



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105483076 A

(43) 申请公布日 2016. 04. 13

(21) 申请号 201510974956. 6

(22) 申请日 2015. 12. 23

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 刘平生 汪洋 周晓明 马学婧

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 何叶喧

(51) Int. Cl.

C12N 5/07(2010. 01)

C07K 14/47(2006. 01)

A61K 47/24(2006. 01)

A61K 47/42(2006. 01)

A61K 47/14(2006. 01)

权利要求书3页 说明书15页
序列表14页 附图10页

(54) 发明名称

一种脂肪体的制备方法及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种脂肪体的制备方法及其应用。本发明所提供的一种制备由中性脂质和单层磷脂膜组成的脂肪体的方法,包括下述步骤:a1) 将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应,然后进行离心,收集上层液相;a2) 将步骤 a1) 得到的上层液相进行两次以上的纯化;每次纯化的方法为:将上层液相与所述缓冲液混匀,然后使其分层,收集上层液相;a3) 将步骤 a2) 得到的上层液相与所述缓冲液混合,然后使其分层,收集下层液相,其中含有脂肪体。利用本发明提供的方法制备的脂肪体,可招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白、获得人工脂滴,可招募一种或几种载脂蛋白、获得人工脂蛋白,均在制备药物和/或药物载体中具有重要作用。

1. 一种制备由中性脂质和单层磷脂膜组成的脂肪体的方法,包括下述步骤:

a1)将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应,然后进行离心,收集上层液相,从上层液相中分离得到脂肪体。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述“从上层液相中分离得到脂肪体”包括如下步骤:

a2)将所述上层液相进行两次以上的纯化;每次纯化的方法为:将上层液相与所述缓冲液混匀,然后使其分层,收集上层液相;

a3)将步骤a2)得到的上层液相与所述缓冲液混合,然后使其分层,收集下层液相,其中含有脂肪体。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述缓冲液为缓冲液B;

所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度为:15mM~25mM HEPES,80mM~120mM KCl,1.5~2.5mM的MgCl₂;溶剂为去离子水;pH为7.2~7.6。

4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:

所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度为:20mM HEPES,100mM KCl,2mM的MgCl₂;溶剂为去离子水;pH为7.4。

5. 如权利要求1至4任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤a1)中,所述涡旋的参数为:总时长为3~5min;

所述步骤a1)中,所述离心的参数为:18000~22000g、3~7min。

6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于:

所述涡旋的参数为:总时长4min。

所述离心的参数为:20000g、5min。

7. 如权利要求1至6中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤a2)中,所述“上层液相进行两次以上的纯化”中的次数以上层液相与所述缓冲液混匀,分层后无沉淀为准。

8. 如权利要求1至7中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤a2)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数为:18000~22000g、3~7min。

9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于:

所述离心的参数为:20000g、5min。

10. 如权利要求1至9中任一所述的方法,其特征在于:

所述步骤a3)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数为:800~1200g、3~7min。

11. 如权利要求10所述的方法,其特征在于:

所述离心的参数为:1000g、5min。

12. 如权利要求1至11中任一所述的方法,其特征在于:

所述磷脂为b1)、b2)或b3):

b1)1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱;

b2)1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3磷酸乙醇胺;

b3) 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱;

所述中性脂质为c1)或c2):

c1) 甘油三酯;

c2) 胆固醇油酸酯和甘油三酯。

13. 如权利要求12所述的方法,其特征在于:

所述b2)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的质量比为1:0.01~2;

所述b3)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比为1:0.01~2;

所述c2)中,胆固醇油酸酯和甘油三酯的质量比为1~5:1。

14. 如权利要求13所述的方法,其特征在于:

所述b2)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的质量比为2:1、1:1或1:2;

所述b3)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比为2:1、1:1或1:2;

所述c2)中,胆固醇油酸酯和甘油三酯的质量比为5:1、4:1、3:1或2:1。

15. 如权利要求1至14中任一所述的方法,其特征在于:所述磷脂和所述中性脂质的质量比为(d1)至(d6)中的任一种:

(d1) 0.25~3:5;

(d2) 3:5;

(d3) 2:5;

(d4) 1:5;

(d5) 1:10;

(d6) 1:20。

16. 用权利要求1-15任一所述方法制备的脂肪体。

17. 一种制备人工脂滴的方法,包括在权利要求16所述脂肪体上招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白,获得人工脂滴。

18. 如权利要求17所述的方法,其特征在于:

所述固有蛋白为MLDS蛋白、MDT-28蛋白或Perilipin-2蛋白;

所述功能蛋白为ATGL;

所述MLDS蛋白为如下e1)或e2):

e1) 氨基酸序列如序列表中序列2所示的蛋白质;

e2) 将e1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与MLDS蛋白具有相同功能的蛋白质。

所述MDT-28蛋白为如下f1)或f2):

f1) 氨基酸序列如序列表中序列4所示的蛋白质;

f2) 将f1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与MDT-28蛋白具有相同功能的蛋白质。

所述Perilipin-2蛋白为如下g1)或g2):

g1)氨基酸序列如序列表中序列6所示的蛋白质;

g2)将g1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与Perilipin-2蛋白具有相同功能的蛋白质。

所述ATGL为如下h1)或h2):

h1)氨基酸序列如序列表中序列8所示的蛋白质;

h2)将h1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与ATGL具有相同功能的蛋白质。

19. 用权利要求17或18所述方法制备的人工脂滴。

20. 一种制备人工脂蛋白的方法,包括在权利要求16所述脂肪体上招募一种或几种载脂蛋白,获得人工脂蛋白。

21. 如权利要求20所述的方法,其特征在于:

所述载脂蛋白为Apo A-I。

22. 用权利要求20或21所述方法制备的人工脂蛋白。

23. (j1)至(j5)中的任一种:

(j1)权利要求16所述脂肪体在制备人工脂滴和/或人工脂蛋白和/或药物载体中的应用;

(j2)权利要求19所述人工脂滴在制备药物载体中的应用;

(j3)权利要求19所述人工脂滴在制备药物中的应用;

(j4)权利要求22所述人工脂蛋白在制备药物载体中的应用;

(j5)权利要求22所述人工脂蛋白在制备药物中的应用。

一种脂肪体的制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种脂肪体的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 脂滴(lipid droplet,LD)是一种细胞器,它由中性脂质核心,单层磷脂膜与相关蛋白组成,这一细胞器的功能包括:1)脂质的合成,存储,代谢和运输;2)蛋白质的存储和降解;3)脂质信号分子和激素的生产和修饰;4)与其他细胞器的相互作用。由于脂滴具有上述的多种功能,许多人类的疾病,特别是代谢性疾病,与脂滴的形成和动态变化息息相关,然而,脂滴的形成机制和动态变化研究依然困难重重。目前仍然缺乏对脂滴如何形成、脂滴的功能及调控机制的全面了解。脂滴的组成的复杂性及其与其它细胞器的相互作用干扰了我们解构这些机制的能力。

[0003] 在过去的十年中,人们致力于脂滴的分离纯化,并通过蛋白质组和脂质组研究阐明脂滴的蛋白质和脂质组成。可是蛋白质组和其他的组分研究发现,分离得到的脂滴几乎总是含有内质网、线粒体和其它细胞器的碎片。可见,制备结构和组成上都接近天然脂滴的人工脂滴(Artificial Lipid Droplets,ALDs)是非常必要的。

[0004] 除脂滴以外,人体内还有一类由单层磷脂膜包裹中性脂,表面覆有蛋白的结构,称为脂蛋白(lipoprotein)。虽然脂蛋白与脂滴的结构非常类似,但二者定位不同,表面蛋白不同:脂滴存在于细胞中,而脂蛋白存在于血液中;脂滴上的主要蛋白为脂滴固有/结构蛋白(lipid droplet resident/structural protein),而脂蛋白上的主要蛋白为载脂蛋白(apolipoprotein)。不同的脂蛋白表面有不同的载脂蛋白。脂蛋白的种类和比例对人体健康有着非常重要的影响。高密度脂蛋白(high-density lipoprotein,HDL)是胆固醇逆向运输(cholesterol reverse transport)的关键组分,可防止胆固醇在血管壁上的沉积,对动脉粥样硬化等心脑血管疾病有非常重要的预防作用。人工脂蛋白或可用于高密度脂蛋白的补充制剂或其他药物载体。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的问题是提供药物载体及一种体外研究脂滴的体系。

[0006] 为解决上述问题,本发明首先提供了一种脂肪体的制备方法,所述脂肪体由中性脂质和单层磷脂膜组成。

[0007] 本发明所提供的制备脂肪体的方法,包括下述步骤:

[0008] a1)将磷脂和中性脂质在缓冲液中进行涡旋以实现两者的反应,然后进行离心,收集上层液相,从上层液相中分离得到脂肪体。

[0009] 所述“从上层液相中分离得到脂肪体”可包括如下步骤:

[0010] a2)将所述上层液相进行两次以上的纯化;每次纯化的方法可为:将上层液相与上述缓冲液混匀,然后使其分层,收集上层液相;

[0011] a3)将步骤a2)得到的上层液相与上述缓冲液混合,然后使其分层,收集下层液相,

其中含有脂肪体。

[0012] 所述缓冲液可为缓冲液B。

[0013] 所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度可为:15mM~25mM HEPES,80mM~120mM KCl,1.5~2.5mM的MgCl₂;溶剂可为去离子水;pH可为7.2~7.6。

[0014] 所述缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度具体可为:20mM HEPES,100mM KCl,2mM的MgCl₂;溶剂具体可为去离子水;pH具体可为7.4。

[0015] 所述步骤a1)中,所述涡旋的参数可为:总时长为3~5min;

[0016] 所述步骤a1)中,所述离心的参数可为:18000~22000g、3~7min。

[0017] 所述步骤a1)中,所述涡旋的参数具体可为:总时长4min。

[0018] 所述步骤a1)中,所述离心的参数具体可为:20000g、5min。

[0019] 所述步骤a2)中,所述“上层液相进行两次以上的纯化”中的次数以上层液相与所述缓冲液混匀,分层后无沉淀为准。

[0020] 所述步骤a2)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数可为:18000~22000g、3~7min。

[0021] 所述步骤a2)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数具体可为:20000g、5min。

[0022] 所述步骤a3)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数可为:800~1200g、3~7min。

[0023] 所述步骤a3)中,所述“使其分层”是通过离心实现的,所述离心的参数具体可为:1000g、5min。

[0024] 所述磷脂为b1)、b2)或b3):

[0025] b1)1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC);

[0026] b2)1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE);

[0027] b3)1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)。

[0028] 所述中性脂质为c1)或c2):

[0029] c1)甘油三酯;

[0030] c2)胆固醇油酸酯(cholesteryl oleate,CO)和甘油三酯。

[0031] 所述b2)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的质量比可为1:0.01~2;

[0032] 所述b3)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比可为1:0.01~2;

[0033] 所述c2)中,甘油三酯和胆固醇油酸酯的质量比可为1~5:1。

[0034] 所述b2)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺的质量比具体可为2:1、1:1或1:2;

[0035] 所述b3)中,1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱和1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱的质量比具体可为2:1、1:1或1:2;

[0036] 所述c2)中,甘油三酯和胆固醇油酸酯的质量比具体可为5:1、4:1、3:1或2:1。

[0037] 所述甘油三酯(triacylglycerol, TAG)的制备方法可如下:(1)取死亡的SD大鼠1只,取皮下脂肪与大网膜脂肪,剪碎;(2)将步骤(1)得到的碎组织置于离心管中,加入萃脂液甲(氯仿:去离子水=1:1, v/v),剧烈涡旋1分钟,然后8000g离心10分钟;(3)取步骤(2)得到的下层有机相,置于新的离心管中,如果发现其浑浊的话按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取直至其澄清;(4)取步骤(3)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(若吹干过程中发现其变浑浊的话则按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取);(5)取步骤(4)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(连续3次称重质量不变),产物即为甘油三酯。

[0038] 所述甘油三酯可为甘油三油酸酯(triolein, T0)。

[0039] 所述甘油三油酸酯(triolein, T0)具体可为Sigma公司的产品,产品目录号为92860。

[0040] 所述磷脂和所述中性脂质的质量比可为(d1)至(d6)中的任一种:

[0041] (d1)0.25~3:5;

[0042] (d2)3:5;

[0043] (d3)2:5;

[0044] (d4)1:5;

[0045] (d5)1:10;

[0046] (d6)1:20。

[0047] 利用上述脂肪体的制备方法制备的脂肪体也属于本发明的保护范围。

[0048] 本发明还提供了一种制备人工脂滴的方法。

[0049] 本发明所提供的制备人工脂滴的方法,包括在通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体上招募一种或几种固有蛋白和/或功能蛋白,获得人工脂滴。

[0050] 所述固有蛋白可为MLDS蛋白、MDT-28蛋白或Perilipin-2蛋白。

[0051] 所述功能蛋白可为ATGL。

[0052] 所述MLDS蛋白可为如下e1)或e2):

[0053] e1)氨基酸序列如序列表中序列2所示的蛋白质;

[0054] e2)将e1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与MLDS蛋白具有相同功能的蛋白质。

[0055] 所述MDT-28蛋白可为如下f1)或f2):

[0056] f1)氨基酸序列如序列表中序列4所示的蛋白质;

[0057] f2)将f1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与MDT-28蛋白具有相同功能的蛋白质。

[0058] 所述Perilipin-2蛋白可为如下g1)或g2):

[0059] g1)氨基酸序列如序列表中序列6所示的蛋白质;

[0060] g2)将g1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与Perilipin-2蛋白具有相同功能的蛋白质。

[0061] 所述ATGL可为如下h1)或h2):

[0062] h1)氨基酸序列如序列表中序列8所示的蛋白质;

[0063] h2)将h1)所示的蛋白质经过1至10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加得到的与ATGL具有相同功能的蛋白质。

- [0064] 利用上述制备人工脂滴的方法制备的人工脂滴也属于本发明的保护范围。
- [0065] 本发明还提供了一种制备人工脂蛋白的方法。
- [0066] 本发明所提供的制备人工脂蛋白的方法,包括在通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体上招募一种或几种载脂蛋白,获得人工脂蛋白。
- [0067] 所述载脂蛋白为Apo A-I。
- [0068] 所述Apo A-I具体可通过参考文献Peitsch,M.C.et al.A purification method for apolipoprotein A-I and A-II.Anal Biochem 178,301-305(1989).中记载的方法获得。
- [0069] 利用上述制备人工脂蛋白的方法制备的人工脂蛋白也属于本发明的保护范围。
- [0070] (j1)至(j5)中的任一种也属于本发明的保护范围:
- [0071] (j1)通过上述任一所述脂肪体的制备方法制备的脂肪体在制备人工脂滴和/或人工脂蛋白和/或药物载体中的应用;
- [0072] (j2)通过上述任一所述人工脂滴的制备方法制备的人工脂滴在制备药物载体中的应用;
- [0073] (j3)通过上述任一所述人工脂滴的制备方法制备的人工脂滴在制备药物中的应用;
- [0074] (j4)通过上述任一所述人工脂蛋白的制备方法制备的人工脂蛋白在制备药物载体中的应用;
- [0075] (j5)通过上述任一所述人工脂蛋白的制备方法制备的人工脂蛋白在制备药物中的应用。
- [0076] 本发明提供了一种脂肪体的制备方法及其应用。本发明所提供的一种脂肪体的制备方法通过涡旋混合中性脂质和磷脂,使用两步法纯化,制备出了由中性脂质核心和单层磷脂膜构成的脂肪体。在脂肪体上招募固有蛋白和/或功能蛋白,如细菌的蛋白MLDS,线虫的蛋白MDT-28、哺乳动物的蛋白Perilipin-2、脂肪甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase,ATGL),获得人工脂滴;在脂肪体上招募载脂蛋白,如Apo A-I(apolipoprotein A-I),获得人工脂蛋白。利用本发明提供的方法制备的脂肪体、人工脂滴和人工脂蛋白,可作为药物载体,进而完成各种生物学和医学的目标。

附图说明

- [0077] 图1为使用涡旋及两步法离心制备纯化脂肪体。
- [0078] A为脂肪体制备流程图:a为制备脂肪体的组分;b为制备脂肪体的流程图,蓝色箭头代表涡旋,红色箭头显示被移除的组分。
- [0079] B为脂肪体制备过程中各组分的形态:a为光学显微镜的观察结果(比例尺=10微米):箭头表示非球形结构,左图为初始制备组分,中图为沉淀组分,右图为上层组分;b为荧光显微镜的观察结果(比例尺=10微米):箭头表示非球形结构,左图为初始制备组分,中图为沉淀组分,右图为上层组分;c为显微镜进行透射电镜正染的结果(比例尺=1微米):左图为初始制备组分,中图为沉淀组分,右图为上层组分。
- [0080] C为光学显微镜观察脂肪体的形态(比例尺=10微米):左图为微分干涉相衬光学显微镜,右图为荧光显微镜。

[0081] D为透射电镜正染脂肪体和脂质体的结果(比例尺=500纳米):左图为脂肪体,右图为脂质体。

[0082] 图2为脂肪体的特征。

[0083] 其中A为脂肪体和线粒体的形态(比例尺=500纳米):a为透射电镜的观察结果:左图为脂肪体,右图为线粒体;b为冷冻电镜的观察结果:左图为脂肪体,右图为线粒体。

[0084] B通过动态光散射(DLS)测定脂肪体的尺寸,多分散性指数=0.085。

[0085] C为薄层层析色谱分析脂肪体制备的过程中每个组分的DOPC/总脂质的比例:a为碘蒸气对样品染色结果(泳道1为脂质Marker,泳道2为初始制备组分,泳道3为混合组分,泳道4为脂肪体a);b为各组分DOPC与总脂质的比例,N=3,平均值±方差。

[0086] D为脂肪体与脂滴的形态:a为脂肪体的形态,左图为肉眼观察结果,中图为光学显微镜的观察结果,右图为荧光显微镜的观察结果;b为小鼠肝脏组织-脂滴的形态,左图为肉眼观察结果,中图为光学显微镜的观察结果,右图为荧光显微镜的观察结果;c为小鼠棕色脂肪组织-脂滴的形态,左图为肉眼观察结果,中图为光学显微镜的观察结果,右图为荧光显微镜的观察结果;d为浊红球菌RHA1-脂滴的形态,左图为肉眼观察结果,中图为光学显微镜的观察结果,右图为荧光显微镜的观察结果。

[0087] 图3制备脂肪体的影响因素。

[0088] A为不同涡旋时间(1为脂肪体b,2为脂肪体c,3为脂肪体d,4为脂肪体a)对脂肪体的影响:a为脂肪体的形态,b为脂肪体的光密度,c为脂肪体的尺寸;

[0089] B为不同比例的DOPC和TAG制备的脂肪体的光密度(a)和尺寸(b);

[0090] C为不同比例的DOPC和DSPC制备的脂肪体的光密度(a)和尺寸(b);

[0091] D为不同比例的DOPC和DOPE制备的脂肪体的光密度(a)和尺寸(b);

[0092] E为不同比例的TAG和CO制备的脂肪体的光密度(a)和尺寸(b);

[0093] F为4°C或室温下孵育7天脂肪体的光密度(a)和尺寸(b)。

[0094] 图4为室温或4°C下储存7天的脂肪体的显微镜照片(比例尺=10微米)。

[0095] A和C为光学显微镜;B和D为荧光显微镜。

[0096] 图5为SMT3-Perilipin-2蛋白的分离与纯化。

[0097] A为用SDS-PAGE分离并通过银染(上图)和Western印迹(下图)分析IPTG诱导前后的全细胞裂解液。黑色箭头指向SMT3-Perilipin-2蛋白对应的条带;

[0098] B为经镍离子金属亲和层析柱纯化的各组分进行SDS-PAGE和胶体蓝染色的分析结果。

[0099] C为从镍柱洗脱的SMT3-Perilipin-2蛋白通过分子筛进一步纯化。四个组分(1,2,3和4)根据其保留体积分别收集,图中用蓝色短线分开表示;

[0100] D为通过SDS-PAGE分析镍柱纯化的SMT3-Perilipin-2蛋白(咪唑洗脱)和分子筛得到的组分。

[0101] 图6为人工重组的不同物种来源的脂滴固有/结构蛋白被招募到脂肪体上。

[0102] 图7为通过募集脂滴的固有/结构蛋白构建人工脂滴。

[0103] A为人工脂滴构建示意图;

[0104] B为脂肪体可以招募脂滴固有/结构蛋白GFP融合蛋白;

[0105] C为SMT3-Perilipin-2蛋白饱和度测定。

- [0106] 图8为脂肪体招募脂滴固有/结构蛋白GFP融合蛋白(比例尺=5微米)。
- [0107] 图9为SMT3-ATGL蛋白在室温或4℃下与脂肪体孵育后的银染分析结果。
- [0108] 图10为脂肪体上募集ATGL与Apo A-I。
- [0109] A为SMT3-ATGL蛋白饱和度测定,其中泳道1至7对应加入的SMT3-ATGL蛋白浓度分别为:0.091,0.132,0.171,0.209,0.244,0.278,0.310微克/微升;
- [0110] B为通过募集高密度脂蛋白的载脂蛋白Apo A-I构建人工脂蛋白。

具体实施方式

- [0111] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。
- [0112] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。
- [0113] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0114] 本发明中所述脂肪体(adiposome)定义为一类以天然或人工合成的中性脂质为核心,天然或人工合成的极性脂质单层膜包裹的,人工合成的结构。脂肪体的脂质组成及形态结构与脂滴近似,因此可以作为制备人工脂滴的主要原材料。
- [0115] 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)为Avanti公司的产品,产品状态为DOPC溶液,即DOPC溶解于氯仿中。
- [0116] 1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)为Avanti公司的产品,产品状态为DOPE溶液,即DOPE溶解于氯仿中。
- [0117] 1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)为Avanti公司的产品,产品状态为DSPC溶液,即DSPC溶解于氯仿中。
- [0118] 胆固醇油酸酯(cholesteryl oleate,CO)为Alfa Aesar公司的产品,尼罗红为Sigma-Aldrich公司的产品,LipidTOX red为Invitrogen公司的产品、产品目录号为H34476,抗Perilipin-2为Abcam公司的产品、产品目录号为ab108323,Percoll为GE Healthcare公司产品,醋酸铀、25%戊二醛和EMbed 812包埋试剂盒均为Electron Microscopy Sciences公司(哈特菲尔德,美国)产品,四氧化钨(电镜级)为NAKALAI Tesque公司(京都,日本)产品,丹宁酸为Sigma公司的产品,C57BL/6小鼠为北京维通利华实验动物技术有限公司产品。动态光散射仪(DLS,Delsa Nano C颗粒分析仪)为Beckman公司产品。
- [0119] 下述实施例中的“涡旋”均使用Vortex-Genie 1涡旋仪(Scientific Industries, Inc.公司,美国)进行,“胶体蓝染色”均使用胶体蓝染色试剂盒(Invitrogen公司的产品,产品目录号为LC6025)进行。
- [0120] 线粒体从C57BL/6小鼠的棕色脂肪组织分离得到,具体分离方法参考Yu, J. et al. Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment. *Biochim Biophys Acta* 1853, 918-928, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.020(2015).
- [0121] 2.5%戊二醛溶液的制备方法:将25%戊二醛溶解于pH7.4、0.1M PB缓冲液,使戊二醛在体系中质量浓度为2.5%。
- [0122] 实施例1中的甘油三酯(triacylglycerol, TAG)的制备方法如下:(1)取死亡的SD大鼠1只,取皮下脂肪与大网膜脂肪,剪碎;(2)将步骤(1)得到的碎组织置于离心管中,加入

萃脂液甲(氯仿:去离子水=1:1,v/v),剧烈涡旋1分钟,然后8000g离心10分钟;(3)取步骤(2)得到的下层有机相,置于新的离心管中,如果发现其浑浊的话按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取直至其澄清;(4)取步骤(3)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干,(若吹干过程中发现其变浑浊的话则按照步骤(2)中的萃取方法进行重复萃取);(5)取步骤(4)得到的下层有机相,在高纯氮下吹干(连续3次称重质量不变),产物即为甘油三酯。

[0123] 缓冲液B的溶质及其在缓冲液中浓度为:20mM HEPES(实际应用中15mM-25mM HEPES均可),100mM KCl(实际应用中80mM-120mM KCl均可),2mM MgCl₂(实际应用中1.5-2.5mM MgCl₂均可);溶剂为去离子水;pH为7.4(实际应用中7.2-7.6均可)。

[0124] 脂质体为磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺按质量比3:7混合,然后用带有100nm孔径的聚碳酸酯滤器微型挤出机(Avanti公司产品)制备的单层脂质体,具体制备方法参考 Nakatogawa,H.,Ichimura,Y.&Ohsumi,Y. Atg8,a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation,mediates membrane tethering and hemifusion. Cell 130, 165-178,doi:10.1016/j.cell.2007.05.021(2007).

[0125] 用荧光显微镜对脂肪体或脂滴进行观察,具体步骤如下:将脂肪体或脂滴用尼罗红(浓度为1μg/ml)或LipidTOX red稀释液(LipidTOX red用缓冲液B以1:1000倍稀释,得到LipidTOX red稀释液)染色,室温孵育30min,取孵育后的脂肪体或脂滴6μl,滴加在载玻片上,然后加2μl抗荧光淬灭剂(碧云天公司产品,产品目录号为P0126)混合、盖盖玻片。用Zeiss M2荧光显微镜、奥林巴斯FV1000荧光共聚焦显微镜或DeltaVision OMX V3超分辨率显微镜获得荧光图像。

[0126] 透视电镜正染具体步骤如下:取脂肪体或脂质体8μl滴在辉光放电处理后的覆有碳膜的铜网上,静置1min,用滤纸吸干多余的样品,然后将样品用1%四氧化锇固定10min、去离子水漂洗,再将样品分别用0.1%单宁酸和2%乙酸双氧铀依次染色5min、用去离子水漂洗。用Tecnai Spirit(FEI)透射型电子显微镜在100千伏下获得显微照片。

[0127] 用透视电镜对脂肪体或线粒体进行观察,具体步骤如下:取脂肪体或线粒体迅速与融化的3%低熔点琼脂糖混合,并在冰上凝固,然后切成约1mm³的小块。将小块在2.5%戊二醛溶液中固定30min,然后继续用溶于pH7.4、0.1M PB缓冲液的1%四氧化锇在室温下固定1h,得到固定块。将该固定块用去离子水洗涤,用乙醇脱水,然后用EMbed 812包埋试剂盒进行渗透和包埋,并在60℃下聚合24h,用Leica EM UC6超微切片机制备70nm超薄切片。用Tecnai Spirit(FEI)透射型电子显微镜在100千伏下获得显微照片。

[0128] 用冷冻电镜对脂肪体或线粒体进行观察,具体步骤如下:取脂肪体或线粒体4μl,滴加在铜网上。使用Vitrobot Mark IV(FEI公司产品)在100%湿度下吸干3秒,然后快速浸入预先用液氮冷却的液态乙烷中使其玻璃化。使用装有Gatan UltraScan4000相机(产品型号895)的Titan Krios冷冻电子显微镜(FEI公司产品)在300千伏下拍摄显微照片。

[0129] 缓冲液T为pH7.4、含50mM Tris-HCl和150mM NaCl的缓冲液。

[0130] 载体pET28a为Novagen公司产品。

[0131] “改造后的pET28a质粒”记载于如下文献中:Hu,W.,Wu,H.,Zhang,H.,Gong,W.& Perrett,S. Resonance assignments for the substrate binding domain of Hsp70 chaperone Ssa1 from *Saccharomyces cerevisiae*. Biomol NMR Assign 9, 329-332,doi:10.1007/s12104-015-9603-5(2015)。“改造后的pET28a质粒”在下文中命名为载

体pET28a-SMT3。

[0132] 载体pGEX-6p-1购自Novagen公司。

[0133] 镍离子金属亲和层析柱填料为螯合有镍离子的Chelating Sepharose Fast Flow,为Amersham Biosciences公司产品。

[0134] GST亲和层析柱填料为生工生物工程(上海)有限公司产品。

[0135] 实施例1、脂肪体的制备

[0136] 一、制备脂肪体a

[0137] 1、利用运用涡旋和两步法离心制备脂肪体a,具体步骤如下:

[0138] (1)取80 μ L DOPC溶液(其中含有2mg DOPC)加入到微量离心管中,用高纯氮气吹干溶剂。

[0139] (2)完成步骤(1)后,向微量离心管中加入100 μ l缓冲液B和5mg TAG,涡旋4min(涡旋10s,停止10s),得到乳白色的脂质混合物1(即初始制备组分),将该脂质混合物1以20000g离心5min(实际应用中18000-22000g离心3-7min均可)。离心后,微量离心管中底部为沉淀组分1,液相体系呈现两层分层(上层为白色带1,白色带1以下的部分为溶液1)。

[0140] (3)完成步骤(2)后,通过抽取的方式弃除溶液1与沉淀组分1,保留白色带1,加入100 μ l缓冲液B,涡旋,得到乳白色的脂质混合物2,将该脂质混合物2以20000g离心5min(实际应用中18000-22000g离心3-7min均可)。离心后,如果微量离心管中底部有沉淀,即为沉淀组分2,液相体系呈现两层分层(上层为白色带2,白色带2以下的部分为溶液2)。

[0141] (4)完成步骤(3)后,通过抽取的方式弃除溶液2与沉淀组分2,保留白色带2,加入100 μ l缓冲液B,涡旋,得到乳白色的脂质混合物3,将该脂质混合物3以20000g离心5min(实际应用中18000-22000g离心3-7min均可)。离心后,液相体系呈现两层分层(上层为白色带3,白色带3以下的部分为溶液3)。

[0142] 步骤(4)即步骤(3)的重复,实际应用中的步骤(3)的重复次数以白色带下层无沉淀为准。

[0143] (5)完成步骤(4)后,取白色带3,加入100 μ l缓冲液B,涡旋混匀,1000g离心5min(实际应用中800-1200g离心3-7min),离心后,液相体系呈现两层分层(上层为白色带4,白色带4以下的部分为溶液4)。收集溶液4,即为脂肪体a。

[0144] 将上述步骤中的白色带4命名为上层组分。

[0145] 将上述步骤中的沉淀组分1和沉淀组分2混合,命名为沉淀组分。

[0146] 将上述步骤中的沉淀组分和上层组分混合,命名为混合组分。

[0147] 利用上述方法制备脂肪体a的具体流程见图1中A(其中a为制备脂肪体a的组分,b为制备脂肪体a的流程图)。对制备脂肪体a过程中的组分形态用光学显微镜和荧光显微镜进行观察、用显微镜进行透射电镜正染,结果如下:初始制备组分、沉淀组分和上层组分中除含中性脂质的球状结构,还存在许多其它类型的结构(图1中B);溶液4几乎所有结构均为球形,且均为尼罗红阳性,而且尼罗红标记的结构的尺寸与光学显微镜图像中的球状结构的尺寸一致,这表明这些球状结构都含有TAG核心(图1中C);将脂肪体a和脂质体用显微镜进行透射电镜正染,结果表明两者具有明显的差异(图1中D)。

[0148] 2、脂肪体a的特征

[0149] (1)用透射电镜分别对脂肪体a和线粒体进行观察,用冷冻电镜分别对脂肪体a和

线粒体进行观察,结果表明(图2中A),脂肪体a由单层磷脂膜包裹,线粒体由双层磷脂膜包裹。

[0150] (2)用动态光散射仪测定脂肪体a的平均尺寸约为189纳米(图2中B),然后使用文献(Ding Y,Zhang S,et al.Isolating lipid droplets from multiple species.Nat Protoc.2013 Jan;8(1):43-51.doi:10.1038/nprot.2012.142.Epub 2012 Dec 6.)中的公式,计算得到脂肪体a中DOPC与总脂质(总脂质即TAG和DOPC)的体积比约为6.6%。

[0151] (3)使用薄层色谱法分析脂质,具体步骤如下:

[0152] a、取待提取物(待提取物体积和下述萃脂液乙中缓冲液B的体积之和为300 μ l),用萃脂液乙(由300 μ l氯仿、300 μ l甲醇和缓冲液B组成)进行萃取以获取脂质(收集有机相,命名为有机相甲),剩余的部分再加入300 μ l氯仿进行萃取以进一步获取脂质(收集有机相,命名为有机相乙);将有机相甲和有机相乙混合,用氮气吹干,得到待提取物的总脂质;待提取物为脂肪体a、脂质混合物1(即初始制备组分)或混合组分。

[0153] b、将步骤a得到的总脂质溶解在100 μ l氯仿中,上样10 μ l至硅胶板;

[0154] c、完成步骤b后,样品在正己烷:乙醚:冰乙酸(体积比为80:20:1)的展开剂中展开,以分离TAG;

[0155] d、完成步骤c后,在空气中挥干有机溶剂(即步骤c中的正己烷、乙醚和冰乙酸),将硅胶板再次在氯仿:甲醇:冰乙酸:水(体积比为75:13:9:3)的溶剂系统中展开,以分离DOPC;

[0156] e、完成步骤d后,用饱和碘蒸气进行染色,用ImageJ软件对脂质斑点的灰度进行量化。

[0157] 结果表明(图2中C),样品中DOPC与脂质的比例为 $7.1 \pm 1.2\%$,与步骤(2)中的计算值相似,表明脂肪体a具有单层磷脂膜的结构。

[0158] (4)根据Ding Y,Zhang S,et al.Isolating lipid droplets from multiple species.Nat Protoc.2013 Jan;8(1):43-51.doi:10.1038/nprot.2012.142.Epub 2012 Dec 6.)和Yu,J,et al.Lipid droplet remodeling and interaction with mitochondria in mouse brown adipose tissue during cold treatment.Biochim Biophys Acta 1853,918-928,doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.020(2015)中记载的方法分别从C57BL/6小鼠肝脏组织、C57BL/6小鼠棕色脂肪组织和产油菌RHA1中分离脂滴,依次命名为肝脏组织-脂滴(Liver LD)、棕色脂肪组织-脂滴(BAT LD)和RHA1-脂滴(RHA1 LD)。

[0159] 脂肪体a、RHA1 LD、Liver LD和BAT LD均呈牛奶状溶液。用动态光散射仪测量脂肪体a、RHA1 LD、Liver LD和BAT LD的平均尺寸,结果BAT LD的粒径最大,平均直径为1848nm;RHA1 LD的粒径最小,平均直径为493nm;脂肪体a的平均直径为189nm(图2中B)。上述结果与光学显微镜得到的结果基本一致(图2中D)。用荧光显微镜对脂肪体或脂滴进行观察,脂肪体a、RHA1 LD、Liver LD和BAT LD都呈现球状结构(图2中D),表明它们都含有TAG核心。

[0160] 3、影响脂肪体形成的因素

[0161] 为优化制备脂肪体的条件,我们系统地改变了步骤1中所述涡旋和两步法中两个主要因素,即步骤(2)中的涡旋时间和两种原料(磷脂与中性脂质)的比例,并通过测量在600nm波长处的光密度(OD_{600})来反映脂肪体的产量,通过动态光散射仪测量脂肪体的尺寸。

[0162] (1)涡旋时间的优化

[0163] 按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的涡旋4min分别替换为涡旋1min、涡旋2min和涡旋3min,其它步骤均不变,得到脂肪体b、脂肪体c和脂肪体d,然后分别测量脂肪体a、脂肪体b、脂肪体c或脂肪体d的尺寸和光密度。

[0164] 实验结果见图3中A。结果表明,脂肪体的产量随涡旋时间的延长而上升,而脂肪体尺寸随涡旋时间的延长而降低,在大约2min达到最小值并进入平台。综合脂肪体的光密度较高(即产量较高)且脂肪体的尺寸较大两个因素,确定涡旋和两步法中步骤(2)的最佳涡旋时间为4min。

[0165] (2)磷脂与中性脂质的比例优化

[0166] 制备脂肪体a中的磷脂具体为DOPC,中性脂质具体为TAG,DOPC:TAG的比例为2:5。

[0167] ①按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的2mg DOPC分别替换为0.25mg DOPC、0.5mg DOPC、1mg DOPC和3mg DOPC,其它步骤均不变,得到脂肪体a1(DOPC:TAG的比例为1:20)、脂肪体a2(DOPC:TAG的比例为1:10)、脂肪体a3(DOPC:TAG的比例为1:5)和脂肪体a4(DOPC:TAG的比例为3:5),然后分别测量脂肪体a1、脂肪体a2、脂肪体a3和脂肪体a4的尺寸和光密度。

[0168] 实验结果见图3中B。结果表明,当DOPC与TAG的比例为2:5时,脂肪体的产量最高;脂肪体的尺寸随着DOPC与TAG的比例上升而减小,至DOPC:TAG为1:5时达到最小并进入平台。综合脂肪体的即产量较高且脂肪体的尺寸较大两个因素,确定制备脂肪体中DOPC与TAG的最佳比例为2:5。

[0169] ②按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的2mg DOPC分别替换为1.33mg DOPC和0.67mg DSPC、1mg DOPC和1mg DSPC、0.67mg DOPC和1.33mg DSPC、以及2mg DSPC,其它步骤均不变,得到脂肪体A1(DOPC: DSPC的比例为2:1)、脂肪体A2(DOPC: DSPC的比例为1:1)、脂肪体A3(DOPC: DSPC的比例为1:2)和脂肪体A4(磷脂仅为DSPC),然后分别测量脂肪体A1、脂肪体A2、脂肪体A3和脂肪体A4的尺寸和光密度。

[0170] 结果表明,当DOPC与DSPC的比例降低时,即DSPC的相对含量升高时,脂肪体的产量明显下降(图3中C的a),而脂肪体的尺寸随着DOPC与DSPC的比例降低而急剧增大(图3中C的b)。

[0171] ③按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的2mg DOPC分别替换为1.33mg DOPC和0.67mg DOPE、1mg DOPC和1mg DOPE、0.67mg DOPC和1.33mg DOPE、和、2mg DOPE,其它步骤均不变,得到脂肪体B1(DOPC:DOPE的比例为2:1)、脂肪体B2(DOPC:DOPE的比例为1:1)、脂肪体B3(DOPC:DOPE的比例为1:2)和脂肪体B4(磷脂仅为DOPE),然后分别测量脂肪体B1、脂肪体B2、脂肪体B3和脂肪体B4的尺寸和光密度。

[0172] 结果表明,DOPE的掺入不影响脂肪体的产量,直至DOPC与DOPE的比例达到1:2时,脂肪体的产量才急剧下降(图3中D的a),而脂肪体的尺寸随着DOPC与DOPE的比例降低而急剧增大,直至DOPC与DOPE的比例达到1:2时,脂肪体的尺寸无法检出(图3中D的b)。

[0173] ④按照上述步骤1的方法,将步骤1中(1)的5mg TAG分别替换为4.17mg TAG和0.83mg CO、4mg TAG和1mg CO、3.75mg TAG和1.25mg CO、和、3.33mg TAG和1.67mg CO,其它步骤均不变,得到脂肪体C1(TAG:CO的比例为5:1)、脂肪体C2(TAG:CO的比例为4:1)、脂肪体C3(TAG:CO的比例为3:1)和脂肪体C4(TAG:CO的比例为2:1),然后分别测量脂肪体C1、脂肪体C2、脂肪体C3和脂肪体C4的尺寸和光密度。

[0174] 结果表明,CO的掺入不影响脂肪体的产量,直至TAG与CO的比例达到3:1时,脂肪体的产量才显著下降(图3中E的a),脂肪体的尺寸也略有下降(图3中E的b),表明中性脂质组成可以极大地影响脂肪体产量和大小。

[0175] 4、脂肪体的稳定性

[0176] 在室温或4℃条件下孵育脂肪体a,孵育7天。整个孵育过程中,每天测定脂肪体a的尺寸、在OD₆₀₀处的光密度,并用光学显微镜和荧光显微镜对脂肪体进行观察。

[0177] 结果表明(图3中F和图4),整个孵育过程中,脂肪体a的光密度和尺寸均无显著变化,可见脂肪体a是相对稳定的。

[0178] 实施例2、通过招募固有蛋白和/或功能蛋白的重组人工脂滴和通过招募载脂蛋白重组人工脂蛋白

[0179] 下述实施例中的Ulp1记载在如下文献中:Hu, W., Wu, H., Zhang, H., Gong, W. & Perrett, S. Resonance assignments for the substrate binding domain of Hsp70 chaperone Ssa1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomol NMR Assign* 9, 329-332, doi: 10.1007/s12104-015-9603-5 (2015)。在下述实验孵育过程中Ulp1可剪切蛋白上的SMT3标签。

[0180] 脂滴是高度动态的,并通过多种脂滴蛋白的介导参与数目繁多的生理功能和相互作用。脂滴上的蛋白可大致分为两类:固有蛋白和动态蛋白。固有蛋白被认为选择性的定位于脂滴上,参与脂滴大小的控制,并介导动态蛋白的定位。例如,磷酸化的PLIN1促使激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive lipase, HSL)定位于脂滴上。因此,使用脂肪体来解构脂滴的功能,就必须在脂肪体上装载脂滴固有蛋白,然后在成功招募固有蛋白生成人工脂滴的基础上,进一步招募功能蛋白。对于脂蛋白而言,不同的载脂蛋白不仅是不同脂蛋白的特异性标记,同时也是脂蛋白的骨架之一。本发明中,脂滴固有蛋白具体为来自于从细菌到哺乳动物的不同生物体的脂滴固有蛋白,包括从产油菌RHA1中分离的RHA1-脂滴(RHA1 LD)上的MLDS蛋白,线虫脂滴上的MDT-28蛋白和哺乳动物非脂肪细胞中的Perilipin-2蛋白,功能蛋白为ATGL。载脂蛋白具体为来自于人的载脂蛋白A1(apolipoprotein A-I, Apo A-I)。

[0181] 一、蛋白的表达和纯化

[0182] 人工合成序列表中序列1所示的DNA分子(即MLDS基因),序列1所示的DNA分子编码序列2所示的蛋白质(即MLDS蛋白)。

[0183] 人工合成序列表中序列3所示的DNA分子(即MDT-28基因),序列3所示的DNA分子编码序列4所示的蛋白质(即MDT-28蛋白)。

[0184] 人工合成序列表中序列5所示的DNA分子(即Perilipin-2基因),序列5所示的DNA分子编码序列6所示的蛋白质(即Perilipin-2蛋白)。

[0185] 人工合成序列表中序列7所示的DNA分子(即ATGL基因),序列7所示的DNA分子编码序列8所示的蛋白质(即ATGL)。

[0186] 人工合成序列表中序列9所示的DNA分子(即MLDS-GFP融合基因),序列9所示的DNA分子编码序列10所示的蛋白质(即MLDS-GFP融合蛋白)。

[0187] 人工合成序列表中序列11所示的DNA分子(即MDT-28-GFP融合基因),序列11所示的DNA分子编码序列12所示的蛋白质(即MDT-28-GFP融合蛋白)。

[0188] 人工合成序列表中序列13所示的DNA分子(即Perilipin-2-GFP融合基因),序列13

所示的DNA分子编码序列14所示的蛋白质(即Perilipin-2-GFP融合蛋白)。

[0189] 牛血清白蛋白购自Sigma公司,产品目录号为A4612。

[0190] 1、SMT3-Perilipin-2蛋白的表达与纯化

[0191] (1)用序列表中序列5所示的DNA分子替换载体pET28a-SMT3的限制性内切酶EcoRI和XhoI识别序列间的片段(载体pET28a-SMT3被限制性核酸内切酶EcoRI和XhoI切成一个大片段和一个小片段,将大片段与序列5中所示的DNA分子连接),得到重组质粒。该重组质粒可表达N-末端融合有6×His标签和SMT3结构域的可溶性蛋白。

[0192] (2)将步骤(1)构建的重组质粒导入大肠杆菌BL21(DE3),得到含有重组质粒的重组大肠杆菌。

[0193] (3)将步骤(2)获得的重组大肠杆菌接种于2×YT培养基(将16g蛋白胨、10g酵母提取物和4g氯化钠溶解于1000mL蒸馏水),37℃培养,当重组大肠杆菌的培养菌液的OD₆₀₀达到0.6(将该培养菌液命名为诱导前菌液),加入异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG),使IPTG在体系中浓度为0.4mM,16℃诱导24h(IPTG诱导后的培养菌液命名为诱导后菌液)。

[0194] 分别收集(4000rpm、离心20min)诱导前菌液或诱导后菌液的菌体,重悬于缓冲液T中,然后用高压细胞破碎仪(型号为JNBIO JN-3000PLUS)裂解,得到全细胞裂解液。将全细胞裂解液进行SDS-PAGE,然后通过银染和Western印迹法进行分析。结果表明(图5中A,其中a为银染分析结果,b为Western印迹法分析结果,箭头指向SMT3-Perilipin-2蛋白对应的条带),诱导后菌液中SMT3-Perilipin-2蛋白大量表达。

[0195] (4)取步骤(3)的诱导后菌液的菌体的全细胞裂解液,30000g离心50min,得到的上清和沉淀,将上清上样至镍离子金属亲和层析柱(填料为螯合有镍离子的Chelating Sepharose Fast Flow,柱体购自Thermo,产品目录号为29924,柱体积4mL,内径1.2cm),然后先用含20mM咪唑的缓冲液T洗脱12个柱体积以去除非目的蛋白一次,再用含500mM咪唑的缓冲液T洗脱3个柱体积以收集目的蛋白(过柱后全部缓冲液T均含目的蛋白)两次,然后用离心超滤管(Amicon公司产品)进行缓冲液交换去除咪唑,通过尺寸排阻色谱法(Size Exclusive Chromatography,SEC)再次纯化(HiLoad 16/600 Superdex 200柱,GE公司产品),洗脱流速为0.8mL/min,根据其保留体积分别收集四个组分,分别命名为组分1(保留体积为45mL-57mL)、组分2(保留体积为57mL-67mL)、组分3(保留体积为67mL-79mL)和组分4(保留体积为79mL-94mL)。

[0196] 将镍离子金属亲和层析柱纯化的各组分的进行SDS-PAGE,然后用胶体蓝染色,结果见图5中B(泳道依次为全细胞裂解液、上清、沉淀、流穿、咪唑洗脱液-1(20mM咪唑洗脱液)、咪唑洗脱液-2(500mM咪唑洗脱液第一部分)、咪唑洗脱液-3(500mM咪唑洗脱液第二部分)。尺寸排阻色谱法分子筛纯化结果见图5中C(峰1为组分1,峰2为组分2,峰3为组分3,峰4为组分4)。对全部500mM咪唑二次洗脱液(即咪唑洗脱液-2合并咪唑洗脱液-3)(图5中D的左图)和尺寸排阻色谱法纯化得到的四个组分(组分1、组分2、组分3和组分4)(图5中D的右图)进行SDS-PAGE和胶体蓝染色,结果表明,组分1包含了纯化后的SMT3-Perilipin-2蛋白。

[0197] 2、MLDS蛋白的表达与纯化

[0198] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列1所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pGEX-6p-1、限制性内切酶XhoI替换为BamHI,步骤1中(4)的镍离子金属亲和层析柱替换为GST亲和层析柱、咪唑替换为还原性谷

胱甘肽,其它步骤均不变,获得纯化MLDS蛋白。

[0199] 3、MDT-28蛋白的表达与纯化

[0200] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列3所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pGEX-6p-1、限制性内切酶EcoRI和XhoI替换为限制性内切酶BamHI和NotI,步骤1中(4)的镍离子金属亲和层析柱替换为GST亲和层析柱、咪唑替换为还原性谷胱甘肽,其它步骤均不变,获得纯化MDT-28蛋白。

[0201] 4、MLDS-GFP融合蛋白的表达与纯化

[0202] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列9所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pET28a,其它步骤均不变,获得纯化MLDS-GFP融合蛋白。

[0203] 5、MDT-28-GFP融合蛋白的表达与纯化

[0204] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列11所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pET28a、限制性内切酶EcoRI替换为限制性内切酶BamHI,其它步骤均不变,获得纯化MDT-28-GFP融合蛋白。

[0205] 6、Perilipin-2-GFP融合蛋白的表达与纯化

[0206] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列13所示的DNA分子、载体pET28a-SMT3替换为载体pET28a,其它步骤均不变,获得纯化Perilipin-2-GFP融合蛋白。

[0207] 7、SMT3-ATGL蛋白的表达与纯化

[0208] 按照上述方法,将步骤1中(1)的序列表中序列5所示的DNA分子替换为序列表中序列7所示的DNA分子,步骤1中(2)的大肠杆菌BL21(DE3)替换为大肠杆菌Rosetta,其它步骤均不变,获得纯化SMT3-ATGL蛋白。

[0209] 8、Apo A-I的表达与纯化

[0210] 参考文献Peitsch,M.C.et al.A purification method for apolipoprotein A-I and A-II.Anal Biochem 178,301-305(1989).中记载的方法,获得纯化Apo A-I。

[0211] 二、脂肪体对固有蛋白和/或功能蛋白和/或载脂蛋白的招募

[0212] 1、固有蛋白的招募与分布

[0213] (1)Perilipin-2蛋白的招募

[0214] a1、5 μ g SMT3-Perilipin-2蛋白、25ng Ulp1和实施例1制备的50 μ l脂肪体a混合,得到100 μ l的混合体系。

[0215] a2、完成步骤a1后,室温下(实际操作中在冰上也可)孵育1h,得到混合体系。

[0216] a3、完成步骤a2后,取混合体系,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层(上层为脂肪体),抽去下层溶液,保留上层。

[0217] a4、取完成步骤a3的上层,重悬于100 μ l缓冲液B中,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层(上层为脂肪体),抽去下层溶液,保留上层。

[0218] a5、取完成步骤a4的上层,重悬于100 μ l缓冲液B中,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层,抽去下层溶液,保留上层(即脂肪体)。

[0219] 将5 μ g SMT3-Perilipin-2蛋白、步骤a5得到脂肪体和步骤a3抽去的下层溶液均进行SDS-PAGE后银染检测。

[0220] 结果见图6中的泳道7、8和9(泳道7为总蛋白(SMT3-Perilipin-2蛋白),泳道8为脂质体募集蛋白(步骤a5得到脂肪体),泳道9为溶液蛋白(步骤a3抽去的下层溶液))。结果表明,Perilipin-2蛋白有约50%被招募到脂肪体a上。将招募有Perilipin-2蛋白的脂肪体命名为人工脂滴Perilipin-2。

[0221] 蛋白饱和度测定:将SMT3-Perilipin-2蛋白、25ng Ulp1和实施例1中制备的30 μ l脂肪体a混合,得到50 μ l的混合体系,混合体系中SMT3-Perilipin-2蛋白的浓度为0.015 μ g/ μ l、0.030 μ g/ μ l、0.056 μ g/ μ l、0.080 μ g/ μ l、0.101 μ g/ μ l、0.137 μ g/ μ l、0.166 μ g/ μ l或0.191 μ g/ μ l。然后按照上述步骤a2至a5,获得人工脂滴,进行SDS-PAGE,然后用胶体蓝染色,或以Perilipin-2抗体为一抗进行Western blot检测。结果见图7中C(其中a为胶体蓝染色结果,b为Western blot检测结果)。结果表明,Perilipin-2蛋白在脂肪体上的募集是可以饱和的。

[0222] (2)MLDS蛋白的招募

[0223] b1、5 μ g MLDS蛋白和实施例1制备的50 μ l脂肪体a混合,得到100 μ l的混合体系。

[0224] b2、完成步骤b1后,室温下(实际操作中在冰上也可)孵育1h,得到混合体系。

[0225] b3、完成步骤b2后,取混合体系,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层(上层为脂肪体),抽去下层溶液,保留上层。

[0226] b4、取完成步骤b3的上层,重悬于100 μ l缓冲液B中,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层(上层为脂肪体),抽去下层溶液,保留上层。

[0227] b5、取完成步骤b4的上层,重悬于100 μ l缓冲液B中,20000g、离心5min,液相体系呈现两层分层,抽去下层溶液,保留上层(即脂肪体)。

[0228] 将5 μ g MLDS蛋白、步骤b5得到脂肪体和步骤b3抽去的下层溶液均进行SDS-PAGE后银染检测。

[0229] 结果见图6中的泳道1、2和3(泳道1为总蛋白(MLDS蛋白),泳道2为脂质体募集蛋白(步骤b5得到脂肪体),泳道3为溶液蛋白(步骤b3抽去的下层溶液))。结果表明,MLDS蛋白有约80%被招募到脂肪体a上。将招募有MLDS蛋白的脂肪体命名为人工脂滴MLDS。

[0230] (3)MDT-28蛋白的招募

[0231] 将步骤(2)中的MLDS蛋白替换为MDT-28蛋白,其他步骤均不变。结果见图6中的泳道4、5和6(泳道4为总蛋白(MDT-28蛋白),泳道5为脂质体募集蛋白,泳道6为溶液蛋白)。结果表明,MDT-28蛋白有约90%被招募到脂肪体a上。将招募有MDT-28蛋白的脂肪体命名为人工脂滴MDT-28。

[0232] (4)牛血清白蛋白的招募

[0233] 将步骤(2)中的MLDS蛋白替换为牛血清白蛋白,其他步骤均不变。结果见图6中的泳道11、12和13(泳道11为总蛋白(牛血清白蛋白),泳道12为脂质体募集蛋白,泳道13为溶液蛋白)。结果表明,牛血清白蛋白没有被招募到脂肪体a上。

[0234] 将招募有蛋白质的脂肪体命名为人工脂滴。

[0235] (5)固有蛋白在人工脂滴上的分布

[0236] 将步骤1中(1)5 μ g SMT3-Perilipin-2蛋白替换为10 μ g纯化Perilipin-2-GFP融合蛋白,其他步骤均不变,获得人工脂滴Perilipin-2-GFP。

[0237] 将步骤1中(2)5 μ g MLDS蛋白替换为10 μ g纯化MLDS-GFP融合蛋白,获得人工脂滴

MLDS-GFP。

[0238] 将步骤1中(3)5 μ g MDT-28蛋白替换为10 μ g MDT-28-GFP融合蛋白,获得人工脂滴MDT-28-GFP。

[0239] 然后用共聚焦显微镜对人工脂滴进行观察。结果表明(图7中B和图8),人工脂滴上的荧光蛋白质呈环形结构,Perilipin-2-GFP融合蛋白、MLDS-GFP融合蛋白和MDT-28-GFP融合蛋白均匀分布在人工脂滴的表面上,偶尔可观察到大的荧光蛋白的聚集体,未检测到游离的GFP;使用OMX DeltaVision(SIM)超分辨率显微镜观察人工脂滴,人工脂滴上的蛋白仍然呈现均匀分布的状态。

[0240] 2、功能蛋白ATGL的招募

[0241] 将步骤1中(1)SMT3-Perilipin-2蛋白替换为SMT3-ATGL蛋白,50 μ l脂肪体a替换为30 μ l脂肪体a,其他步骤均不变,获得招募有ATGL的脂肪体。

[0242] 结果见图9(左图为常温孵育的实验结果,右图为4 $^{\circ}$ C孵育的实验结果,其中泳道1和5为Marker,泳道2和6为总蛋白(SMT3-ATGL蛋白),泳道3和7为脂质体募集蛋白,泳道4和8为溶液蛋白)。结果表明,ATGL有约1/3被招募到脂肪体a上。将招募有ATGL的脂肪体命名为人工脂滴ATGL。

[0243] 蛋白饱和度测定:将SMT3-ATGL蛋白和实施例1中制备的50 μ l脂肪体a混合,得到100 μ l的混合体系,混合体系中SMT3-ATGL蛋白的浓度为0.091 μ g/ μ l,0.132 μ g/ μ l,0.171 μ g/ μ l,0.209 μ g/ μ l,0.244 μ g/ μ l,0.278 μ g/ μ l或0.310 μ g/ μ l。然后按照步骤1中的a2至a5,获得人工脂滴,进行SDS-PAGE,然后银染,或以ATGL抗体(Cell Signaling Technology公司,产品目录号为2138)为一抗进行Western blot检测。结果见图10中A(其中a为银染结果,b为Western blot检测结果)。结果表明,当ATGL在反应体系中的浓度为0.209 μ g/ μ l时,脂肪体a对ATGL的招募达到了饱和。

[0244] 3、载脂蛋白的招募

[0245] 将步骤1中(2)5 μ g MLDS蛋白替换为9 μ g Apo A-I,其他步骤均不变,获得招募有Apo A-I的脂肪体。结果见图10中B(泳道1为脂质体募集蛋白,泳道2为溶液蛋白,泳道3为总蛋白(Apo A-I))。结果表明,Apo A-I有约50%被招募到脂肪体a上。将招募有Apo A-I的脂肪体命名为人工脂蛋白Apo A-I。

[0246] 制备脂肪体a',方法基本同实施例1的步骤一,差别仅在于用商购的甘油三油酸酯代替实施例1中的甘油三脂,在步骤(5)中得到脂肪体a'。将脂肪体a'进行实施例2的各项试验,其结果与脂肪体a基本一致,均无显著差异。

[0247] 商购的甘油三油酸酯为甘油三油酸酯(triolein,T0),购自Sigma公司,产品目录号为92860。

<110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 一种脂肪体的制备方法及其应用
 <160> 14
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 831
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 1

atgactgacc	agaagacat	cgacagcgtc	aagacctcgc	tgtaecgaggc	cgtaggegcc	60
ggagacgtcg	tegtgcaggc	cgtagcgcac	gtcgtcgcgc	aggccgcctc	gcgcgcccag	120
tcaccaccagg	gtgacgtcga	agagcgtgctc	ggcggcgcca	aggagcgcctc	cgccggactc	180
caggaagagg	tcaccgaggg	tgtagagaac	cttcgcgacc	gcctcgcctc	actgcccgtc	240
gagctgcccg	aggagcttgc	cgagctgcgt	gagaagtcca	ccgcccgcga	gctgcgcgaag	300
ggtgcccagg	cctacctgaa	ggtagcctcc	gacctgtaca	cgtagcctgc	cgagcgcggc	360
gaggacaccg	tcagcgcctc	ccgcaagcag	ccggtcgtcg	aggagggcat	cgcccgcgcc	420
gagaccgcct	tcggtgacgc	cgtagcgtcg	accgaggaag	ctctcggcac	cggtgcaagc	480
cagacgcgcg	ccgtagcgcga	gcagcgcgca	aagctcgcgg	gcgccccttc	gggtgcgcatc	540
tcgacaccg	ccgagggact	cgccgagccc	atcgcgcgac	ccgcccgcga	ggctgcctcg	600
aaggtctctc	acctgggcca	ccagcgcgag	gaagcgtcga	aggacgcctc	cgatcgcgtc	660
accgccaccg	cgcccgcagc	ccagcctcgc	gcgacaagg	ctccccggc	caagcagccc	720
gctcccgcga	agaaggctgc	tcgcccgaag	gctcgggcaa	ccccggcccc	ggcccgcggc	780
agaagggccg	ccgctcgcgc	caagaagcct	gctcgggcca	agaaggcttg	a	831

[0001]

<210> 2
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 2

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

145 150 155 160
 Gln Thr Arg Ala Val Gly Glu Gln Ala Ala Lys Leu Ala Gly Arg Ala
 165 170 175
 Ser Gly Arg Ile Ser Asp Thr Ala Glu Gly Leu Gly Glu Ala Ile Ala
 180 185 190
 Asp Ala Gly Asp Glu Ala Ala Leu Lys Val Leu Asp Leu Gly Asp Gln
 195 200 205
 Ala Glu Glu Ala Ser Lys Asp Ala Ala Asp Arg Val Thr Ala Thr Ala
 210 215 220
 Ala Asp Val Gln Ala Arg Ala Asp Lys Ala Ala Pro Ala Lys His Ala
 225 230 235 240
 Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro Ala Lys Ala Ala Ala Thr Pro Ala
 245 250 255
 Pro Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Ala Pro Ala Lys Lys Ala Ala Pro
 260 265 270
 Ala Lys Lys Ala
 275

<210> 3
 <211> 1257
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 3

[0002] atgactgacg tegagcagcc agtatcagtt gaggatcaac aageccaage ccaaagetac 60
 tacgatcaag tettaggaaa tgcttaecgta caaacggcaa tcaatgcata cacaaagaet 120
 aaagagttcc atceacttct taactccaca ttgaattcag ccgaagaaaa ggtttccact 180
 gtcggaaatt atgcegctca aaaagcctat gacggataca attcgtacta cgттаagcca 240
 aagaacaccg cttatgaagc agtctcttat ggaaccgaga gggccaaaac agctgттgag 300
 agcggaaaagc aagctgctat cgttggtggt acattcggaa ttggagctgc cgtctgттtg 360
 acccaattct cacttgccctt gagtgctgga ggtgcccgcc tggtccttga gcaagtggac 420
 agtgctaaaa agttgggaag cagcgcgatt tctacgatca aagaagccga gcttgctgctc 480
 gaacacagaa tcttctcagc tcttcatcag gcccaacgaa tegccatggt tcttgтggag 540
 aaaatcacag aaaataactaa ttcaattgett gacattcttg acggageagt tcagaaagga 600
 ctcaatatcg aggtcccacc atctgtgaac ctcaaccatcg gacagecagт caaaaaatctg 660
 gcttcaactga tegtecaagg agtatctaac aagettttta aggcacatga tcatgттatc 720
 gatccaatca acgagagage cegтаattat cttgagcagc teagccaatc cttegtattg 780
 ctagacatcg tecgtgagaa gaaaacgtgg gтcatagaga agtcaaacga gctctccaca 840
 tetgtctttg atttcaagaa aacacttgag gaagaggcac aaaaatacaa agttgctcca 900
 gaagagatgt tgatgaaaca catteaatca acctccgagc aactctcaac acaacttcaa 960
 tcattgcgtg agaagggaca aaacgttttc ggtgatggaa cтаagattga ctccaccatt 1020
 gactacttgг agaacttgaa gaagaacttc acagatgctg aggatgттta caaagtccgc 1080
 gacgaggttc tgaacgaggg acгtcaacgg atcgcgcgagc ttтcaacctg gacgactagc 1140
 cттttgatta tetcgгccga atggcaattt gaacctgaag atctactaat cgaagagctc 1200
 tacttgatg cгccaccgcc agttcgсaca agaaacttgt ataggaatcg тгcctaa 1257

<210> 4
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>

	<400> 4															
	Met	Thr	Asp	Val	Glu	Gln	Pro	Val	Ser	Val	Glu	Asp	Gln	Gln	Ala	Gln
	1				5					10					15	
	Ala	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Val	Leu	Gly	Asn	Ala	Tyr	Val	Gln	Thr
			20						25					30		
	Ala	Ile	Asn	Ala	Tyr	Thr	Lys	Thr	Lys	Glu	Phe	His	Pro	Leu	Leu	Asn
			35					40					45			
	Ser	Thr	Leu	Asn	Ser	Ala	Glu	Glu	Lys	Val	Ser	Thr	Val	Gly	Asn	Tyr
		50					55					60				
	Ala	Ala	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Tyr	Val	Lys	Pro
	65					70					75				80	
	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Tyr	Gly	Thr	Glu	Arg	Ala	Lys
				85						90					95	
	Thr	Ala	Val	Glu	Ser	Gly	Lys	Gln	Ala	Ala	Ile	Val	Gly	Gly	Thr	Phe
				100					105					110		
	Gly	Ile	Gly	Ala	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser
			115					120					125			
	Ala	Gly	Gly	Ala	Ala	Leu	Val	Leu	Glu	Gln	Val	Asp	Ser	Ala	Lys	Lys
		130					135					140				
	Leu	Gly	Ser	Ser	Ala	Ile	Ser	Thr	Ile	Lys	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Val
	145					150					155					160
	Glu	His	Arg	Ile	Phe	Ser	Ala	Leu	His	Gln	Ala	Gln	Arg	Ile	Ala	Met
				165						170					175	
	Val	Pro	Val	Glu	Lys	Ile	Thr	Glu	Asn	Thr	Asn	Ser	Leu	Leu	Asp	Ile
				180					185					190		
	Leu	Asp	Gly	Ala	Val	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Ile	Glu	Val	Pro	Pro	Ser
[0003]			195					200					205			
	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gly	Gln	Arg	Val	Lys	Asn	Leu	Ala	Ser	Leu	Ile
		210					215					220				
	Val	Gln	Gly	Val	Ser	Asn	Lys	Leu	Phe	Lys	Ala	His	Asp	His	Val	Ile
	225					230					235				240	
	Asp	Pro	Ile	Asn	Glu	Arg	Ala	Arg	Asn	Tyr	Leu	Glu	Gln	Leu	Ser	Gln
				245						250					255	
	Ser	Phe	Val	Leu	Leu	Asp	Ile	Val	Arg	Glu	Lys	Lys	Thr	Trp	Val	Ile
			260						265					270		
	Glu	Lys	Ser	Asn	Glu	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	Phe	Asp	Phe	Lys	Lys	Thr
			275					280					285			
	Leu	Glu	Glu	Glu	Ala	Gln	Lys	Tyr	Lys	Val	Ala	Pro	Glu	Glu	Met	Leu
		290					295					300				
	Met	Lys	His	Ile	Gln	Ser	Thr	Ser	Glu	Gln	Leu	Ser	Thr	Gln	Leu	Gln
	305					310					315				320	
	Ser	Leu	Arg	Glu	Lys	Gly	Gln	Asn	Val	Phe	Gly	Asp	Gly	Thr	Lys	Ile
				325						330					335	
	Asp	Ser	Thr	Ile	Asp	Tyr	Leu	Glu	Asn	Leu	Lys	Lys	Asn	Phe	Thr	Asp
			340						345					350		
	Ala	Glu	Asp	Val	Tyr	Lys	Val	Arg	Asp	Glu	Val	Leu	Asn	Glu	Gly	Arg
			355					360					365			
	Gln	Arg	Ile	Ala	Glu	Leu	Ser	Thr	Trp	Thr	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Ile
			370					375					380			
	Ser	Ala	Glu	Trp	Gln	Phe	Glu	Pro	Glu	Asp	Leu	Leu	Ile	Glu	Glu	Leu
	385					390					395					400
	Tyr	Phe	Asp	Ala	Pro	Pro	Pro	Val	Arg	Thr	Arg	Asn	Leu	Tyr	Arg	Asn
				405						410					415	

Arg Ala

<210> 5
 <211> 1314
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 5

atggeatceg	ttgcagttga	tcacaaaccg	agtgtggtga	ctcgggtggt	caacctgccc	60
ttggtgagct	ccacgtatga	cctcatgtcc	tcagcctatc	tcagtacaaa	ggaccagtat	120
cctacctga	agtctgtgtg	tgagatggca	gagaacggtg	tgaagaccat	cacctccgtg	180
gccatgacca	gtgetctgcc	catcatccag	aagetagage	cgcaaatgtc	agttgccaat	240
acctatgcct	gtaaggggct	agacaggatt	gaggagagac	tgcctattct	gaatcagcca	300
tcaactcaga	ttgttgccaa	tgccaaaggc	getgtgactg	gggcaaaaga	tgetgtgacg	360
actactgtga	ctggggccaa	ggattctgtg	gccagcacga	tcacaggggt	gatggacaag	420
accaaagggg	cagtgactgg	cagtgtggag	aagaaccaagt	ctgtggtcag	tggcagcatt	480
aacacagtct	tggggagtgc	gatgatgcag	ctcgtgagca	gtggcgtaga	aaatgcactc	540
accaaaatcag	agctgttggt	agaacagtae	ctccctctca	ctgaggaaga	actagaaaaa	600
gaagcaaaaa	aagttgaagg	atttgatctg	gttcagaagc	caagttatta	tgtagactg	660
ggatecctgt	ctaccaagct	tcactecctg	gcctaccagc	aggetctcag	cagggttaaa	720
gaagetaagc	aaaaaagcca	acagaccatt	tctcagetcc	atttactgt	tcacctgatt	780
gaatttgcca	ggaagaatgt	gtatagtgcc	aatcagaaaa	ttcaggatgc	tcaggataag	840
ctctacctct	catgggtaga	gtggaaaagg	agcattggat	atgatgatac	tgatgagtec	900
cactgtgctg	agcacattga	gtcacgtact	cttgcaattg	cccgaacct	gactcagcag	960
ctccagacca	cgtgccacac	cctctgtctc	aacatccaag	gtgtaccaca	gaacatecaa	1020
[0004] gateaageca	agcacatggg	ggtgatggca	ggcgacatct	actcagttgt	ccgcaatget	1080
gectccttta	aagaagtgtc	tgacagcctc	ctcaettcta	gcaaggggca	gctgcagaaa	1140
atgaaggaat	ctttgatgta	egtgatggat	tatcttggtta	acaacagccc	cctcaactgg	1200
ctggtaggtc	ccttttatec	tcagetgact	gagtctcaga	atgetcagga	ccaaggtgca	1260
gagatggaca	agagcagcca	ggagaccag	cgatctgagc	ataaaactca	ttaa	1314

<210> 6
 <211> 437
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 6

Met	Ala	Ser	Val	Ala	Val	Asp	Pro	Gln	Pro	Ser	Val	Val	Thr	Arg	Val
1				5				10						15	
Val	Asn	Leu	Pro	Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Tyr	Asp	Leu	Met	Ser	Ser	Ala
		20						25						30	
Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	Asp	Gln	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Lys	Ser	Val	Cys	Glu
		35				40							45		
Met	Ala	Glu	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Ile	Thr	Ser	Val	Ala	Met	Thr	Ser
		50				55						60			
Ala	Leu	Pro	Ile	Ile	Gln	Lys	Leu	Glu	Pro	Gln	Ile	Ala	Val	Ala	Asn
65					70					75					80
Thr	Tyr	Ala	Cys	Lys	Gly	Leu	Asp	Arg	Ile	Glu	Glu	Arg	Leu	Pro	Ile
				85					90					95	
Leu	Asn	Gln	Pro	Ser	Thr	Gln	Ile	Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Gly	Ala	Val
			100						105					110	

Thr	Gly	Ala	Lys	Asp	Ala	Val	Thr	Thr	Thr	Val	Thr	Gly	Ala	Lys	Asp	
		115					120					125				
Ser	Val	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Gly	Val	Met	Asp	Lys	Thr	Lys	Gly	Ala	
	130				135						140					
Val	Thr	Gly	Ser	Val	Glu	Lys	Thr	Lys	Ser	Val	Val	Ser	Gly	Ser	Ile	
	145				150					155					160	
Asn	Thr	Val	Leu	Gly	Ser	Arg	Met	Met	Gln	Leu	Val	Ser	Ser	Gly	Val	
			165						170						175	
Glu	Asn	Ala	Leu	Thr	Lys	Ser	Glu	Leu	Leu	Val	Glu	Gln	Tyr	Leu	Pro	
			180						185					190		
Leu	Thr	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Ala	Lys	Lys	Val	Glu	Gly	Phe	
			195					200					205			
Asp	Leu	Val	Gln	Lys	Pro	Ser	Tyr	Tyr	Val	Arg	Leu	Gly	Ser	Leu	Ser	
	210					215						220				
Thr	Lys	Leu	His	Ser	Arg	Ala	Tyr	Gln	Gln	Ala	Leu	Ser	Arg	Val	Lys	
	225				230						235				240	
Glu	Ala	Lys	Gln	Lys	Ser	Gln	Gln	Thr	Ile	Ser	Gln	Leu	His	Ser	Thr	
					245				250						255	
Val	His	Leu	Ile	Glu	Phe	Ala	Arg	Lys	Asn	Val	Tyr	Ser	Ala	Asn	Gln	
			260					265						270		
Lys	Ile	Gln	Asp	Ala	Gln	Asp	Lys	Leu	Tyr	Leu	Ser	Trp	Val	Glu	Trp	
		275						280					285			
Lys	Arg	Ser	Ile	Gly	Tyr	Asp	Asp	Thr	Asp	Glu	Ser	His	Cys	Ala	Glu	
	290					295						300				
His	Ile	Glu	Ser	Arg	Thr	Leu	Ala	Ile	Ala	Arg	Asn	Leu	Thr	Gln	Gln	
	305					310					315				320	
[0005]	Leu	Gln	Thr	Thr	Cys	His	Thr	Leu	Leu	Ser	Asn	Ile	Gln	Gly	Val	Pro
					325						330				335	
Gln	Asn	Ile	Gln	Asp	Gln	Ala	Lys	His	Met	Gly	Val	Met	Ala	Gly	Asp	
			340						345					350		
Ile	Tyr	Ser	Val	Phe	Arg	Asn	Ala	Ala	Ser	Phe	Lys	Glu	Val	Ser	Asp	
			355					360					365			
Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Gln	Leu	Gln	Lys	Met	Lys	Glu	Ser	
	370						375					380				
Leu	Asp	Asp	Val	Met	Asp	Tyr	Leu	Val	Asn	Asn	Thr	Pro	Leu	Asn	Trp	
	385					390					395				400	
Leu	Val	Gly	Pro	Phe	Tyr	Pro	Gln	Leu	Thr	Glu	Ser	Gln	Asn	Ala	Gln	
					405					410					415	
Asp	Gln	Gly	Ala	Glu	Met	Asp	Lys	Ser	Ser	Gln	Glu	Thr	Gln	Arg	Ser	
			420						425						430	
Glu	His	Lys	Thr	His												
			435													

<210> 7

<211> 1515

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 7

atgtttcccc	gcgagaagac	gtggaacatc	tcgttcgcgg	getgcggctt	cctcggcgtc		60
tactacgtcg	gcgtagcctc	ctgcctccgc	gagcaecgc	ccttctgggt	ggccaacgcc		120
acgeacatct	acggcgctct	ggcggggcgc	ctcaeggcca	cggectgggt	caccggggtc		180

tgccctgggtg	aggctggtgc	caagttcatt	gaggtatcta	aagaggcccg	gaagcggttc	240
ctgggceccc	tcacccctc	ctcaacctg	gtaaagatca	tccgcagitt	ctgctgaag	300
gtcctgectg	ctgatagcca	tgagcatgcc	agtgggegcc	tgggcatctc	ctgaceccg	360
gtgteagacg	gegagaatgt	cattatatec	cacttcaact	ccaaggacga	getcatecag	420
gccaatgtct	gcagcggttt	catececggtg	tactgtgggc	tcateccctc	ctccctecag	480
gggggtgcgct	acgtggatgg	tggeatttca	gacaacctgc	cactctatga	gcttaagaac	540
accatcacag	tgtecccctt	ctcgggcgag	agtgacatct	gtccgcagga	cagctccacc	600
aacatccaog	agctgcegggt	caccaacace	agcatecagt	tcaacctgcg	caacctctac	660
cgctctcca	aggcectctt	cccgcggag	cccctggtgc	tgcgagagat	gtgcaagcag	720
ggataccggg	atggcctgcg	ctttctgcag	cggaacggcc	tctgaaccg	gcccaccccc	780
ttgetggcgt	tgeccccgc	cgccccca	ggcccagagg	acaaggacca	ggcagtgagg	840
agcgeccaag	eggaggatta	ctcgeagctg	cccggagaag	atcacatcct	ggagcacctg	900
cccgeccggc	tcaatgagge	cctgctggag	gcctgcgtgg	agcccacgga	cctgctgacc	960
accctctcca	acatgctgcc	tgtgctctg	gccacggcca	tgatggtgcc	ctacacgctg	1020
ccgetggaga	gegctctgtc	cttcaccate	cgcttgctgg	agtggctgcc	cgacgttccc	1080
gaggacatcc	ggtggatgaa	ggagcagacg	ggcagcatct	gccagtacct	ggtgatgcgc	1140
gccaagagga	agctgggcag	gcacctgccc	tccaggctgc	cgagcaggt	ggagctgcgc	1200
cgctccagt	cgtgcgcgtc	cgtgcgcgtg	tctgcgcgcg	cctacagaga	ggcactgccc	1260
ggctggatgc	gcaacaacct	ctcgtggggg	gacgcgctgg	ccaagtggga	ggagtgcacg	1320
cgccagctgc	tgeteggcct	cttetgcacc	aacgtggcct	tcccgeccga	agctctgcgc	1380
atgcgcgca	ccgcgcgacc	ggctcccgc	cccgcggacc	cagcatcccc	gcagcaccag	1440
ctggccgggc	ctgecccctt	getgagcacc	cctgctcccg	aggcccggcc	cgtgatcggg	1500
gcctggggc	tgtga					1515

<210> 8

<211> 504

[0006] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 8

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

Glu Leu Lys Asn Thr Ile Thr Val Ser Pro Phe Ser Gly Glu Ser Asp
 180 185 190
 Ile Cys Pro Gln Asp Ser Ser Thr Asn Ile His Glu Leu Arg Val Thr
 195 200 205
 Asn Thr Ser Ile Gln Phe Asn Leu Arg Asn Leu Tyr Arg Leu Ser Lys
 210 215 220
 Ala Leu Phe Pro Pro Glu Pro Leu Val Leu Arg Glu Met Cys Lys Gln
 225 230 235 240
 Gly Tyr Arg Asp Gly Leu Arg Phe Leu Gln Arg Asn Gly Leu Leu Asn
 245 250 255
 Arg Pro Asn Pro Leu Leu Ala Leu Pro Pro Ala Arg Pro His Gly Pro
 260 265 270
 Glu Asp Lys Asp Gln Ala Val Glu Ser Ala Gln Ala Glu Asp Tyr Ser
 275 280 285
 Gln Leu Pro Gly Glu Asp His Ile Leu Glu His Leu Pro Ala Arg Leu
 290 295 300
 Asn Glu Ala Leu Leu Glu Ala Cys Val Glu Pro Thr Asp Leu Leu Thr
 305 310 315 320
 Thr Leu Ser Asn Met Leu Pro Val Arg Leu Ala Thr Ala Met Met Val
 325 330 335
 Pro Tyr Thr Leu Pro Leu Glu Ser Ala Leu Ser Phe Thr Ile Arg Leu
 340 345 350
 Leu Glu Trp Leu Pro Asp Val Pro Glu Asp Ile Arg Trp Met Lys Glu
 355 360 365
 Gln Thr Gly Ser Ile Cys Gln Tyr Leu Val Met Arg Ala Lys Arg Lys
 370 375 380
 [0007] Leu Gly Arg His Leu Pro Ser Arg Leu Pro Glu Gln Val Glu Leu Arg
 385 390 395 400
 Arg Val Gln Ser Leu Pro Ser Val Pro Leu Ser Cys Ala Ala Tyr Arg
 405 410 415
 Glu Ala Leu Pro Gly Trp Met Arg Asn Asn Leu Ser Leu Gly Asp Ala
 420 425 430
 Leu Ala Lys Trp Glu Glu Cys Gln Arg Gln Leu Leu Leu Gly Leu Phe
 435 440 445
 Cys Thr Asn Val Ala Phe Pro Pro Glu Ala Leu Arg Met Arg Ala Pro
 450 455 460
 Ala Asp Pro Ala Pro Ala Pro Ala Asp Pro Ala Ser Pro Gln His Gln
 465 470 475 480
 Leu Ala Gly Pro Ala Pro Leu Leu Ser Thr Pro Ala Pro Glu Ala Arg
 485 490 495
 Pro Val Ile Gly Ala Leu Gly Leu
 500

<210> 9

<211> 1563

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400>9

atgactgacc agaagaccat cgacagcgtc aagacctcgc tgtaecgggc cgtaggcgcc 60
 ggagaactcg tcgtgcagge cgtgcegae gtegtcgccc aggtccgctc gcgcgccgag 120
 tccaccagg gtgaactega agagcgtgtc ggcggcgcca aggagcgc at cgccggactc 180

caggaagagg	tcaccgaggg	tgtcgagaac	cttcgcgacc	gcctcgccgg	actgcccgtcc	240
gagctgcccg	aggagcttgc	cgagctgegt	gagaagtcca	ccgccgaega	gctgcgcaag	300
gttgccgagg	cctacctgaa	ggtcgectcc	gacctgtaca	cgtcgctcgc	cgagegceggc	360
gaggacaccg	tegagcgcat	ccgcaagcag	ccggtcgtcg	aggagggcat	cggcccgccc	420
gagaccgect	tcggtgacgc	cgtegagctg	accgaggaag	ctctcggcac	cgttgcaacgc	480
cagacgcgcg	ccgtcggcga	gcaggccgca	aagctcgggg	gcccgccttc	gggtcgcattc	540
tcgacaccg	ccgagggact	cgccgagccc	atcgccgacg	ccggcgacga	ggctgccectg	600
aagttctcg	acctggggca	ccaggccgag	gaagcgtcga	aggacgtcgc	cgatcgcgctc	660
accgccaccg	cgcccgacgt	ccaggtctgc	gccgacaagg	ctgccccgge	caagcaegcc	720
gctcccgcga	agaaggtctg	tcggccaag	gctgcccga	ccccggccc	ggccccggccc	780
aagaagggcg	ccgctccggc	caagaaggct	gctccggcca	agaaggctaa	gcttgccggcc	840
gcaatggtga	gcaagggcga	ggagctgttc	accgggggtg	tgccatcct	ggtcgagctg	900
gaeggcgacg	taaaccggcca	caagttcagc	gtgtccggcg	agggcgaggg	cgatgccacc	960
taeggcaagc	tgacctgaa	gttcattctg	accaccggca	agctgcccct	gcccctgccc	1020
acctctgtga	ccacctgac	ctaccggctg	cagtgettca	gccctaccc	cgaccacatg	1080
aagcagcagc	actttctcaa	gtccgccatg	cccgaaggct	acgtccagga	gcgcaccatc	1140
ttctcaagg	acgacggcaa	ctacaagacc	cgcccgagg	tgaagtcca	ggcgacacc	1200
ctggtgaacc	gcctcgagct	gaaggcctc	gacttcaagg	aggaccgcaa	catcctgggg	1260
cacaagctgg	agtacaacta	caacagccac	aacgtctata	tcattggcca	caagcagaag	1320
aaccgcatca	aggtgaactt	caagatccc	cacaacatcg	aggaccggcag	cgatgcagctc	1380
gcccaccact	accagcagaa	cacccccatc	ggcgaccggc	ccgtgctgct	gcccgcacaac	1440
cactacctga	gcaccagtc	cgccctgagc	aaagacccca	acgagaagcg	cgatcacatg	1500
gtctgctg	agttcgtgac	cgcccgccgg	atactctc	gcattggacga	gctgtacaag	1560
taa						1563

- <210> 10
- [0008] <211> 520
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>
- <400> 10

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

				165					170					175		
	Ser	Gly	Arg	Ile	Ser	Asp	Thr	Ala	Glu	Gly	Leu	Gly	Glu	Ala	Ile	Ala
				180					185					190		
	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	Val	Leu	Asp	Leu	Gly	Asp	Gln
			195					200					205			
	Ala	Glu	Glu	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Ala	Asp	Arg	Val	Thr	Ala	Thr	Ala
		210					215					220				
	Ala	Asp	Val	Gln	Ala	Arg	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Pro	Ala	Lys	His	Ala
	225					230						235				240
	Ala	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Pro	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Thr	Pro	Ala
				245							250					255
	Pro	Ala	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Lys	Lys	Ala	Ala	Pro
				260							265					270
	Ala	Lys	Lys	Ala	Lys	Leu	Ala	Ala	Ala	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu
			275						280					285		
	Leu	Phe	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val
			290				295						300			
	Asn	Gly	His	Lys	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr
	305					310						315				320
	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro
				325						330						335
	Val	Pro	Trp	Pro	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys
				340						345					350	
	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser
			355					360					365			
[0009]	Ala	Met	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp
			370					375					380			
	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr
	385					390						395				400
	Leu	Val	Asn	Arg	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly
				405							410					415
	Asn	Ile	Leu	Gly	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val
				420						425					430	
	Tyr	Ile	Met	Ala	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys
			435						440						445	
	Ile	Arg	His	Asn	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr
			450				455						460			
	Gln	Gln	Asn	Thr	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn
	465						470					475				480
	His	Tyr	Leu	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys
				485								490				495
	Arg	Asp	His	Met	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr
				500								505				510
	Leu	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys								
			515					520								
	<210>	11														
	<211>	1980														
	<212>	DNA														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>															
	<400>	11														

atgactgacg	tegagcagcc	agtatcagtt	gaggatcaac	aagcccaage	ccaaagctac	60
tacgatcaag	tcttaggaaa	tgcttacgta	caaacggcaa	tcaatgcata	cacaaagact	120
aaagagttcc	atccacttct	taactecaca	ttgaattcag	ccgaagaaaa	ggtttccact	180
gtcggaaatt	atgeggetca	aaaagectat	gacggataca	attcgtacta	cgttaageca	240
aagaacaccg	cttatgaage	agtctcttat	ggaaccgaga	gggccaaaae	agctgttgag	300
ageggaaaagc	aagctgctat	cgttggtggt	acattcggaa	ttggagctgc	cgctgttttg	360
acccaattct	cacttgcctt	gagtgtcggg	ggtgccgccc	tggtccttga	gcaagtggac	420
agtgtcaaaa	agttgggaag	cagcgcgatt	tctacgatca	aagaagccga	gcttgcctgc	480
gaacacagaa	tcttctcage	tcttcacag	gcccacgaa	tcgccatggt	tctgtggag	540
aaaatcacag	aaaataactaa	tteattgctt	gacattcttg	acggagcagt	tcagaaagga	600
ctcaatatcg	aggteccacc	atctgtgaac	ctcaccatcg	gacagcgagt	caaaaatctg	660
gcttcaactga	tcgtccaagg	agtatctaac	aaggccatcg	atcatgittat	cgatccaatc	720
aacgagagag	cccgttaatta	tcttgagcag	ctcagccaat	cttcctgatt	gctagacatc	780
gtccgtgaga	agaaaacgtg	ggtcatagag	aagtcaaacg	agctctccac	atctgtcttt	840
gatttcaaga	aaacacttga	ggaagaggca	caaaaataca	aagttgctcc	agaagagatg	900
ttgatgaaac	acattcaatc	aacctccgag	caactctcaa	cacaacttca	ateattgcgt	960
gagaagggac	aaaacgtttt	cggtgatgga	actaagattg	actccaccat	tgactacttg	1020
gagaacttga	agaagaactt	cacagatgct	gaggatgttt	acaaagtcg	cgacgaggtt	1080
ctgaacgagg	gacgtcaacg	gatcgcgag	ctttcaacct	ggacgactag	ctttttgatt	1140
atctcgcccg	aatggcaatt	tgaacctgaa	gatctactaa	tcgaagaget	ctacttcgat	1200
gcgccaccgc	cagttcgca	aagaaacttg	tataggaatc	gtgccaaget	tgccgcccga	1260
atggtgagca	agggcgagga	gctgttcacc	ggggtggtgc	ccatcctggt	cgagctggac	1320
ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gagaggcga	tgccacctac	1380
ggcaagctga	ceetgaagtt	catctgcacc	accgccaagc	tgcccgtgcc	ctggcccacc	1440
ctcgtgacca	cectgacct	cgccgtgcag	tcttccagcc	gtaccctcga	ccacatgaag	1500
cagcagcact	tcttcaagtc	cgccatgcc	gaaggetacg	tccaggagcg	caccatcttc	1560
[0010] ttcaaggacg	acggcaacta	caagaaccgc	gcccagggtga	agttcagggg	cgacaccttg	1620
gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcctcgac	ttcaaggagg	acggcaacat	ctgggggca	1680
aagctggagt	acaactacaa	cagccacaac	gtctatatca	tgcccgacaa	gcagaagaac	1740
ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatecgcacc	aacatcgagg	acggcagcgt	gcagctcgcc	1800
gaccactacc	agcagaacac	ccccatcgge	gacggccccg	tgtgtgtgcc	cgacaaccac	1860
tacctgagca	cccagtcgc	cctgagcaaa	gaccccaacg	agaagcgcga	tcacatggtc	1920
ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggate	actctcggca	tgacagagct	gtacaagtaa	1980

<210> 12

<211> 659

<212> PRI

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 12

Met	Thr	Asp	Val	Glu	Gln	Pro	Val	Ser	Val	Glu	Asp	Gln	Gln	Ala	Gln
1			5					10						15	
Ala	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Val	Leu	Gly	Asn	Ala	Tyr	Val	Gln	Thr
		20						25					30		
Ala	Ile	Asn	Ala	Tyr	Thr	Lys	Thr	Lys	Glu	Phe	His	Pro	Leu	Leu	Asn
		35				40						45			
Ser	Thr	Leu	Asn	Ser	Ala	Glu	Glu	Lys	Val	Ser	Thr	Val	Gly	Asn	Tyr
	50					55					60				
Ala	Ala	Gln	Lys	Ala	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Asn	Ser	Tyr	Tyr	Val	Lys	Pro
65					70					75				80	
Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr	Glu	Ala	Val	Ser	Tyr	Gly	Thr	Glu	Arg	Ala	Lys
			85						90					95	

Thr Ala Val Glu Ser Gly Lys Gln Ala Ala Ile Val Gly Gly Thr Phe
 100 105 110
 Gly Ile Gly Ala Ala Val Val Leu Thr Gln Phe Ser Leu Ala Leu Ser
 115 120 125
 Ala Gly Gly Ala Ala Leu Val Leu Glu Gln Val Asp Ser Ala Lys Lys
 130 135 140
 Leu Gly Ser Ser Ala Ile Ser Thr Ile Lys Glu Ala Glu Leu Ala Val
 145 150 155 160
 Glu His Arg Ile Phe Ser Ala Leu His Gln Ala Gln Arg Ile Ala Met
 165 170 175
 Val Pro Val Glu Lys Ile Thr Glu Asn Thr Asn Ser Leu Leu Asp Ile
 180 185 190
 Leu Asp Gly Ala Val Gln Lys Gly Leu Asn Ile Glu Val Pro Pro Ser
 195 200 205
 Val Asn Leu Thr Ile Gly Gln Arg Val Lys Asn Leu Ala Ser Leu Ile
 210 215 220
 Val Gln Gly Val Ser Asn Lys Ala His Asp His Val Ile Asp Pro Ile
 225 230 235 240
 Asn Glu Arg Ala Arg Asn Tyr Leu Glu Gln Leu Ser Gln Ser Phe Val
 245 250 255
 Leu Leu Asp Ile Val Arg Glu Lys Lys Thr Trp Val Ile Glu Lys Ser
 260 265 270
 Asn Glu Leu Ser Thr Ser Val Phe Asp Phe Lys Lys Thr Leu Glu Glu
 275 280 285
 Glu Ala Gln Lys Tyr Lys Val Ala Pro Glu Glu Met Leu Met Lys His
 290 295 300
 [0011] Ile Gln Ser Thr Ser Glu Gln Leu Ser Thr Gln Leu Gln Ser Leu Arg
 305 310 315 320
 Glu Lys Gly Gln Asn Val Phe Gly Asp Gly Thr Lys Ile Asp Ser Thr
 325 330 335
 Ile Asp Tyr Leu Glu Asn Leu Lys Lys Asn Phe Thr Asp Ala Glu Asp
 340 345 350
 Val Tyr Lys Val Arg Asp Glu Val Leu Asn Glu Gly Arg Gln Arg Ile
 355 360 365
 Ala Glu Leu Ser Thr Trp Thr Thr Ser Leu Leu Ile Ser Ala Glu
 370 375 380
 Trp Gln Phe Glu Pro Glu Asp Leu Leu Ile Glu Glu Leu Tyr Phe Asp
 385 390 395 400
 Ala Pro Pro Pro Val Arg Thr Arg Asn Leu Tyr Arg Asn Arg Ala Lys
 405 410 415
 Leu Ala Ala Ala Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val
 420 425 430
 Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe
 435 440 445
 Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr
 450 455 460
 Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr
 465 470 475 480
 Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro
 485 490 495
 Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly
 500 505 510
 Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys

	515		520		525
Thr	Arg Ala Glu Val Lys	Phe	Glu Gly Asp Thr	Leu Val Asn Arg Ile	
	530		535		540
Glu	Leu Lys Gly Ile Asp	Phe Lys Glu Asp Gly	Asn Ile Leu Gly His		
545		550		555	560
Lys	Leu Glu Tyr Asn Tyr	Asn Ser His Asn Val	Tyr Ile Met Ala Asp		
		565		570	575
Lys	Gln Lys Asn Gly Ile	Lys Val Asn Phe Lys	Ile Arg His Asn Ile		
		580		585	590
Glu	Asp Gly Ser Val Gln	Leu Ala Asp His Tyr	Gln Gln Asn Thr Pro		
		595		600	605
Ile	Gly Asp Gly Pro Val	Leu Leu Pro Asp Asn	His Tyr Leu Ser Thr		
		610		615	620
Gln	Ser Ala Leu Ser Lys	Asp Pro Asn Glu Lys	Arg Asp His Met Val		
625		630		635	640
Leu	Leu Glu Phe Val Thr	Ala Ala Gly Ile Thr	Leu Gly Met Asp Glu		
		645		650	655
	Leu Tyr Lys				

- <210> 13
- <211> 2031
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223>
- <400>13

```

[0012] atggcattcgg ttgcagttga tccacaaccg agtgtggtga ctcggtggt caacctgccc          60
ttggtgagct ccacgtatga cctcatgtcc tcagcctatc tcagtacaaa ggaccagtat          120
ccctacctga agtctgtgtg tgagatggca gagaacggtg tgaagaccat cacctecgtg          180
gcatgacca gtgtctgtcc catcatccag aagctagagc cgcaaatgac agttgccaat          240
acctatgcct gtaaggggct agacaggatt gaggagagac tgcctattct gaatcagcca          300
tcaactcaga ttgttgccaa tgccaaaggc gctgtgactg ggccaaaaga tgctgtgacg          360
actactgtga ctggggccaa ggattctgtg gccagcacga tcacaggggt gatggacaag          420
accaaagggg cagtgtgactg cagtgtggag aagaccaagt ctgtggteag tggcagcatt          480
aacacagtct tggggagtcg gatgatgcag ctctgtgagc gtggcgtaga aatgcactc          540
accaaatcag agctgttggg agaacagtac ctccctctca ctgaggaaga actagaaaaa          600
gaagcaaaaa aagttgaagg atttgatctg gttcagaage caagttatta tgtttagactg          660
ggatecctgt ctaccaagct tcactcccgt gcctaccage aggcctcag cagggttaaa          720
gaagctaage aaaaaagcca acagaccatt tctcagctcc attctactgt tcacctgatt          780
gaatttgcca ggaagaatgt gtatagtgcc aatcagaaaa ttcaggatgc tcaggataag          840
ctctacctct catgggtaga gtggaaaagg agcattggat atgatgatac tgatgagtcc          900
cactgtgctg agcacattga gtcacgtact cttgcaattg cccgcaacct gactcagcag          960
ctccagacca cgtgccacac cctcctgtcc aacatccaag gtgtaccaca gaacatccaa          1020
gateaagcca agcacatggg ggtgatggca ggcgacatct actcagtgtt ccgcaatget          1080
gcctccttta aagaagtgtc tgacagctc ctcaattcta gcaaggggca gctgcagaaa          1140
atgaaggaat ctttagatga cgtgatggat tatcttgta acaaacagcc cctcaactgg          1200
ctggtaggtc cttttatec tcagctgact gactctcaga atgctcagga ccaaggtgca          1260
gagatggaca agagcagcca ggagaccag cgatctgagc ataaaaactca tatggtgagc          1320
aagggegagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta          1380
aacggccaca agtccagcgt gtcggcgag ggcgagggcg atgccacct cggcaagctg          1440
accctgaagt tcactgtcac caccggcaag ctgcccgtgc cctgcccac cctcgtgacc          1500
accctgacct acggcgtgca gtgctcagc cgtaccacc accacatgaa gcagcacgac          1560
ttcttcaagt ccgcatgccc cgaaggctac gtcacaggag gcaccatctt cttcaaggac          1620
    
```

```

gacggcaact acaagaccgc cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc 1680
atcgagctga agggcatcga ctccaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag 1740
tacaactaca acagecaciaa cgtctatata atggcggaca agcagaagaa cggcateaag 1800
gtgaacttca agatecgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac 1860
cagcagaaca ccccatecgg egaeggeccc gtgetgetgc cegacaacca ctacetgagc 1920
accagtcgcg ccctgagcaa agacccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag 1980
ttcgtgaccg ccgcegggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta a 2031

```

<210> 14

<211> 676

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 14

```

Met Ala Ser Val Ala Val Asp Pro Gln Pro Ser Val Val Thr Arg Val
1          5          10          15
Val Asn Leu Pro Leu Val Ser Ser Thr Tyr Asp Leu Met Ser Ser Ala
20        25        30
Tyr Leu Ser Thr Lys Asp Gln Tyr Pro Tyr Leu Lys Ser Val Cys Glu
35        40        45
Met Ala Glu Asn Gly Val Lys Thr Ile Thr Ser Val Ala Met Thr Ser
50        55        60
Ala Leu Pro Ile Ile Gln Lys Leu Glu Pro Gln Ile Ala Val Ala Asn
65        70        75        80
Thr Tyr Ala Cys Lys Gly Leu Asp Arg Ile Glu Glu Arg Leu Pro Ile
85        90        95
[0013] Leu Asn Gln Pro Ser Thr Gln Ile Val Ala Asn Ala Lys Gly Ala Val
100       105       110
Thr Gly Ala Lys Asp Ala Val Thr Thr Thr Val Thr Gly Ala Lys Asp
115       120       125
Ser Val Ala Ser Thr Ile Thr Gly Val Met Asp Lys Thr Lys Gly Ala
130       135       140
Val Thr Gly Ser Val Glu Lys Thr Lys Ser Val Val Ser Gly Ser Ile
145       150       155       160
Asn Thr Val Leu Gly Ser Arg Met Met Gln Leu Val Ser Ser Gly Val
165       170       175
Glu Asn Ala Leu Thr Lys Ser Glu Leu Leu Val Glu Gln Tyr Leu Pro
180       185       190
Leu Thr Glu Glu Glu Leu Glu Lys Glu Ala Lys Lys Val Glu Gly Phe
195       200       205
Asp Leu Val Gln Lys Pro Ser Tyr Tyr Val Arg Leu Gly Ser Leu Ser
210       215       220
Thr Lys Leu His Ser Arg Ala Tyr Gln Gln Ala Leu Ser Arg Val Lys
225       230       235       240
Glu Ala Lys Gln Lys Ser Gln Gln Thr Ile Ser Gln Leu His Ser Thr
245       250       255
Val His Leu Ile Glu Phe Ala Arg Lys Asn Val Tyr Ser Ala Asn Gln
260       265       270
Lys Ile Gln Asp Ala Gln Asp Lys Leu Tyr Leu Ser Trp Val Glu Trp
275       280       285
Lys Arg Ser Ile Gly Tyr Asp Asp Thr Asp Glu Ser His Cys Ala Glu
290       295       300

```


	His	Ile	Glu	Ser	Arg	Thr	Leu	Ala	Ile	Ala	Arg	Asn	Leu	Thr	Gln	Gln	
	305					310					315					320	
	Leu	Gln	Thr	Thr	Cys	His	Thr	Leu	Leu	Ser	Asn	Ile	Gln	Gly	Val	Pro	
					325					330						335	
	Gln	Asn	Ile	Gln	Asp	Gln	Ala	Lys	His	Met	Gly	Val	Met	Ala	Gly	Asp	
				340					345					350			
	Ile	Tyr	Ser	Val	Phe	Arg	Asn	Ala	Ala	Ser	Phe	Lys	Glu	Val	Ser	Asp	
			355					360					365				
	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Gln	Leu	Gln	Lys	Met	Lys	Glu	Ser	
		370					375						380				
	Leu	Asp	Asp	Val	Met	Asp	Tyr	Leu	Val	Asn	Asn	Thr	Pro	Leu	Asn	Trp	
	385					390					395					400	
	Leu	Val	Gly	Pro	Phe	Tyr	Pro	Gln	Leu	Thr	Glu	Ser	Gln	Asn	Ala	Gln	
					405					410						415	
	Asp	Gln	Gly	Ala	Glu	Met	Asp	Lys	Ser	Ser	Gln	Glu	Thr	Gln	Arg	Ser	
				420					425						430		
	Glu	His	Lys	Thr	His	Met	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	
			435					440					445				
	Val	Val	Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	
		450					455					460					
	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	
	465					470					475					480	
	Thr	Leu	Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	
					485					490						495	
[0014]	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	
					500				505						510		
	Pro	Asp	His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	
			515					520					525				
	Gly	Tyr	Val	Gln	Glu	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Asp	Gly	Asn	Tyr	
		530					535					540					
	Lys	Thr	Arg	Ala	Glu	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	
	545					550					555					560	
	Ile	Glu	Leu	Lys	Gly	Ile	Asp	Phe	Lys	Glu	Asp	Gly	Asn	Ile	Leu	Gly	
					565						570					575	
	His	Lys	Leu	Glu	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ser	His	Asn	Val	Tyr	Ile	Met	Ala	
			580						585						590		
	Asp	Lys	Gln	Lys	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Asn	Phe	Lys	Ile	Arg	His	Asn	
			595					600					605				
	Ile	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Ala	Asp	His	Tyr	Gln	Gln	Asn	Thr	
		610					615						620				
	Pro	Ile	Gly	Asp	Gly	Pro	Val	Leu	Leu	Pro	Asp	Asn	His	Tyr	Leu	Ser	
	625					630					635					640	
	Thr	Gln	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Asp	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Asp	His	Met	
					645						650					655	
	Val	Leu	Leu	Glu	Phe	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Ile	Thr	Leu	Gly	Met	Asp	
				660						665						670	
	Glu	Leu	Tyr	Lys													
			675														

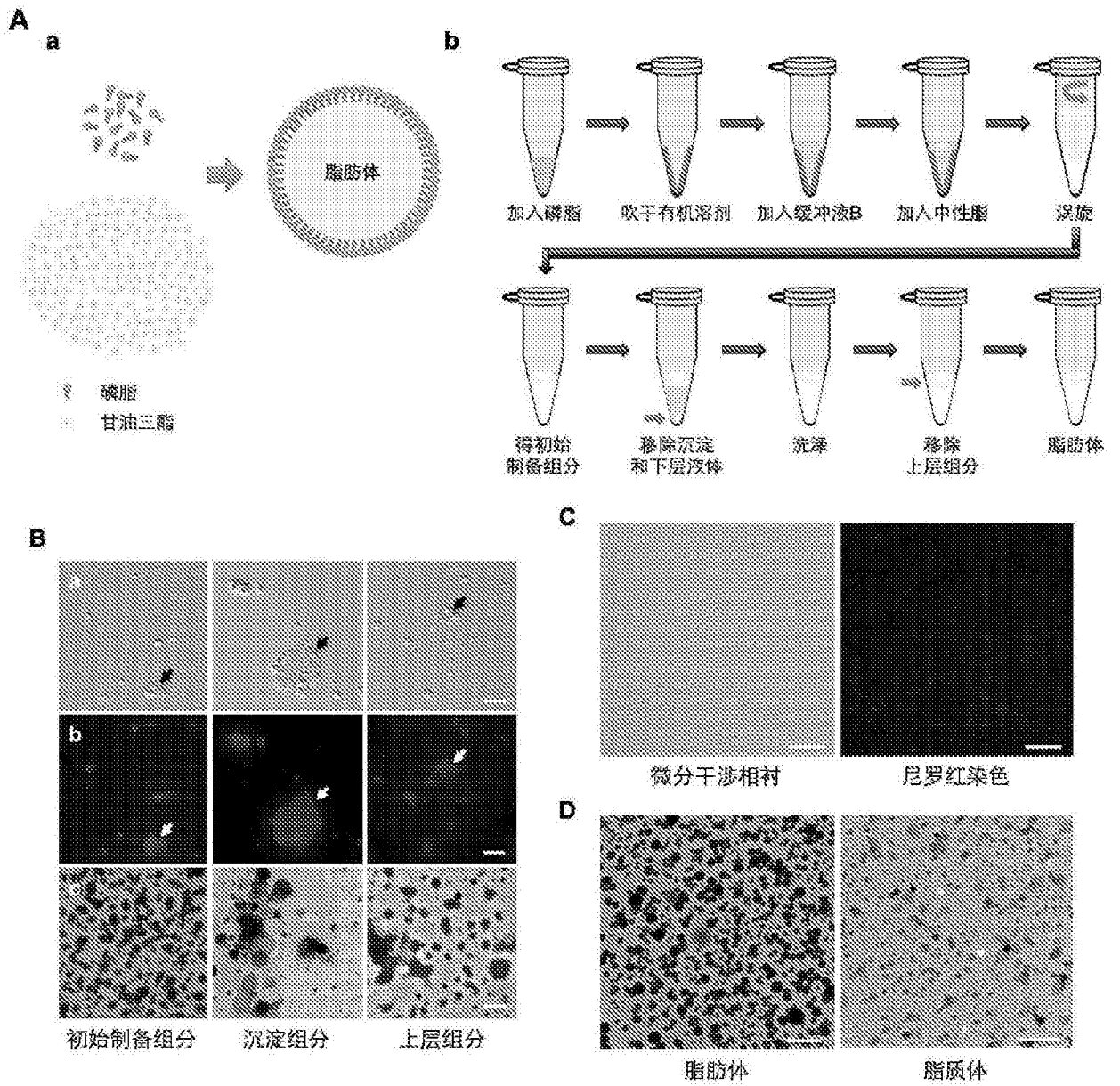


图1

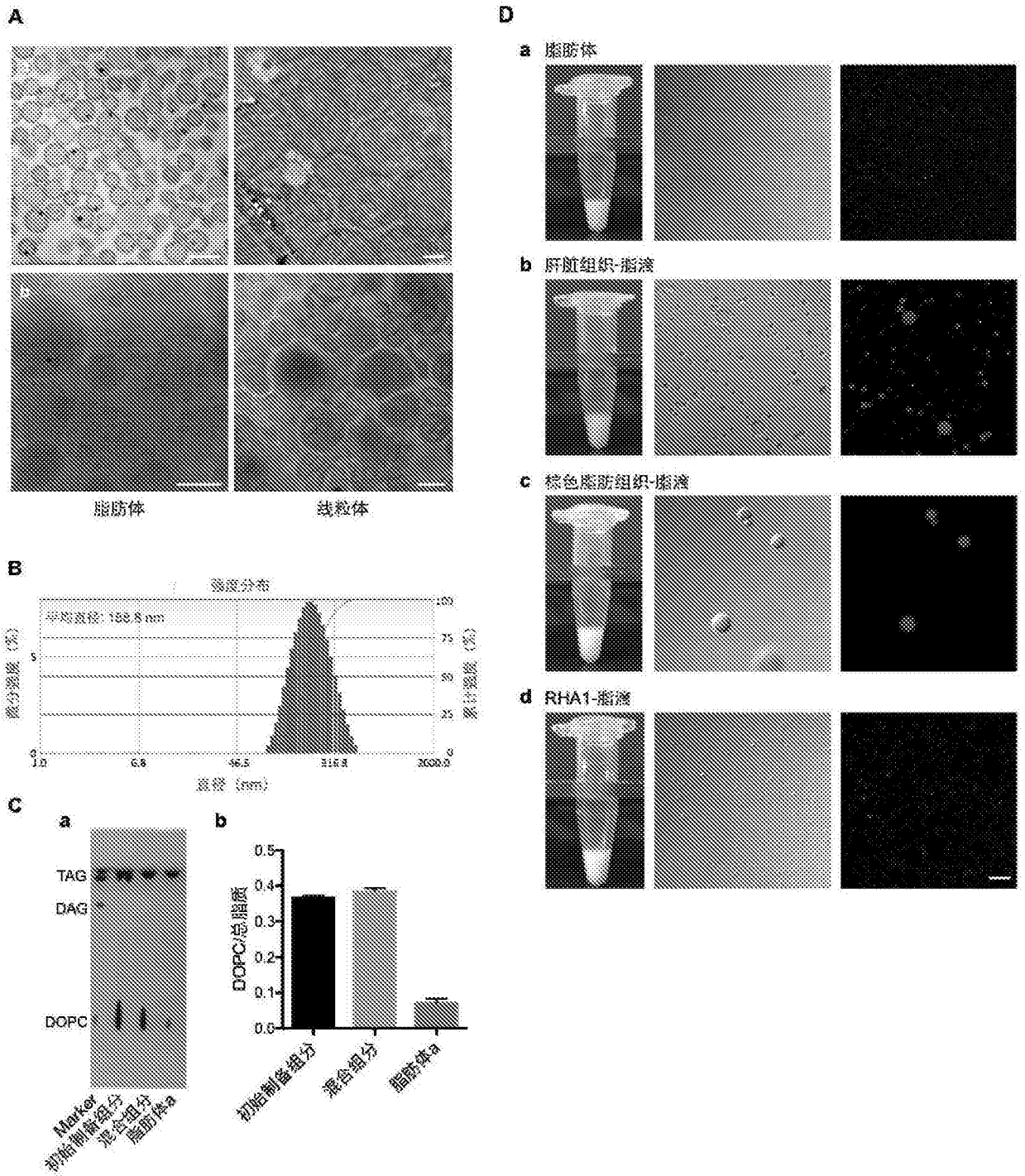


图2

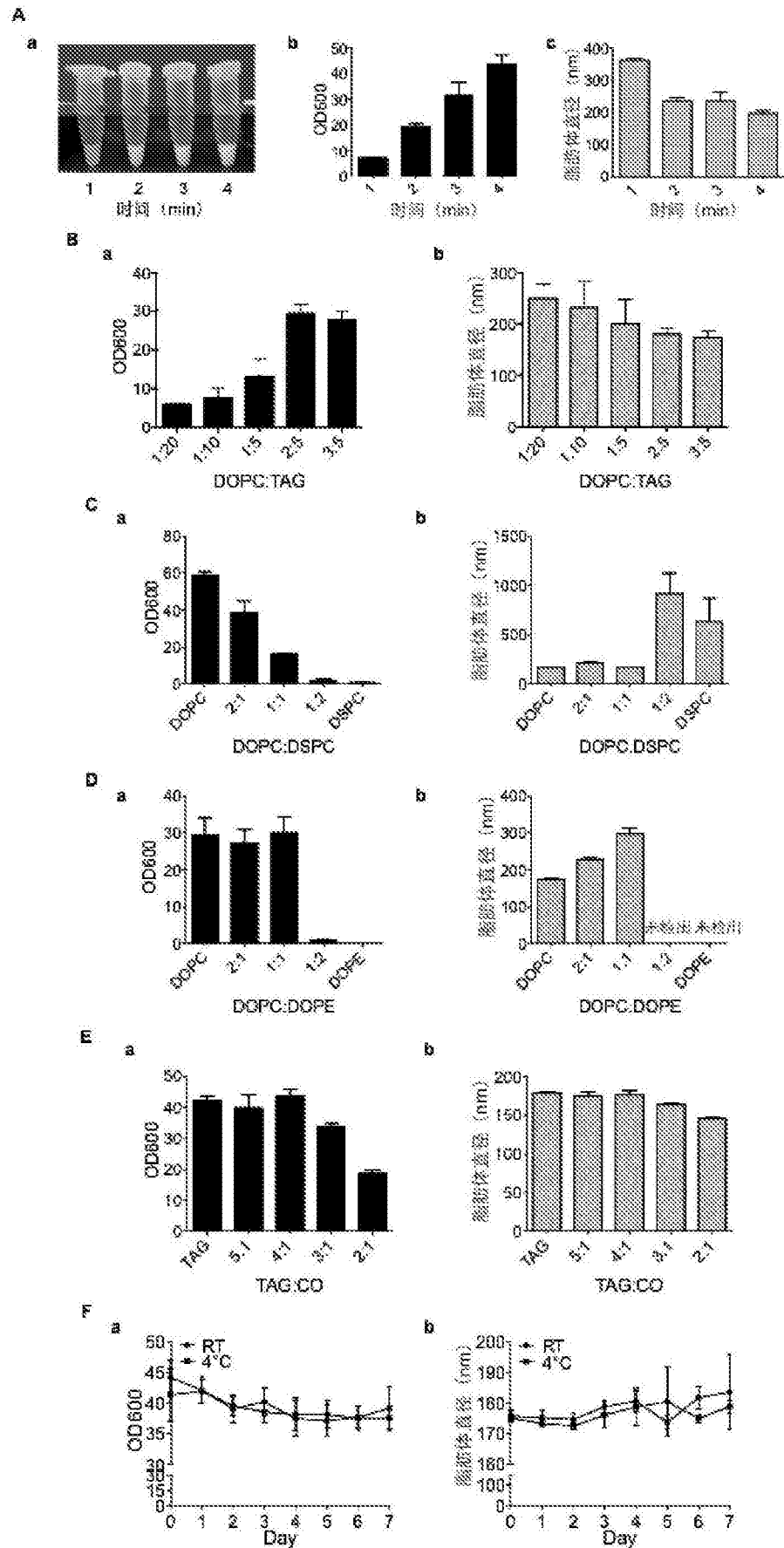


图3

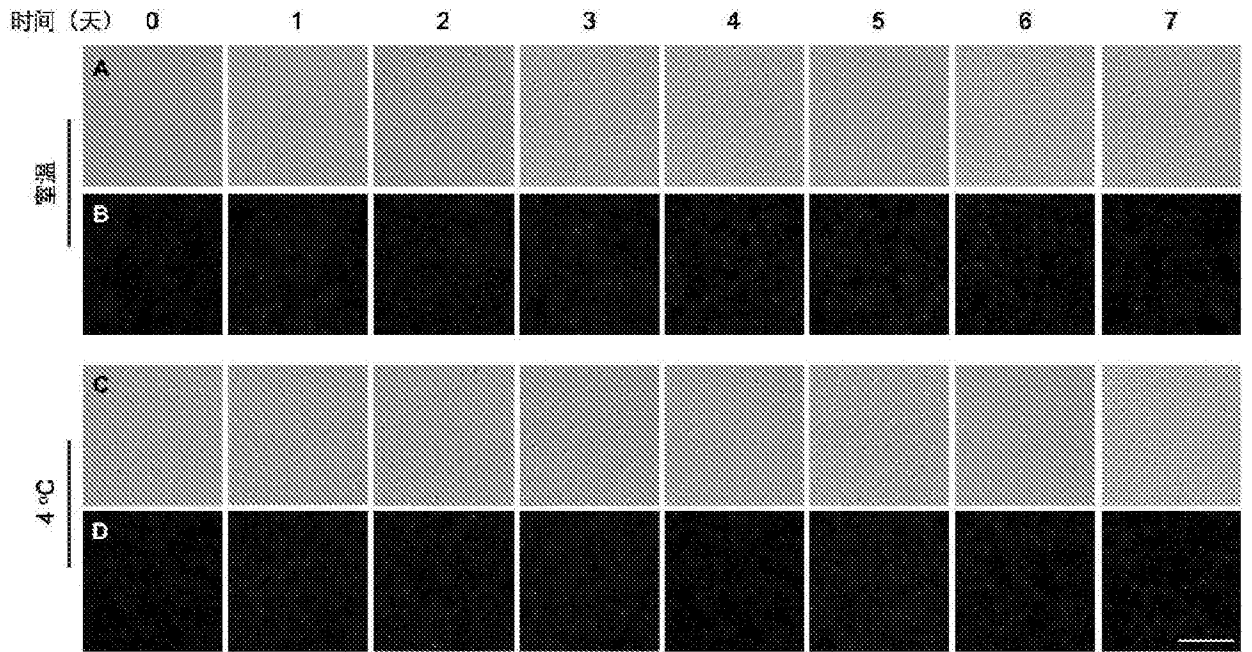


图4

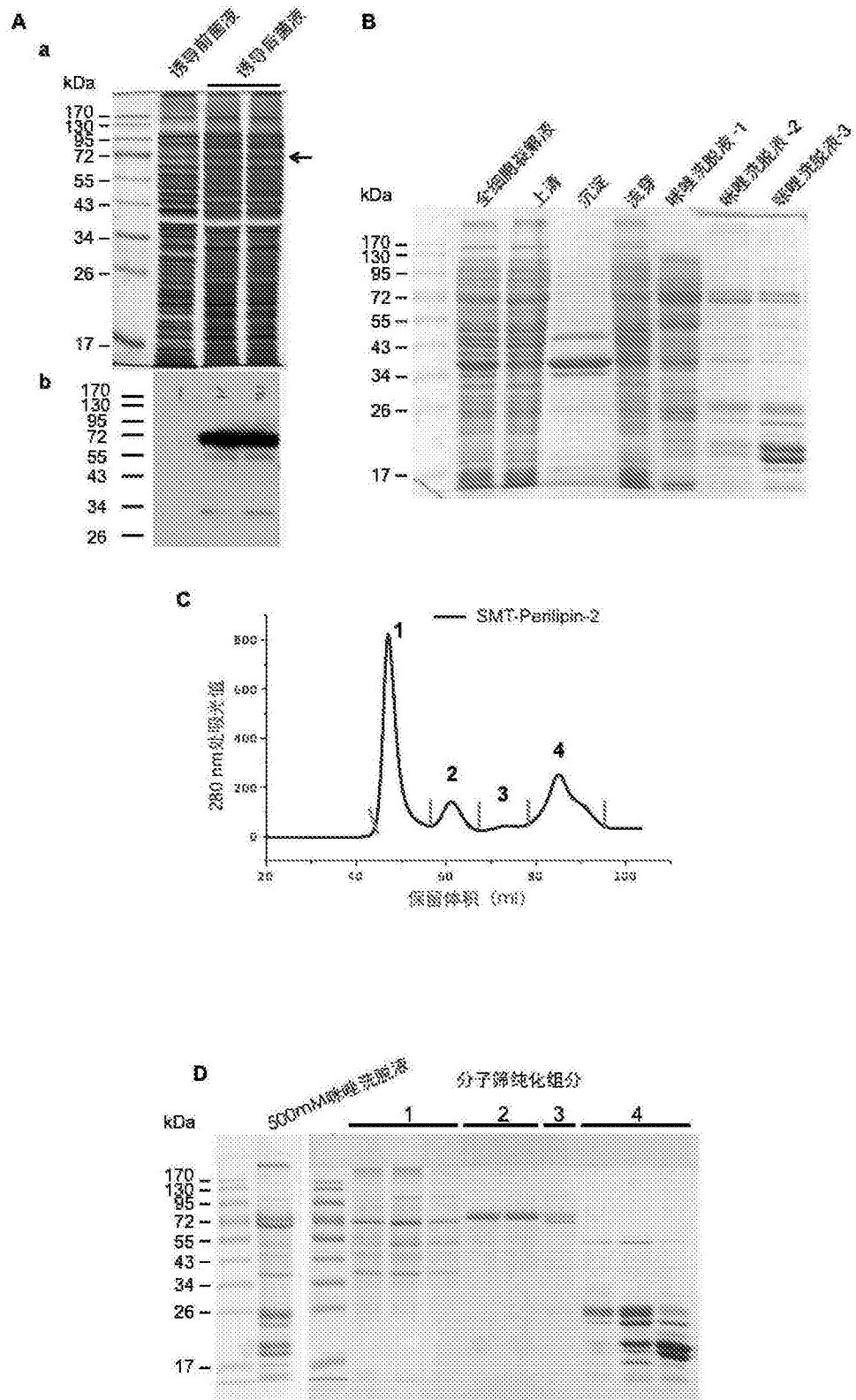


图5

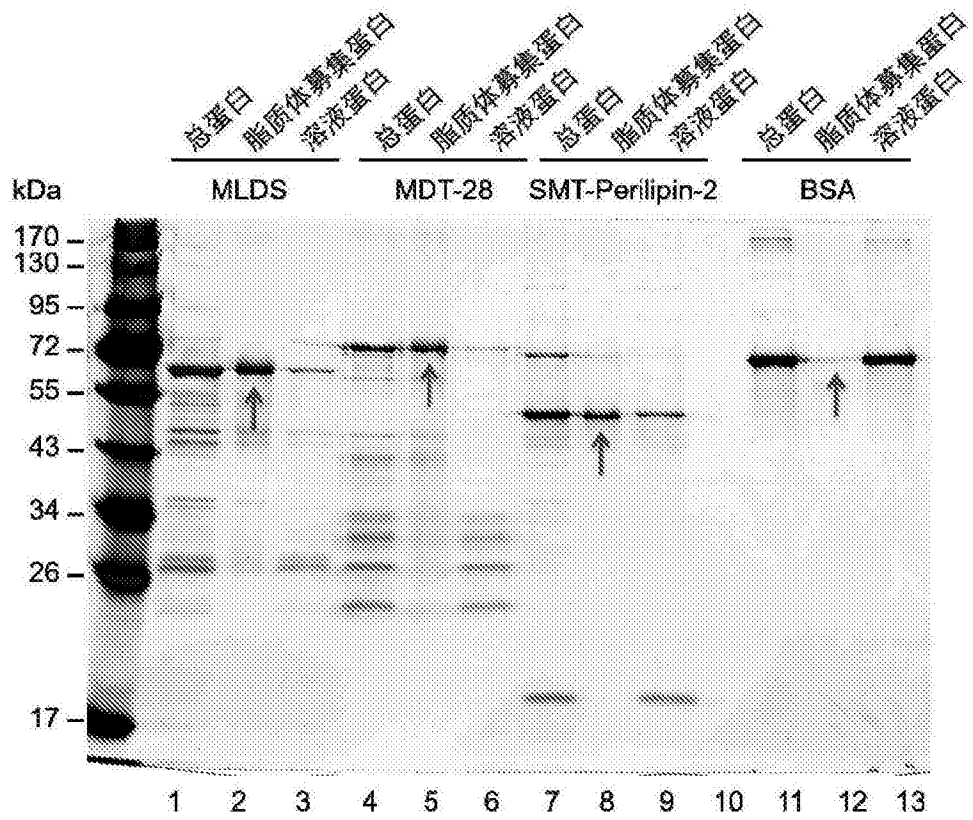


图6

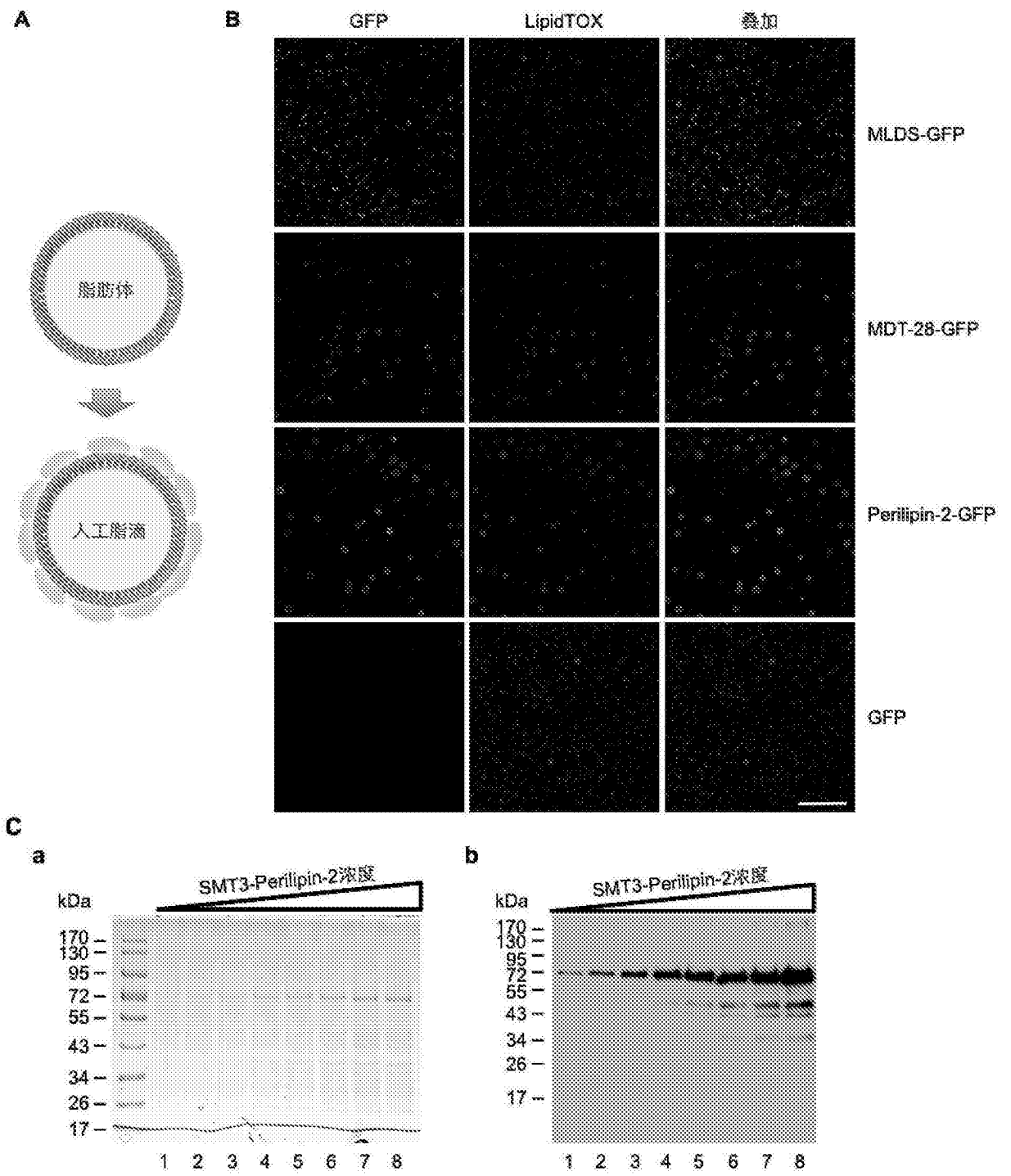


图7

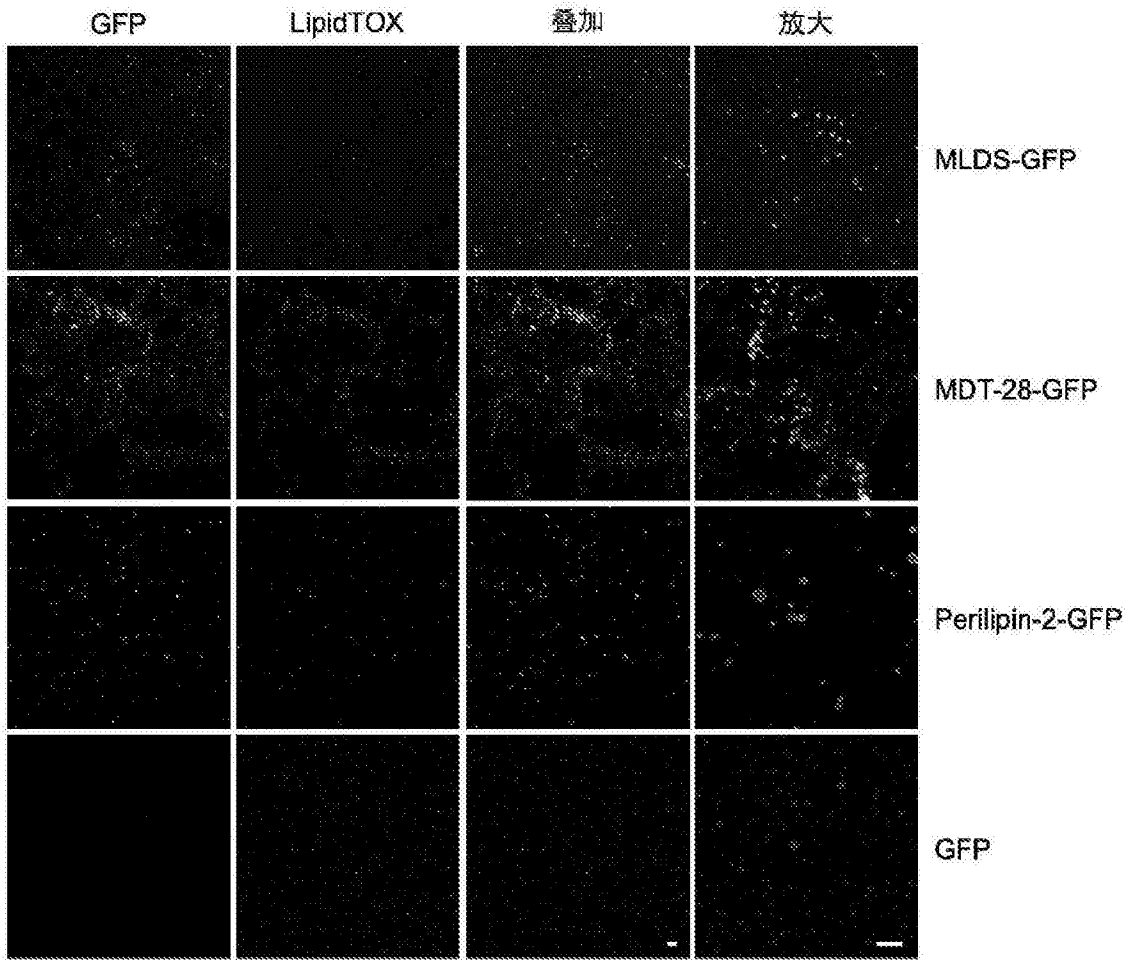


图8

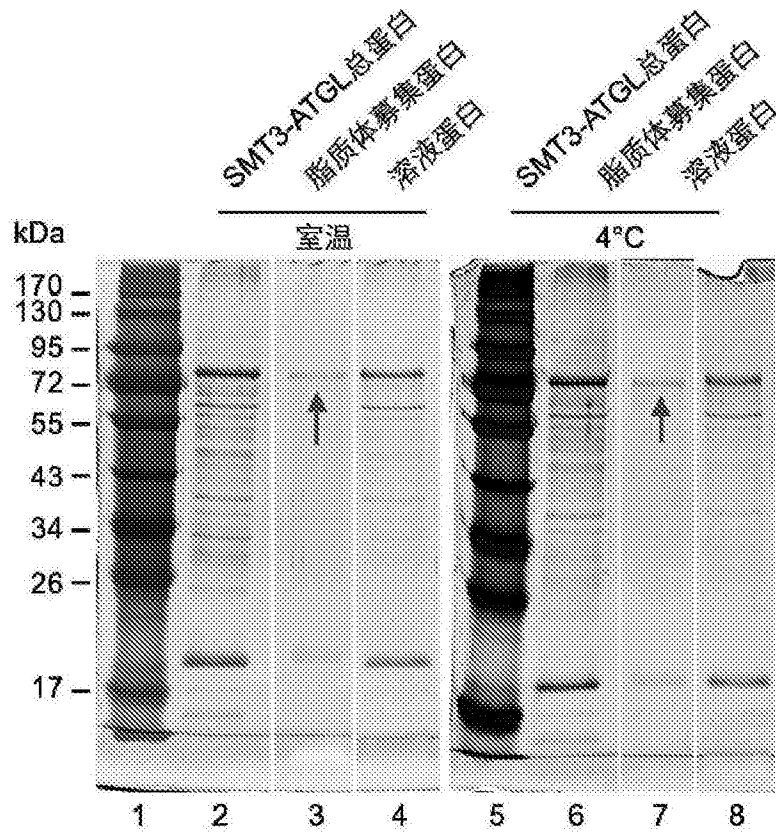


图9

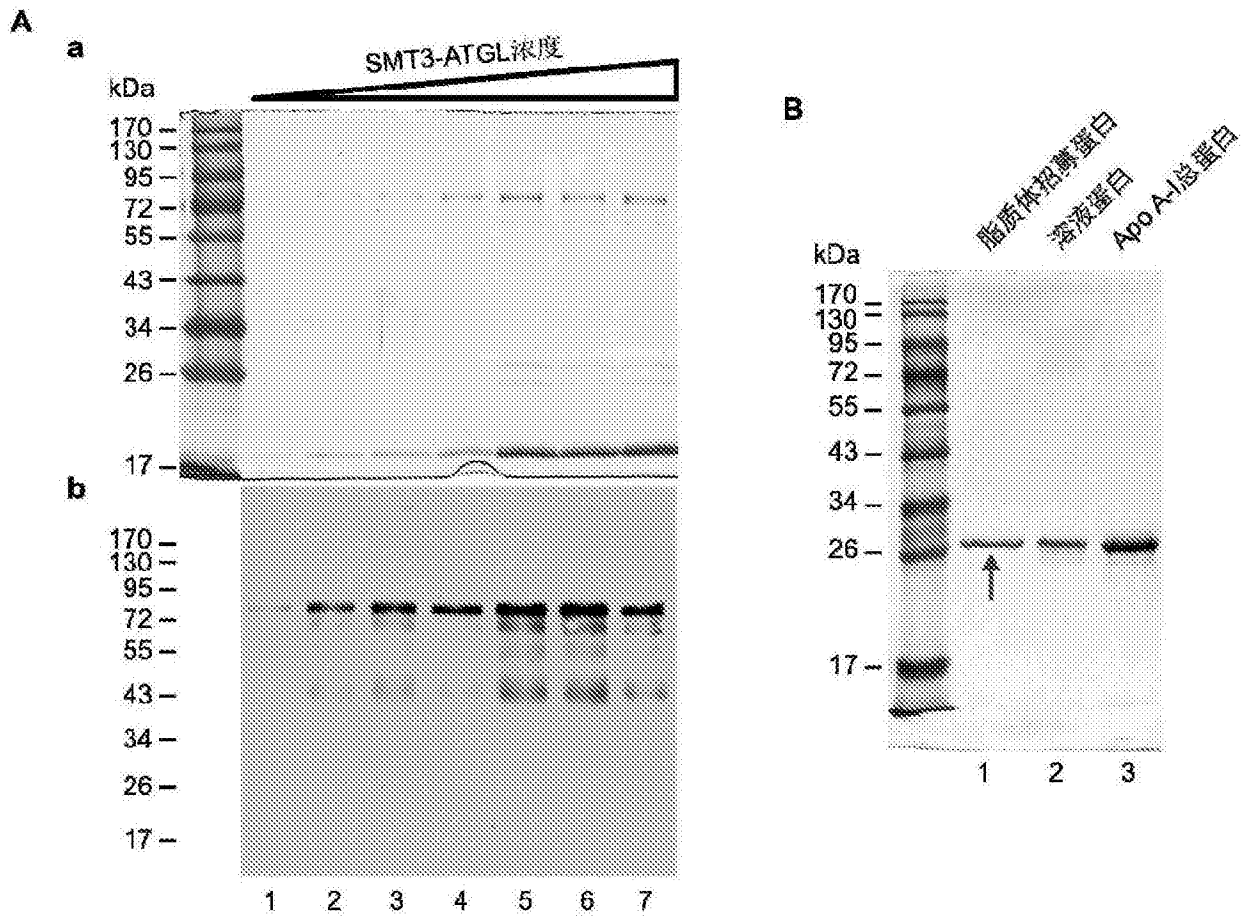


图10