

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510102772.7

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 3 月 21 日

[11] 公开号 CN 1932016A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

[22] 申请日 2005.9.15

[21] 申请号 200510102772.7

[71] 申请人 北京诺赛基因组研究中心有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区永昌北路 3 号 707

[72] 发明人 高霞 贺鹏飞 石太平 高鹏
张晨颖 程华玲 邓唯唯 李娜
马进京 郭金海 童郁蓉 蔡恬静
陆阳 王平章 王欣宇 王峰
马大龙

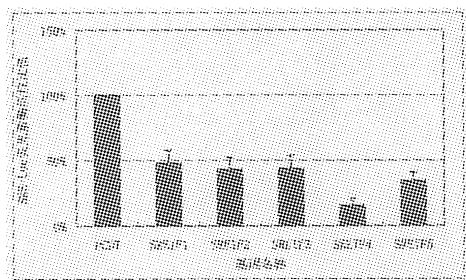
权利要求书 2 页 说明书 50 页 附图 3 页

[54] 发明名称

影响 SRE 活性的多核苷酸及其编码多肽和用途

[57] 摘要

本发明公开了一类新的编码具有影响 SRE 活性的功能的人蛋白的多核苷酸及其编码的多肽，多肽的抗体。本发明也公开了这类新的多核苷酸在宿主细胞中外源表达对 SRE 活性的影响的应用。本发明还公开了所述多肽、抗体在制备预防和治疗与增殖或肌肉分化相关的肌肉系统疾病或肿瘤的药物上的用途。



1. 一种分离的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸含有编码具有影响 SRE 活性的功能的多肽的核苷酸序列，该核苷酸序列选自：

(a) 与编码含有 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸有至少 70%相似性的多核苷酸；

(b) 编码含有与 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列有至少 70%相似性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；

(c) 与(a)或(b)的多核苷酸互补的多核苷酸。

2. 如权利要求 1 所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码的多肽具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18。

3. 如权利要求 1 所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸的序列与选自下组的核苷酸序列有至少 85%相似性：

(a) SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17 的编码区序列或全长序列；

(b) 在遗传密码简并范围内相应于(a)中提到的序列的至少一个序列；

(c) 与(a)或(b)中提到的序列互补的序列杂交的至少一个序列。

4. 如权利要求 3 所述的多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸的序列选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17 的编码区序列或全长序列。

5. 权利要求 1 所述的多核苷酸编码的多肽，其特征在于，所述多肽包含选自下组中的氨基酸序列的多肽：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18；或与以上任一氨基酸序列具有至少 90%相似性的多肽；或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

6. 权利要求 5 所述的多肽，其特征在于，所述多肽具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18。

-
7. 一种载体, 其特征在于, 所述载体含有权利要求 1 所述的多核苷酸。
 8. 一种遗传工程宿主细胞, 其特征在于, 所述宿主细胞选自:
 - (a) 用权利要求 7 所述的载体转化或转导的宿主细胞;
 - (b) 用权利要求 1 所述的多核苷酸转化或转导的宿主细胞。
 9. 一种抗体, 其特征在于, 所述抗体是能与权利要求 5 所述的多肽特异性结合的抗体。
 10. 一种核酸片段, 其特征在于, 所述核酸片段含有权利要求 1 所述的任一多核苷酸中 8-100 个连续的核苷酸。
 11. 一种分离的多核苷酸在影响 SRE 活性中的应用, 其特征在于所述多核苷酸选自权利要求 1 所述的多核苷酸, 该多核苷酸在宿主细胞中外源表达会影响 SRE 活性。
 12. 权利要求 11 所述的应用, 其特征在于所述多核苷酸的序列选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9 的编码区序列或全长序列, 该多核苷酸在宿主细胞中外源表达会抑制 SRE 的活化。
 13. 权利要求 11 所述的应用, 其特征在于所述多核苷酸的序列选自 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17 的编码区序列或全长序列, 该多核苷酸在宿主细胞中外源表达会促进 SRE 的活化。
 14. 权利要求 1 所述的多核苷酸或权利要求 5 所述的多肽在制备预防和/或治疗与增殖或肌肉分化相关的肌肉系统疾病或肿瘤的药物中的用途。
 15. 权利要求 14 所述的用途, 其中所述疾病选自肌肉增生、肌肉重塑、衰老等相关疾病或肿瘤。
 16. 含有权利要求 5 所述的多肽和药学上可接受的载体的药物组合物。
 17. 一种与增殖或肌肉分化相关的肌肉系统疾病或肿瘤的体外检测方法, 其特征在于, 利用权利要求 9 所述的抗体或权利要求 10 所述的核酸片段来检测宿主样品中的多肽的存在或水平。

影响 SRE 活性的多核苷酸及其编码多肽和用途

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及基因表达调控领域，具体地说，本发明涉及一类新的编码具有影响 SRE 活性的功能的人蛋白的多核苷酸，及其编码的多肽，多肽的抗体。本发明还涉及这类新的多核苷酸在宿主细胞中外源表达对 SRE 活性的影响的应用。本发明还涉及所述多肽、抗体在制备预防和治疗与增殖或肌肉分化相关的肌肉系统疾病或肿瘤的药物上的用途。

背景技术

血清反应元件 SRE (serum response element) 是主要存在于两类基因的启动子区域的短的顺式作用元件。其中一类是立早基因，例如 c-fos, fosB, junB, egr-1 and -2 等。可以介导血清或生长因子引起的立早基因的激活，从而刺激细胞生长。另一类基因是平滑肌特异 (SMC) 的基因，其成员主要是一些与肌肉收缩有关的基因和细胞骨架蛋白基因，例如 actins and myosins 等，另外还包括一些转录因子的基因和信号传导因子基因。SRE 的核心序列是 CArG box (CC(A/T)₆GG, CC(A/T-rich)GG) (Minty, A. and Kedes, L. Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. Mol. Cell. Biol., 6: 2125-2136, 1986.)。目前已知有 60 多个基因含有 CArG box，另外有 20 多个可能含有 CArG box 的基因有待于进一步的实验验证。CArG box 调控着两套不同的基因：肌肉分化相关基因和细胞生长相关基因。在特定组织中，这两套基因通常是互相排斥的，例如，在停止生长的血管壁细胞中，只表达一些与平滑肌分化相关的 CArG box 基因，而不表达细胞生长相关的 CArG box 基因。一旦这两套基因的调控发生问题，就会导致病变，例如在血管壁的平滑肌细胞中如果表达了含有 CArG box 的生长相关基因，如 c-fos, PDGF-A，就会产生血管肉瘤。

SRE 的结合蛋白是血清反应因子 SRF (serum response factor)。SRF 能被很多不同的刺激物所激活，例如血清，生长因子，及影响胞内钙浓度的试剂等。SRF 属于 MADS 蛋白家族，具有 DNA 结合和二聚体化双功能的结构域 MADS box，它被磷酸化后，可以形成二聚体，并与其它一些辅助蛋白因子一起和 SRE 结合，形成复合物，从而调控下游基因的表达，并介导很多重要的生物学过程，如生血作用，肌肉生成，损伤修复以及胚胎发育等。在 c-fos 的启动子中，SRF 与 TCF 蛋白作

用。TCF (Ternary complex factor) 是一类重要的转录因子家族, 其成员有elk-1, SAP-1, ERP/NET等。在一些心脏特异基因中, SRF与GATA-4, TEF-1, ATF6, 或myocardin相互作用。在骨骼肌细胞中, SRF 与helix-loop-helix 蛋白, 如MyoD, myogenin, 或 E12 形成复合物。这些与SRF相互作用的蛋白作为辅助因子, 调控SRE的转录活性。SRF还能够与TF II F的大亚基RAP74直接结合, 而TF II F是RNA聚合酶 II 形成起始转录复合物的基本元件, 并且能促进转录延伸。因此, SRF与SRE结合可以起到募集转录起始复合物形成的作用。SRF基因的启动子区还有2个可以结合SRF自身的保守的CArG box, 表明SRF可以通过反馈加强自身的表达。

至少有两个信号传导通路能够介导SRE对胞外信号的反应。一条通路是受MAPK调控的依赖于TCF蛋白家族成员的信号通路。SRE, SRF, 以及TCF蛋白家族的成员能够组成三元复合物。TCFs可以被Ras/MAPK 通路磷酸化, 从而可以调控SRE的转录活性。另一个通路是SRF直接被磷酸化, 不依赖于TCF的信号通路, 主要受Rho信号通路或者PI3K途径来激活。Rho GTPase 家族 (RhoA, Rac1和CDC42) 的某些成员能直接激活SRF。这个通路可能是通过某个未知的辅助因子介导的。促肿瘤试剂TPA, 也可以通过不依赖TCFs的PI3K途径来激活SRF。SRF在多个位点能被激酶磷酸化, 从而被激活。例如, 103位的丝氨酸能够被丝/苏氨酸激酶pp90RSK, MAPKAP激酶2 (属于MAPK p38通路), CaMK II 和IV 分别磷酸化激活。

由于SRF主要控制着细胞生长相关的立早基因和细胞分化相关的肌肉特异基因这两类基因的表达, 这两种不同的角色在不同的组织中必须有严格的调控, 否则就容易出现肌肉系统的疾病或肿瘤。

1. SRF 和肌肉增生

SRF 调控很多心肌特异基因的表达。在心肌增生过程中, 很多 SRF 调控的基因表达发生变化, 这暗示了 SRF 可能参与了其中的调节。转基因方法的研究也证实了这个观点。持续在健康年轻的小鼠心脏中过表达 SRF 导致心脏肥大, 轻度纤维化, 心肌症以及早亡。在骨骼肌细胞中, 鸟类的过度拉伸和负荷引起的肌肉增生能够增加细胞核和细胞质中的 SRF 的水平。另外的研究表明, 对老鼠的骨骼肌机械负重也能够增加 SRF 的水平, 而且降低负荷水平能够相应的引起 SRF 的水平降低。哮喘能引起呼吸道平滑肌负荷的变化, 不知道这是否引起 SRF 浓度或活性的变化。

2. SRF 与肌肉重塑

平滑肌细胞的不正常增殖往往引起血管和呼吸道重塑, 并且引起一些病变, 例如肺紧张pulmonary hypertension, 动脉硬化arteriosclerosis, LAM, 和哮喘asthma. 在人衰竭的心脏中, 发现了一种不同的SRF的剪接体SRF Δ 4, 5. 与正常心脏相比, 病变心脏中全长SRF降低了。实验诱导的兔心脏中也观察到一样的变化。更重要的是, 体外实验发现, SRF Δ 4, 5能够抑制全长SRF的表达, 从而抑制SRF调控的基因表达。

3. SRF与衰老

SRF在衰老中的具体机制并不清楚。但是, 年老和年轻成年小鼠心脏相比, 细胞核和细胞质中SRF都有增加。更重要的是, 在心肌梗塞时, 年轻小鼠的心脏能通过外加SRF而重新搏动, 而年老小鼠则不能。这种SRF的差别可能导致了观察到的衰老引起的立早基因的诱导能力降低, 从而使细胞失去了适应极端条件的能力。奇怪的是, 另一方面在衰老的成纤维细胞中, SRF结合DNA的能力降低了。这可能是因为衰老细胞中SRF被过磷酸化了。肌细胞和成纤维细胞遗传上的差别也许也在一定程度上导致这种不同的发现。在心衰过程中, 心肌中SRF 水平的降低导致其对心脏特异性转录调控作用的改变, 从而引起这些蛋白质转录生成量的改变以对病理性因素作出适应性的变化。如果在心衰的治疗过程中通过增加SRF 的水平以增加 α 2MHC 表达, 达到增加心肌收缩力的目的, 这无疑将为心衰的治疗开辟一条新的思路。

4. SRF与肿瘤

SRF能够促进还是抑制肿瘤产生, 对于不同的细胞, 有不同的效果, 这取决于与SRF相互作用的辅助因子的种类和数量。恶性平滑肌细胞瘤中, 观察到SM-g-actin消失, 并且SRF/MEF2/NK-2 复合物也与正常细胞有不同。另外的研究表明, 在发生间叶细胞的转移的上皮瘤细胞中, SRF是过量而且高度激活的。增加的SRF活性不但增加了SRF自身的表达, 还增加了肌球蛋白, 黏连蛋白vinculin以及所有依赖SRF调控的基因。这些变化以及纺锤样形态的出现依赖于RhoA信号的介导。

抗癌药 distamycin A 能够干扰 SRF 的结合, 从而选择性的降低依赖 SRF 的启动子活性, 进而抑制肌肉生成。在实验中, 用 distamycin A 处理培养的多潜能的 10T1/2 细胞, 其不再能分化成肌肉, 相反, 分化成脂肪纤维瘤的能力却增强了。

发明内容

人基因组学研究目前是国际上的热点, 除大规模测序的方法外, 还缺少从功能研究开始的高通量筛选具有一定功能的基因的方法。针对这种现状及现有药物或试剂的不足, 本发明的目的是提供一类新的编码具有影响 SRE 活性功能的人蛋白的多核苷酸 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9。

本发明的另一目的是提供这类多核苷酸所编码的多肽。

本发明的另一目的是提供含有这类多核苷酸的载体, 和这类多核苷酸及其载体转化或转导的宿主细胞。

本发明的另一目的是提供这类多核苷酸所编码的多肽的抗体和用于检测的核酸分子。

本发明的另一目的是提供这类新的多核苷酸在宿主细胞中外源表达影响 SRE 活性的应用。

本发明的另一目的是提供生产这些多核苷酸和其编码的多肽的方法以及该多核苷酸及其编码的多肽的用途。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

在本发明的第一方面，提供新颖的分离的多核苷酸，它包含编码具有影响 SRE 活性的功能的蛋白的核苷酸序列，该核苷酸序列选自：(a) 与编码含有 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸有至少 70% 相似性的多核苷酸；(b) 编码含有与 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列有至少 70% 相似性的氨基酸序列的多肽的多核苷酸；(c) 与(a)或(b)的多核苷酸互补的多核苷酸。

较佳地，该多核苷酸编码的多肽具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18。

较佳地，该多核苷酸的序列与选自下组的核苷酸序列有至少 85% 相似性：(a) SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17 的编码区序列或全长序列；(b) 在遗传密码简并范围内相应于(a)中提到的序列的至少一个序列；(c) 与(a)或(b)中提到的序列互补的序列杂交的至少一个序列。

更佳地，该多核苷酸的序列选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17 的编码区序列或全长序列。

在本发明的第二方面，提供了上述核苷酸所编码的多肽，它包含具有选自下组中的氨基酸序列的多肽：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18；或与以上任一氨基酸序列具有至少 90% 以上相似性的多肽，或其保守性变异多肽、或其活性片段、或其活性衍生物。

较佳地，该多肽是具有选自下组的氨基酸序列的多肽：SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18。

在本发明的第三方面，提供了含有上述多核苷酸的载体，以及被该载体转化或转导的宿主细胞，还提供了被上述多核苷酸转化或转导的宿主细胞。

在本发明的第四方面，提供了与上述多肽特异性结合的抗体，还提供了可用于检测的核酸分子，它含有上述任一多核苷酸中 8-100 个连续的核苷酸。

在本发明的第五方面，提供了上述多核苷酸在宿主细胞中外源表达影响 SRE 活性的应用。较佳地，该应用包括具有选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9 中的编码区或全长序列的多核苷酸在宿主细胞中外源表达抑制 SRE 活化的应用和具有选自 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17 中的编码区或全长序列的多核苷酸在宿主细胞中外源表达促进 SRE 活化的应用。

在本发明的第六方面，提供了上述多核苷酸和多肽在制备预防和/或治疗与增殖或肌肉分化相关的肌肉系统的疾病或肿瘤的药物中的用途。较佳地，在制备预防和/或治疗肌肉增生、肌肉重塑、衰老等相关疾病或肿瘤的药物中的用途。

在本发明地第七方面，提供了一种药物组合物，它含有安全有效量的本发明中的具有诱导人体细胞凋亡功能的多肽及药学上可接受的载体。

在本发明的第八方面，提供了一种与增殖或肌肉分化相关的肌肉系统的疾病或肿瘤的体外检测方法，利用上述抗体或核酸片段来检测宿主样品中的多肽的存在或水平。

本发明的其他方面由于本文的技术的公开，对本领域技术人员而言是显而易见的。

如本文所用，“分离的”是指物质从其原始环境中分离出来（如果是天然物质，原始环境即是天然环境）。如活体细胞内的天然状态下的多核苷酸和多肽是没有分离纯化的，但同样的多核苷酸或多肽如果从天然状态中与共同存在的其他物质分开，则为分离纯化的。这样的多核苷酸可能是某一载体的一部分，也可能这样的多核苷酸或多肽是某一组合物的一部分，既然载体或组合物不是它们的天然环境的成分，这些多核苷酸或多肽仍然是分离的。

如本文所用，“相似性”是指核苷酸或多肽序列比对过程中用来描述检测序列和目标序列之间相同 DNA 碱基或氨基酸残基顺序所占比例的高低，是一种直接的数量关系，通过部分相同或相似的百分比来度量核苷酸序列或者多肽序列之间相似的程度，此相似性百分比可以通过本领域已有的比对方法来计算，例子有两两序列间的比对方法 FASTA 程序 (Pearson, W. R. and Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 2444 - 2448), BLAST 程序 (Altschul, S. F., et al. 1990 Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410) 等，或多序列比对方法 CLUSTAL W (CORPET, F. 1998 Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. Nucleic Acids Res., 16:10881-10890) 等。同源序列是指从某一共同祖先经趋异进化而形成的不同序列，根据相似性百分比可以判断比对序列间的同源性。当基因或蛋白质间相似程度很高时，表示它们具有一段共同的进化历程，从而判断它

们会具有相似的生物学功能。当具有至少 50%的相似程度时, 比较容易推测检测序列和目标序列可能是同源序列。较佳地, 具有至少 70%的相似程度; 更佳地, 具有至少 85%的相似程度; 最佳地, 具有至少 90%的相似程度。而当相似性程度低于 20%时, 就难以确定或者根本无法确定其是否具有同源性。

本发明的多核苷酸包括其互补链可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 形式包括 cDNA、基因组 DNA 或人工合成的 DNA。DNA 可以是单链的或是双链的。DNA 可以是编码链或非编码链。如本文所用, “编码具有诱导细胞凋亡功能的多肽的多核苷酸” 可以是包括编码此多肽的多核苷酸, 也可以是还包括附加编码序列和/或非编码序列的多核苷酸。以 SREIF1 所编码的多肽为例, 编码成熟多肽的编码区序列可以与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列相同或者是遗传密码简并的变异体。如本文所用, “遗传密码简并” 是指一个氨基酸有几个密码子的现象。例如在本发明中 SREIF1 所编码的多肽的遗传密码简并的变异体指编码具有 SEQ ID NO:2 的多肽的核苷酸, 且此核苷酸与 SEQ ID NO:1 所示的编码区序列有差别。对于其他具有诱导人体细胞凋亡功能的多肽, 可依此类推。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体, 它编码与本发明有相同的氨基酸序列的多肽或多肽的片段、类似物和衍生物。该多核苷酸的变异体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体。这些核苷酸变异体包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的, 等位变异体是一个多核苷酸的替换形式, 它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入, 但不会从实质上改变其编码的多肽的功能。

本发明还涉及与本发明所述多核苷酸序列的互补序列杂交且两个序列间具有至少 50%, 较佳地至少 70%, 更佳地至少 80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与此多核苷酸序列的互补序列可杂交的多核苷酸。在本发明中, “严格条件” 是指: (1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱, 如 $0.2\times\text{SSC}$, 0.1%SDS, 60℃; 或 (2) 杂交时加有变性剂, 如 50%(v/v) 甲酰胺, 0.1%小牛血清/0.1%Ficoll, 42℃等; 或 (3) 仅在两条序列之间的相同性至少在 95%以上, 更好的是在 97%以上时才发生杂交。并且, 可杂交的多核苷酸编码的多肽与本发明所述的多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明的多核苷酸序列能用本领域已有的方法获得。这些技术包括但不限于: (1) 通过杂交技术分离 DNA 序列; (2) 人工化学合成 DNA 序列; (3) 通过构建 cDNA 文库大规模获得所需的多核苷酸; (4) PCR 扩增技术。

第一种方法是先构建基因组文库或者 cDNA 文库, 然后通过分子杂交等技术从基因组文库或 cDNA 文库中筛选出目的基因或序列。当生物基因组比较小时, 此方法较易成功; 当生物基因组很大时, 构建其完整的基因组文库较困难, 再从庞大的文库中去克隆目的基因的工程量也很大。

第二种方法是按设计好的序列一次合成 100-200bp 长的 DNA 片段,再用这些合成的片段组合连接成完整的基因。这种合成基因的序列的方法的价格十分昂贵。此方法主要用于合成作为引物、接头等的核酸片段。

第三种方法是用本领域通常的方法构建 cDNA 文库,多次测序后,结合生物信息学分析技术(Ota et al. Nat Genet. 2004 Jan;36(1):40-5),大规模获得目的 cDNA 克隆。生物信息学分析技术包括但不限于用 BLAST 或 BLAT 与已有的公共数据库比对,如 refseq 数据库等;用 Phred 算法评估测序质量;用计算转录起始密码子 ATG 的出现概率的 ATGpr 算法筛选全长 cDNA 序列等。

第四种方法用 PCR 技术扩增 DNA/RNA 的方法(Saiki, et al. Science 1985; 230: 1350-1354)。用于 PCR 的引物可根据本文所公开的本发明的序列信息适当地选择,并可用常规方法合成。可用常规方法如通过凝胶电泳分离和纯化扩增的 DNA/RNA 片段。本发明优选应用的方法是两步法通量化 RT-PCR 技术在混合 cDNA 文库中扩增得到大量的 cDNA 克隆。混合 cDNA 文库包括现有的 cDNA 文库和肿瘤文库。

本发明的基因,或者各种 DNA 片段等核苷酸序列的测定可用常规方法,如双脱氧链终止法(Sanger et al. PNAS, 1977, 74: 5463-5467);也可用商业测序试剂盒等。为了获得全长的 cDNA 序列,测序需要反复进行。有时需要测定多个克隆的 cDNA 序列,才能拼接成全长的 cDNA 序列。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽、合成多肽,优选重组多肽。本发明的多肽可以是天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(如细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。本发明的多肽可以是糖基化的,也可以是非糖基化的。本发明的多肽可以包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

本发明还包括具有诱导人体细胞凋亡功能的多核苷酸编码的人蛋白多肽的片段、衍生物和类似物。术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持与本发明的天然具有诱导人体细胞凋亡功能的人蛋白多肽相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物和类似物可以是:(a)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优先保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(b)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(c)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物)融合所形成的多肽,或(d)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列)。

本发明的多肽可以通过常规的重组 DNA 技术,利用本发明的多核苷酸序列来表达或生产重组的具有诱导人体细胞凋亡功能的蛋白多肽(Science, 1984; 224: 1431)。包括以下步骤:

(1) 用本发明的多核苷酸(或其变异体),或用含有此多核苷酸的表达载体转化或转导合适

的宿主细胞；

(2) 在合适的培养基中培养步骤(1)得到的宿主细胞；

(3) 从培养基或细胞中分离、纯化所需的蛋白多肽。

本发明中的多核苷酸和多肽优选以分离的形式提供，更佳地被纯化至均质。

本发明也涉及包含本发明所述多核苷酸的载体。本发明中，编码具有诱导人体细胞凋亡功能的人蛋白多肽的多核苷酸序列可以插入到重组表达载体中。术语“重组表达载体”指本领域熟知的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒，如腺病毒、逆转录病毒，或者其他载体。在本发明中适用的载体可以是原核表达载体，也可以是真核表达载体，如在细菌中表达的基于 T7 的表达载体(Rosenberg, et al. Gene, 1987, 56:125)，在哺乳动物细胞中高表达的真核表达载体 pcDNA[™]3.1/myc-hisB(-) (Invitrogen)，pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen，以下缩写为 pcDT)。本发明优选 pcDT，它可以直接与 PCR 产物连接来构建真核表达载体，大大提高了规模化生产的效率。只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以应用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。用本领域的技术人员熟知的方法来构建含有本发明所述多核苷酸序列和转录/翻译控制信号的表达载体即可。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组 DNA 技术等(Sambrook, et al. Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 1989)。

本发明的多核苷酸序列可有效地连接到表达载体中的适当的启动子上来指导 mRNA 合成。这些启动子的代表性例子有：大肠杆菌的 lac 或 trp 启动子；λ 噬菌体的 P_L 启动子；真核启动子包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、反转录病毒的 LTRs 和其他一些已知的可控制基因在原核或真核细胞或其病毒中表达的启动子。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。表达载体优选的包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性、或真核细胞培养用的绿色荧光蛋白(GFP)、新霉素抗性、及二氢叶酸还原酶。

本发明还涉及用上述载体或者本发明的多核苷酸经基因工程产生的宿主细胞。本发明的载体和多核苷酸可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达具有诱导人体细胞凋亡功能的蛋白质。宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌；植物细胞；果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞；CHO、COS 或 Bowes 黑色素瘤细胞的动物细胞；293T、Hela 细胞等。

本发明的多核苷酸在高等真核细胞中表达时，如果在载体中插入增强子序列时将会使转录增强。增强子是 DNA 的顺式作用因子，通常有 10-300 个碱基对，作用于启动子以增强基因的转录。

例子有：在复制起始点下游的 100-270 个碱基对的 SV40 增强子、在复制起始点下游的多瘤增强子以及腺病毒增强子等。

本领域的普通技术人员都知道如何选择适当的载体、启动子、增强子和宿主细胞。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主细胞为原核细胞如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收集，用 CaCl_2 法处理，所用步骤是本领域众所周知的。可供选择的是 MgCl_2 处理，也可用电穿孔的方法处理。当宿主是真核细胞时，可选择以下转染方法：磷酸钙共沉淀法、常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。获得的转化子可以用常规方法培养，来表达本发明的多核苷酸所编码的多肽。根据所选的宿主细胞选择合适的常规培养基，在适于宿主细胞生长的条件下培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用适当的方法如温度转化或化学诱导，来诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

上述方法中的重组多肽可包被于细胞内、细胞外或在细胞膜上表达或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其他特性通过各种分离方法分离和纯化重组多肽。这些方法是本领域技术人员所熟知的，如常规的复性处理，用蛋白沉淀剂处理（盐析方法）、离心、渗透破菌、超声波处理、超离心、分子筛层析（凝胶过滤）、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析和其它各种液相层析技术或这些方法的结合。

本发明还涉及与本发明多核苷酸的任何一部分同源的核酸片段。如本文所用，“核酸片段”的长度至少含有 15 个核苷酸，较好的是至少 30 个核苷酸，更好的是至少 50 个核苷酸，最好的是至少 100 个核苷酸。此核酸片段通常是在本发明的核苷酸序列信息的基础上化学合成的 DNA 序列。上述核酸片段可以用于 PCR 扩增技术（如作为引物）以确定和/或分离编码具有诱导人体细胞凋亡功能的多核苷酸；也可以作为杂交所用的探针。也可以用于 RNA 干扰技术。本发明的多核苷酸的一部分或全部也可作为探针固定在微阵列（Microarray）或 DNA 芯片上，用于分析组织中基因的差异表达和基因诊断。探针的标记可用放射性同位素，荧光素或酶（如碱性磷酸酶）等。

本发明的多肽可以直接作为药物治疗疾病，如与增殖或肌肉分化相关的肌肉系统疾病和肿瘤等；还可用于筛选促进或对抗具有影响 SRE 活性的功能的蛋白的抗体、多肽或其它配体，例如，筛选可用于促进或抑制本发明的蛋白的功能的抗体。用表达的重组的本发明的蛋白来筛选多肽库，用于寻找有治疗价值的能够促进或抑制本发明的蛋白的功能的多肽分子。

本发明的多肽可以单独使用或者与合适的药物载体组合后使用。组合物包含安全有效量的多肽或拮抗剂及不影响药物效果的载体和赋型剂。这些载体可以是水、葡萄糖、乙醇、盐类、缓冲液、甘油及它们的组合。药物组合物可以以方便的方式给药，如通过局部、静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、鼻内或皮内的给药途径。给药于患者的用量取决于许多因素，如给药方式、待治疗者

的健康条件和诊断医生的判断。

本发明的多肽也可以通过在活体表达这些多肽来使用。例如患者的细胞可以通过在体外用编码本发明多肽的基因进行基因工程操作，然后将工程细胞提供给患者，使工程细胞在体内高表达这种多肽，从而达到治疗的目的。

具有影响 SRE 活性功能的人蛋白的多核苷酸也可用于多种治疗目的。可用在基因治疗技术中来治疗由于具有影响 SRE 活性的功能的人蛋白表达异常或活性异常导致的疾病。重组的基因治疗载体（如病毒载体）可设计成表达变异的具有影响 SRE 活性的功能的人蛋白，来抑制内源性的具有影响 SRE 活性功能的人蛋白的活性。重组的具有影响 SRE 活性功能的人蛋白基因也可包装到脂质体中转移至细胞内。

抑制本发明多肽 mRNA 的寡聚核苷酸（包括反义 RNA 和 DNA）以及核酸也在本发明的范围之内。反义 RNA 和 DNA 以及核酸可用本领域已有的方法合成。为了增加核酸分子的稳定性，可用多种方法对其进行修饰，如增加两侧的序列长度，核糖核苷间的连接用磷酸硫酯键或肽键。

本发明的多肽及其片段、衍生物、类似物或表达它们的细胞可以作为抗原来生产抗体。这些抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab 片段和 Fab 表达文库产生的抗体。本发明的多肽的抗体可用本领域公知的抗体制备方法生产。例子有：单克隆抗体可用杂交瘤技术生产 (Kohler and Milstein. *Nature*, 1975, 256: 495-497)。多克隆抗体的生产可用本发明的多肽免疫动物，如家兔、小鼠、大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应，包括但不限于弗氏佐剂。将人恒定区和非人源的可变区结合的嵌合抗体可用已有的技术产生 (Morrison et al. *PNAS*, 1985, 81: 6851)。单链抗体也可用已有的技术生产 (U. S. Pat No. 4946778)。

本发明的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活体标本中的具有诱导细胞凋亡功能的蛋白。还可以在临床上用于与具有诱导细胞凋亡功能的人蛋白相关的疾病的临床诊断、治疗、疗效评价等。例如用放射性同位素标记与本发明的多肽结合的单克隆抗体，然后注入体内跟踪其位置和分布，可以作为一种非创伤性诊断方法来定位肿瘤细胞，或判断肿瘤细胞是否转移。本发明中的抗体还可以用于治疗或预防与具有影响 SRE 活性功能的人蛋白相关的疾病。给予适当剂量的抗体可以刺激或阻断具有影响 SRE 活性功能的人蛋白的产生或活性。

本发明还涉及定量和定位检测具有影响 SRE 活性功能的蛋白水平的诊断试验方法。这些试验是本领域所熟知的，且包括 FISH 测定和放射免疫测定。实验中检测的具有影响 SRE 活性功能的蛋白水平，可以用作解释具有影响 SRE 活性功能的蛋白在各种疾病中的重要性和用于诊断具有影响 SRE 活性功能的蛋白起作用的疾病。

具有影响 SRE 活性功能的蛋白的多核苷酸可用于具有影响 SRE 活性功能的蛋白相关疾病的诊

断和治疗。在诊断方面,具有影响 SRE 活性功能的蛋白的多核苷酸可用于检测具有影响 SRE 活性功能的蛋白的表达与否,或在疾病状态下具有影响 SRE 活性功能的蛋白的异常表达。如具有影响 SRE 活性功能的蛋白的 DNA 序列可用于对活检标本的杂交以判断具有影响 SRE 活性功能的蛋白的表达异常。杂交技术是本领域已公开的成熟技术,包括 Southern 印迹法、Northern 印迹法、原位杂交等,相关的试剂盒可以从商业途径获得。本发明的多核苷酸的一部分或全部可作为探针固定在微阵列(Microarray)或 DNA 芯片上,用于分析组织中基因的差异表达和基因诊断。用具有影响 SRE 活性功能的蛋白特异的引物进行 RNA-聚合酶链式反应(RT-PCR)体外扩增也可以检测具有影响 SRE 活性功能的蛋白的转录产物。

检测具有影响 SRE 活性功能的蛋白基因的突变也可用于诊断具有影响 SRE 活性功能的蛋白相关的疾病。具有影响 SRE 活性功能的蛋白基因的突变形式包括与正常野生型的具有影响 SRE 活性功能的蛋白的 DNA 序列相比的点突变、易位、缺失、重组和其它任何异常等。可用本领域已有的技术如 Southern 印迹法、DNA 序列分析、PCR 和原位杂交检测突变。另外,突变有可能影响蛋白的表达,因此用 Northern 印迹法、Western 印迹法可间接判断基因有无突变。

基因 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 在实验中所有用到的正常组织、胎儿组织、肿瘤组织中都有表达,说明其为人体自身重要的 SRE 影响因子;在不同的组织中表达量高低有差别,说明其在不同的组织中发挥功能的程度不同。

以下对本发明的实施方案进一步详细说明。

本发明通过对 NCBI 的 refseq 数据库进行人功能未知预测基因检索,获得人未知功能基因序列,进一步利用 Human_est 数据库通过 BLASTn 方法进行序列校正,根据校正后得到的序列设计基因特异引物,从混合人组织 cDNA 文库中通过两步法通量化 RT-PCR 技术扩增得到目的基因的编码区 cDNA 片段。此编码区 cDNA 片段与 pcDT 重组构建真核表达载体。然后采用双荧光素酶报告基因法检测 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 基因对 SRE 的影响。该方法采用的是体内信号转导途径顺式报导系统,其中所用的 SRE-luc 报告质粒载有萤火虫荧光素酶基因,该基因的表达由合成的启动子所调控,其中包含基本的启动子元件(TATA box),以及转录因子 SRE 的结合位点, SRE-luc 报告质粒的结构图如图 2 所示。当细胞内的 SRE 通过某种信号转导途径而被活化时, SRE 便会结合于报告质粒 SRE-luc 的增强子元件,从而启动报告基因萤火虫荧光素酶基因的转录,进一步胞内翻译成荧光素酶,导致细胞内荧光素酶数量增加,活性增强;相反,当细胞内的 SRE 活化受到抑制的时候,荧光素酶的表达量及活性就低。所以,通过检测荧光素酶的活性,便可以反映不同刺激物以及共转染的目的基因对细胞内 SRE 是否具有促进活化或者抑制活化的

功能。pRL-SV40 报告质粒载体如图 2 所示, 含有水母荧光素酶基因, 该基因的表达由猿猴病毒 40 (SV40) 增强子/启动子所调控, 转染哺乳动物细胞后可以产生较强的基本水平的水母荧光素酶的表达, 且表达的活性不受 SRE 活化与否的调节, 所以在实验中用作内对照报告基因。实验表明本发明的多肽具有显著、稳定的影响 SRE 活性的作用。

由于采用了以上技术方案, 本发明具有如下优点:

- 1、提供了规模化克隆和筛选新基因的技术平台。
- 2、提供了人类新功能基因 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 的 cDNA 序列及其编码多肽;
- 3、首次发现人类新功能基因 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 具有影响 SRE 活性的作用, 并且高效、稳定;
- 4、SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 在机体多数正常细胞表达, 说明其为自身重要的 SRE 调控分子。
- 5、基于上述的 4 个优点, 本发明为进一步研究 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 与 SRE 之间的调控关系, 以及开发治疗与增殖和肌肉分化相关疾病或肿瘤的新药物, 为开创新的临床诊断、疗效评价及预后指标奠定必要的基础。

附图说明

图 1、真核表达载体 pcDT-SREIFx 的构建示意图 (SREIFx 选自 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9)

图 2、pSRE-luc 荧光素酶基因报告质粒的结构图 (上图) 和 pRL-SV40 报告质粒结构图 (下图)

图 3、SREIF1、2、3、4、5 外源表达抑制 PMA 对 SRE 的活化

图 4、SREIF6、7、8、9 外源表达促进 SRE 活化

具体实施方式

下面结合具体实施例和附图, 进一步阐述本发明。这些实施例和附图仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 如《分子克隆实验指南》(2002 年第三版[美]萨姆布鲁克等著, 科学出版社)中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1、两步法通量化 RT-PCR 技术扩增目的基因

- (1) 对 NCBI 的 refseq 数据库进行人功能未知预测基因检索, 获得人未知功能基因序列,

并利用 Human_est 数据库通过 BLASTn 方法进行序列校正，最终得到的序列设定为下组序列：SEQ ID NO. 1、SEQ ID NO. 3、SEQ ID NO. 5、SEQ ID NO. 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17。根据此类序列设计基因 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 的特异引物：

基因名称	上游引物(5' -3')	下游引物(5' -3')
SREIF1	ctgctcgcacaggactcgg	gggctataactcagactgggatctg
SREIF2	cagacgccacggagtttgtg	tggcaccagaaaaacccatctc
SREIF3	gtgcgatgagcttcttcggc	tgcaagtaacgggtcaactgagc
SREIF4	gtgatatgagcaacaatggaccag	cactatattactcactcgtcaccactctg
SREIF5	caccatgatgcaaactctgcga	tgggtcgaagaaggtgctgg
SREIF6	aggacctgggtttcagtgatgag	cctgatagccagtcgagttctcttatatc
SREIF7	gctcctctggctgatggcat	tcctgggacagagccactaagtc
SREIF8	ggactttccttacctgtttttccag	ggctatgtggctgttgtgtgc
SREIF9	cgttgccattcaacatcatg	ggaaaataaactgagcctactgaggag

(2) 用上述引物，按目的基因的表达谱在现有的 cDNA 文库和肿瘤文库中选择模板，进行初扩。现有的文库包括 12 种人体正常组织（心、胰、睾丸、卵巢、前列腺、结肠、小肠、骨骼肌、胸腺、淋巴结、扁桃体、白细胞）；6 种人肿瘤组织（肺癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌）；和 8 种胎儿组织（胎肺、胎心、胎肝、胎脾、胎肾、胎脑、胎骨骼肌、胎胸腺）的 cDNA 文库（Clonetch, K1420-1, 1241-1）。初扩反应条件如下：

50μl PCR 反应：

cDNA 混合库	各 1.0μl
5' , 3' 引物	终浓度为 2pmol/μl
10× Pyrobest buffer	5μl
2.5mM dNTPs	4μl
Pyrobest	1μl
双蒸水	补足至 50μl

PCR 延伸时间根据所扩目的基因的最长片段，按 50sec/Kb 的原则进行扩增：

94℃ 5 分钟; 94℃ 30 秒, 64℃ 30 秒, 72℃ 50sec/Kb; 72℃ 10 分钟; 4℃ ∞

28 个循环

初扩产物纯化到 30μl, 以去除 PCR 反应体系中大量的引物及 dNTPs 等, 并浓缩整个体系, 得到对应目的基因序列的二级扩增库, 作为二扩(大扩)的模板。

(3) 将(2)中的纯化产物作为模板, 分别对每个目的基因进行二扩, 反应条件如下:

50μl PCR (每个基因) 反应:

一扩纯化产物	1.6μl
5' , 3' 引物	终浓度为 2pmol/μl
10× Ex-Taq buffer	5μl
2.5mM dNTP	4μl
Ex-Taq	0.5μl
双蒸水	补足至 50μl

PCR 延伸时间根据所扩目的基因的最长片段, 按 50sec/Kb 的原则进行扩增:

94℃ 5 分钟; 94℃ 30 秒, 64℃ 30 秒, 72℃ 50sec/Kb; 72℃ 10 分钟; 4℃ ∞

30 个循环

得到的 PCR 产物取 10μl 上样电泳, 挑选有扩增条带的 PCR 产物, 进行等体积纯化 (40μl)。通过两步 PCR 反应扩增出非单一条带的基因用 Qiagen 胶回收试剂盒切胶回收目的片段。扩增的结果表明, 这些组织的细胞中都存在基因 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 的 cDNA, 说明 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 在这些组织的细胞中都产生了基因 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 的转录产物, 有较广的表达图谱, 在多种组织中参与转录因子的调节。

实施例 2、目的基因真核表达载体的构建

将二扩纯化产物和真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, 缩写为 pcDT), 按照试剂盒制造厂商建议的条件进行连接反应。连接产物电击法转化大肠杆菌 DH5 α, 转化物在含氨苄青霉素的固体 LB 平板培养基上生长, 挑选生长的单一克隆菌落, 提取质粒, 用 EcoRI 酶切, 酶切产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定, 挑选有插入片段的阳性克隆, 通过测序 (ABI PRISM 3700 DNA 分析仪) 选出正确的正向插入克隆, 各自命名为 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9。

同时收集培养液, 用 SDS-PAGE 分析沉淀蛋白, 获得 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 多肽。

SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 蛋白分析结果显示: SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9

蛋白序列如下组序列：SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 4、SEQ ID NO. 6、SEQ ID NO. 8、SEQ ID NO. 10、SEQ ID NO. 12、SEQ ID NO. 14、SEQ ID NO. 16、SEQ ID NO. 18 所示。

实施例 3、双荧光素酶报告基因法测定目的基因对 PMA 诱导 SRE 活化的抑制作用。

用目的基因和报告基因 pSRE-luc, pRL-TK 共转染人胚胎肾 293T 细胞, 通过分别检测两种荧光素酶活性来测定 SRE 的活性。共转染的方法为阳离子非脂性转染法, 采用威格拉斯生物技术(北京)有限公司, 按产品说明书所述进行。

转染操作步骤如下:

(1) 细胞培养: 将 293T 细胞(ATCC Number: CRL-11268)(2.0×10^4)用含 10%胎牛血清的 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)培养基(Hyclone, SH0022.02)铺在 96 孔细胞培养板(Costar, 3599)上, 接种密度 1.2 万/孔, 培养基体积 100 μ l/孔, 在 5%CO₂, 37℃的培养箱中培养 18-24 小时。

(2) 制备转染复合物:

取 2.5 μ l 生理盐水稀释 40ng 报告基因 pSRE-luc, 4ng pRL-TK 和 50ng 目的质粒, 缓慢混合均匀; 同样用 2.5 μ l 生理盐水稀释适当量的 vigofect (一般为 0.04 μ l/孔), 缓慢混合均匀, 在室温下放置 5 分钟, 与稀释的 DNA 缓慢混合, 室温放置 15 分钟, 以形成转染复合物。

(3) 转染: 将转染复合物缓慢滴入细胞培养板(5 μ l/孔), 轻微摇匀。5%CO₂, 37℃的培养箱中培养 18-24 小时。

转染 18-24 小时后用 PMA(十四酸佛波酯, Calbiochem, 524400, 终浓度 50ng/ml)刺激细胞, 37℃孵箱培养。6-8 小时后弃去培养液, 加入 Passive Lysis Buffer (Promega, E1960), 放入 -80℃冰箱。检测时, 取出细胞板, 室温下自然解冻, 使细胞完全裂解, 10 μ l 细胞裂解液移至白色荧光板, 加入 Dual-luciferase 双报告系统检测底物, 用微孔板酶标仪(Genios Pro, Tecan)检测荧光素酶活性。

设定转染 pcDT 空载体、PMA 刺激时细胞内的荧光素酶活性比值(萤火虫荧光素酶荧光强度/水母荧光素酶荧光强度表示)为 1, 其他条件下细胞内的荧光素酶活性比值以此为标准, 用相对值表示。结果参照图 3, 分别用待检质粒和 pSRE-luc 共转染 293T 细胞, 用 PMA 刺激的 293T 细胞中荧光素酶的活性明显地下调, 表明 SREIF1、2、3、4、5 在 293T 细胞中的表达产物对 PMA 诱导 SRE 活化有强的抑制作用。

根据以上实验结果可以确定, 当 SRE 表达水平的上调引起与某些疾病相关基因的转录表达相应增加时, SREIF1、2、3、4、5 对 SRE 活化的抑制作用可以阻止该疾病的发生和发展。因此, 本发明可以用于制备预防和治疗由于 SRE 过表达而引起的肌肉系统疾病或肿瘤的药物。

实施例 4、双荧光素酶报告基因法测定目的基因对 SRE 活化的促进作用。

除不用刺激物刺激外，其余实验过程与步骤同实施例 3。

结果参照图 4，分别用待检质粒和 pSRE-luc 共转染 293T 细胞，以转染空载体 pcDT 时荧光素酶活性比值为标准 100%，待检质粒可明显促进 SRE 的活化，pSRE-luc 荧光素酶活性明显上调，表明 SREIF1、2、3、4、5 在 293T 细胞中的表达产物对 SRE 活化有强的促进作用。

根据以上实验结果可以确定，当 SRE 表达水平的下调引起与某些疾病相关基因的转录表达相应减少时，SREIF6、7、8、9 对 SRE 活化的促进作用可以阻止该疾病的发生和发展。因此，本发明可以用于制备预防和治疗由于 SRE 表达较少引起的肌肉系统疾病或肿瘤的药物。

实施例 5、抗体制备

抗原选用原核细胞或真核细胞表达的 SREIF1、2、3、4、5、6、7、8、9 蛋白全长或部分肽段，也可以合成多肽作为抗原。

多克隆抗体的制备：免疫动物选用成年雄性新西兰兔或 BALb/c 小鼠，初次免疫用 200ug（新西兰兔）或 20ug（BALb/c 小鼠）抗原与等体积弗氏完全佐剂（FCA）充分乳化后，于背部皮下多点注射。初次免疫后 21、42、63 天，用弗氏不完全佐剂（FIA）完全乳化的抗原蛋白，各加强免疫 1 次，用量同前。每次免疫后 7~10 天，ELISA 方法检测血清效价，达到 1×10^4 时，放血分离血清。Western blot 鉴定抗体特异性。

单克隆抗体制备：免疫 BALb/c 小鼠同前，取脾脏制成 B 细胞悬液，与对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，通过 HAT（H：次黄嘌呤；A：氨基嘌呤；T：胸腺嘧啶核苷）选择性培养，获得杂交细胞系，再通过 ELISA 方法检测抗体效价，筛选出特定的杂交瘤细胞系，并得到单克隆抗体。

序 列 表

<110> 北京诺赛基因组研究中心有限公司

<120> 影响 SRE 活性的多核苷酸及其编码多肽和用途

<130>

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1280

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (105).. (794)

<400> 1	
agttgctttg ctgttagcct gttggacctt cgagcctagc tgctcgcacaggactcggcc	60
acctgccctt cctgcaccga ctggccagct caagagggtt ggat atg gac ctt ctt	116
Met Asp Leu Leu	
1	
caa ttc ctg gcc ttc ctc ttt gtc ctg ctt ttg tct ggg atg gga gcc	164
Gln Phe Leu Ala Phe Leu Phe Val Leu Leu Leu Ser Gly Met Gly Ala	
5 10 15 20	
aca ggc acc ttg agg acc tcc ctg gac cca agc ctg gag atc tac aag	212
Thr Gly Thr Leu Arg Thr Ser Leu Asp Pro Ser Leu Glu Ile Tyr Lys	
25 30 35	
aag atg ttt gag gtg aag cgg cgg gag cag ctg ttg gca ctg aag aac	260
Lys Met Phe Glu Val Lys Arg Arg Glu Gln Leu Leu Ala Leu Lys Asn	
40 45 50	
ctg gca cag ctg aac gac atc cac cag cag tac aag atc ctt gat gtc	308
Leu Ala Gln Leu Asn Asp Ile His Gln Gln Tyr Lys Ile Leu Asp Val	
55 60 65	
atg ctc aag ggg ctc ttt aag gtg ctg gag gac tcc cgg aca gtg ctc	356
Met Leu Lys Gly Leu Phe Lys Val Leu Glu Asp Ser Arg Thr Val Leu	
70 75 80	
acc gct gct gat gtg ctc cca gat ggg ccc ttc ccc cag gac gag aag	404
Thr Ala Ala Asp Val Leu Pro Asp Gly Pro Phe Pro Gln Asp Glu Lys	

85	90	95	100	
ctg aag gat gct ttc tcc cac gtg gtg gag aac acg gcc ttc ttc ggc				452
Leu Lys Asp Ala Phe Ser His Val Val Glu Asn Thr Ala Phe Phe Gly				
	105	110	115	
gat gtg gtg ctg cgc ttc ccg agg att gtg cac tat tac ttt gac cac				500
Asp Val Val Leu Arg Phe Pro Arg Ile Val His Tyr Tyr Phe Asp His				
	120	125	130	
aac tcc aac tgg aac ctc ctc atc cgc tgg ggt atc agt ttc tgc aac				548
Asn Ser Asn Trp Asn Leu Leu Ile Arg Trp Gly Ile Ser Phe Cys Asn				
	135	140	145	
cag aca ggc gtc ttc aac cag ggg ccc cac tcg ccc atc ctc agc ctg				596
Gln Thr Gly Val Phe Asn Gln Gly Pro His Ser Pro Ile Leu Ser Leu				
	150	155	160	
atg gcc cag gag ctg ggg atc agt gag aaa gac tcc aac ttc cag aac				644
Met Ala Gln Glu Leu Gly Ile Ser Glu Lys Asp Ser Asn Phe Gln Asn				
	165	170	175	180
cca ttt aaa atc gac cgc aca gag ttc att ccc agc act gac cct ttc				692
Pro Phe Lys Ile Asp Arg Thr Glu Phe Ile Pro Ser Thr Asp Pro Phe				
	185	190	195	
cag aag gcc ctg aga gaa gaa gag aaa cgc cga aag aaa gag gag aag				740
Gln Lys Ala Leu Arg Glu Glu Glu Lys Arg Arg Lys Lys Glu Glu Lys				
	200	205	210	
cgg aag gag atc cga aaa ggc cca agg atc tcc aga tcc cag tct gag				788
Arg Lys Glu Ile Arg Lys Gly Pro Arg Ile Ser Arg Ser Gln Ser Glu				
	215	220	225	
tta tag ccctggagca gctcagggt cagggggcca caaggaggca ggtcgggagg				844
Leu				
aagaagaggt ggaggtgtgg ttgtggtgga gagcaccagc tagccccttc cagaagggga				904
ggccacattt gcccggcccc ctggagctgg gtctgagccc cagctgaagg gactgagcct				964
cagatggctg gattttctct caggggcctc ctgctgaagg ggccttcaga ggattttatg				1024
ctggaaatat gaccctgtgc agactgctgg gggaggcagg aggatgcctg cctggaccct				1084
gttggtggct gaagacctct ggccagctgg cttccgccct tgggtggggaa gcagcagaac				1144
taggtttctga gccacgggtc aggggtgccac cctgctgctg gcccactgt gtcacagagc				1204
tgcttggcac aggtcccagc ccctctgcag agacacaata aaagccagca gaccctttga				1264

aaaaaaaaa aaaaaa

1280

<210> 2

<211> 229

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Met Asp Leu Leu Gln Phe Leu Ala Phe Leu Phe Val Leu Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Gly Met Gly Ala Thr Gly Thr Leu Arg Thr Ser Leu Asp Pro Ser Leu
 20 25 30

Glu Ile Tyr Lys Lys Met Phe Glu Val Lys Arg Arg Glu Gln Leu Leu
 35 40 45

Ala Leu Lys Asn Leu Ala Gln Leu Asn Asp Ile His Gln Gln Tyr Lys
 50 55 60

Ile Leu Asp Val Met Leu Lys Gly Leu Phe Lys Val Leu Glu Asp Ser
 65 70 75 80

Arg Thr Val Leu Thr Ala Ala Asp Val Leu Pro Asp Gly Pro Phe Pro
 85 90 95

Gln Asp Glu Lys Leu Lys Asp Ala Phe Ser His Val Val Glu Asn Thr
 100 105 110

Ala Phe Phe Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Pro Arg Ile Val His Tyr
 115 120 125

Tyr Phe Asp His Asn Ser Asn Trp Asn Leu Leu Ile Arg Trp Gly Ile
 130 135 140

Ser Phe Cys Asn Gln Thr Gly Val Phe Asn Gln Gly Pro His Ser Pro
 145 150 155 160

Ile Leu Ser Leu Met Ala Gln Glu Leu Gly Ile Ser Glu Lys Asp Ser
165 170 175

Asn Phe Gln Asn Pro Phe Lys Ile Asp Arg Thr Glu Phe Ile Pro Ser
180 185 190

Thr Asp Pro Phe Gln Lys Ala Leu Arg Glu Glu Glu Lys Arg Arg Lys
195 200 205

Lys Glu Glu Lys Arg Lys Glu Ile Arg Lys Gly Pro Arg Ile Ser Arg
210 215 220

Ser Gln Ser Glu Leu
225

<210> 3
<211> 755
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (76).. (630)

<400> 3
aactagctcc accctctaac cccactcca gctgcagacg ccacggagtt tgtgcagggg 60

cgcagcgctc cagcc atg gcg cgt tcg etc gtc cac gac acc gtg ttc tac 111
Met Ala Arg Ser Leu Val His Asp Thr Val Phe Tyr
1 5 10

tgc ctg agt gta tac cag gta aaa ata agc ccc aca cct cag ctg ggg 159
Cys Leu Ser Val Tyr Gln Val Lys Ile Ser Pro Thr Pro Gln Leu Gly
15 20 25

gca gca tca agc gca gaa ggc cat gtt ggc caa gga gct cca ggc etc 207
Ala Ala Ser Ser Ala Glu Gly His Val Gly Gln Gly Ala Pro Gly Leu
30 35 40

atg ggt aat atg aac cct gag ggc ggt gtg aac cac gag aac ggc atg 255
Met Gly Asn Met Asn Pro Glu Gly Gly Val Asn His Glu Asn Gly Met
45 50 55 60

aac cgc gat ggc ggc atg atc ccc gag ggc ggc ggt gga aac cag gag 303
Asn Arg Asp Gly Gly Met Ile Pro Glu Gly Gly Gly Gly Asn Gln Glu

65	70	75	
cct cgg cag cag ccg cag ccc ccg ccg gag gag ccg gcc cag gcg gcc			351
Pro Arg Gln Gln Pro Gln Pro Pro Pro Glu Glu Pro Ala Gln Ala Ala			
80	85	90	
atg gag ggt ccg cag ccc gag aac atg cag cca cga act cgg cgc acg			399
Met Glu Gly Pro Gln Pro Glu Asn Met Gln Pro Arg Thr Arg Arg Thr			
95	100	105	
aag ttc acg ctg ttg cag gtg gag gag ctg gaa agt gtt ttc cga cac			447
Lys Phe Thr Leu Leu Gln Val Glu Glu Leu Glu Ser Val Phe Arg His			
110	115	120	
act caa tac cct gat gtg ccc aca aga agg gaa ctt gcc gaa aac tta			495
Thr Gln Tyr Pro Asp Val Pro Thr Arg Arg Glu Leu Ala Glu Asn Leu			
125	130	135	140
ggt gtg act gaa gac aaa gtg cgg gtt tgg ttt aag aat aaa agg gcc			543
Gly Val Thr Glu Asp Lys Val Arg Val Trp Phe Lys Asn Lys Arg Ala			
145	150	155	
aga tgt agg cga cat cag aga gaa tta atg ctc gcc aat gaa cta cgt			591
Arg Cys Arg Arg His Gln Arg Glu Leu Met Leu Ala Asn Glu Leu Arg			
160	165	170	
gct gac cca gac gac tgt gtc tac atc gtc gtg gac tag ccctagaatg			640
Ala Asp Pro Asp Asp Cys Val Tyr Ile Val Val Asp			
175	180		
ccatccttct tcaggagcta gtttgagat gggtttttct ggtgccactg acacctgggc			700
tgcccatgcc gctcaggeta cccttatctc ctctgcactt atgttatcaa taaag			755
<210> 4			
<211> 184			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 4			
Met Ala Arg Ser Leu Val His Asp Thr Val Phe Tyr Cys Leu Ser Val			
1	5	10	15
Tyr Gln Val Lys Ile Ser Pro Thr Pro Gln Leu Gly Ala Ala Ser Ser			
20	25	30	
Ala Glu Gly His Val Gly Gln Gly Ala Pro Gly Leu Met Gly Asn Met			

35

40

45

Asn Pro Glu Gly Gly Val Asn His Glu Asn Gly Met Asn Arg Asp Gly

505560

Gly Met Ile Pro Glu Gly Gly Gly Gly Asn Gln Glu Pro Arg Gln Gln

65707580

Pro Gln Pro Pro Pro Glu Glu Pro Ala Gln Ala Ala Met Glu Gly Pro

859095

Gln Pro Glu Asn Met Gln Pro Arg Thr Arg Arg Thr Lys Phe Thr Leu

100105110

Leu Gln Val Glu Glu Leu Glu Ser Val Phe Arg His Thr Gln Tyr Pro

115120125

Asp Val Pro Thr Arg Arg Glu Leu Ala Glu Asn Leu Gly Val Thr Glu

130135140

Asp Lys Val Arg Val Trp Phe Lys Asn Lys Arg Ala Arg Cys Arg Arg

145150155160

His Gln Arg Glu Leu Met Leu Ala Asn Glu Leu Arg Ala Asp Pro Asp

165170175

Asp Cys Val Tyr Ile Val Val Asp

180

<210> 5
<211> 1626
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (453)..(1463)

<400> 5
ggcacgaggg aagcgctcg gtgcgttgca ccgccggagg ctgggcagct cgcagcgctg 60

ctcggcgctg gacccacccc ggcaggcgca ggccaccac acccggtctt gtgcggctgc	120
ccccgcagc attgcacggc cgacctcgc ccgcccactg ccaccggccg cgggactggc	180
tgggactggc tcggccgagg gcaactgctcc tcggtgcatt gctgctcggg cgccgcagcc	240
cgcagccgcc agcctcccc ggcggtgccc ctccccgtg gagccggctg tccgtcggcg	300
cccactgccc ggcggcagcg gcggagccag gcagccccgc ggcggccgag cgcgctcgcg	360
catcgggccc tctggccttc ttacctagg gcagcccgcg ccccggtgcg agggagcggt	420
ccttaccgag acccgcccgg cccggcggtg cg atg agc ttc ttc ggc ttc ggg	473
Met Ser Phe Phe Gly Phe Gly	
1 5	
cag agc gtg gag gtg gaa atc ctt ctg aac gat gca gag agt agg aag	521
Gln Ser Val Glu Val Glu Ile Leu Leu Asn Asp Ala Glu Ser Arg Lys	
10 15 20	
cgg gcc gag cac aag acg gag gac ggg aag aag gag aaa tat ttc ctc	569
Arg Ala Glu His Lys Thr Glu Asp Gly Lys Lys Glu Lys Tyr Phe Leu	
25 30 35	
ttc tac gac ggg gag acg gtc tcc ggg aag gtg agc ctt gcc ctc aag	617
Phe Tyr Asp Gly Glu Thr Val Ser Gly Lys Val Ser Leu Ala Leu Lys	
40 45 50 55	
aac ccc aac aag cgg ctg gag cac cag ggc atc aag atc gag ttc atc	665
Asn Pro Asn Lys Arg Leu Glu His Gln Gly Ile Lys Ile Glu Phe Ile	
60 65 70	
ggg cag atc gaa ctc tac tac gat cgc ggg aac cac cat gag ttt gtg	713
Gly Gln Ile Glu Leu Tyr Tyr Asp Arg Gly Asn His His Glu Phe Val	
75 80 85	
tcc ctg gtg aag gac ctg gcc cgg cct gga gag atc acc cag tcg cag	761
Ser Leu Val Lys Asp Leu Ala Arg Pro Gly Glu Ile Thr Gln Ser Gln	
90 95 100	
gcc ttc gac ttt gag ttt acc cac gtg gag aag ccg tat gag tcc tac	809
Ala Phe Asp Phe Glu Phe Thr His Val Glu Lys Pro Tyr Glu Ser Tyr	
105 110 115	
aca ggg cag aat gtg aag cta cgc tat ttc ctt cgt gct acc atc agc	857
Thr Gly Gln Asn Val Lys Leu Arg Tyr Phe Leu Arg Ala Thr Ile Ser	
120 125 130 135	
cgc cgc ctc aat gat gtt gtc aaa gag atg gac att gta gtt cac aca	905
Arg Arg Leu Asn Asp Val Val Lys Glu Met Asp Ile Val Val His Thr	

140	145	150	
ctc agc aca tac cca gag ctg aac tct tcc atc aag atg gag gtt ggg Leu Ser Thr Tyr Pro Glu Leu Asn Ser Ser Ile Lys Met Glu Val Gly 155	160	165	953
att gag gac tgt ctg cac att gaa ttt gag tac aat aaa tcc aaa tac Ile Glu Asp Cys Leu His Ile Glu Phe Glu Tyr Asn Lys Ser Lys Tyr 170	175	180	1001
cac ttg aaa gat gtc att gta ggg aag ata tac ttc ctg ctg gtg aga His Leu Lys Asp Val Ile Val Gly Lys Ile Tyr Phe Leu Leu Val Arg 185	190	195	1049
atc aaa atc aag cac atg gag ata gac atc atc aag cga gaa acg acg Ile Lys Ile Lys His Met Glu Ile Asp Ile Ile Lys Arg Glu Thr Thr 200	205	210	1097
ggg aca ggc ccc aac gtg tac cat gag aat gac acg ata gcc aag tac Gly Thr Gly Pro Asn Val Tyr His Glu Asn Asp Thr Ile Ala Lys Tyr 220	225	230	1145
gag atc atg gac ggg gca cca gtg cga gga gag tcc atc ccg atc cgg Glu Ile Met Asp Gly Ala Pro Val Arg Gly Glu Ser Ile Pro Ile Arg 235	240	245	1193
ctc ttc ctg gcc ggg tat gag ctc acg ccc acc atg cgg gac atc aac Leu Phe Leu Ala Gly Tyr Glu Leu Thr Pro Thr Met Arg Asp Ile Asn 250	255	260	1241
aag aag ttc tct gtg cgc tat tac ctc aac ctg gtg ctg ata gac gag Lys Lys Phe Ser Val Arg Tyr Tyr Leu Asn Leu Val Leu Ile Asp Glu 265	270	275	1289
gag gag cgg cgc tac ttc aag cag cag gaa gtg gtg ttg tgg cgg aag Glu Glu Arg Arg Tyr Phe Lys Gln Gln Glu Val Val Leu Trp Arg Lys 280	285	290	1337
ggg gac atc gta cgg aag agc atg tcc cac cag gcg gcc atc gcc tca Gly Asp Ile Val Arg Lys Ser Met Ser His Gln Ala Ala Ile Ala Ser 300	305	310	1385
cag cgc ttt gag ggc acc acc tcc ctg ggt gag gtg cgg acc ccc agc Gln Arg Phe Glu Gly Thr Thr Ser Leu Gly Glu Val Arg Thr Pro Ser 315	320	325	1433
cag ctg tct gac aac aac tgc agg cag tag gccccaggg ccgagaagat Gln Leu Ser Asp Asn Asn Cys Arg Gln 330	335		1483
gctgggcacc caccagcac cccatctac caacaccagc ggctgggggc gggggcggac			1543

cttgtgaggc tcagttgacc cgttacttgc aacctgaaaa caaatcatgt ttttgactta 1603

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1626

<210> 6

<211> 336

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Met Ser Phe Phe Gly Phe Gly Gln Ser Val Glu Val Glu Ile Leu Leu
1 5 10 15

Asn Asp Ala Glu Ser Arg Lys Arg Ala Glu His Lys Thr Glu Asp Gly
20 25 30

Lys Lys Glu Lys Tyr Phe Leu Phe Tyr Asp Gly Glu Thr Val Ser Gly
35 40 45

Lys Val Ser Leu Ala Leu Lys Asn Pro Asn Lys Arg Leu Glu His Gln
50 55 60

Gly Ile Lys Ile Glu Phe Ile Gly Gln Ile Glu Leu Tyr Tyr Asp Arg
65 70 75 80

Gly Asn His His Glu Phe Val Ser Leu Val Lys Asp Leu Ala Arg Pro
85 90 95

Gly Glu Ile Thr Gln Ser Gln Ala Phe Asp Phe Glu Phe Thr His Val
100 105 110

Glu Lys Pro Tyr Glu Ser Tyr Thr Gly Gln Asn Val Lys Leu Arg Tyr
115 120 125

Phe Leu Arg Ala Thr Ile Ser Arg Arg Leu Asn Asp Val Val Lys Glu
130 135 140

Met Asp Ile Val Val His Thr Leu Ser Thr Tyr Pro Glu Leu Asn Ser
145 150 155 160

Ser Ile Lys Met Glu Val Gly Ile Glu Asp Cys Leu His Ile Glu Phe
165 170 175

Glu Tyr Asn Lys Ser Lys Tyr His Leu Lys Asp Val Ile Val Gly Lys
180 185 190

Ile Tyr Phe Leu Leu Val Arg Ile Lys Ile Lys His Met Glu Ile Asp
195 200 205

Ile Ile Lys Arg Glu Thr Thr Gly Thr Gly Pro Asn Val Tyr His Glu
210 215 220

Asn Asp Thr Ile Ala Lys Tyr Glu Ile Met Asp Gly Ala Pro Val Arg
225 230 235 240

Gly Glu Ser Ile Pro Ile Arg Leu Phe Leu Ala Gly Tyr Glu Leu Thr
245 250 255

Pro Thr Met Arg Asp Ile Asn Lys Lys Phe Ser Val Arg Tyr Tyr Leu
260 265 270

Asn Leu Val Leu Ile Asp Glu Glu Glu Arg Arg Tyr Phe Lys Gln Gln
275 280 285

Glu Val Val Leu Trp Arg Lys Gly Asp Ile Val Arg Lys Ser Met Ser
290 295 300

His Gln Ala Ala Ile Ala Ser Gln Arg Phe Glu Gly Thr Thr Ser Leu
305 310 315 320

Gly Glu Val Arg Thr Pro Ser Gln Leu Ser Asp Asn Asn Cys Arg Gln
325 330 335

<210> 7

<211> 946

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (155).. (913)

<400> 7

ggaagtttgt ggcggaggtg aggccgaggt gactgcagag cggctcgcga gggtttttga 60

ctgataaagc aatggaagcc actgaagagc ttttaagatga ggatggcatg gagggaagat 120

aagtcacata atcagttctg tgatatgagc aaca atg gac cag aag att tta tct 175

Met Asp Gln Lys Ile Leu Ser

1

5

cta gca gca gaa aaa aca gca gac aaa ctg caa gaa ttt ctt caa acc 223

Leu Ala Ala Glu Lys Thr Ala Asp Lys Leu Gln Glu Phe Leu Gln Thr

10

15

20

ctg aga gaa ggt gat ttg act aat ctc ctt cag aat caa gca gtg aaa 271

Leu Arg Glu Gly Asp Leu Thr Asn Leu Leu Gln Asn Gln Ala Val Lys

25

30

35

gga aaa gtt gct gga gca ctc ctg aga gcc atc ttc aaa ggt tcc ccc 319

Gly Lys Val Ala Gly Ala Leu Leu Arg Ala Ile Phe Lys Gly Ser Pro

40

45

50

55

tgc tct gag gaa gct gga aca ctt agg aga cgt aag ata tac act tgt 367

Cys Ser Glu Glu Ala Gly Thr Leu Arg Arg Arg Lys Ile Tyr Thr Cys

60

65

70

tgt atc cag ttg gtg gaa tcg ggg gat ttg cag aaa gaa ata gcg tct 415

Cys Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Asp Leu Gln Lys Glu Ile Ala Ser

75

80

85

gag atc ata gga tta ctg atg ctg gag gct cac cat ttt cca gga cca 463

Glu Ile Ile Gly Leu Leu Met Leu Glu Ala His His Phe Pro Gly Pro

90

95

100

tta ttg gtt gaa tta gcc aat gag ttt att agt gct gtc aga gaa ggc 511

Leu Leu Val Glu Leu Ala Asn Glu Phe Ile Ser Ala Val Arg Glu Gly

105

110

115

agc cta gtg aat gga aaa tct ttg gag tta cta cct atc att ctc act 559

Ser Leu Val Asn Gly Lys Ser Leu Glu Leu Leu Pro Ile Ile Leu Thr

120

125

130

135

gcc ctg gct acg aaa aag gaa aat ctg gct tat gga aaa ggt gta ctg 607

Ala Leu Ala Thr Lys Lys Glu Asn Leu Ala Tyr Gly Lys Gly Val Leu

140

145

150

agt ggg gaa gaa tgt aag aaa cag ttg att aac acc ctg tgt tct ggc 655

Ser Gly Glu Glu Cys Lys Lys Gln Leu Ile Asn Thr Leu Cys Ser Gly
 155 160 165
 agg tgg gat cag caa tat gta atc caa ctc acc tcc atg ttc aag gat 703
 Arg Trp Asp Gln Gln Tyr Val Ile Gln Leu Thr Ser Met Phe Lys Asp
 170 175 180
 gtc cct ctg act gca gaa gag gtg gaa ttt gtg gtg gaa aaa gca ttg 751
 Val Pro Leu Thr Ala Glu Glu Val Glu Phe Val Val Glu Lys Ala Leu
 185 190 195
 agc atg ttc tcc aag atg aat ctt caa gaa ata cca cct ttg gtc tat 799
 Ser Met Phe Ser Lys Met Asn Leu Gln Glu Ile Pro Pro Leu Val Tyr
 200 205 210 215
 cag ctt ctg gtt ctc tcc tcc aag gga agc aga aag agt gtt ttg gaa 847
 Gln Leu Leu Val Leu Ser Ser Lys Gly Ser Arg Lys Ser Val Leu Glu
 220 225 230
 gga atc ata gcc ttc ttc agt gca cta gat aag cag cac aat gag gaa 895
 Gly Ile Ile Ala Phe Phe Ser Ala Leu Asp Lys Gln His Asn Glu Glu
 235 240 245
 cag agt ggt gac gag tga gtaatatagt gtagaaataa agatcatttt tac 946
 Gln Ser Gly Asp Glu
 250

<210> 8
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8

Met Asp Gln Lys Ile Leu Ser Leu Ala Ala Glu Lys Thr Ala Asp Lys
 1 5 10 15
 Leu Gln Glu Phe Leu Gln Thr Leu Arg Glu Gly Asp Leu Thr Asn Leu
 20 25 30
 Leu Gln Asn Gln Ala Val Lys Gly Lys Val Ala Gly Ala Leu Leu Arg
 35 40 45
 Ala Ile Phe Lys Gly Ser Pro Cys Ser Glu Glu Ala Gly Thr Leu Arg
 50 55 60

Arg Arg Lys Ile Tyr Thr Cys Cys Ile Gln Leu Val Glu Ser Gly Asp
65 70 75 80

Leu Gln Lys Glu Ile Ala Ser Glu Ile Ile Gly Leu Leu Met Leu Glu
85 90 95

Ala His His Phe Pro Gly Pro Leu Leu Val Glu Leu Ala Asn Glu Phe
100 105 110

Ile Ser Ala Val Arg Glu Gly Ser Leu Val Asn Gly Lys Ser Leu Glu
115 120 125

Leu Leu Pro Ile Ile Leu Thr Ala Leu Ala Thr Lys Lys Glu Asn Leu
130 135 140

Ala Tyr Gly Lys Gly Val Leu Ser Gly Glu Glu Cys Lys Lys Gln Leu
145 150 155 160

Ile Asn Thr Leu Cys Ser Gly Arg Trp Asp Gln Gln Tyr Val Ile Gln
165 170 175

Leu Thr Ser Met Phe Lys Asp Val Pro Leu Thr Ala Glu Glu Val Glu
180 185 190

Phe Val Val Glu Lys Ala Leu Ser Met Phe Ser Lys Met Asn Leu Gln
195 200 205

Glu Ile Pro Pro Leu Val Tyr Gln Leu Leu Val Leu Ser Ser Lys Gly
210 215 220

Ser Arg Lys Ser Val Leu Glu Gly Ile Ile Ala Phe Phe Ser Ala Leu
225 230 235 240

Asp Lys Gln His Asn Glu Glu Gln Ser Gly Asp Glu
245 250

<210> 9

<211> 2381

<212> DNA

<213> 人

<220>

<221> CDS

<222> (868)..(1419)

<400> 9

```

ggcacgaggg gctcactctg caaccaaggc acgtgcattc tggatcatccc acgcgggggag      60
cgcgcgcaag gcccgcccag cccccacatg ccagcccccac cctccagtcg gtccggacgc      120
cgacgccttt ttgacctctg ctgtgcccgg ccctcctcat ctggcctgcc cagggtcttg      180
tgctggcggg gtccagctgc tccaatccct cctcctctgc tctgccctgc cctgccctgg      240
cctgccccgg cgccctccct cagcccgggt atcaggcgag aggcggagct ggccccggcg      300
gccccgcccc cgctgtagaa agggccgggc gactgttact cgcggtcac cggccttgg      360
ccttttatct cgggtgctgc gggggaggcg ggaggaggag acaccagggg tggccctgag      420
cgccggcgac acctttctg gactataaat tgagcacctg ggatgggtag ggggccaacg      480
cagtcaccgc cgtccgcagt cacagtccag ccactgaccg cagcagcgcc cttgcgtagc      540
agccgcttgc agcgagaaca ctgaattgcc aacgagcagg agagtctcaa ggcgcaagag      600
gaggccaggg ctcgaccac agagcacct cagccatcgc gagtttccgg gcgccaagc      660
caggagaagc cgcccatccc gcagggccgg tctgccagcg agacgagagt tggcgagggc      720
ggaggagtgc cgggaatccc gccacaccgg ctatagccag gccccagcg cgggccttgg      780
agagcgcggtg aaggcgggca tccccttgac ccggccgacc atccccgtgc ccctgcgtcc      840
ctgcgtcca acgtccgcgc ggccacc atg atg caa atc tgc gac acc tac aac      894
          Met Met Gln Ile Cys Asp Thr Tyr Asn
          1             5

cag aag cac tcg ctc ttt aac gcc atg aat cgc ttc att ggc gcc gtg      942
Gln Lys His Ser Leu Phe Asn Ala Met Asn Arg Phe Ile Gly Ala Val
10             15             20             25

aac aac atg gac cag acg gtg atg gtg ccc agc ttg ctg cgc gac gtg      990
Asn Asn Met Asp Gln Thr Val Met Val Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val
          30             35             40

ccc ctg gct gac ccc ggg tta gac aac gat gtt ggc gtg gag gta ggc      1038
Pro Leu Ala Asp Pro Gly Leu Asp Asn Asp Val Gly Val Glu Val Gly
          45             50             55

```

ggc agt ggc ggc tgc ctg gag gag cgc acg ccc cca gtc ccc gac tcg Gly Ser Gly Gly Cys Leu Glu Glu Arg Thr Pro Pro Val Pro Asp Ser 60 65 70	1086
gga agc gcc aat ggc agc ttt ttc gcg ccc tct cgg gac atg tac agc Gly Ser Ala Asn Gly Ser Phe Phe Ala Pro Ser Arg Asp Met Tyr Ser 75 80 85	1134
cac tac gtg ctt ctc aag tcc atc cgc aac gac atc gag tgg ggg gtc His Tyr Val Leu Leu Lys Ser Ile Arg Asn Asp Ile Glu Trp Gly Val 90 95 100 105	1182
ctg cac cag ccg cct cca ccg gct ggg agc gag gag ggc agt gcc tgg Leu His Gln Pro Pro Pro Ala Gly Ser Glu Glu Gly Ser Ala Trp 110 115 120	1230
aag tcc aag gac atc ctg gtg gac ctg ggc cac ttg gag ggt gcg gac Lys Ser Lys Asp Ile Leu Val Asp Leu Gly His Leu Glu Gly Ala Asp 125 130 135	1278
gcc ggc gaa gaa gac ctg gaa cag cag ttc cac tac cac ctg cgc ggg Ala Gly Glu Glu Asp Leu Glu Gln Gln Phe His Tyr His Leu Arg Gly 140 145 150	1326
ctg cac act gtg ctc tcg aaa ctc acg cgc aaa gcc aac atc ctc act Leu His Thr Val Leu Ser Lys Leu Thr Arg Lys Ala Asn Ile Leu Thr 155 160 165	1374
aac aga tac aag cag gag atc ggc ttc ggc aat tgg ggc cac tga Asn Arg Tyr Lys Gln Glu Ile Gly Phe Gly Asn Trp Gly His 170 175 180	1419
ggcgtggcgc ccgtggtgc ccagcacctt cttegacca tctcaccctc tctcattect	1479
caaagctttt ttttttttcc tggctggggg gcgggaaggg cagactgcaa actggggggc	1539
tgcgtacgtg caggaggcgc ggtggggctg cgtggaggag ggggccacgt gtgagagaga	1599
agaaaatggt ggccggagat gggagggccc aaggaacctc ctgggagggg gcctgcattc	1659
tatgttggtg ggaatgggac tgggctgacg ccctgcattc agcctgtgcc tttcctgggg	1719
tttcttttct gttcttttcg gaggagaggg cccgagaagg ggccatacca gggcgcggcg	1779
ctgggttgcc acacttgga aagcagcccg gagctgggtg ctggggaagg cggggcgcgt	1839
agcctccgc cgccctgcgg ttgggccggt ggaggcccag gcgttgctag gattgcatca	1899
gttttctgt ttgcactatt tctttttgta acattggccc tgtgtgaagt atttcgaatc	1959

tcctccttgc tctgaaactt cagcgattcc attgtgataa ggcacaaaac agcactgtct 2019
gtcggtaatc ggtactactt tattaatgat tttctgttac actgtatagt agtcctatgg 2079
cacccccacc ccattcccttt cgtgccactc ccgtccccac ccccaccca gtgtgtataa 2139
gctggcattt cgccagcttg tacgtagctt gccactcagt gaaaataata acattattat 2199
gagaaagtgg acttaaccga aatggaacca actgacattc tatcgtgttg tacatagaat 2259
gatgaagggt tccactgttg ttgtatgtct taaatttatt taaaactttt tttaatccag 2319
atgtagacta tattctaaaa aataaaaaag caaatgtgtc aactaaaaaa aaaaaaaaaa 2379
aa 2381

<210> 10
<211> 183
<212> PRT
<213> 人

<400> 10

Met Met Gln Ile Cys Asp Thr Tyr Asn Gln Lys His Ser Leu Phe Asn
1 5 10 15

Ala Met Asn Arg Phe Ile Gly Ala Val Asn Asn Met Asp Gln Thr Val
20 25 30

Met Val Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Pro Leu Ala Asp Pro Gly Leu
35 40 45

Asp Asn Asp Val Gly Val Glu Val Gly Gly Ser Gly Gly Cys Leu Glu
50 55 60

Glu Arg Thr Pro Pro Val Pro Asp Ser Gly Ser Ala Asn Gly Ser Phe
65 70 75 80

Phe Ala Pro Ser Arg Asp Met Tyr Ser His Tyr Val Leu Leu Lys Ser
85 90 95

Ile Arg Asn Asp Ile Glu Trp Gly Val Leu His Gln Pro Pro Pro Pro
100 105 110

Ala Gly Ser Glu Glu Gly Ser Ala Trp Lys Ser Lys Asp Ile Leu Val
115 120 125

Asp Leu Gly His Leu Glu Gly Ala Asp Ala Gly Glu Glu Asp Leu Glu
130 135 140

Gln Gln Phe His Tyr His Leu Arg Gly Leu His Thr Val Leu Ser Lys
145 150 155 160

Leu Thr Arg Lys Ala Asn Ile Leu Thr Asn Arg Tyr Lys Gln Glu Ile
165 170 175

Gly Phe Gly Asn Trp Gly His
180

<210> 11
<211> 3129
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (214)..(1167)

<400> 11
gggcgagtac tcctgattgt gacatcacat tcatcccctg ggcgatggag cttgtcactg 60
ggaaggaata ctcagtcgga gaatagccaa caagatgggt tactgggaga atctcttcag 120
tggcactgag tggaggcatc aggggggttg agccttgta acagggaacc tgccccccaa 180
cacttggaag gacctgggtt tcagtgatga gac atg ggg tat gat gta acc cgt 234
Met Gly Tyr Asp Val Thr Arg
1 5
ttc cag ggg gat gtt gac gaa gat ctt atc tgc cct att tgc agt gga 282
Phe Gln Gly Asp Val Asp Glu Asp Leu Ile Cys Pro Ile Cys Ser Gly
10 15 20
gtc ttg gag gag cca gta cag gca cct cat tgt gaa cat gct ttc tgc 330
Val Leu Glu Glu Pro Val Gln Ala Pro His Cys Glu His Ala Phe Cys
25 30 35
aac gcc tgc atc acc cag tgg ttc tct cag caa cag aca tgt cca gtg 378

Asn Ala Cys Ile Thr Gln Trp Phe Ser Gln Gln Gln Thr Cys Pro Val	
40 45 50 55	
gac cgt agt gtt gtg acg gtc gcc cat ctg cgc cca gta cct cgg atc	426
Asp Arg Ser Val Val Thr Val Ala His Leu Arg Pro Val Pro Arg Ile	
60 65 70	
atg cgg aac atg ttg tca aag ctg cag att gcc tgt gac aac gct gtg	474
Met Arg Asn Met Leu Ser Lys Leu Gln Ile Ala Cys Asp Asn Ala Val	
75 80 85	
ttc ggc tgt agt gcc gtt gtc cgg ctt gac aac ctc atg tct cac ctc	522
Phe Gly Cys Ser Ala Val Val Arg Leu Asp Asn Leu Met Ser His Leu	
90 95 100	
agc gac tgt gag cac aac ccg aag cgg cct gtg acc tgt gaa cag ggc	570
Ser Asp Cys Glu His Asn Pro Lys Arg Pro Val Thr Cys Glu Gln Gly	
105 110 115	
tgt ggc ctg gag atg ccc aaa gat gag ctg ccc aac cat aac tgc att	618
Cys Gly Leu Glu Met Pro Lys Asp Glu Leu Pro Asn His Asn Cys Ile	
120 125 130 135	
aag cac ctg cgc tca gtg gta cag cag cag cag aca cgc atc gca gag	666
Lys His Leu Arg Ser Val Val Gln Gln Gln Gln Thr Arg Ile Ala Glu	
140 145 150	
ctg gag aag acg tca gct gaa cac aaa cac cag ctg gcg gag cag aag	714
Leu Glu Lys Thr Ser Ala Glu His Lys His Gln Leu Ala Glu Gln Lys	
155 160 165	
cga gac atc cag ctg cta aag gca tac atg cgt gca atc cgc agt gtc	762
Arg Asp Ile Gln Leu Leu Lys Ala Tyr Met Arg Ala Ile Arg Ser Val	
170 175 180	
aac ccc aac ctt cag aac ctg gag gag aca att gaa tac aac gag atc	810
Asn Pro Asn Leu Gln Asn Leu Glu Glu Thr Ile Glu Tyr Asn Glu Ile	
185 190 195	
cta gag tgg gtg aac tcc ctt cag cca gca aga gtg acc cgc tgg gga	858
Leu Glu Trp Val Asn Ser Leu Gln Pro Ala Arg Val Thr Arg Trp Gly	
200 205 210 215	
ggg atg atc tca act cct gat gct gtg ctc cag gct gta atc aag cgc	906
Gly Met Ile Ser Thr Pro Asp Ala Val Leu Gln Ala Val Ile Lys Arg	
220 225 230	
tcc ctg gtg gag agt ggc tgt cct gct tct att gtc aac gag ctg att	954
Ser Leu Val Glu Ser Gly Cys Pro Ala Ser Ile Val Asn Glu Leu Ile	
235 240 245	

gaa aat gcc cac gag cgt agc tgg ccc cag ggt ctg gcc aca cta gag Glu Asn Ala His Glu Arg Ser Trp Pro Gln Gly Leu Ala Thr Leu Glu 250 255 260	1002
act aga cag atg aac cga cgc tac tat gag aac tac gtg gcc aag cgc Thr Arg Gln Met Asn Arg Arg Tyr Tyr Glu Asn Tyr Val Ala Lys Arg 265 270 275	1050
atc cct ggc aag cag gct gtt gtc gtg atg gcc tgt gag aac cag cac Ile Pro Gly Lys Gln Ala Val Val Val Met Ala Cys Glu Asn Gln His 280 285 290 295	1098
atg ggg gat gac atg gtg caa gag cca ggc ctt gtc atg ata ttt gcg Met Gly Asp Asp Met Val Gln Glu Pro Gly Leu Val Met Ile Phe Ala 300 305 310	1146
cat ggc gtg gaa gag ata taa gagaactcga ctggctatca ggaagagatg His Gly Val Glu Glu Ile 315	1197
gaaatcagaa aatcccatca ctccagcagc tgggacctga gtcctacca ccattcttaa	1257
tactgtggct tatacctgag ccacacatct ccctgccctt ctggcactga agggccttgg	1317
ggtagtttgc tcagcctttc aggtgggaaa cccagatttc ctccctttgc catattcccc	1377
taaaatgtct ataaattatc agtctgggtg ggaaagcccc cacctccatc cattttctg	1437
cttaggtcc ctggttcag ttattttcag aaagcacaaa gagattcaat ttccctggag	1497
gatcaggaca gaggaaggaa tctctaactg tccctctcct ccaaaaccag ggaatcagag	1557
cagtcaggcc tgttgactct aagcagcaga catcctgaag aaatggtaag ggtggagcca	1617
aatctctaga aataagtagt gaggccgtta attggccatc actgatggcc cttagggaaa	1677
gaactggacct ctgtgccaaag cagtatccct gttcagccca ccttaaagggt gtaggcaccc	1737
actgggtcta ccagtatgca ggttgggata ctgaaaattt ccagatgagc tcttctttcc	1797
tacaagtttt cataattagg gaatgccagg gtttagggta ggggttaatc tgttgggggt	1857
tgatgtgttt agcaagaagc tactcctagc ttttgctaaa atatggttgg cactgcctct	1917
tgtggcacag gccataattg ttccatagac ccctctctag ccctgtgact gtagttagtt	1977
actttgatga ttttctttgg ccattgtttg tttatatattt acaaactcca cctactgccc	2037
ccccccctct tttttttaag aatggcctga tcatggctat ctcagccaca ttgttggcaa	2097
tttaatttat ttacttcctt tttttttttt aagaaaggaa aaaagaaaaa aaaatcaaac	2157

```

ttgaaacttt tcttttgatg ttcctattgt gggggttctg gatagggtgg gacagggatg 2217
ggggtgtgtt ttatatTTTT tccttttcag cacaaccttt ggctttaata taggaagagc 2277
caaggagatc ctcggctgaa ctacgatat ctgccccaaa cctctgtaac cccaactgaa 2337
atgaggagct tcctctcttc ctgtgaagga tatgacagtc cagcatcgat gcctgtgccc 2397
tctggaaaaa tttcctccta gcccttcag ggccttatca taaaactctg gatttagagt 2457
attcattttg aaggcaactc ccccttcccc aagtttcctt ggagctgtat agctgggttc 2517
taagcttcac catgcaaata agaaatttta tctctaagta caggetgtgc cgtgtctcac 2577
ccacaccccc ctggggactt cagttccatt tcaggttacc tggggatac cttgatccct 2637
agagtactg gcagagtaag agaaggggag agataatagg tgtgattatt ttaatatgaa 2697
gggtgggagtg tggttgaga tagaaaggct cctccccacc atgtaatggc ttcctctcag 2757
aattttattc caggctagct tgctgcaggt ctgggtagtt ggatcatggc tccactggga 2817
ttggggtgga aagcttgagg ggagtagggt tccagctctg ggacattgtg ctcaggaatt 2877
tgaaaacgct gctatactta ctctggttac tacatttctt ccaactccct ttccectacc 2937
tgcttaacc aaggctcata ctgtcctgtc cttaccctca gatggagcca ggaagctcag 2997
tgaaaggctt ccctaccctt tgcactagtg tctctgcagg ttgctggttg tgtgtatgt 3057
gctgttccat ggtgttgact gcactaataa taaacctttt actcaactct ctaaaaaaaaa 3117
aaaaaaaaaa aa 3129

```

<210> 12
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12

```

Met Gly Tyr Asp Val Thr Arg Phe Gln Gly Asp Val Asp Glu Asp Leu
1           5           10          15

```

```

Ile Cys Pro Ile Cys Ser Gly Val Leu Glu Glu Pro Val Gln Ala Pro
20           25           30

```

His Cys Glu His Ala Phe Cys Asn Ala Cys Ile Thr Gln Trp Phe Ser
35 40 45

Gln Gln Gln Thr Cys Pro Val Asp Arg Ser Val Val Thr Val Ala His
50 55 60

Leu Arg Pro Val Pro Arg Ile Met Arg Asn Met Leu Ser Lys Leu Gln
65 70 75 80

Ile Ala Cys Asp Asn Ala Val Phe Gly Cys Ser Ala Val Val Arg Leu
85 90 95

Asp Asn Leu Met Ser His Leu Ser Asp Cys Glu His Asn Pro Lys Arg
100 105 110

Pro Val Thr Cys Glu Gln Gly Cys Gly Leu Glu Met Pro Lys Asp Glu
115 120 125

Leu Pro Asn His Asn Cys Ile Lys His Leu Arg Ser Val Val Gln Gln
130 135 140

Gln Gln Thr Arg Ile Ala Glu Leu Glu Lys Thr Ser Ala Glu His Lys
145 150 155 160

His Gln Leu Ala Glu Gln Lys Arg Asp Ile Gln Leu Leu Lys Ala Tyr
165 170 175

Met Arg Ala Ile Arg Ser Val Asn Pro Asn Leu Gln Asn Leu Glu Glu
180 185 190

Thr Ile Glu Tyr Asn Glu Ile Leu Glu Trp Val Asn Ser Leu Gln Pro
195 200 205

Ala Arg Val Thr Arg Trp Gly Gly Met Ile Ser Thr Pro Asp Ala Val
210 215 220

Leu Gln Ala Val Ile Lys Arg Ser Leu Val Glu Ser Gly Cys Pro Ala
225 230 235 240

Ser Ile Val Asn Glu Leu Ile Glu Asn Ala His Glu Arg Ser Trp Pro
245 250 255

Gln Gly Leu Ala Thr Leu Glu Thr Arg Gln Met Asn Arg Arg Tyr Tyr
260 265 270

Glu Asn Tyr Val Ala Lys Arg Ile Pro Gly Lys Gln Ala Val Val Val
275 280 285

Met Ala Cys Glu Asn Gln His Met Gly Asp Asp Met Val Gln Glu Pro
290 295 300

Gly Leu Val Met Ile Phe Ala His Gly Val Glu Glu Ile
305 310 315

<210> 13
<211> 3005
<212> DNA
<213> 人

<220>
<221> CDS
<222> (241)..(1155)

<400> 13
cagtgggtgga agaagaggcg gcggcgggcg gggtagggag cctggaaacg cgagcgggga 60
tggtaggtgg ttggaccgc cggggccgcc gtcgtttcca gaaagggttt gactggagga 120
acctctggag cagctgttgg ctggctcctc tggtgatgg catgttgagg tacatgggcc 180
agcggcagcg agggcatcca atccagaggg gtccactcta gaggccaggc caccagcacc 240
atg ggc cag tgt gtc acc aag tgt aag aat ccc tca tcg acc ctg ggc 288
Met Gly Gln Cys Val Thr Lys Cys Lys Asn Pro Ser Ser Thr Leu Gly
1 5 10 15
agc aaa aat gga gac cgt gag ccc agc aac aag tca cat agc agg agg 336
Ser Lys Asn Gly Asp Arg Glu Pro Ser Asn Lys Ser His Ser Arg Arg
20 25 30
ggt gca ggc cac cgt gag gag cag gta cca ccc tgt ggc aag cca ggt 384
Gly Ala Gly His Arg Glu Glu Gln Val Pro Pro Cys Gly Lys Pro Gly
35 40 45

gga gat atc ctc gtc aac ggg acc aag aag gcc gag gct gcc act gag Gly Asp Ile Leu Val Asn Gly Thr Lys Lys Ala Glu Ala Ala Thr Glu 50 55 60	432
gcc tgc cag ctg cca acg tcc tcg gga gat gct ggg agg gag tcc aag Ala Cys Gln Leu Pro Thr Ser Ser Gly Asp Ala Gly Arg Glu Ser Lys 65 70 75 80	480
tcc aat gcc gag gag tct tcc ttg caa aga ttg gaa gaa ctg ttc agg Ser Asn Ala Glu Glu Ser Ser Leu Gln Arg Leu Glu Glu Leu Phe Arg 85 90 95	528
cgc tac aag gat gag cgg gaa gat gca att ttg gag gaa ggc atg gag Arg Tyr Lys Asp Glu Arg Glu Asp Ala Ile Leu Glu Glu Gly Met Glu 100 105 110	576
cgc ttt tgc aat gac ctg tgt gtt gac ccc aca gaa ttt cga gtg ctg Arg Phe Cys Asn Asp Leu Cys Val Asp Pro Thr Glu Phe Arg Val Leu 115 120 125	624
ctc ttg gct tgg aag ttc cag gct gca acc atg tgc aaa ttc acc agg Leu Leu Ala Trp Lys Phe Gln Ala Ala Thr Met Cys Lys Phe Thr Arg 130 135 140	672
aag gag ttt ttt gat ggc tgc aaa gca ata agt gca gac agc att gac Lys Glu Phe Phe Asp Gly Cys Lys Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ile Asp 145 150 155 160	720
gga atc tgt gca cgg ttc cct agc ctc tta aca gaa gcc aaa caa gag Gly Ile Cys Ala Arg Phe Pro Ser Leu Leu Thr Glu Ala Lys Gln Glu 165 170 175	768
gat aaa ttc aag gat ctc tac cgg ttt aca ttt cag ttt ggc ctg gac Asp Lys Phe Lys Asp Leu Tyr Arg Phe Thr Phe Gln Phe Gly Leu Asp 180 185 190	816
tct gaa gaa ggg cag cgg tca ctg cat cgg gaa ata gcc att gcc ctg Ser Glu Glu Gly Gln Arg Ser Leu His Arg Glu Ile Ala Ile Ala Leu 195 200 205	864
tgg aaa cta gtc ttt acc cag aac aat cct ccg gta ttg gac caa tgg Trp Lys Leu Val Phe Thr Gln Asn Asn Pro Pro Val Leu Asp Gln Trp 210 215 220	912
cta aac ttc cta aca gag aac ccc tcg ggg atc aag ggc atc tcc cgg Leu Asn Phe Leu Thr Glu Asn Pro Ser Gly Ile Lys Gly Ile Ser Arg 225 230 235 240	960
gac act tgg aac atg ttc ctt aac ttc act cag gtg att ggc cct gac Asp Thr Trp Asn Met Phe Leu Asn Phe Thr Gln Val Ile Gly Pro Asp	1008

245	250	255	
ctc agc aac tac agt gaa gat gag gcc tgg cca agt ctc ttt gac acc			1056
Leu Ser Asn Tyr Ser Glu Asp Glu Ala Trp Pro Ser Leu Phe Asp Thr			
260	265	270	
ttt gtg gag tgg gaa atg gag cga agg aaa aga gaa ggg gaa ggg aga			1104
Phe Val Glu Trp Glu Met Glu Arg Arg Lys Arg Glu Gly Glu Gly Arg			
275	280	285	
ggt gca ctc agc tca ggg cct gag ggc ttg tgt ccc gag gag cag act			1152
Gly Ala Leu Ser Ser Gly Pro Glu Gly Leu Cys Pro Glu Glu Gln Thr			
290	295	300	
tag tggctctgtc ccaggagcag cagcaaggat ctgccagctg ccctgcagcc			1205
aactgaggaa ttggaccatt ttggaaatta ctgaagatcc ggatattttc tactttacac			1265
ctttctctgc cttgtatctg aaagggctct aaaatgctgt atcatgtttt aggcactttc			1325
ttcatttttt tggttatttt ggttatttcc tttttggggg gatctcccag aatatttgaa			1385
cctggttaca tgttgtgtat ctttttttga agccttcaga tagaataagc ctgccatttc			1445
ttgcacaaat ttaggttttt tttttgtttt tttttgtttt tttttttttt ttttggtagg			1505
ggagggcata gagcagggcg gggggatggg actgttaggt tgaattaaca ttacaaaatg			1565
atacagtgcc agatctcagt ttcgcataatt gtttttcagg gcaggtctgt actgtgtgta			1625
gtgctgttta catagatgaa tttaggttgt aataattatt tttaaagatt tacacagatt			1685
tgaatagcag tgtaactgt taaccacatt gcattaattc ccaggcgatt tagagctctt			1745
ggagagccaa ggccagccaa gagcatttgt agtctggtga caaccccctt ttaagctaat			1805
ttatccagaa ccctgatttc cctcacttct tgctcattcc ttctttgacc tattgcattt			1865
catgttgagt tttccatca acatgctgca cctgtcagtc aagtgagcat tttttaagaa			1925
cacattgtac tgagaaccac ttaagcattg aatgcggaga aagcagtgt acctcagttt			1985
tgctggaagt agacttcttt gatagttttc tttctttgat gaagtttctg tattttcatg			2045
ttgtaagtgg aaatactttt ttttgtttgt ttgtttcatt tgccttgag ccaaagtttc			2105
tgttcctggg ggtcgggaaa ctgcctgccg gccaaactgac ttgaaggaaa actgtggtat			2165
ggagctctgc ttgaattttt ttttttttaa tatttttatt ttttctttg aatatcatca			2225
gcttacttgt ctggcaaggg cagaagcctg gggttggcct gaactctgcc aaacaaatat			2285

```

caaagtgtat ttaatagtta aatttgtgcc ctttcccttc ttgctgcacc catgttgtca 2345
cttaaccccc aggagttatt tattatcttt ttgttaaagt caggctcatt tggggaatg 2405
tgatgactgt ttaggtttac atgaccctcc tctcctttcc ctacccccaa atatgtatat 2465
atacatatat aaaatatgta tatattttac ctatataaaa tatatatata tacacatata 2525
tgtatctata ttcctttgtt tctttgcctg cttatactgg ccataaaaga gggagctgcc 2585
ttcaatgtat aaagtataag aagagtgccg gggaatgccg taatggaggc ttttggatct 2645
gaatttgac catttcacta aagagaacat gagtttgctc agccctttcc tcacaagagg 2705
gagggccccg gttccccaga cttctccacg cgctggctcc ataaaggcca gctttggcca 2765
ggctgccaca ggggcctgag gagctcactc tgggcctacc tggtttcagt tagagggtcc 2825
tctgttatt tttccattta aaaagtatgt cctcagaaaa ctgtactgga aggatgggtg 2885
gcaggaactt gtatagttca gcttccaaca ctttgaaca gattaaaaag ggaatctttt 2945
aaataaaaac gtataaaaat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3005

```

<210> 14

<211> 304

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

```

Met Gly Gln Cys Val Thr Lys Cys Lys Asn Pro Ser Ser Thr Leu Gly
1           5           10           15

```

```

Ser Lys Asn Gly Asp Arg Glu Pro Ser Asn Lys Ser His Ser Arg Arg
          20           25           30

```

```

Gly Ala Gly His Arg Glu Glu Gln Val Pro Pro Cys Gly Lys Pro Gly
          35           40           45

```

```

Gly Asp Ile Leu Val Asn Gly Thr Lys Lys Ala Glu Ala Ala Thr Glu
          50           55           60

```

```

Ala Cys Gln Leu Pro Thr Ser Ser Gly Asp Ala Gly Arg Glu Ser Lys
65           70           75           80

```

Ser Asn Ala Glu Glu Ser Ser Leu Gln Arg Leu Glu Glu Leu Phe Arg
85 90 95

Arg Tyr Lys Asp Glu Arg Glu Asp Ala Ile Leu Glu Glu Gly Met Glu
100 105 110

Arg Phe Cys Asn Asp Leu Cys Val Asp Pro Thr Glu Phe Arg Val Leu
115 120 125

Leu Leu Ala Trp Lys Phe Gln Ala Ala Thr Met Cys Lys Phe Thr Arg
130 135 140

Lys Glu Phe Phe Asp Gly Cys Lys Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ile Asp
145 150 155 160

Gly Ile Cys Ala Arg Phe Pro Ser Leu Leu Thr Glu Ala Lys Gln Glu
165 170 175

Asp Lys Phe Lys Asp Leu Tyr Arg Phe Thr Phe Gln Phe Gly Leu Asp
180 185 190

Ser Glu Glu Gly Gln Arg Ser Leu His Arg Glu Ile Ala Ile Ala Leu
195 200 205

Trp Lys Leu Val Phe Thr Gln Asn Asn Pro Pro Val Leu Asp Gln Trp
210 215 220

Leu Asn Phe Leu Thr Glu Asn Pro Ser Gly Ile Lys Gly Ile Ser Arg
225 230 235 240

Asp Thr Trp Asn Met Phe Leu Asn Phe Thr Gln Val Ile Gly Pro Asp
245 250 255

Leu Ser Asn Tyr Ser Glu Asp Glu Ala Trp Pro Ser Leu Phe Asp Thr
260 265 270

Phe Val Glu Trp Glu Met Glu Arg Arg Lys Arg Glu Gly Glu Gly Arg

275	280	285	
Gly Ala Leu Ser Ser Gly Pro Glu Gly Leu Cys Pro Glu Glu Gln Thr			
290	295	300	
<210> 15			
<211> 1832			
<212> DNA			
<213> 人			
<220>			
<221> CDS			
<222> (281)..(1057)			
<400> 15			
agcagagtcc ggctgcctgg ggcgggcggc gcgtgtctgc agctgctccg ggtagcccg		60	
taggcgcgcc gtccccagcc ccgccgccgg ccctcgggtgc gcccggccgc ctgcaccccc		120	
aggagcagct gctgtgaata aacacagaag tggagctggg ggactgatta gaagcctcat		180	
tcagtgcacc tgggccccag caggcccagc caggcgtgga ggaagaggca ttgaggactt		240	
tccttacctg tttttccagc tcaccactg ccagcagaga atg ctg tcc agt ttc		295	
	Met Leu Ser Ser Phe		
	1 5		
aac gag tgg ttt tgg cag gac agg ttc tgg tta cca ccc aat gtc acg		343	
Asn Glu Trp Phe Trp Gln Asp Arg Phe Trp Leu Pro Pro Asn Val Thr			
	10 15 20		
tgg aca gag cta gaa gac cgg gat ggc cgt gtc tac ccc cac ccc cag		391	
Trp Thr Glu Leu Glu Asp Arg Asp Gly Arg Val Tyr Pro His Pro Gln			
	25 30 35		
gac ttg ttg gca gcc ctg ccc ctg gcg ctg gtc ctc ctg gcc atg cgc		439	
Asp Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val Leu Leu Ala Met Arg			
	40 45 50		
ctt gcc ttt gag aga ttc att ggc ctg ccc ctg agc cgg tgg ctg ggt		487	
Leu Ala Phe Glu Arg Phe Ile Gly Leu Pro Leu Ser Arg Trp Leu Gly			
	55 60 65		
gtg agg gat cag acc agg agg caa gtg aag ccc aac gcc acg ctg gag		535	
Val Arg Asp Gln Thr Arg Arg Gln Val Lys Pro Asn Ala Thr Leu Glu			
	70 75 80 85		
aaa cac ttc ctc acg gaa ggg cac agg ccc aag gag ccc cag ctg tct		583	

Lys His Phe Leu Thr Glu Gly His Arg Pro Lys Glu Pro Gln Leu Ser	
90 95 100	
ctc ctg gcc gcc cag tgt ggc ctc acg ctg cag cag acc cag cga tgg	631
Leu Leu Ala Ala Gln Cys Gly Leu Thr Leu Gln Gln Thr Gln Arg Trp	
105 110 115	
ttc cgg aga cgc cgg aac cag gat cga ccc cag ctg acc aag aag ttc	679
Phe Arg Arg Arg Arg Asn Gln Asp Arg Pro Gln Leu Thr Lys Lys Phe	
120 125 130	
tgt gag gcc agc tgg agg ttt ctc ttc tac ctg tcc tcc ttc gtg ggc	727
Cys Glu Ala Ser Trp Arg Phe Leu Phe Tyr Leu Ser Ser Phe Val Gly	
135 140 145	
ggc ctc tcg gtc ctg tac cac gag tca tgg ctg tgg gca cca gta atg	775
Gly Leu Ser Val Leu Tyr His Glu Ser Trp Leu Trp Ala Pro Val Met	
150 155 160 165	
tgc tgg gac agg tac cca aac cag act ctg aag cca tcc ctg tac tgg	823
Cys Trp Asp Arg Tyr Pro Asn Gln Thr Leu Lys Pro Ser Leu Tyr Trp	
170 175 180	
tgg tac ctc ttg gag ctg ggt ttc tac ctc tca ctg cta atc agg ctg	871
Trp Tyr Leu Leu Glu Leu Gly Phe Tyr Leu Ser Leu Leu Ile Arg Leu	
185 190 195	
ccc ttt gat gtc aag cgc aag ggt ggg gga cct tcc agc atc aag cct	919
Pro Phe Asp Val Lys Arg Lys Gly Gly Gly Pro Ser Ser Ile Lys Pro	
200 205 210	
cgt ccc cac tat gac cca ccg tct act gca gga ttt caa gga gca ggt	967
Arg Pro His Tyr Asp Pro Pro Ser Thr Ala Gly Phe Gln Gly Ala Gly	
215 220 225	
gat aca cca ctt cgt ggc ggt cat cct gat gac ctt ctc cta cag tgc	1015
Asp Thr Pro Leu Arg Gly Gly His Pro Asp Asp Leu Leu Leu Gln Cys	
230 235 240 245	
caa cct gct gcg cat tgg ctc tct ggt gct gct gtt aca tga	1057
Gln Pro Ala Ala His Trp Leu Ser Gly Ala Ala Val Thr	
250 255	
ttcctctgac tacctgctgg aggcctgtaa gatggtcaac tacatgcagt atcagcaagt	1117
gtgcgacgct ctcttctca tcttctcctt tgtcttcttc tacacccgac tggctctctt	1177
tcccacccag atcctctaca ccacatacta cgagtccatc agcaacaggg gcccttctt	1237
cggctactac ttcttcaacg ggcttctgat gttgctgcag ctgccgcacg tgttctggtc	1297

```

ttgcctcatt ctgcgcattg tctatagctt catgaagaag ggccagatgg agaaggacat 1357
tcgtagtgat gtagaagaat cagactccag tgaggaggtg gcggcgggcc aggaacctct 1417
gcagctaaag aacggggcag ctggagggcc caggccagcc cccactgatg gccctcagag 1477
ccgggtggcc gggcgtctga ccaacaggca cacaacagcc acatagccgg gcggggctgg 1537
ctgtaagggg ttccccccc gccagtgcct tggatatctt tggggtgact ggactggcgc 1597
ccctgggcca cttttctgga gacagggagg gccccaccg ggggtgggtgg gaaggctgat 1657
gatctgtctc cagccccctt cttctgcca cccaccctt ttccctctgg gcaactggac 1717
agatctggga gccagcagct ggatgctgtg gctggccaga gacacctcca ggctgtggcc 1777
tgggggctgg ggggagcccc aggctgaaaa ggggtccaatt aaaacaaatg gagcc 1832

```

<210> 16
 <211> 258
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 16

```

Met Leu Ser Ser Phe Asn Glu Trp Phe Trp Gln Asp Arg Phe Trp Leu
1           5           10          15

```

```

Pro Pro Asn Val Thr Trp Thr Glu Leu Glu Asp Arg Asp Gly Arg Val
          20           25           30

```

```

Tyr Pro His Pro Gln Asp Leu Leu Ala Ala Leu Pro Leu Ala Leu Val
          35           40           45

```

```

Leu Leu Ala Met Arg Leu Ala Phe Glu Arg Phe Ile Gly Leu Pro Leu
          50           55           60

```

```

Ser Arg Trp Leu Gly Val Arg Asp Gln Thr Arg Arg Gln Val Lys Pro
65           70           75           80

```

```

Asn Ala Thr Leu Glu Lys His Phe Leu Thr Glu Gly His Arg Pro Lys
          85           90           95

```

```

Glu Pro Gln Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gln Cys Gly Leu Thr Leu Gln

```

100					105					110						
Gln	Thr	Gln	Arg	Trp	Phe	Arg	Arg	Arg	Arg	Asn	Gln	Asp	Arg	Pro	Gln	
115					120					125						
Leu	Thr	Lys	Lys	Phe	Cys	Glu	Ala	Ser	Trp	Arg	Phe	Leu	Phe	Tyr	Leu	
130					135					140						
Ser	Ser	Phe	Val	Gly	Gly	Leu	Ser	Val	Leu	Tyr	His	Glu	Ser	Trp	Leu	
145					150					155					160	
Trp	Ala	Pro	Val	Met	Cys	Trp	Asp	Arg	Tyr	Pro	Asn	Gln	Thr	Leu	Lys	
165					170					175						
Pro	Ser	Leu	Tyr	Trp	Trp	Tyr	Leu	Leu	Glu	Leu	Gly	Phe	Tyr	Leu	Ser	
180					185					190						
Leu	Leu	Ile	Arg	Leu	Pro	Phe	Asp	Val	Lys	Arg	Lys	Gly	Gly	Gly	Pro	
195					200					205						
Ser	Ser	Ile	Lys	Pro	Arg	Pro	His	Tyr	Asp	Pro	Pro	Ser	Thr	Ala	Gly	
210					215					220						
Phe	Gln	Gly	Ala	Gly	Asp	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Gly	His	Pro	Asp	Asp	
225					230					235					240	
Leu	Leu	Leu	Gln	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Trp	Leu	Ser	Gly	Ala	Ala	
245					250					255						

Val Thr

- <210> 17
- <211> 1689
- <212> DNA
- <213> 人

- <220>
- <221> CDS

<222> (35).. (901)

<400> 17

```

agcaaatttc aactcccgt tgccattcaa catc atg gat gat ccg aag agt gaa      55
                        Met Asp Asp Pro Lys Ser Glu
                          1                5

cag cag cgc ata ctg cgc cgc cac caa cgc gag agg cag gag ctg cag      103
Gln Gln Arg Ile Leu Arg Arg His Gln Arg Glu Arg Gln Glu Leu Gln
      10                15                20

gcc cag atc cgg agc tta aaa aac tcg gtc ccc aag acc gac aag acg      151
Ala Gln Ile Arg Ser Leu Lys Asn Ser Val Pro Lys Thr Asp Lys Thr
      25                30                35

aaa aga aag cag ttg ctc caa gac gtg gcc cgc atg gag gcc gag atg      199
Lys Arg Lys Gln Leu Leu Gln Asp Val Ala Arg Met Glu Ala Glu Met
      40                45                50                55

gct cag aag cac cgg cag gag ctg gag aag ttc caa gac gac agt agc      247
Ala Gln Lys His Arg Gln Glu Leu Glu Lys Phe Gln Asp Asp Ser Ser
      60                65                70

att gaa tct gtc gtc gaa gac ctg gcc aag atg aat ctg gaa aac cgg      295
Ile Glu Ser Val Val Glu Asp Leu Ala Lys Met Asn Leu Glu Asn Arg
      75                80                85

cct ccc cgc tcc tcc aaa gcc cac aga aag aga gaa aga atg gag tcc      343
Pro Pro Arg Ser Ser Lys Ala His Arg Lys Arg Glu Arg Met Glu Ser
      90                95                100

gag gag agg gag cgc cag gag agc atc ttc cag gct gag atg tcg gag      391
Glu Glu Arg Glu Arg Gln Glu Ser Ile Phe Gln Ala Glu Met Ser Glu
      105                110                115

cac ctg gcc ggc ttc aag cgc gag gag gag gag aag ctc gcc gcc atc      439
His Leu Ala Gly Phe Lys Arg Glu Glu Glu Glu Lys Leu Ala Ala Ile
      120                125                130                135

ctg gga gcc agg ggt ctg gag atg aaa gcg atc ccg gcc gac ggc cac      487
Leu Gly Ala Arg Gly Leu Glu Met Lys Ala Ile Pro Ala Asp Gly His
      140                145                150

tgc atg tac cgc gcc atc caa gac cag ctg gtg ttc agc gtg tct gtg      535
Cys Met Tyr Arg Ala Ile Gln Asp Gln Leu Val Phe Ser Val Ser Val
      155                160                165

gag atg ctg cgc tgc cgc acc gcc agc tac atg aag aag cac gtc gac      583
Glu Met Leu Arg Cys Arg Thr Ala Ser Tyr Met Lys Lys His Val Asp
      170                175                180

```

gag ttc ctg ccc ttc ttc agc aac ccc gag acc agc gac tcc ttc ggc Glu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Pro Glu Thr Ser Asp Ser Phe Gly 185 190 195	631
tac gac gac ttc atg atc tac tgc gac aac atc gtg cgc acc acg gca Tyr Asp Asp Phe Met Ile Tyr Cys Asp Asn Ile Val Arg Thr Thr Ala 200 205 210 215	679
tgg gga ggc cag ctg gag ctg agg gcc ctg tgc cac gtc ctg aag acc Trp Gly Gly Gln Leu Glu Leu Arg Ala Leu Ser His Val Leu Lys Thr 220 225 230	727
ccc atc gag gtg atc cag gcc gac tgc ccc acc ttg atc atc ggg gag Pro Ile Glu Val Ile Gln Ala Asp Ser Pro Thr Leu Ile Ile Gly Glu 235 240 245	775
gag tac gtc aag aag ccg atc atc ctg gtc tac ctg cgc tat gcc tac Glu Tyr Val Lys Lys Pro Ile Ile Leu Val Tyr Leu Arg Tyr Ala Tyr 250 255 260	823
agc ctc ggc gag cac tac aac tcc gtg aca ccg ctc gag gcc ggc gcc Ser Leu Gly Glu His Tyr Asn Ser Val Thr Pro Leu Glu Ala Gly Ala 265 270 275	871
gcc ggg ggc gtg ctc ccg cgt ctc ctg tag gccccaaaggc gctgagcagc Ala Gly Gly Val Leu Pro Arg Leu Leu 280 285	921
cccgaggaaac tgtcgccgtc gccgcatttc ctgagtaggc tcagtttatt ttcccccttt	981
gctttttctct gtttttcttt tccttctttt taatcaaaac tacccgcccc cgccccgccc	1041
ccgcttttctt aaccttgctg ctttcacagg gtgggaaacg aaattcgagg gaaattcccc	1101
ggaaatatga gggaaatctc tgcattgcac caccagaggg gcataaattt gaaagttcta	1161
accttttctt gcccttaagg gtctttttacc tccctcacca actaagattt ggtcatgttg	1221
cgtataactt caccacaaaa atggaaatat tggccggggc cggtgggtca cgcctgtaat	1281
cccagcactt tgggaggccg aggcggggcg atcacaggt caggagtctg agaccagcct	1341
ggccaacatg gtgaaacccc acctctacaa aaaatacaaa aattagccgg gcgtggtggc	1401
aggcacctgt agtcccagat actcgggagg ctaaggcagg agaatcgctt gacgggaagc	1461
ggaggttgca gtgagccgag atcgtgcctt tgcactccag cgtggaagac agtgagactc	1521
cgtctcaaaa aatgaaaaa ttagccaggc aggttggcgg gggcctgtaa tcctagctac	1581
ttggggtgct gaggcaggag aatcaactga acccgggagg cggaggctgc agtgggccgg	1641

gatcgtacta ctgcactcca gcatggaaga cagcgagact ccgtctcc

1689

<210> 18

<211> 288

<212> PRT

<213> 人

<400> 18

Met Asp Asp Pro Lys Ser Glu Gln Gln Arg Ile Leu Arg Arg His Gln
1 5 10 15

Arg Glu Arg Gln Glu Leu Gln Ala Gln Ile Arg Ser Leu Lys Asn Ser
20 25 30

Val Pro Lys Thr Asp Lys Thr Lys Arg Lys Gln Leu Leu Gln Asp Val
35 40 45

Ala Arg Met Glu Ala Glu Met Ala Gln Lys His Arg Gln Glu Leu Glu
50 55 60

Lys Phe Gln Asp Asp Ser Ser Ile Glu Ser Val Val Glu Asp Leu Ala
65 70 75 80

Lys Met Asn Leu Glu Asn Arg Pro Pro Arg Ser Ser Lys Ala His Arg
85 90 95

Lys Arg Glu Arg Met Glu Ser Glu Glu Arg Glu Arg Gln Glu Ser Ile
100 105 110

Phe Gln Ala Glu Met Ser Glu His Leu Ala Gly Phe Lys Arg Glu Glu
115 120 125

Glu Glu Lys Leu Ala Ala Ile Leu Gly Ala Arg Gly Leu Glu Met Lys
130 135 140

Ala Ile Pro Ala Asp Gly His Cys Met Tyr Arg Ala Ile Gln Asp Gln
145 150 155 160

Leu Val Phe Ser Val Ser Val Glu Met Leu Arg Cys Arg Thr Ala Ser
165 170 175

Tyr Met Lys Lys His Val Asp Glu Phe Leu Pro Phe Phe Ser Asn Pro
180 185 190

Glu Thr Ser Asp Ser Phe Gly Tyr Asp Asp Phe Met Ile Tyr Cys Asp
195 200 205

Asn Ile Val Arg Thr Thr Ala Trp Gly Gly Gln Leu Glu Leu Arg Ala
210 215 220

Leu Ser His Val Leu Lys Thr Pro Ile Glu Val Ile Gln Ala Asp Ser
225 230 235 240

Pro Thr Leu Ile Ile Gly Glu Glu Tyr Val Lys Lys Pro Ile Ile Leu
245 250 255

Val Tyr Leu Arg Tyr Ala Tyr Ser Leu Gly Glu His Tyr Asn Ser Val
260 265 270

Thr Pro Leu Glu Ala Gly Ala Ala Gly Gly Val Leu Pro Arg Leu Leu
275 280 285

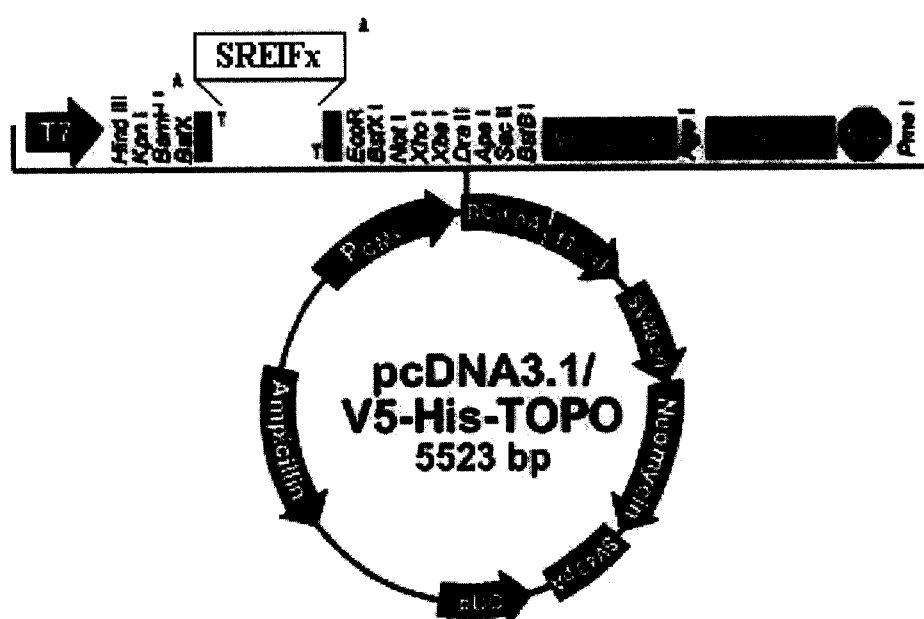


图 1 真核表达载体 pcDT-SREIF-x 的构建示意图

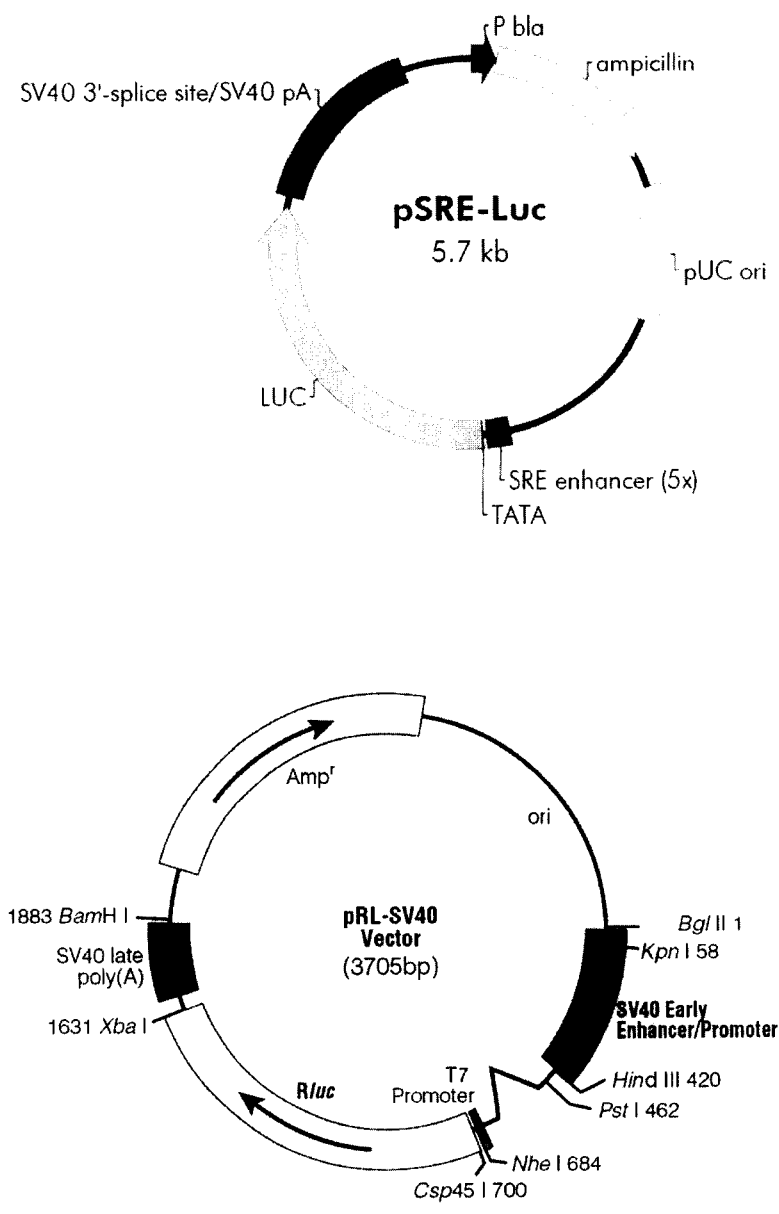


图 2 pSRE-luc 荧光素酶基因报告质粒的结构图（上图）
和 pRL-SV40 报告质粒结构图（下图）

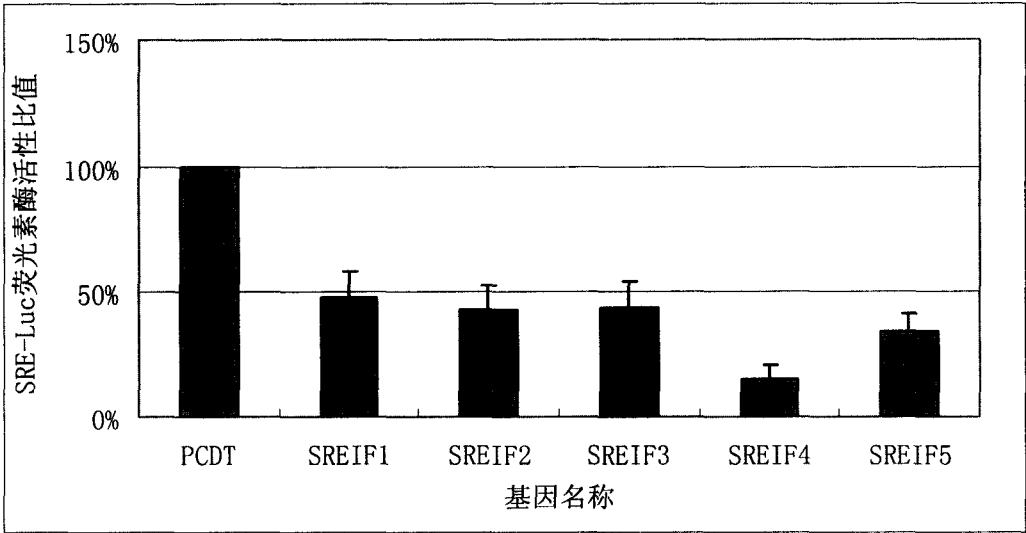


图 3 SREIF1、2、3、4、5 外源表达抑制 PMA 对 SRE 的活化

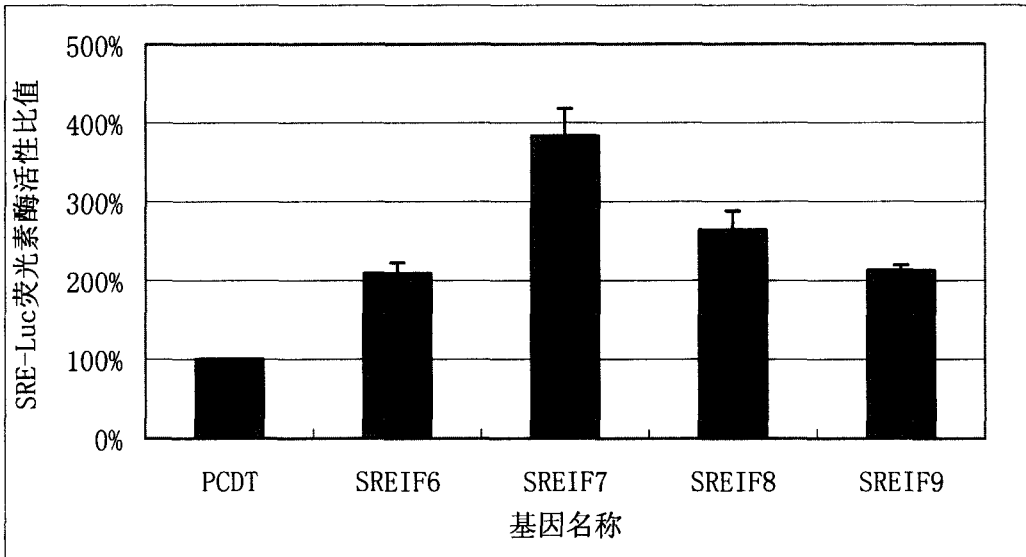


图 4、SREIF6、7、8、9 外源表达促进 SRE 活化