



(10) 授权公告号 CN 114480347 B

(45) 授权公告日 2022.12.23

(21) 申请号 202210158452.7	CN 106085986 A,2016.11.09
(22) 申请日 2022.02.21	CN 113930410 A,2022.01.14
(65) 同一申请的已公布的文献号	US 2014342400 A1,2014.11.20
申请公布号 CN 114480347 A	WO 2019178346 A1,2019.09.19
(43) 申请公布日 2022.05.13	Juan P. Fernandez等.Optimized CRISPR-Cpf1 system for genome editing in zebrafish.《Methods》.2018,第150卷
(73) 专利权人 中国科学院地球化学研究所	Melanie Weisser等.Structural and Functional Insights into Human Re-initiation Complexes.《Molecular Cell》.2017,第67卷(第3期),
地址 550081 贵州省贵阳市观山湖区林城西路99号	Murugan K 等.Pervasive off-target and double-stranded DNA nicking by CRISPR-Cas12a.《BioRxiv》.2019,
(72) 发明人 曹昊睿 张华 徐鹏奇 冉芳	卢盼 等..基于CRISPR-Cas12a蛋白的副溶血弧菌及tdh基因检测分析.《疾病监测》.2021,第37卷(第3期),
汤琳 晏智 钟理 凯文·托马斯	无.TEV Protease (GST/His-tag).《百度》.2020,
(74) 专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理有限公司 11758	<b>审查员 印丽娟</b>
专利代理师 景鹏 张颖	权利要求书1页 说明书6页
(51) Int. Cl.	序列表5页 附图2页
C12N 9/22 (2006.01)	
(56) 对比文件	
CN 113881652 A,2022.01.04	
CN 108503709 A,2018.09.07	
CN 110431229 A,2019.11.08	

(54) 发明名称

一种纯化Cas12a蛋白的方法

(57) 摘要

公开了一种纯化Cas12a蛋白的方法,所述方法包括:通过细菌表达带有His标签的Cas12a蛋白,获得含Cas12a蛋白的上清液;然后使用第一镍柱、第二镍柱和肝素柱对上述上清液进行纯化,得到经纯化的Cas12a蛋白。

1. 一种纯化Cas12a蛋白的方法,其特征在于,所述方法包括:通过细菌表达带有His标签的Cas12a蛋白,获得含Cas12a蛋白的上清液;然后使用第一镍柱对所述上清液进行纯化,在所述第一镍柱纯化之后,使用烟草蚀纹病毒蛋白酶进行酶切,以从所述带有His标签的Cas12a蛋白切除掉His标签,获得经酶切的蛋白溶液,然后使用第二镍柱和肝素柱对所述经酶切的蛋白溶液进行纯化,得到经纯化的Cas12a蛋白;

其中,所述方法不经过凝胶过滤纯化,所述Cas12a蛋白包括SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列;

在所述第一镍柱的纯化步骤中,使用第一缓冲液和第二缓冲液以1.8mL/min进行线性洗脱;

所述第二缓冲液在洗脱缓冲液中的比例在40min的时间内从0%升高至100%;

所述第一缓冲液和/或所述第二缓冲液的pH值为8.0;

所述第一缓冲液包含50mM Tris-HCl、20mM咪唑、300mM NaCl、0.5mM TCEP;

所述第二缓冲液包含50mM Tris-HCl、300mM咪唑、300mM NaCl、0.5mM TCEP。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述His标签连接在所述Cas12a蛋白的N-末端或C-末端。

## 一种纯化Cas12a蛋白的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种快速纯化Cas12a蛋白的方法。

### 背景技术

[0002] CRISPR-Cas12a系统是一种新的RNA指导的核酸内切酶,用于基因组编辑领域。与Cas9系统相比,Cas12a只需要crRNA即可对靶DNA进行识别与切割,不需要tracrRNA的参与,系统更加简单。Cas12a识别的原间隔序列临近基序(protospacer adjacent motif, PAM)序列为富胸腺嘧啶(T)序列,可以扩展CRISPR的编辑范围。另外,Cas12a切割靶DNA产生粘性末端,更加有利于目的基因的插入。研究还发现,Cas12a在具有相近的编辑效率前提下,具有比Cas9更低的脱靶率。因此,Cas12a被广泛应用于基因编辑中。

[0003] 为了制备满足所需纯度的Cas12a蛋白,往往需要对重组表达的蛋白进行提取和纯化。但现有的纯化方法存在周期长、操作复杂,且可能会导致蛋白分解,进而造成蛋白有效产率降低等问题。因此,亟需一种能通过较短周期、操作简单且纯化效率高的Cas12a蛋白纯化方法。

### 发明内容

[0004] 为了解决现有技术中存在的上述技术问题之一,本发明提供了一种纯化Cas12a蛋白的方法。经本发明的方法纯化得到的Cas12a蛋白具有较高的活性,且纯度较高。

[0005] 根据本发明的一个方面,提供了一种纯化Cas12a蛋白的方法,所述方法包括:通过细菌表达带有His标签的Cas12a蛋白,获得含Cas12a蛋白的上清液;然后使用第一镍柱、第二镍柱和肝素柱对所述上清液进行纯化,得到经纯化的Cas12a蛋白。

[0006] 根据本公开的一些实施方式,所述His标签连接在所述Cas12a蛋白的N-末端。根据本公开的一些实施方式,所述His标签连接在所述Cas12a蛋白的C-末端。

[0007] 根据本公开的一些实施方式,所述Cas12a蛋白包括如SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。根据本公开的一些实施方式,所述Cas12a蛋白包括与SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或99.8%序列同一性的氨基酸序列。

[0008] 根据本公开的一些实施方式,所述方法进一步包括:在所述第一镍柱纯化之后,使用烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶进行酶切,以从所述带有His-标签的Cas12a蛋白切除掉His-标签。

[0009] 根据本公开的一些实施方式,将经过TEV蛋白酶酶切的混合物进行第二镍柱纯化。当Cas12a蛋白的表达量较大时,TEV酶切去除标签蛋白的反应可能会进行的不够彻底。因此,经TEV酶切的溶液中,包含从Cas12a蛋白切除的His-标签、Cas12蛋白、TEV酶,已经没有酶切干净的仍然带有His-标签的Cas12蛋白混合在一起。为了将其分离,进行了第二镍柱纯化。通过第二镍柱纯化,不带His标签的Cas12a蛋白直接穿过镍柱,而His标签和仍然带有His标签的Cas12a蛋白被吸附在镍柱上,从而与切掉His标签的Cas12a蛋白分离开。

[0010] 根据本公开的一些实施方式,通过肝素柱,对经过第二镍柱纯化的产物进一步纯化,以破除高聚合物。

[0011] 根据本公开的一些实施方式,所述第一镍柱的纯化步骤中,使用第一缓冲液和第二缓冲液以1.0~2.0mL/min进行线性洗脱。根据本公开的具体实施方式,所述第一镍柱的纯化步骤中,使用第一缓冲液和第二缓冲液以1.5~2.0mL/min进行线性洗脱,例如以1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0mL/min进行线性洗脱。

[0012] 根据本公开的一些实施方式,在线性洗脱的过程中,第二缓冲液占洗脱缓冲液中的比例从0%升高至100%。根据本公开的一些实施方式,第二缓冲液在洗脱缓冲液中的比例在30~60min的时间内从0%升高至100%。根据本公开的具体实施方式,第二缓冲液在洗脱缓冲液中的比例在30~50min的时间内从0%升高至100%。根据本公开的具体实施方式,第二缓冲液在洗脱缓冲液中的比例在40min的时间内从0%升高至100%。

[0013] 根据本公开的一些实施方式,所述第一缓冲液的pH值为7.5~8.2,例如为8.0。根据本公开的一些实施方式,所述第二缓冲液的pH值pH值为7.5~8.2,例如为8.0。

[0014] 根据本公开的一些实施方式,所述第一缓冲液可以包含40~55mM Tris-HCl,例如可以包含40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54或55mM Tris-HCl。根据本公开的一些实施方式,所述第一缓冲液还可以包含16~25mM咪唑,例如可以包含16、17、18、19、20、21、22、23、24或25mM咪唑。根据本公开的一些实施方式,所述第一缓冲液还可以包含280~320mM NaCl,例如可以包含280、290、300、310或320mM NaCl。根据本公开的一些实施方式,所述第一缓冲液还可以包含0.4~0.6mM TCEP,例如可以包含0.4、0.5或0.6mM TCEP。

[0015] 根据本公开的一些实施方式,所述第二缓冲液可以包含40~55mM Tris-HCl,例如可以包含40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54或55mM Tris-HCl。根据本公开的一些实施方式,所述第二缓冲液还可以包含280~320mM咪唑,例如可以包含280、290、300、310或320mM咪唑。根据本公开的一些实施方式,所述第二缓冲液还可以包含280~320mM NaCl,例如可以包含280、290、300、310或320mM NaCl。根据本公开的一些实施方式,所述第二缓冲液还可以包含0.4~0.6mM TCEP,例如可以包含0.4、0.5或0.6mM TCEP。

[0016] 与单次镍柱的纯化相比,本公开的两次镍柱纯化Cas12a蛋白的方法不需要经过最为耗时费力和极易造成蛋白损耗的凝胶过滤纯化,降低了纯化成本。本公开通过两次镍柱与肝素柱组合,进行重组Cas12a蛋白的纯化,提高了蛋白纯度,同时还大幅降低纯化时间,整个纯化时间约36小时左右,相应也大幅降低了由时间延长所造成的蛋白损耗。

## 附图说明

[0017] 图1示出了根据本公开实施方式的纯化方法各步骤获得的蛋白样本的PAGE胶结果。图1A中,从左至右的泳道1为分子量标志物,泳道2为镍柱粗提(第一次镍柱)流穿液,泳道3为镍柱粗提(第一次镍柱)的洗涤液,泳道4为镍柱粗提(第一次镍柱)的蛋白峰(样品1),泳道5为TEV酶切后的样品2。图1B中,从左至右的泳道1为分子量标志物,泳道2为TEV酶切后的样品2,泳道3为二次镍柱洗脱,泳道4为二次镍柱的流穿液(样品3),泳道5~8为Cas12a二次纯化的各峰样品(7、10、11.5、9)。

[0018] 图2示出了通过实施例3纯化步骤获得的各蛋白样品的高度聚合物的检测图谱。

[0019] 图3示出了经不同纯化方法获得的Cas12a蛋白活性的测定结果。

## 具体实施方式

[0020] 为使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步的详细说明。此处所描述的具体实施例仅用于解释本发明,并不用于构成对本发明的任何限制。此外,在以下说明中,省略了对公知结构和技术的描述,以避免不必要地混淆本公开的概念。这样的结构和技术在许多出版物中也进行了描述。

### [0021] 定义

[0022] 除非另有定义,否则本发明使用的所有技术术语和科技术语都具有如在本发明所属领域中通常使用的相同含义。出于解释本说明书的目的,将应用以下定义,并且在适当时,以单数形式使用的术语也将包括复数形式,反之亦然。

[0023] 除非上下文另有明确说明,否则本文所用的表述“一种”和“一个”包括复数指代。例如,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞及本领域技术人员可知晓的等同物等等。

[0024] 本文所用的术语“约”表示其后的数值的 $\pm 20\%$ 的范围。在一些实施方式中,术语“约”表示其后的数值的 $\pm 10\%$ 的范围。在一些实施方式中,术语“约”表示其后的数值的 $\pm 5\%$ 的范围。

[0025] 本文所用的术语“烟草蚀纹病毒蛋白酶”或“TEV酶”是一种重组表达的带有His标签的半胱氨酸蛋白酶,能特异性识别七肽序列Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly/Ser,并在Gln和Gly/Ser氨基酸残基之间进行酶切。TEV酶可用于去除融合蛋白中的GST、His或者其他标签。

[0026] 本文所用的术语“肝素”是一种含硫酸酯的酸性多糖,能与抗凝血因子III、凝血酶、类凝血酶、人凝血因子IX、XI和VIII等,大肠杆菌表达的人白介素、人前列腺生长因子、重组人血管内皮生长因子、软骨生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、重组人酸性成纤维细胞生长因子、重组肝细胞生长因子、重组鼠肝素辅因子II、重组人血小板第四因子、重组人内皮抑素、重组人角质细胞生长因子等生物大分子结合。因此肝素可以用于这类物质的纯化。肝素柱或肝素亲和层析介质是以高流速琼脂糖微球为基质,采用环氧活化工艺,将肝素偶联到琼脂糖凝胶上,从而应用于某些蛋白的纯化。

[0027] 本文所用的术语“序列同一性”是指,两个氨基酸序列之间或两个核苷酸序列之间的关联度。可以使用如在EMBOSS软件包的尼德尔程序中的尼德曼-翁施算法(Needleman-Wunsch algorithm),来确定两个氨基酸序列之间的序列同一性。所使用的参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5和EBL0SUM62(BL0SUM62的EMBOSS版)取代矩阵。使用尼德尔标记的“最长同一性”的输出作为同一性百分比,并且按照如下公式计算:

[0028]  $(\text{相同的残基} \times 100) / (\text{比对长度} - \text{比对中的空位总数})$ 。

[0029] 下面提供实施例和附图以帮助理解本发明。但应理解,这些实施例和附图仅用于说明本发明,但不构成任何限制。本发明的实际保护范围在权利要求书中进行阐述。应理解,在不脱离本发明精神的情况下,可以进行任何修改和改变。

[0030] 实施例1:Cas12a蛋白表达载体的构建和Cas12a蛋白的表达

[0031] 取感受态细胞Rosseta (DE3)并在冰上融解。取1 $\mu\text{L}$ 其中已经插入了Cas12a编码序列的质粒6His-MBP-TEV-huLbCpf1 (Addgene)加入到50 $\mu\text{L}$ 感受态细胞中,冰浴30min,然后42 $^{\circ}\text{C}$ 热激45s,迅速平稳放回冰中2分钟,添加700 $\mu\text{L}$ 不含抗生素的无菌培养基,混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养1小时,吸取约50 $\mu\text{L}$ 菌液均匀涂布到含100mg/L氨苄青霉素和30mg/L氯霉素的LB琼

脂培养基平板中,37℃培养过夜。挑取菌落,转移至含100mg/L氨苄青霉素和30mg/L氯霉素培养基中,过夜培养。

[0032] 取25mL饱和菌液加入到1L含100mg/L氨苄青霉素和30mg/L氯霉素以及0.2%葡萄糖培养基中,37℃培养至OD值0.5-0.6左右,然后加入IPTG(终浓度为0.1mM),18℃表达过夜。4℃,5000g离心10分钟,弃去上清液,-80℃保存。每4L菌液大概能够收获菌体25~30g。

[0033] 实施例2:Cas12a蛋白的提取

[0034] 冰上解冻菌体,按照1:4-5体积加入裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,pH=8.0,20mM咪唑,300mM NaCl,0.5mM TCEP,0.25mg/ml溶菌酶,1:100蛋白酶抑制剂)重悬菌体,然后在冰水浴条件下超声破碎,超声振幅40,总工作时间12min。超声完毕后,40000g高速离心1.5h,吸取上清液,菌体和上清液均保留少量样品以备后续蛋白电泳。上清液用于下面的纯化实验。

[0035] 实施例3:使用两次镍柱和肝素柱进行Cas12a蛋白的纯化

[0036] 纯化过程中使用了以下缓冲液:

[0037] 缓冲液A(50mM Tris-HCl,pH=8.0,20mM咪唑,300mM NaCl,0.5mM TCEP);

[0038] 缓冲液B(50mM Tris-HCl,pH=8.0,300mM咪唑,300mM NaCl,0.5mM TCEP);

[0039] 缓冲液C(20mM HEPES,0.5mM TCEP,100mM NaCl);

[0040] 缓冲液D(2M NaCl,20mM HEPES,0.5mM TCEP,pH=8);

[0041] 缓冲液E(20mM Tris-HCl,pH 7.5,200mM NaCl,10%(v/v)甘油)。

[0042] 具体的纯化步骤如下:

[0043] (1) 镍柱粗纯

[0044] 先利用蠕动泵水洗5个柱体积,再利用缓冲液A平衡HisTrap HP 5个柱体积,然后利用蠕动泵加载实施例2中获得的上清液,上样量约为100~150mL,并保留流穿以备电泳,上完样后先用缓冲液A水洗5~10个柱体积,然后将镍柱置于AKTA Pure25M(Cytiva)上继续清洗至UV 280稳定,然后开始线性洗脱,洗脱参数设置为40min缓冲液B泵达到100%,流速1.8mL/min,洗脱至基线平稳后,合并收集到蛋白峰样品,为样品1。

[0045] (2) 透析及酶切

[0046] 测试蛋白浓度,按照(8~10):100的质量比例加入烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶(自制),4℃,酶切16~24h,同时利用透析将缓冲液置换为缓冲液C,得到样品2。

[0047] 将步骤(1)的镍柱粗提过程中的流穿液、洗涤液、蛋白峰样本(样品1),以及经过TEV酶切之后的样品,通过PAGE胶电泳和考马斯亮蓝染色检测,结果如图1A所示。从图1A的结果可以看到,TEV酶切后仍然存在没有酶切完全的带有标签的Cas12a蛋白(如图1A中的箭头所示)。为了进一步纯化,除去没有酶切完全的Cas12a蛋白,进行了二次镍柱纯化。

[0048] (3) 二次镍柱纯化

[0049] 向含蛋白的缓冲液C溶液中加入咪唑,使其终浓度达到20mM,然后再上一次镍柱,收集流穿,为样品3。

[0050] 为了验证二次镍柱纯化的结果,将样品2与二次镍柱的洗脱和流穿样品,通过PAGE胶和考马斯亮蓝染色检测,结果如图1B所示。从图1B的结果可以看到,经过二次镍柱纯化后,基本上除去了没有酶切完全的蛋白,使蛋白纯度大大提高。

[0051] 但发现虽然纯度得到了提高,但是样品的紫外峰出现多峰现象,表明存在蛋白高

聚物。

[0052] (4) 肝素柱破除高聚合体

[0053] 为了消除蛋白高聚物,将流穿加载到肝素柱,然后利用缓冲液D线性洗脱,收集洗脱液,通过浓缩的方式更换缓冲液为缓冲液E,为样品4。

[0054] (5) 蛋白电泳

[0055] 将各阶段样品进行蛋白电泳。

[0056] 此过程中使用了两次镍柱纯化,并同时进行了肝素柱破除聚合体,耗时约36小时,得到约55mg的Cas12a蛋白。

[0057] (6) 蛋白高聚分析

[0058] 利用缓冲液E (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 20% (v/v) 甘油和1mM TCEP) 平衡Increase 200柱子,然后将样品3和4分别通过500 $\mu$ L样品环注入流路,利用280nm波长分析紫外吸收峰波形,检测样品是否存在蛋白高聚物,结果示于图2中。

[0059] 图2A示出了样品4的色谱峰,图2B为样品3的色谱峰。从图2可以看出,过肝素柱得到的样品4未发生沉淀和高聚,紫外吸收峰高且主峰明显,说明能够得到更高产率的高纯度单体蛋白;而未经肝素柱纯化的样品3则出现大量蛋白聚沉的现象,紫外吸收峰低且同一蛋白出现多峰,这表明未经肝素柱纯化的样品3的存在大量的蛋白高聚物。

[0060] 实施例4:使用一次镍柱加分子筛对Cas12a蛋白的纯化

[0061] 使用实施例3中的缓冲液,按照以下步骤进行纯化:

[0062] (1) 镍柱粗纯

[0063] 先利用蠕动泵水洗5个柱体积,再利用缓冲液A平衡Histrap HP 5个柱体积,然后利用蠕动泵上样,上样量约为100~150mL,并暂时保留流穿以备电泳,上完样后先用缓冲液A水洗5~10个柱体积,然后将镍柱置于AKTA Pure25M (Cytiva) 上继续清洗至UV 280稳定,然后开始线性洗脱,洗脱参数设置为40min缓冲液B泵达到100%,流速1.8mL/min,洗脱至基线平稳后,收集蛋白峰。

[0064] (2) 透析及酶切

[0065] 按照(8~10):100的比例加入烟草蚀纹病毒 (TEV) 蛋白酶 (自制), 4 $^{\circ}$ C, 酶切16~24h,同时利用透析将缓冲液置换为缓冲液C。

[0066] (3) 分子筛纯化

[0067] 利用缓冲液E (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl, 20% (v/v) 甘油和1mM TCEP) 平衡Increase 200柱子,然后将样品通过500 $\mu$ L样品环注入流路。

[0068] (4) 肝素柱破除高聚合体

[0069] 将流穿加载到肝素柱,然后利用缓冲液D线性洗脱,收集洗脱液,通过浓缩的方式更换缓冲液为缓冲液E,为样品5。

[0070] 上述纯化过程耗时约60小时,得到约36mg的Cas12a蛋白。而且,通过实施例3的结果也可以看出,分子筛纯化步骤也无法去除Cas12a蛋白的高聚物。

[0071] 实施例5.检测经纯化的Cas12a蛋白的活性

[0072] 配置终浓度为100nM Cas12a, 125nM gRNA (UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUCCUGCUUAGU GAUUUCAGA, SEQ ID NO.:2), 500nM FAM-TTATT-BHQ1探针于1 $\times$ NEB缓冲液2.1 (B7202S) 中, 37 $^{\circ}$ C 孵育60min, 并利用ABI7500记录荧光数据。

[0073] 通过上述步骤,测试了实施例3中的样品3(二次镍柱)和样品4(二次镍柱加肝素柱),实施例4中的样品5(一次镍柱加肝素柱加分子筛)的Cas12a蛋白,以及购买的Cas12a蛋白的活性,结果示于图3中。

[0074] 从图3可以看出,通过二次镍柱加肝素柱纯化获取的样品4的Cas12a蛋白活性,明显高于经两次镍柱纯化获取的样品3。这表明蛋白高聚现象对活性有巨大影响,未经过肝素柱的Cas12a蛋白由于高聚物的出现,其活性远远低于除去高聚物的Cas12a蛋白的活性。另外,经过二次镍柱加肝素柱的样品4的活性,也高于经过单次镍柱加肝素柱和分子筛纯化获取的样品5的活性。

[0075] 本发明的技术方案不限于上述具体实施例的限制,凡是根据本发明的技术方案做出的技术变形,均落入本发明的保护范围之内。



[0001] 序列表

[0002] <110> 中国科学院地球化学研究所

[0003] <120> 一种纯化Cas12a蛋白的方法

[0004] <160> 2

[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0006] <210> 1

[0007] <211> 1228

[0008] <212> PRT

[0009] <213> Homo sapiens

[0010] <400> 1

[0011] Met Ser Lys Leu Glu Lys Phe Thr Asn Cys Tyr Ser Leu Ser Lys Thr

[0012] 1 5 10 15

[0013] Leu Arg Phe Lys Ala Ile Pro Val Gly Lys Thr Gln Glu Asn Ile Asp

[0014] 20 25 30

[0015] Asn Lys Arg Leu Leu Val Glu Asp Glu Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Lys

[0016] 35 40 45

[0017] Gly Val Lys Lys Leu Leu Asp Arg Tyr Tyr Leu Ser Phe Ile Asn Asp

[0018] 50 55 60

[0019] Val Leu His Ser Ile Lys Leu Lys Asn Leu Asn Asn Tyr Ile Ser Leu

[0020] 65 70 75 80

[0021] Phe Arg Lys Lys Thr Arg Thr Glu Lys Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn

[0022] 85 90 95

[0023] Leu Glu Ile Asn Leu Arg Lys Glu Ile Ala Lys Ala Phe Lys Gly Asn

[0024] 100 105 110

[0025] Glu Gly Tyr Lys Ser Leu Phe Lys Lys Asp Ile Ile Glu Thr Ile Leu

[0026] 115 120 125

[0027] Pro Glu Phe Leu Asp Asp Lys Asp Glu Ile Ala Leu Val Asn Ser Phe

[0028] 130 135 140

[0029] Asn Gly Phe Thr Thr Ala Phe Thr Gly Phe Phe Asp Asn Arg Glu Asn

[0030] 145 150 155 160

[0031] Met Phe Ser Glu Glu Ala Lys Ser Thr Ser Ile Ala Phe Arg Cys Ile

[0032] 165 170 175

[0033] Asn Glu Asn Leu Thr Arg Tyr Ile Ser Asn Met Asp Ile Phe Glu Lys

[0034] 180 185 190

[0035] Val Asp Ala Ile Phe Asp Lys His Glu Val Gln Glu Ile Lys Glu Lys

[0036] 195 200 205

[0037] Ile Leu Asn Ser Asp Tyr Asp Val Glu Asp Phe Phe Glu Gly Glu Phe

[0038] 210 215 220

[0039]	Phe Asn Phe Val Leu Thr Gln Glu Gly Ile Asp Val Tyr Asn Ala Ile
[0040]	225 230 235 240
[0041]	Ile Gly Gly Phe Val Thr Glu Ser Gly Glu Lys Ile Lys Gly Leu Asn
[0042]	245 250 255
[0043]	Glu Tyr Ile Asn Leu Tyr Asn Gln Lys Thr Lys Gln Lys Leu Pro Lys
[0044]	260 265 270
[0045]	Phe Lys Pro Leu Tyr Lys Lys Gln Val Leu Ser Asp Arg Glu Ser Leu Ser
[0046]	275 280 285
[0047]	Phe Tyr Gly Glu Gly Tyr Thr Ser Asp Glu Glu Val Leu Glu Val Phe
[0048]	290 295 300
[0049]	Arg Asn Thr Leu Asn Lys Asn Ser Glu Ile Phe Ser Ser Ile Lys Lys
[0050]	305 310 315 320
[0051]	Leu Glu Lys Leu Phe Lys Asn Phe Asp Glu Tyr Ser Ser Ala Gly Ile
[0052]	325 330 335
[0053]	Phe Val Lys Asn Gly Pro Ala Ile Ser Thr Ile Ser Lys Asp Ile Phe
[0054]	340 345 350
[0055]	Gly Glu Trp Asn Val Ile Arg Asp Lys Trp Asn Ala Glu Tyr Asp Asp
[0056]	355 360 365
[0057]	Ile His Leu Lys Lys Lys Ala Val Val Thr Glu Lys Tyr Glu Asp Asp
[0058]	370 375 380
[0059]	Arg Arg Lys Ser Phe Lys Lys Ile Gly Ser Phe Ser Leu Glu Gln Leu
[0060]	385 390 395 400
[0061]	Gln Glu Tyr Ala Asp Ala Asp Leu Ser Val Val Glu Lys Leu Lys Glu
[0062]	405 410 415
[0063]	Ile Ile Ile Gln Lys Val Asp Glu Ile Tyr Lys Val Tyr Gly Ser Ser
[0064]	420 425 430
[0065]	Glu Lys Leu Phe Asp Ala Asp Phe Val Leu Glu Lys Ser Leu Lys Lys
[0066]	435 440 445
[0067]	Asn Asp Ala Val Val Ala Ile Met Lys Asp Leu Leu Asp Ser Val Lys
[0068]	450 455 460
[0069]	Ser Phe Glu Asn Tyr Ile Lys Ala Phe Phe Gly Glu Gly Lys Glu Thr
[0070]	465 470 475 480
[0071]	Asn Arg Asp Glu Ser Phe Tyr Gly Asp Phe Val Leu Ala Tyr Asp Ile
[0072]	485 490 495
[0073]	Leu Leu Lys Val Asp His Ile Tyr Asp Ala Ile Arg Asn Tyr Val Thr
[0074]	500 505 510
[0075]	Gln Lys Pro Tyr Ser Lys Asp Lys Phe Lys Leu Tyr Phe Gln Asn Pro
[0076]	515 520 525
[0077]	Gln Phe Met Gly Gly Trp Asp Lys Asp Lys Glu Thr Asp Tyr Arg Ala

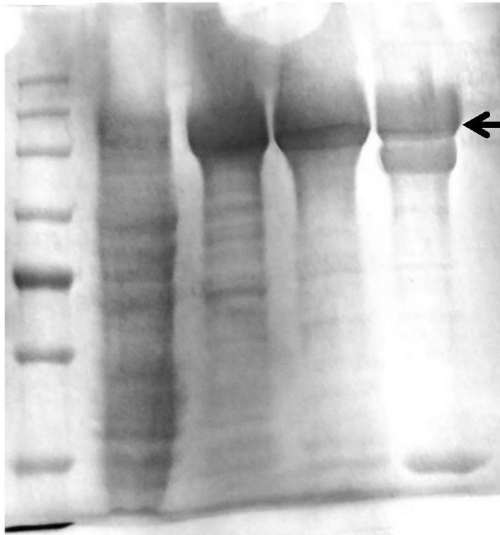
[0078]	530	535	540
[0079]	Thr Ile Leu Arg Tyr Gly Ser Lys Tyr Tyr Leu Ala Ile Met Asp Lys		
[0080]	545	550	555
[0081]	Lys Tyr Ala Lys Cys Leu Gln Lys Ile Asp Lys Asp Asp Val Asn Gly		
[0082]		565	570
[0083]	Asn Tyr Glu Lys Ile Asn Tyr Lys Leu Leu Pro Gly Pro Asn Lys Met		
[0084]		580	585
[0085]	Leu Pro Lys Val Phe Phe Ser Lys Lys Trp Met Ala Tyr Tyr Asn Pro		
[0086]		595	600
[0087]	Ser Glu Asp Ile Gln Lys Ile Tyr Lys Asn Gly Thr Phe Lys Lys Gly		
[0088]		610	615
[0089]	Asp Met Phe Asn Leu Asn Asp Cys His Lys Leu Ile Asp Phe Phe Lys		
[0090]	625	630	635
[0091]	Asp Ser Ile Ser Arg Tyr Pro Lys Trp Ser Asn Ala Tyr Asp Phe Asn		
[0092]		645	650
[0093]	Phe Ser Glu Thr Glu Lys Tyr Lys Asp Ile Ala Gly Phe Tyr Arg Glu		
[0094]		660	665
[0095]	Val Glu Glu Gln Gly Tyr Lys Val Ser Phe Glu Ser Ala Ser Lys Lys		
[0096]		675	680
[0097]	Glu Val Asp Lys Leu Val Glu Glu Gly Lys Leu Tyr Met Phe Gln Ile		
[0098]		690	695
[0099]	Tyr Asn Lys Asp Phe Ser Asp Lys Ser His Gly Thr Pro Asn Leu His		
[0100]	705	710	715
[0101]	Thr Met Tyr Phe Lys Leu Leu Phe Asp Glu Asn Asn His Gly Gln Ile		
[0102]		725	730
[0103]	Arg Leu Ser Gly Gly Ala Glu Leu Phe Met Arg Arg Ala Ser Leu Lys		
[0104]		740	745
[0105]	Lys Glu Glu Leu Val Val His Pro Ala Asn Ser Pro Ile Ala Asn Lys		
[0106]		755	760
[0107]	Asn Pro Asp Asn Pro Lys Lys Thr Thr Thr Leu Ser Tyr Asp Val Tyr		
[0108]		770	775
[0109]	Lys Asp Lys Arg Phe Ser Glu Asp Gln Tyr Glu Leu His Ile Pro Ile		
[0110]	785	790	795
[0111]	Ala Ile Asn Lys Cys Pro Lys Asn Ile Phe Lys Ile Asn Thr Glu Val		
[0112]		805	810
[0113]	Arg Val Leu Leu Lys His Asp Asp Asn Pro Tyr Val Ile Gly Ile Asp		
[0114]		820	825
[0115]	Arg Gly Glu Arg Asn Leu Leu Tyr Ile Val Val Val Asp Gly Lys Gly		
[0116]		835	840
			845

[0117]	Asn Ile Val Glu Gln Tyr Ser Leu Asn Glu Ile Ile Asn Asn Phe Asn
[0118]	850 855 860
[0119]	Gly Ile Arg Ile Lys Thr Asp Tyr His Ser Leu Leu Asp Lys Lys Glu
[0120]	865 870 875 880
[0121]	Lys Glu Arg Phe Glu Ala Arg Gln Asn Trp Thr Ser Ile Glu Asn Ile
[0122]	885 890 895
[0123]	Lys Glu Leu Lys Ala Gly Tyr Ile Ser Gln Val Val His Lys Ile Cys
[0124]	900 905 910
[0125]	Glu Leu Val Glu Lys Tyr Asp Ala Val Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asn
[0126]	915 920 925
[0127]	Ser Gly Phe Lys Asn Ser Arg Val Lys Val Glu Lys Gln Val Tyr Gln
[0128]	930 935 940
[0129]	Lys Phe Glu Lys Met Leu Ile Asp Lys Leu Asn Tyr Met Val Asp Lys
[0130]	945 950 955 960
[0131]	Lys Ser Asn Pro Cys Ala Thr Gly Gly Ala Leu Lys Gly Tyr Gln Ile
[0132]	965 970 975
[0133]	Thr Asn Lys Phe Glu Ser Phe Lys Ser Met Ser Thr Gln Asn Gly Phe
[0134]	980 985 990
[0135]	Ile Phe Tyr Ile Pro Ala Trp Leu Thr Ser Lys Ile Asp Pro Ser Thr
[0136]	995 1000 1005
[0137]	Gly Phe Val Asn Leu Leu Lys Thr Lys Tyr Thr Ser Ile Ala Asp Ser
[0138]	1010 1015 1020
[0139]	Lys Lys Phe Ile Ser Ser Phe Asp Arg Ile Met Tyr Val Pro Glu Glu
[0140]	1025 1030 1035 1040
[0141]	Asp Leu Phe Glu Phe Ala Leu Asp Tyr Lys Asn Phe Ser Arg Thr Asp
[0142]	1045 1050 1055
[0143]	Ala Asp Tyr Ile Lys Lys Trp Lys Leu Tyr Ser Tyr Gly Asn Arg Ile
[0144]	1060 1065 1070
[0145]	Arg Ile Phe Arg Asn Pro Lys Lys Asn Asn Val Phe Asp Trp Glu Glu
[0146]	1075 1080 1085
[0147]	Val Cys Leu Thr Ser Ala Tyr Lys Glu Leu Phe Asn Lys Tyr Gly Ile
[0148]	1090 1095 1100
[0149]	Asn Tyr Gln Gln Gly Asp Ile Arg Ala Leu Leu Cys Glu Gln Ser Asp
[0150]	1105 1110 1115 1120
[0151]	Lys Ala Phe Tyr Ser Ser Phe Met Ala Leu Met Ser Leu Met Leu Gln
[0152]	1125 1130 1135
[0153]	Met Arg Asn Ser Ile Thr Gly Arg Thr Asp Val Asp Phe Leu Ile Ser
[0154]	1140 1145 1150
[0155]	Pro Val Lys Asn Ser Asp Gly Ile Phe Tyr Asp Ser Arg Asn Tyr Glu

[0156]	1155	1160	1165	
[0157]	Ala Gln Glu Asn Ala Ile Leu Pro Lys Asn Ala Asp Ala Asn Gly Ala			
[0158]	1170	1175	1180	
[0159]	Tyr Asn Ile Ala Arg Lys Val Leu Trp Ala Ile Gly Gln Phe Lys Lys			
[0160]	1185	1190	1195	1200
[0161]	Ala Glu Asp Glu Lys Leu Asp Lys Val Lys Ile Ala Ile Ser Asn Lys			
[0162]	1205	1210	1215	
[0163]	Glu Trp Leu Glu Tyr Ala Gln Thr Ser Val Lys His			
[0164]	1220	1225		
[0165]	<210> 2			
[0166]	<211> 41			
[0167]	<212> DNA/RNA			
[0168]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0169]	<400> 2			
[0170]	uaauuucua	uaaguguaga	uuccugcuua	gugauuucag a

41

A.

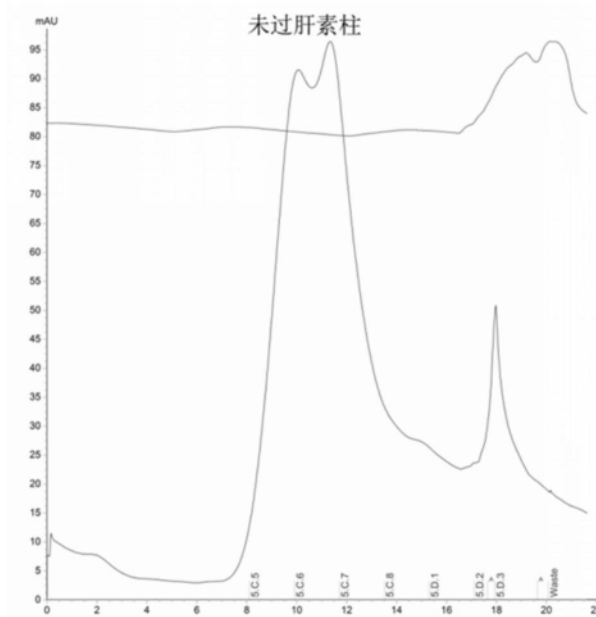


B.



图1

A.



B.

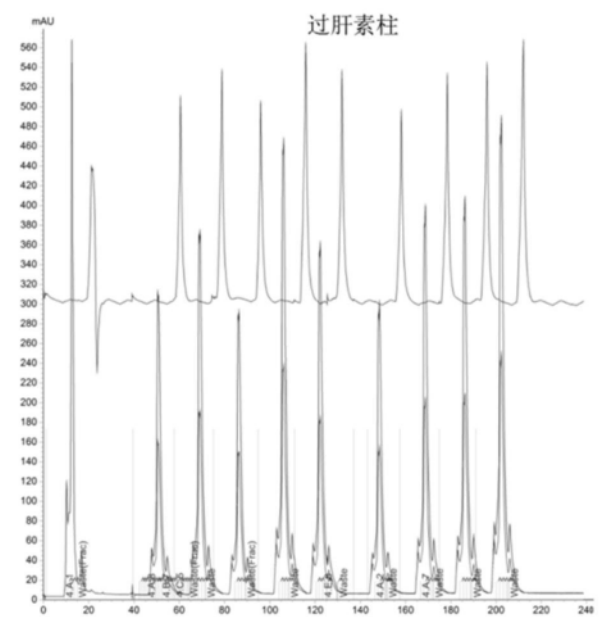


图2

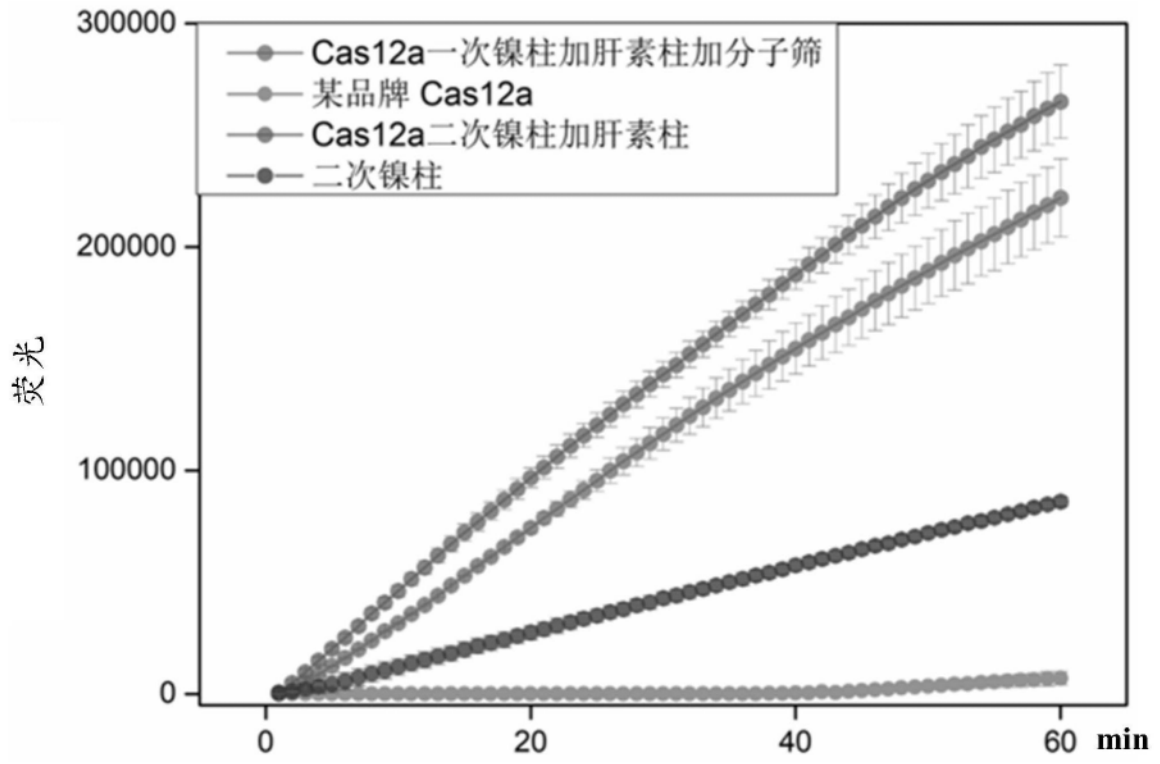


图3