



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1997741 B

(45) 授权公告日 2012.08.22

(21) 申请号 200580018846.7

A61P 27/14 (2006.01)

(22) 申请日 2005.04.07

A61P 37/08 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 14/435 (2006.01)

116089/2004 2004.04.09 JP

C07K 16/18 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C12N 1/19 (2006.01)

2006.12.08

C12N 1/21 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

C12N 5/10 (2006.01)

PCT/JP2005/007191 2005.04.07

C12P 21/02 (2006.01)

(87) PCT申请的公布数据

G01N 33/53 (2006.01)

W02005/097996 JA 2005.10.20

C12P 21/08 (2006.01)

(73) 专利权人 日本全药工业株式会社

(56) 对比文件

地址 日本福岛县

Shumann R. J. et al.. Characterization of house dust mite and scabies mite allergens by use of canine serum antibodies. 《Am. J. Vet. Res.》. 2001, 第 62 卷 (第 9 期), 1344-1348.

(72) 发明人 津久井利广 辻本元 岩渊成紘

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

审查员 于婷

代理人 李波 梁谋

(51) Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61P 11/02 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

A61P 17/04 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 15 页

序列表 21 页 附图 14 页

(54) 发明名称

新的螨变应原

(57) 摘要

安全和有效的不含诱导过敏的杂质的变应原,其作为螨变态反应性疾病的治疗剂或诊断剂。提供了以下重组蛋白:(a)由 SEQ ID NO:2 或 35 所示氨基酸序列组成的蛋白;或 (b)包含通过对 SEQ ID NO:2 或 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列的蛋白,其具有螨变应原活性。

1. 由 SEQ ID NO :35 所示氨基酸序列组成的重组螨变应原。
2. 编码由 SEQ ID NO :35 所示氨基酸序列组成的螨变应原的 DNA。
3. 由 SEQ ID NO :34 所示核苷酸序列组成的 DNA。
4. 表达载体,其包含权利要求 2 或 3 的 DNA。
5. 融合蛋白,其由权利要求 1 的螨变应原和另一种蛋白组成。
6. 用权利要求 4 的表达载体转化的细菌、酵母、昆虫或动物细胞。
7. 生产重组螨变应原的方法,该方法包括在可以表达基因的条件下培养权利要求 6 的细菌、酵母、昆虫或动物细胞,导致细胞产生重组螨变应原,然后收获重组螨变应原。
8. 生产重组螨变应原的方法,该方法包括在可以表达基因的条件下培养权利要求 6 的细菌、酵母、昆虫或动物细胞,导致细胞产生融合重组螨变应原,收获融合重组螨变应原,然后除去与变应原融合的另一蛋白。
9. 螨变态反应性疾病的诊断剂,其含有权利要求 1 的重组螨变应原或权利要求 5 的融合蛋白作为活性成分。
10. 抗权利要求 1 的螨变应原的抗体。
11. 权利要求 10 的抗螨变应原的抗体,其是单克隆抗体。
12. 杂交瘤,其产生权利要求 11 的单克隆抗体。
13. 屋尘中的螨变应原的免疫测定方法,其使用权利要求 10 或 11 的抗体。
14. 权利要求 13 的屋尘中的螨变应原的免疫测定方法,其是 ELISA 法。

新的螨变应原

技术领域

[0001] 本发明涉及具有变应原活性的重组螨变应原,具体涉及导致狗特应性的螨变应原。本发明进一步涉及编码变应原的基因、使得基因能够表达的表达载体、通过用表达载体转化获得的转化体、制备重组螨变应原的方法、螨变态反应性疾病的治疗剂,和螨变态反应性疾病的诊断剂。

背景技术

[0002] 已知屋尘螨是诸如特应性皮炎和支气管哮喘的变态反应性疾病的主要原因。常规地,使用变态反应的致病物质作为治疗剂的脱敏治疗被认为是最重要的基本治疗方法。具体地,对诸如花粉病、屋尘螨变态反应和真菌性变态反应的疾病广泛进行了脱敏治疗,这些疾病是难以避免的诸如吸入的变应原的抗原诱导的。但是,由于致敏抗原的作用,脱敏治疗涉及过敏的危险,因此,需要施用安全的治疗性抗原。正在研究所述安全的致敏抗原。

[0003] 至于螨变态反应性疾病,报道了两种类型的螨,即屋尘螨 (*Dermatophagoides pteronyssinus*) 和粉尘螨 (*Dermatophagoides farinae*) 是屋尘中的变应原来源 (参见非专利文件 1 和 2)。从这些螨分离了主要的螨变应原。已知这些螨变应原是分子量为 24kD-28kD 的糖蛋白 (pI 4.6-7.2) 和 / 或包含在螨排泄物中的分子量为 14.5kD-20kD 的蛋白 (pI 5-7.2) 和 / 或螨体 (参见非专利文件 3-7)。

[0004] 至于螨变应原基因,克隆了屋尘螨的主要变应原 Der p1 (分子量:25,371) 和 Derp2 (分子量:14,131) 以及粉尘螨的主要变应原 Der f1 (分子量:25,191) 和 Der f2 (分子量:14,021),也确定了它们的核苷酸序列 (参见非专利文件 8-15)。也制备了基于这些变应原的重组变应原,进行了涉及这些变应原的研究。此外,也报道了 Der f3,即一种分子量为大约 30,000 的变应原的核苷酸序列 (参见非专利文件 16)。此外,作为螨变应原,也报道了 ma10、ma3、ma15、ma29、ma44、ma50、ma113、ma114 和 ma115 (参见专利文件 1)。此外,也报道了表现与抗 -Der f2 血清的强交叉反应性的 ma124 (参见专利文件 2)。

[0005] 此外,报道了 98-kDa Der f15、109-kDa Der f15 (参见非专利文件 17) 和 60-kDa Der f18 (参见非专利文件 18) 在狗中是与 IgE 强反应的变应原。

[0006] 作为诊断螨变态反应性疾病的方法,常规将皮内反应测试作为主流方法,该方法基于患者的病史,并且使用屋尘螨提取物和 / 或螨体提取物。该方法与涉及血清 IgE 抗体滴度 (相对值) 测量的 RAST (放射变应原吸附测试) 方法、吸入诱导测试和鼻粘膜刺激测试等组合。但是,直接诊断螨变态反应性疾病仍然非常困难。

[0007] 常规进行了支气管哮喘的脱敏治疗方法,该方法采用屋尘提取物和屋尘螨作为特异性变应原。但是,还没有成功分析屋尘的组成。此外,屋尘含有很多类型的可以诱导过敏的杂质。因此,在这些情况下,屋尘的剂量是非常有限的。因此,常规脱敏治疗的效果是非常低水平的。因此,需要用于脱敏治疗的更有效和更安全的抗原。公知的是有效用于脱敏治疗的变应原存在于螨的高分子量粗排泄物的级份中。由这些级份,不能获得足够用于脱敏治疗的量的螨变应原。因此,采用涉及从通过饲养螨获得的产物提取和纯化螨变应原的

方法,获得用于治疗的原的稳定供应是困难的。此外,如上文的描述,常规报道了用基因重组技术制备多种重组螨变应原。但是,不能说这些变应原对于实际治疗总是有效的。需要提供具有更有效的、新的和更高的螨变应原活性的重组螨变应原。

- [0008] 专利文件 1 日本专利公开 (Kokai)No. 7-112999 A(1995)
- [0009] 专利文件 2 日本专利公开 (Kokai)No. 7-278190 A(1995)
- [0010] 非专利文件 1 Allerg. Asthma, 10, 329-334 (1964)
- [0011] 非专利文件 2 J. Allergy, 42, 14-28 (1968)
- [0012] 非专利文件 3 J. Immunol., 125, 587-592 (1980)
- [0013] 非专利文件 4 J. Allergy Clin. Immunol., 76, 753-761 (1985)
- [0014] 非专利文件 5 Immunol., 46, 679-687 (1982)
- [0015] 非专利文件 6 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 81, 214-223 (1986)
- [0016] 非专利文件 7 J. Allergy Clin. Immunol., 75, 686-692 (1985)
- [0017] 非专利文件 8 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 85, 127-129 (1988)
- [0018] 非专利文件 9 J. Exp. Med., 167, 175-182 (1988)
- [0019] 非专利文件 10 J. Exp. Med., 170, 1457-1462 (1989)
- [0020] 非专利文件 11 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 118-123 (1990)
- [0021] 非专利文件 12 Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 91, 124-129 (1990)
- [0022] 非专利文件 13 Jpn. J. Allergol., 39, 557-561 (1990)
- [0023] 非专利文件 14 Clinical and Experimental Allergy, 21, 25-32 (1991)
- [0024] 非专利文件 15 Clinical and Experimental Allergy, 21, 33-37 (1991)
- [0025] 非专利文件 16 FEBS Lett., 377, 62-66 (1995)
- [0026] 非专利文件 17 Vet. Immunol. Immunopathol, 78, 231-247 (2001)
- [0027] 非专利文件 18 J. Allergy Clin. Immunol, 112, 79-86 (2003)

发明内容

[0028] 本发明的一个目的是提供不含诱导过敏的杂质的安全和有效的重组螨变应原,作为螨变态反应性疾病的治疗剂或诊断剂。更具体地,本发明的目的是提供来源于螨体的基因,并且提供使得基因能够表达的表达载体。本发明的另一目的是提供具有变应原活性的新的螨变应原,其是通过表达来源于螨体的基因而获得的。本发明的进一步的目的是提供含有重组螨变应原作为活性成分的螨变态反应性疾病的新治疗剂,并且提供含有重组螨变应原的螨变态反应性疾病的新诊断剂。

[0029] 作为广泛研究以实现上述目的结果,发明人发现了新的螨变应原,并且发现该变应原在脱敏治疗中发挥极佳的作用。因此,发明人完成了本发明。

[0030] 具体地,本发明的描述如下:

[0031] 以下重组螨变应原 (a) 或 (b):

[0032] (a) 包含 SEQ ID NO:2 或 35 所示氨基酸序列的重组螨变应原;或

[0033] (b) 包含通过对 SEQ ID NO:2 或 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列,并且具有螨变应原活性的重组螨变应原。

[0034] 编码以下螨变应原 (a) 或 (b) 的基因:

- [0035] (a) 包含 SEQ ID NO:2 或 35 所示氨基酸序列的螨变应原 ;或
- [0036] (b) 包含通过对 SEQ ID NO:2 或 35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的氨基酸序列,并且具有螨变应原活性的螨变应原。
- [0037] 包含以下 DNA(c) 或 (d) 的基因 :
- [0038] (c) 包含 SEQ ID NO:1 或 34 所示核苷酸序列的 DNA ;或
- [0039] (d) 在严格条件下与包含特定序列的 DNA 杂交,并且编码具有螨变应原活性的蛋白的 DNA,所述特定序列与包含 SEQ ID NO:1 或 34 所示核苷酸序列的 DNA 的序列互补。
- [0040] 根据 [1] 的螨变应原的片段肽。
- [0041] 根据 [4] 的片段肽,其包含含有 SEQ ID NO:3-SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列中的至少一个序列的氨基酸序列。
- [0042] 螨变应原的片段基因,其编码 [4] 或 [5] 的片段肽。
- [0043] 重组载体,其包含 [2] 或 [3] 的基因或 [6] 的片段基因。
- [0044] 融合蛋白,其由 [1] 的螨变应原和另一种蛋白组成。
- [0045] 用 [7] 的表达载体转化的细菌、酵母、昆虫或动物细胞。
- [0046] 生产重组螨变应原的方法,该方法包括在可以表达基因的条件下培养 [9] 的细菌、酵母、昆虫或动物细胞,导致细胞产生重组螨变应原,然后收获重组螨变应原。
- [0047] 生产重组螨变应原的方法,该方法包括在可以表达基因的条件下培养 [9] 的细菌、酵母、昆虫或动物细胞,导致细胞产生融合重组螨变应原,收获融合重组螨变应原,然后除去与变应原融合的另一种蛋白。
- [0048] 螨变态反应性疾病的治疗剂,其含有 [1] 的重组螨变应原、[4] 的片段肽或 [8] 的融合蛋白作为活性成分。
- [0049] 螨变态反应性疾病的诊断剂,其含有 [1] 的重组螨变应原、[4] 的片段肽或 [8] 的融合蛋白作为活性成分。
- [0050] 抗 [1] 的螨变应原的抗体。
- [0051] 根据 [14] 的抗螨变应原的抗体,其是单克隆抗体。
- [0052] 杂交瘤,其产生 [15] 的单克隆抗体。
- [0053] 屋尘中的螨变应原的免疫测定方法,其使用 [14]-[16] 的任意一项的抗体。
- [0054] 根据 [17] 的屋尘中的螨变应原的免疫测定方法,其是 ELISA 法。
- [0055] 说明书包括了本申请的优先权文件日本专利申请 No. 2004-116089 的说明书和 / 或附图中公开的部分或所有内容。

附图说明

- [0056] 图 1 是表示重组狗 Fc ϵ RI α 链的电泳结果的照片。
- [0057] 图 2 是表示重组狗 Fc ϵ RI α 链与 IgE 的结合的照片。
- [0058] 图 3 显示检测粉尘螨特异性 IgE 的结果。
- [0059] 图 4 是显示用重组狗 Fc ϵ RI α 链进行 Western 印迹分析的结果的照片。
- [0060] 图 5 是显示从粉尘螨提取的抗原的 2-D(二维)电泳图样的照片。
- [0061] 图 6 显示的照片显示了粉尘螨变应原蛋白的 2-D(二维)电泳和 Western 印迹分析的结果。

- [0062] 图 7-1 显示了 Zen1 基因的部分核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0063] 图 7-2 显示了 Zen1 基因的部分核苷酸序列和氨基酸序列（续图 7-1）。
- [0064] 图 8-1 显示了 Zen1 基因的全长 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列。
- [0065] 图 8-2 显示了 Zen1 基因的全长 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列（续图 8-1）。
- [0066] 图 8-3 显示了 Zen1 基因的全长 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列（续图 8-2）。
- [0067] 图 8-4 显示了 Zen1 基因的全长 cDNA 核苷酸序列和氨基酸序列（续图 8-3）。
- [0068] 图 9 是显示用大肠杆菌制备然后纯化的重组 Zen1 的 SDS-PAGE 结果的照片。
- [0069] 图 10 是显示通过抗 Zen1 多克隆抗体的 Western 印迹分析的反应结果的照片。泳道 1 显示重组 Zen1 的结果，用的 2 显示螨体的结果。
- [0070] 图 11 是显示 ELISA 分析的重组 Zen1 与 IgE 的反应性结果的照片。
- [0071] 实施本发明的最佳方式
- [0072] 下面详细描述本发明。
- [0073] (1) 分离螨变应原 Zen1 蛋白和确定其部分序列
- [0074] 用获自临床诊断为具有螨变态反应的动物的螨变应原特异性 IgE 确定螨变态反应。具体地，用含有例如螨变应原特异性 IgE、螨提取物、识别病原体特异性 IgE 的 IgE 受体的血清，通过 Western 印迹鉴定螨变应原。可以通过公知的方法鉴定变应原。
- [0075] 由此鉴定的本发明的新的螨变应原是一种 Zen1 蛋白，分子量为 150kDa-200kDa。
- [0076] 可以通过进行电泳，然后从螨变应原斑点提取螨变应原而分离鉴定的螨变应原。此时，需要进行 2-D（二维）电泳，以便与其它蛋白完全分离。
- [0077] 用由此提取的螨变应原，可以通过公知的方法确定部分序列。公知的确定部分序列的方法的实例包括基于 MS/MS 和肽作图的从头测序。
- [0078] (2) 通过 RT-PCR 制备 cDNA 克隆
- [0079] 可以通过从螨提取 mRNA，用 mRNA 作模板合成螨变应原 cDNA，构建 cDNA 文库，然后筛选靶，获得编码本发明的螨变应原的 DNA。
- [0080] 所述 mRNA 的供应源是螨体，螨优选是粉尘螨、屋尘螨等，它们是屋尘螨。但是，其实例不限于此。通过常用技术可以制备所述 mRNA。由此获得的 mRNA 作为模板，基于上文 (1) 中获得的序列信息设计引物，然后合成编码螨变应原的 cDNA 片段。将由此获得的片段亚克隆到合适的载体如 pGEM（由 Promega 生产）。然后通过诸如循环测序方法的标准方法确定核苷酸序列。
- [0081] SEQ ID NOS :3-19 示出了本发明的螨变应原的部分氨基酸序列。其中，通过从头测序确定了 SEQ ID NOS :3-7 中所示的序列。N 末端氨基酸序列示于 SEQ ID NO :19。通过肽作图确定了 SEQ ID NOS :8-18 中所示的序列。
- [0082] 本发明包括螨变应原，它包含的氨基酸序列包含至少一个 SEQ ID NOS :3-19 所示的氨基酸序列，这些序列代表作为螨变应原的 Zen1 蛋白的片段。
- [0083] 编码作为本发明的螨变应原的 Zen1 蛋白的 Zen1 基因的 DNA 的部分核苷酸序列示于 SEQ ID NO :1，其全长核苷酸序列示于 SEQ ID NO :34。作为本发明的螨变应原的 Zen1 蛋白的部分氨基酸序列示于 SEQ ID NO :2，其全长氨基酸序列示于 SEQ ID NO :35。
- [0084] 只要包含所述氨基酸序列的蛋白具有螨变应原活性，在氨基酸序列中可以发生至少一个，优选一个或几个氨基酸的缺失、取代或添加。

[0085] 例如,可以缺失 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列的至少一个,优选一个或几个(如 1-10,进一步优选 1-5 个)氨基酸。可以在 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列中添加至少一个,优选一个或几个(如 1-10,进一步优选 1-5 个)氨基酸。或者,可以用其它氨基酸取代 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列中的至少一个,优选一个或几个(如 1-10,进一步优选 1-5 个)氨基酸。

[0086] 通过对 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的所述氨基酸序列包括与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列具有至少 85%或更多,优选 90%或更多,进一步优选 95%或更多,特别优选 97%或更多同源性的序列,所述同源性例如是用 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information),采用最初设置的缺省参数计算的。

[0087] 具有通过对 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列缺失、取代或添加一个或几个氨基酸而得到的所述氨基酸序列的蛋白与具有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:35 的氨基酸序列的蛋白基本相同。

[0088] 此外,本发明的基因的实例也包括能够在以下条件下与包含特定序列的 DNA 杂交,并且编码具有蠕变应原活性的蛋白的 DNA,所述特定序列与具有上述 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:34 所示 DNA 序列的基因的序列互补。具体地,所述条件使得能够用固定了 DNA 的滤器在 68°C 下 0.7M-1.0M NaCl 存在下杂交,并且在 68°C 下用 0.1-2×SSC 溶液(1×SSC 包含 150mM NaCl 和 15mM 柠檬酸钠)洗涤,从而进行鉴定。或者,本发明的基因是当通过 Southern 印迹方法转移并固定在硝酸纤维素膜上,然后 42°C 下在杂交缓冲液(50% 甲酰胺,4×SSC,50mM HEPES(pH 7.0),10×Denhardt's 溶液,和 100 μg/ml 鲑鱼精子 DNA)中反应过夜时能形成杂交体的 DNA。

[0089] 此外,本发明还包括相应于上述 DNA 的 RNA,或能够在严格条件下与该 RNA 杂交,并且编码具有蠕变应原活性的蛋白的 RNA。

[0090] 可以通过将本发明的基因连接(插入)到合适的载体中而获得本发明的重组载体。用于插入本发明的基因的载体不是特别限定的,只要它们能够在诸如细菌、酵母或动物细胞的宿主中复制。所述载体的实例包括质粒 DNA 和噬菌体 DNA。用于构建表达载体的载体 DNA 是广泛普及并且容易获得的。所述载体 DNA 的实例包括 pUC19 和 pTV118 N(由 Takara Shuzo 生产)、pUEX2(由 Amersham 生产)、pGEX-4T,和 pKK233-2(由 Pharmacia 生产),以及 pMAM-neo(由 Clontech 生产)。

[0091] 构建本发明的所述表达载体的方法并不受到特别的限制,并且可以根据标准方法进行。例如,可以将 EcoRI 消化的蠕变应原 cDNA 片段插入质粒 pUC19 多克隆位点中的 EcoRI 位点。此外,可以将该片段连接于质粒载体 pGEX-4T 的 EcoRI 位点,使得能够获得表达载体。

[0092] 用本发明的所述表达载体转化的细菌、酵母或动物细胞不受特别的限制,只要它们能够表达本发明的基因。所述细菌的实例包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。所述酵母的实例包括啤酒糖酵母等。所述动物细胞的实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、Sf21 和 Sf9 细胞,它们是 *Mamestra brassicae* 卵巢细胞、猴 COS 细胞和小鼠成纤维细胞。

[0093] 本发明的重组蠕变应原的实例包括直接表达的蠕变应原和表达为与其它蛋白的融合蛋白的那些。下文中,所述融合蛋白称作融合重组蠕变应原。形成所述融合蛋白的其

它蛋白的实例包括,但不特别限定于 β -半乳糖苷酶、谷胱甘肽 S- 转移酶、蛋白 A 和麦芽糖结合蛋白。

[0094] 本发明的重组螨变应原也可能是仅仅由对变应原活性关键的区域组成的肽片段或包含对变应原活性关键的地方的肽片段。此外,除了通过表达单独的螨变应原蛋白获得的产物,可以通过除去其它蛋白,从表达为融合蛋白的产物获得所述重组螨变应原。

[0095] 具体地,通过表达来源于螨体的基因获得本发明的重组螨变应原,它是具有螨变应原活性的蛋白。此处,“具有螨变应原活性”是指能够在哺乳动物中诱导变态反应。

[0096] 可以通过以下方法生产本发明的螨变应原。在完成上述转化株的培养后,收获微生物体,悬浮于含有多重蛋白酶抑制剂的缓冲液中,然后通过超声处理进行破碎。用含有诸如苯基甲磺酰氟、一碘乙酸、抑胃酶肽 A 或乙二胺四乙酸的蛋白酶抑制剂和诸如十二烷基硫酸钠 (SDS)、triton X-100 或 Nonidet P40 的表面活性剂的缓冲液提取细胞碎屑中的定位于膜的蛋白。通过采用固定的谷胱甘肽的亲合层析、采用固定的抗螨抗体的亲和层析等,纯化从提取物或培养物浓度物获得的由螨变应原和谷胱甘肽 S- 转移酶组成的融合蛋白。此外,固定了谷胱甘肽的载体是由 Pharmacia 生产的载体。此外,固定了抗螨抗体的载体是通过将兔抗螨抗体与活化的 Tresyl 载体 (如, Tresyl GM 凝胶 (由 Kurita Water Industries 生产), Tresyl Toyopearl (由 Tosoh 生产) 和 Tresyl sepharose (由 Pharmacia 生产)) 共价结合而制备的载体。此外,可以获得由螨变应原和 His 标志 (如 6×His) 组成的融合蛋白,然后用固定了金属的亲合珠等进行纯化。

[0097] 用蛋白酶消化纯化的融合重组螨变应原,然后通过单个或组合的公知纯化方法进行分级分离,同时用 ELISA 和螨变态反应性疾病的患者的白细胞组胺释放测定 (Allergy 37, 725 (1988)) 进行监测,所述纯化方法包括凝胶过滤层析、超滤、离子交换层析、亲和层析、疏水层析、层析聚焦、等电聚集法和凝胶电泳法。

[0098] 本发明还包括含有螨变应原作为活性成分的螨变态反应性疾病治疗剂。所述治疗剂用作多种类型的螨变态反应性疾病的治疗剂。此处,“螨变态反应性疾病”包括所有由螨特异性抗原导致的变态反应性疾病,如特应性支气管哮喘、变态反应性鼻炎、变态反应性结膜炎和特应性皮炎。

[0099] 可以通过例如以下方法制备本发明的螨变态反应性疾病的治疗剂:干燥通过上述方法纯化的重组螨变应原或其片段肽,收获粉末形式的所述变应原或片段肽,然后制备螨变态反应性疾病的治疗性脱敏剂。但是,该方法不特别限于此。当将本发明的螨变态反应性疾病的治疗剂用作治疗性脱敏剂时,可以直接使用该试剂,或如果必要,用作通过标准方法提供的与通常使用的佐剂和多种添加剂的联合药物,所述佐剂和多种添加剂如稳定剂、赋形剂、增溶剂、乳化剂、缓冲剂、润滑剂、防腐剂和着色剂。例如,将粉末形式的纯化的重组螨变应原溶解于补加了苯酚的生理盐水中,然后用作抗原的储液,用于脱敏治疗。

[0100] 可以通过常规施用途径,如经皮、口服、皮内、皮下、肌内和腹膜内施用方法施用本发明的螨变态反应性疾病的治疗剂。此外,本发明的治疗剂也可以用于经皮或经粘膜药物,如锭剂、舌下含片、滴眼液、鼻内喷雾剂、泥敷剂、乳膏和洗剂。此外,施用本发明的螨变态反应性疾病的治疗剂的剂量和施用次数可以根据施用途径、症状等进行合适的选择,使得对于成人,剂量在每次施用大约 20 μ g 或更少的范围内。每周一次或几次进行施用。

[0101] 此外,本发明的螨变态反应性治疗剂不仅用作抗螨变态反应性疾病的治疗剂,也

可以用作抗该疾病的预防剂。此外,本发明的螨变态反应性疾病治疗剂可以安全用于人体,而不产生过敏诱导作用。

[0102] 本发明的螨变态反应性诊断剂用作诊断抗螨变态反应性疾病的皮内反应的试剂或诊断螨变态反应的滴定剂。当将诊断剂用作诊断皮内反应的诊断剂时,通过制备通过根据标准方法的上述方法纯化的重组螨变应原或其片段肽而获得该试剂。例如,将重组螨变应原干燥并制成粉末,将粉末溶解并稀释于含有苯酚的生理盐水,然后使用。采用诊断剂作为诊断皮内反应的试剂的方法是根据标准方法使用的。

[0103] 此外,当将诊断剂用作诊断螨变态反应的滴定剂时,类似地通过标准方法制备该试剂。例如,将重组螨变应原或其片段肽合适地溶解并稀释于 Hank' s 缓冲液,将得到的溶液用作组胺释放滴定试剂。该方法通常是通过以下程序进行的。具体地,将螨变态反应性疾病患者的血液或通过离心从患者血液获得的血细胞级份悬浮于缓冲液中。用重组螨变应原作为滴定剂,对固定量的血细胞悬浮液进行滴定。用 HPLC 测量通过变应原刺激从嗜碱性细胞释放的组胺量 [Allergy 37,725(1988)]。

[0104] 在组胺释放滴定中,基于最大释放量的 50% (滴定曲线的反曲点) 确定组胺的释放量。具体地,该滴定的特征在于:(1) 根据血细胞悬浮液的滴度直接测量患者的变应原敏感性;和(2) 在将血浆与重组螨变应原预反应后,通过用反应溶液对血细胞进行滴定获得的值(血液滴定曲线值)通常高于通过用重组螨变应原对血细胞悬浮液进行滴定获得的值(血细胞悬浮液滴定曲线值)。这是由于血浆中能够中和变应原的 IgG 抗体(封闭抗体)的存在。因此,可以根据血液滴定曲线从血细胞悬浮液滴定曲线偏移的程度获得封闭抗体滴度。变应原敏感性和该封闭抗体滴度使得能够实现准确的螨变态反应诊断。该组胺释放滴定测试也可以用于监测脱敏治疗的效果。

[0105] 本发明也包括抗本发明的螨变应原的抗体或其片段肽。所述抗体可以通过公知方法作为多克隆抗体或单克隆抗体获得。所述抗体可以用于测量屋尘中螨变应原的存在、不存在等。所述测量可以用公知的免疫学方法如 ELISA 进行。在所述测量后,从屋尘中提取蛋白,然后测量。

[0106] 此外,表达了本发明的重组螨变应原蛋白。通过用如此表达的重组蛋白进行测试,如特异性 IgE 反应测试或用螨变态反应患者狗进行的皮内反应测试,可以证实本发明的螨变应原蛋白的变应原蛋白功能。

[0107] 将在下面的实施例中进一步描述本发明。这些实施例不意欲限制本发明的范围。

[0108] 此外,除非特别指出相反的意思,用于每个实施例的试剂是从 Nacalai Tesque, Wako Pure Chemical Industries, Sigma, Difco 等购买的商业化试剂。此外,用于基因工程的试剂,如限制酶,是从 Takara Shuzo, Toyobo, Invitrogen 等购买的,然后根据制造商的说明书进行使用。

[0109] [实施例 1] 建立 IgE 检测系统

[0110] 通过 PCR 扩增狗高亲和力 IgE 受体 α 链 (Fc ϵ RI α) cDNA 的细胞外区,排除其信号肽位点,并且加入了限制酶 EcoR I 和 Xho I 位点。用 T4-DNA 连接酶将所得物连接到大肠杆菌表达质粒载体 pGEX4T-1 (由 Amersham Biosciences 生产) 的 EcoR I 和 Xho I 位点。用由此获得的重组质粒转化大肠杆菌 TOP10 菌株 (由 Invitrogen 生产)。在含有氨苄青霉素 (100 μ g/mL) 的 LB 培养基中将转化的菌株 37°C 下培养过夜。随后,在新的 LB 培养基上传代

培养小量菌株,直到 600nm 处的 OD 值达到 1.0。随后,添加 IPTG(异丙基- β -D-半乳糖苷),达到 1mM 的终浓度。3 小时后,收获细胞,然后用 PBS(pH7.4)清洗一次。通过在 PBS(pH7.4)中超声处理而裂解再次收获的细胞,通过离心除去不溶的级份,然后收集含有与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合狗 Fc ϵ RI α 的可溶级份。随后,用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 柱(由 Amersham Biosciences 生产)从可溶级份获得与 GST 融合的狗 Fc ϵ RI α 。从 10 升培养溶液获得 1.0mg 融合蛋白(GST-Fc ϵ RI α)。证实了获得的纯化 GST-Fc ϵ RI α 在 SDS-PAGE 后显示出单个 45kDa 的条带(图 1)。将重组的狗 IgE(由 BETHYL 生产)和纯化的狗 IgG 固定在免疫板(由 Nalge Nunc International 生产)上,采用从 1.0 μ g, 0.1 μ g, 0.05 μ g, 0.025 μ g, 0.0125 μ g, 以及然后 0.00625 μ g 的 2 倍系列稀释,以便证实纯化的 GST-Fc ϵ RI α 的反应性。证实了纯化的 GST-Fc ϵ RI α 与 IgE 反应,但不与 IgG 反应(图 2)。将从粉尘螨提取的 4.0 μ g 抗原(由 GREER 生产)固定在免疫板(由 Nalge Nunc International 生产)上。使粉尘螨阳性狗血清(通过用生理盐水稀释 50 倍的粉尘螨抗原溶液(由 GREER 生产)进行皮内反应证实为粉尘螨阳性的狗血清)与抗原反应。然后加入生物素标记的 GST-Fc ϵ RI α 。此外,基于添加过氧化物酶偶联的链亲和素(由 Jackson Immuno Research 生产)和底物导致的显色反应,证实了 GST-Fc ϵ RI α 链识别螨变应原特异性 IgE(图 2)。此外,将从粉尘螨提取的 4.0 μ g 抗原(由 GREER 生产)固定在免疫板(由 Nalge Nunc International 生产)上。使通过用提取自粉尘螨的抗原免疫而获得的狗血清与抗原反应。证实 GST-Fc ϵ RI α 不与 56℃ 下热处理 1 小时的粉尘螨阳性狗血清反应,也不与纯化的狗 IgG 反应,但与重组的狗 IgE(由 BETHYL 生产)反应。认为 GST-Fc ϵ RI α 识别变应原特异性 IgE(图 3)。在图 3 中,“-”表示血清没有在 56℃ 下处理 1 小时,“+”表示血清在 56℃ 下处理 1 小时,“cont.”表示未免疫的血清。

[0111] [实施例 2] 通过 Western 印迹分析螨的主要变应原

[0112] 用 8 只狗的血清和血浆样品进行 Western 印迹分析。这 8 只狗发生了特应性皮炎,并且诊断患有螨变态反应,该诊断是基于用从粉尘螨变应原(由 GREER 生产)提取的抗原溶液进行的皮内反应和采用实施例 1 中产生的重组狗 Fc ϵ RI α 链进行的 ELISA 法。将 β -巯基乙醇加入从粉尘螨提取的抗原的 100.0 μ L 溶液,达到 50.0 μ L/mL 的终浓度。加入 200 μ L 由此制备的 Laemmli 样品缓冲液(由 BIO-RAD 生产),然后 100℃ 下热处理 5 分钟。将所得物加样到凝胶浓度为 5%-20% 的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE;由 ATTO 生产)上,然后进行电泳。完成电泳后,将所得物转移到 PVDF 膜(Hybond-P;由 Amersham Biosciences 生产)。使膜在封闭溶液(补加了 5% 脱脂奶的 PBST(通过将 Tween20 添加到 PBS 中达到 0.1% 的终浓度而制备))中 4℃ 下静置过夜。在 PBST 中将膜清洗 10 分钟,在封闭溶液中将每份狗血清或血浆样品稀释 10 倍。将每个稀释的溶液样品加入到膜,然后在室温下反应 3 小时。用 PBST 清洗 3 次(每次 10 分钟)。用封闭溶液稀释生物素标记的狗 Fc ϵ RI α ,然后将稀释的溶液加入膜,随后在室温下反应 2 小时。用 PBST 清洗 3 次(每次 10 分钟),将用 PBST 稀释 10,000 倍的链亲和素-HRP 偶联物(由 Amersham Biosciences 生产)加入膜,然后室温下反应 1 小时。用 PBST 清洗 5 次(每次 10 分钟)后,将 ECL Plus Western 印迹检测系统(由 Amersham Biosciences 生产)的反应溶液加入到膜上,然后在室温下反应 5 分钟。然后,用 X 射线膜(Hyperfilm ECL;由 Amersham Biosciences 生产)检测信号。结果,在相应于分子量 150 kDa 的条带和相应于分子量 250kDa 的条带之间检测到了表

现强反应的蛋白(图4)。在图4中,用箭头表示的条带相应于表现出强反应,并且分子量为150kDa-250kDa的蛋白。在图4中,从1-8的数字分别表示8只狗,“ct.”表示阴性血清。

[0113] [实施例3] 通过2-D(二维)电泳分析螨变应原蛋白

[0114] 通过2-D(二维)电泳分离与IgE强反应的分子量为150kDa-250kDa的变应原蛋白。用Protean IEF细胞(由BIO-RAD生产)进行2-D(二维)电泳。将1.0mg从粉尘螨提取的抗原(由GREER生产)溶解于1.0mL的膨胀缓冲液(2-D起始试剂盒;由BIO-RAD生产)。在活性条件下(50V,20℃和12小时)用17cm长的IPG Ready strip凝胶(pH4-7;由BIO-RAD生产)和聚焦盘使300 μL由此获得的溶液膨胀。膨胀后,在以下条件下进行聚焦。首先,在步骤1(250V,20分钟,20℃)进行除去过量盐的程序。在步骤2,电压从250V升高到10,000V,共6小时。在步骤3,用10,000V的电压和总共60,000 Vh的电压时进行聚焦。在2-D(二维)电泳前,用SDS-PAGE平衡缓冲液I(6M尿素,0.375M Tris pH8.8,2% SDS,20%甘油,和2% (w/v) DTT;由BIO-RAD生产)将IPG ready strip凝胶轻柔振荡10分钟。随后,用SDS-PAGE平衡缓冲液II(6M尿素,0.375M Tris pH8.8,2% SDS,20%甘油,和2.5% (w/v) 碘乙酰胺;由BIO-RAD生产)进一步将凝胶轻柔振荡10分钟,从而进行平衡。用1% (v/w) 低熔点琼脂糖(由BIO-RAD生产)将平衡的IPG ready strip凝胶紧密附着于PII ready凝胶(8-16%;由BIO-RAD生产)。用40mA的恒定电流(起始电压是135V,最终电压是400V)电泳大约3小时。电泳后,用Bio-Safe(由BIO-RAD生产)对凝胶染色,由此可以对蛋白斑点进行图样分析(图5)。

[0115] [实施例4] 通过Western印迹分析而鉴定变应原斑点

[0116] 2-D(二维)电泳后,将蛋白斑点转移到PVDF膜(Hybond-P;由Amersham Biosciences生产)。使膜在封闭溶液(补加了5%脱脂奶的PBST(通过将Tween20添加到PBS中达到0.1%的终浓度而制备))中4℃下静置过夜。在PBST中将膜清洗10分钟,在封闭溶液中将狗血清或血浆样品稀释10倍。将由此稀释的溶液加入到膜,然后在室温下反应3小时。用PBST清洗3次(每次10分钟),用封闭溶液稀释生物素标记的狗FcεRIα。将稀释的生物素标记的狗FcεRIα加入膜,随后在室温下反应2小时。用PBST清洗3次(每次10分钟),将用PBST稀释10,000倍的链亲和素-HRP偶联物(由Amersham Biosciences生产)加入膜。室温下反应1小时。用PBST清洗5次(每次10分钟)后,将ECL Plus Western印迹检测系统(由Amersham Biosciences生产)的反应溶液加入到膜上,然后在室温下反应5分钟。用X射线膜(Hyperfilm ECL;由Amersham Biosciences生产)检测信号。结果,在pH约4.5,在相应于分子量150kDa的条带和相应于分子量250kDa的条带之间检测到了表现强反应的斑点。由此,获得了相应于本发明的变应原蛋白(Zen1)的斑点(图6)。在图6中:左上图6-1显示了粉尘螨的2-D(二维)电泳图样(pH4-7);右上图6-2显示了用发生特应性皮炎的狗患者的粉尘螨阳性血清进行的Western印迹分析(pH4-7)的结果;左下图6-3显示了粉尘螨的2-D(二维)电泳图样(pH3.9-5.1);右下图6-4显示了与2-D(二维)电泳图样相比,用发生特应性皮炎的狗患者的粉尘螨阳性血清进行的Western印迹分析(pH3.9-5.1)获得的反应斑点(斑点在图的上部表现为黑色的圆形斑点,并且用箭头表示)。用箭头表示的斑点观察到了强反应。

[0117] [实施例5] Zen1蛋白的蛋白组分析

[0118] 从凝胶上切下通过2-D(二维)电泳分离的Zen1蛋白斑点,然后进行MS/MS分析。

可以获得大量 MS/MS 数据,但是没有证实任何命中。对 5 种认为是新蛋白的肽进行了从头测序法,由此确定了氨基酸序列 (SEQ ID NOS :3-7) (表 1)。对这些氨基酸序列进行了 BLAST 检索,但没有获得明确的命中。

[0119] 表 1

[0120]	部分序列 415	: MKSLLNEANELLK
	部分序列 445	: SAQDVLEK
	部分序列 847	: FMQSLLNEADELLR
	部分序列 448	: LPDSDLKDELAK
	部分序列 491	: LPDSDLKNELA EK

[0121] 通过从头测序法确定的 Zen1 的部分氨基酸序列

[0122] [实施例 6] Zen1 蛋白的肽作图分析

[0123] 从凝胶上切下通过 2-D (二维) 电泳分离的 Zen1 蛋白斑点。制备肽图谱,然后进行 8 个峰的氨基酸测序。结果,确定了 11 个氨基酸片段的序列 (SEQ ID NOS :8-18) (表 2)。进行了 BLAST 检索,但没有获得明确的命中。

[0124] 表 2

[0125]	部分序列 21	: MYNFHLEAY
	部分序列 28	: IAHFLELE
	部分序列 32	: IAHFELE
	部分序列 23-1	: KFQSSLNEAN
	部分序列 23-2	: IAHLESE(T)
	部分序列 24	: KFQSSLN(E)A
	部分序列 22	: DAQLEXE
	部分序列 9-1	: SAQDVSL
	部分序列 9-2	: RNEMNE
	部分序列 20-1	: MFQSSLNKADFD
	部分序列 20-2	: DLARDVXL

[0126] 通过 Zen1 的肽作图获得的相应于峰的氨基酸序列

[0127] [实施例 7] 分析 Zen1 蛋白的 N-末端氨基酸序列

[0128] 从凝胶上切下通过 2-D (二维) 电泳分离的 Zen1 蛋白斑点。采用 HP G1005A 蛋白测序系统,通过标准方法确定 Zen1 蛋白的 N-末端氨基酸序列 (SEQ ID NO :19) (表 3)。对序列进行了 BLAST 检索,但没有获得明确的命中。

[0129] 表 3

[0130]	N-末端序列 : DNRDDVLKQTEE
--------	-----------------------

[0131] Zen1 N-末端氨基酸序列

[0132] [实施例 8] 提取螨总 RNA 和分离螨 poly(A)mRNA

[0133] 根据标准方法通过培养和生长粉尘螨而获得的未处理的螨体置于大约 2.0L 饱和盐溶液中。充分搅拌溶液,然后静置 30 分钟。用粗滤器撇出上清液中的螨体,用生理盐水

清洗,然后干燥。将 1.0g 蠕体进行总 RNA 提取,用 FastTrack 2.0 试剂盒(由 Invitrogen 生产),根据试剂盒的手册分离蠕 poly(A)mRNA。

[0134] [实施例 9] 合成蠕 cDNA

[0135] 用 100ng 实施例 8 中分离的蠕 poly(A)mRNA 作为模板,并且采用 cDNA 合成试剂盒(ReverTraAce- α -;由 Toyobo 生产),根据试剂盒的手册进行逆转录反应。

[0136] [实施例 10] 通过 PCR 扩增 Zen1 基因

[0137] 根据 Zen1 蛋白的 N-末端氨基酸序列,将引物 N-1(5'-GAYGAYGTNTTAAACARACNGAR GAR-3'(SEQ ID NO:20):Y = C 或 T,N = A 或 C 或 G 或 T,并且 R = A 或 G) 和 N-2(5'-GAY GAYGTN CTN AAR CAR ACN GAR GAR-3'(SEQ ID NO:21):Y = C 或 T,N = A 或 C 或 G 或 T,并且 R = A 或 G) 设计为有义引物。此外,根据作为反向引物的通过从头测序方法获得的氨基酸序列(表 4),设计 12 个引物(SEQ ID NOS:22-33)。采用作为模板的 1.0 μ g 实施例 9 中合成的蠕 cDNA、Ex taq 聚合酶(由 TaKaRa Bio 生产)和根据手册制备的每个样品,在 94°C 下进行热变性处理 2 分钟,并且进行 35 个循环的反应,每个循环由 94°C 下 1 分钟,65°C 下 2 分钟,和 72°C 下 3 分钟组成。在 72°C 下进行 9 分钟的进一步反应后,在 4°C 储存样品。当用反向引物 415-4(5'-RTTNAGNAGRTCYYTNGCRTCYYT-3'(SEQ ID No:25):N = A 或 C 或 G 或 T,R = A 或 G,并且 Y = C 或 T) 进行 PCR 时,获得了大约 1,000bp 的 DNA 片段。当用 491-2(5'-RTT RTC NGC NAG RTCYYT RTT-3'(SEQ ID No:29):N = A 或 C 或 G 或 T,R = A 或 G,并且 Y = C 或 T) 进行 PCR 时,获得了大约 880bp 的 DNA 片段。

[0138] 表 4

[0139]	N-1	: 5'-GAY GAY GTN TTR AAR CAR ACN GAR GAR-3'
	N-2	: 5'-GAY GAY GTN CTN AAR CAR ACN GAR GAR-3'
	415-1	: 5'-RTT RAA RAA RTC YTT NGC RTC YTT RAA-3'
	415-2	: 5'-RTT NAG RAA RTC YTT NGC RTC YTT-3'
	415-3	: 5'-RTT RAA NAG RTC YTT NGC RTC YTT-3'
	415-4	: 5'-RTT NAG NAG RTC YTT NGC RTC YTT-3'
	445-1	: 5'-RTT RTC RAA NAC YTC RTG NGC-3'
	445-2	: 5'-RTT RTC NAG NAC YTC RTG NGC-3'
	491-1	: 5'-RTT RTC NGC RAA RTC YTT RTT-3'
	491-2	: 5'-RTT RTC NGC NAG RTC YTT RTT-3'
	448-1	: 5'-RTT NGC RAA RTC YTC RTT RAA YTC-3'
	448-2	: 5'-RTT NGC NAG RTC YTC RTT RAA YTC-3'
	448-3	: 5'-RTT NGC RAA RTC YTC RTT NAG YTC-3'
	448-4	: 5'-RTT NGC NAG RTC YTC RTT NAG YTC-3'

[0140] 合成用于扩增 Zen1 基因的混合引物序列。当用 N-1 和 415-4 进行 PCR 时,获得了大约 1000bp 的片段。当用 N-1 和 491-2 进行 PCR 时,获得了大约 880bp 的片段。

[0141] N = A 或 C 或 G 或 T,R = A 或 G,Y = C 或 T

[0142] [实施例 11] 克隆 Zen1 基因

[0143] 从琼脂糖凝胶(sUPREC-01,由 TaKaRa 生产)收集用实施例 10 中的引物 N-1 和 415-4 扩增的 DNA 片段。用 T4 DNA 连接酶将 DNA 片段连接到 pGEM-T Easy 载体(由 Promega 生产)的克隆位点,从而转化宿主大肠杆菌 ToPl0(由 Invitrogen 生产)。具体地,混合大肠杆菌感受态细胞和质粒,然后在冰上对混合物进行温度处理大约 30 分钟,42°C 下 30 秒,然后在冰上 2 分钟。然后将所得物悬浮于 SoC 培养基(2% Trypton,0.5% 酵母提取物,0.

0.5% NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 和 20 mM 葡萄糖), 然后 37℃ 下温育 1 小时。随后, 在补加了 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基 (1% 酵母提取物, 0.5% trypton 和 1% NaCl) 上 37℃ 下将转化的大肠杆菌培养过夜, 从而获得大肠杆菌菌落。选择认为含有插入的片段的白色克隆。在补加了 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基上培养克隆过夜。用 GFX (商标) Micro PlasmidPrep 试剂盒 (由 Amersham Bioscience 生产) 纯化质粒 DNA。用染料引物循环测序试剂盒 (由 Amersham 生产) 进行测序反应, 然后用荧光 DNA 测序仪 (由 Shimadzu Corporation 生产) 进行核苷酸序列分析。此外, 当发现 3 个克隆的核苷酸序列在其核苷酸序列分析时完全匹配时, 进行最终的确定 (图 7-1 和图 7-2)。

[0144] [实施例 12] 分析 Zen1 基因

[0145] 用 Genetyx-win ver. 6 软件 (由 Software Development 生产) 分析实施例 11 中克隆的 Zen1 基因。碱基的数目是 1020bp, 氨基酸残基的数目是 340 (图 7-1, 图 7-2, 和 SEQ ID NOS :1 和 2)。对基因的核苷酸序列和氨基酸序列进行了 BLAST 检索, 但是没有获得明确的命中。Zen1 基因被认为是新基因。

[0146] [实施例 13] 分离全长 Zen1 cDNA

[0147] 通过 RACE (cDNA 末端的快速扩增) 法分离全长 cDNA。采用 SV 总 RNA 分离试剂盒 (由 Promega 生产), 从实施例 8 中使用的螨体提取总 RNA。用 GeneRacer (商标) 试剂盒, 根据试剂盒的手册制备 RACE 的模板。此外, 基于实施例 12 中获得的 Zen1 部分序列, 合成了第一轮 PCR 和嵌套式 PCR 的引物, 用于扩增 5' 和 3' 末端 (表 5)。5' 和 3' 末端的扩增反应按如下进行。在 1.0 μL 根据上文制备的 RACE 模板中加入包含在 GeneRacer (商标) 试剂盒中的 5' 和 3' 引物各 3.0 μL, 1.0 μL dNTP 混合物溶液 (各 10mM), 包含在 Advantage cDNA 聚合酶混合物 (由 CLONTECH 生产) 中的 5.0 μL 10×cDNA PCR 反应缓冲液, 1.0 μL Advantage cDNA 聚合酶混合物, 和按上文所述合成并且调节在 10 μM 的第一轮 PCR 的基因特异性引物各 1.0 μL。然后用无菌蒸馏水将得到的溶液的体积调节到 50.0 μL。用 Touchdown PCR 法进行基因扩增。制备的样品溶液在 94℃ 下热变性 1 分钟, 进行 5 轮反应, 每轮由 94℃ 下 30 秒和 72℃ 下 4 分钟组成, 进行 5 轮反应, 每轮由 94℃ 下 30 秒和 70℃ 下 4 分钟组成, 进行 25 轮最终反应, 每轮由 94℃ 下 30 秒和 68℃ 下 4 分钟组成, 然后在 4℃ 下储存。完成第一轮 PCR 后, 向 5' 和 3' 末端扩增反应溶液各 1.0mL 中加入包含在 GeneRacer (商标) 试剂盒中的嵌套式 PCR 的 5' 引物和 3' 引物各 1.0 μL, 1.0 μL dNTP 混合物溶液 (各 10mM), 包含在 Advantage cDNA 聚合酶混合物 (由 CLONTECH 生产) 中的 5.0 μL 10×cDNA PCR 反应缓冲液, 1.0 μL Advantage cDNA 聚合酶混合物, 和按上文所述合成并且调节在 10 μM 的第一轮 PCR 的基因特异性引物各 1.0 μL。然后用无菌蒸馏水将得到的溶液的体积调节到 50.0 μL。用上述 Touchdown PCR 法进行基因扩增。采用 1.0% 琼脂糖凝胶, 通过电泳证实由此获得的扩增的 5' 和 3' 末端的片段。切下这些片段, 然后收集 (SUPREC-01, 由 TaKaRa 生产)。用 T4 DNA 连接酶将片段连接到 pGEM-T Easy 载体 (由 Promega 生产) 的克隆位点, 从而转化宿主大肠杆菌 TOP10 (由 Invitrogen 生产)。具体地, 混合大肠杆菌感受态细胞和质粒, 然后在冰上对混合物进行温度处理大约 30 分钟, 42℃ 下 30 秒, 然后在冰上 2 分钟。然后将所得物悬浮于 SOC 培养基 (2% Trypton, 0.5% 酵母提取物, 0.05% NaCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 和 20mM 葡萄糖), 然后 37℃ 下温育 1 小时。随后, 在补加了 50 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基 (1% 酵母提取物, 0.5% trypton 和 1% NaCl) 上 37℃ 下将转化的大

肠杆菌培养过夜,从而获得大肠杆菌菌落。选择认为含有插入的片段的白色克隆。在补加了 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基上培养克隆过夜。用 GFX(Trademark)Micro Plasmid Prep 试剂盒(由 Amersham Bioscience 生产)纯化质粒 DNA。用染料引物循环测序试剂盒(由 Amersham 生产)进行测序反应,然后用荧光 DNA 测序仪(由 Shimadzu Corporation 生产)进行核苷酸序列分析。此外,当发现 3 个克隆的核苷酸序列在其分析时完全匹配时,进行最终的确定。结果,可以确定 Zen1 的 5' 末端和 3' 末端的核苷酸序列(图 8-1-图 8-4,和 SEQ ID NOS:34 和 35)。

[0148] 表 5

[0149]

引物名称	序列	使用目的
ZenIRS-1:	5' -AAT TAC AAA CAT GAG TTA GAA-3'	3' RACE1 st PCR
ZenIRS-2:	5' -GAA TTG TTG ACA ATG TTC AAA-3'	3' RACE 嵌套式 PCR
ZenIRR-1:	5' -GAT TTC ATC TTT CAA ATC TGA-3'	5' RACE1 st PCR
ZenIRR-2:	5' -CTT TTC CAA TAC ATC CTG GGC-3'	5' RACE 嵌套式 PCR

[0150] (从上到下, SEQ ID NOS:36、37、38 和 39)

[0151] 用于 RACE 法的引物及其序列

[0152] [实施例 14] 纯化重组 Zen1

[0153] 通过 PCR 扩增实施例 13 获得的、添加了限制酶 BamHI 和 XhoI 位点的 Zen1 cDNA。用 T4-DNA 连接酶将扩增产物连接到大肠杆菌表达质粒载体 pGEX4T-1(由 Amersham Biosciences 生产)的 EcoR I 和 Xho I 位点。用由此获得的重组质粒转化大肠杆菌 TOP10 菌株(由 Invitrogen 生产)。在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中将转化的菌株 37°C 下培养过夜。随后,在新的 LB 培养基上传代培养小量菌株,直到 600nm 处的 OD 值达到 1.0。添加 IPTG(异丙基 β -D-半乳糖苷),达到 1mM 的终浓度。3 小时后,收获细胞,然后用 PBS(pH7.4)清洗一次。通过在 PBS(pH7.4)中超声处理而裂解再次收获的细胞,通过离心除去不溶的级份,然后收集含有与谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合的 Zen1 的可溶级份。随后,用谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 柱(由 Amersham Biosciences 生产)从可溶级份获得与 GST 融合的 Zen1。将含量为融合蛋白的 1/100 的凝血酶(由 Amersham Biosciences 生产)加入含有纯化的融合产物(即,融合于 GST 的 Zen1)的溶液,然后在 22°C 下反应 20 小时。由此,GST 从 Zen1 分离。随后,用 Benzamidin 琼脂糖凝胶(由 Amersham Biosciences 生产)除去凝血酶,然后纯化重组的 Zen1。由此获得的纯化的 Zen1 表现出相应于分子量为大约 60kDa 的单个条带,这是通过 SDS-PAGE 证实的(图 9)。

[0154] [实施例 15] 制备抗 Zen1 多克隆抗体和分析抗体与螨蛋白的反应性

[0155] 以 1 周的间隔用实施例 14 纯化的重组 Zen1 免疫 6 只小鼠(BALB/c,雌性,4 周龄)5 次。随后,从小鼠采集血液,分离血清,然后通过 ELISA 分析 IgG 抗体的反应。按如下进行 ELISA。将 1.0 μ g 重组 Zen1 和 4.0 μ g 从粉尘螨提取的抗原(由 GREER 生产)分别固定在免疫板(由 NalgeNunc International 生产)上,然后在 37°C 下用封闭溶液(通过将 Tween20 加入补加了 10% FBS 的 PBS 中达到 0.05%的终浓度而制备)封闭 1 小时。用封闭溶液将每个小鼠血清样品稀释 1000 倍,然后在室温下反应 1 小时。清洗每个免疫板后,

使其与用封闭溶液稀释 2000 倍的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 单克隆抗体（由 ZYMED 生产）反应。

[0156] 清洗每个免疫板后，将 100 μ L 酶底物溶液（ABTS 溶液）加入每个孔，然后在 37°C 下反应 10 分钟。通过向每个孔中加入 100 μ L 0.32% 的氟化钠溶液而终止酶反应。用免疫读数器（BioRad）测量 414nm 处每个孔的吸光度。用 ELISA 证实 IgG 与相关受试物的反应后，确定受试物是抗 Zen1 的多克隆抗体。

[0157] 通过 Western 印迹分析小鼠 IgG 与多克隆抗体（重组 Zen1）的反应性和关于螨体的该反应性。将 β -巯基乙醇加入 100.0 μ L 调节到 50 μ g/mL 的重组 Zen1 蛋白溶液和 100.0 μ L 从粉尘螨提取的抗原的溶液，达到 50.0 μ L/mL 的终浓度，由此制备 200 μ L Laemmli 样品缓冲液（由 BIO-RAD 生产）。100°C 下热处理 5 分钟，然后将所得物加样到凝胶浓度为 5%–20% 的聚丙烯酰胺凝胶（PAGEL；由 ATTO 生产）上。由此进行电泳。完成电泳后，将所得物转移到 PVDF 膜（Hybond-P；由 Amersham Biosciences 生产）。使膜在封闭溶液（补加了 5% 脱脂奶的 PBST（通过将 Tween20 添加到 PBS 中达到 0.1% 的终浓度而制备））中 4°C 下静置过夜。在 PBST 中将膜清洗 10 分钟。用 PBST 将 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 单克隆抗体（由 ZYMED 生产）稀释 2000 倍，然后将稀释的溶液加入膜，随后在室温下反应 2 小时。用 PBST 清洗 5 次（每次 10 分钟）后，将 ECL Plus Western 印迹检测系统（由 Amersham Biosciences 生产）的反应溶液加入到膜上，然后在室温下反应 5 分钟。用 X 射线膜（Hyperfilm ECL；由 Amersham Biosciences 生产）检测信号。结果，检测到了表示与分子量为大约 60kDa 的重组 Zen1 反应的信号和表示与分子量为 150 kDa–250 kDa 的天然型 Zen1 反应的信号（图 10）。因此，证实了实施例 13 分离的全长 Zen1 cDNA 编码分子量为 150kDa–250kDa 的螨体的所述变应原蛋白。

[0158] [实施例 16] 分析重组 Zen1 的 IgE 反应性

[0159] 通过 ELISA 评估实施例 14 中纯化的重组 Zen1 的变应原性。将 1.0 μ g 重组 Zen1 固定在免疫板（由 Nalge Nunc International K.K. 生产）上，然后在 37°C 下用封闭溶液（通过将 Tween20 加入补加了 10% FBS 的 PBS 中达到 0.05% 的终浓度而制备）封闭 1 小时。使检测的粉尘螨阳性的 9 只狗的血清（通过用生理盐水稀释 50 倍的粉尘螨抗原溶液（由 GREER 生产）进行皮内反应证实为粉尘螨阳性的狗血清）与阴性对照狗血清反应。加入生物素标记的 GST-Fc ϵ RI α ，然后，通过添加过氧化物酶偶联的链亲和素（由 Jackson Immuno Research 生产）和酶底物溶液（ABTS 溶液）导致显色反应。通过向每个孔中加入 100 μ L 0.32% 的氟化钠溶液而终止酶反应。用免疫读数器（BioRad）测量 414nm 处每个孔的吸光度。具体地，用重组的狗 Fc ϵ RI α ，通过 ELISA 系统分析血清 IgE（9 只通过该程序的皮内反应证实的测试为螨阳性的狗的血清，或阴性狗（对照）的血清）与重组 Zen1 的反应。结果，证实了高于阴性狗的值（用虚线表示）的值。因此，证实了重组 Zen1 是与 IgE 反应的变应原蛋白（图 11）。

[0160] 工业实用性

[0161] 本发明使得能够提供作为螨变态反应性疾病的治疗剂或预防剂的安全和有效的重组螨变应原，其不含诱导过敏的杂质。

[0162] 在此全文引入在此引用的所有公开文献作为参考。本领域技术人员容易理解，本发明的多种修饰和改变在所附权利要求公开的技术思想和发明范围内是可实现的。本发明

意欲包括所述修饰和改变。

序列表

<110>NIPPON ZENYAKU KOGYO LTD.

<120> 新的螨变应原

<130>PH-2409-PCT

<150>JP2004-116089

<151>2004-04-09

<160>39

<170>PatentIn Ver. 2.1

<210>1

<211>1022

<212>DNA

<213> 粉尘螨

<220>

<221>CDS

<222>(1).. (1020)

<400>1

gac gat gta tta aag cag act gag gag cct att aaa agt gcc cag gat	48
Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Pro Ile Lys Ser Ala Gln Asp	
1 5 10 15	
gta ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa	96
Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu	
20 25 30	
aaa ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa	144
Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys	
35 40 45	
aat cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc	192
Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe	
50 55 60	
aaa aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc	240
Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser	

65	70	75	80	
ttg aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca				288
Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr				
	85	90	95	
aca aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa				336
Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys				
	100	105	110	
aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc				384
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro				
	115	120	125	
gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cca gaa ccg				432
Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro				
	130	135	140	
act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc				480
Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr				
	145	150	155	160
aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act				528
Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr				
	165	170	175	
ccg gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac cgg acc atc				576
Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile				
	180	185	190	
cac ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca				624
His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro				
	195	200	205	
act ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg				672
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro				
	210	215	220	
gaa cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca				720
Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro				
	225	230	235	240
tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg				768
Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr				
	245	250	255	
act aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt				816
Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu				
	260	265	270	
att aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg				864
Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu				

275	280	285	
aaa aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat			912
Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His			
290	295	300	
gag tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg			960
Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser			
305	310	315	320
gaa ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg tta aat gaa gcc			1008
Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala			
	325	330	335
aac gaa ctc ctg aa			1022
Asn Glu Leu Leu			
340			

<210>2

<211>340

<212>PRT

<213> 粉尘螨

<400>2

Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Pro Ile Lys Ser Ala Gln Asp			
1	5	10	15
Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu			
	20	25	30
Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys			
	35	40	45
Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe			
	50	55	60
Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser			
65	70	75	80
Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr			
	85	90	95
Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys			
	100	105	110
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro			
	115	120	125
Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro			
	130	135	140
Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr			

145	150	155	160
Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr			
	165	170	175
Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile			
	180	185	190
His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro			
	195	200	205
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro			
	210	215	220
Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro			
225	230	235	240
Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr			
	245	250	255
Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu			
	260	265	270
Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu			
	275	280	285
Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His			
	290	295	300
Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser			
305	310	315	320
Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala			
	325	330	335
Asn Glu Leu Leu			
	340		

<210>3

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>3

Met Lys Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Leu Leu Lys

1

5

10

<210>4

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>4

Ser Ala Gln Asp Val Leu Glu Lys

1

5

<210>5

<211>14

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>5

Phe Met Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp Glu Leu Leu Arg

1

5

10

<210>6

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>6

Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Leu Ala Lys

1

5

10

<210>7

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>7

Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asn Glu Leu Ala Glu Lys

1

5

10

<210>8

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>8

Met Tyr Asn Phe His Leu Glu Ala Tyr

1

5

<210>9

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>9

Ile Ala His Phe Leu Glu Leu Glu

1

5

<210>10

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>10

Ile Ala His Phe Glu Leu Glu

1

5

<210>11

<211>10

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>11

Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn

1

5

10

<210>12

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>12

Ile Ala His Leu Glu Ser Glu Thr

1

5

<210>13

<211>9

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>13

Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala

1

5

<210>14

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>14

Asp Ala Gln Leu Glu Xaa Glu

1

5

<210>15

<211>7

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>15

Ser Ala Gln Asp Val Scr Leu

1

5

<210>16

<211>6

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>16

Arg Asn Glu Met Asn Glu

1

5

<210>17

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>17

Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Lys Ala Asp Phe Asp
1 5 10

<210>18

<211>8

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>18

Asp Leu Ala Arg Asp Val Xaa Leu
1 5

<210>19

<211>12

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :合成肽

<400>19

Asp Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu
1 5 10

<210>20

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>9 和 21

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>20

gaygaygtnt traarcacac ngargar

27

<210>21

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>9, 12 和 21

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>21

gaygaygtnc tnaarcacac ngargar

27

<210>22

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>16

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>22

rttraaraar tcyttngcrt cyttraa

27

<210>23

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>4 和 16

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>23

rttnagraar tcyttngcrt cytt

24

<210>24

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>7 和 16

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>24

rttraanagr tcyttngcrt cytt

24

<210>25

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>4,7 和 16

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>25

rttnagnagr tcyttngcrt cytt

24

<210>26

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>10 和 19

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>26

rttrtcran acytcrtgng c

21

<210>27

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>7,10 和 19

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>27

rttrtcnagn acytertgng c

21

<210>28

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>7

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>28

rttrtcngcr aartcytttrt t

21

<210>29

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>7 和 10

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>29

rttrtcngcn agrtcytttrt t

21

<210>30

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>4

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>30

rttngcraar tcytcrttra aytc

24

<210>31

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>4 和 7

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>31

rttngcnagr tcytcrttra aytc

24

<210>32

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>4 和 19

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>32

rttngcraar tcyterttna gytc

24

<210>33

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<220>

<221> 修饰的碱基

<222>4, 7 和 19

<223>n 代表 a, c, g 或 t

<400>33

rttngcnagr tcyterttna gytc

24

<210>34

<211>1518

<212>DNA

<213> 粉尘螨

<220>

<221>CDS

<222>(1).. (1515)

<400>34

atg aaa tta acc gct aca tta ctg ttg att cta aca ttg agt tgg gca 48

Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Ser Trp Ala

1 5 10 15

ggt att ttc gtt gat gca aat cca cga ttc aaa cgt gat aat cgg gat 96

Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp

20 25 30

gat gtt ttg aaa caa act gaa gag ctt att aaa agt gcc cag gat gta 144

Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val

35	40	45	
ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa aaa			192
Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys			
50	55	60	
ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa aat			240
Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn			
65	70	75	80
cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc aaa			288
Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys			
85	90	95	
aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc ttg			336
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu			
100	105	110	
aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca aca			384
Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr			
115	120	125	
aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca			432
Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr			
130	135	140	
ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa			480
Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu			
145	150	155	160
ccg act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cca gaa ccg act			528
Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr			
165	170	175	
acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa			576
Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys			
180	185	190	
acc ccc gaa ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act ccg			624
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro			
195	200	205	
gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac cgg acc atc cac			672
Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile His			
210	215	220	
ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca act			720
Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr			
225	230	235	240
ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa			768
Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu			

245	250	255	
cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca			816
Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser			
260	265	270	
acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg act			864
Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr			
275	280	285	
aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt att			912
Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile			
290	295	300	
aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa			960
Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys			
305	310	315	320
aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat gag			1008
Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu			
325	330	335	
tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg gaa			1056
Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu			
340	345	350	
ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg ttg aac gaa gct gat			1104
Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp			
355	360	365	
gaa att atc aga tcc ttg aca act acg acg gaa ccg aca aca ttg aat			1152
Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn			
370	375	380	
agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg			1200
Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro			
385	390	395	400
aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc			1248
Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr			
405	410	415	
act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gga ccg aca aca			1296
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr			
420	425	430	
ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg			1344
Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro			
435	440	445	
gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca tcg aat			1392
Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn			

450	455	460	
agc acc act tca gaa cca acg aat tca atc aat aga aaa aca agt gaa			1440
Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Ash Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu			
465	470	475	480
ttt cat tct tat ccg att ggt tcc ata aga ttc gaa tca gat tca ata			1488
Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile			
485	490	495	
ttt tct aaa cat ttt att ctt ttg att tga			1518
Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile			
500	505		

<210>35

<211>505

<212>PRT

<213> 粉尘螨

<400>35

Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Ser Trp Ala			
1	5	10	15
Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp			
20	25	30	
Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val			
35	40	45	
Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys			
50	55	60	
Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn			
65	70	75	80
Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys			
85	90	95	
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu			
100	105	110	
Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr			
115	120	125	
Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr			
130	135	140	
Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu			
145	150	155	160
Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr			
165	170	175	

Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys		
180	185	190
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro		
195	200	205
Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile His		
210	215	220
Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr		
225	230	235
Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu		
245	250	255
Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser		
260	265	270
Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr		
275	280	285
Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile		
290	295	300
Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys		
305	310	315
Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu		
325	330	335
Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu		
340	345	350
Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp		
355	360	365
Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn		
370	375	380
Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro		
385	390	395
Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr		
405	410	415
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr		
420	425	430
Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro		
435	440	445
Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn		
450	455	460
Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu		
465	470	475
Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile		

	485	490	495
Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile			
500	505		
<210>36			
<211>21			
<212>DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列说明 :引物			
<400>36			
aattacaaac atgagttaga a			21
<210>37			
<211>21			
<212>DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列说明 :引物			
<400>37			
gaattgttga caatgttcaa a			21
<210>38			
<211>21			
<212>DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列说明 :引物			
<400>38			
gatttcatct ttcaaattctg a			21
<210>39			
<211>21			
<212>DNA			

<213> 人工序列

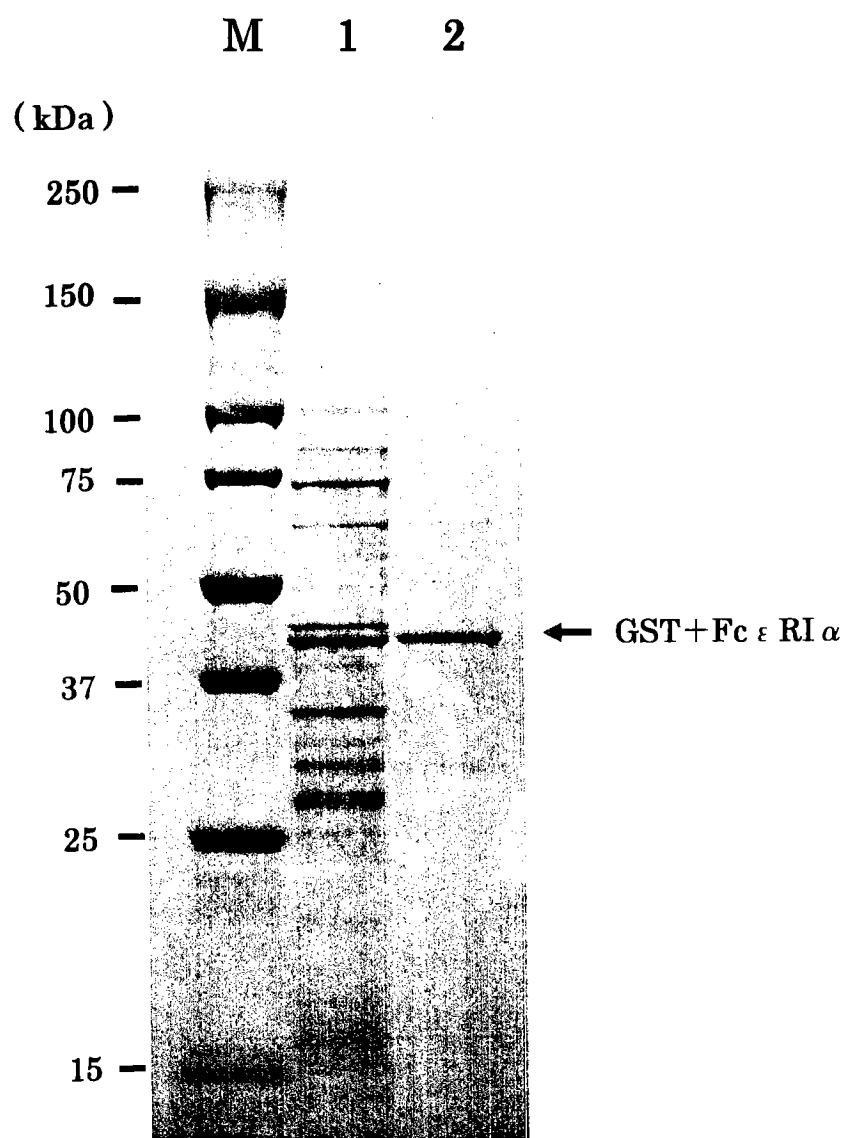
<220>

<223> 人工序列说明 :引物

<400>39

cttttccaat acatcctggg c

21



- M: 分子标记 (由BIO-RAD生产)
1: 用IPTG诱导后的大肠杆菌BL21的可溶级分
2: 与GST蛋白融合的纯化的狗 FcεRIα链

图 1

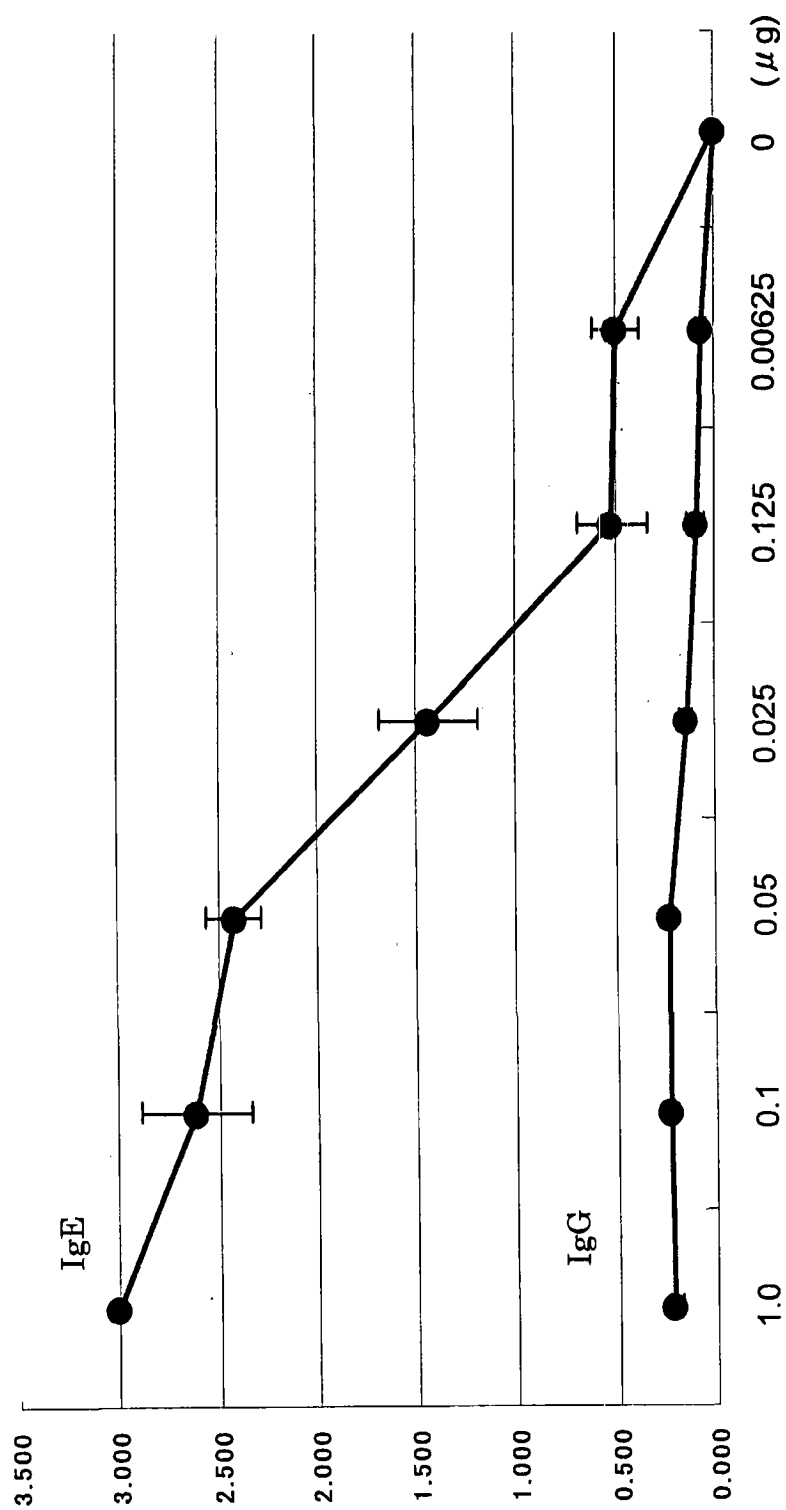


图 2

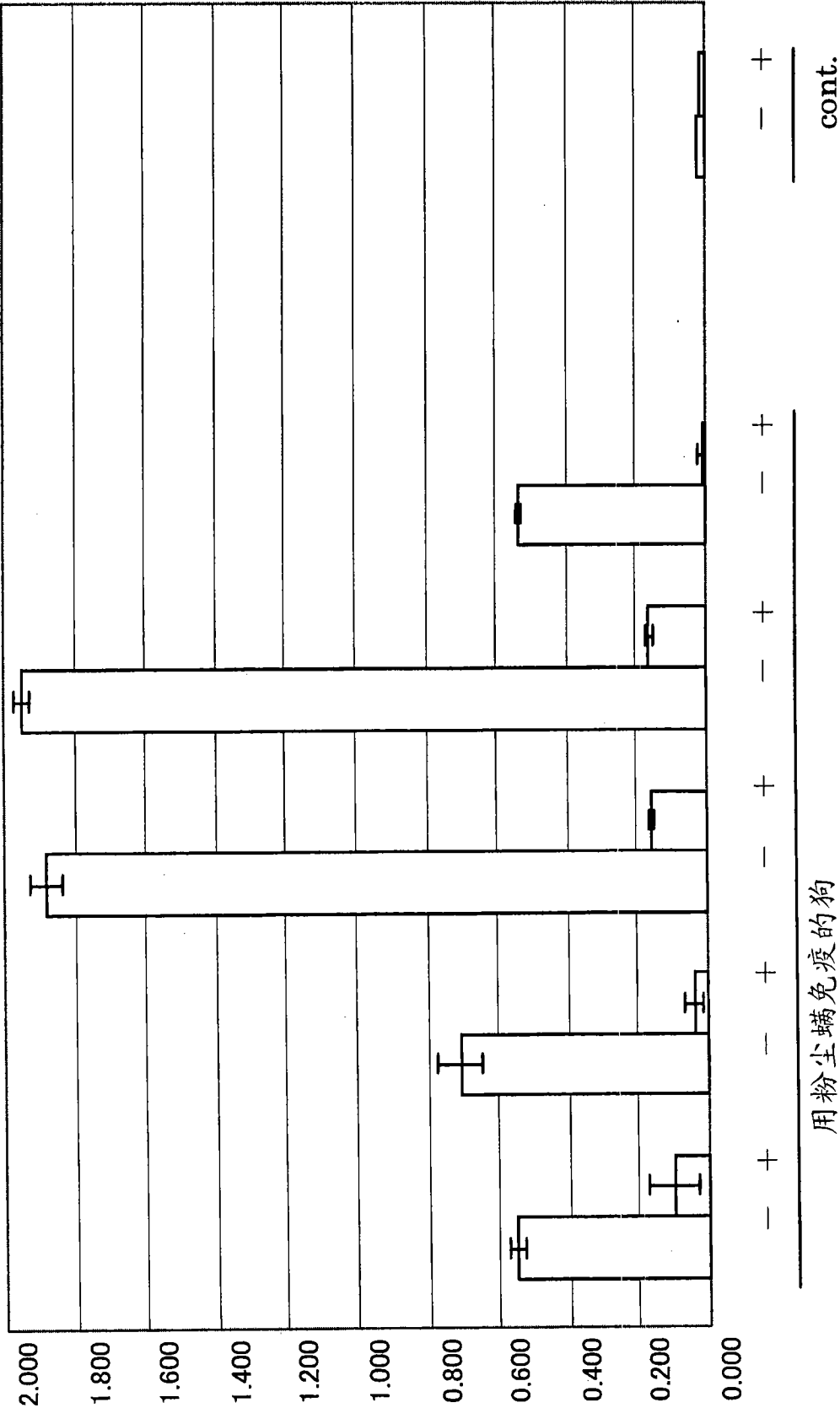


图 3

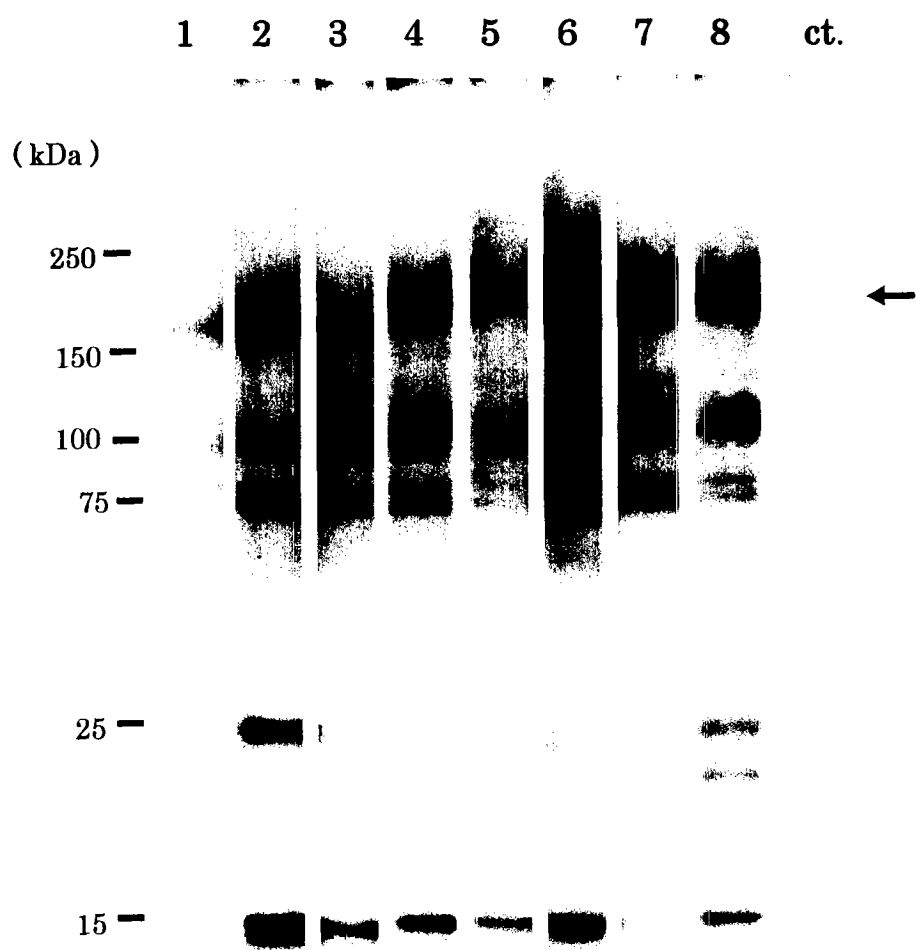


图 4

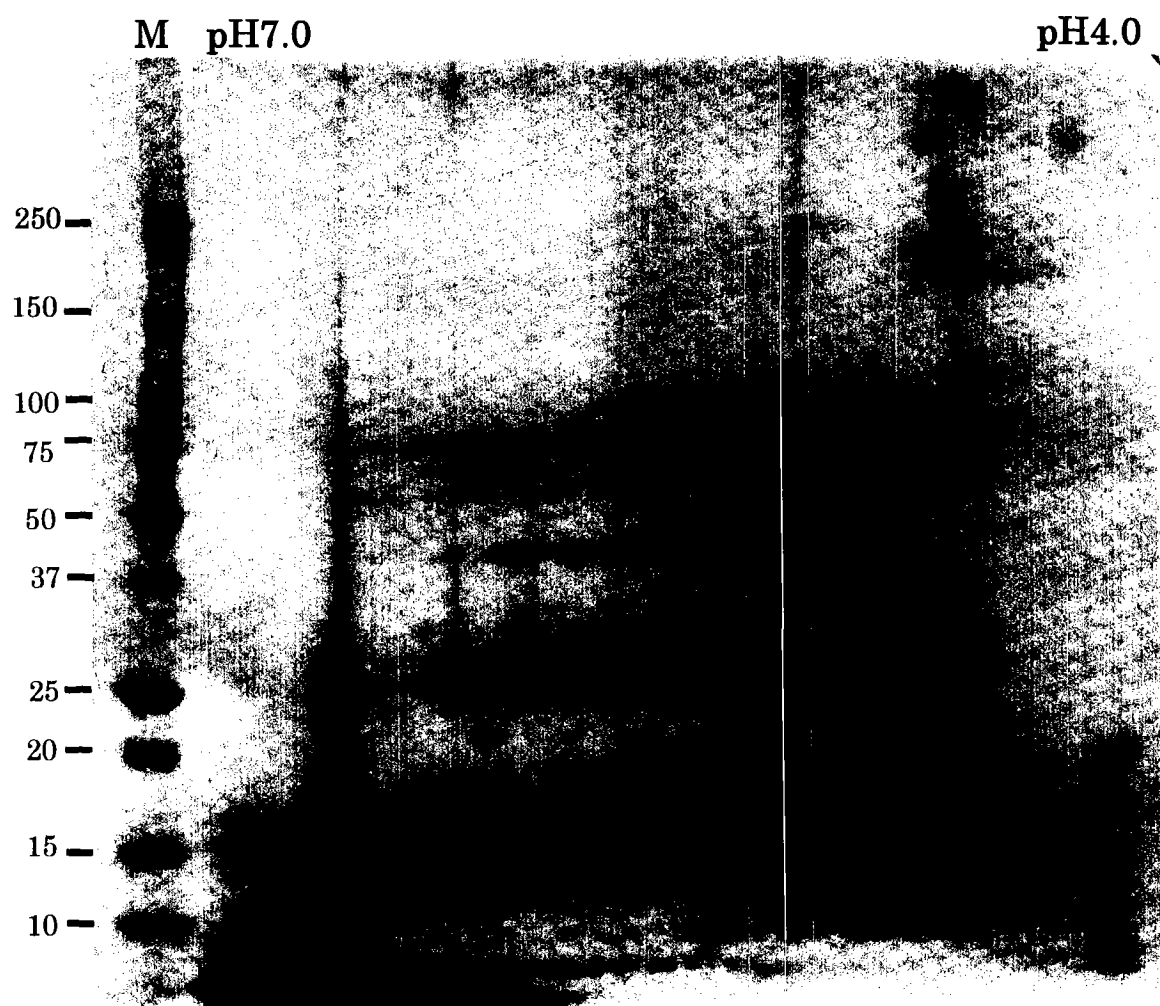


图 5

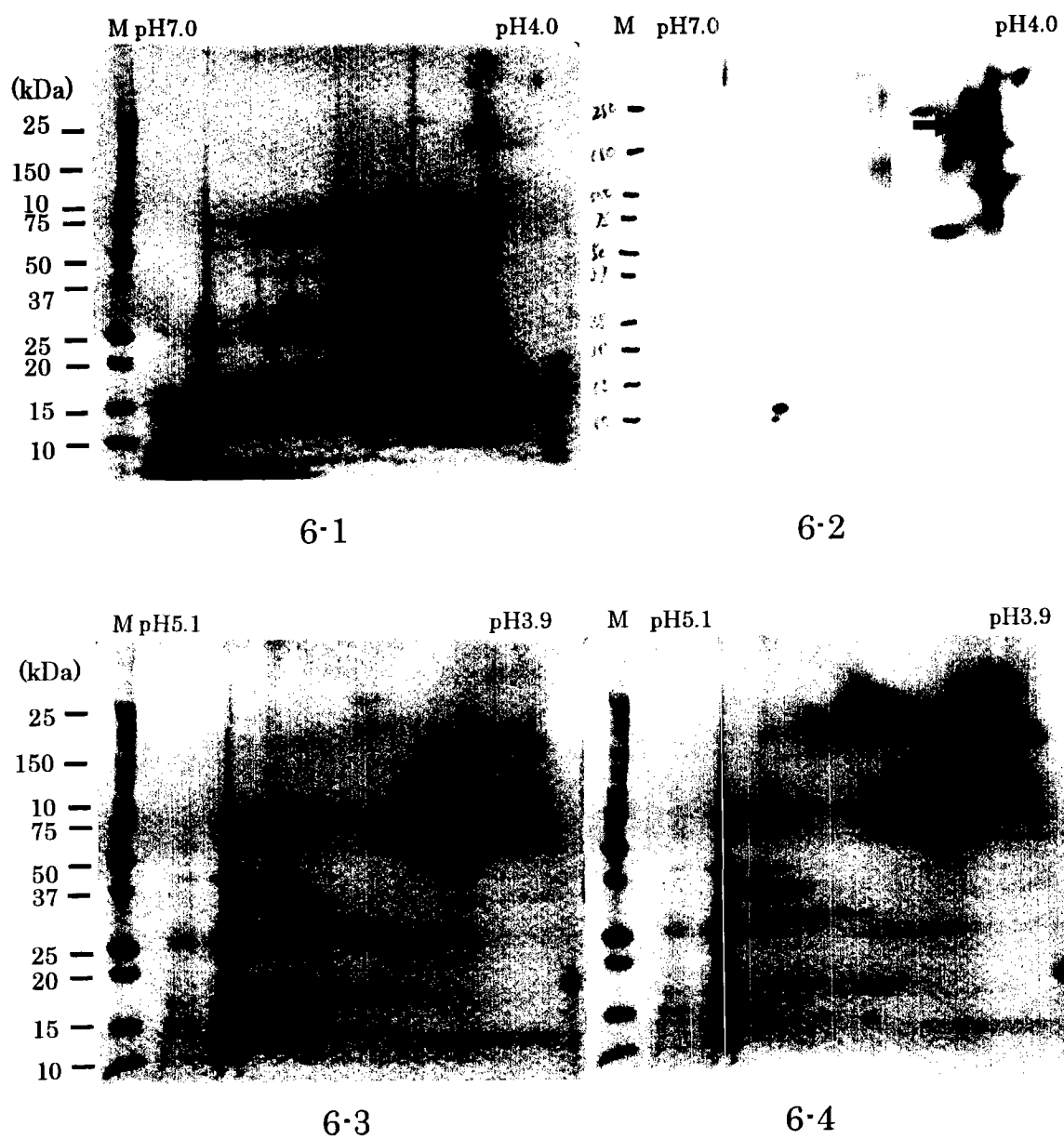


图 6

gac gat gta tta aag cag act gag gag cct att aaa agt gcc cag gat Asp Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Pro Ile Lys Ser Ala Gln Asp 1 5 10 15	48
gta ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa Val Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu 20 25 30	96
aaa ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa Lys Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys 35 40 45	144
aat cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe 50 55 60	192
aaa aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc Lys Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser 65 70 75 80	240
ttg aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca Leu Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr 85 90 95	288
aca aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa Thr Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys 100 105 110	336
aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro 115 120 125	384
gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cca gaa ccg Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro 130 135 140	432
act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr 145 150 155 160	480
aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr 165 170 175	528

图 7-1

ccg gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac cgg acc atc Pro Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile 180 185 190	576
cac ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca His Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro 195 200 205	624
act ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro 210 215 220	672
gaa cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro 225 230 235 240	720
tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr 245 250 255	768
act aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt Thr Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu 260 265 270	816
att aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg Ile Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu 275 280 285	864
aaa aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat Lys Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His 290 295 300	912
gag tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg Glu Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser 305 310 315 320	960
gaa ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg tta aat gaa gcc Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala 325 330 335	1008
aac gaa ctc ctg aa Asn Glu Leu Leu 340	1022

图 7-2

atg aaa tta acc gct aca tta ctg ttg att cta aca ttg agt tgg gca	48
Met Lys Leu Thr Ala Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Leu Ser Trp Ala	
1 5 10 15	
ggt att ttc gtt gat gca aat cca cga ttc aaa cgt gat aat cgg gat	96
Gly Ile Phe Val Asp Ala Asn Pro Arg Phe Lys Arg Asp Asn Arg Asp	
20 25 30	
gat gtt ttg aaa caa act gaa gag ctt att aaa agt gcc cag gat gta	144
Asp Val Leu Lys Gln Thr Glu Glu Leu Ile Lys Ser Ala Gln Asp Val	
35 40 45	
ttg gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa gat gaa atc gca gaa aaa	192
Leu Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys Asp Glu Ile Ala Glu Lys	
50 55 60	
ctg gca acc atg aag cat tac aaa cat aag tta gaa aat gca aaa aat	240
Leu Ala Thr Met Lys His Tyr Lys His Lys Leu Glu Asn Ala Lys Asn	
65 70 75 80	
cca atc aaa atc gcc cat ttt gaa ttg gaa ttg ttg aca atg ttc aaa	288
Pro Ile Lys Ile Ala His Phe Glu Leu Glu Leu Leu Thr Met Phe Lys	
85 90 95	
aag ttc caa tca tta ttg aac gaa gct aat gaa att atc aaa tcc ttg	336
Lys Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asn Glu Ile Ile Lys Ser Leu	
100 105 110	
aca acc aca aca acg gaa ccg aca acc cca act cct gaa cca aca aca	384
Thr Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr	
115 120 125	
aca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca	432
Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr	
130 135 140	

图 8-1

ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa	480
Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu	
145 150 155 160	
ccg act acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cca gaa ccg act	528
Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr	
165 170 175	
acc aaa aca ccg gaa cca aca aca cca act cct gaa ccg act acc aaa	576
Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys	
180 185 190	
acc ccc gaa ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc acc cca act ccg	624
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr Pro	
195 200 205	
gac cgc tac caa aac ccc cga ccg cta cca aaa cac cgg acc atc cac	672
Asp Arg Tyr Gln Asn Pro Arg Pro Leu Pro Lys His Arg Thr Ile His	
210 215 220	
ccc aac tcc gga ccg act acc aaa aca cct gaa cca tcc act cca act	720
Pro Asn Ser Gly Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Pro Thr	
225 230 235 240	
ccg gaa ccg act acc aaa acc ccc gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa	768
Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu	
245 250 255	
cca tca acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca	816
Pro Ser Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser	
260 265 270	
acc cca act ccg gaa ccg act acc aaa aca ccg gaa cca tca acg act	864
Thr Pro Thr Pro Glu Pro Thr Thr Lys Thr Pro Glu Pro Ser Thr Thr	
275 280 285	

图 8-2

aag aaa cct aat cgg gat gat gtt ttg aaa caa gct gaa gag ctt att	912
Lys Lys Pro Asn Arg Asp Asp Val Leu Lys Gln Ala Glu Glu Leu Ile	
290 295 300	
aaa aga gcc gag gat gta ttt gaa aag ttg ccc gat tca gat ttg aaa	960
Lys Arg Ala Glu Asp Val Phe Glu Lys Leu Pro Asp Ser Asp Leu Lys	
305 310 315 320	
aat gaa atc gca gaa aaa ctg gca acc atg aag aat tac aaa cat gag	1008
Asn Glu Ile Ala Glu Lys Leu Ala Thr Met Lys Asn Tyr Lys His Glu	
325 330 335	
tta gaa aat gca aaa aat cca atc aaa atc gcc cat ctt gaa tcg gaa	1056
Leu Glu Asn Ala Lys Asn Pro Ile Lys Ile Ala His Leu Glu Ser Glu	
340 345 350	
ttg ttg aca atg ttc aaa atg ttc caa tca ttg ttg aac gaa gct gat	1104
Leu Leu Thr Met Phe Lys Met Phe Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Asp	
355 360 365	
gaa att atc aga tcc ttg aca act acg acg gaa ccg aca aca ttg aat	1152
Glu Ile Ile Arg Ser Leu Thr Thr Thr Thr Glu Pro Thr Thr Leu Asn	
370 375 380	
agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg	1200
Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro	
385 390 395 400	
aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc	1248
Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr	
405 410 415	
act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca	1296
Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Gly Pro Thr Thr	
420 425 430	

图 8-3

ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg	1344
Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro	
435 440 445	
gaa ccg aca aca ttg aat agc acc act ccg gaa ccg aca aca tcg aat	1392
Glu Pro Thr Thr Leu Asn Ser Thr Thr Pro Glu Pro Thr Thr Ser Asn	
450 455 460	
agc acc act tca gaa cca acg aat tca atc aat aga aaa aca agt gaa	1440
Ser Thr Thr Ser Glu Pro Thr Asn Ser Ile Asn Arg Lys Thr Ser Glu	
465 470 475 480	
ttt cat tct tat ccg att ggt tcc ata aga ttc gaa tca gat tca ata	1488
Phe His Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Ile Arg Phe Glu Ser Asp Ser Ile	
485 490 495	
ttt tct aaa cat ttt att ctt ttg att tga	1518
Phe Ser Lys His Phe Ile Leu Leu Ile Stop	
500 505	

图 8-4

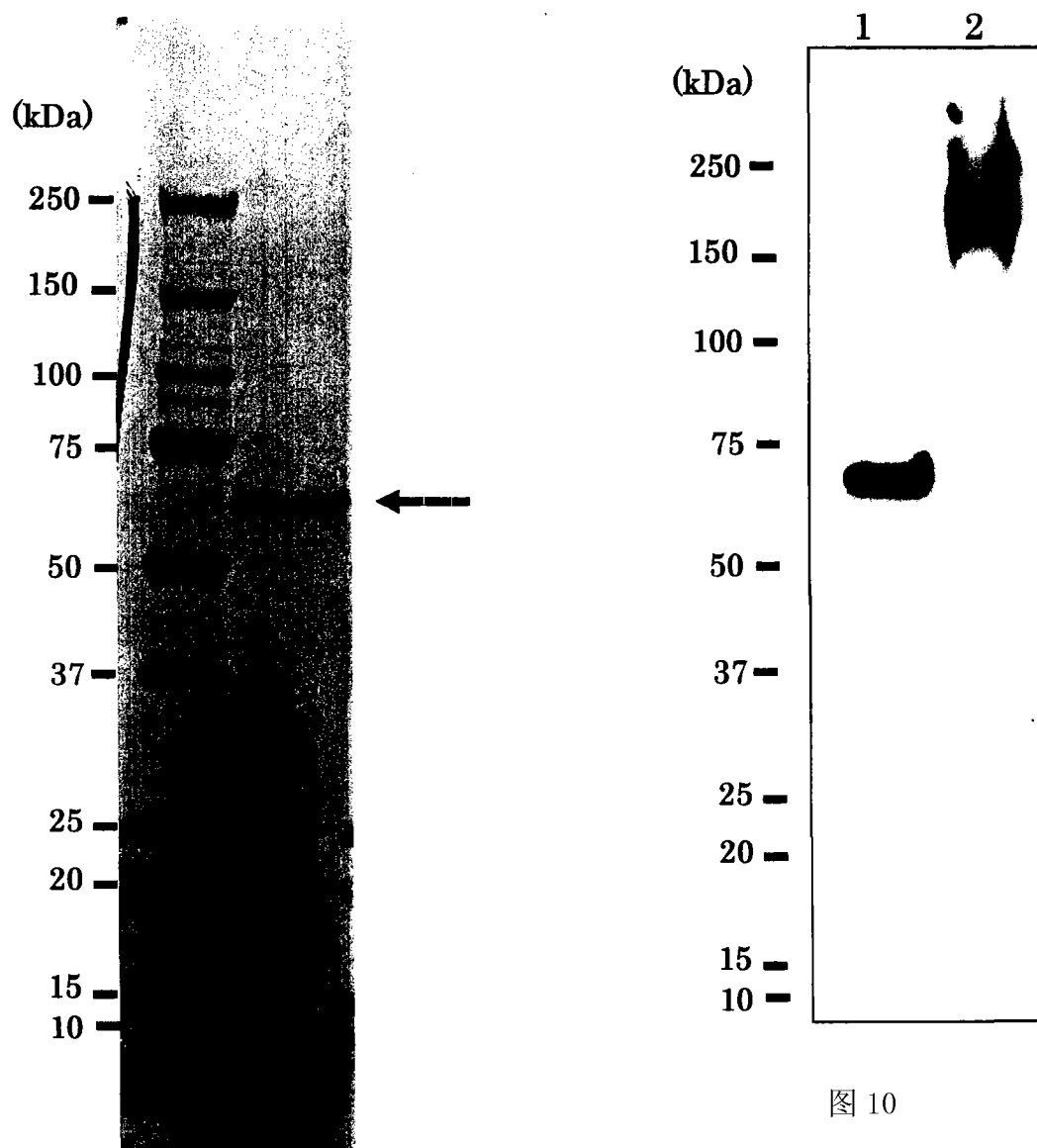


图 9

图 10

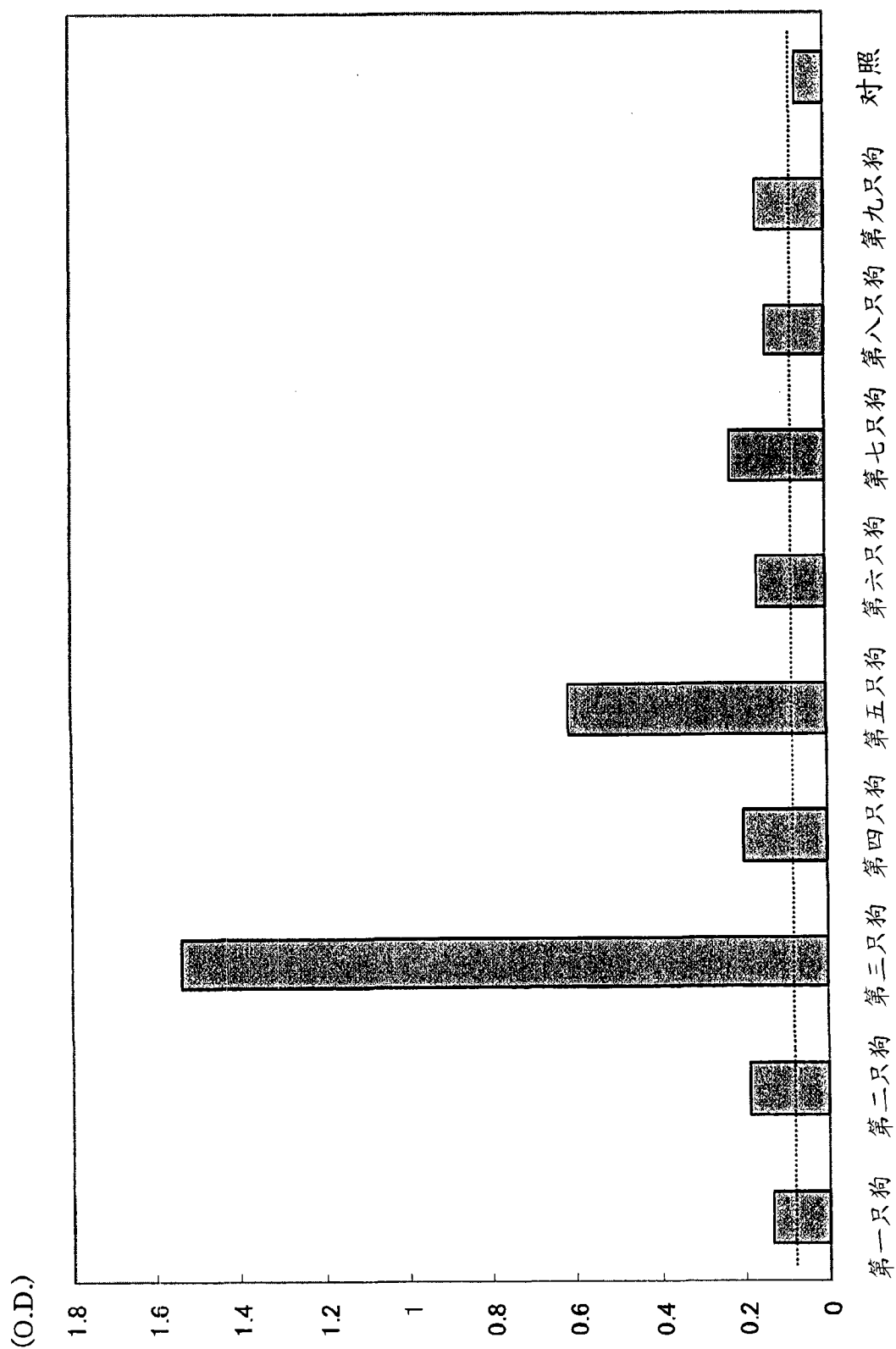


图 11