有6个记录收集数据。所有变体均具有与M8H4DK-wt A1M相同或者更高的热稳定性。带有N17,96D突变的所有变体均观察到更高的稳定性。

[0904] 表8.非应激的III期变体的聚集和热稳定性。

[0905]

		RP-HPLC		DLS		DSF
#	变体	RT[min]	主峰（总的%）	平均半径(nm)	所用测量值（个数，总共6个）	Tm
60	M8H4DK-wt	12.1	87	2.9	6	46.6
35	M8H4DK-R66H+N1796D	12.1	89	3.2	6	49.8
37	M8H4DK-M41K	9.8	80	3.3	6	46.8
38	M8H4DK-R66H	12.1	89	2.9	6	46.4
39	M8H4DK-N1796D	12.1	90	3.0	6	49.7
40	M8H-wt	12.2	78	3.2	6	47.1
41	M8H-R66H+N1796D	12.2	88	3.2	6	50.2
61	M-wt	12.9	81	3.8	6	46.3
42	M-R66H+N1796D	12.9	82	3.4	6	50.2

[0906] 通过在窄吸液头中吸液80次将III期的变体暴露于剪切力。使用DLS对剪切应激引起的聚集进行分析。一般而言，具有N1796D突变的所有变体对剪切应激均显示出高的耐受性(表9)，除了M8H标记的R66H+N1796D变体(#41)。另外，研究了对在不同缓冲液中浓缩到1mM引起的应激的耐受性。所有变体均在pH 8.0或7.4的20mM的Tris-HCl+0.125M的NaCl中浓缩到1mM，并立即通过PAGE进行分析(图4a，表10)。还在Tris-缓冲液或PBS中进行单次冻融循环之后通过PAGE对0.1mM和1mM的样品进行了分析(图4b，表10)。在M8H4DK标记的变体中，所有带有N17,96D的突变与wt A1M相比对浓缩、冻融、pH降低和缓冲液改变(变为PBS)均显示出增加的耐受性。添加R66H突变甚至进一步改善了稳定性和溶解性。单独的R66H突变具有与wt A1M大致相同的耐受性，而M41K突变则具有显著更低的耐受性。N端标记的缩短或去除对耐受性具有负面作用，与相应的R66H+N17,96D变体相比对于wt A1M的负面作用更显著。

[0907] 表9.III期变体的剪切稳定性。

[0908]

#	变体	平均半径（nm）	所用测量值（个数，总共6个）
60	M8H4DK-wt	2.9	3
35	M8H4DK-R66H+N1796D	3.0	6
37	M8H4DK-M41K		0
38	M8H4DK-R66H		0
39	M8H4DK-N1796D	3.1	6
40	M8H-wt	3.1	1
41	M8H-R66H+N1796D		0
61	M-wt	3.9	5
42	M-R66H+N1796D	3.4	6

[0909]

表 10. III 期变体在不同缓冲液中的浓缩稳定性和冻融稳定性。

		大聚集物（%）						
#	变体	0.1 mM, pH 8.0	1 mM, pH 8.0	1 mM, pH 8.0, 1x 冻融	0.1 mM, pH 7.4	1 mM, pH 7.4	1 mM, pH 7.4, 1x 冻融	1 mM 的 PBS, pH 7.4, 1x 冻融
60	M8H4DK-wt	0.3	1.1	2.0	0.4	1.2	3.1	13.2
35	M8H4DK-R66H+N1796D	0.2	0.3	0.1	0.4	0.2	0.3	1.3
37	M8H4DK-M41K	1.3	4.1	4.8	0.8	7.9	11.9	15.6
38	M8H4DK-R66H	0.6	0.5	1.0	0.2	0.7	2.4	16.0
39	M8H4DK-N1796D	0.7	1.1	0.1	0.2	0.1	0.7	2.5
40	M8H-wt	0.8	7.2	3.6	8.4	10.2	11.4	14.0
41	M8H-R66H+N1796D	0.3	0.4	0.4	0.3	0.4	1.2	7.6
61	M-wt	0.4	2.0	2.3	9.1	1.6	3.9	17.9
42	M-R66H+N1796D	0.4	0.3	0.5	0.4	0.5	0.5	1.6

[0910] 在延伸项目中研究了所有III期变体的功能活性以涵盖已知A1M功能的所有可能方面。在合成ABTS自由基上并在可商购的氧自由基抗氧化能力(ORAC)分析中研究了与血红素不相关的还原能力(图5)。M8H4DK标记的N17,96D-A1M和R66H+N17,96D-A1M显示出与wt A1M类似的还原能力,而M8H4DK标记的M41K-A1M和R66H-A1M则显示出略微更低的ABTS还原能力(图5A)。标记的缩短或去除几乎没有作用,但是当被M8H-标记和未被标记时R66H-N17,

96D变体则显示倾向于具有比wt A1M更高的还原能力。M8H4DK标记的wt A1M的性能在ORAC分析中被设定为100％，其他变体相对于其进行对比。所有的M8H4DK-变体在ORAC中均显示出与M8H4DK-wt相同的结果，除了M8H4DK-R66H+N17,96D，其具有显著更高的能力(图5b)。另外，M8H标记的和未标记的R66H+N17,96D-A1M显示出比wt-A1M略微更高的ORAC能力。还在细胞色素c的还原分析中对还原能力进行了研究(图6)。大部分变体与wt-A1M相比在更低的浓度下显示出略微更低的还原能力，并且对于N17,96D和R66H+N17,96D而言，这是显著的(在0.3-0.6μM下)(图6A)。它的重要性尚不清楚。标记的缩短和去除对该特性无影响。

[0911] 在游离血红素结合分析和血红素-琼脂糖结合分析中研究了血红素结合(图6)。随着在约410-415nm处出现吸收峰(所谓的Soret条带)观察到游离血红素的结合和配位(Karnaukhova等人，2014;Rutardottir等人，2016)。血红素通常在约380-390nm处具有吸收峰，并且这可在它单独溶解时或者在它与像卵白蛋白这样的非结合性对照蛋白一起混合和孵育时被观察到。但是，当血红素与wt A1M混合时，在410nm与415nm之间形成吸收峰，产生所谓的红移(即峰向更高的波长移动)和增加的Abs(413/386)比例。据显示红移程度和Abs(413/386)比例与A1M的血红素-结合功能相关(Rutardottir等人，2016)。因此在III期中对于所有变体将这些特性进行对比(图6b)。在M8H4DK标记的变体中，全部都显示出与wt A1M大致相同的红移，除了M41K变体，其具有更强的移动。有趣的是，将标记缩短为M8H增加了红移，而去除标记则降低了红移。显然，标记对该特性具有强烈的影响。将稀释系列的A1M与血红素-琼脂糖的结合跟与对照琼脂糖的结合对比，从而研究了血红素与A1M的结合。通常，像卵白蛋白这样的对照蛋白显示没有与血红素-琼脂糖的结合高于背景与对照琼脂糖的结合(图6C)。通常，所添加的M8H4DK-wt A1M(35-A1M)的70-80％与血红素琼脂糖结合，而与对照琼脂糖的结合则未观察到。在III期中将所有变体的结合进行对比。全部都显示出类似程度的与血红素-琼脂糖的结合(66-72％)，而卵白蛋白则未显示结合。

[0912] 使用迁移偏移和荧光分析的结合(Karnaukhova等人2014)进一步对血红素与M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)和M8H4DK-35-A1M(35-A1M)的结合进行分析(图11)。作为血红素结合的结果，非变性PAGE分析中wt-A1M和35-A1M的迁移在血红素:蛋白比<1时更慢，在血红素:蛋白比>1时更快，显示对血红素浓度的相同依赖性(图11A和B)。在高血红素浓度下，两种变体显示倾向于低聚，从而支持之前对于wt-A1M的发现(Karanaukhova等人2014)。类似地，血红素结合以类似的动力学在两种wt-A1M和35-A1M中引起色氨酸荧光的淬灭(图11B)。以前显示血红素配位到A1M中引起415nm下UV-吸收峰的形成(Ruttarsdottir等人，2016;karnaukhova等人，2014)。观察到wt-A1M-和35-A1M/血红素络合物类似的UV-吸收模式(图11C)，35-A1M峰仅有小的红移(415→417nm)。

[0913] 使用未受应激的新制蛋白对wt-A1M和35-A1M的ABTS-自由基还原速率进行了研究[10]，其对于wt-A1M和35-A1M类似(图12A)。在储存7天之后，wt-A1M在浓缩到1mM之后和在22℃下显示出更慢的还原速率(图12B)，表明除了这些条件下显示的聚集之外还损失蛋白活性(表11)。细胞色素c-还原(Allhorn等人，2005)对于35-A1M略微更慢(图12C)，而通过ORAC分析测量的抗氧化能力对于35-A1M则略微更高(图12D)。

[0914] 表11.M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)和M8H4DK-35-A1M(35-A1M)的物理化学特性。

[0915]

条件[1]	浓度	方法	参数	wt-A1M	35-A1M
未受应激[2]	0.1 mM	HPLC	洗脱时间（分钟）	12.1	12.1
			单体（%）	87	89
		DLS	半径（nm）	2.9	3.2
		PAGE	聚集物（%）	1.5	0.4
		SEC	单体（%）	87	93
受到应激					
加热	0.1 mM	DSF	T_m（°C）	46.6	51.6
高浓度	1 mM	PAGE	聚集物（%）	1.1	0.4
pH 7.4[3]	1 mM	PAGE	聚集物（%）	1.2	0.4
冻融[2]	1 mM	PAGE	聚集物（%）	2.0	0.4
冻融/PBS	1 mM	PAGE	聚集物（%）	13.2	7.6
延长的储存[4]					
4°C-1 天	1 mM	SEC	回收[5]（%）	100	100
			聚集物（%）	17.9	3.9
4°C-7 天	1 mM	SEC	回收（%）	100	100
			聚集物（%）	12.1	3.7
室温-7 天	1 mM	SEC	回收（%）	44	100
			聚集物（%）	0.2	0.1
37°C-1.5 小时	1 mM	SEC	回收（%）	67	100
			聚集物（%）	53	28
37°C-4.5 小时	1 mM	SEC	回收（%）	0	44
			聚集物（%）	ND[6]	15

[0916] 附注：

[0917] 1.室温，除非另外指出。

[0918] 2. 20mM的Tris-HCl，0.125M的NaCl，pH 8.0

[0919] 3. 20mM的Tris-HCl，0.125M的NaCl，pH 7.4

[0920] 4.PBS

[0921] 5.在10,000xg下离心分离之后由总的峰面积与原料的对比计算。

[0922] 6.未测定

[0923] 对A1M变体保护K562细胞免于血红素引起的细胞死亡的能力进行研究的生物分析(图7)。根据乳酸脱氢酶的释放，在无A1M的情况下用血红素孵育的细胞的细胞死亡程度被设为100％。所有M8H4DK标记的变体，包括wt-A1M，在10μM下均显示出几乎100％的保护(图7)，在各变体之间无显著差别。M8H标记的变体显示出几乎相同的保护潜力，而未标记的变体则观察到略微更低的潜力。

[0924] M8H4DK-wt A1M(35-A1M)和M8H4DK-35-A1M(wt-A1M)的细胞保护能力

[0925] 在暴露于游离血红素和游离的铁的K562细胞和人肾脏近端小管上皮细胞系(HK-2)中对两种A1M变体的细胞保护特性进行了测试。图12显示，通过暴露于0.1mM的血红素的K562-细胞的胞质标志LDH的胞外释放测量，两种A1M变体完全抑制细胞的死亡。wt-A1M和35-A1M的剂量响应曲线几乎完全重叠，表明类似的细胞保护能力。

[0926] 图14中显示HK-2细胞的保护。首先，由Fenton(会产生羟基自由基的游离的铁、抗坏血酸盐和过氧化氢的混合物)反应引起细胞的破坏。通过追踪重叠剂量响应曲线，通过

WST-1分析测量的细胞存活率由两种A1M变体恢复(图14A)。血红素加氧酶-1(HO-1)(一种记录详尽的氧化应激响应的生物标志(Alam等人,1999))的上调被wt-A1M和35-A1M以类似的程度显著抑制(图14B)。还通过使用血红素孵育引起HK-2细胞的细胞破坏,并且可被两种A1M变体抑制(图14C和D)。再一次,使用两种血红素浓度,10μM和30μM,通过WST-1分析测量的细胞存活率以类似的程度被两种蛋白恢复(图14C)。HO-1和另一种细胞应激响应基因Hsp70的上调被两种A1M变体以类似的程度抑制(图14D)。

[0927] 小鼠中M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)和M8H4DK-35-1M(35-A1M)的体内分布

[0928] 以前显示静脉内注射的A1M被迅速从血液清除,并且主要集中在大鼠和小鼠的肾脏和肝脏(Larsson等人,2001;Ahlstedt等人,2015)。我们对wt-A1M和35-A1M在血液中的清除速率和在器官中的分布进行了对比(图15)。在前60分钟期间观察到类似的更新速率,而35-A1M则在1小时之后被更快地清除。在10分钟和30分钟之后A1M在研究器官中的分布在两种蛋白之间未显示任何显著的差别。wt-A1M和35-A1M均主要存在于肾脏中,在心脏、肝脏、肺部、皮肤和脾脏中观察到更少的量,而在大脑中则观察到可忽略的量。

[0929] M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)和M8H4DK-35-A1M(35-A1M)对肾脏的体内保护

[0930] 以前,A1M已经在引起血红素相关的肾脏损伤和氧化应激相关的肾脏损伤的动物模型中显示出体内治疗效果(Wester-Rosenlöf等人,2014;Nääv等人,2015;Sverrison等人,2014)。在此,我们在甘油注射横纹肌溶解症小鼠模型中研究了两种A1M变体的体内保护作用,在小鼠模型中由于肌肉断裂而产生急性肾脏损伤(AKI),并释放肌红蛋白、游离血红素、自由基和其他组织成分。甘油注射引起HO-1基因和Hsp70基因(细胞应激的两种生物标志)(图16A和16B)的巨大上调,并且大部分上调由于同时注射wt-A1M或35-A1M而被抑制。在施用的剂量下(7mg/kg动物重量)未观察到两种A1M变体之间的显著差别。

[0931] 总之,III期中的研究显示,含N17,96D的A1M-突变显著增加了A1M分子的稳定性,在添加R66H突变后A1M分子被进一步改善。此外,M8H4DK标记的A1M变体比具有更短标记的变体或者没有标记的变体更稳定。因此,标记不仅充当纯化工具,而且还为A1M提供增加的稳定性和稳定性,并且不会对功能造成影响。M8H4DK-R66H+N1796D(35-A1M)分子显示相同或者更佳的功能特性,可能细胞色素c的还原除外。总之,稳定性/溶解性和功能研究表明,M8H4DK-R66H+N17,96D(35-A1M)与M8H4DK-wt A1M(wt-A1M)相比具有改善的分子特性,并且使用急性肾脏损伤的横纹肌溶解症甘油注射模型Wt-A1M和35-A1M均显示对肾脏的体内保护作用。

[0932] M8H4DK-R66H+N1796D相对于M8H4DK-wt的进一步的稳定性研究。

[0933] 为了进一步将M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M与wt-A1M进行对比,在进行冻融循环并在+4℃和室温下储存之后通过SEC-FPLC和ABTS还原分析对聚集和功能进行测试(图8)。wt-A1M和R66H+N17,96D-A1M的样品(100μM)均很好地耐受5x冻融循环。如前所示,在浓缩到1mM之后wt-A1M显示出比R66H+N17,96D-A1M更多的聚集,储存1周之后与储存过夜之后相比观察到类似的结果。增加的wt-A1M的聚集未影响2μM-样品的ABTS还原活性。在冻融、浓缩并在+4℃下储存1周之后,目视检查显示两个变体完全清澈的溶液。为了进一步使A1M溶液受到应激,将100μM和1mM的溶液在室温下储存1周。100μM的溶液的目视检查显示轻微的wt-A1M浑浊,但是R66H+N17,96D-A1M溶液则保持清澈。SEC-FPLC显示wt-A1M的曲线下面积降低到原料的80%,表明wt-A1M的损失,尽管未观察到大聚集物的增加。损失最可能是由于蛋白被

沉淀并在运行FPLC之前通过过滤除去而引起。对于R66H+N17,96D-A1M,可观察到聚集的一些增加,但是在100μM下在室温下储存一周之后未损失蛋白。在ABTS分析中,R66H+N17,96D-A1M仍显示出完全活性,而对于wt-A1M则观察到稍微降低。储存1周的1mM的溶液的目视检查显示两种变体都浑浊,但是wt-A1M溶液看上去更稠。在溶液被稀释10倍以便上样到SEC上时,R66H+N17,96D-A1M的沉淀被溶解,但是wt-A1M的沉淀则未被溶解。在SEC中,观察到很少的聚集物,但是仅44%的wt-A1M原料保留。相比而言,R66H+N17,96D-A1M则100%保留。在ABTS分析中,wt-A1M具有严重降低的活性,而R66H+N17,96D-A1M的活性则保持不变。该研究显示,M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M在室温下在高浓度下能够耐受储存,而wt-A1M则不能。

[0934] 在37℃下研究了1mM的溶液的稳定性。将样品孵育1.5小时、2.5小时和4.5小时,然后进行目视检查,通过SEC-FPLC和ABTS还原分析进行分析(图9)。孵育1.5小时之后,在目视检查时两个溶液仍然是清澈的,但是SEC-FPLC显示在wt-A1M溶液(53%)中比在R66H+N17,96D-A1M溶液(28%)中具有更多的聚集物。通过曲线下的面积估计,在wt-A1M的SEC上仅67%的原料被洗脱,而R66H+N17,96D-A1M则100%被洗脱。两种变体在ABTS分析中均显示出完全活性。孵育2.5小时之后,wt-A1M溶液变浑浊,沉淀不能溶解。在SEC上发现40%的原料,ABTS活性被显著降低。R66H+N17,96D-A1M溶液仍然是清澈的,并在ABTS分析中显示出完全活性,但是大聚集物则在SEC-FPLC中从28%增加到38%。4.5小时之后,wt-A1M变为粘稠物质,不能进行吸液。因此,未进一步对其进行分析。R66H+N17,96D-A1M变浑浊,但仍不能进行吸液。一些沉淀在稀释之后仍然保留。SEC上洗脱的蛋白的量为原料的44%,并在ABTS分析中观察到降低的活性。研究表明,在+37℃下孵育之后,A1M首先形成可溶解的聚集物,然后它形成不可逆的聚集物,并在ABTS分析中损失活性。孵育2.5小时之后观察到完全不可逆的wt-A1M沉淀,而对于M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M在4.5小时之后则仅观察到部分不可逆的沉淀。因此,M8H4DK-R66H+N17,96D-A1M在+37℃下比M8H4DK-wt-A1M更不能耐受储存。

[0935] 参考文献

[0936] Ahlstedt J,Tran TA,Strand F,Holmqvist B,Strand S-E,Gram M,and Åkerström B.Biodistribution and pharmacokinetics of recombinant α_1-microglobulin and its potential use in radioprotection of kidneys.Am J Nucl Med Mol Imaging 5(4):333-347,2015.

[0937] Alam J,Stewart D,Touchard C,Boinapally S,Choi AM,and Cook JL.Nrf2,a Cap'n'Collar transcription factor,regulates induction of the heme-oxygenase gene.J Biol Chem 274:26071-26078,1999.

[0938] Allhorn M,Berggård T,Nordberg J,Olsson ML,Åkerström B.Processing of the lipocalinα_1-microglobulin by hemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties.Blood 99;2002:1894-1901.

[0939] Allhorn M,Klapyta A,Åkerström B.Redox properties of the lipocalin α_1-microglobulin:reduction of cytochrome c,hemoglobin,and free iron.Free Radic Biol Med 38;2005:557-567.

[0940] Anderson UD,Rutardottir S,Centlow M,Olsson MG,Kristensen,K,Isberg PE,Thilaganatan B,Åkerström B,Hansson SR.Fetal hemoglobin andα_1-microglobulin as

first and early second trimester predictive biomarkers of preeclampsia.Am J Obst Gynecol 204;2011:520.e1-520.e5

[0941] Berggård T,Cohen A,Persson P,Lindqvist A,Cedervall T,Silow M,Thøgersen IB,Jönsson J-Å,Enghild JJ,Åkerström B.α_1-Microglobulin chromophores are located to three lysine residues semiburied in the lipocalin pocket and associated with a novel lipophilic compound.Protein Sci.8;1999:2611-2620.

[0942] Berggård T,Thelin N,Falkenberg C,Enghild JJ,Åkerström B.Prothrombin, albumin and immunoglobulin A form covalent complexes withα_1-microglobulin in human plasma.Eur J Biochem 245;1997:676-683.

[0943] Bratt T,Olsson H,Sjöberg EM,Jergil B,Åkerström B.Cleavage of the α_1-microglobulin-bikunin precursor is localized to the Golgi apparatus of rat liver cells.Biochim Biophys Acta 1157;1993:147-154.

[0944] Centlow M,Carninci P,Nemeth K,Mezey E,Brownstein M,Hansson SR.Placental expression profiling in preeclampsia:local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes.Fertility and sterility 90;2008: 1834-1843.

[0945] Ekström B.,Berggård I.Humanα_1-microglobulin:Purification procedure, chemical and physicochemical properties.J Biol Chem 252(22);1977:8048-8057.

[0946] Escribano J,Lopez-Otin C,Hjerpe A,Grubb A,Mendez E.Location and characterization of the three carbohydrate prosthetic groups of human protein HC.FEBS Lett 266(1-2);1990:167-170.

[0947] Flower DR.The lipocalin family.Biochem J 318;1996:1-14.

[0948] Gram M,Anderson UD,Johansson ME,Edström-HägerwallA,Larsson I,Jälmby M, Hansson SR,and Åkerström B.The human endogenous protection system against cell-free hemoglobin and heme is overwhelmed in preeclampsia and provides potential biomarkers and clinical indicators.PloS One 10(9):e0138111,2015.

[0949] Hansson SR,Gram M and Åkerström B.Fetal hemoglobin in preeclampsia:a new etiological tool for prediction/diagnosis and a potential target for therapy.Curr Opin Obstet Gynecol.25(6);2013:448-455.

[0950] Karnaukhova E,Rutardottir S,Majabi M,WesterRosenlöfL,Alayash AI, Åkerström B.Characterization of heme binding to recombinantα_1-microglobulin.Front Physiol 5;2014:465.doi:10.3389/fphys.2014.00465.

[0951] Kaumeyer JF,Polazzi JO,Kotick MP.The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter-alpha-trypsin inhibitor also encodesα_1-microglobulin(protein HC).Nucleic Acids Res 14(20);1986:7839-7850.

[0952] Kwasek A,Osmark P,Allhorn M,Lindqvist A,Åkerström B,Wasylewski Z.Production of recombinant humanα_1-microglobulin and mutated forms involved

in chromophore formation.Prot.Expr.Purif.53;2007:145-152.

[0953] Laemmli UK.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature 227;1970:680-685.

[0954] Larsson J,Wingårdh K,Berggård T,Davies JR,Lögdberg L,Strand S-E,Åkerström B.Distribution of ^{125}I-labelled $_1$-microglobulin in rats after intravenous injection.J Lab Clin Med 137:165-175,2001

[0955] Lindqvist A,Bratt T,Altieri M,Kastern W,Åkerström B.Ratα_1-microglobulin:co-expression in liver with the light chain of inter-alpha-trypsin inhibitor.Biochim Biophys Acta 1130;1992:63-67.

[0956] May K,RosenlöfL,Olsson MG,Centlow M,Mörgelin M,Larsson I,Cederlund M,Rutardottir S,Schneider H,Siegmund W,Åkerström B,Hansson SR.Perfusion of human placenta with haemoglobin introduces preeclampsia-like injuries that are prevented byα_1-microglobulin.Placenta 32(4);2011:323-332.

[0957] Meining W,Skerra A.The crystal structure of humanα_1-microglobulin reveals a potential haem-binding site.Biochem J.445(2);2012:175-82.

[0958] Nääv Å,Erlandsson L,Axelsson J,Larsson I,Johansson M,Wester Rosenlöf L,Mörgelin M,Casslén V,Gram M,Åkerström B,Hansson SR.A1M ameliorates preeclampsia-like symptoms in placenta and kidney induced by cell-free fetal hemoglobin in rabbit.PloS One,10(5);2015:e0125499.

[0959] Olsson MG,Allhorn M,Larsson J,Cederlund M,Lundqvist,K,Schmidtchen A,Sørensen OE,MörgelinM,Åkerström B.Up-regulation of A1M/α_1-microglobulin in skin by heme and reactive oxygen species gives protection from oxidative damage.PLoS One 6(11);2011:e27505.

[0960] Olsson MG,Centlow M,Rutardottir S,Stenfors I,Larsson J,Hosseini-Maaf B,Olsson ML,Hansson SR,Åkerström B.Increased levels of free hemoglobin,oxidation markers,and the antioxidative heme scavengerα_1-microglobulin in preeclampsia.Free Rad.Biol.Med.48;2010:284-291.

[0961] Olsson MG,Olofsson T,Tapper H,ÅkerströmB.The lipocalinα_1-microglobulin protects erythroid K562 cells against oxidative damage induced by heme and reactive oxygen species.Free Rad Res.42;2008:725-736.

[0962] Olsson MG,Rosenlöf LW,Kotarsky H,Olofsson T,Leanderson T,Mörgelin M,Fellman V,Åkerström B.The radical-binding lipocalin A1M binds to a Complex I subunit and protects mitochondrial structure and function.Antiox Redox Signal.18(16);2013:2017-2028.

[0963] Rutardottir S,Karnaukhova E,Nantasenamat C,Songtawee N,Prachayasittikul V,Rajabi M,WesterRosenlöf L,Alayash AI,ÅkerströmB.Studies of

two heme binding sites in A1M/α_1-microglobulin using site-directed mutagenesis and molecular simulation.Biochim Biophys Acta 1864(1);2016:29-41.

[0964] Sala A,Campagnoli M,Perani E,Romano A,LabóS,Monzani E,Minchiotti L,Galliano M.Humanα_1-microglobulin is covalently bound to kynurenine-derived chromophores.J Biol Chem 279(49);2004:51033-51044.

[0965] Sverrisson K,Axelsson J,Rippe A,Gram M,ÅkerströmB,Hansson SR.Rippe B.Extracellular fetal hemoglobin(HbF)induces increases in glomerular permeability.Inhibition withα_1-microglobulin(A1M)and Tempol.Am J Physiol Renal Physiol 306(4);2014:F442-448.

[0966] Wester-Rosenlöf L,Casslén V,Axelsson J,Edström-HägerwallA,Gram M,Holmquist M,Johansson ME,Larsson I,Ley D,Marsal K,MörgelinM,Rippe B,Rutardottir S,Shohani B,Åkerström B,Hansson SR.A1M/α_1-microglobulin protects from heme-induced placental and renal damage in a pregnant sheep model of preeclampsia.PLoS One 9(1);2014:e86353.

[0967] Åkerström B,Borregaard N,Flower D,Salier JP.Lipocalins,an introduction.In Lipocalins.Eds.Åkerström B,Borregaard N,Flower D,Salier JP,Landes Bioscience,Georgetown TX.

[0968] ÅkerströmB,Gram M.A1M,an extravascular tissue cleaning and house-keeping protein.Free Rad Biol Med 74;2014:274-282.

[0969] ÅkerströmB,Maghzal GJ,Winterbourn CC,Kettle AJ.The lipocalinα_1-microglobulin has radical scavenging activity.J Biol Chem 282;2007:31493-31503.

[0970] ÅkerströmB,Bratt T,Enghild JJ.Formation of theα_1-microglobulin chromophore in mammalian and insect cells:a novel post-translational mechanism?FEBS Lett 362,50-54,1995。

[0001] 序列表

[0002] <110> A1M制药公司，医药村，223 81 隆德，瑞典

[0003] <120> 新alpha-1-微球蛋白衍生蛋白及其应用

[0004] <130> P017240PCT1

[0005] <160> 95

[0006] <170> BiSSAP 1.3

[0007] <210> 1

[0008] <211> 183

[0009] <212> PRT

[0010] <213> 智人(Homo sapiens)

[0011] <220>

[0012] <223> 野生型人A1M,无突变

[0013] <400> 1

[0014] Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe

[0015] 1 5 10 15

[0016] Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser

[0017] 20 25 30

[0018] Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr

[0019] 35 40 45

[0020] Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser

[0021] 50 55 60

[0022] Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu

[0023] 65 70 75 80

[0024] Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn

[0025] 85 90 95

[0026] Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala

[0027] 100 105 110

[0028] Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr

[0029] 115 120 125

[0030] Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln

[0031] 130 135 140

[0032] Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile

[0033] 145 150 155 160

[0034] Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro

[0035] 165 170 175

[0036] Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg

[0037] 180

[0038] <210> 2

[0039] <211> 184

[0040] <212> PRT

[0041] <213> 智人(Homo sapiens)

[0042] <220>

[0043] <223> rhA1M, 即N端Met

[0044] <400> 2

[0045] Met Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn

[0046] 1 5 10 15

[0047] Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly

[0048] 20 25 30

[0049] Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser

[0050] 35 40 45

[0051] Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr

[0052] 50 55 60

[0053] Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr

[0054] 65 70 75 80

[0055] Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp

[0056] 85 90 95

[0057] Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr

[0058] 100 105 110

[0059] Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile

[0060] 115 120 125

[0061] Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu

[0062] 130 135 140

[0063] Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser

[0064] 145 150 155 160

[0065] Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu

[0066] 165 170 175

[0067] Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg

[0068] 180

[0069] <210> 3

[0070] <211> 184

[0071] <212> PRT

[0072] <213> 智人(Homo sapiens)

[0073] <220>

[0074] <223> hA1M, 无标记,N端Met, N17,96D; R66H

[0075] <400> 3

[0076] Met Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn

[0077] 1 5 10 15

[0078] Phe Asp Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly
[0079] 20 25 30
[0080] Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser
[0081] 35 40 45
[0082] Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr
[0083] 50 55 60
[0084] Ser Thr His Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr
[0085] 65 70 75 80
[0086] Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp
[0087] 85 90 95
[0088] Asp Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr
[0089] 100 105 110
[0090] Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile
[0091] 115 120 125
[0092] Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu
[0093] 130 135 140
[0094] Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser
[0095] 145 150 155 160
[0096] Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu
[0097] 165 170 175
[0098] Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[0099] 180
[0100] <210> 4
[0101] <211> 184
[0102] <212> PRT
[0103] <213> 智人(Homo sapiens)
[0104] <220>
[0105] <223> hA1M, 非标记,N端Met, M41K
[0106] <400> 4
[0107] Met Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn
[0108] 1 5 10 15
[0109] Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly
[0110] 20 25 30
[0111] Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser
[0112] 35 40 45
[0113] Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr
[0114] 50 55 60
[0115] Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr
[0116] 65 70 75 80

[0117] Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp
[0118] 85 90 95
[0119] Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr
[0120] 100 105 110
[0121] Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile
[0122] 115 120 125
[0123] Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu
[0124] 130 135 140
[0125] Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser
[0126] 145 150 155 160
[0127] Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu
[0128] 165 170 175
[0129] Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[0130] 180
[0131] <210> 5
[0132] <211> 195
[0133] <212> PRT
[0134] <213> 智人(Homo sapiens)
[0135] <220>
[0136] <223> 6His, N17,96D; R66H
[0137] <400> 5
[0138] Met His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro Val Pro
[0139] 1 5 10 15
[0140] Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile Ser Arg
[0141] 20 25 30
[0142] Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys Pro Trp
[0143] 35 40 45
[0144] Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val Leu Gly
[0145] 50 55 60
[0146] Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His Trp Arg
[0147] 65 70 75 80
[0148] Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr Asp Thr
[0149] 85 90 95
[0150] Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr Met Glu
[0151] 100 105 110
[0152] Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe Leu Thr
[0153] 115 120 125
[0154] Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys Leu Tyr
[0155] 130 135 140

[0156] Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe Arg Val
[0157] 145 150 155 160
[0158] Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr Met Ala
[0159] 165 170 175
[0160] Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro Ile Leu
[0161] 180 185 190
[0162] Ile Pro Arg
[0163] 195
[0164] <210> 6
[0165] <211> 195
[0166] <212> PRT
[0167] <213> 智人(Homo sapiens)
[0168] <220>
[0169] <223> hA1M, 6His, M41K
[0170] <400> 6
[0171] Met His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro Val Pro
[0172] 1 5 10 15
[0173] Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asn Ile Ser Arg
[0174] 20 25 30
[0175] Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys Pro Trp
[0176] 35 40 45
[0177] Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val Leu Gly
[0178] 50 55 60
[0179] Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg Trp Arg
[0180] 65 70 75 80
[0181] Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr Asp Thr
[0182] 85 90 95
[0183] Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr Met Glu
[0184] 100 105 110
[0185] Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe Leu Thr
[0186] 115 120 125
[0187] Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys Leu Tyr
[0188] 130 135 140
[0189] Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe Arg Val
[0190] 145 150 155 160
[0191] Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr Met Ala
[0192] 165 170 175
[0193] Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro Ile Leu
[0194] 180 185 190

[0195] Ile Pro Arg
[0196] 195
[0197] <210> 7
[0198] <211> 197
[0199] <212> PRT
[0200] <213> 智人(Homo sapiens)
[0201] <220>
[0202] <223> 8His, N17,96D; R66H
[0203] <400> 7
[0204] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro
[0205] 1 5 10 15
[0206] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile
[0207] 20 25 30
[0208] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys
[0209] 35 40 45
[0210] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
[0211] 50 55 60
[0212] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His
[0213] 65 70 75 80
[0214] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
[0215] 85 90 95
[0216] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr
[0217] 100 105 110
[0218] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
[0219] 115 120 125
[0220] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
[0221] 130 135 140
[0222] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
[0223] 145 150 155 160
[0224] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
[0225] 165 170 175
[0226] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
[0227] 180 185 190
[0228] Ile Leu Ile Pro Arg
[0229] 195
[0230] <210> 8
[0231] <211> 197
[0232] <212> PRT
[0233] <213> 智人(Homo sapiens)

[0234] <220>

[0235] <223> hA1M, 8His, M41K

[0236] <400> 8

[0237] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro

[0238] 1 5 10 15

[0239] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asn Ile

[0240] 20 25 30

[0241] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys

[0242] 35 40 45

[0243] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val

[0244] 50 55 60

[0245] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg

[0246] 65 70 75 80

[0247] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr

[0248] 85 90 95

[0249] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr

[0250] 100 105 110

[0251] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe

[0252] 115 120 125

[0253] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys

[0254] 130 135 140

[0255] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe

[0256] 145 150 155 160

[0257] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr

[0258] 165 170 175

[0259] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro

[0260] 180 185 190

[0261] Ile Leu Ile Pro Arg

[0262] 195

[0263] <210> 9

[0264] <211> 197

[0265] <212> PRT

[0266] <213> 智人(Homo sapiens)

[0267] <220>

[0268] <223> hA1M, 8His, 无突变

[0269] <400> 9

[0270] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro

[0271] 1 5 10 15

[0272] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asn Ile

[0273] 20 25 30

[0274] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys

[0275] 35 40 45

[0276] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val

[0277] 50 55 60

[0278] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg

[0279] 65 70 75 80

[0280] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr

[0281] 85 90 95

[0282] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr

[0283] 100 105 110

[0284] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe

[0285] 115 120 125

[0286] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys

[0287] 130 135 140

[0288] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe

[0289] 145 150 155 160

[0290] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr

[0291] 165 170 175

[0292] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro

[0293] 180 185 190

[0294] Ile Leu Ile Pro Arg

[0295] 195

[0296] <210> 10

[0297] <211> 193

[0298] <212> PRT

[0299] <213> 智人(Homo sapiens)

[0300] <220>

[0301] <221> VARIANT

[0302] <222> 1

[0303] <223> Xaa = Met或不存在

[0304] <220>

[0305] <221> VARIANT

[0306] <222> 1

[0307] <223> Xaa = Met或不存在

[0308] <220>

[0309] <221> VARIANT

[0310] <222> 2

[0311] <223> Xaa = His或不存在

[0312] <220>
[0313] <221> VARIANT
[0314] <222> 2
[0315] <223> Xaa = His或不存在
[0316] <220>
[0317] <221> VARIANT
[0318] <222> 3
[0319] <223> Xaa = His或不存在
[0320] <220>
[0321] <221> VARIANT
[0322] <222> 3
[0323] <223> Xaa = His或不存在
[0324] <220>
[0325] <221> VARIANT
[0326] <222> 4
[0327] <223> Xaa = His或不存在
[0328] <220>
[0329] <221> VARIANT
[0330] <222> 4
[0331] <223> Xaa = His或不存在
[0332] <220>
[0333] <221> VARIANT
[0334] <222> 5
[0335] <223> Xaa = His或不存在
[0336] <220>
[0337] <221> VARIANT
[0338] <222> 5
[0339] <223> Xaa = His或不存在
[0340] <220>
[0341] <221> VARIANT
[0342] <222> 6
[0343] <223> Xaa = His或不存在
[0344] <220>
[0345] <221> VARIANT
[0346] <222> 6
[0347] <223> Xaa = His或不存在
[0348] <220>
[0349] <221> VARIANT
[0350] <222> 7

[0351] <223> Xaa = His或不存在

[0352] <220>

[0353] <221> VARIANT

[0354] <222> 7

[0355] <223> Xaa = His或不存在

[0356] <220>

[0357] <221> VARIANT

[0358] <222> 8

[0359] <223> Xaa = His或不存在

[0360] <220>

[0361] <221> VARIANT

[0362] <222> 8

[0363] <223> Xaa = His或不存在

[0364] <220>

[0365] <221> VARIANT

[0366] <222> 9

[0367] <223> Xaa = His或不存在

[0368] <220>

[0369] <221> VARIANT

[0370] <222> 9

[0371] <223> Xaa = His或不存在

[0372] <220>

[0373] <221> VARIANT

[0374] <222> 10

[0375] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0376] <220>

[0377] <221> VARIANT

[0378] <222> 10

[0379] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0380] <220>

[0381] <221> VARIANT

[0382] <222> 11

[0383] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0384] <220>

[0385] <221> VARIANT

[0386] <222> 11

[0387] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0388] <220>

[0389] <221> VARIANT

[0390] <222> 12

[0391] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0392] <220>

[0393] <221> VARIANT

[0394] <222> 12

[0395] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0396] <220>

[0397] <221> VARIANT

[0398] <222> 13

[0399] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0400] <220>

[0401] <221> VARIANT

[0402] <222> 13

[0403] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0404] <220>

[0405] <221> VARIANT

[0406] <222> 14

[0407] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0408] <220>

[0409] <221> VARIANT

[0410] <222> 14

[0411] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0412] <220>

[0413] <221> VARIANT

[0414] <222> 31

[0415] <223> Xaa = Asn或Asp

[0416] <220>

[0417] <221> VARIANT

[0418] <222> 55

[0419] <223> Xaa = Met或Lys

[0420] <220>

[0421] <221> VARIANT

[0422] <222> 80

[0423] <223> Xaa = Arg或His

[0424] <220>

[0425] <221> VARIANT

[0426] <222> 110

[0427] <223> Xaa = Asn或Asp

[0428] <400> 10

[0429] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Pro
[0430] 1 5 10 15
[0431] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Xaa Ile
[0432] 20 25 30
[0433] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys
[0434] 35 40 45
[0435] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Xaa Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
[0436] 50 55 60
[0437] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Xaa
[0438] 65 70 75 80
[0439] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
[0440] 85 90 95
[0441] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Xaa Ile Thr
[0442] 100 105 110
[0443] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
[0444] 115 120 125
[0445] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
[0446] 130 135 140
[0447] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
[0448] 145 150 155 160
[0449] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
[0450] 165 170 175
[0451] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
[0452] 180 185 190
[0453] Ile Leu Ile Pro Arg
[0454] 195
[0455] <210> 11
[0456] <211> 16
[0457] <212> PRT
[0458] <213> 智人(Homo sapiens)
[0459] <220>
[0460] <223> Y1
[0461] <400> 11
[0462] Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe
[0463] 1 5 10 15
[0464] <210> 12
[0465] <211> 23
[0466] <212> PRT
[0467] <213> 智人(Homo sapiens)

[0468] <220>

[0469] <223> Y2

[0470] <400> 12

[0471] Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr

[0472] 1 5 10 15

[0473] Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile

[0474] 20

[0475] <210> 13

[0476] <211> 24

[0477] <212> PRT

[0478] <213> 智人(Homo sapiens)

[0479] <220>

[0480] <223> Y3

[0481] <400> 13

[0482] Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu

[0483] 1 5 10 15

[0484] Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr

[0485] 20

[0486] <210> 14

[0487] <211> 29

[0488] <212> PRT

[0489] <213> 智人(Homo sapiens)

[0490] <220>

[0491] <223> Y4

[0492] <400> 14

[0493] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr

[0494] 1 5 10 15

[0495] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp

[0496] 20 25

[0497] <210> 15

[0498] <211> 87

[0499] <212> PRT

[0500] <213> 智人(Homo sapiens)

[0501] <220>

[0502] <223> Y5

[0503] <400> 15

[0504] Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala

[0505] 1 5 10 15

[0506] Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr

[0507] 20 25 30

[0508] Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln

[0509] 35 40 45

[0510] Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile

[0511] 50 55 60

[0512] Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro

[0513] 65 70 75 80

[0514] Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg

[0515] 85

[0516] <210> 16

[0517] <211> 83

[0518] <212> PRT

[0519] <213> 智人(Homo sapiens)

[0520] <220>

[0521] <223> Y5

[0522] <400> 16

[0523] Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala

[0524] 1 5 10 15

[0525] Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr

[0526] 20 25 30

[0527] Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln

[0528] 35 40 45

[0529] Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile

[0530] 50 55 60

[0531] Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro

[0532] 65 70 75 80

[0533] Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg

[0534] 85

[0535] <210> 17

[0536] <211> 197

[0537] <212> PRT

[0538] <213> 智人(Homo sapiens)

[0539] <220>

[0540] <221> VARIANT

[0541] <222> 1

[0542] <223> Xaa = Met或不存在

[0543] <220>

[0544] <221> VARIANT

[0545] <222> 1

[0546] <223> Xaa = Met或不存在

[0547] <220>

[0548] <221> VARIANT

[0549] <222> 2

[0550] <223> Xaa = His或不存在

[0551] <220>

[0552] <221> VARIANT

[0553] <222> 2

[0554] <223> Xaa = His或不存在

[0555] <220>

[0556] <221> VARIANT

[0557] <222> 3

[0558] <223> Xaa = His或不存在

[0559] <220>

[0560] <221> VARIANT

[0561] <222> 3

[0562] <223> Xaa = His或不存在

[0563] <220>

[0564] <221> VARIANT

[0565] <222> 4

[0566] <223> Xaa = His或不存在

[0567] <220>

[0568] <221> VARIANT

[0569] <222> 4

[0570] <223> Xaa = His或不存在

[0571] <220>

[0572] <221> VARIANT

[0573] <222> 5

[0574] <223> Xaa = His或不存在

[0575] <220>

[0576] <221> VARIANT

[0577] <222> 5

[0578] <223> Xaa = His或不存在

[0579] <220>

[0580] <221> VARIANT

[0581] <222> 6

[0582] <223> Xaa = His或不存在

[0583] <220>

[0584] <221> VARIANT

[0585] <222> 6

[0586] <223> Xaa = His或不存在

[0587] <220>

[0588] <221> VARIANT

[0589] <222> 7

[0590] <223> Xaa = His或不存在

[0591] <220>

[0592] <221> VARIANT

[0593] <222> 7

[0594] <223> Xaa = His或不存在

[0595] <220>

[0596] <221> VARIANT

[0597] <222> 8

[0598] <223> Xaa = His或不存在

[0599] <220>

[0600] <221> VARIANT

[0601] <222> 8

[0602] <223> Xaa = His或不存在

[0603] <220>

[0604] <221> VARIANT

[0605] <222> 9

[0606] <223> Xaa = His或不存在

[0607] <220>

[0608] <221> VARIANT

[0609] <222> 9

[0610] <223> Xaa = His或不存在

[0611] <220>

[0612] <221> VARIANT

[0613] <222> 10

[0614] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0615] <220>

[0616] <221> VARIANT

[0617] <222> 10

[0618] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0619] <220>

[0620] <221> VARIANT

[0621] <222> 11

[0622] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0623] <220>

[0624] <221> VARIANT

[0625] <222> 11

[0626] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0627] <220>

[0628] <221> VARIANT

[0629] <222> 12

[0630] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0631] <220>

[0632] <221> VARIANT

[0633] <222> 12

[0634] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0635] <220>

[0636] <221> VARIANT

[0637] <222> 13

[0638] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0639] <220>

[0640] <221> VARIANT

[0641] <222> 13

[0642] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0643] <220>

[0644] <221> VARIANT

[0645] <222> 14

[0646] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0647] <220>

[0648] <221> VARIANT

[0649] <222> 14

[0650] <223> Xaa = Asp, Glu, Lys, Arg,或不存在

[0651] <220>

[0652] <221> VARIANT

[0653] <222> 31

[0654] <223> Xaa = Asn或Asp

[0655] <220>

[0656] <221> VARIANT

[0657] <222> 55

[0658] <223> Xaa = Met或Lys

[0659] <220>

[0660] <221> VARIANT

[0661] <222> 80

[0662] <223> Xaa = Arg或His

[0663] <220>

[0664] <221> VARIANT

[0665] <222> 110

[0666] <223> Xaa = Asn或Asp

[0667] <400> 17

[0668] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Pro

[0669] 1 5 10 15

[0670] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Xaa Ile

[0671] 20 25 30

[0672] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys

[0673] 35 40 45

[0674] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Xaa Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val

[0675] 50 55 60

[0676] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Xaa

[0677] 65 70 75 80

[0678] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr

[0679] 85 90 95

[0680] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Xaa Ile Thr

[0681] 100 105 110

[0682] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe

[0683] 115 120 125

[0684] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys

[0685] 130 135 140

[0686] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe

[0687] 145 150 155 160

[0688] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr

[0689] 165 170 175

[0690] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro

[0691] 180 185 190

[0692] Ile

[0693] <210> 18

[0694] <211> 180

[0695] <212> PRT

[0696] <213> 智人(Homo sapiens)

[0697] <220>

[0698] <223> hA1M, No tag, N-terminal Met, N17,96D; R66H; truncated

[0699] <400> 18

[0700] Met Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn

[0701] 1 5 10 15

[0702] Phe Asp Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly
[0703] 20 25 30
[0704] Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser
[0705] 35 40 45
[0706] Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr
[0707] 50 55 60
[0708] Ser Thr His Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr
[0709] 65 70 75 80
[0710] Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp
[0711] 85 90 95
[0712] Asp Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr
[0713] 100 105 110
[0714] Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile
[0715] 115 120 125
[0716] Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu
[0717] 130 135 140
[0718] Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser
[0719] 145 150 155 160
[0720] Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu
[0721] 165 170 175
[0722] Pro Glu Pro Ile
[0723] 180
[0724] <210> 19
[0725] <211> 180
[0726] <212> PRT
[0727] <213> 智人(Homo sapiens)
[0728] <220>
[0729] <223> hA1M, 无标记,N端Met,M41K;被截短
[0730] <400> 19
[0731] Met Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn
[0732] 1 5 10 15
[0733] Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly
[0734] 20 25 30
[0735] Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser
[0736] 35 40 45
[0737] Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr
[0738] 50 55 60
[0739] Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr
[0740] 65 70 75 80

[0741] Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp
[0742] 85 90 95
[0743] Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr
[0744] 100 105 110
[0745] Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile
[0746] 115 120 125
[0747] Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu
[0748] 130 135 140
[0749] Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser
[0750] 145 150 155 160
[0751] Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu
[0752] 165 170 175
[0753] Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[0754] 180
[0755] <210> 20
[0756] <211> 191
[0757] <212> PRT
[0758] <213> 智人(Homo sapiens)
[0759] <220>
[0760] <223> 6His, N17,96D; R66H; 被截短
[0761] <400> 20
[0762] Met His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro Val Pro
[0763] 1 5 10 15
[0764] Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile Ser Arg
[0765] 20 25 30
[0766] Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys Pro Trp
[0767] 35 40 45
[0768] Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val Leu Gly
[0769] 50 55 60
[0770] Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His Trp Arg
[0771] 65 70 75 80
[0772] Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr Asp Thr
[0773] 85 90 95
[0774] Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr Met Glu
[0775] 100 105 110
[0776] Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe Leu Thr
[0777] 115 120 125
[0778] Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys Leu Tyr
[0779] 130 135 140

[0780] Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe Arg Val
[0781] 145 150 155 160
[0782] Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr Met Ala
[0783] 165 170 175
[0784] Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro Ile
[0785] 180 185 190
[0786] <210> 21
[0787] <211> 191
[0788] <212> PRT
[0789] <213> 智人(Homo sapiens)
[0790] <220>
[0791] <223> hA1M, 6His, M41K; 被截短
[0792] <400> 21
[0793] Met His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro Val Pro
[0794] 1 5 10 15
[0795] Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asn Ile Ser Arg
[0796] 20 25 30
[0797] Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys Pro Trp
[0798] 35 40 45
[0799] Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val Leu Gly
[0800] 50 55 60
[0801] Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg Trp Arg
[0802] 65 70 75 80
[0803] Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr Asp Thr
[0804] 85 90 95
[0805] Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr Met Glu
[0806] 100 105 110
[0807] Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe Leu Thr
[0808] 115 120 125
[0809] Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys Leu Tyr
[0810] 130 135 140
[0811] Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe Arg Val
[0812] 145 150 155 160
[0813] Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr Met Ala
[0814] 165 170 175
[0815] Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro Ile Leu
[0816] 180 185 190
[0817] Ile Pro Arg
[0818] 195

[0819] <210> 22

[0820] <211> 193

[0821] <212> PRT

[0822] <213> 智人(Homo sapiens)

[0823] <220>

[0824] <223> 8His, N17,96D; R66H; 被截短

[0825] <400> 22

[0826] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro

[0827] 1 5 10 15

[0828] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile

[0829] 20 25 30

[0830] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys

[0831] 35 40 45

[0832] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val

[0833] 50 55 60

[0834] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His

[0835] 65 70 75 80

[0836] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr

[0837] 85 90 95

[0838] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr

[0839] 100 105 110

[0840] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe

[0841] 115 120 125

[0842] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys

[0843] 130 135 140

[0844] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe

[0845] 145 150 155 160

[0846] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr

[0847] 165 170 175

[0848] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro

[0849] 180 185 190

[0850] Ile

[0851] <210> 23

[0852] <211> 193

[0853] <212> PRT

[0854] <213> 智人(Homo sapiens)

[0855] <220>

[0856] <223> hA1M, 8His, M41K; 被截短

[0857] <400> 23

[0858] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro
[0859] 1 5 10 15
[0860] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asn Ile
[0861] 20 25 30
[0862] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys
[0863] 35 40 45
[0864] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
[0865] 50 55 60
[0866] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg
[0867] 65 70 75 80
[0868] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
[0869] 85 90 95
[0870] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr
[0871] 100 105 110
[0872] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
[0873] 115 120 125
[0874] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
[0875] 130 135 140
[0876] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
[0877] 145 150 155 160
[0878] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
[0879] 165 170 175
[0880] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
[0881] 180 185 190
[0882] Ile Leu Ile Pro Arg
[0883] 195
[0884] <210> 24
[0885] <211> 200
[0886] <212> PRT
[0887] <213> 小鼠 <小鼠, 种属>
[0888] <220>
[0889] <223> 1.M8H5GIEGR-小鼠
[0890] <400> 24
[0891] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[0892] 1 5 10 15
[0893] Gly Arg Asp Pro Ala Ser Thr Leu Pro Asp Ile Gln Val Gln Glu Asn
[0894] 20 25 30
[0895] Phe Ser Glu Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Val Gly
[0896] 35 40 45

[0897] Ser Thr Cys Pro Trp Leu Ser Arg Ile Lys Asp Lys Met Ser Val Gln
[0898] 50 55 60
[0899] Thr Leu Val Leu Gln Glu Gly Ala Thr Glu Thr Glu Ile Ser Met Thr
[0900] 65 70 75 80
[0901] Ser Thr Arg Trp Arg Arg Gly Val Cys Glu Glu Ile Thr Gly Ala Tyr
[0902] 85 90 95
[0903] Gln Lys Thr Asp Ile Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp
[0904] 100 105 110
[0905] Asn Ile Thr Leu Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr
[0906] 115 120 125
[0907] Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Ser Ser His His His Gly Leu Thr Ile
[0908] 130 135 140
[0909] Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Glu Pro Gln Leu Arg Asp Ser Leu Leu
[0910] 145 150 155 160
[0911] Gln Glu Phe Lys Asp Val Ala Leu Asn Val Gly Ile Ser Glu Asn Ser
[0912] 165 170 175
[0913] Ile Ile Phe Met Pro Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Asp Arg Glu
[0914] 180 185 190
[0915] Val Glu Pro Thr Ser Ile Ala Arg
[0916] 195 200
[0917] <210> 25
[0918] <211> 201
[0919] <212> PRT
[0920] <213> 裸鼹鼠(Heterocephalus glaber)
[0921] <220>
[0922] <223> 2. M8H5GIEGR-裸鼹鼠
[0923] <400> 25
[0924] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[0925] 1 5 10 15
[0926] Gly Arg Asn Pro Val Pro Met Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[0927] 20 25 30
[0928] Asn Phe Asp Glu Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Phe Asn Leu Ala Thr
[0929] 35 40 45
[0930] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Arg Ile Lys Asp Arg Leu Ser Val
[0931] 50 55 60
[0932] Ser Thr Met Val Leu Gly Lys Gly Thr Thr Glu Thr Gln Ile Ser Thr
[0933] 65 70 75 80
[0934] Thr His Thr His Trp Arg Gln Gly Val Cys Gln Glu Thr Ser Gly Val
[0935] 85 90 95

[0936] Tyr Lys Lys Thr Asp Thr Ala Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[0937] 100 105 110
[0938] Trp Asn Val Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[0939] 115 120 125
[0940] Tyr Ala Ile Ile Leu Thr Lys Lys Phe Ser His His His Gly Pro Thr
[0941] 130 135 140
[0942] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Glu Pro Arg Leu Arg Asp Ser Leu
[0943] 145 150 155 160
[0944] Leu Gln Glu Phe Arg Glu Met Ala Leu Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[0945] 165 170 175
[0946] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asn Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Asp Gln
[0947] 180 185 190
[0948] Ala Pro Glu Ser Thr Pro Ala Pro Arg
[0949] 195 200
[0950] <210> 26
[0951] <211> 197
[0952] <212> PRT
[0953] <213> 蛙形目(Anura)
[0954] <220>
[0955] <223> 3. M8H5GIEGR-青蛙
[0956] <400> 26
[0957] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[0958] 1 5 10 15
[0959] Gly Arg Cys Ser Pro Ile Gln Pro Glu Asp Asn Ile Gln Ile Gln Glu
[0960] 20 25 30
[0961] Asn Phe Asp Leu Gln Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asp Ile Ala Ile
[0962] 35 40 45
[0963] Gly Ser Thr Cys Lys Trp Leu Lys His His Lys Glu Lys Phe Asn Met
[0964] 50 55 60
[0965] Gly Thr Leu Glu Leu Ser Asp Gly Glu Thr Asp Gly Glu Val Arg Ile
[0966] 65 70 75 80
[0967] Val Asn Thr Arg Met Arg His Gly Thr Cys Ser Gln Ile Val Gly Ser
[0968] 85 90 95
[0969] Tyr Gln Lys Thr Glu Thr Pro Gly Lys Phe Asp Tyr Phe Asn Ala Arg
[0970] 100 105 110
[0971] Trp Gly Thr Thr Ile Gln Asn Tyr Ile Val Phe Thr Asn Tyr Asn Glu
[0972] 115 120 125
[0973] Tyr Val Ile Met Gln Met Arg Lys Lys Lys Gly Ser Glu Thr Thr Thr
[0974] 130 135 140

[0975] Thr Val Lys Leu Tyr Gly Arg Ser Pro Asp Leu Arg Pro Thr Leu Val
[0976] 145 150 155 160
[0977] Asp Glu Phe Arg Gln Phe Ala Leu Ala Gln Gly Ile Pro Glu Asp Ser
[0978] 165 170 175
[0979] Ile Val Met Leu Pro Asn Asn Gly Glu Cys Ser Pro Gly Glu Ile Glu
[0980] 180 185 190
[0981] Val Arg Pro Arg Arg
[0982] 195
[0983] <210> 27
[0984] <211> 197
[0985] <212> PRT
[0986] <213> 原鸡属(Gallus)
[0987] <220>
[0988] <223> 4. M8H5GIEGR-鸡
[0989] <400> 27
[0990] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[0991] 1 5 10 15
[0992] Gly Arg Thr Pro Val Gly Asp Gln Asp Glu Asp Ile Gln Val Gln Glu
[0993] 20 25 30
[0994] Asn Phe Glu Pro Glu Arg Met Tyr Gly Lys Trp Tyr Asp Val Ala Val
[0995] 35 40 45
[0996] Gly Thr Thr Cys Lys Trp Met Lys Asn Tyr Lys Glu Lys Phe Ser Met
[0997] 50 55 60
[0998] Gly Thr Leu Val Leu Gly Pro Gly Pro Ser Ala Asp Gln Ile Ser Thr
[0999] 65 70 75 80
[1000] Ile Ser Thr Arg Leu Arg Gln Gly Asp Cys Lys Arg Val Ser Gly Glu
[1001] 85 90 95
[1002] Tyr Gln Lys Thr Asp Thr Pro Gly Lys Tyr Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys
[1003] 100 105 110
[1004] Trp Asp Val Ser Ile Lys Ser Tyr Val Leu Arg Thr Asn Tyr Glu Glu
[1005] 115 120 125
[1006] Tyr Ala Val Ile Leu Met Lys Lys Thr Ser Asn Phe Gly Pro Thr Thr
[1007] 130 135 140
[1008] Thr Leu Lys Leu Tyr Gly Arg Ser Pro Glu Leu Arg Glu Glu Leu Thr
[1009] 145 150 155 160
[1010] Glu Ala Phe Gln Gln Leu Ala Leu Glu Met Gly Ile Pro Ala Asp Ser
[1011] 165 170 175
[1012] Val Phe Ile Leu Ala Asn Lys Gly Glu Cys Val Pro Gln Glu Thr Ala
[1013] 180 185 190

[1014] Thr Ala Pro Glu Arg
[1015] 195
[1016] <210> 28
[1017] <211> 201
[1018] <212> PRT
[1019] <213> 家兔(Oryctolagus cuniculus)
[1020] <220>
[1021] <223> 5. M8H5GIEGR-家兔
[1022] <400> 28
[1023] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1024] 1 5 10 15
[1025] Gly Arg Asp Pro Val Pro Thr Leu Pro Asp Asp Ile Gln Val Gln Glu
[1026] 20 25 30
[1027] Asn Phe Glu Leu Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Val
[1028] 35 40 45
[1029] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Arg Ile Lys Asp Arg Met Ala Val
[1030] 50 55 60
[1031] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Thr Ser Glu Thr Glu Ile Ser Met
[1032] 65 70 75 80
[1033] Thr Ser Thr His Trp Arg Arg Gly Val Cys Glu Glu Ile Ser Gly Ala
[1034] 85 90 95
[1035] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ala Lys
[1036] 100 105 110
[1037] Trp Asn Leu Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1038] 115 120 125
[1039] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg Arg His Gly Pro Thr
[1040] 130 135 140
[1041] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Glu Pro Gln Leu Arg Glu Ser Leu
[1042] 145 150 155 160
[1043] Leu Gln Glu Phe Arg Glu Val Ala Leu Gly Val Gly Ile Pro Glu Asn
[1044] 165 170 175
[1045] Ser Ile Phe Thr Met Ile Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Gln Gln
[1046] 180 185 190
[1047] Glu Pro Lys Pro Ala Pro Val Leu Arg
[1048] 195 200
[1049] <210> 29
[1050] <211> 201
[1051] <212> PRT
[1052] <213> 松鼠猴(Saimiri)

[1053] <220>

[1054] <223> 6. M8H5GIEGR-松鼠猴

[1055] <400> 29

[1056] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu

[1057] 1 5 10 15

[1058] Gly Arg Ser Pro Val Pro Thr Pro Pro Glu Gly Ile Gln Val Gln Glu

[1059] 20 25 30

[1060] Asn Phe Asn Leu Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile

[1061] 35 40 45

[1062] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Leu Lys Val

[1063] 50 55 60

[1064] Ser Thr Leu Val Leu Glu Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met

[1065] 65 70 75 80

[1066] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Phe Cys Glu Gln Thr Ser Trp Ala

[1067] 85 90 95

[1068] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Glu Pro Lys

[1069] 100 105 110

[1070] Trp Asn Val Thr Met Glu Ser Tyr Val Ala His Thr Asn Tyr Glu Glu

[1071] 115 120 125

[1072] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr

[1073] 130 135 140

[1074] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Glu Pro Gln Leu Arg Glu Ser Leu

[1075] 145 150 155 160

[1076] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp

[1077] 165 170 175

[1078] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asn Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln

[1079] 180 185 190

[1080] Glu Pro Gln Pro Ile Leu His Arg Arg

[1081] 195 200

[1082] <210> 30

[1083] <211> 201

[1084] <212> PRT

[1085] <213> 海象属(Odobenus)

[1086] <220>

[1087] <223> 7. M8H5GIEGR-海象

[1088] <400> 30

[1089] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu

[1090] 1 5 10 15

[1091] Gly Arg Ser Pro Val Leu Thr Pro Pro Asp Ala Ile Gln Val Gln Glu

[1092] 20 25 30
[1093] Asn Phe Asp Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Phe His Val Ala Met
[1094] 35 40 45
[1095] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Phe Met Asp Arg Met Ser Met
[1096] 50 55 60
[1097] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Asp Gly Glu Ile Ser Met
[1098] 65 70 75 80
[1099] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Arg Gly Thr Cys Glu Glu Ile Ser Gly Ala
[1100] 85 90 95
[1101] Tyr Glu Lys Thr Ser Thr Asn Gly Lys Phe Leu Tyr His Asn Pro Lys
[1102] 100 105 110
[1103] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asp Tyr Asp Glu
[1104] 115 120 125
[1105] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1106] 130 135 140
[1107] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Gln Pro Gln Leu Arg Glu Ser Leu
[1108] 145 150 155 160
[1109] Leu Glu Glu Phe Arg Glu Leu Ala Leu Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1110] 165 170 175
[1111] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asn Lys Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1112] 180 185 190
[1113] Glu Pro Glu Pro Ser Pro His Met Arg
[1114] 195 200
[1115] <210> 31
[1116] <211> 200
[1117] <212> PRT
[1118] <213> 海牛属(Trichechus)
[1119] <220>
[1120] <223> 8. M8H5GIEGR-海牛
[1121] <400> 31
[1122] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1123] 1 5 10 15
[1124] Gly Arg Ser Pro Val Lys Thr Pro Leu Asn Asp Ile Gln Val Gln Glu
[1125] 20 25 30
[1126] Asn Phe Asp Leu Pro Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Phe Asn Ile Ala Ile
[1127] 35 40 45
[1128] Gly Ser Thr Cys Gln Trp Leu Lys Arg Leu Lys Ala Gly Pro Thr Met
[1129] 50 55 60
[1130] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Asp Thr Glu Ile Ser Thr

[1131] 65 70 75 80
[1132] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Phe Cys Glu Glu Ile Ser Gly Ala
[1133] 85 90 95
[1134] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Ala Gly Lys Phe Leu Tyr His Gly Ser Lys
[1135] 100 105 110
[1136] Trp Asn Val Thr Leu Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1137] 115 120 125
[1138] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg Tyr Gly Leu Thr Ile
[1139] 130 135 140
[1140] Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Gln Pro Gln Val Arg Glu Ser Leu Leu
[1141] 145 150 155 160
[1142] Glu Glu Phe Arg Glu Phe Ala Leu Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser
[1143] 165 170 175
[1144] Ile Phe Thr Thr Ala Asp Lys Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu
[1145] 180 185 190
[1146] Pro Glu Pro Thr Ala Ala Leu Arg
[1147] 195 200
[1148] <210> 32
[1149] <211> 202
[1150] <212> PRT
[1151] <213> 鲽鱼(Pleuronectes platessa)
[1152] <220>
[1153] <223> 9. M8H5GIEGR-比目鱼
[1154] <400> 32
[1155] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1156] 1 5 10 15
[1157] Gly Arg Leu Pro Val Leu Pro Glu Pro Leu Tyr Pro Thr Gln Glu Asn
[1158] 20 25 30
[1159] Phe Asp Leu Thr Arg Phe Val Gly Thr Trp His Asp Val Ala Leu Thr
[1160] 35 40 45
[1161] Ser Ser Cys Pro His Met Gln Arg Asn Arg Ala Asp Ala Ala Ile Gly
[1162] 50 55 60
[1163] Lys Leu Val Leu Glu Lys Asp Thr Gly Asn Lys Leu Lys Val Thr Arg
[1164] 65 70 75 80
[1165] Thr Arg Leu Arg His Gly Thr Cys Val Glu Met Ser Gly Glu Tyr Glu
[1166] 85 90 95
[1167] Leu Thr Ser Thr Pro Gly Arg Ile Phe Tyr His Ile Asp Arg Trp Asp
[1168] 100 105 110
[1169] Ala Asp Val Asp Ala Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala

[1170] 115 120 125
[1171] Ile Ile Ile Met Ser Lys Gln Lys Thr Ser Gly Glu Asn Ser Thr Ser
[1172] 130 135 140
[1173] Leu Lys Leu Tyr Ser Arg Thr Met Ser Val Arg Asp Thr Val Leu Asp
[1174] 145 150 155 160
[1175] Asp Phe Lys Thr Leu Val Arg His Gln Gly Met Ser Asp Asp Thr Ile
[1176] 165 170 175
[1177] Ile Ile Lys Gln Asn Lys Gly Asp Cys Ile Pro Gly Glu Gln Val Glu
[1178] 180 185 190
[1179] Glu Ala Pro Ser Gln Pro Glu Pro Lys Arg
[1180] 195 200
[1181] <210> 33
[1182] <211> 201
[1183] <212> PRT
[1184] <213> 猩猩属(Pongo)
[1185] <220>
[1186] <223> 10. M8H5GIEGR-猩猩
[1187] <400> 33
[1188] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1189] 1 5 10 15
[1190] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1191] 20 25 30
[1192] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1193] 35 40 45
[1194] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1195] 50 55 60
[1196] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1197] 65 70 75 80
[1198] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1199] 85 90 95
[1200] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1201] 100 105 110
[1202] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1203] 115 120 125
[1204] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg Arg His Gly Pro Thr
[1205] 130 135 140
[1206] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1207] 145 150 155 160
[1208] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp

[1209] 165 170 175
[1210] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1211] 180 185 190
[1212] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1213] 195 200
[1214] <210> 34
[1215] <211> 201
[1216] <212> PRT
[1217] <213> 智人(Homo sapiens)
[1218] <220>
[1219] <223> 11. M8H5GIEGR-人P35K
[1220] <400> 34
[1221] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1222] 1 5 10 15
[1223] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1224] 20 25 30
[1225] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1226] 35 40 45
[1227] Gly Ser Thr Cys Lys Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1228] 50 55 60
[1229] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1230] 65 70 75 80
[1231] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1232] 85 90 95
[1233] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1234] 100 105 110
[1235] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1236] 115 120 125
[1237] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1238] 130 135 140
[1239] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1240] 145 150 155 160
[1241] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1242] 165 170 175
[1243] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1244] 180 185 190
[1245] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1246] 195 200
[1247] <210> 35

[1248] <211> 201

[1249] <212> PRT

[1250] <213> 智人(Homo sapiens)

[1251] <220>

[1252] <223> 12. M8H5GIEGR-人M41K

[1253] <400> 35

[1254] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu

[1255] 1 5 10 15

[1256] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu

[1257] 20 25 30

[1258] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile

[1259] 35 40 45

[1260] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val

[1261] 50 55 60

[1262] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met

[1263] 65 70 75 80

[1264] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala

[1265] 85 90 95

[1266] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys

[1267] 100 105 110

[1268] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu

[1269] 115 120 125

[1270] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr

[1271] 130 135 140

[1272] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu

[1273] 145 150 155 160

[1274] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp

[1275] 165 170 175

[1276] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln

[1277] 180 185 190

[1278] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg

[1279] 195 200

[1280] <210> 36

[1281] <211> 201

[1282] <212> PRT

[1283] <213> 智人(Homo sapiens)

[1284] <220>

[1285] <223> 13. M8H5GIEGR-人R66H

[1286] <400> 36

[1287] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1288] 1 5 10 15
[1289] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1290] 20 25 30
[1291] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1292] 35 40 45
[1293] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1294] 50 55 60
[1295] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1296] 65 70 75 80
[1297] Thr Ser Thr His Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1298] 85 90 95
[1299] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1300] 100 105 110
[1301] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1302] 115 120 125
[1303] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1304] 130 135 140
[1305] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1306] 145 150 155 160
[1307] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1308] 165 170 175
[1309] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1310] 180 185 190
[1311] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1312] 195 200
[1313] <210> 37
[1314] <211> 201
[1315] <212> PRT
[1316] <213> 智人(Homo sapiens)
[1317] <220>
[1318] <223> 14. M8H5GIEGR-人T75K
[1319] <400> 37
[1320] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1321] 1 5 10 15
[1322] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1323] 20 25 30
[1324] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1325] 35 40 45

[1326] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1327] 50 55 60
[1328] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1329] 65 70 75 80
[1330] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Lys Ser Gly Ala
[1331] 85 90 95
[1332] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1333] 100 105 110
[1334] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1335] 115 120 125
[1336] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1337] 130 135 140
[1338] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1339] 145 150 155 160
[1340] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1341] 165 170 175
[1342] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1343] 180 185 190
[1344] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1345] 195 200
[1346] <210> 38
[1347] <211> 201
[1348] <212> PRT
[1349] <213> 智人(Homo sapiens)
[1350] <220>
[1351] <223> 15. M8H5GIEGR-人T75Y
[1352] <400> 38
[1353] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1354] 1 5 10 15
[1355] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1356] 20 25 30
[1357] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1358] 35 40 45
[1359] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1360] 50 55 60
[1361] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1362] 65 70 75 80
[1363] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Tyr Ser Gly Ala
[1364] 85 90 95

[1365] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1366] 100 105 110
[1367] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1368] 115 120 125
[1369] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1370] 130 135 140
[1371] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1372] 145 150 155 160
[1373] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1374] 165 170 175
[1375] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1376] 180 185 190
[1377] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1378] 195 200
[1379] <210> 39
[1380] <211> 201
[1381] <212> PRT
[1382] <213> 智人(Homo sapiens)
[1383] <220>
[1384] <223> 16. M8H5GIEGR-人M99K
[1385] <400> 39
[1386] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1387] 1 5 10 15
[1388] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1389] 20 25 30
[1390] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1391] 35 40 45
[1392] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1393] 50 55 60
[1394] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1395] 65 70 75 80
[1396] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1397] 85 90 95
[1398] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1399] 100 105 110
[1400] Trp Asn Ile Thr Lys Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1401] 115 120 125
[1402] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1403] 130 135 140

[1404] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1405] 145 150 155 160
[1406] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1407] 165 170 175
[1408] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1409] 180 185 190
[1410] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1411] 195 200
[1412] <210> 40
[1413] <211> 201
[1414] <212> PRT
[1415] <213> 智人(Homo sapiens)
[1416] <220>
[1417] <223> 17. M8H5GIEGR-人S101Y
[1418] <400> 40
[1419] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1420] 1 5 10 15
[1421] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1422] 20 25 30
[1423] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1424] 35 40 45
[1425] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1426] 50 55 60
[1427] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1428] 65 70 75 80
[1429] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1430] 85 90 95
[1431] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1432] 100 105 110
[1433] Trp Asn Ile Thr Met Glu Tyr Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1434] 115 120 125
[1435] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1436] 130 135 140
[1437] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1438] 145 150 155 160
[1439] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1440] 165 170 175
[1441] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1442] 180 185 190

[1443] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1444] 195 200
[1445] <210> 41
[1446] <211> 201
[1447] <212> PRT
[1448] <213> 智人(Homo sapiens)
[1449] <220>
[1450] <223> 18. M8H5GIEGR-人K69.92.118.130R
[1451] <400> 41
[1452] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1453] 1 5 10 15
[1454] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1455] 20 25 30
[1456] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1457] 35 40 45
[1458] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1459] 50 55 60
[1460] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1461] 65 70 75 80
[1462] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Arg Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1463] 85 90 95
[1464] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Arg Ser Lys
[1465] 100 105 110
[1466] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1467] 115 120 125
[1468] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Arg Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1469] 130 135 140
[1470] Ile Thr Ala Arg Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1471] 145 150 155 160
[1472] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1473] 165 170 175
[1474] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1475] 180 185 190
[1476] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1477] 195 200
[1478] <210> 42
[1479] <211> 198
[1480] <212> PRT
[1481] <213> 腔棘鱼属(Latimeria)

[1482] <220>

[1483] <223> 19. M8H5GIEGR-空棘鱼

[1484] <400> 42

[1485] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu

[1486] 1 5 10 15

[1487] Gly Arg Gly Ser Pro Leu Arg Asp Glu Asp Ile Gln Val Gln Glu Asn

[1488] 20 25 30

[1489] Phe Asp Leu Pro Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Glu Ile Ala Ile Ala

[1490] 35 40 45

[1491] Ser Thr Cys Pro Trp Val Lys Asn His Lys Asp Lys Met Phe Met Gly

[1492] 50 55 60

[1493] Thr Met Val Leu Gln Glu Gly Glu Gln Ser Asp Arg Ile Ser Thr Thr

[1494] 65 70 75 80

[1495] Ser Thr Arg Ile Arg Asp Gly Thr Cys Ser Gln Ile Thr Gly Tyr Tyr

[1496] 85 90 95

[1497] Thr Leu Thr Thr Thr Pro Gly Lys Phe Ala Tyr His Asn Ser Lys Trp

[1498] 100 105 110

[1499] Asn Leu Asp Val Asn Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr

[1500] 115 120 125

[1501] Ser Ile Val Met Met Gln Lys Tyr Lys Ser Ser Asn Ser Thr Thr Thr

[1502] 130 135 140

[1503] Val Arg Leu Tyr Gly Arg Thr Gln Glu Leu Arg Asp Ser Leu His Ala

[1504] 145 150 155 160

[1505] Glu Phe Lys Lys Phe Ala Leu Asp Gln Gly Ile Asp Glu Asp Ser Ile

[1506] 165 170 175

[1507] Tyr Ile Leu Pro Lys Arg Asp Glu Cys Val Pro Gly Glu Pro Lys Ala

[1508] 180 185 190

[1509] Glu Ser Leu Met Ala Arg

[1510] 195

[1511] <210> 43

[1512] <211> 201

[1513] <212> PRT

[1514] <213> 智人(Homo sapiens)

[1515] <220>

[1516] <223> 21. M8H5GIEGR-人L89T

[1517] <400> 43

[1518] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu

[1519] 1 5 10 15

[1520] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu

[1521] 20 25 30
[1522] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1523] 35 40 45
[1524] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1525] 50 55 60
[1526] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1527] 65 70 75 80
[1528] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1529] 85 90 95
[1530] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Thr Tyr His Lys Ser Lys
[1531] 100 105 110
[1532] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1533] 115 120 125
[1534] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1535] 130 135 140
[1536] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1537] 145 150 155 160
[1538] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1539] 165 170 175
[1540] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1541] 180 185 190
[1542] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1543] 195 200
[1544] <210> 44
[1545] <211> 201
[1546] <212> PRT
[1547] <213> 智人(Homo sapiens)
[1548] <220>
[1549] <223> 22. M8H5GIEGR-人N1796D
[1550] <400> 44
[1551] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1552] 1 5 10 15
[1553] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1554] 20 25 30
[1555] Asn Phe Asp Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1556] 35 40 45
[1557] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1558] 50 55 60
[1559] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met

[1560] 65 70 75 80
[1561] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1562] 85 90 95
[1563] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1564] 100 105 110
[1565] Trp Asp Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1566] 115 120 125
[1567] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1568] 130 135 140
[1569] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1570] 145 150 155 160
[1571] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1572] 165 170 175
[1573] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1574] 180 185 190
[1575] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1576] 195 200
[1577] <210> 45
[1578] <211> 201
[1579] <212> PRT
[1580] <213> 智人(Homo sapiens)
[1581] <220>
[1582] <223> 23. M8H5GIEGR-人T45K
[1583] <400> 45
[1584] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1585] 1 5 10 15
[1586] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1587] 20 25 30
[1588] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1589] 35 40 45
[1590] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Lys Val
[1591] 50 55 60
[1592] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1593] 65 70 75 80
[1594] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1595] 85 90 95
[1596] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1597] 100 105 110
[1598] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu

[1599] 115 120 125
[1600] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1601] 130 135 140
[1602] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1603] 145 150 155 160
[1604] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1605] 165 170 175
[1606] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1607] 180 185 190
[1608] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1609] 195 200
[1610] <210> 46
[1611] <211> 201
[1612] <212> PRT
[1613] <213> 智人(Homo sapiens)
[1614] <220>
[1615] <223> 24. M8H5GIEGR-人A135E
[1616] <400> 46
[1617] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1618] 1 5 10 15
[1619] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1620] 20 25 30
[1621] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1622] 35 40 45
[1623] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1624] 50 55 60
[1625] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1626] 65 70 75 80
[1627] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1628] 85 90 95
[1629] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1630] 100 105 110
[1631] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1632] 115 120 125
[1633] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1634] 130 135 140
[1635] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Glu Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1636] 145 150 155 160
[1637] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp

[1638] 165 170 175
[1639] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1640] 180 185 190
[1641] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1642] 195 200
[1643] <210> 47
[1644] <211> 201
[1645] <212> PRT
[1646] <213> 智人(Homo sapiens)
[1647] <220>
[1648] <223> 25. M8H5GIEGR-人V170S
[1649] <400> 47
[1650] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1651] 1 5 10 15
[1652] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1653] 20 25 30
[1654] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1655] 35 40 45
[1656] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1657] 50 55 60
[1658] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1659] 65 70 75 80
[1660] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1661] 85 90 95
[1662] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1663] 100 105 110
[1664] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1665] 115 120 125
[1666] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1667] 130 135 140
[1668] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1669] 145 150 155 160
[1670] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1671] 165 170 175
[1672] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Ser Pro Gly Glu Gln
[1673] 180 185 190
[1674] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1675] 195 200
[1676] <210> 48

[1677] <211> 201
[1678] <212> PRT
[1679] <213> 智人(Homo sapiens)
[1680] <220>
[1681] <223> 26. M8H5GIEGR-人
[1682] <400> 48
[1683] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1684] 1 5 10 15
[1685] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1686] 20 25 30
[1687] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1688] 35 40 45
[1689] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1690] 50 55 60
[1691] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1692] 65 70 75 80
[1693] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1694] 85 90 95
[1695] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1696] 100 105 110
[1697] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1698] 115 120 125
[1699] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1700] 130 135 140
[1701] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1702] 145 150 155 160
[1703] Leu Gln Asp Phe Arg Asp Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1704] 165 170 175
[1705] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln
[1706] 180 185 190
[1707] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1708] 195 200
[1709] <210> 49
[1710] <211> 201
[1711] <212> PRT
[1712] <213> 智人(Homo sapiens)
[1713] <220>
[1714] <223> 27. M8H5GIEGR-人G172Q
[1715] <400> 49

[1716] Met His His His His His His His His Gly Gly Gly Gly Gly Ile Glu
[1717] 1 5 10 15
[1718] Gly Arg Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu
[1719] 20 25 30
[1720] Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile
[1721] 35 40 45
[1722] Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val
[1723] 50 55 60
[1724] Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met
[1725] 65 70 75 80
[1726] Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala
[1727] 85 90 95
[1728] Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys
[1729] 100 105 110
[1730] Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu
[1731] 115 120 125
[1732] Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr
[1733] 130 135 140
[1734] Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu
[1735] 145 150 155 160
[1736] Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp
[1737] 165 170 175
[1738] Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gln Glu Gln
[1739] 180 185 190
[1740] Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1741] 195 200
[1742] <210> 50
[1743] <211> 197
[1744] <212> PRT
[1745] <213> 智人(Homo sapiens)
[1746] <220>
[1747] <223> 33. M8H4DK-人M41K+
[1748] <400> 50
[1749] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro
[1750] 1 5 10 15
[1751] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asn Ile
[1752] 20 25 30
[1753] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys
[1754] 35 40 45

[1755] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
[1756] 50 55 60
[1757] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His
[1758] 65 70 75 80
[1759] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
[1760] 85 90 95
[1761] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr
[1762] 100 105 110
[1763] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
[1764] 115 120 125
[1765] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
[1766] 130 135 140
[1767] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
[1768] 145 150 155 160
[1769] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
[1770] 165 170 175
[1771] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
[1772] 180 185 190
[1773] Ile Leu Ile Pro Arg
[1774] 195
[1775] <210> 51
[1776] <211> 197
[1777] <212> PRT
[1778] <213> 智人(Homo sapiens)
[1779] <220>
[1780] <223> 34. M8H4DK-人M41K+N1796D 34
[1781] <400> 51
[1782] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro
[1783] 1 5 10 15
[1784] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile
[1785] 20 25 30
[1786] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys
[1787] 35 40 45
[1788] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
[1789] 50 55 60
[1790] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg
[1791] 65 70 75 80
[1792] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
[1793] 85 90 95

[1794] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr
[1795] 100 105 110
[1796] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
[1797] 115 120 125
[1798] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
[1799] 130 135 140
[1800] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
[1801] 145 150 155 160
[1802] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
[1803] 165 170 175
[1804] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
[1805] 180 185 190
[1806] Ile Leu Ile Pro Arg
[1807] 195
[1808] <210> 52
[1809] <211> 197
[1810] <212> PRT
[1811] <213> 智人(Homo sapiens)
[1812] <220>
[1813] <223> 35. M8H4DK-人R66H+N1796D
[1814] <400> 52
[1815] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro
[1816] 1 5 10 15
[1817] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile
[1818] 20 25 30
[1819] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys
[1820] 35 40 45
[1821] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
[1822] 50 55 60
[1823] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His
[1824] 65 70 75 80
[1825] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
[1826] 85 90 95
[1827] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr
[1828] 100 105 110
[1829] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
[1830] 115 120 125
[1831] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
[1832] 130 135 140

[1833] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
[1834] 145 150 155 160
[1835] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
[1836] 165 170 175
[1837] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
[1838] 180 185 190
[1839] Ile Leu Ile Pro Arg
[1840] 195
[1841] <210> 53
[1842] <211> 197
[1843] <212> PRT
[1844] <213> 智人(Homo sapiens)
[1845] <220>
[1846] <223> 36. M8H4DK-人M41K+R66H+N1796D
[1847] <400> 53
[1848] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro
[1849] 1 5 10 15
[1850] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile
[1851] 20 25 30
[1852] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys
[1853] 35 40 45
[1854] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Lys Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
[1855] 50 55 60
[1856] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His
[1857] 65 70 75 80
[1858] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
[1859] 85 90 95
[1860] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr
[1861] 100 105 110
[1862] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
[1863] 115 120 125
[1864] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
[1865] 130 135 140
[1866] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
[1867] 145 150 155 160
[1868] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
[1869] 165 170 175
[1870] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
[1871] 180 185 190

[1872] Ile Leu Ile Pro Arg
[1873] 195
[1874] <210> 54
[1875] <211> 197
[1876] <212> PRT
[1877] <213> 智人(Homo sapiens)
[1878] <220>
[1879] <223> 38. M8H4DK-人R66H
[1880] <400> 54
[1881] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro
[1882] 1 5 10 15
[1883] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asn Ile
[1884] 20 25 30
[1885] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys
[1886] 35 40 45
[1887] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val
[1888] 50 55 60
[1889] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His
[1890] 65 70 75 80
[1891] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr
[1892] 85 90 95
[1893] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr
[1894] 100 105 110
[1895] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe
[1896] 115 120 125
[1897] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys
[1898] 130 135 140
[1899] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe
[1900] 145 150 155 160
[1901] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr
[1902] 165 170 175
[1903] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro
[1904] 180 185 190
[1905] Ile Leu Ile Pro Arg
[1906] 195
[1907] <210> 55
[1908] <211> 197
[1909] <212> PRT
[1910] <213> 智人(Homo sapiens)

[1911] <220>

[1912] <223> 39.M8H4DK-人

[1913] <400> 55

[1914] Met His His His His His His His His Asp Asp Asp Asp Lys Gly Pro

[1915] 1 5 10 15

[1916] Val Pro Thr Pro Pro Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile

[1917] 20 25 30

[1918] Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys

[1919] 35 40 45

[1920] Pro Trp Leu Lys Lys Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val

[1921] 50 55 60

[1922] Leu Gly Glu Gly Ala Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg

[1923] 65 70 75 80

[1924] Trp Arg Lys Gly Val Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr

[1925] 85 90 95

[1926] Asp Thr Asp Gly Lys Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr

[1927] 100 105 110

[1928] Met Glu Ser Tyr Val Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe

[1929] 115 120 125

[1930] Leu Thr Lys Lys Phe Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys

[1931] 130 135 140

[1932] Leu Tyr Gly Arg Ala Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe

[1933] 145 150 155 160

[1934] Arg Val Val Ala Gln Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr

[1935] 165 170 175

[1936] Met Ala Asp Arg Gly Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro

[1937] 180 185 190

[1938] Ile Leu Ile Pro Arg

[1939] 195

[1940] <210> 56

[1941] <211> 192

[1942] <212> PRT

[1943] <213> 智人(Homo sapiens)

[1944] <220>

[1945] <223> 40. M8H-人wt

[1946] <400> 56

[1947] Met His His His His His His His His Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro

[1948] 1 5 10 15

[1949] Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Gly

[1950] 20 25 30
[1951] Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys
[1952] 35 40 45
[1953] Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala
[1954] 50 55 60
[1955] Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr Arg Trp Arg Lys Gly Val
[1956] 65 70 75 80
[1957] Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys
[1958] 85 90 95
[1959] Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asn Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val
[1960] 100 105 110
[1961] Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe
[1962] 115 120 125
[1963] Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala
[1964] 130 135 140
[1965] Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln
[1966] 145 150 155 160
[1967] Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly
[1968] 165 170 175
[1969] Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg
[1970] 180 185 190
[1971] <210> 57
[1972] <211> 192
[1973] <212> PRT
[1974] <213> 智人(Homo sapiens)
[1975] <220>
[1976] <223> 41. M8H-人R66H+N1796D
[1977] <400> 57
[1978] Met His His His His His His His His Gly Pro Val Pro Thr Pro Pro
[1979] 1 5 10 15
[1980] Asp Asn Ile Gln Val Gln Glu Asn Phe Asp Ile Ser Arg Ile Tyr Gly
[1981] 20 25 30
[1982] Lys Trp Tyr Asn Leu Ala Ile Gly Ser Thr Cys Pro Trp Leu Lys Lys
[1983] 35 40 45
[1984] Ile Met Asp Arg Met Thr Val Ser Thr Leu Val Leu Gly Glu Gly Ala
[1985] 50 55 60
[1986] Thr Glu Ala Glu Ile Ser Met Thr Ser Thr His Trp Arg Lys Gly Val
[1987] 65 70 75 80
[1988] Cys Glu Glu Thr Ser Gly Ala Tyr Glu Lys Thr Asp Thr Asp Gly Lys

[1989] 85 90 95

[1990] Phe Leu Tyr His Lys Ser Lys Trp Asp Ile Thr Met Glu Ser Tyr Val

[1991] 100 105 110

[1992] Val His Thr Asn Tyr Asp Glu Tyr Ala Ile Phe Leu Thr Lys Lys Phe

[1993] 115 120 125

[1994] Ser Arg His His Gly Pro Thr Ile Thr Ala Lys Leu Tyr Gly Arg Ala

[1995] 130 135 140

[1996] Pro Gln Leu Arg Glu Thr Leu Leu Gln Asp Phe Arg Val Val Ala Gln

[1997] 145 150 155 160

[1998] Gly Val Gly Ile Pro Glu Asp Ser Ile Phe Thr Met Ala Asp Arg Gly

[1999] 165 170 175

[2000] Glu Cys Val Pro Gly Glu Gln Glu Pro Glu Pro Ile Leu Ile Pro Arg

[2001] 180 185 190

[2002] <210> 58

[2003] <211> 594

[2004] <212> DNA

[2005] <213> 智人(Homo sapiens)

[2006] <220>

[2007] <223> 60. M8H4DK-人wt

[2008] <400> 58

[2009] atgcatcacc atcaccatca ccatcacgat gacgatgaca agggccctgt gccaacgccg 60

[2010] cccgacaaca tccaagtgca ggaaaacttc aatatctctc ggatctatgg gaagtggtac 120

[2011] aacctggcca tcggttccac ctgcccctgg ctgaagaaga tcatggacag gatgacagtg 180

[2012] agcacgctgg tgctgggaga gggcgctaca gaggcggaga tcagcatgac cagcactcgt 240

[2013] tggcggaaag gtgtctgtga ggagacgtct ggagcttatg agaaaacaga tactgatggg 300

[2014] aagtttctct atcacaaatc caaatggaac ataaccatgg agtcctatgt ggtccacacc 360

[2015] aactatgatg agtatgccat tttcctgacc aagaaattca gccgccatca tggacccacc 420

[2016] attactgcca agctctacgg gcgggcgccg cagctgaggg aaactctcct gcaggacttc 480

[2017] agagtggttg cccagggtgt gggcatccct gaggactcca tcttcaccat ggctgaccga 540

[2018] ggtgaatgtg tccctgggga gcaggaacca gagcccatct taatcccgag atga 594

[2019] <210> 59

[2020] <211> 603

[2021] <212> DNA

[2022] <213> 小鼠 <小鼠, 种属>

[2023] <220>

[2024] <223> 1.M8H5GIEGR-小鼠

[2025] <400> 59

[2026] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcgaccct 60

[2027] gcgtcaacac tgccagatat ccaggttcag gagaacttca gtgagtcccg gatctatgga 120

[2028] aaatggtaca acctggcggt gggatccacc tgcccgtggc tgagccgcat taaggacaag 180
[2029] atgagcgtga gcacgctggt gctgcaggag ggggcgacag aaacagagat cagcatgacc 240
[2030] agtactcgat ggcggagagg tgtctgtgag gagatcactg gggcgtacca gaagacggac 300
[2031] atcgatggaa agttcctcta ccacaaatcc aaatggaaca taaccttgga atcctatgtg 360
[2032] gtccacacca actatgacga atatgccatt ttccttacca agaagtccag ccaccaccac 420
[2033] gggctcacca tcactgccaa gctctatggt cgggagccac agctgaggga cagccttctg 480
[2034] caggagttca aggatgtggc cctgaatgtg ggcatctctg agaactccat catttttatg 540
[2035] cctgacagag gggaatgtgt ccctggggat cgggaggtgg agcccacatc aattgccaga 600
[2036] tga 603
[2037] <210> 60
[2038] <211> 606
[2039] <212> DNA
[2040] <213> 裸鼹鼠(Heterocephalus glaber)
[2041] <220>
[2042] <223> 2. M8H5GIEGR-裸鼹鼠
[2043] <400> 60
[2044] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcaatcct 60
[2045] gtgccgatgc cgccagacaa catccaagtg caggagaact ttgatgaatc ccggatctat 120
[2046] gggaaatggt tcaacctggc tacgggctcc acgtgcccgt ggctgaagag gatcaaagac 180
[2047] aggctgagtg tgagcacaat ggtgctgggc aaggggacca cggagacaca gatcagcaca 240
[2048] acccacaccc actggcggca aggggtgtgc caggagacct caggggttta caagaaaaca 300
[2049] gacacggctg ggaagttcct ctaccacaag tccaaatgga atgtaaccat ggagtcctat 360
[2050] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc atcattctaa ctaagaagtt cagccaccac 420
[2051] catggaccga ccattactgc caagctctat gggagagagc cgcggctgag agacagcctc 480
[2052] ctgcaggaat tcagggagat ggccctgggc gtaggcatcc ccgaggattc catcttcaca 540
[2053] atggccaaca gaggggaatg tgtccctggt gaccaggcac cagagtccac cccagccccg 600
[2054] aggtga 606
[2055] <210> 61
[2056] <211> 594
[2057] <212> DNA
[2058] <213> 蛙形目(Anura)
[2059] <220>
[2060] <223> 3. M8H5GIEGR-青蛙
[2061] <400> 61
[2062] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgctgcagc 60
[2063] ccaatccagc cagaggacaa tatccagatc caggagaact ttgatctcca gaggatttat 120
[2064] ggcaaatggt acgacattgc catcggctcc acctgcaaat ggctgaagca ccacaaggaa 180
[2065] aagttcaaca tggggacact ggagcttagc gatggggaga ccgacgggga ggtgcggatt 240
[2066] gtgaacacaa ggatgaggca cggaacctgc tctcagattg ttgggtccta tcagaagaca 300

[2067] gagaccccag ggaagttcga ctatttcaac gcacggtggg gaaccacgat ccaaaactac 360
[2068] attgtcttca ctaactacaa tgagtatgtc atcatgcaga tgaggaagaa gaagggatcg 420
[2069] gagaccacca cgaccgtcaa gctgtatggg cggagcccag acttgcgtcc gaccctcgtt 480
[2070] gatgaattca ggcagtttgc cttggctcag ggcattcctg aagactccat cgtgatgcta 540
[2071] cctaacaatg gtgagtgctc tccaggggaa atagaagtga gaccacggag atga 594
[2072] <210> 62
[2073] <211> 594
[2074] <212> DNA
[2075] <213> 家鸡(Gallus gallus)
[2076] <220>
[2077] <223> 4. M8H5GIEGR-鸡
[2078] <400> 62
[2079] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcacgcct 60
[2080] gttggggacc aggatgagga cattcaagtg caagagaatt ttgagcctga gcggatgtat 120
[2081] gggaaatggt atgacgtagc tgttggcacc acctgcaagt ggatgaagaa ctacaaggag 180
[2082] aagttcagca tgggcacact ggtgctgggc cccggcccca gcgctgacca gatcagtacc 240
[2083] atcagcacca ggctgcggca aggtgactgc aaacgtgtct caggagagta ccagaaaact 300
[2084] gacacccctg gcaaatacac ctactataac cccaagtggg atgtgtctat caagtcctac 360
[2085] gtgcttcgca ccaactatga agaatacgca gtcattctga tgaagaagac aagtaatttt 420
[2086] ggcccaacca ccacactgaa gctgtatggg agaagcccag agctgcggga agagctcacc 480
[2087] gaggctttcc agcagctggc tctggagatg ggcatccctg cagattccgt cttcatcctg 540
[2088] gccaacaaag gtgaatgtgt cccacaggag actgccactg cccctgagag gtga 594
[2089] <210> 63
[2090] <211> 606
[2091] <212> DNA
[2092] <213> 家兔(Oryctolagus)
[2093] <220>
[2094] <223> 5. M8H5GIEGR-家兔
[2095] <400> 63
[2096] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcgacccc 60
[2097] gtgcccaccc tgccggacga catccaagtg caggagaact tcgagctctc tcggatctac 120
[2098] gggaaatggt acaacctggc tgtggggtcc acctgcccgt ggctgaagag gatcaaggac 180
[2099] aggatggccg tgagcacgct ggtgctggga gaggggacga gcgagacgga gatcagcatg 240
[2100] accagcacgc actggcggag gggcgtctgt gaggagatct ccggggccta tgagaaaacg 300
[2101] gacactgacg ggaagttcct gtaccacaaa gccaaatgga acttaaccat ggagtcctac 360
[2102] gtggtgcaca ccaactacga tgagtatgcc atttttctca ccaagaaatt cagccgccgc 420
[2103] cacggcccca ccatcaccgc caagctctat gggcgggagc cgcagctgag ggagagcctc 480
[2104] ctgcaggagt tcagggaggt ggctctcggg gtggggatcc ccgagaactc catcttcacc 540
[2105] atgatcgaca gaggggaatg tgtgcccggg cagcaggaac caaagcctgc ccccgtgttg 600

[2106] agatga 606

[2107] <210> 64

[2108] <211> 606

[2109] <212> DNA

[2110] <213> 松鼠猴(Saimiri)

[2111] <220>

[2112] <223> 6. M8H5GIEGR-松鼠猴

[2113] <400> 64

[2114] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcagccca 60

[2115] gtgccgacgc cgcccgaagg cattcaagtg caggaaaact tcaatctctc tcggatctac 120

[2116] ggcaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctaaagaa gatcatggac 180

[2117] aggttgaaag tgagcacgct ggtgctggaa gagggcgcca cggaggcgga gatcagcatg 240

[2118] accagcactc gctggcggaa aggtttctgt gagcagacct cttgggctta tgagaaaaca 300

[2119] gatactgatg ggaagtttct ctatcacgaa cccaaatgga acgtaaccat ggagtcctat 360

[2120] gtggcccaca ccaactatga ggagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420

[2121] catggaccca ccattactgc caagctctat gggcgggagc cacagctgag ggaaagcctc 480

[2122] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggattc catcttcacc 540

[2123] atggctaacc gaggtgaatg cgtccctggg gagcaggaac cacagcccat cctacaccgg 600

[2124] agatga 606

[2125] <210> 65

[2126] <211> 606

[2127] <212> DNA

[2128] <213> 海象属(Odobenus)

[2129] <220>

[2130] <223> 7. M8H5GIEGR-海象

[2131] <400> 65

[2132] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcagtccc 60

[2133] gtgctgacgc cgcctgacgc catccaagtg caagagaact tcgacatctc tcggatctac 120

[2134] gggaagtggt ttcatgtggc catgggctcc acctgcccgt ggctgaagaa gttcatggac 180

[2135] aggatgtcca tgagcacgct ggtgctgggc gaggggggcga cggatgggga gatcagcatg 240

[2136] accagcacac gttggcggag aggcacctgt gaggagatct ctggggctta tgagaaaacc 300

[2137] agcactaacg gaaagttcct ctatcataat cccaaatgga acatcaccat ggagtcctat 360

[2138] gtggtccaca ccgactatga tgagtacgcc atctttctga ccaagaaatt cagccgccac 420

[2139] catgggccca ccattactgc caagctctat gggcgacagc cgcagcttcg agaaagcctg 480

[2140] ctggaggagt tcagggagct tgccttgggt gtgggcatcc ccgaggactc catcttcacc 540

[2141] atggccaaca aaggtgagtg tgtccctggg gagcaggaac cagagccctc tccacacatg 600

[2142] aggtga 606

[2143] <210> 66

[2144] <211> 603

[2145] <212> DNA

[2146] <213> 海牛属(Trichechus)

[2147] <220>

[2148] <223> 8. M8H5GIEGR-海牛

[2149] <400> 66

[2150] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcagccca 60

[2151] gtgaaaacac cactcaacga catccaagtg caggagaact ttgacctccc tcggatctac 120

[2152] gggaaatggt tcaacatagc cattggctcc acctgccaat ggctgaagag gttgaaggcc 180

[2153] gggccgacca tgagcaccct ggtcctggga gagggagcta cagacacaga gatcagcaca 240

[2154] accagcactc gttggcggaa aggcttctgt gaggagatct ctggggcata tgagaaaaca 300

[2155] gacacagctg ggaagttcct ttatcacgga tccaaatgga atgtaacctt ggagtcctat 360

[2156] gtggtccaca ccaactatga tgagtacgcc atttttctga ccaagaaatt cagccgctat 420

[2157] ggactcacca ttactgctaa gctctatggg cggcagcctc aggtgaggga gagcctcctg 480

[2158] gaggagttca gggaatttgc cctgggtgtg ggcatccctg aggattccat cttcaccacg 540

[2159] gccgacaaag gtgagtgtgt ccctggagag caggagccag aacccaccgc agccctgaga 600

[2160] tga 603

[2161] <210> 67

[2162] <211> 609

[2163] <212> DNA

[2164] <213> 鲽鱼(Pleuronectes platessa)

[2165] <220>

[2166] <223> 9. M8H5GIEGR-比目鱼

[2167] <400> 67

[2168] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcctccct 60

[2169] gtgctccctg aacctcttta cccgacacag gagaactttg atctgacccg gtttgtgggg 120

[2170] acatggcacg atgttgcctt gacgagcagc tgcccccata tgcagcgtaa cagggcggat 180

[2171] gcagccattg gtaaactggt tctggagaaa gacactggaa acaaactcaa ggtgacacga 240

[2172] actagactca gacatggaac atgtgtggag atgtctggag aatatgagtt aaccagcaca 300

[2173] ccaggacgaa tcttctacca tattgacagg tgggatgcag acgtggacgc ctacgtggtt 360

[2174] cacaccaact acgacgagta cgcaattata ataatgagca aacagaaaac atcgggggag 420

[2175] aacagcacct cactcaagct gtacagtcgg acgatgtctg tgagagacac tgtgctggat 480

[2176] gacttcaaaa ctctggtcag acatcaggga atgagtgacg acaccattat catcaagcag 540

[2177] aacaaaggtg actgtattcc tggagagcag gtggaagaag caccatctca gccagagccc 600

[2178] aagcggtga 609

[2179] <210> 68

[2180] <211> 606

[2181] <212> DNA

[2182] <213> 猩猩属(Pongo)

[2183] <220>

[2184] <223> 10. M8H5GIEGR-猩猩

[2185] <400> 68

[2186] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2187] gtgccgacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120

[2188] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180

[2189] aggatgacag tgagcaccct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240

[2190] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacat ctggagctta tgagaaaaca 300

[2191] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360

[2192] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccgt 420

[2193] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaaccctc 480

[2194] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540

[2195] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gaacaggaac cagagcccat cttaatcccg 600

[2196] agatga 606

[2197] <210> 69

[2198] <211> 606

[2199] <212> DNA

[2200] <213> 智人(Homo sapiens)

[2201] <220>

[2202] <223> 11. M8H5GIEGR-人P35K

[2203] <400> 69

[2204] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2205] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120

[2206] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcaaat ggctgaagaa gatcatggac 180

[2207] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240

[2208] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300

[2209] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360

[2210] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420

[2211] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480

[2212] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540

[2213] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600

[2214] agatga 606

[2215] <210> 70

[2216] <211> 606

[2217] <212> DNA

[2218] <213> 智人(Homo sapiens)

[2219] <220>

[2220] <223> 12. M8H5GIEGR-人M41K

[2221] <400> 70

[2222] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2223] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
[2224] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcaaagac 180
[2225] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
[2226] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
[2227] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360
[2228] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420
[2229] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2230] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2231] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
[2232] agatga 606
[2233] <210> 71
[2234] <211> 606
[2235] <212> DNA
[2236] <213> 智人(Homo sapiens)
[2237] <220>
[2238] <223> 13. M8H5GIEGR-人R66H
[2239] <400> 71
[2240] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60
[2241] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
[2242] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
[2243] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
[2244] accagcactc attggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
[2245] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360
[2246] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420
[2247] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2248] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2249] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
[2250] agatga 606
[2251] <210> 72
[2252] <211> 606
[2253] <212> DNA
[2254] <213> 智人(Homo sapiens)
[2255] <220>
[2256] <223> 14. M8H5GIEGR-人T75K
[2257] <400> 72
[2258] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60
[2259] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
[2260] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
[2261] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240

[2262] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagaaat ctggagctta tgagaaaaca 300
[2263] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360
[2264] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420
[2265] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2266] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2267] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
[2268] agatga 606
[2269] <210> 73
[2270] <211> 606
[2271] <212> DNA
[2272] <213> 智人(Homo sapiens)
[2273] <220>
[2274] <223> 15. M8H5GIEGR-人T75Y
[2275] <400> 73
[2276] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60
[2277] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
[2278] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
[2279] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
[2280] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagtatt ctggagctta tgagaaaaca 300
[2281] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360
[2282] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420
[2283] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2284] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2285] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
[2286] agatga 606
[2287] <210> 74
[2288] <211> 606
[2289] <212> DNA
[2290] <213> 智人(Homo sapiens)
[2291] <220>
[2292] <223> 16. M8H5GIEGR-人M99K
[2293] <400> 74
[2294] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60
[2295] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
[2296] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
[2297] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
[2298] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
[2299] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccaa agagtcctat 360
[2300] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420

[2301] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2302] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2303] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
[2304] agatga 606
[2305] <210> 75
[2306] <211> 606
[2307] <212> DNA
[2308] <213> 智人(Homo sapiens)
[2309] <220>
[2310] <223> 17. M8H5GIEGR-人S101Y
[2311] <400> 75
[2312] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60
[2313] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
[2314] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
[2315] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
[2316] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
[2317] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtattat 360
[2318] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420
[2319] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2320] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2321] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
[2322] agatga 606
[2323] <210> 76
[2324] <211> 606
[2325] <212> DNA
[2326] <213> 智人(Homo sapiens)
[2327] <220>
[2328] <223> 18. M8H5GIEGR-人K69.92.118.
[2329] <400> 76
[2330] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60
[2331] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
[2332] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
[2333] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
[2334] accagcactc gttggcggcg tggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
[2335] gatactgatg ggaagtttct ctatcaccgt tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360
[2336] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagcgttt cagccgccat 420
[2337] catggaccca ccattactgc ccgtctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2338] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2339] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600

[2340] agatga 606

[2341] <210> 77

[2342] <211> 597

[2343] <212> DNA

[2344] <213> 腔棘鱼属(Latimeria)

[2345] <220>

[2346] <223> 19. M8H5GIEGR-空棘鱼

[2347] <400> 77

[2348] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggaagt 60

[2349] ccccttcgag atgaagacat ccaagtgcag gagaactttg accttcccag gatttatgga 120

[2350] aaatggtacg aaattgcaat cgcttcgacc tgtccctggg tgaagaatca caaggataag 180

[2351] atgttcatgg gaactatggt gctacaagag ggagagcaga gtgaccggat cagtaccacc 240

[2352] tccacccgaa tcagggatgg aacctgctca cagatcactg gatattacac gttaaccaca 300

[2353] acacctggga agttcgctta tcacaattct aaatggaact tggatgtcaa cagttatgtt 360

[2354] gttcacacta actatgacga atactcgatt gtgatgatgc agaaatacaa aagctctaac 420

[2355] tctaccacta cagtccgact ctatggaaga actcaagagc tacgagacag cttgcatgcc 480

[2356] gagttcaaaa agtttgctct ggatcaggga atagatgagg actccattta cattctgcca 540

[2357] aaaagagatg aatgtgtacc tggtgaacct aaagcagaat ctctcatggc acgttga 597

[2358] <210> 78

[2359] <211> 606

[2360] <212> DNA

[2361] <213> 智人(Homo sapiens)

[2362] <220>

[2363] <223> 21. M8H5GIEGR-人L89T

[2364] <400> 78

[2365] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2366] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120

[2367] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180

[2368] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240

[2369] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300

[2370] gatactgatg ggaagtttac ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360

[2371] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420

[2372] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480

[2373] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540

[2374] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600

[2375] agatga 606

[2376] <210> 79

[2377] <211> 606

[2378] <212> DNA

[2379] <213> 智人(Homo sapiens)

[2380] <220>

[2381] <223> 22. M8H5GIEGR-人N1796D

[2382] <400> 79

[2383] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2384] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcgatatctc tcggatctat 120

[2385] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180

[2386] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240

[2387] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300

[2388] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatggg atataaccat ggagtcctat 360

[2389] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420

[2390] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480

[2391] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540

[2392] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600

[2393] agatga 606

[2394] <210> 80

[2395] <211> 606

[2396] <212> DNA

[2397] <213> 智人(Homo sapiens)

[2398] <220>

[2399] <223> 23. M8H5GIEGR-人T45K

[2400] <400> 80

[2401] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2402] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120

[2403] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180

[2404] aggatgaaag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240

[2405] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300

[2406] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360

[2407] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420

[2408] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480

[2409] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540

[2410] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600

[2411] agatga 606

[2412] <210> 81

[2413] <211> 606

[2414] <212> DNA

[2415] <213> 智人(Homo sapiens)

[2416] <220>

[2417] <223> 24. M8H5GIEGR-人A135E

[2418] <400> 81

[2419] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2420] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120

[2421] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180

[2422] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240

[2423] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300

[2424] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360

[2425] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420

[2426] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggaac cgcagctgag ggaaactctc 480

[2427] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540

[2428] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600

[2429] agatga 606

[2430] <210> 82

[2431] <211> 606

[2432] <212> DNA

[2433] <213> 智人(Homo sapiens)

[2434] <220>

[2435] <223> 25. M8H5GIEGR-人V170S

[2436] <400> 82

[2437] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2438] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120

[2439] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180

[2440] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240

[2441] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300

[2442] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360

[2443] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420

[2444] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480

[2445] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540

[2446] atggctgacc gaggtgaatg ttctcctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600

[2447] agatga 606

[2448] <210> 83

[2449] <211> 606

[2450] <212> DNA

[2451] <213> 智人(Homo sapiens)

[2452] <220>

[2453] <223> 26. M8H5GIEGR-人V148D

[2454] <400> 83

[2455] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60

[2456] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120

[2457] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
[2458] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
[2459] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
[2460] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360
[2461] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420
[2462] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2463] ctgcaggact tcagagatgt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2464] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctggg gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
[2465] agatga 606
[2466] <210> 84
[2467] <211> 606
[2468] <212> DNA
[2469] <213> 智人(Homo sapiens)
[2470] <220>
[2471] <223> 27. M8H5GIEGR-人G172Q
[2472] <400> 84
[2473] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggt ggaggagggg gtatcgaggg ccgcggccct 60
[2474] gtgccaacgc cgcccgacaa catccaagtg caggaaaact tcaatatctc tcggatctat 120
[2475] gggaagtggt acaacctggc catcggttcc acctgcccct ggctgaagaa gatcatggac 180
[2476] aggatgacag tgagcacgct ggtgctggga gagggcgcta cagaggcgga gatcagcatg 240
[2477] accagcactc gttggcggaa aggtgtctgt gaggagacgt ctggagctta tgagaaaaca 300
[2478] gatactgatg ggaagtttct ctatcacaaa tccaaatgga acataaccat ggagtcctat 360
[2479] gtggtccaca ccaactatga tgagtatgcc attttcctga ccaagaaatt cagccgccat 420
[2480] catggaccca ccattactgc caagctctac gggcgggcgc cgcagctgag ggaaactctc 480
[2481] ctgcaggact tcagagtggt tgcccagggt gtgggcatcc ctgaggactc catcttcacc 540
[2482] atggctgacc gaggtgaatg tgtccctcag gagcaggaac cagagcccat cttaatcccg 600
[2483] agatga 606
[2484] <210> 85
[2485] <211> 594
[2486] <212> DNA
[2487] <213> 智人(Homo sapiens)
[2488] <220>
[2489] <223> 33. M8H4DK-人M41K+R66H
[2490] <400> 85
[2491] atgcatcacc atcaccatca ccatcacgat gacgatgaca agggccctgt gccaacgccg 60
[2492] cccgacaaca tccaagtgca ggaaaacttc aatatctctc ggatctatgg gaagtggtac 120
[2493] aacctggcca tcggttccac ctgcccctgg ctgaagaaga tcaaagacag gatgacagtg 180
[2494] agcacgctgg tgctgggaga gggcgctaca gaggcggaga tcagcatgac cagcactcat 240
[2495] tggcggaaag gtgtctgtga ggagacgtct ggagcttatg agaaaacaga tactgatggg 300

[2496] aagtttctct atcacaaatc caaatggaac ataaccatgg agtcctatgt ggtccacacc 360
[2497] aactatgatg agtatgccat tttcctgacc aagaaattca gccgccatca tggacccacc 420
[2498] attactgcca agctctacgg gcgggcgccg cagctgaggg aaactctcct gcaggacttc 480
[2499] agagtggttg cccagggtgt gggcatccct gaggactcca tcttcaccat ggctgaccga 540
[2500] ggtgaatgtg tccctgggga gcaggaacca gagcccatct taatcccgag atga 594
[2501] <210> 86
[2502] <211> 594
[2503] <212> DNA
[2504] <213> 智人(Homo sapiens)
[2505] <220>
[2506] <223> 34. M8H4DK-人M41K+N1796D
[2507] <400> 86
[2508] atgcatcacc atcaccatca ccatcacgat gacgatgaca agggccctgt gccaacgccg 60
[2509] cccgacaaca tccaagtgca ggaaaacttc gatatctctc ggatctatgg gaagtggtac 120
[2510] aacctggcca tcggttccac ctgcccctgg ctgaagaaga tcaaagacag gatgacagtg 180
[2511] agcacgctgg tgctgggaga gggcgctaca gaggcggaga tcagcatgac cagcactcgt 240
[2512] tggcggaaag gtgtctgtga ggagacgtct ggagcttatg agaaaacaga tactgatggg 300
[2513] aagtttctct atcacaaatc caaatgggat ataaccatgg agtcctatgt ggtccacacc 360
[2514] aactatgatg agtatgccat tttcctgacc aagaaattca gccgccatca tggacccacc 420
[2515] attactgcca agctctacgg gcgggcgccg cagctgaggg aaactctcct gcaggacttc 480
[2516] agagtggttg cccagggtgt gggcatccct gaggactcca tcttcaccat ggctgaccga 540
[2517] ggtgaatgtg tccctgggga gcaggaacca gagcccatct taatcccgag atga 594
[2518] <210> 87
[2519] <211> 594
[2520] <212> DNA
[2521] <213> 智人(Homo sapiens)
[2522] <220>
[2523] <223> 35. M8H4DK-人R66H+N1796D
[2524] <400> 87
[2525] atgcatcacc atcaccatca ccatcacgat gacgatgaca agggccctgt gccaacgccg 60
[2526] cccgacaaca tccaagtgca ggaaaacttc gatatctctc ggatctatgg gaagtggtac 120
[2527] aacctggcca tcggttccac ctgcccctgg ctgaagaaga tcatggacag gatgacagtg 180
[2528] agcacgctgg tgctgggaga gggcgctaca gaggcggaga tcagcatgac cagcactcat 240
[2529] tggcggaaag gtgtctgtga ggagacgtct ggagcttatg agaaaacaga tactgatggg 300
[2530] aagtttctct atcacaaatc caaatgggat ataaccatgg agtcctatgt ggtccacacc 360
[2531] aactatgatg agtatgccat tttcctgacc aagaaattca gccgccatca tggacccacc 420
[2532] attactgcca agctctacgg gcgggcgccg cagctgaggg aaactctcct gcaggacttc 480
[2533] agagtggttg cccagggtgt gggcatccct gaggactcca tcttcaccat ggctgaccga 540
[2534] ggtgaatgtg tccctgggga gcaggaacca gagcccatct taatcccgag atga 594

[2535] <210> 88

[2536] <211> 594

[2537] <212> DNA

[2538] <213> 智人(Homo sapiens)

[2539] <220>

[2540] <223> 36. M8H4DK-人M41K+R66H+N1796D

[2541] <400> 88

[2542] atgcatcacc atcaccatca ccatcacgat gacgatgaca agggccctgt gccaacgccg 60

[2543] cccgacaaca tccaagtgca ggaaaacttc gatatctctc ggatctatgg gaagtggtac 120

[2544] aacctggcca tcggttccac ctgcccctgg ctgaagaaga tcaaagacag gatgacagtg 180

[2545] agcacgctgg tgctgggaga gggcgctaca gaggcggaga tcagcatgac cagcactcat 240

[2546] tggcggaaag gtgtctgtga ggagacgtct ggagcttatg agaaaacaga tactgatggg 300

[2547] aagtttctct atcacaaatc caaatgggat ataaccatgg agtcctatgt ggtccacacc 360

[2548] aactatgatg agtatgccat tttcctgacc aagaaattca gccgccatca tggacccacc 420

[2549] attactgcca agctctacgg gcgggcgccg cagctgaggg aaactctcct gcaggacttc 480

[2550] agagtggttg cccagggtgt gggcatccct gaggactcca tcttcaccat ggctgaccga 540

[2551] ggtgaatgtg tccctgggga gcaggaacca gagcccatct taatcccgag atga 594

[2552] <210> 89

[2553] <211> 594

[2554] <212> DNA

[2555] <213> 智人(Homo sapiens)

[2556] <220>

[2557] <223> 37. M8H4DK-人M41K

[2558] <400> 89

[2559] atgcatcacc atcaccatca ccatcacgat gacgatgaca agggccctgt gccaacgccg 60

[2560] cccgacaaca tccaagtgca ggaaaacttc aatatctctc ggatctatgg gaagtggtac 120

[2561] aacctggcca tcggttccac ctgcccctgg ctgaagaaga tcaaagacag gatgacagtg 180

[2562] agcacgctgg tgctgggaga gggcgctaca gaggcggaga tcagcatgac cagcactcgt 240

[2563] tggcggaaag gtgtctgtga ggagacgtct ggagcttatg agaaaacaga tactgatggg 300

[2564] aagtttctct atcacaaatc caaatggaac ataaccatgg agtcctatgt ggtccacacc 360

[2565] aactatgatg agtatgccat tttcctgacc aagaaattca gccgccatca tggacccacc 420

[2566] attactgcca agctctacgg gcgggcgccg cagctgaggg aaactctcct gcaggacttc 480

[2567] agagtggttg cccagggtgt gggcatccct gaggactcca tcttcaccat ggctgaccga 540

[2568] ggtgaatgtg tccctgggga gcaggaacca gagcccatct taatcccgag atga 594

[2569] <210> 90

[2570] <211> 594

[2571] <212> DNA

[2572] <213> 智人(Homo sapiens)

[2573] <220>

[2574] <223> 38. M8H4DK-人R66H

[2575] <400> 90

[2576] atgcatcacc atcaccatca ccatcacgat gacgatgaca agggccctgt gccaacgccg 60

[2577] cccgacaaca tccaagtgca ggaaaacttc aatatctctc ggatctatgg gaagtggtac 120

[2578] aacctggcca tcggttccac ctgcccctgg ctgaagaaga tcatggacag gatgacagtg 180

[2579] agcacgctgg tgctgggaga gggcgctaca gaggcggaga tcagcatgac cagcactcat 240

[2580] tggcggaaag gtgtctgtga ggagacgtct ggagcttatg agaaaacaga tactgatggg 300

[2581] aagtttctct atcacaaatc caaatggaac ataaccatgg agtcctatgt ggtccacacc 360

[2582] aactatgatg agtatgccat tttcctgacc aagaaattca gccgccatca tggacccacc 420

[2583] attactgcca agctctacgg gcgggcgccg cagctgaggg aaactctcct gcaggacttc 480

[2584] agagtggttg cccagggtgt gggcatccct gaggactcca tcttcaccat ggctgaccga 540

[2585] ggtgaatgtg tccctgggga gcaggaacca gagcccatct taatcccgag atga 594

[2586] <210> 91

[2587] <211> 594

[2588] <212> DNA

[2589] <213> 智人(Homo sapiens)

[2590] <220>

[2591] <223> 39. M8H4DK-人N1796D

[2592] <400> 91

[2593] atgcatcacc atcaccatca ccatcacgat gacgatgaca agggccctgt gccaacgccg 60

[2594] cccgacaaca tccaagtgca ggaaaacttc gatatctctc ggatctatgg gaagtggtac 120

[2595] aacctggcca tcggttccac ctgcccctgg ctgaagaaga tcatggacag gatgacagtg 180

[2596] agcacgctgg tgctgggaga gggcgctaca gaggcggaga tcagcatgac cagcactcgt 240

[2597] tggcggaaag gtgtctgtga ggagacgtct ggagcttatg agaaaacaga tactgatggg 300

[2598] aagtttctct atcacaaatc caaatgggat ataaccatgg agtcctatgt ggtccacacc 360

[2599] aactatgatg agtatgccat tttcctgacc aagaaattca gccgccatca tggacccacc 420

[2600] attactgcca agctctacgg gcgggcgccg cagctgaggg aaactctcct gcaggacttc 480

[2601] agagtggttg cccagggtgt gggcatccct gaggactcca tcttcaccat ggctgaccga 540

[2602] ggtgaatgtg tccctgggga gcaggaacca gagcccatct taatcccgag atga 594

[2603] <210> 92

[2604] <211> 579

[2605] <212> DNA

[2606] <213> 智人(Homo sapiens)

[2607] <220>

[2608] <223> 40. M8H-人wt

[2609] <400> 92

[2610] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggc cctgtgccaa cgccgcccga caacatccaa 60

[2611] gtgcaggaaa acttcaatat ctctcggatc tatgggaagt ggtacaacct ggccatcggt 120

[2612] tccacctgcc cctggctgaa gaagatcatg gacaggatga cagtgagcac gctggtgctg 180

[2613] ggagagggcg ctacagaggc ggagatcagc atgaccagca ctcgttggcg gaaaggtgtc 240
[2614] tgtgaggaga cgtctggagc ttatgagaaa acagatactg atgggaagtt tctctatcac 300
[2615] aaatccaaat ggaacataac catggagtcc tatgtggtcc acaccaacta tgatgagtat 360
[2616] gccattttcc tgaccaagaa attcagccgc catcatggac ccaccattac tgccaagctc 420
[2617] tacgggcggg cgccgcagct gagggaaact ctcctgcagg acttcagagt ggttgcccag 480
[2618] ggtgtgggca tccctgagga ctccatcttc accatggctg accgaggtga atgtgtccct 540
[2619] ggggagcagg aaccagagcc catcttaatc ccgagatga 579
[2620] <210> 93
[2621] <211> 579
[2622] <212> DNA
[2623] <213> 智人(Homo sapiens)
[2624] <220>
[2625] <223> 41. M8H-人R66H+N1796D
[2626] <400> 93
[2627] atgcatcacc atcaccatca ccatcacggc cctgtgccaa cgccgcccga caacatccaa 60
[2628] gtgcaggaaa acttcgatat ctctcggatc tatgggaagt ggtacaacct ggccatcggt 120
[2629] tccacctgcc cctggctgaa gaagatcatg gacaggatga cagtgagcac gctggtgctg 180
[2630] ggagagggcg ctacagaggc ggagatcagc atgaccagca ctcattggcg gaaaggtgtc 240
[2631] tgtgaggaga cgtctggagc ttatgagaaa acagatactg atgggaagtt tctctatcac 300
[2632] aaatccaaat gggatataac catggagtcc tatgtggtcc acaccaacta tgatgagtat 360
[2633] gccattttcc tgaccaagaa attcagccgc catcatggac ccaccattac tgccaagctc 420
[2634] tacgggcggg cgccgcagct gagggaaact ctcctgcagg acttcagagt ggttgcccag 480
[2635] ggtgtgggca tccctgagga ctccatcttc accatggctg accgaggtga atgtgtccct 540
[2636] ggggagcagg aaccagagcc catcttaatc ccgagatga 579
[2637] <210> 94
[2638] <211> 555
[2639] <212> DNA
[2640] <213> 智人(Homo sapiens)
[2641] <220>
[2642] <223> 42. untagged-人R66H+N1796D
[2643] <400> 94
[2644] atgggccctg tgccaacgcc gcccgacaac atccaagtgc aggaaaactt cgatatctct 60
[2645] cggatctatg ggaagtggta caacctggcc atcggttcca cctgcccctg gctgaagaag 120
[2646] atcatggaca ggatgacagt gagcacgctg gtgctgggag agggcgctac agaggcggag 180
[2647] atcagcatga ccagcactca ttggcggaaa ggtgtctgtg aggagacgtc tggagcttat 240
[2648] gagaaaacag atactgatgg gaagtttctc tatcacaaat ccaaatggga tataaccatg 300
[2649] gagtcctatg tggtccacac caactatgat gagtatgcca ttttcctgac caagaaattc 360
[2650] agccgccatc atggacccac cattactgcc aagctctacg ggcgggcgcc gcagctgagg 420
[2651] gaaactctcc tgcaggactt cagagtggtt gcccagggtg tgggcatccc tgaggactcc 480

[2652] atcttcacca tggctgaccg aggtgaatgt gtccctgggg agcaggaacc agagcccatc 540

[2653] ttaatcccga gatga 555

[2654] <210> 95

[2655] <211> 555

[2656] <212> DNA

[2657] <213> 智人(Homo sapiens)

[2658] <220>

[2659] <223> 61. untagged-人wt

[2660] <400> 95

[2661] atgggccctg tgccaacgcc gcccgacaac atccaagtgc aggaaaactt caatatctct 60

[2662] cggatctatg ggaagtggta caacctggcc atcggttcca cctgcccctg gctgaagaag 120

[2663] atcatggaca ggatgacagt gagcacgctg gtgctgggag agggcgctac agaggcggag 180

[2664] atcagcatga ccagcactcg ttggcggaaa ggtgtctgtg aggagacgtc tggagcttat 240

[2665] gagaaaacag atactgatgg gaagtttctc tatcacaaat ccaaatggaa cataaccatg 300

[2666] gagtcctatg tggtccacac caactatgat gagtatgcca ttttcctgac caagaaattc 360

[2667] agccgccatc atggacccac cattactgcc aagctctacg ggcgggcgcc gcagctgagg 420

[2668] gaaactctcc tgcaggactt cagagtggtt gcccagggtg tgggcatccc tgaggactcc 480

[2669] atcttcacca tggctgaccg aggtgaatgt gtccctgggg agcaggaacc agagcccatc 540

[2670] ttaatcccga gatga 555

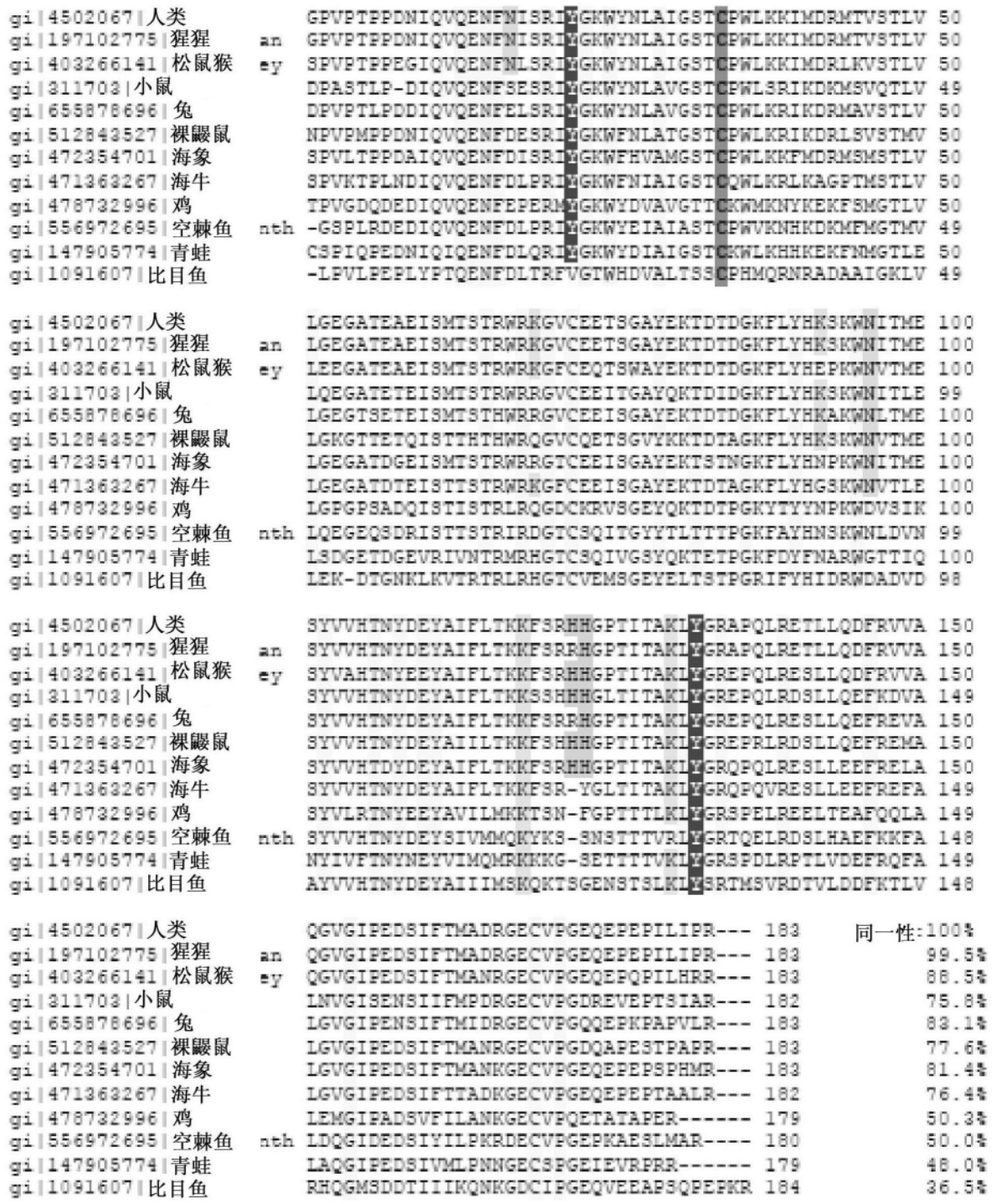
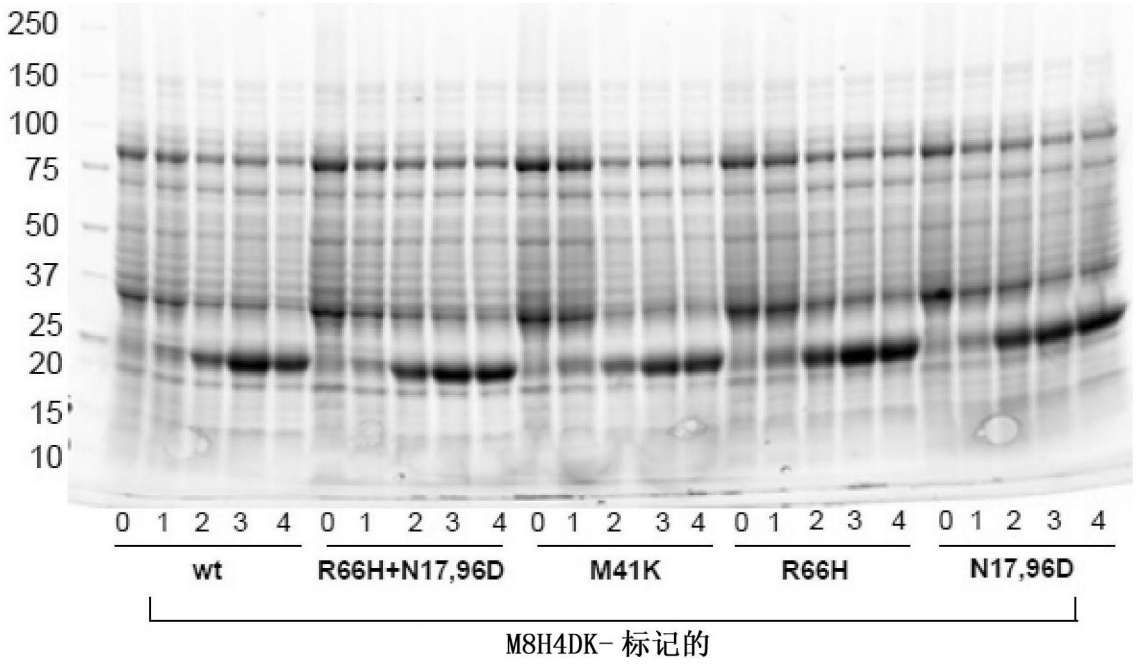

gi|4502067|人类 GPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLV 50
gi|197102775|猩猩 an GPVPTPPDNIQVQENFNISRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRMTVSTLV 50
gi|403266141|松鼠猴 ey SPVPTPPEGIQVQENFNLSRIYGKWYNLAIGSTCPWLKKIMDRLKVSTLV 50
gi|311703|小鼠 DPASTLP-DIQVQENFSESRIYGKWYNLAVGSTCPWLSRIKDKMSVQTLV 49
gi|655878696|兔 DPVPTLPDDIQVQENFELSRIYGKWYNLAVGSTCPWLKRIKDRMAVSTLV 50
gi|512843527|裸鼹鼠 NPVPMPPDNIQVQENFDESRIYGKWFNLATGSTCPWLKRIKDRLSVSTMV 50
gi|472354701|海象 SPVLTPPDAIQVQENFDISRIYGKWFHVAMGSTCPWLKKFMDRMSMSTLV 50
gi|471363267|海牛 SPVKTPLNDIQVQENFDLPRIYGKWFNIAIGSTCQWLKRLKAGPTMSTLV 50
gi|478732996|鸡 TPVGDQDEDIQVQENFEPERMYGKWYDVAVGTTCKWMKNYKEKFSMGTLV 50
gi|556972695|空棘鱼 nth -GSPLRDEDIQVQENFDLPRIYGKWYEIAIASTCPWVKNHKDKMFMGTMV 49
gi|147905774|青蛙 CSPIQPEDNIQIQENFDLQRIYGKWYDIAIGSTCKWLKHHKEKFNMGTLE 50
gi|1091607|比目鱼 -LPVLPEPLYPTQENFDLTRFVGTWHDVALTSSCPHMQRNRADAAIGKLV 49
gi|4502067|人类 LGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITME 100
gi|197102775|猩猩 an LGEGATEAEISMTSTRWRKGVCEETSGAYEKTDTDGKFLYHKSKWNITME 100
gi|403266141|松鼠猴 ey LEEGATEAEISMTSTRWRKGFCEQTSWAYEKTDTDGKFLYHEPKWNVTME 100
gi|311703|小鼠 LQEGATETEISMTSTRWRRGVCEEITGAYQKTDIDGKFLYHKSKWNITLE 99
gi|655878696|兔 LGEGTSETEISMTSTHWRRGVCEEISGAYEKTDTDGKFLYHKAKWNLTME 100
gi|512843527|裸鼹鼠 LGKGTTETQISTTHTHWRQGVCQETSGVYKKTDTAGKFLYHKSKWNVTME 100
gi|472354701|海象 LGEGATDGEISMTSTRWRRGTCEEISGAYEKTSTNGKFLYHNPKWNITME 100
gi|471363267|海牛 LGEGATDTEISTTSTRWRKGFCEEISGAYEKTDTAGKFLYHGSKWNVTLE 100
gi|478732996|鸡 LGPGPSADQISTISTRLRQGDCKRVSGEYQKTDTPGKYTYYNPKWDVSIK 100
gi|556972695|空棘鱼 nth LQEGEQSDRISTTSTRIRDGTCSQITGYYTLTTTPGKFAYHNSKWNLDVN 99
gi|147905774|青蛙 LSDGETDGEVRIVNTRMRHGTCSQIVGSYQKTETPGKFDYFNARWGTTIQ 100
gi|1091607|比目鱼 LEK-DTGNKLKVTRTRLRHGTCVEMSGEYELTSTPGRIFYHIDRWDADVD 98
gi|4502067|人类 SYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVA 150
gi|197102775|猩猩 an SYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRAPQLRETLLQDFRVVA 150
gi|403266141|松鼠猴 ey SYVAHTNYEEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGREPQLRESLLQDFRVVA 150
gi|311703|小鼠 SYVVHTNYDEYAIFLTKKSSHHHGLTITAKLYGREPQLRDSLLQEFKDVA 149
gi|655878696|兔 SYVVHTNYDEYAIFLTKKFSRRHGPTITAKLYGREPQLRESLLQEFREVA 150
gi|512843527|裸鼹鼠 SYVVHTNYDEYAIILTKKFSHHHGPTITAKLYGREPRLRDSLLQEFREMA 150
gi|472354701|海象 SYVVHTDYDEYAIFLTKKFSRHHGPTITAKLYGRQPQLRESLLEEFRELA 150
gi|471363267|海牛 SYVVHTNYDEYAIFLTKKFSR-YGLTITAKLYGRQPQVRESLLEEFREFA 149
gi|478732996|鸡 SYVLRTNYEEYAVILMKKTSN-FGPTTTLKLYGRSPELREELTEAFQQLA 149
gi|556972695|空棘鱼 nth SYVVHTNYDEYSIVMMQKYKS-SNSTTTVRLYGRTQELRDSLHAEFKKFA 148
gi|147905774|青蛙 NYIVFTNYNEYVIMQMRKKKG-SETTTTVKLYGRSPDLRPTLVDEFRQFA 149
gi|1091607|比目鱼 AYVVHTNYDEYAIIIMSKQKTSGENSTSLKLYSRTMSVRDTVLDDFKTLV 148
gi|4502067|人类 QGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR--- 183 同一性:100%
gi|197102775|猩猩 an QGVGIPEDSIFTMADRGECVPGEQEPEPILIPR--- 183 99.5%
gi|403266141|松鼠猴 ey QGVGIPEDSIFTMANRGECVPGEQEPQPILHRR--- 183 88.5%
gi|311703|小鼠 LNVGISENSIIFMPDRGECVPGDREVEPTSIAR--- 182 75.8%
gi|655878696|兔 LGVGIPENSIFTMIDRGECVPGQQEPKPAPVLR--- 183 83.1%
gi|512843527|裸鼹鼠 LGVGIPEDSIFTMANRGECVPGDQAPESTPAPR--- 183 77.6%
gi|472354701|海象 LGVGIPEDSIFTMANKGECVPGEQEPEPSPHMR--- 183 81.4%
gi|471363267|海牛 LGVGIPEDSIFTTADKGECVPGEQEPEPTAALR--- 182 76.4%
gi|478732996|鸡 LEMGIPADSVFILANKGECVPQETATAPER------ 179 50.3%
gi|556972695|空棘鱼 nth LDQGIDEDSIYILPKRDECVPGEPKAESLMAR---- 180 50.0%
gi|147905774|青蛙 LAQGIPEDSIVMLPNNGECSPGEIEVRPRR------ 179 48.0%
gi|1091607|比目鱼 RHQGMSDDTIIIKQNKGDCIPGEQVEEAPSQPEPKR 184 36.5%

图1


250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
0 1 2 3 4 0 1 2 3 4 0 1 2 3 4 0 1 2 3 4 0 1 2 3 4
wt
R66H+N17,96D
M41K
R66H
N17,96D
M8H4DK- 标记的

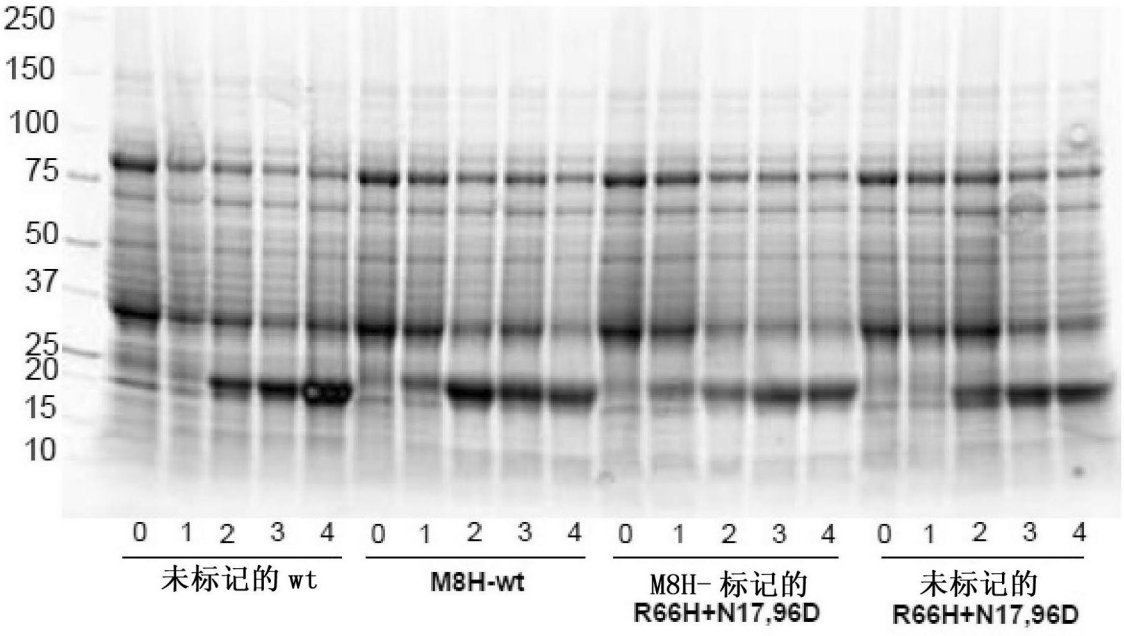

250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
0 1 2 3 4 0 1 2 3 4 0 1 2 3 4 0 1 2 3 4
未标记的 wt
M8H-wt
M8H- 标记的
R66H+N17,96D
未标记的
R66H+N17,96D

图2

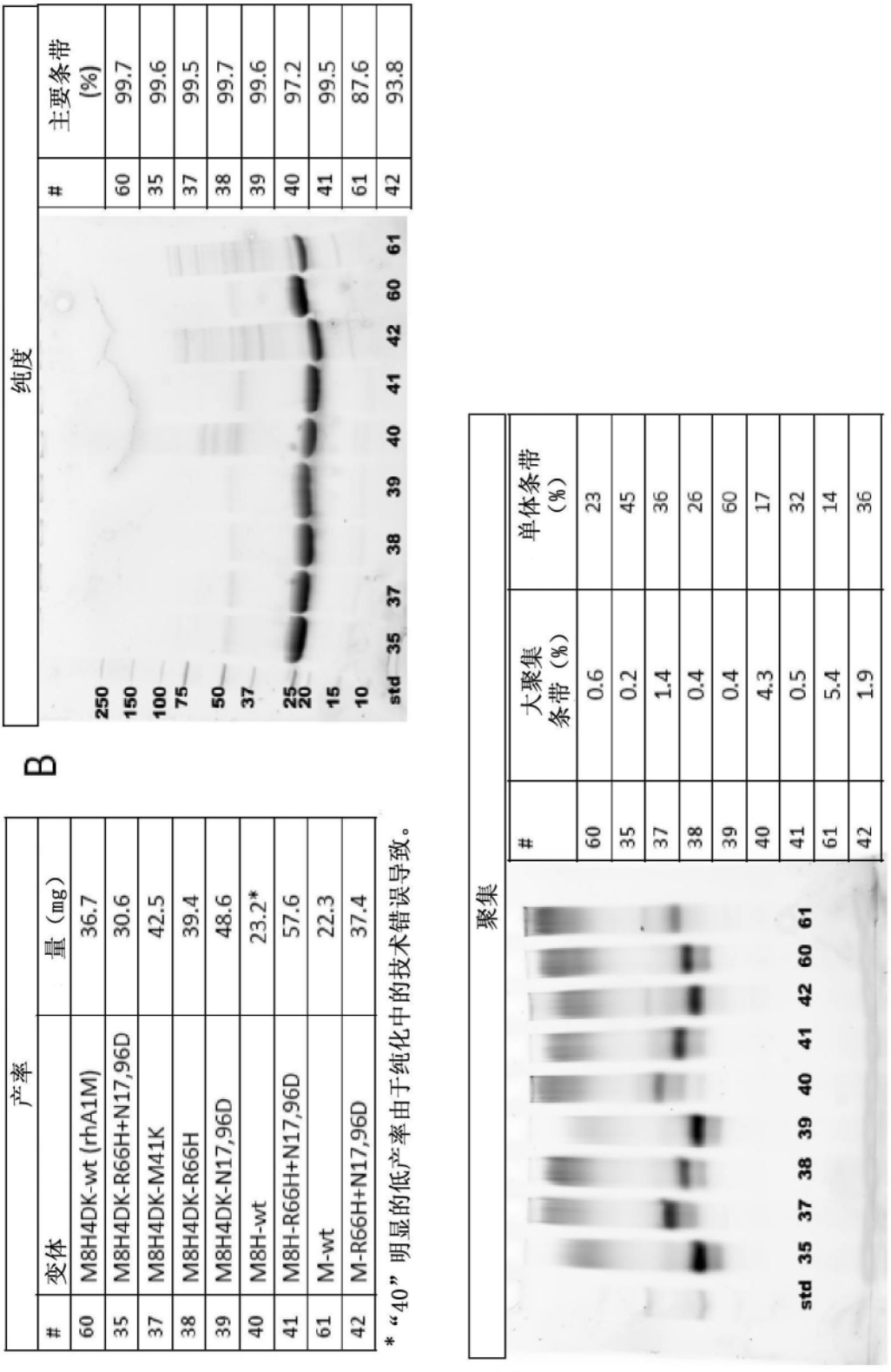

A
产率
变体 量（mg）
60 M8H4DK-wt (rhA1M) 36.7
35 M8H4DK-R66H+N17,96D 30.6
37 M8H4DK-M41K 42.5
38 M8H4DK-R66H 39.4
39 M8H4DK-N17,96D 48.6
40 M8H-wt 23.2*
41 M8H-R66H+N17,96D 57.6
61 M-wt 22.3
42 M-R66H+N17,96D 37.4
* “40”明显的低产率由于纯化中的技术错误导致。
B
纯度
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
std 35 37 38 39 40 41 42 60 61
主要条带 (%)
60 99.7
35 99.6
37 99.5
38 99.7
39 99.6
40 97.2
41 99.5
61 87.6
42 93.8
C
聚集
std 35 37 38 39 40 41 42 60 61
大聚集条带（%） 单体条带（%）
60 0.6 23
35 0.2 45
37 1.4 36
38 0.4 26
39 0.4 60
40 4.3 17
41 0.5 32
61 5.4 14
42 1.9 36

图3

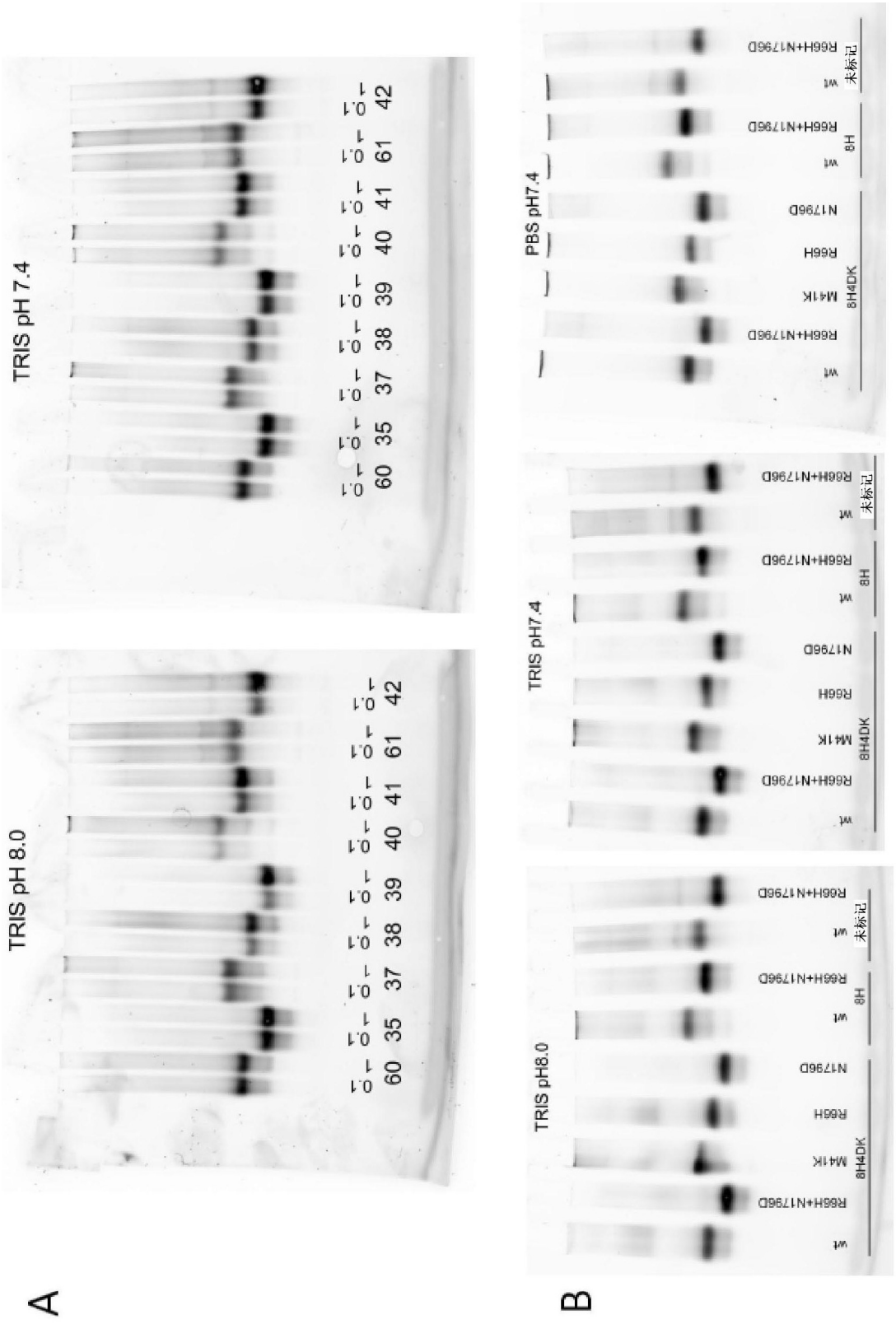

A
TRIS pH 7.4
1 0.1 1 0.1 1 0.1 1 0.1 1 0.1 1 0.1 1 0.1
60 35 37 38 39 40 41 61 42
TRIS pH 8.0
1 0.1 1 0.1 1 0.1 1 0.1 1 0.1 1 0.1 1 0.1
60 35 37 38 39 40 41 61 42
B
PBS pH7.4
TRIS pH7.4
TRIS pH8.0
wt
R66H+N179D
M41K
R66H
N179D
8H4DK
8H
未标记

图4

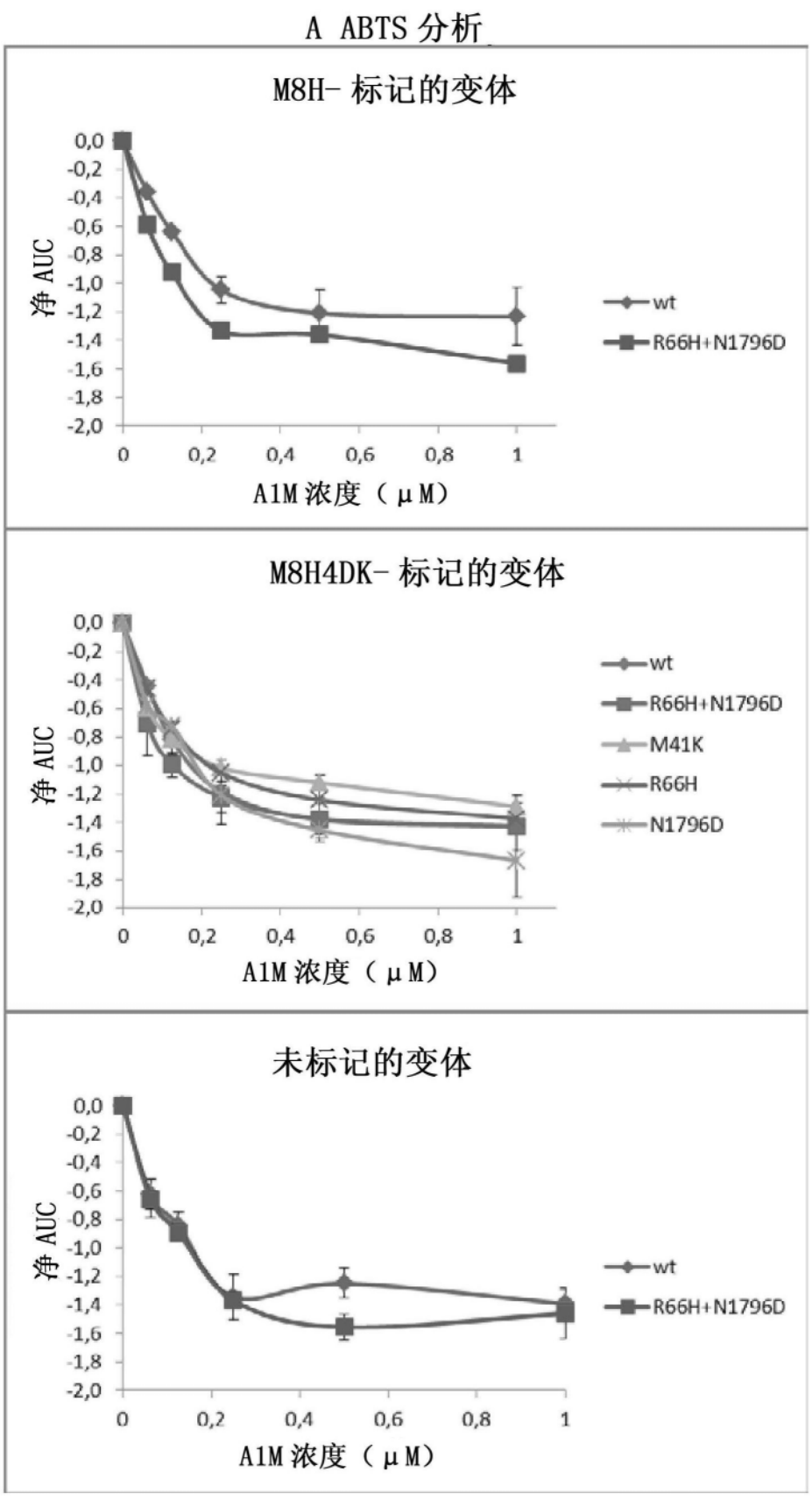

A ABTS 分析
M8H- 标记的变体
净 AUC
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
-0,8
-1,0
-1,2
-1,4
-1,6
-1,8
-2,0
0
0,2
0,4
0,6
0,8
1
A1M 浓度（μM）
wt
R66H+N1796D
M8H4DK- 标记的变体
净 AUC
A1M 浓度（μM）
wt
R66H+N1796D
M41K
R66H
N1796D
未标记的变体
净 AUC
A1M 浓度（μM）
wt
R66H+N1796D

图5

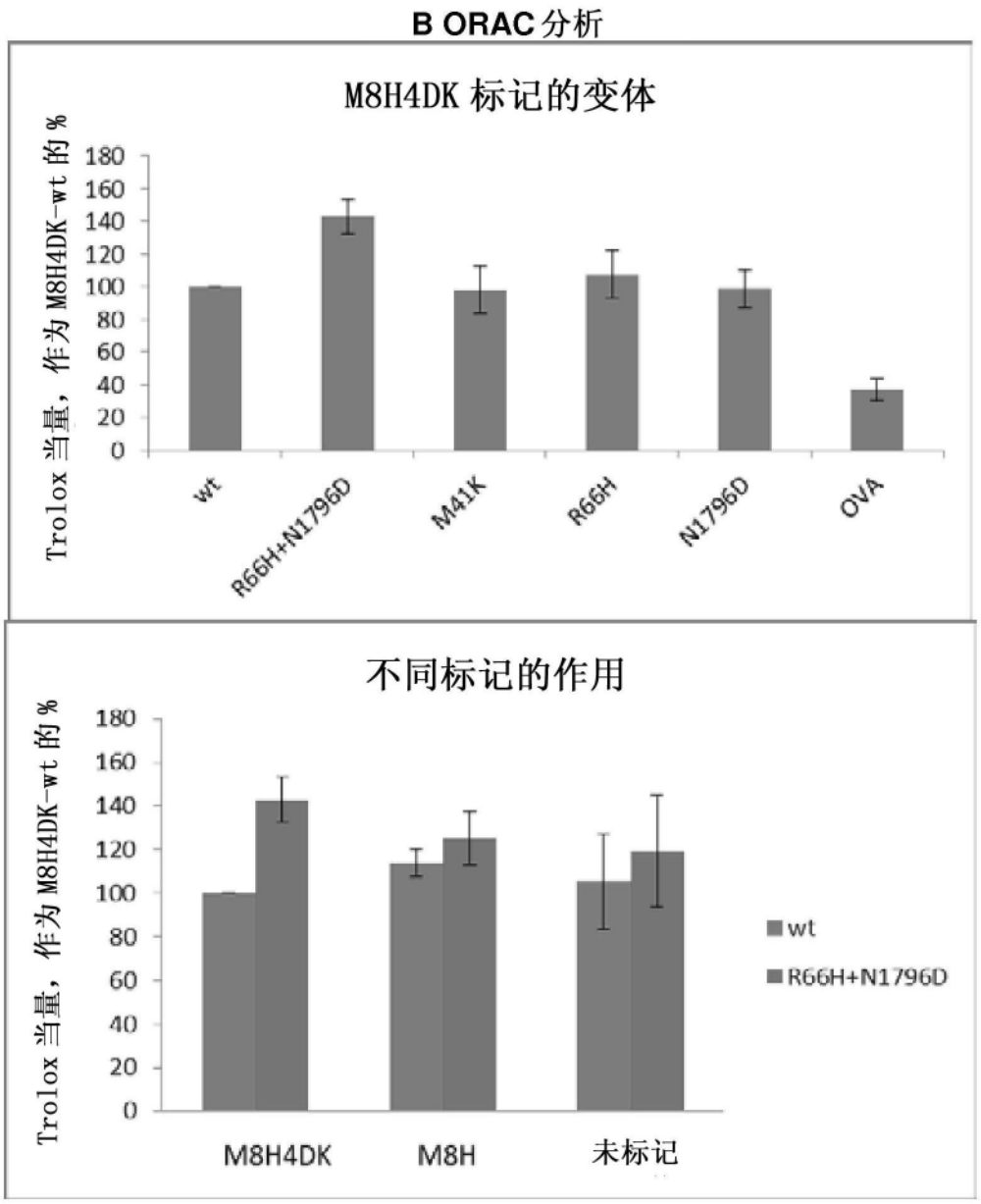

B ORAC分析
M8H4DK标记的变体
Trolox当量，作为M8H4DK-wt的%
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
wt
R66H+N1796D
M41K
R66H
N1796D
OVA
不同标记的作用
Trolox当量，作为M8H4DK-wt的%
M8H4DK
M8H
未标记
wt
R66H+N1796D

图5-续

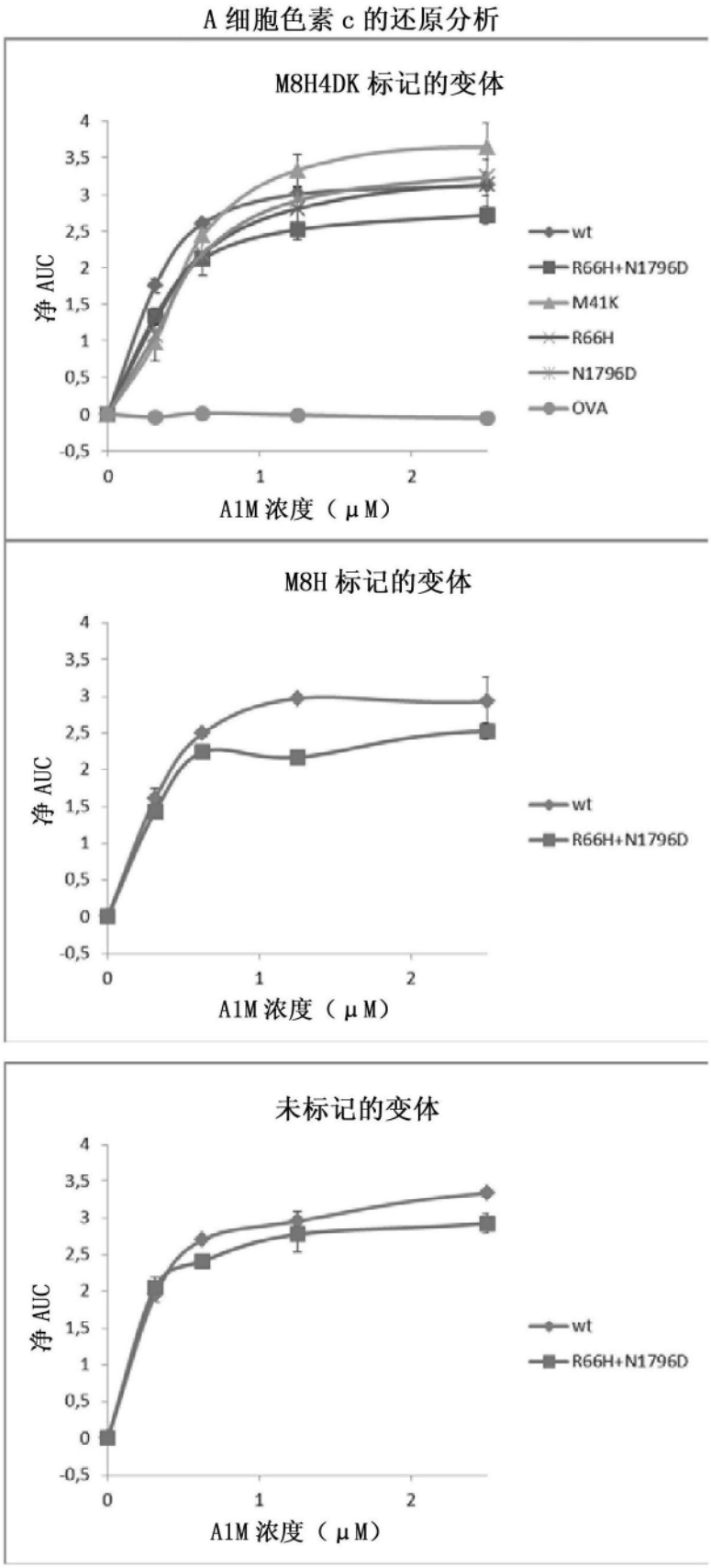
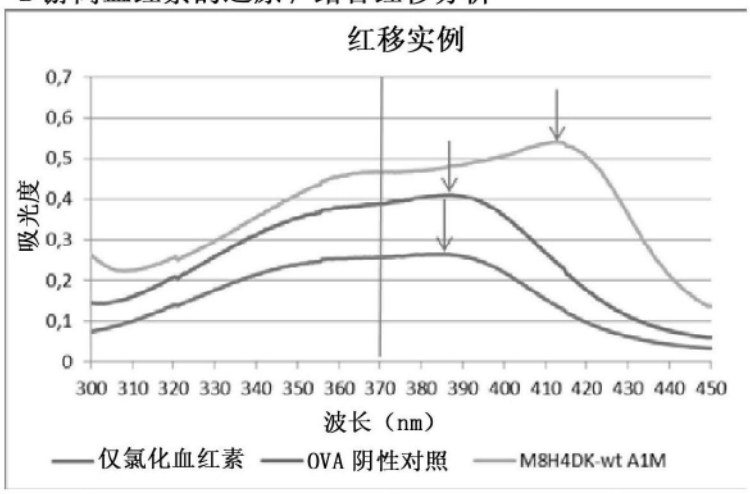

A 细胞色素 c 的还原分析
M8H4DK 标记的变体
净 AUC
A1M 浓度（μM）
wt
R66H+N1796D
M41K
R66H
N1796D
OVA
M8H 标记的变体
净 AUC
A1M 浓度（μM）
wt
R66H+N1796D
未标记的变体
净 AUC
A1M 浓度（μM）
wt
R66H+N1796D

图6

B 游离血红素的还原 / 结合红移分析



#	变体	最大 (370-450nm)	比例 413:386
	仅血红素	386	0.52
	OVA	387	0.59
60	M8H4DK-wt (rhA1M)	413	1.13
35	M8H4DK-R66H+N17,96D	411	1.11
37	M8H4DK-M41K	415	1.27
38	M8H4DK-R66H	412	1.12
39	M8H4DK-N17,96D	413	1.15
40	M8H-wt	415	1.34
41	M8H-R66H+N17,96D	415	1.41
61	M-wt	386	0.87
42	MR66H+N1796D	387	0.76

C 血红素 - 琼脂糖结合 g

#	变体	μM 结合 / μM 蛋白
	OVA	0.008
60	M8H4DK-wt (rhA1M)	0.71
35	M8H4DK-R66H+N17,96D	0.72
37	M8H4DK-M41K	0.76
38	M8H4DK-R66H	0.66
39	M8H4DK-N17,96D	0.69
40	M8H-wt	0.68
41	M8H-R66H+N17,96D	0.72
61	M-wt	0.68
42	MR66H+N17,96D	0.66

图6-续

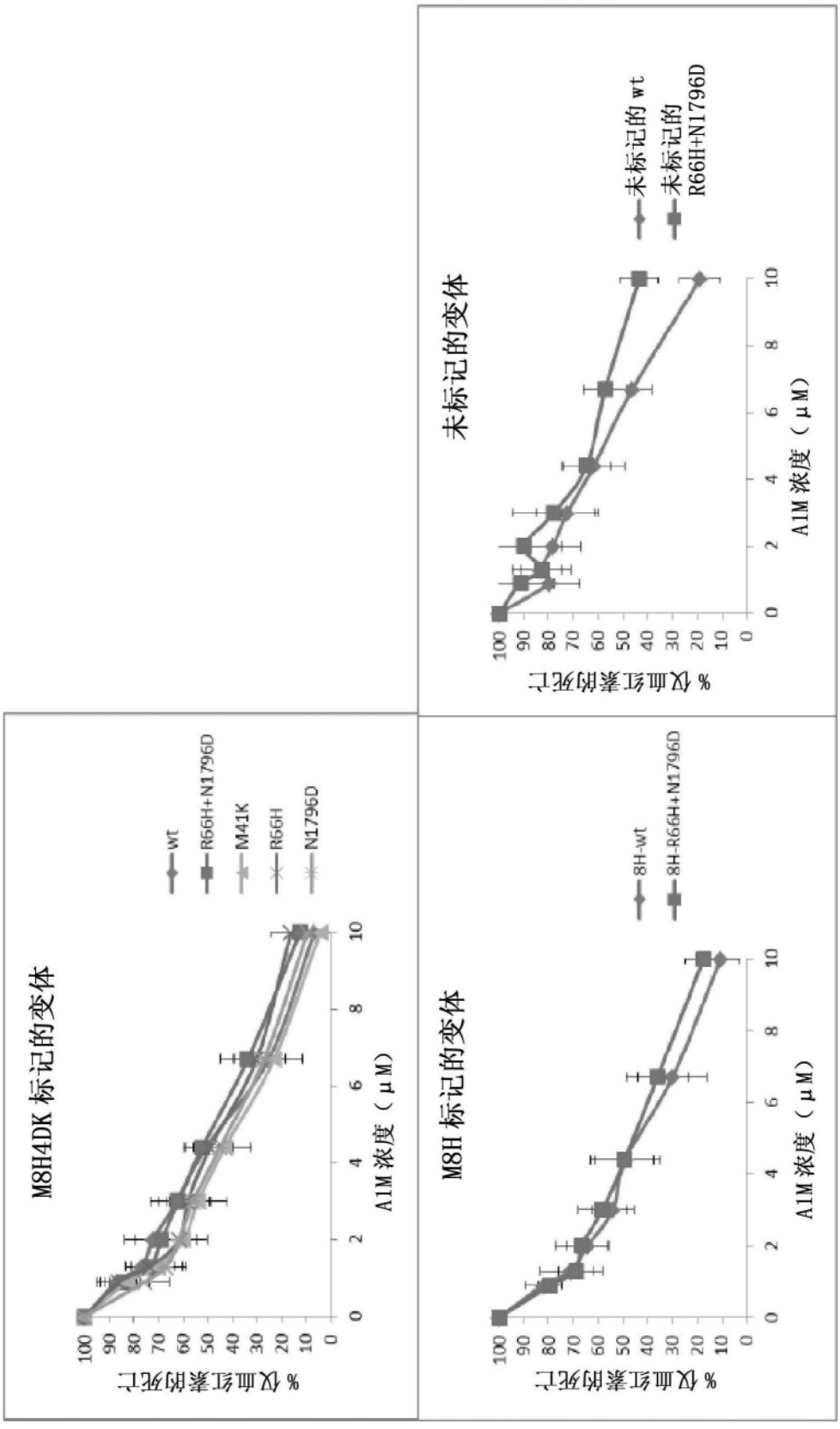

M8H4DK 标记的变体
wt
R66H+N1796D
M41K
R66H
N1796D
% 仅血红素的死亡
A1M 浓度（μM）
M8H 标记的变体
8H-wt
8H-R66H+N1796D
% 仅血红素的死亡
A1M 浓度（μM）
未标记的变体
未标记的 wt
未标记的 R66H+N1796D
% 仅血红素的死亡
A1M 浓度（μM）

图7

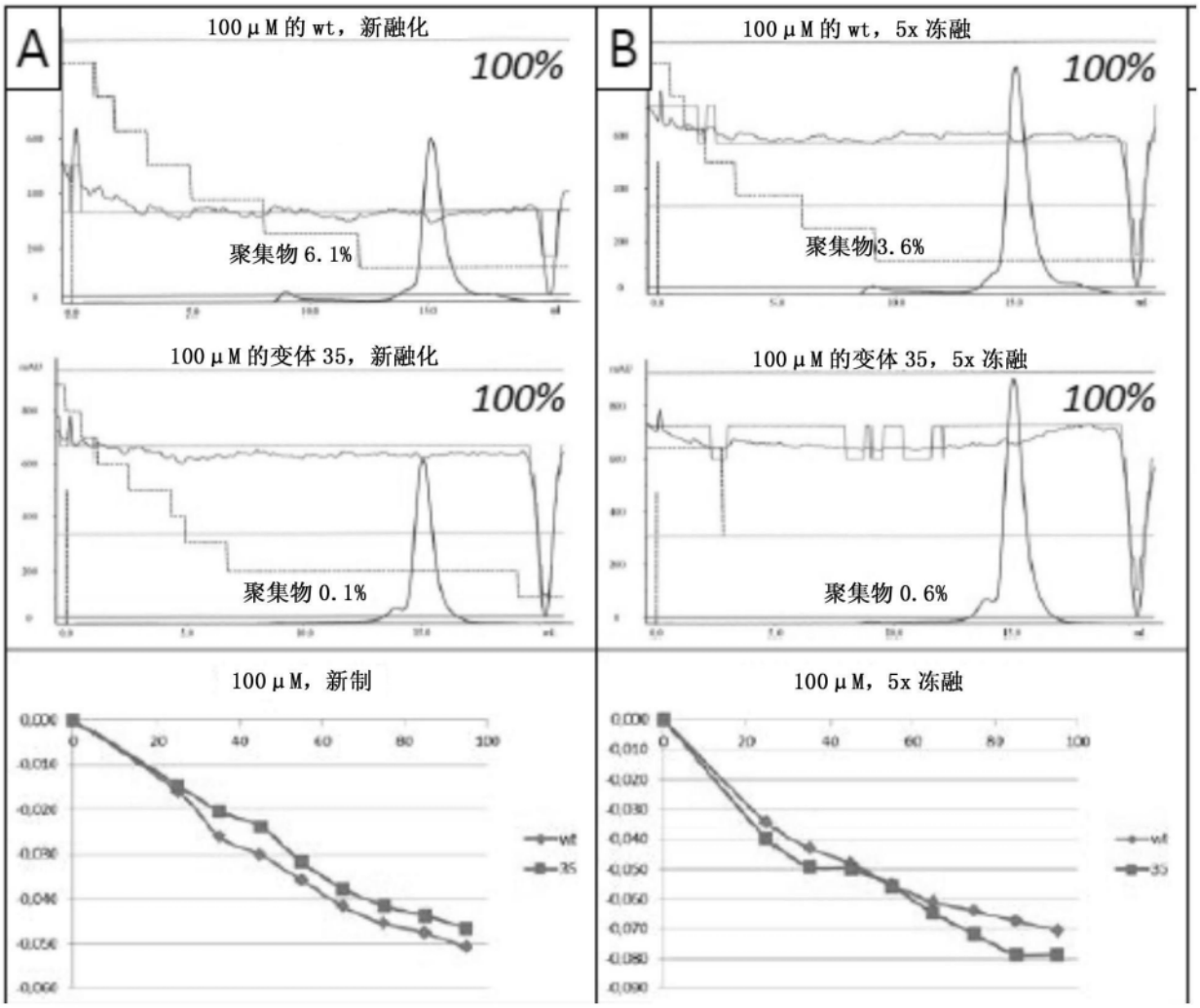

A
100 μ M 的 wt，新融化
100%
聚集物 6.1%
B
100 μ M 的 wt，5x 冻融
100%
聚集物3.6%
100 μ M 的变体 35，新融化
100%
聚集物 0.1%
100 μ M 的变体 35，5x 冻融
100%
聚集物 0.6%
100 μ M，新制
100 μ M，5x 冻融
wt
35

图8

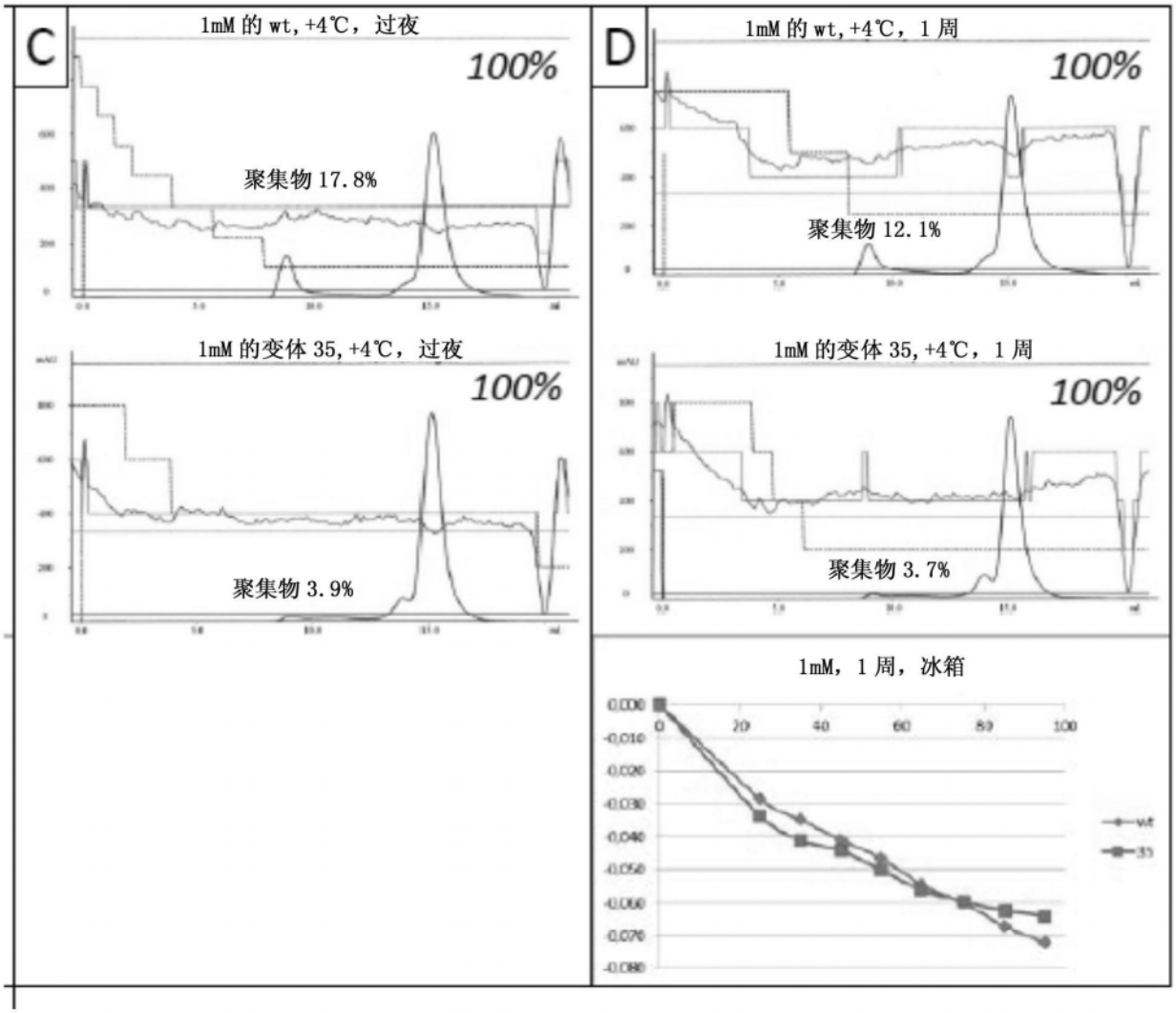

C
1mM 的 wt, +4℃, 过夜
100%
聚集物 17.8%
1mM 的变体 35, +4℃, 过夜
100%
聚集物 3.9%
D
1mM 的 wt, +4℃, 1 周
100%
聚集物 12.1%
1mM 的变体 35, +4℃, 1 周
100%
聚集物 3.7%
1mM, 1 周, 冰箱
0
20
40
60
80
100
wt
35

图8-续

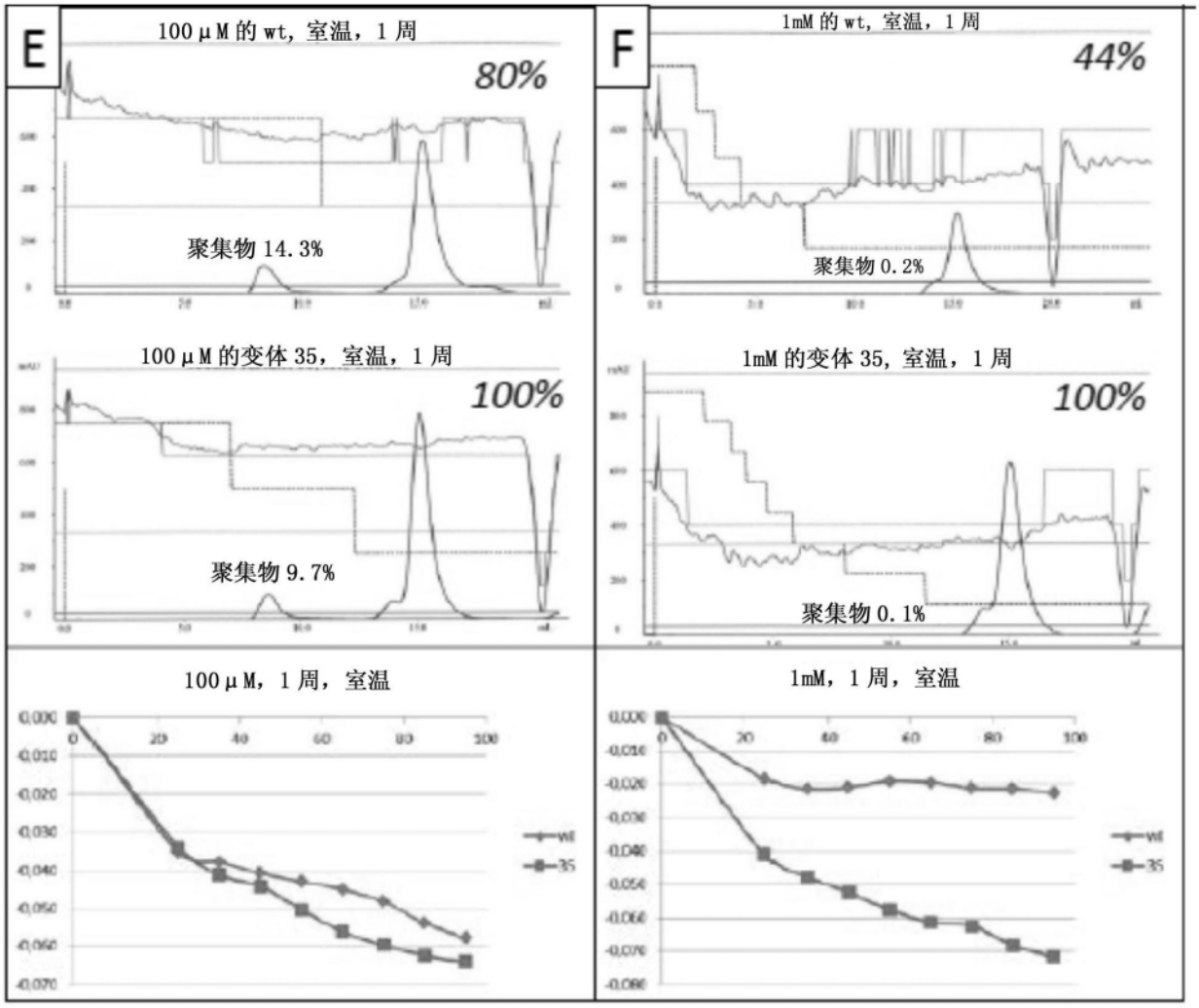

E
100 μ M 的 wt, 室温, 1 周
80%
聚集物 14.3%
100 μ M 的变体 35, 室温, 1 周
100%
聚集物 9.7%
100 μ M, 1 周, 室温
F
1mM 的 wt, 室温, 1 周
44%
聚集物 0.2%
1mM 的变体 35, 室温, 1 周
100%
聚集物 0.1%
1mM, 1 周, 室温

图8-续

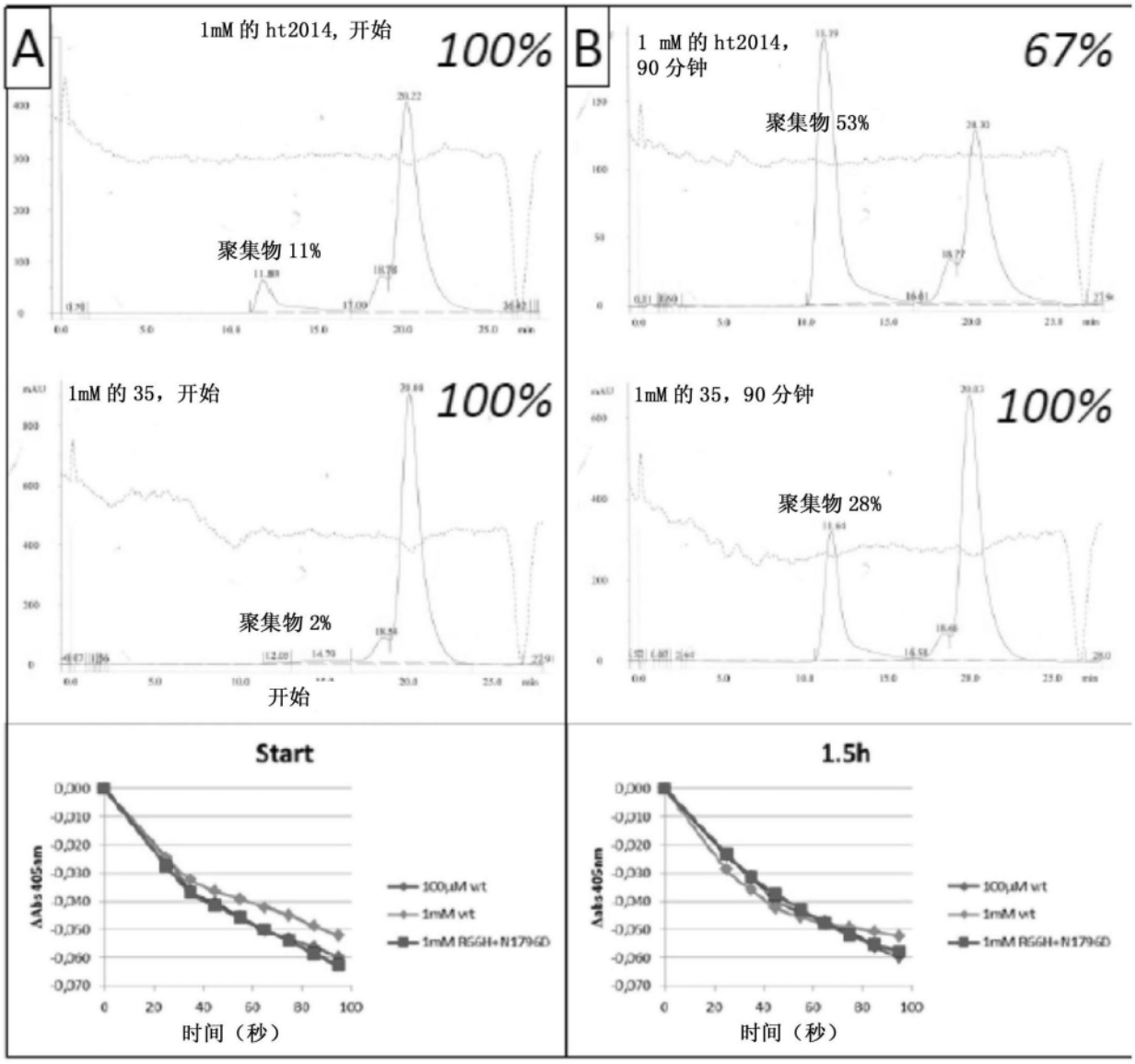

A
1mM 的 ht2014，开始
100%
聚集物 11%
B
1 mM 的 ht2014，
90 分钟
67%
聚集物 53%
1mM 的 35，开始
100%
聚集物 2%
开始
1mM 的 35，90 分钟
100%
聚集物 28%
Start
1.5h
ΔAbs 405nm
时间（秒）
100μM wt
1mM wt
1mM R5GH+N179D

图9

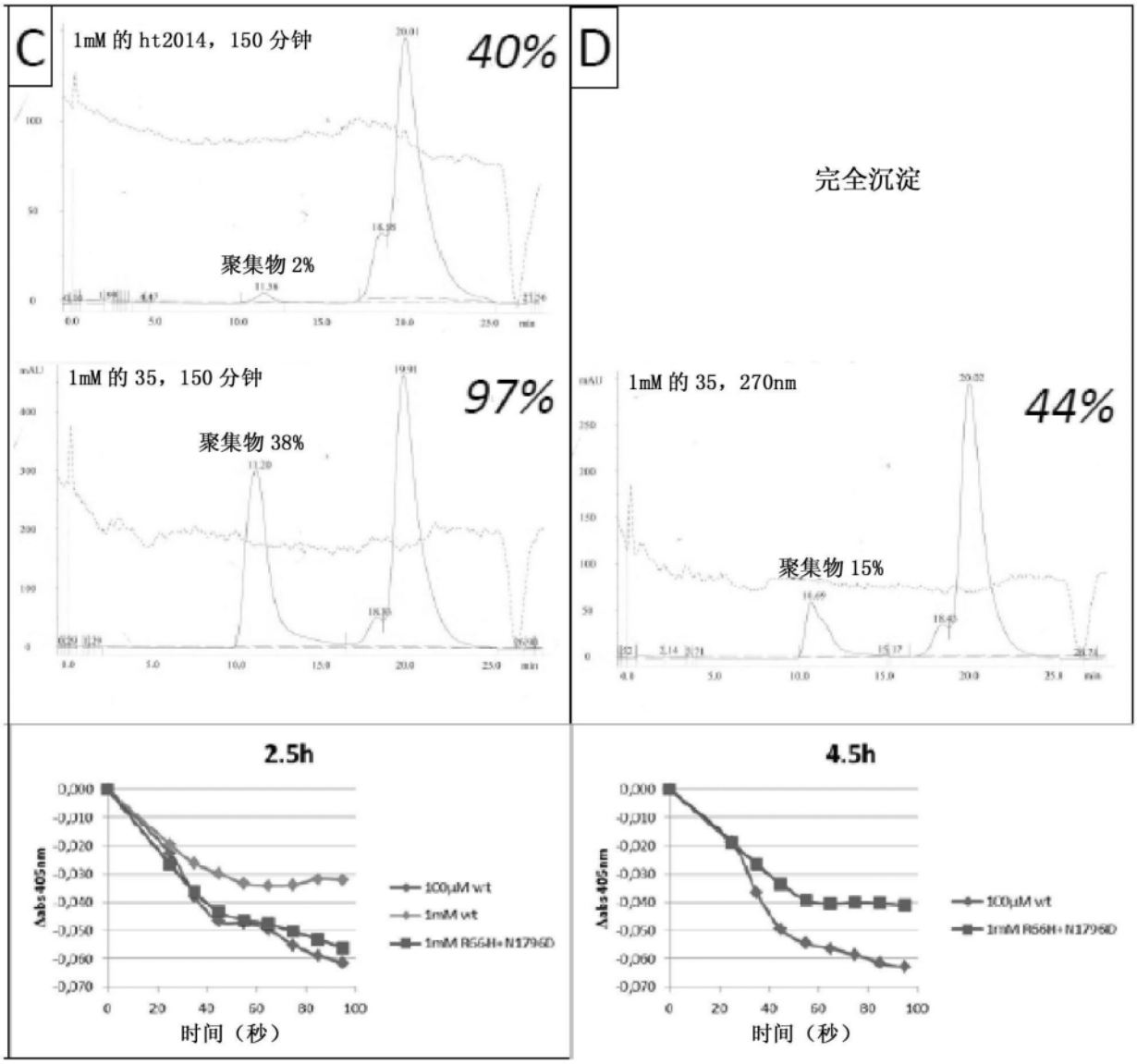

C
1mM 的 ht2014，150 分钟
40%
聚集物 2%
1mM 的 35，150 分钟
97%
聚集物 38%
D
完全沉淀
1mM 的 35，270nm
44%
聚集物 15%
2.5h
4.5h
ΔAbs405nm
时间（秒）
100μM wt
1mM wt
1mM R66H+N176D

图9-续

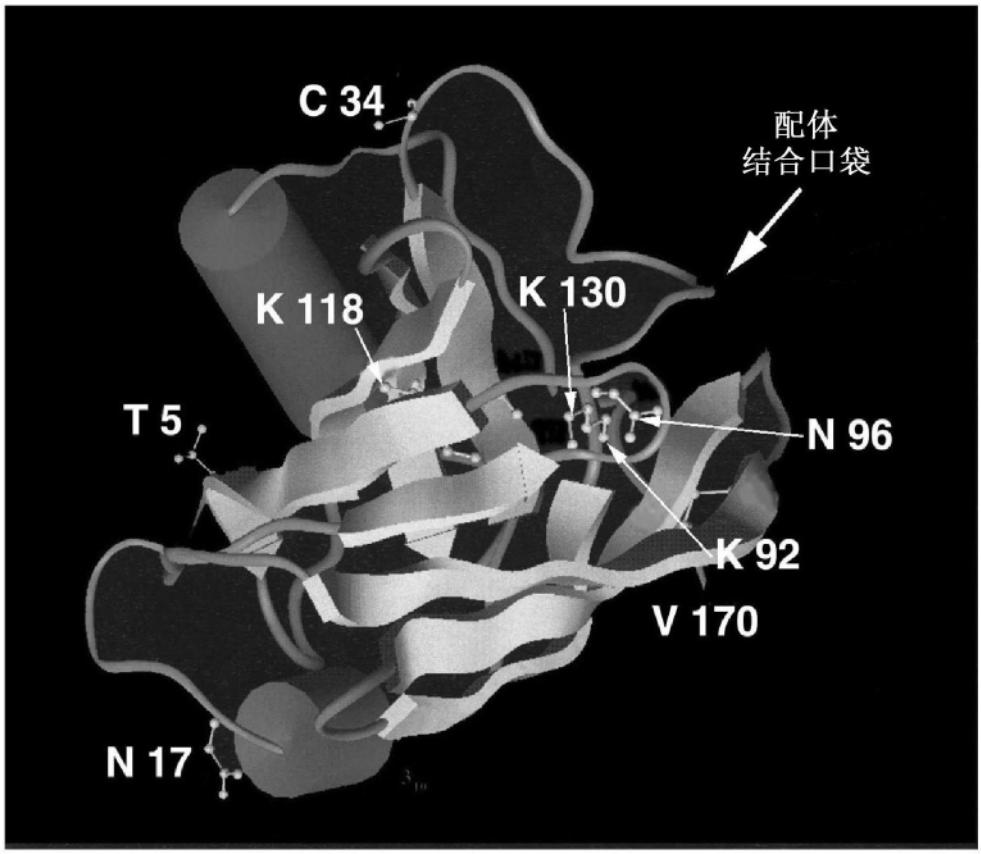


图10

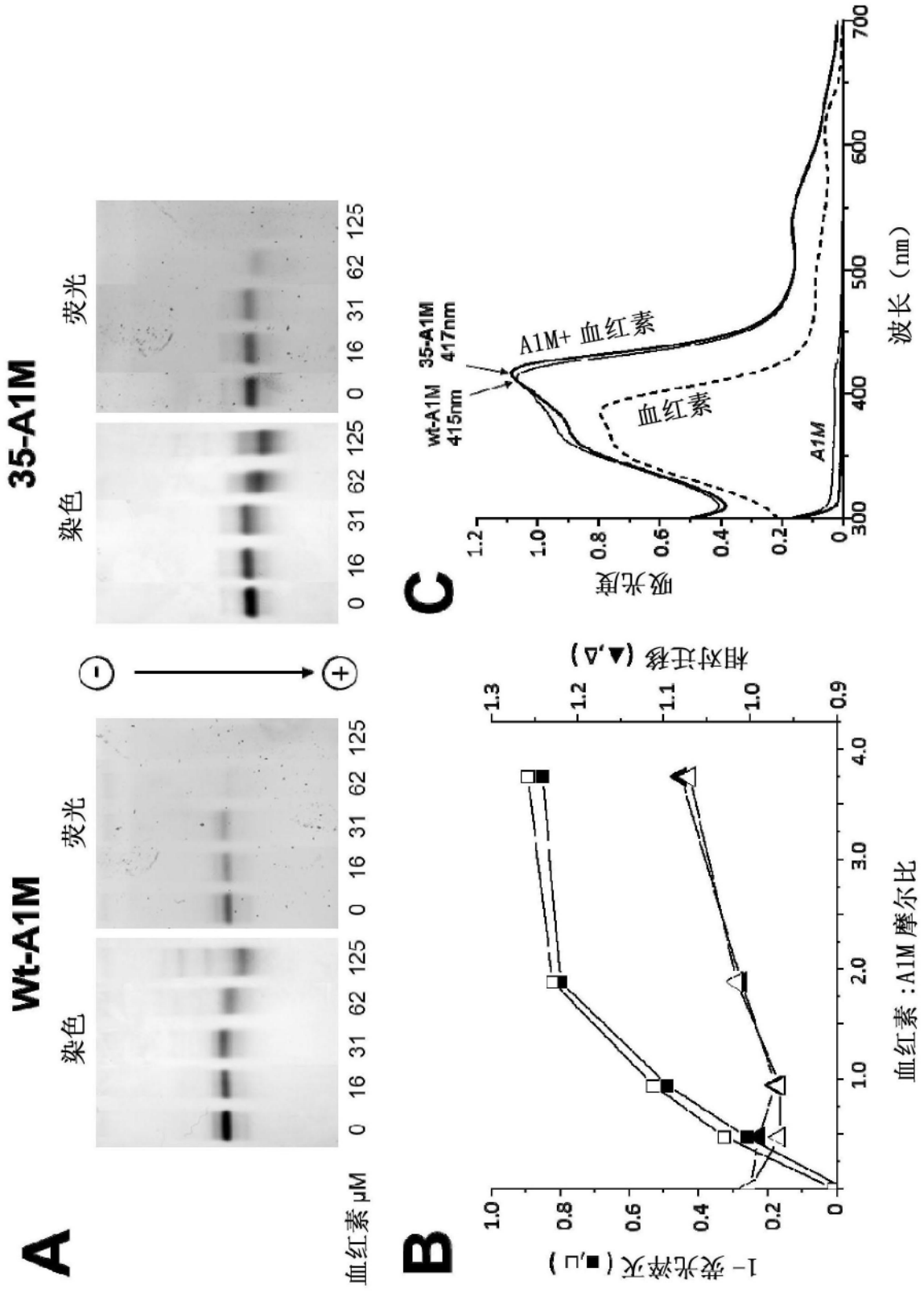

A
Wt-A1M
染色
荧光
35-A1M
染色
荧光
血红素μM 0 16 31 62 125 0 16 31 62 125
⊖
⊕
B
1- 荧光淬灭 (■,□)
相对迁移 (▲,△)
血红素 :A1M 摩尔比
C
吸光度
波长（nm）
wt-A1M 415nm
35-A1M 417nm
A1M+ 血红素
血红素
A1M

图11

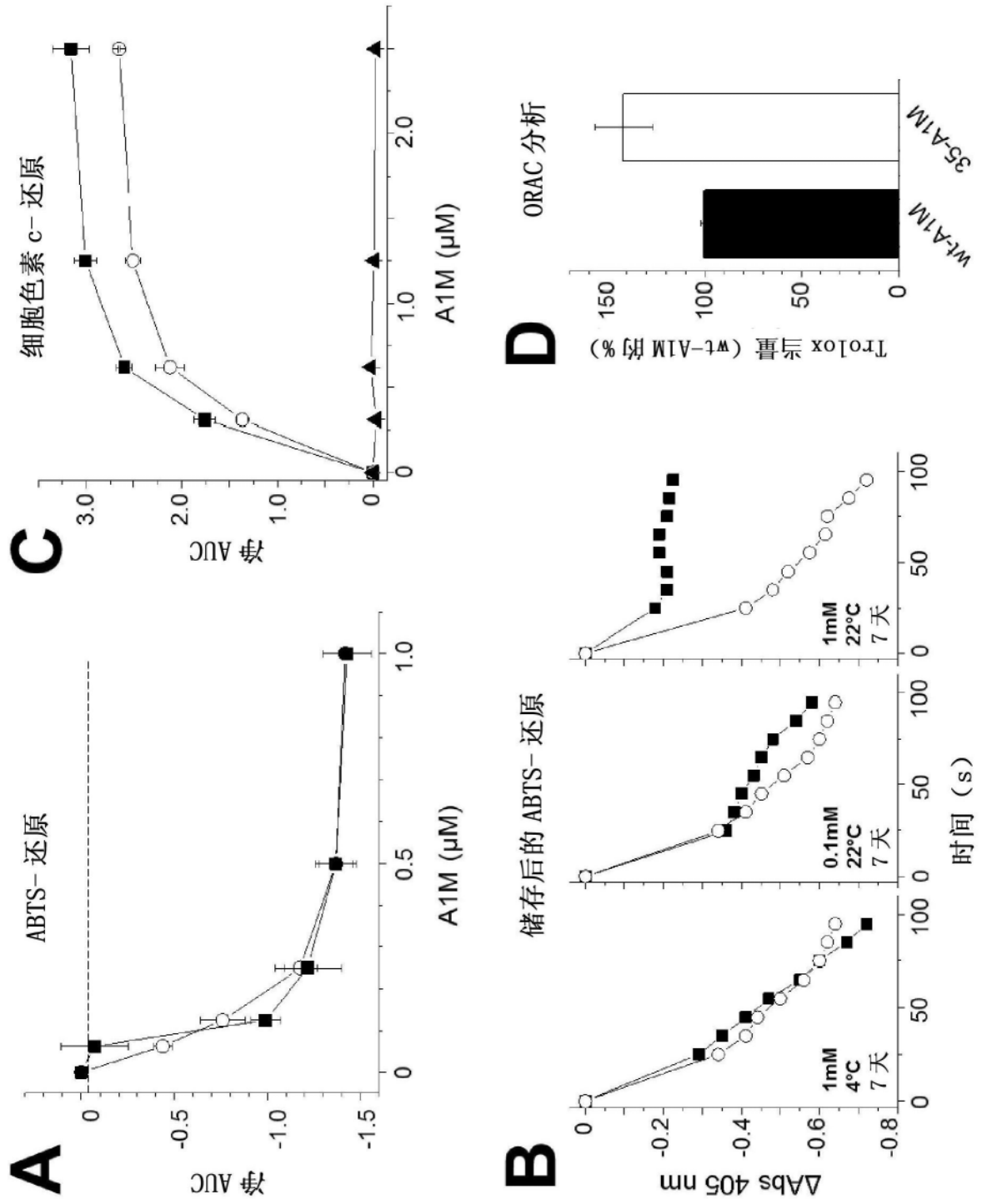

A
ABTS- 还原
净 AUC
A1M (μM)
C
细胞色素 c- 还原
净 AUC
A1M (μM)
B
储存后的 ABTS- 还原
ΔAbs 405 nm
1mM 4°C 7 天
0.1mM 22°C 7 天
1mM 22°C 7 天
时间（s）
D
ORAC 分析
Trolox 当量（wt-A1M 的%）
Wt-A1M
35-A1M

图12

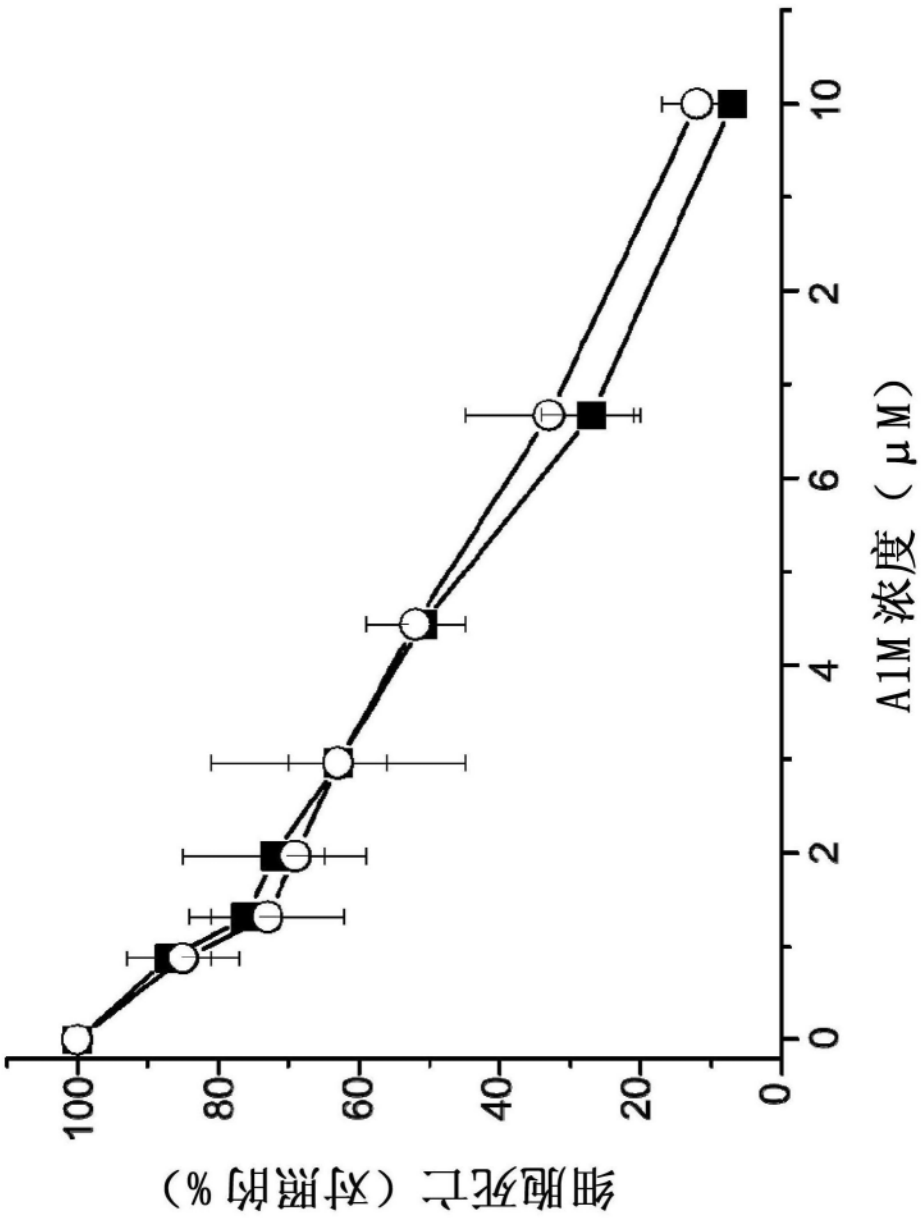


图13

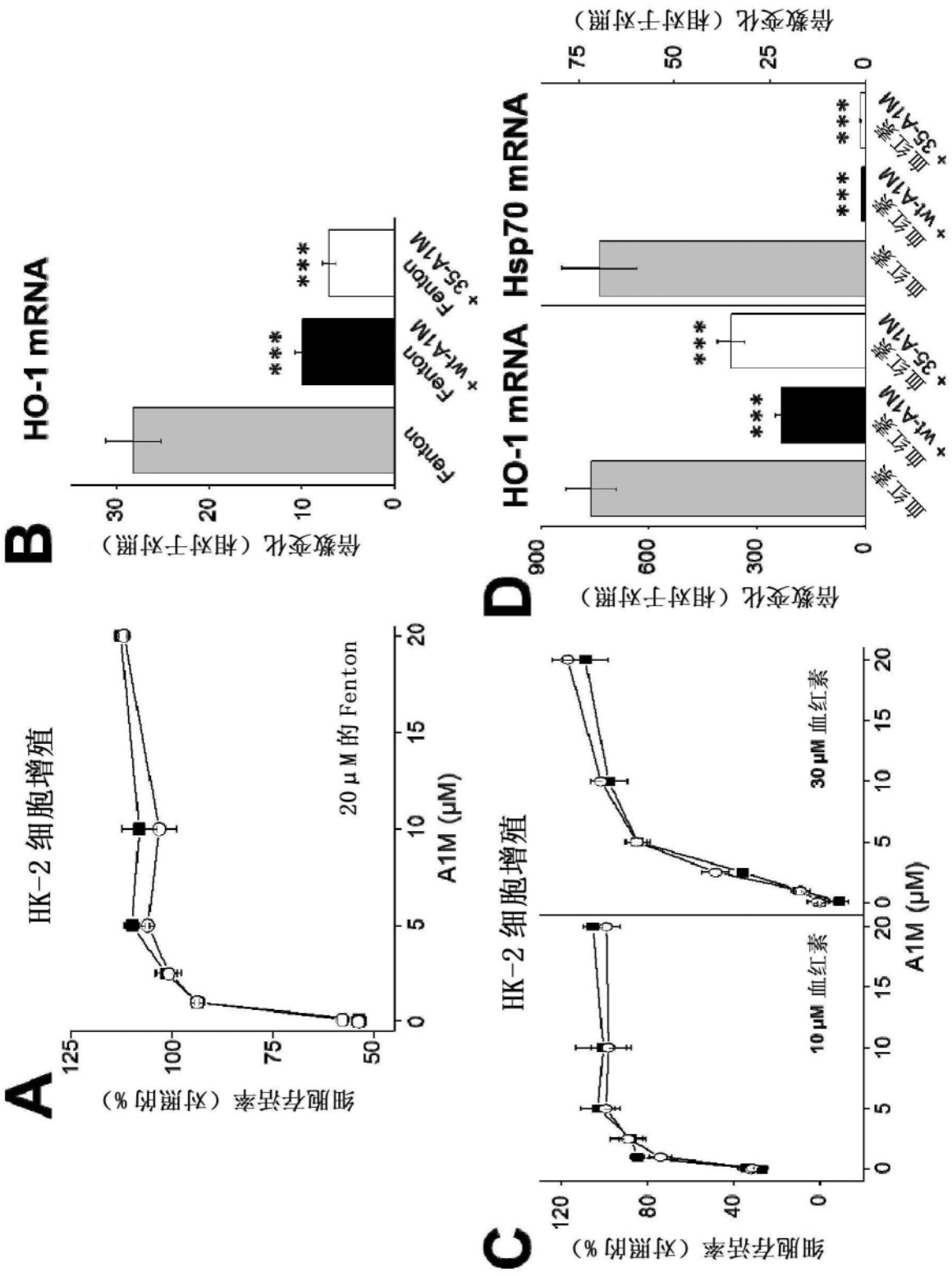

A
HK-2 细胞增殖
细胞存活率（对照的 %）
20 μ M 的 Fenton
A1M (μM)
B
HO-1 mRNA
倍数变化（相对于对照）
Fenton
Fenton + Wt-A1M
Fenton + 35-A1M
***
C
HK-2 细胞增殖
细胞存活率（对照的 %）
10 μM 血红素
30 μM 血红素
A1M (μM)
D
HO-1 mRNA
Hsp70 mRNA
倍数变化（相对于对照）
血红素
血红素 + Wt-A1M
血红素 + 35-A1M
***

图14

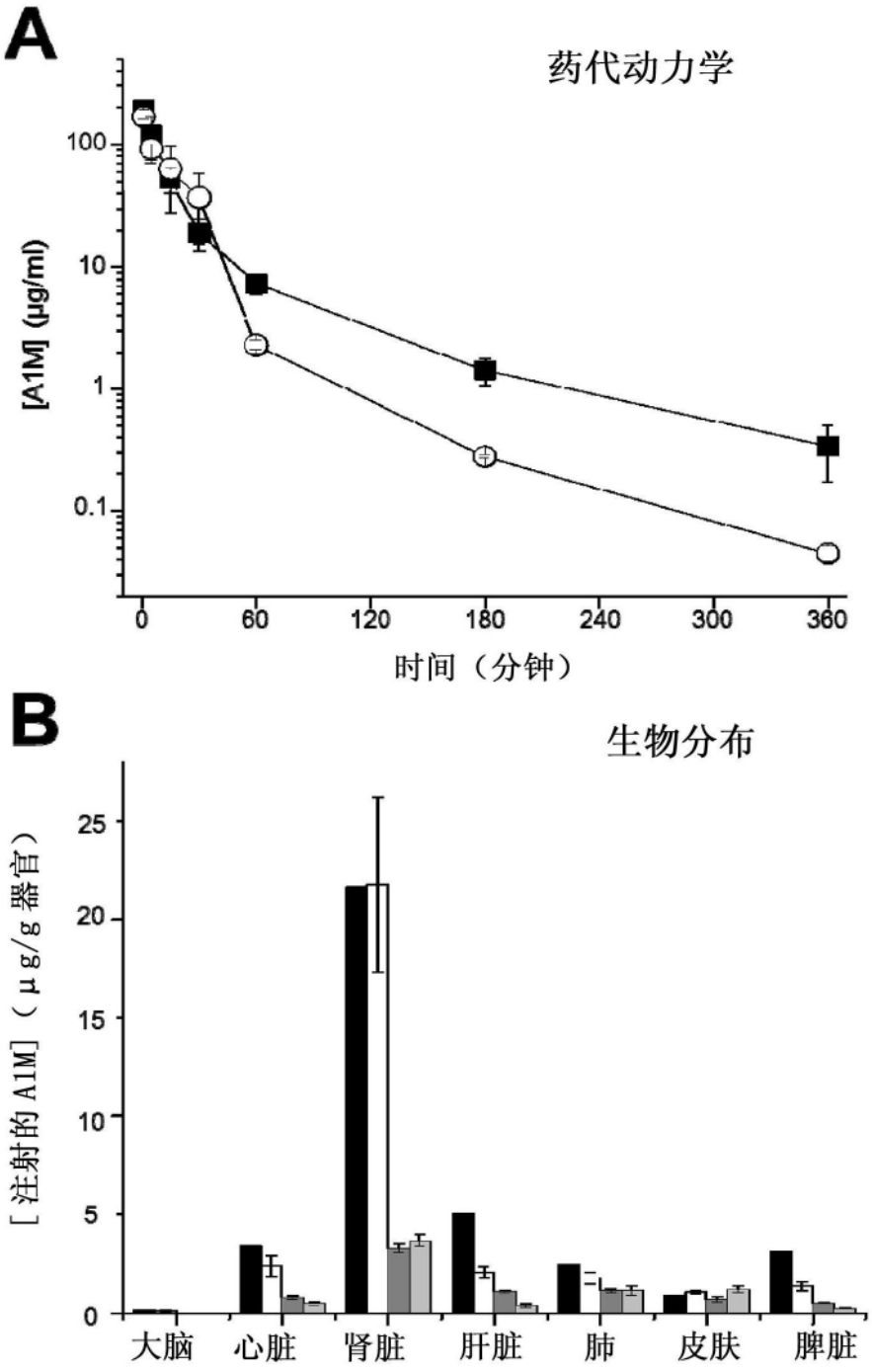

A
药代动力学
[A1M] (μg/ml)
100
10
1
0.1
0
60
120
180
240
300
360
时间（分钟）
B
生物分布
[注射的 A1M]（μg/g 器官）
25
20
15
10
5
0
大脑
心脏
肾脏
肝脏
肺
皮肤
脾脏

图15

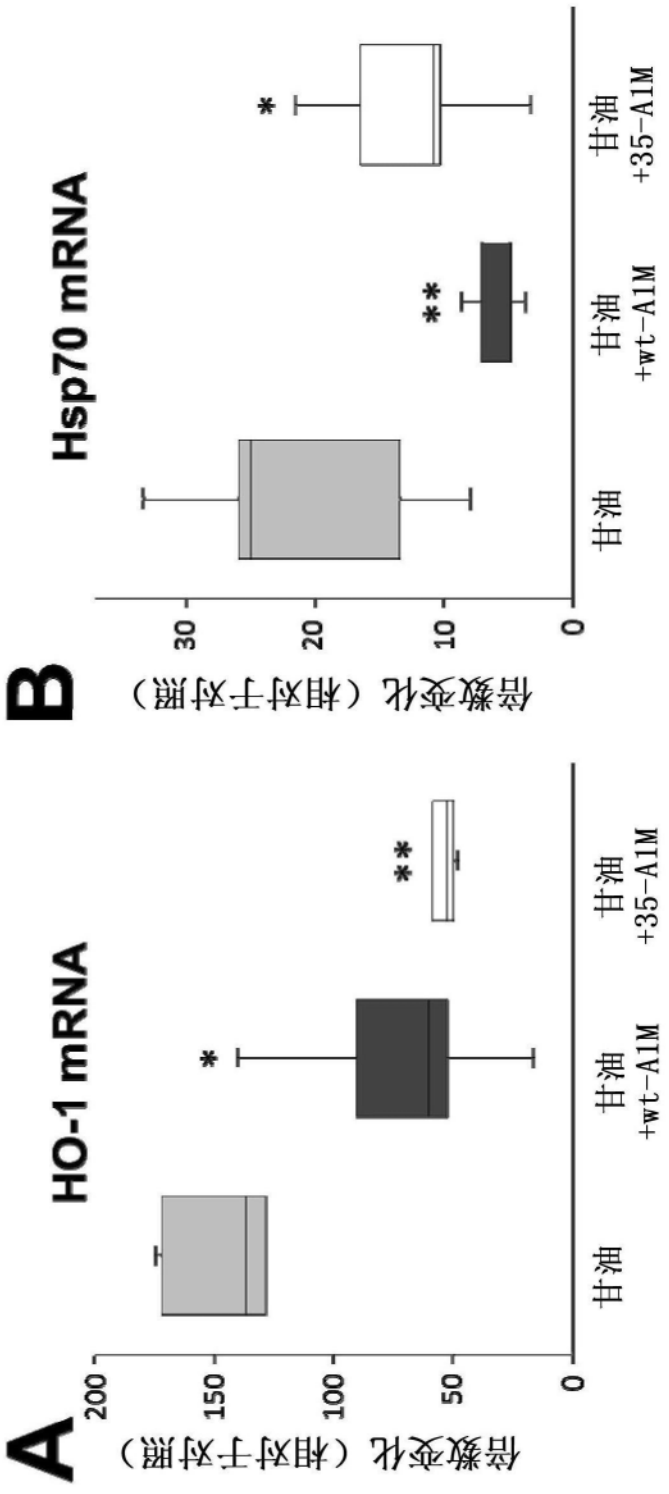

A
HO-1 mRNA
倍数变化（相对于对照）
200
150
100
50
0
*
**
甘油
甘油 +wt-A1M
甘油 +35-A1M
B
Hsp70 mRNA
倍数变化（相对于对照）
30
20
10
0
**
*
甘油
甘油 +wt-A1M
甘油 +35-A1M

图16