



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101914557 A

(43) 申请公布日 2010. 12. 15

(21) 申请号 201010231264. X

(22) 申请日 2010. 07. 14

(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 杨福愉 赵凯 卫涛涛

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 陈长会

(51) Int. Cl.

*C12N 15/59* (2006. 01)

*C12N 15/70* (2006. 01)

*C12N 9/76* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页 序列表 1 页  
附图 6 页

(54) 发明名称

人源胰凝乳蛋白酶的表达及纯化

(57) 摘要

本发明提供一种人源胰凝乳蛋白酶的分选纯化方法,其特征在于所述人源胰凝乳蛋白酶原的激活和标签的去除在一步完成,不引入肠激酶,而是只使用胰蛋白酶,其包括以下步骤:a) 获得人源胰凝乳蛋白酶原编码序列;b) 将上述获得的人源胰凝乳蛋白酶原编码序列引入原核表达系统中,得到重组质粒;c) 将上述得到的重组质粒转化细胞质二硫化物还原系统的两个突变的宿主菌株进行人源重组胰凝乳蛋白酶原的表达纯化;d) 将上述纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶混合以激活酶原。该发明在酶原激活的同时完成了增溶标签的去除,避免了昂贵的肠激酶的使用,同时可获得几乎不含多余氨基酸的重组蛋白。生产成本的降低无疑给该工作带来了广阔的工业应用前景。本发明纯化所得的胰凝乳蛋白酶表达量高,纯度好,成本低,可以有效地用于治疗及化学领域。

1. 一种人源胰凝乳蛋白酶的分离纯化方法,其特征在于所述人源胰凝乳蛋白酶原的激活和标签的去除在一步完成,不引入肠激酶,而是只使用胰蛋白酶,其包括以下步骤:
  - a) 获得人源胰凝乳蛋白酶原编码序列;
  - b) 将上述获得的人源胰凝乳蛋白酶原编码序列引入原核表达系统中,得到重组质粒;
  - c) 将上述得到的重组质粒转化细胞质二硫化物还原系统的两个突变的宿主菌株进行人源重组胰凝乳蛋白酶原的表达纯化;
  - d) 将上述纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶混合以激活酶原。
2. 权利要求 1 所述的方法,所述方法还包括下列步骤:
  - e) 利用 SBTI-Sepharose 亲和柱纯化得到激活后的胰凝乳蛋白酶。
3. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述人源胰凝乳蛋白酶原编码序列如 SEQ ID NO: 1 所显示。
4. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述原核表达系统为促进二硫键形成的载体。
5. 权利要求 4 所述的方法,其中所述促进二硫键形成的载体为 pET32a 载体。
6. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中具有细胞质二硫化物还原系统的两个突变的宿主菌株是 *E. coli* Rosetta-gami (DE3) 菌株。
7. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中在步骤 d) 中,将纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶按照质量比 100 : 1-1000 : 1 混合。
8. 权利要求 7 所述的方法,其中纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶按照质量比 400 : 1 混合。
9. 权利要求 1-8 任一项所述的方法,其中在步骤 d) 中,将纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶混合后,在 16-37°C 反应 30-120 分钟。
10. 权利要求 9 所述的方法,其中在步骤 d) 中,将纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶混合后,在 30°C 反应 90 分钟。

## 人源胰凝乳蛋白酶的表达及纯化

### 技术领域

[0001] 本发明属于蛋白质分离纯化技术领域,具体涉及一种人源胰凝乳蛋白酶的分离纯化方法,其包括以下步骤:(a) 采用含有细胞质二硫化物还原系统两个突变的大肠杆菌 Rosetta-gami (DE3);(b) 促进二硫键形成的载体 pET-32a,得到 trx 标签融合的重组人源胰凝乳蛋白酶原蛋白和 (c) 使用胰蛋白酶激活重组的酶原,并且在激活酶原的同时将 trx 标签去除。

[0002] 该发明在酶原激活的同时完成了增溶标签的去除,避免了昂贵的肠激酶的使用,同时可获得几乎不含多余氨基酸的重组蛋白。生产成本的降低无疑给该工作带来了广阔的工业应用前景。本发明纯化所得的胰凝乳蛋白酶表达量高,纯度好,成本低,可以有效地用于治疗及化学领域。

[0003] 相关背景

[0004] 胰凝乳蛋白酶最初被发现存在于牛的胰脏中,目前已从牛的胰脏中纯化出两种无活性的酶原蛋白——胰凝乳蛋白酶原 A 和胰凝乳蛋白酶原 B;之后从猪的胰脏中又纯化出另一种酶原,胰凝乳蛋白酶原 C[1]。胰凝乳蛋白酶原 A 可通过不同的活化方式产生多种形式的有活性的酶(如  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\pi$ 、 $\delta$  等),其中  $\alpha$  为主要形式;而胰凝乳蛋白酶原 B 使用大量胰酶激活后即产生最终的活性形式胰凝乳蛋白酶  $B_{\pi}$ [2]。胰凝乳蛋白酶原 A 和 B 具有相似的沉降及扩散常数,并且具有相同的分子量。胰凝乳蛋白酶  $\alpha$  在溶液中具有单体和二聚体两种分子形式,胰凝乳蛋白酶 B 虽然在大多数 pH 也显示相似的行为,但在 pH 4 时它们只是以单体形式存在[3]。胰凝乳蛋白酶 A 和 B 虽然具有相同的分子量,但是二者具有不同的电泳迁移率。此外二者在离子交换树脂的滞留率不同,且它们对天然的胰蛋白酶抑制剂的敏感性也不同。故可通过准备方法、溶解度、电泳迁移率和等电点将二者区分。一些底物特异性研究结果显示,胰凝乳蛋白酶 B 水解酰基色氨酸酯的速率要比水解酪氨酸酯和苯丙氨酸酯的速率慢得多。

[0005] 目前定义胰凝乳蛋白酶 A 及胰凝乳蛋白酶 B 的依据就是将不同种属蛋白的氨基酸序列分别与牛的 A 型或 B 型进行全序列比对。人源胰凝乳蛋白酶与牛胰凝乳蛋白酶 A 和 B 的氨基酸序列同源性分别为 82% 和 86%。按此规则,人源胰凝乳蛋白酶被命名为胰凝乳蛋白酶 B。同理,大鼠的胰凝乳蛋白酶也属于胰凝乳蛋白酶 B(图 1、表 1)。然而根据 Hudaky 等人的研究发现,牛胰凝乳蛋白酶 B 水解色氨酸酯的速率比水解苯丙氨酸或酪氨酸酯底物的速率慢了两个数量级,而胰凝乳蛋白酶 A 水解三者具有相似的速率,这是由于 A1a226 空间位阻大于 Gly226 空间位阻造成的。因此如果按照酶反应的底物特异性规律来分类,则大鼠的胰凝乳蛋白酶仍属于 B 型,而人的胰凝乳蛋白酶则属于 A 型[4]。为了避免不同命名方法带来的混淆,克服酶与底物间特异性差异对实验可能造成的影响,进行人源胰凝乳蛋白酶的表达纯化工作是非常必要的。

[0006] 此外,人源胰凝乳蛋白酶还具有一定的药用价值。 $\beta$ -chymotrypsin 已被临床用于化痰及抗炎症药物(oral mucolytic and anti-inflammatory agent)[5-9],目前口腔复合酶治疗主要采用 Wobenzym N 和 WobeMugos 的方法,成分包括丝氨酸蛋白酶(胰酶、胰

凝乳蛋白酶)以及植物金属蛋白酶(木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶)。除此之外,胰凝乳蛋白酶还可以针剂或喷剂的形式用于创伤或手术后伤口愈合、抗炎及防止局部水肿、积血、扭伤水肿、乳房手术后浮肿、中耳炎及鼻炎等,而且可用于白内障摘除。目前为止,使用的胰凝乳蛋白酶全部来自动物胰脏,因此该药物的生产受限于可获得的牛或猪的来源。更为重要的是,部分病人在使用异种(性)胰凝乳蛋白酶后会发生过敏反应,严重的甚至会危及生命。而使用基因工程表达人源胰凝乳蛋白酶可以获得不受限制的重组蛋白,从而满足治疗需要[10]。

[0007] 表 1. 各种属胰凝乳蛋白酶与牛胰凝乳蛋白酶 A 和 B 的序列相似性比较。

[0008]		等电点 (PI)	与 Bovine A 的	与 Bovine B 的
[0009]			同源度	同源度
[0010]	Bovine A	8.26	100	79.18
[0011]	Bovine B	4.76	79.18	100
[0012]	Human B	7.19	81.63	86.12
[0013]	Rat B	4.66	75.52	84.58
[0014]	Mouse B	4.68	76.67	85.48
[0015]	Dog 2	7.27	82.57	80.42

[0016] 胰凝乳蛋白酶是丝氨酸蛋白酶家族的内肽酶,其在胰脏内以无活性的酶原形式合成,并随胰液运送至小肠后被剪切激活。人胰凝乳蛋白酶原共有 245 个氨基酸,并包含五对二硫键。其被胰蛋白酶剪切激活后成为三段肽链,并仍由两对链间二硫键连接,此外还含有三对链内二硫键。为了以正确构象表达胰凝乳蛋白酶原,必须在表达过程中形成正确的二硫键。然而,在大肠杆菌胞浆中的还原态妨碍了蛋白质中二硫键的形成,导致包涵体的形成,严重影响目标蛋白的产量和活性。

[0017] 实验证明采用包涵体变性复性的方法,只能获得银染级别的目标蛋白。显然如此少量的蛋白无论是在功能研究还是后续的抗体制备方面都是远远不能满足需求的。因此寻找一种有效的用于人胰凝乳蛋白酶原的表达纯化体系是非常重要的。

[0018] 大鼠胰凝乳蛋白酶原的表达已经在啤酒酵母中得以实现[11]。然而,使用酵母的表达体系非常耗时,在靶蛋白富集前需要针对不同培养基进行多种选择步骤,因此在开始纯化前即需要花费约九天时间,并且在纯化过程中需要多次不同的层析步骤。由于属于丝氨酸蛋白酶家族的胰凝乳蛋白酶具有自催化活性,使得在长时间的纯化过程中产物的活性和产量有很大程度的损失。为了克服长时间孵育带来的这些问题,并且得到更快速经济的表达纯化步骤,我们选择了大肠杆菌的表达系统。

## 发明内容

[0019] 发明概述:

[0020] 本发明提供下列:

[0021] 1. 一种人源胰凝乳蛋白酶的分离纯化方法,其特征在于所述人源胰凝乳蛋白酶原的激活和标签的去除在一步完成,不引入肠激酶,而是只使用胰蛋白酶,其包括以下步骤:

[0022] a) 获得人源胰凝乳蛋白酶原编码序列;

[0023] b) 将上述获得的人源胰凝乳蛋白酶原编码序列引入原核表达系统中,得到重组质

粒；

[0024] c) 将上述得到的重组质粒转化细胞质二硫化物还原系统的两个突变的宿主菌株进行人源重组胰凝乳蛋白酶原的表达纯化；

[0025] d) 将上述纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶混合以激活酶原。

[0026] 2.1 所述的方法,所述方法还包括下列步骤：

[0027] e) 利用 SBTI-Sepharose 亲和柱纯化得到激活后的胰凝乳蛋白酶。

[0028] 3.1 或 2 所述的方法,其中所述人源胰凝乳蛋白酶原编码序列如 SEQID NO :1 所显示。

[0029] 4.1 或 2 所述的方法,其中所述原核表达系统为促进二硫键形成的载体。

[0030] 5.4 所述的方法,其中所述促进二硫键形成的载体为 pET32a 载体。

[0031] 6.1 或 2 所述的方法,其中具有细胞质二硫化物还原系统的两个突变的宿主菌株是 *E. coli* Rosetta-gami (DE3) 菌株。

[0032] 7.1 或 2 所述的方法,其中在步骤 d) 中,将纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶按照质量比 100 : 1-1000 : 1 混合。

[0033] 8.7 所述的方法,其中纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶按照质量比 400 : 1 混合。

[0034] 9.1-8 任一项所述的方法,其中在步骤 d) 中,将纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶混合后,在 16-37°C 反应 30-120 分钟。

[0035] 10.9 所述的方法,其中在步骤 d) 中,将纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶混合后,在 30°C 反应 90 分钟。

[0036] 发明详述

[0037] 本发明提供一种简便经济的人源胰凝乳蛋白酶的分离纯化方法,采取了下列实施方案。

[0038] 1. 从 HEK-293 细胞中提取 RNA,并利用反转录试剂盒制备 cDNA。

[0039] 2. 以经过反转录得到所需的 cDNA 为模板,扩增人源胰凝乳蛋白酶原的 CDS 从第 19 位氨基酸至终止密码子之间的序列(即不包含前 18 个信号肽),并分别在此编码序列的 5' 端和 3' 端引入 Nco I 和 Xho I 位点。所述人源胰凝乳蛋白酶原的序列如 SEQ ID NO :1 所示。

[0040] 3. 向回收的 PCR 产物和提取的原核表达系统(优选地,促进二硫键形成的载体,更优选地 pET32a 载体),分别加入限制性核酸内切酶(优选地 Nco I 和 Xho I),回收目的片段。将回收后的两种产物进行连接,得到人源胰凝乳蛋白酶原的表达载体,在本发明一个实施方案中,所述得到的表达载体为 pET32a-chymotrypsinogen 质粒。

[0041] 在本发明的一个实施方案中,使用 pET32a 载体作为表达载体,pET32a 具有以下几个优点:(1) 该载体可以在目标蛋白的 N 端引入 trx-tag,该标签可以促进二硫键在细菌胞质中的形成,对富含二硫键蛋白的表达至关重要。(2) 该载体的组氨酸标签可以选择性地融合表达于目标蛋白的两端。如将该标签表达于目标蛋白的 N 端,之后可以通过肠激酶剪切位点将所有标签去除,得到接近天然构象的目标蛋白。

[0042] 4. 将所得表达载体,例如 pET32a-chymotrypsinogen 质粒转化细胞质二硫化物还原系统的两个突变的宿主菌株,如 *E. coli* Rosetta-gami (DE3) 菌株,收集细菌,破碎,检测

后合并蛋白含量最高的收集管内的收集液。

[0043] 5. 将纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶按照质量比 100 : 1-1000 : 1, 优选地 400 : 1 混合, 于 16-37°C, 优选地 30°C, 反应 30-120 分钟, 优选地 90 分钟, 以激活酶原。

[0044] 在一个实施方案中, 加入 TLCK 中和胰酶活性后, 利用 SBTI-Sepharose 亲和柱纯化得到激活后的胰凝乳蛋白酶。具体步骤如下: 用平衡缓冲液平衡亲和柱后, 将含有已活化的胰凝乳蛋白酶的样品上柱, 平衡缓冲液淋洗两个柱体积后, 用 1mM HCl 洗脱, 每 1ml 收集。

[0045] 本发明与现有技术相比的优势: 利用胰蛋白酶的自激活特性, 成功地去除了融合蛋白上的标签, 并同时酶原激活, 从而获得了接近天然序列的酶。该实验在酶原激活的同时完成了标签的去除, 避免了昂贵的肠激酶的使用。同时配合促进二硫键形成的载体和菌株, 得到了大量的可溶性蛋白。生产成本的降低无疑给该工作带来了广阔的工业应用前景。

### 附图说明

[0046] 图 1. 不同生物体中胰凝乳蛋白酶原的多序列比对。

[0047] 图 2. 人胰凝乳蛋白酶原的 DNA 序列。

[0048] 图 3. pET-32a-hctrb 的质粒图谱。在质粒的 trxA 标签序列后插入人胰凝乳蛋白酶原的基因编码序列, 使得表达的 trx-chymotrypsinogen 融合蛋白能形成正确的二硫键。

[0049] 图 4. 在大肠杆菌 Rosetta-gami (DE3) 中表达纯化人源胰凝乳蛋白酶原。(A) Trx-chymotrypsinogen 融合蛋白使用还原型 SDS-PAGE 进行分离后使用考马斯亮蓝进行染色。(B) 使用 anti-His 的抗体对 trx-chymotrypsinogen 融合蛋白进行免疫印迹检测。

[0050] 图 5. 人源胰凝乳蛋白酶的纯化及酶活性检测。(A) 使用 SBTI 柱纯化已激活的胰凝乳蛋白酶。向融合蛋白中加入胰蛋白酶, 按照酶:底物 (w/w) 为 1 : 400 的比率于 30°C 反应 90 分钟。反应产物上样至 SBTI 柱并使用 1mMHCl 洗脱。使用还原型 SDS-PAGE 对洗脱后的有活性的胰凝乳蛋白酶进行检测。(B) 抑制剂对胰凝乳蛋白酶剪切底物 Bid 的活性的影响。在 5 或 0.5  $\mu$ M TLCK, 1 或 0.1  $\mu$ M TPCK 存在下, 对胰凝乳蛋白酶于 37°C 预孵育 30 分钟。将 Bid 加入每一组反应体系中, 于 37°C 孵育 1 小时后终止反应。使用 SDS-PAGE 对剪切后的 Bid 蛋白进行检测。

[0051] 图 6. 胰凝乳蛋白酶激活示意图。

[0052] 图 7. 纯化后的胰凝乳蛋白酶为  $\pi$  型胰凝乳蛋白酶。(A) 使用胰蛋白酶酶解纯化的胰凝乳蛋白酶后进行肽指纹图谱检测。纯化后的 26kD 人源胰凝乳蛋白酶进行还原型 SDS-PAGE 分离后使用胰蛋白酶进行酶解, 酶解后的肽段进行 LC-MS/MS 检测。(B) 对纯化的胰凝乳蛋白酶进行蛋白 N 端测序。将洗脱产物于 15% SDS-PAGE 进行分离后转移至 PVDF 膜上, 使用考马斯亮蓝染色。切下正确的条带, 于 ABI-491 氨基酸测序仪进行检测, 得到 N 端五个氨基酸序列为 IVNGE。

[0053] 图 8.  $\pi$  型胰凝乳蛋白酶的自激活。将  $\pi$  型胰凝乳蛋白酶在 pH 3.0 (A) 或 pH 8.0 (B) 的缓冲液中, 于 37°C 孵育 1 小时。反应产物分别进行非还原或还原型 SDS-PAGE 分离。

[0054] 图 9 人胰凝乳蛋白酶原编码序列。(SEQ ID NO :1)

[0055] 具体实施方式实施例

[0056] (1) 实验材料

[0057] RNeasy RNA 提取试剂盒、Omniscript 反转录试剂盒购自 QIAGEN 公司 ;Yeast extract、Tryptone 购自 OXOID 公司 ;pET-32a、pET-22b 和 E. coli Rosetta-gami (DE3) 购自 novagen 公司 ;Random Hexamers 购自 Fermentas 公司 ;pfu DNA 聚合酶、dNTP、DNA ladder、E. coli Top10 感受态菌株、质粒小提试剂盒、核酸凝胶回收试剂盒、抗 his-tag 的单克隆抗体等购自 Tiangen 公司 ;引物合成、DNA 测序由 Invitrogen 公司完成 ;Nde I、BamH I、Nco I、Xho I 等核酸内切酶购自 TaKaRa 公司 ;T4DNA 连接酶购自 Promega 公司 ;Ni Sepharose 6 Fast Flow 柱、CNBr-activated Sepharose™ 4B 购自 GE Healthcare 公司 ;SBTI (Trypsin inhibitor from soybean)、Trypsin、TLCK (L-1-chloro-3-(4-tosylamido)-7-amino-2-heptanone)、TPCK (L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone) 购自 Sigma 公司 ;其它试剂均为国产分析纯。

## [0058] 2 实验方法

### [0059] 2.1 从 HEK-293 细胞中提取 RNA

[0060] 采用 QIAGEN RNeasy 试剂盒从细胞中提取 RNA, 实验方法参照试剂盒说明。简要步骤如下 (以下步骤如无特殊说明, 所用试剂、容器、器械等均需无 RNA 酶, 所有步骤均应在 20-25℃ 进行): 将细胞种于六孔板中, 待细胞长至融合度为 70% -80% 时, 将孔中培养基吸去, 加入适量生理盐水, 轻柔漂洗后弃去生理盐水。向六孔板中加入 350 μl RLT 溶液, 轻轻摇动至细胞完全裂解。用枪将细胞裂解物吸入 1.5ml EP 管, 向样品中加入 350 μl 170% 乙醇, 吹打混匀 (此步骤中可能产生沉淀, 但不影响实验结果)。将混合液 (包含沉淀) 吸入 RNeasy mini column 中, 于 10000g 离心 15 秒, 弃去穿柱液。向柱中加入 700 μl RW1 溶液, 于 10000g 离心 15 秒, 弃去穿柱液和收集管。将 RNeasy mini column 放入新的收集管中, 加入 500 μl RPE 溶液, 于 10000g 离心 15 秒, 弃去穿柱液。再次加入 500 μl RPE 溶液, 于 10000g 离心 2 分钟, 弃去穿柱液和收集管。将 RNeasy mini column 放入新的 1.5ml 的收集管中, 加入 50 μl 无 RNase 的水, 于 12000g 离心 1 分钟, 将穿柱液重新加入管中, 再次于 12000g 离心 1 分钟。得到的穿柱液即为 RNA, 利用 Gene Quant Pro 仪 (Amersham 公司) 测定浓度, 立即使用。

### [0061] 2.2 RT-PCR

#### [0062] 2.2.1 反转录

[0063] 用 QIAGEN Omniscript 反转录试剂盒制备 cDNA, 实验方法参照试剂盒说明。简单步骤如下 (以下步骤如无特殊说明所用试剂、容器、器械等均需无 RNA 酶): 吸取新鲜提取的 RNA 2.5 μg, 加入 5 μl 110× 反应缓冲液、5 μl dNTP (5mM each)、5 μl Random Hexamers (10 μM)、2 μl 反转录酶 (4unit/μl), 用水补齐体积至 50 μl, 轻微振荡混匀。37℃ 孵育 90min, 得到的 cDNA 于 -20℃ 保存。

#### [0064] 2.2.2 PCR

[0065] 从 HEK-293 细胞中提取的 RNA, 经过反转录得到所需的 cDNA。以其为模板, 以下面一对引物, 按照表 2 方案, 在 PTC-200 梯度热循环仪 (GMI) 上进行 PCR, 扩增人源胰凝乳蛋白酶原的 CDS 从第 19 位氨基酸至终止密码子之间的序列 (即不包含前 18 个信号肽), 并分别在此编码序列的 5' 端和 3' 端引入 Nco I 和 Xho I 位点。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物, 切下分子量为 759bp 的条带, 回收并测序 (图 2)。

[0066] Sense : 5' -CATGCCATGGGGTGC GG GTCCCCGCCATCC-3'

[0067] Nco I

[0068] Antisense :5' -CCGCTCGAGTCAGTTGGCAGCCAGGATC-3'

[0069] Xho I

[0070] 表 2 使用 HEK-293cDNA 进行 PCR 的操作步骤。

[0071]

步骤	1	2	3	4	5	6	7
温度(°C)	95	95	64	72	重复 2-4	72	4
时间(s)	300	30	60	120	步骤 35 次	600	600

[0072] 2.3 构建 pET32a-胰凝乳蛋白酶原质粒

[0073] 向回收的 PCR 产物和提取的 pET32a 质粒中分别加入 Nco I 和 Xho I 限制性核酸内切酶,37°C 保温过夜进行双酶切。用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物并回收目的片段。将回收后的两种产物按照 10 : 1 (PCR 产物 : 质粒) 的比例加入同一反应管中,加入连接酶缓冲液、T4DNA 连接酶 (TaKaRa),16°C 连接过夜,得到人源胰凝乳蛋白酶原的表达载体。

[0074] 2.4 人源重组胰凝乳蛋白酶原的表达纯化

[0075] 将所得 pET32a-chymotrypsinogen 质粒转化 E. coli Rosetta-gami (DE3) 菌株,挑取单克隆于 37°C 扩大培养至 OD 为 0.6 左右,用 1mM IPTG 于 16°C 诱导过夜,收集细菌。将细菌重悬于 1/10 菌液体积的重悬缓冲液中 (20mM Tris-HCl, pH 8.0 ;0.5M NaCl ;20mM 咪唑 ;1mM PMSF),超声破碎细菌 (6s,6s,300W,300 次)。于 4°C,20000g 离心 30 分钟收集上清。用平衡缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH 8.0 ;0.5M NaCl ;20mM 咪唑) 平衡 Ni Sepharose 6Fast Flow (GE) 柱后,将之前得到的上清上样后,用平衡缓冲液淋洗。最后用洗脱缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH 8.0 ;0.5M NaCl ;500mM 咪唑) 洗脱,每 1ml 收集。15% SDS-PAGE 检测后合并蛋白含量最高的收集管内的收集液。

[0076] 2.5 SBT I-Sepharose 亲和柱的偶联

[0077] 称取 1g 冻干的 CNBr 激活的 Sepharose 4B (GE),用 1mM HCl 悬浮,使其膨胀。将膨胀的基质倒入层析柱中,用大约 200ml 1mM HCl 分多次淋洗,将其中的添加剂完全去除。将 35mg SBTI (Sigma) 溶于 5ml 偶联缓冲液 (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3 ;0.5M NaCl) 中。将膨胀好的 CNBr 激活的 Sepharose 4B 与 SBTI 溶液混合后颠倒摇晃,4°C 过夜偶联。将偶联好的基质倒入层析柱,用偶联缓冲液至少洗 5 个柱体积以除去过量的游离态 SBTI。向基质中加入 0.1M Tris-HCl, pH 8.0 室温摇晃 2 小时,以屏蔽剩余的活性基团。用 buffer A (0.1M 乙酸 / 乙酸钠, pH 4.0 ;0.5M NaCl)、buffer B (0.1M Tris-HCl, pH 8.0 ;0.5M NaCl) 反复淋洗基质至少 3 遍,每遍至少 5 个柱体积。将偶联好的基质装柱备用。

[0078] 2.6 酶原的激活以及有活性的胰凝乳蛋白酶的纯化

[0079] 将纯化的胰凝乳蛋白酶原与胰蛋白酶按照质量比 400 : 1 混合,于 30°C 水浴孵育 90 分钟激活酶原。加入 TLCK (终浓度 100 μM) 中和胰酶活性后,利用 SBTI-Sepharose 亲和柱纯化得到激活后的胰凝乳蛋白酶。具体步骤如下 :用平衡缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH 8.0 ;0.25M NaCl) 平衡亲和柱后,将含有已活化的胰凝乳蛋白酶的样品上柱,平衡缓冲液淋洗两个柱体积后,用 1mM HCl 洗脱,每 1ml 收集。

[0080] 2.7 π-chymotrypsin 的自激活



[0081] 将纯化的胰凝乳蛋白酶置换至 20mM Tris-HCl, pH 8.0 的缓冲液中,于 37°C 孵育 1h。马上使用。

[0082] 2.8 肽指纹图谱鉴定

[0083] 将盐酸洗脱的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,用考马斯亮蓝染色。将目标蛋白条带从胶上切下,切成 1mm<sup>3</sup> 的小块,利用脱色缓冲液 (50% 甲醇 ;25mM 碳酸氢铵, pH 8.0) 脱色。用洗胶缓冲液 (50% 甲醇,10% 乙酸) 洗涤胶块,然后用 HPLC 级的水洗涤胶块。将胶块转移至 0.5ml 的 EP 管中,加入乙腈真空干燥脱水。利用含有测序级别的胰酶 (10ng/ $\mu$ l) 的碳酸氢铵将干燥的胶块再水合,在 37°C 酶解 18 小时。利用抽提缓冲液 1 (50% 乙腈,5% 三氟乙酸) 和抽提缓冲液 2 (75% 乙腈,0.1% 三氟乙酸) 先后两次抽提酶解得到的肽段,合并两次抽提得到的上清,将上清真空干燥,并于 -20°C 保存。利用线性串联的纳米级 C18 反相柱和离子阱型质谱仪对样品进行液质联用分析。

[0084] 2.9N- 末端氨基酸序列分析

[0085] 人源胰凝乳蛋白酶 (20mM Tris-HCl, pH 8.0) 经 15% SDS-PAGE 后,通过电转移技术,转移至固相载体 - 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidenedifluoride membrane, PVDF) 膜上。用考马斯亮蓝染膜 2 分钟后用 50% 的甲醇脱色。将含有 26kD 蛋白片段的膜切下,于 ABI-491A 蛋白测序仪 (Applied Biosystems) 上检测该胰凝乳蛋白酶片段末端的氨基酸组成。

[0086] 2.10 抑制剂对胰凝乳蛋白酶活性的影响

[0087] 检测胰蛋白酶特异性抑制剂 TLCK、胰凝乳蛋白酶特异性抑制剂 TPCK 对纯化的胰凝乳蛋白酶活性的抑制作用。采用的蛋白酶抑制剂终浓度分别为 :TLCK (5  $\mu$  M, 0.5  $\mu$  M) ; TPCK (1  $\mu$  M, 0.1  $\mu$  M)。取一定量胰凝乳蛋白酶分别加入两种蛋白酶抑制剂在 37°C 孵育 30 分钟,然后加入 10  $\mu$  g Bid (终体积 20  $\mu$  l) 混合均匀,于 37°C 反应 1 小时。利用 15% 的 SDS-PAGE 检测胰凝乳蛋白酶对 Bid 的剪切情况。

[0088] 3 实验结果

[0089] 3.1 人源胰凝乳蛋白酶原表达载体的构建

[0090] 按照表 2 条件进行 PCR,得到一条特异的分子量正确的明亮条带。将此条带进行测序 (图 2),结果显示此条带的序列与人的胰凝乳蛋白酶原的序列完全吻合。将此片段连入 pET32a 中,即获得了人源胰凝乳蛋白酶原的表达载体。

[0091] 3.2 人源胰凝乳蛋白酶原的表达

[0092] 我们在表达过程中选用了 Rosetta-gami (DE3) 这种 trxB/gor 双突变的表达宿主菌,该菌具有细胞质二硫化物还原系统的两个突变,可以增加 E. coli 细胞质中二硫键的形成。同时为了进一步增加蛋白可溶性,我们使用 pET32a 载体进行表达。pET32a 具有以下几个优点:(1) 该载体可以在目标蛋白的 N 端引入 trxB-tag,该标签可以进一步促进二硫键在细菌胞质中的形成,对富含二硫键蛋白的表达至关重要。(2) 该载体的组氨酸标签可以选择性地融合表达于目标蛋白的两端。如将该标签表达于目标蛋白的 N 端,之后可以通过肠激酶剪切位点将所有标签去除,得到接近天然构象的目标蛋白。在构建了 pET32a-chymotrypsinogen 的表达载体之后 (图 3),按照前述实验方法,我们成功纯化出了大量可溶性的人源胰凝乳蛋白酶原 (图 4)。

[0093] 3.3 胰凝乳蛋白酶原的激活

[0094] 人胰凝乳蛋白酶原的理论分子量为 26kD,而表达的酶原由于含有三个标签,分子量为 43kD 左右。在酶原被激活之前,理论上需要用肠激酶将位于融合蛋白 N 端的 trx-tag、His-tag、S-tag 三个标签除去,以得到接近天然序列的胰凝乳蛋白酶原,从而用于后续有活性的酶的制备。然而由于肠激酶价格及其昂贵,要完全切割纯化得到的融合酶原需较大用量,这样无疑会给实验室纯化增加成本,而且不适用于大规模的工业生产。因此我们对该融合酶原的活化进行了研究。通过序列比对发现,载体上肠激酶的识别位点 DDDDK 同样存在于胰蛋白酶的前肽 (propeptide) 上。胰蛋白酶同样也是由胰腺腺细胞以酶原形式分泌,之后在小肠中被肠激酶激活,进而可活化胰凝乳蛋白酶。激活后的胰酶可进一步自激活,自激活的剪切位点同样位于 DDDDK 后面的肽键。因此我们思考是否可首先利用胰酶自激活的特性,直接向 43kD 的含有标签的融合酶原中加入一定量的胰酶,使其在肠激酶位点后对该融合酶原进行剪切从而将标签去除,得到接近天然序列的胰凝乳蛋白酶原,然后再利用胰酶可激活胰凝乳蛋白酶原而不是非特异性将其降解的特性,进一步得到有活性的胰凝乳蛋白酶? 在该实验中,胰酶用量有严格要求。幸运的是,按照实验方法 2.6 中提到的激活及纯化方式,发现用文中所述用量的胰蛋白酶激活胰凝乳蛋白酶原的同时,也可以将融合蛋白 N 端的标签完全去除,得到分子量为 26kD 的目标蛋白 (图 5A)。

[0095] 此外采用 SBTI-Sepharose 作为亲和层析介质,只能结合那些被激活的、有活性的且正确折叠的人源胰凝乳蛋白酶,而那些折叠错误或被错误激活的重组蛋白则被从纯化产物中去除,因此可进一步提高该方法的纯化效率。

#### [0096] 3.4 激活后得到 $\pi$ -chymotrypsin

[0097] 从前面的实验结果可见,通过还原型 SDS-PAGE,可得到分子量为 26kD 的单一一条带。然而根据经典的激活理论 (图 6),有活性的胰凝乳蛋白酶应由三条肽链组成,它们之间靠二硫键连接,在进行还原型 SDS-PAGE 时,应该得到三条电泳条带 (其中一条由于分子量只有不到 2kD,因此不易检测)。这与我们的实验结果不符,造成这种差异的原因究竟是什么呢? 纯化产物可对底物 Bid 进行剪切,证明我们得到的胰凝乳蛋白酶确实是有活性的,且该活性可被胰凝乳蛋白酶的特异性抑制剂 TPCK 所抑制 (图 5B),因此我们猜测激活得到的酶为  $\pi$ -chymotrypsin。胰凝乳蛋白酶原经胰酶激活后首先形成  $\pi$ -chymotrypsin,剪切后的前肽仍然通过二硫键连接到有活性的酶上。经还原型 SDS-PAGE 后理论上形成两条肽链,但由于前肽较小而不易检测。将还原型 SDS-PAGE 得到的单一一条带进行 LC-MS/MS 质谱检测及 N 端蛋白测序 (图 7),结果验证了我们的猜测。在肽指纹图谱中,我们没有看到覆盖前肽部分的肽段,而 N 端测序结果显示的正是从 34 位开始的五个氨基酸序列。实验中得到的  $\pi$ -chymotrypsin 没有被继续自激活形成  $\alpha$ -chymotrypsin,是因为我们控制激活条件的结果。有活性的  $\pi$ -chymotrypsin 洗脱后保存在 1mM HCl 中,低 pH 可抑制 chymotrypsin 的自激活,因为在此 pH 时催化三联体中的 His75 被质子化导致 chymotrypsin 失活 [12]。

[0098] 如将得到的  $\pi$ -chymotrypsin 置于 pH 8.0 的缓冲液中孵育一段时间,可以看到其被自激活成为  $\alpha$ -chymotrypsin。如图 8A 所示,+/-DTT 的  $\pi$ -chymotrypsin 样品分子量有少许差别,可能是由于前肽分子量造成的差异,也可能是由于还原剂对蛋白构象造成的差异在 SDS-PAGE 上的体现。而对于含有 DTT 的自激活样品 (图 8B),可以看到其包含 26kD、14kD 和 11kD 三条电泳条带。其中 26kD 是没有被自激活的  $\pi$ -chymotrypsin,而 14kD 和 11kD 分别对应  $\alpha$ -chymotrypsin 的 B 链及 C 链。对于不含有 DTT 的自激活样品,只能在

26kD 看到两条分子量接近的蛋白条带,分别对应  $\pi$ -chymotrypsin 和  $\alpha$ -chymotrypsin。

[0099] 由于  $\pi$ -chymotrypsin 自激活成为  $\alpha$ -chymotrypsin 后,会进一步发生自降解,造成酶活性及含量降低,因此在本实验中纯化的蛋白通常以  $\pi$ -chymotrypsin 的形式保存于 HCl 中,使用前根据需要进行自激活。

[0100] 4 小结

[0101] 本发明通过 RT-PCR 从 HEK-293 细胞 cDNA 中获得全长人源胰凝乳蛋白酶原基因,并构建了其表达载体。通过与 pET32a 的 trx-tag 形成融合蛋白,并配合使用含有细胞质二硫化物还原系统两个突变的菌株 Rosetta-gami (DE3),得到了毫克级的人源胰凝乳蛋白酶原可溶性蛋白。之后巧妙地利用胰蛋白酶的自激活特性,成功地去除了融合蛋白上的标签,并同时酶原激活,从而获得了接近天然序列的酶。该实验在酶原激活的同时完成了标签的去除,避免了昂贵的肠激酶的使用。生产成本的降低无疑给该工作带来了广阔的工业应用前景。

[0102] 1. Folk JE, Schirmer EW(1965)Chymotrypsin C. I. Isolation of the Zymogen and the Active Enzyme :Preliminary Structure and Specificity Studies. J Biol Chem 240 :181-192

[0103] 2. Appel W(1986)Chymotrypsin :molecular and catalytic properties. Clin Biochem 19 :317-322

[0104] 3. Smith EL, Brown DM, Laskowski M(1951)Molecular weights of chymotrypsinogen and chymotrypsin alpha and B. J Biol Chem 191 :639-650

[0105] 4. Hudaky P, Kaslik G, Venekei I, Graf L(1999)The differential specificity of chymotrypsin A and B is determined by amino acid 226. Eur J Biochem 259 :528-533

[0106] 5. Avakian S(1964)Further Studies on the Absorption of Chymotrypsin. Clin Pharmacol Ther 5 :712-715

[0107] 6. Brakenbury PH, Kotowski J(1983)A comparative study of the management of ankle sprains. Br J Clin Pract 37 :181-185

[0108] 7. Glozman VG, Anchupane IS(1982)[Use of chymotrypsin in inflammatory diseases of the scrotal organs]. Urol Nefrol (Mosk) :44-46

[0109] 8. Kobayashi T, Ozone H, Kamei H, Ishimaru K(1984)[Chymoral for inflammatory diseases in the orodental area]. Shikai Tenbo 64 :813-818

[0110] 9. Roberts AD, Hart DM(1983)Polyglycolic acid and catgut sutures, with and without oral proteolytic enzymes, in the healing of episiotomies. Br J Obstet Gynaecol 90 :650-653

[0111] 10. Curvers S, Brixius P, Klauser T, Thommes J, Weuster-Botz D, Takors R, Wandrey C(2001)Human chymotrypsinogen B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation. Biotechnol Prog 17 :495-502

[0112] 11. Venekei I, Graf L, Rutter WJ(1996)Expression of rat chymotrypsinogen in yeast :a study on the structural and functional significance of the

---

chymotrypsinogen propeptide. FEBS Lett 379 :139-142

[0113] 12. Hess GP, McConn J, Ku E, McConkey G(1970)Studies of the activity of chymotrypsin. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 257 :89-104

[0001]

IB101821

## 序列表

&lt;110&gt; 中国科学院生物物理研究所

&lt;120&gt; 人源胰凝乳蛋白酶的表达及纯化

&lt;130&gt; IB101821

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人

&lt;400&gt; 1

```

tgcgggtcc ccgcatcca cctgtgctc agcggcctgt ccaggatcgt gaatggggag      60
gacgccgtcc ccggctcctg gccctggcag gtgtccctgc aggacaaaac cggtctccac      120
ttctgcgggg gctccctcat cagcaggac tgggtggtca ccgctgccca ctgcggggtc      180
aggacctcgg acgtggctgt ggctggggag ttgaccagg gctctgacga ggagaacatc      240
caggtcctga agatcgccaa ggtcttcaag aacccaagt tcagattct gaccgtgaac      300
aatgacatca ccctgctgaa gtggccaca cctgccctgt tctccagac agtgtccgcc      360
gtgtgcctgc ccagcgcga cgacgactc cccgcgggga cactgtgtgc caccacaggc      420
tggggcaaga ccaagtaca cgccaacaag acccctgaca agtgcagca ggcagccctg      480
cccctcctgt ccaatgccga atgcaagaag tcttggggca ggaggatcac cgacgtgatg      540
atctgtgccg gggccagtgg cgtctctcc tgcattggcg actctggcgg tccctggtc      600
tgccaaaagg atggagcctg gaccctggtg ggcatttgt cctggggcag cgacacctgc      660
tccacctcca gccctggcgt gtaagccctg gtcaccaagc tcataccttg ggtgcagaag      720
atcctggtg ccaactga

```

bovine A	CGVPAICPVLSGLSRIVNGEEAVPGSWPQVSLQDKTGFHFCCGSLINENWVVTAAHCGVITSDVWVAGEFDCCSSSEKICK	82
bovine B	CGVPAICPVLSGLARIVNGEEAVPGSWPQVSLQDSTGFHFCCGSLISEDWVVTAAHCGVITSDVWVAGEFDCCLETFDTICV	82
human B	CGVPAICPVLSGLSRIVNGEEAVPGSWPQVSLQDKTGFHFCCGSLISEDWVVTAAHCGVITSDVWVAGEFDCCSDEENICV	82
rat B	CGVPTICPVLTGLSRIVNGEEAVPGSWPQVSLQDKTGFHFCCGSLISEDWVVTAAHCGVITSDVWVAGEFDCCSDEENICV	82
mouse B	CGVPAICPVLTGLSRIVNGEEAVPGSWPQVSLQDRTGFHFCCGSLISEDWVVTAAHCGVITSDVWVAGEFDCCSDEENICV	82
dog 2	CGVPAICPVLSGLSRIVNGEEAVPGSWPQVSLQDSTGFHFCCGSLISEDWVVTAAHCGVITSDVWVAGEFDCCSDAESTICV	82
Consensus	cgvp i pvl gl rivnge a pgswpqvslqd tgfhfccgsl i e wvvt aahcgv t vvagefdqg e q	
bovine A	LKIAKVFKNSEYNSTIINNDITLLKLTAAFSCTVSAVCLPSASDFEAAGTTCVTTGWCLTRYTNANTEPDLQCAALHLLS	164
bovine B	LKIGKVFKNPKRESILIVRNDITLLKLTAEACFSETVSAVCLPSADEDFPACMLCATTGWCKTKYNALKTEPKLQCAALHIVS	164
human B	LKIAKVFKNPKRESILIVNNDITLLKLTAEAREFCTVSAVCLPSADDFEPACTLCATTGWCKTKYNANKTEPKLQCAALHLLS	164
rat B	LKIAQVFKNPKENMFTIVRNDITLLKLTAEACFSETVSAVCLPNVDDDFEPCITVCAITGWCKTKYNALKTEPKLQCAALHIVS	164
mouse B	LKIAQVFKNPKENSFTIVRNDITLLKLTAEACFSETVSAVCLPTVDDDFEPACTLCATTGWCKTKYNALKTEPKLQCAALHIVS	164
dog 2	LKIAKVFKNPKENMFTIINNDITLLKLTAEAREFCTVSAVCLPEATDFEPACTLCVTTGWCLTKHTNANTEPKLQCAALHLLS	164
Consensus	lki vfk n k t nditllkl t a fs tvsavclp df g c ttgw g t tp lqqa lp s	
bovine A	NTNCKRYWGTKIKDAMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCKKNCANTLVGIVSWGSSSTCSTSEGGVYARVTAIVNWVQQTIAA	244
bovine B	NTDCRKYWGSRVTDVMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCKKNCANTLVGIVSWGSSSTCSTSEAVYARVTAIVMPVWQETIAA	244
human B	NAECKKSWGRRITDVMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCKKDCANTLVGIVSWGSDTCSTSEGGVYARVTKLIPVWQKTLAA	244
rat B	EADCKKSWGSKITDVMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCKKDCVWTLVAGIVSWGSGVCSTSEAVYARVTAIVMPVWQQTIEA	244
mouse B	EAKCKESWGSKITDVMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCKKDCVWTLVAGIVSWGSGFCSTSEAVYARVTAIVMPVWQETIEA	244
dog 2	NAECKKFWGSKITDVMICAGASGVSSCMGDSGGPLVCKKDCANTLVGIVSWGSGTCSTSEGGVYARVTKLIPVWQQTICAA	244
Consensus	c wg d m cagasgvsscmgdsggplvc k g wtl givswgs cstsp vy rvt l wvq l a	

图 1.



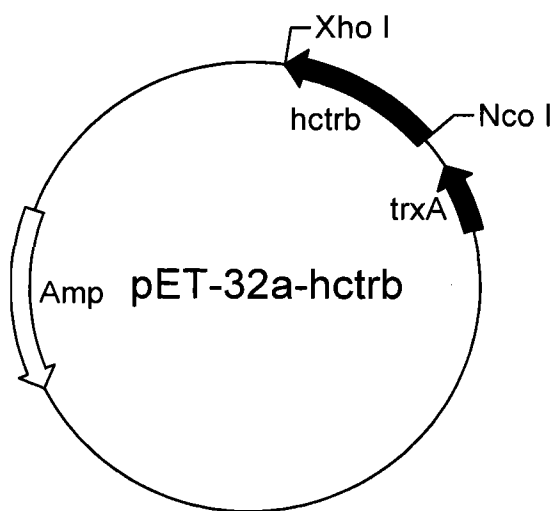
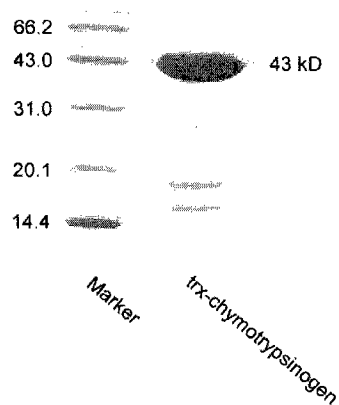


图 3.

(A)



(B)

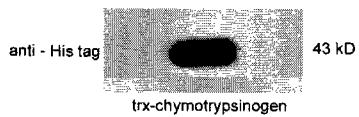
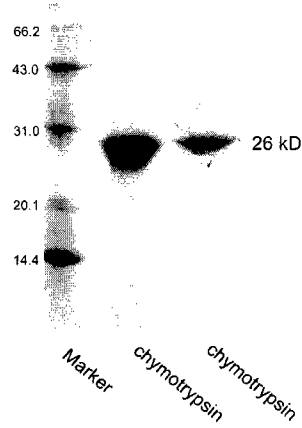


图 4.



(A)



(B)

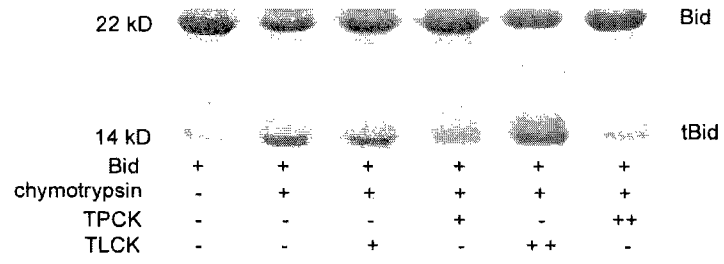


图 5.

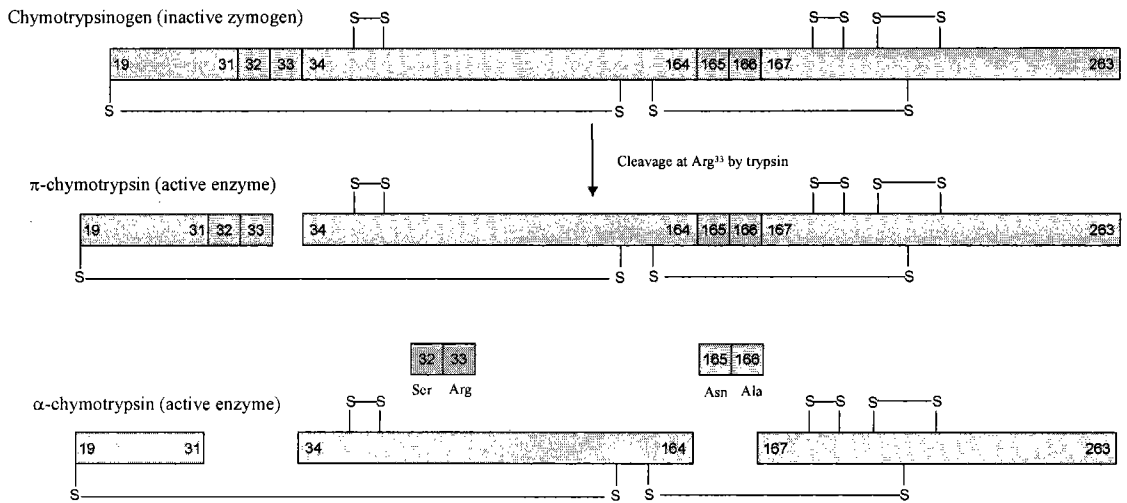


图 6.

(A)

gi|117617 Mass: 28479 Score: 127 Expect: 3.9e-08 Queries matched: 10  
 Chymotrypsinogen B precursor [Contains: Chymotrypsin B chain A; Chymotrypsin B chain B; Chymotrypsin B chain C]  
 gi|118496341 Mass: 28322 Score: 127 Expect: 3.9e-08 Queries matched: 10  
 chymotrypsinogen B1 [Homo sapiens]

Matched peptides shown in Bold Red

1 MASLWLLSCF SLVGAAF~~GC~~G VPAIHPVL~~SG~~ LSRIVNGEDA VPGSWPWQVS  
 51 LQDKTGFHFC GGSLISEDWV V~~TAAHCGVRT~~ SDVVVAGEFD QGSDEENIQV  
 101 LKIAKVFKNP KFSILTVNND ITLLKLATPA RFSQTVS~~AVC~~ LPSADDDFPA  
 151 GTLCATTGWG KTKYNANKTP DKLQQAALPL LSNAECKKSW GRRITDVMIC  
 201 AGASGVSSCM GDSGGPLVCQ KDGAWTLVGI VSWGSDTCST SSPGVYARVT  
 251 KLIPWVQKIL AAN

(B)

$\pi$ -chymotrypsin (active enzyme)

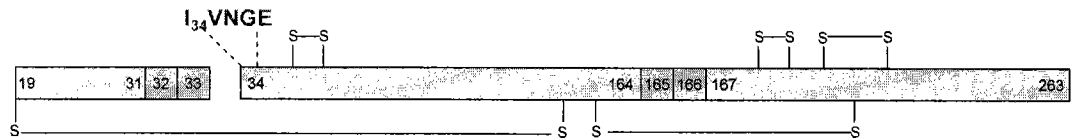


图 7.

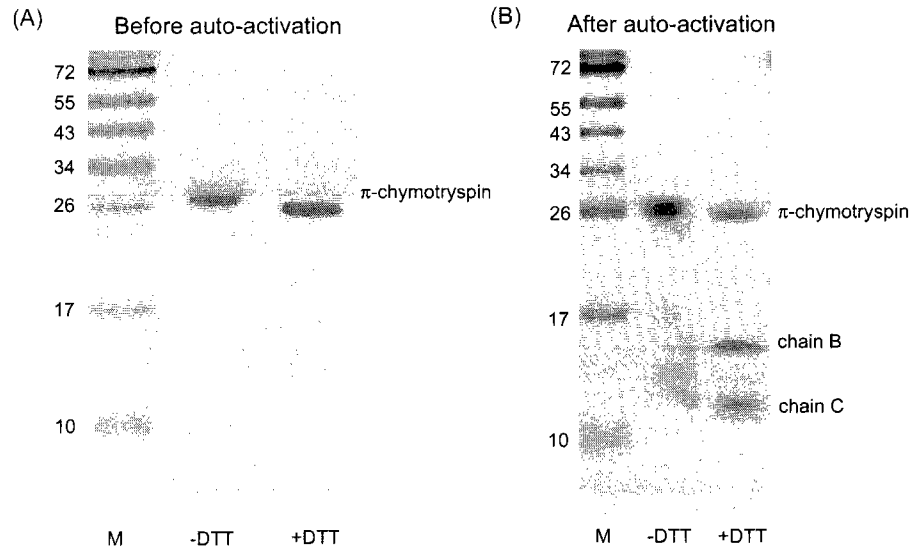


图 8.

TGCGGGGTCCCCGCCATCCACCCTGTGCTCAGCGGCCTGTCCAG  
GATCGTGAATGGGGAGGACGCCGTCCCCGGCTCCTGGCCCTGGCAG  
GTGTCCCTGCAGGACAAAACCGGCTTCCACTTCTGCGGGGGTCCC  
TCATCAGCGAGGACTGGGTGGTCACCGCTGCCACTGCGGGGGTCAG  
GACCTCCGACGTGGTCGTGGCTGGGGAGTTTGACCAGGGCTCTGAC  
GAGGAGAACATCCAGGTCCTGAAGATCGCCAAGGTCTTCAAGAACC  
CCAAGTTCAGCATTCTGACCGTGAACAATGACATCACCTGCTGAAG  
CTGGCCACACCTGCCCGCTTCTCCAGACAGTGTCCGCCGTGTGCCT  
GCCAGCGCCGACGACGACTTCCCCGCGGGGACACTGTGTGCCACC  
ACAGGCTGGGGCAAGACCAAGTACAACGCCAACAAGACCCCTGAC  
AAGCTGCAGCAGGCAGCCCTGCCCTCCTGTCCAATGCCGAATGCA  
AGAAGTCCTGGGGCAGGAGGATCACCGACGTGATGATCTGTGCCGG  
GGCCAGTGGCGTCTCCTCCTGCATGGGCGACTCTGGCGGTCCCCTGG  
TCTGCCAAAAGGATGGAGCCTGGACCCTGGTGGGCATTGTGTCCTG  
GGGCAGCGACACCTGCTCCACCTCCAGCCCTGGCGTGTACGCCCGT  
GTCACCAAGCTCATACCTTGGGTGCAGAAGATCCTGGCTGCCAACTG  
A

图 9