



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109852666 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201910044299.3

(22)申请日 2019.01.17

(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 阎锡蕴 江冰 范克龙

(74)专利代理机构 北京市诚辉律师事务所
11430

代理人 唐宁

(51)Int.Cl.

C12Q 1/28(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

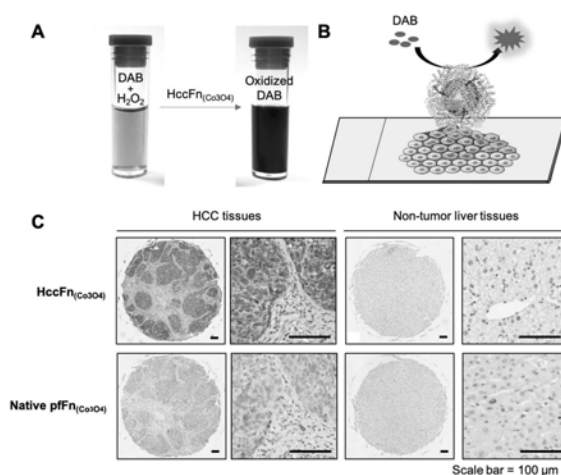
权利要求书1页 说明书5页
序列表4页 附图5页

(54)发明名称

一种用于肝癌诊断的特异性靶点及诊断试剂

(57)摘要

本发明涉及一种用于肝癌诊断的特异性靶点及诊断试剂,所述的特异性靶点为GRP78蛋白,所述的诊断试剂为:装载了具有过氧化物酶催化活性的物质,且表面融合了所述靶向多肽SP94的纳米颗粒,所述的纳米颗粒是铁蛋白颗粒。



1. 一种可用于肿瘤诊断的特异性分子靶标,其特征在于,所述的分子靶标为GRP78蛋白,优选的,所述的肿瘤是肝癌,所述的GRP78蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

2. 标记权利要求1所述的特异性分子靶标的靶向多肽SP94,所述的靶向多肽SP94多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 一种能够同辣根过氧化物酶的底物反应并显色的肿瘤诊断试剂,其特征在于,所述的诊断试剂为:

装载了具有过氧化物酶催化活性的物质,且表面融合了所述靶向多肽SP94的纳米颗粒,所述的纳米颗粒是铁蛋白颗粒,优选的,所述的肿瘤是肝癌。

4. 根据权利要求3所述的所述的肿瘤诊断试剂,其特征在于,铁蛋白颗粒优选为人重链铁蛋白24聚体颗粒或激烈火球菌铁蛋白24聚体颗粒,最优选的,所述的铁蛋白颗粒为激烈火球菌铁蛋白24聚体颗粒。

5. 根据权利要求3或4所述的肿瘤诊断试剂,其特征在于,所述的靶向多肽SP94通过连接序列与纳米颗粒的蛋白连接成融合蛋白,优选的,所述的连接序列如SEQ ID NO.3所示。

6. 根据权利要求4所述的肿瘤诊断试剂,其特征在于,所述激烈火球菌铁蛋白的氨基酸序列如SEQ IDNO.2所示。

7. 根据权利要求3或4所述的肿瘤诊断试剂,其特征在于,所述的具有过氧化物酶催化活性物质为金属氧化物,优选的,所述的具有过氧化物酶催化活性物质为金属氧化物,更优选的,所述的具有过氧化物酶催化活性物质是 Fe_3O_4 或 Co_3O_4 ,最优选的,所述的具有过氧化物酶催化活性物质是 Co_3O_4 。

8. 权利要求1-7任一所述的分子靶标、靶向多肽或诊断试剂在制备用于诊断肝癌或判断肝癌分化程度和肿瘤侵袭程度的诊断试剂盒中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述的诊断试剂盒的检测样本为穿刺活组织标本、术后病理切片、尸体剖检组织或机体循环系统中的脱落细胞、组织溶解细胞或体外培养细胞。

一种用于肝癌诊断的特异性靶点及诊断试剂

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体而言,涉及一种用于肝癌诊断的特异性靶点及诊断试剂。

背景技术

[0002] 肝癌已经成为日益常见且严重威胁人类生命和生活质量的主要疾病之一。肝癌的诊断是当前肿瘤研究人员最关心的课题和遇到的难题。

[0003] 病理切片检查最准确、可靠,是国内外公认的肿瘤诊断的“金标准”(Shi, et al., (2008) Am. J. Clin. Pathol., 129:358-366; Taylor et al. (2006) Biotech Histochem., 81: 3-12.; Larsson, et al., (1988) Immunocytochemistry: Theory and Practice. Boca Raton, FL: CRC Press 41-73)。目前,病理切片的主要染色方法有苏木精-伊红染色(HE)、免疫组化、免疫荧光。HE染色主要通过苏木精使细胞核内的染色质着紫蓝色,通用伊红使细胞质和细胞外基质中的成分着红色,以此提供细胞形态学的信息,病理医生根据这些细胞形态学的改变,粗略的鉴定组织细胞的癌变,该染色方法操作方便、快速,但是仅能够提供组织形态学的变化,信息量少,对于较为复杂、多型性的肿瘤,就不能作出正确的判断。免疫组化或免疫荧光利用一抗与被检测组织抗原结合,荧光信号分子或酶标记的二抗、三抗与一抗结合,然后通过荧光信号或酶底物反应显色,提供所要检测抗原的定位和半定量信息,进而鉴定组织细胞的癌变、坏死、炎性细胞浸润等病理改变。免疫组化或免疫荧光能够提供某特定抗原的分布、含量及细胞形态学的详细信息,对病理学的深入研究十分有意义,但是免疫染色需要一抗、二抗甚至三抗的多步孵育, PBS反复重洗,及酶或是荧光分子的标记,步骤复杂,操作时间长。因此,有必要研究简单、快速且能够提供丰富信息量的癌组织、癌细胞检测试剂和方法,以提高临床病理诊断效率,为病人的治疗赢得时间。

[0004] 我们课题组于2007年首次发现氧化铁纳米颗粒具有类似过氧化物酶的催化活性,即在过氧化氢存在下,氧化铁纳米颗粒能够与DAB, TMB等辣根过氧化物酶的底物反应,生成与过氧化物酶相同的反应产物,从而产生与过氧化物酶相类似的催化作用。基于这一发现我们提出了纳米酶的概念(Gao L, Zhuang J, Yan X, et al., (2007) Nature Nanotech., 2: 577-583; 中国专利200610057413.9)。并且我们将四氧化三铁纳米酶仿生合成在人重链铁蛋白内腔中,发展了针对靶点TFR1(转铁蛋白受体1)的肿瘤诊断新试剂M-HFn(Fan K, et al., (2012) Nature Nanotech., 7(7): 459-464)。

[0005] 激烈火球菌铁蛋白是由24个亚基构成了内径为8nm,外径为12nm的蛋白壳。激烈火球菌铁蛋白具有极佳的热稳定性,非常适合长期储存和适应外部条件变化,作为诊断试剂具有天然优势。从纳米材料的角度看,这个天然的蛋白壳,内部空间可以填充药物、荧光小分子。可以利用激烈火球菌铁蛋白亚基的催化氧化作用向蛋白壳空腔内部装载金属离子,从而形成由蛋白壳包裹的、粒径均一的,金属氧化物纳米颗粒。而蛋白壳外可以利用基因工程的手段,融合表达小分子多肽或抗体,将其作为多肽,抗体或者疫苗展示平台。

[0006] 有报道指出肝癌靶向肽SP94能够特异性靶向肝癌细胞,但是SP94在肝癌细胞上的

受体未知(Lo,A.et al.,(2008)Mol Cancer Ther.,7(3):579-89)。这里,我们通过免疫共沉淀和质谱的方法鉴定出了SP94的在肝癌细胞上的受体为葡萄糖调节蛋白78(GRP78)。

[0007] 我们在激烈火球菌铁蛋白的外表面融合表达展示SP94多肽,合成了具有肝癌靶向性的铁蛋白壳,简称HccFn。利用生物仿生原理,合成的仿生铁蛋白纳米酶(HccFn(Co_3O_4)),其外壳能够特异性靶向恶性肝癌组织,内核具有过氧化物酶活性。我们将这种双功能仿生纳米铁蛋白应用到肝癌诊断上,将会给肝癌诊断带来新试剂、新技术、新思路。

发明内容

[0008] 本发明首先涉及一种可用于肿瘤诊断的特异性分子靶标,所述的分子靶标为GRP78蛋白,优选的,所述的肿瘤是肝癌,所述的GRP78蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0009] SEQ ID NO.4:

[0010] MKLSLVAAMLLLLSAARAEEDKKEDVGTVVGIDLGTTYSCVGVFKNGRVEI IANDQGNRITPSYVAF
TPEGERLIGDAAKNQLTSNPENTVFDKRLIGRTWNDPSVQQDIKFLPFKVVVEKTKPYIQVDIGGGQTKTFAPEE
ISAMVLTKMKETAAYLGGKVTAVVTVPAYFNDAQRQATKDAGTIAGLNMRI INEPTAAAIAYGLDKREGEKNI
LVFDLGGGTFDVSLLTIDNGVFEVVATNGDTHLGGEDFDQRVMEHF IKLYKKKTGKDVRKDNRAVQKLRRVEKAK
RALSSQHARIEIESFYEGEDFSETLTRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLSDLDLKKSDIDEIVLVGGSTRIPKIQ
QLVKEFFNGKEPSRG INPDEAVAYGAAVQAGVLSGDQDTGDLVLLDVCPLTLGIETVGGVMTKLIPRNTVVPTKKS
QIFSTASDNQPTVTIKVYEGERPLTKDNHLLGTFDLTGIPPAPRGVPQIEVTFEIDVNGILRVTAEDKGTGNKNI
TITNDQNRLTPEEIERMVNDAEKFAEEDKCLKERIDTRNELESYAYSLKNQIGDKEKLGKLSSEDKETMEKAVEE
KIEWLESHQDADIEDFKAKKKELEEIVQPIISKLYGSAGP PPTGEEDTAEKDEL。

[0011] 本发明还涉及用于标记所述的分子靶标GRP78的靶向多肽SP94,所述的SP94多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0012] SEQ ID NO.1:SFSIIHTPILPL。

[0013] 本发明还涉及一种能够同辣根过氧化物酶的底物反应并显色的肿瘤诊断试剂,所述的诊断试剂为:装载了具有过氧化物酶催化活性的物质,且表面融合了所述靶向多肽SP94的纳米颗粒,所述的纳米颗粒是铁蛋白颗粒,优选的,所述的肿瘤是肝癌。

[0014] 所述的铁蛋白颗粒优选为人重链铁蛋白24聚体颗粒或激烈火球菌铁蛋白24聚体颗粒,最优选的,所述的铁蛋白颗粒为激烈火球菌铁蛋白24聚体颗粒。

[0015] 所述的激烈火球菌铁蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0016] SEQ ID NO.2:

[0017] MLSERMLKALNDQLNRELYSAYLYFAMAAYFEDLGLEGFANWMKAQAEIII GHALRFYNYIYDRNGRV
ELDEIPKPPKEWESPLKAFEAAYEHEKFI SKSIYELAALAEKDYSTRAFLEWF INEQVEEEASVKKILDKLFKA
KDSPQILFMLDKELSARAPKLPGLLMQGGGE。

[0018] 优选的,所述的靶向多肽SP94通过连接序列与纳米颗粒的蛋白连接成融合蛋白,所述的连接序列如SEQ ID NO.3所示。

[0019] SEQ ID NO.3:GGSGGGSGGGGS。

[0020] 所述的具有过氧化物酶催化活性物质为金属氧化物,优选的,所述的具有过氧化物酶催化活性物质为 Fe_3O_4 或 Co_3O_4 ,最优选的,所述的具有过氧化物酶催化活性物质是

Co₃O₄。

[0021] 本发明还涉及所述的分子靶标、靶向多肽SP94或诊断试剂在制备用于诊断肝癌或判断肝癌分化程度和肿瘤侵袭程度的诊断试剂盒中的应用。

[0022] 优选的,所述的诊断试剂盒的检测样本为穿刺活组织标本、术后病理切片、尸体剖检组织或机体循环系统中的脱落细胞、组织溶解细胞或体外培养细胞。

[0023] 本发明还涉及使用所述的分子靶标、靶向多肽SP94、诊断试剂或诊断试剂盒在诊断肝癌或判断肝癌分化程度和肿瘤侵袭程度中的应用。

附图说明

[0024] 图1、SP94靶向肽与肝癌细胞表面的GRP78特异性结合。图1A为免疫共沉淀和质谱鉴定的方法鉴定SP94受体示意;图1B为凝胶电泳分析与SP94靶向肽特异结合的肝癌细胞HepG2的表面蛋白;图1C为质谱分析SP94靶向肽受体蛋白的结果;图1D为SP94靶向肽受体蛋白能够被GRP78蛋白抗体特异识别;图1E为在肝癌细胞HepG2上敲除GRP78基因后,SP94与HepG2亲和力下降;图1F为在不表达GRP78的鼠3T3-L1细胞上过表达GRP78基因后,SP94与3T3-L1细胞亲和力增加。

[0025] 图2、肝癌靶向性铁蛋白HccFn蛋白壳的制备和表征。图2A为天然的激烈火球菌铁蛋白(pfFn)的结构示意;图2D为表面融合表达了SP94靶向肽的激烈火球菌铁蛋白(HccFn)的结构示意;图2B为pfFn的透射电镜和动态光散射分析;图2E为HccFn的透射电镜和动态光散射分析;图2C为FITC荧光标记的pfFn与肝癌细胞HepG2共孵育的激光共聚焦显微镜成像;图2F为FITC荧光标记的HccFn与肝癌细胞HepG2共孵育的激光共聚焦显微镜成像。

[0026] 图3、肝癌诊断试剂HccFn (Co₃O₄) 的制备和表征。图3A,3D为内腔装载了四氧化三钴纳米颗粒的激烈火球菌铁蛋白(pfFn (Co₃O₄),图3A)和HccFn (Co₃O₄) (图3D)的结构示意;图3B为pfFn (Co₃O₄)的透射电镜和动态光散射分析;图3E为HccFn (Co₃O₄)的透射电镜和动态光散射分析;图3C为pfFn (Co₃O₄)的四氧化三钴内核的透射电镜和粒径分布统计分析;图3F为HccFn (Co₃O₄)的四氧化三钴内核的透射电镜和粒径分布统计分析。

[0027] 图4、为装载Co₃O₄和装载Fe₃O₄的HccFn的过氧化物酶活性对比。图4A为相同条件下HccFn (Co₃O₄)和HccFn (Fe₃O₄)催化TMB显色反应对比;图4B为HccFn (Co₃O₄)和HccFn (Fe₃O₄)催化TMB显色的OD562nm度值与时间曲线;图4C为HccFn (Co₃O₄)和HccFn (Fe₃O₄)催化底物过氧化氢(H₂O₂)的饱和曲线;图4D为HccFn (Co₃O₄)和HccFn (Fe₃O₄)催化底物TMB的饱和曲线。

[0028] 图5、肝癌诊断试剂HccFn (Co₃O₄)能够特异识别临床肝癌组织。图5A为HccFn (Co₃O₄)催化过氧化物酶底物DAB显色的示意图;图5B为基于HccFn (Co₃O₄)的免疫组化肝癌诊断新方法示意;图5C为基于HccFn (Co₃O₄)的免疫组化肝癌诊断方法能够特异识别临床肝癌组织。

[0029] 图6、肝癌诊断试剂HccFn (Co₃O₄)应用于肝癌预后诊断。图6A为HccFn (Co₃O₄)能够区分肝癌和非癌组织,且可呈现出差异性染色;图6B为HccFn (Co₃O₄)在肝癌和癌旁组织的染色统计分析;图6C为HccFn (Co₃O₄)在不同分化阶段的肝癌组织染色差异分析;图6D为HccFn (Co₃O₄)在不同肿瘤侵袭阶段的肝癌组织染色差异分析;图6E为HccFn (Co₃O₄)染色强弱与肝癌病人生存期的相关性分析。

具体实施方式

[0030] 实施例1、SP94靶向肽在肝癌细胞表面的特异性受体鉴定

[0031] 为了鉴定SP94靶向肽在肝癌细胞表面的特异性受体,我们首先使用生物素(Biotin)标记的SP94与肝癌细胞HepG2共孵育,再加入化学交联剂DTSSP来固定SP94与受体的相互作用。随后将HepG2细胞裂解后,与链霉亲和素标记的树脂共孵育,离心得到受体蛋白-SP94-生物素-链霉亲和素-树脂复合物(图1A)。经过凝胶电泳分析,可以发现一条78KDa大小的受体蛋白与SP94特异性结合(图1B)。随后质谱分析结果显示,该受体蛋白为葡萄糖调节蛋白78(GRP78)(图1C)。经过GRP78蛋白抗体结合验证,进一步证实与SP94相互作用的蛋白为GRP78(图1D)。在HepG2细胞敲除GRP78后,SP94与HepG2的亲合力下降;在3T3-L1过表达GRP78后,SP94与3T3-L1的亲合力增加。以上结果都证实GRP78是SP94在肝癌细胞表面的特异性受体。

[0032] 实施例2肝癌靶向性铁蛋白HccFn蛋白壳的制备和表征

[0033] 通过基因融合的手段将SP94肝癌靶向肽(SEQ ID NO:2)通过接头蛋白(SEQ ID NO:3)融合表达在激烈火球菌铁蛋白(SEQ ID NO:1)(图2A)的N端,我们将此融合蛋白命名为HccFn(图2D)。融合蛋白HccFn是由24个相同亚基自组装形成的球壳状结构蛋白。透射电镜和动态光散射分析结果也说明激烈火球菌铁蛋白(pfFn)(图2B),HccFn(图2E)都保持了良好的均一性和球壳状结构。我们用FITC来荧光标记pfFn和HccFn,与肝癌细胞HepG2共孵育30分钟后,通过激光共聚焦扫描显微镜观察,HccFn特异的结合到了HepG2细胞表面(图2C,3F)。

[0034] 实施例3肝癌诊断试剂HccFn(Co₃O₄)的制备和表征

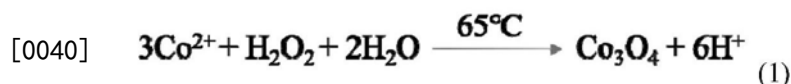
[0035] 利用铁蛋白内核天然矿化的原理,我们将金属钴离子装载进入pfFn(图3A)和HccFn(图3D)蛋白壳,在蛋白壳内腔氧化形成四氧化三钴纳米颗粒,从而仿生合成了包裹有四氧化三钴纳米内核的pfFn(Co₃O₄)和HccFn(Co₃O₄)。具体操作如下:

[0036] (1) 将0.1M的氯化钠溶液除气,同纯化后的铁蛋白壳加入氮气环境下的密闭反应器中,反应温度维持在65℃,pH值稳定在8.5,

[0037] (2) 按照每个铁蛋白壳4000个Co²⁺的比率加入Co(NO₃)₂,双氧水作为氧化剂和Co同时加入,加入的量按照H₂O₂:Co²⁺=1:3,

[0038] (3) 双氧水和Co加完后体系继续反应5分钟,加入200μL浓度300mM的柠檬酸钠络合剩余的Co。

[0039] 四氧化三钴纳米颗粒形成原理见下面公式(1)。



[0041] 收集产品经排阻色谱纯化,去除变性的杂蛋白,得到包裹有四氧化三钴纳米内核的pfFn(Co₃O₄)和HccFn(Co₃O₄)。

[0042] 透射电镜和动态光散射分析表明装载入四氧化三钴纳米内核的pfFn(图3B)和HccFn(图3E)蛋白壳保持了良好的均一性和完整的球壳状结构。同时针对四氧化三钴纳米内核的透射电镜分析表明在pfFn(图3C)和HccFn(图3F)蛋白壳内部均形成了粒径均一的四氧化三钴纳米颗粒。

[0043] 实施例4肝癌诊断试剂HccFn(Co₃O₄)的过氧化物酶活性高于装载Fe₃O₄的HccFn

[0044] 我们之前报道过内腔装载四氧化三铁 (Fe_3O_4) 纳米颗粒的重组人重链铁蛋白蛋白壳 (Kelong Fan et al, Magnetoferritin nanoparticles for targeting and visualizing tumour tissues, NATURE NANOTECHNOLOGY, VOL 7, JULY 2012), 简称 M-HFn, 具有过氧化物酶活性。这里, 我们合成了内腔装载四氧化三钴 (Co_3O_4) 纳米颗粒和四氧化三铁 (Fe_3O_4) 纳米颗粒的 HccFn 铁蛋白蛋白壳, 简称 HccFn (Co_3O_4) 和 HccFn (Fe_3O_4)。我们以 TMB 和过氧化氢 (H_2O_2) 为反应底物, 检测 HccFn (Co_3O_4) 和 HccFn (Fe_3O_4) 的过氧化物酶活性。活性实验结果表明 HccFn (Co_3O_4) 的过氧化物酶活性显著高于 HccFn (Fe_3O_4) (图 4A, 4B)。

[0045] 活性检测体系如下: 800mM H_2O_2 , 0.2mg/mL TMB, 和 0.2M 醋酸钠溶液 (pH 4.5), 再加入相同浓度 (0.25 μM) 的 HccFn (Co_3O_4), HccFn (Fe_3O_4) 和 HccFn。检测 OD652nm 光吸收值变化。

[0046] 同时, 过氧化物酶酶活动力学分析实验结果表明 HccFn (Co_3O_4) 对底物 TMB 和 H_2O_2 的亲合力均显著高于 HccFn (Fe_3O_4)。检测底物 H_2O_2 的酶活动力学曲线时, 底物 TMB 的浓度为 800 μM (图 4C); 检测底物 TMB 的酶活动力学曲线时, 底物 H_2O_2 的浓度为 2400mM (图 4D)。以上实验结果表明 HccFn (Co_3O_4) 的过氧化物酶活性显著高于 HccFn (Fe_3O_4)。

[0047] 实施例 5 肝癌诊断试剂 HccFn (Co_3O_4) 可以用于识别和可视化肝癌组织

[0048] HccFn (Co_3O_4) 在有底物 H_2O_2 和过氧化物酶底物 DAB 存在的情况下, 能够催化 DAB 产生氧化颜色反应, 产生黄褐色沉淀 (图 5A)。利用 HccFn (Co_3O_4) 的这一特性, 我们将 HccFn (Co_3O_4) 用于临床肝癌组织染色。由于 HccFn (Co_3O_4) 蛋白壳能够特异识别并结合肝癌组织 (识别靶点为 GRP78), 在有过氧化物酶底物 DAB 和 H_2O_2 存在的情况下对肝癌组织特异性染色 (图 5B)。我们的实验结果表明没有靶向肽 SP94 展示的 pfFn (Co_3O_4) 并不识别肝癌组织, 展示靶向肽 SP94 的 HccFn (Co_3O_4) 特异识别肝癌组织, 而不识别癌旁组织 (图 5C)。

[0049] 实施例 6 肝癌诊断试剂 HccFn (Co_3O_4) 可以用于肝癌预后诊断

[0050] 将 HccFn (Co_3O_4) 用于临床肝癌组织染色, 我们发现 HccFn (Co_3O_4) 不染色正常肝组织, 且在不同临床肝癌组织染色中呈现出显著的染色强弱差异, 我们将染色程度分为: 强染色, 中度染色, 弱染色和不染色四种 (图 6A)。在对 345 例非癌肝组织和 424 例肝癌组织染色中, 我们发现 HccFn (Co_3O_4) 对肝癌组织的识别灵敏度达到了 63.4% (269/424), 识别特异性达到了 79.3% (273/345) (图 6B)。并且 HccFn (Co_3O_4) 对肝癌组织的染色程度与肝癌肿瘤分化程度和肿瘤侵袭程度呈正相关。随着肝癌分化程度的降低 (高分化, 中分化, 低分化), HccFn (Co_3O_4) 染色阳性率增加 (50% (24/48), 65.7% (159/242), 65.1% (84/129)), 而且 HccFn (Co_3O_4) 强染色比例增加 (14.5% (7/48), 16.9% (41/242), 30.2% (39/129)) (图 6C)。随着肝癌侵袭程度的增加 (T1, T2, T3, T4), HccFn (Co_3O_4) 染色阳性率增加 (32.4% (11/34), 59.5% (78/131), 64.5% (58/90), 100% (3/3)) (图 6D)。进一步的分析发现, 肝癌病人的 5 年生存期与 HccFn (Co_3O_4) 对肝癌组织的染色程度呈负相关。HccFn (Co_3O_4) 强染色的肝癌病人生存期显著低于非强染色的肝癌病人。这些与肝癌病人相关的预后信息都可以通过 HccFn (Co_3O_4) 对肝癌组织的染色分析来判断出来。

[0051] 以上实验室结果表明 HccFn (Co_3O_4) 可以用来作为肝癌的预后诊断试剂。

[0052] 最后需要说明的是, 以上实施例仅用作帮助本领域技术人员理解本发明的实质, 不用做对保护范围的限定。

Arg Ala Pro Lys Leu Pro Gly Leu Leu Met Gln Gly Gly Glu
 165 170
 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 连接序列
 <400> 3
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 654
 <212> PRT
 <213> GRP78蛋白
 <400> 4
 Met Lys Leu Ser Leu Val Ala Ala Met Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala
 1 5 10 15
 Arg Ala Glu Glu Glu Asp Lys Lys Glu Asp Val Gly Thr Val Val Gly
 20 25 30
 Ile Asp Leu Gly Thr Thr Tyr Ser Cys Val Gly Val Phe Lys Asn Gly
 35 40 45
 Arg Val Glu Ile Ile Ala Asn Asp Gln Gly Asn Arg Ile Thr Pro Ser
 50 55 60
 Tyr Val Ala Phe Thr Pro Glu Gly Glu Arg Leu Ile Gly Asp Ala Ala
 65 70 75 80
 Lys Asn Gln Leu Thr Ser Asn Pro Glu Asn Thr Val Phe Asp Ala Lys
 85 90 95
 Arg Leu Ile Gly Arg Thr Trp Asn Asp Pro Ser Val Gln Gln Asp Ile
 100 105 110
 Lys Phe Leu Pro Phe Lys Val Val Glu Lys Lys Thr Lys Pro Tyr Ile
 115 120 125
 Gln Val Asp Ile Gly Gly Gly Gln Thr Lys Thr Phe Ala Pro Glu Glu
 130 135 140
 Ile Ser Ala Met Val Leu Thr Lys Met Lys Glu Thr Ala Glu Ala Tyr
 145 150 155 160
 Leu Gly Lys Lys Val Thr His Ala Val Val Thr Val Pro Ala Tyr Phe
 165 170 175
 Asn Asp Ala Gln Arg Gln Ala Thr Lys Asp Ala Gly Thr Ile Ala Gly
 180 185 190
 Leu Asn Val Met Arg Ile Ile Asn Glu Pro Thr Ala Ala Ala Ile Ala

195	200	205
Tyr Gly Leu Asp Lys Arg Glu Gly Glu Lys Asn Ile Leu Val Phe Asp		
210	215	220
Leu Gly Gly Gly Thr Phe Asp Val Ser Leu Leu Thr Ile Asp Asn Gly		
225	230	235
Val Phe Glu Val Val Ala Thr Asn Gly Asp Thr His Leu Gly Gly Glu		
245	250	255
Asp Phe Asp Gln Arg Val Met Glu His Phe Ile Lys Leu Tyr Lys Lys		
260	265	270
Lys Thr Gly Lys Asp Val Arg Lys Asp Asn Arg Ala Val Gln Lys Leu		
275	280	285
Arg Arg Glu Val Glu Lys Ala Lys Arg Ala Leu Ser Ser Gln His Gln		
290	295	300
Ala Arg Ile Glu Ile Glu Ser Phe Tyr Glu Gly Glu Asp Phe Ser Glu		
305	310	315
Thr Leu Thr Arg Ala Lys Phe Glu Glu Leu Asn Met Asp Leu Phe Arg		
325	330	335
Ser Thr Met Lys Pro Val Gln Lys Val Leu Glu Asp Ser Asp Leu Lys		
340	345	350
Lys Ser Asp Ile Asp Glu Ile Val Leu Val Gly Gly Ser Thr Arg Ile		
355	360	365
Pro Lys Ile Gln Gln Leu Val Lys Glu Phe Phe Asn Gly Lys Glu Pro		
370	375	380
Ser Arg Gly Ile Asn Pro Asp Glu Ala Val Ala Tyr Gly Ala Ala Val		
385	390	395
Gln Ala Gly Val Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr Gly Asp Leu Val Leu		
405	410	415
Leu Asp Val Cys Pro Leu Thr Leu Gly Ile Glu Thr Val Gly Gly Val		
420	425	430
Met Thr Lys Leu Ile Pro Arg Asn Thr Val Val Pro Thr Lys Lys Ser		
435	440	445
Gln Ile Phe Ser Thr Ala Ser Asp Asn Gln Pro Thr Val Thr Ile Lys		
450	455	460
Val Tyr Glu Gly Glu Arg Pro Leu Thr Lys Asp Asn His Leu Leu Gly		
465	470	475
Thr Phe Asp Leu Thr Gly Ile Pro Pro Ala Pro Arg Gly Val Pro Gln		
485	490	495
Ile Glu Val Thr Phe Glu Ile Asp Val Asn Gly Ile Leu Arg Val Thr		
500	505	510

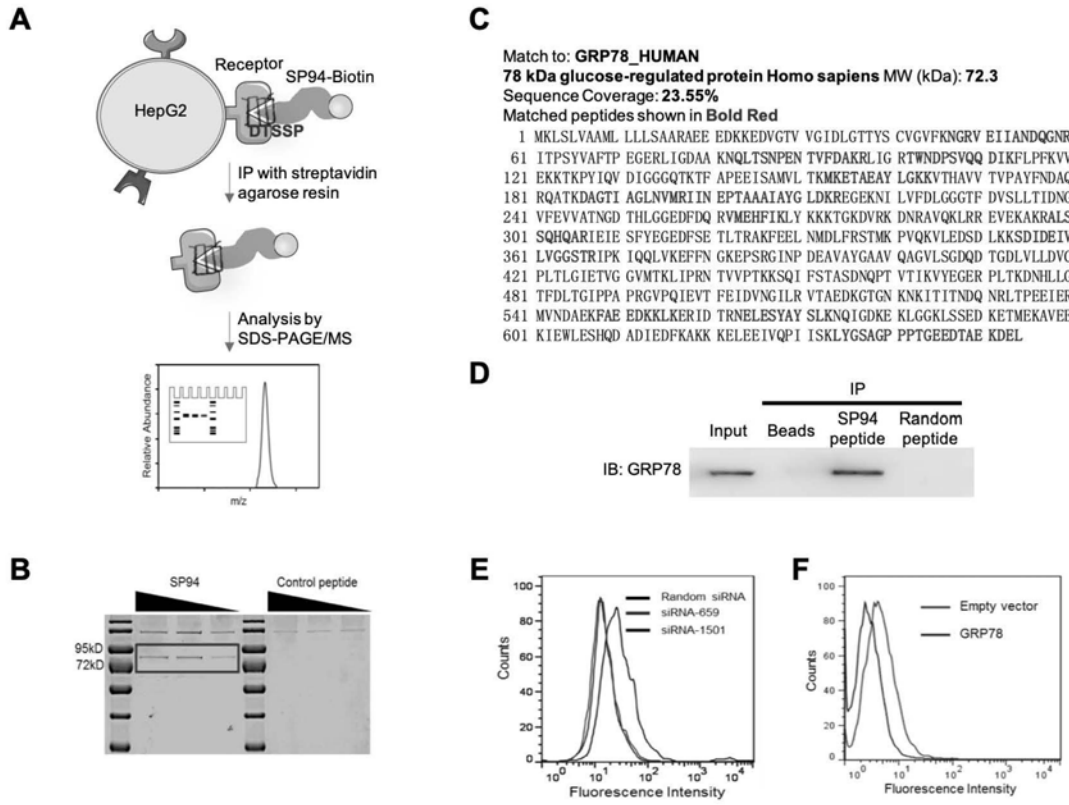


图1

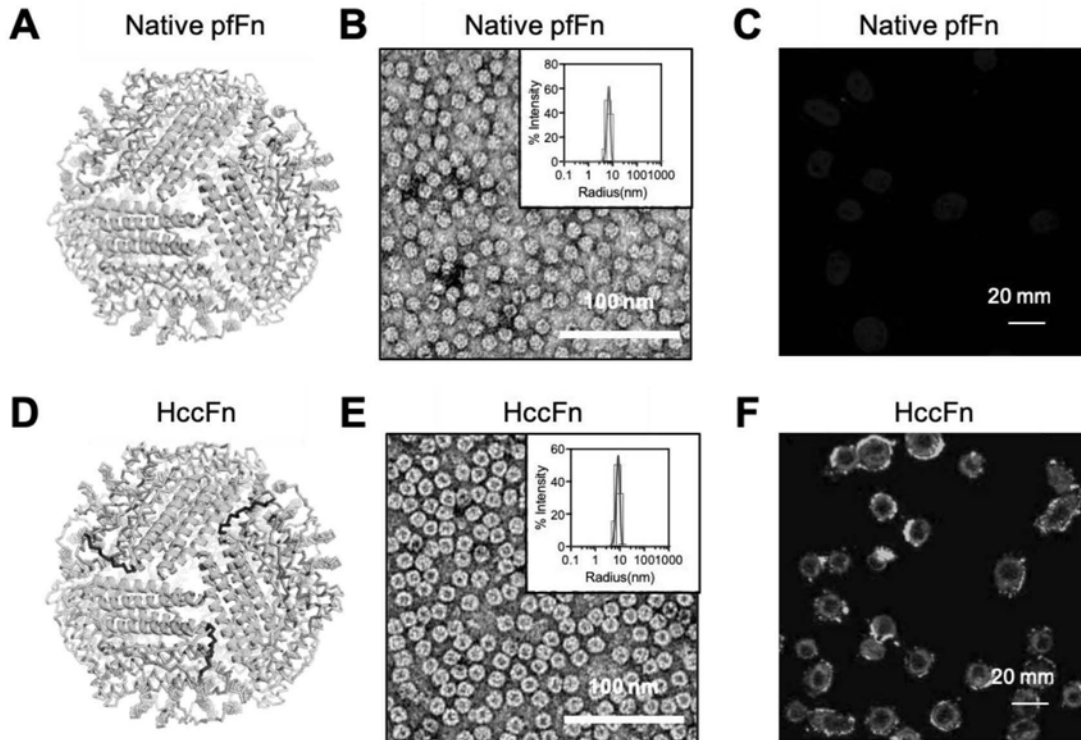


图2

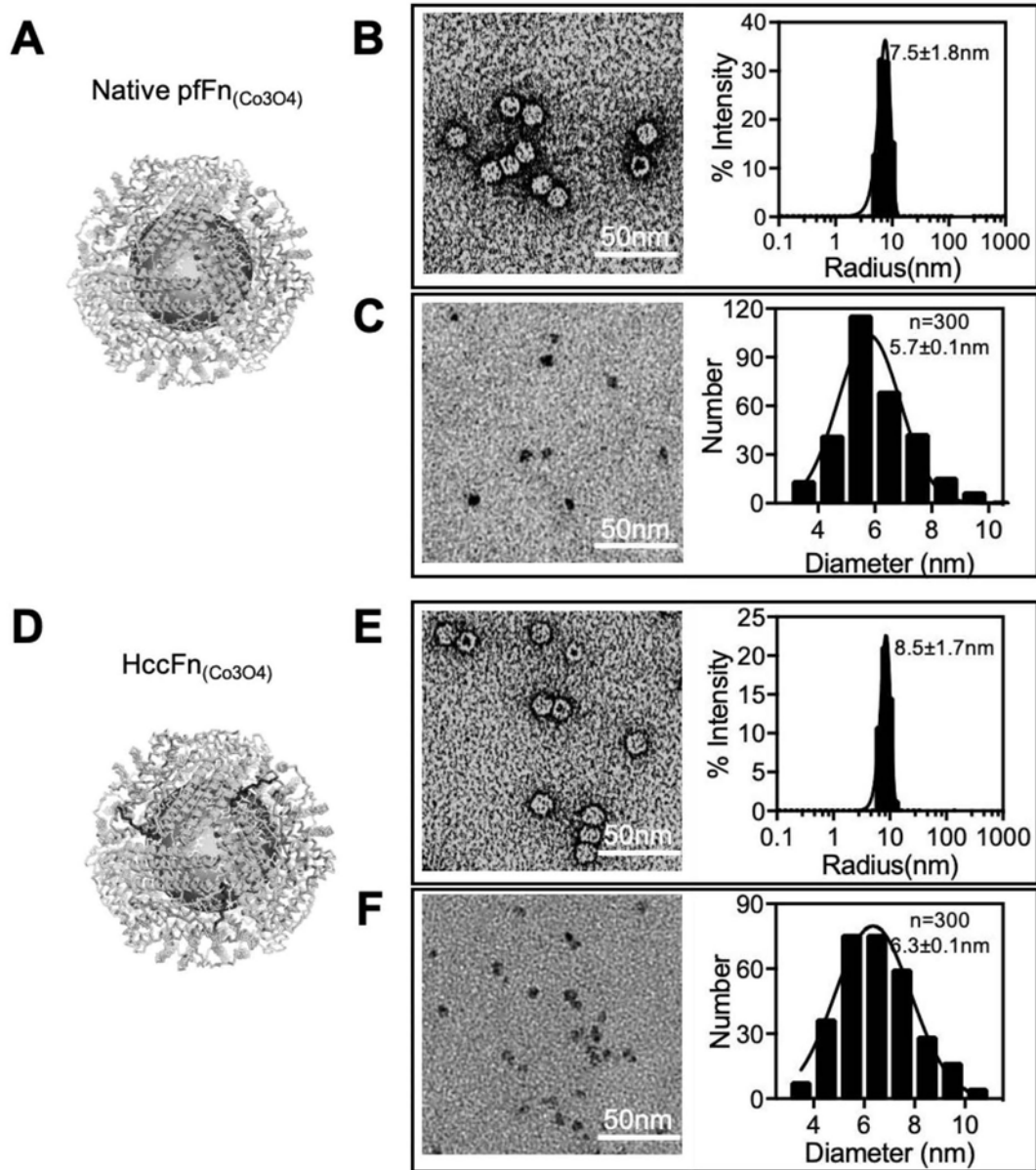


图3

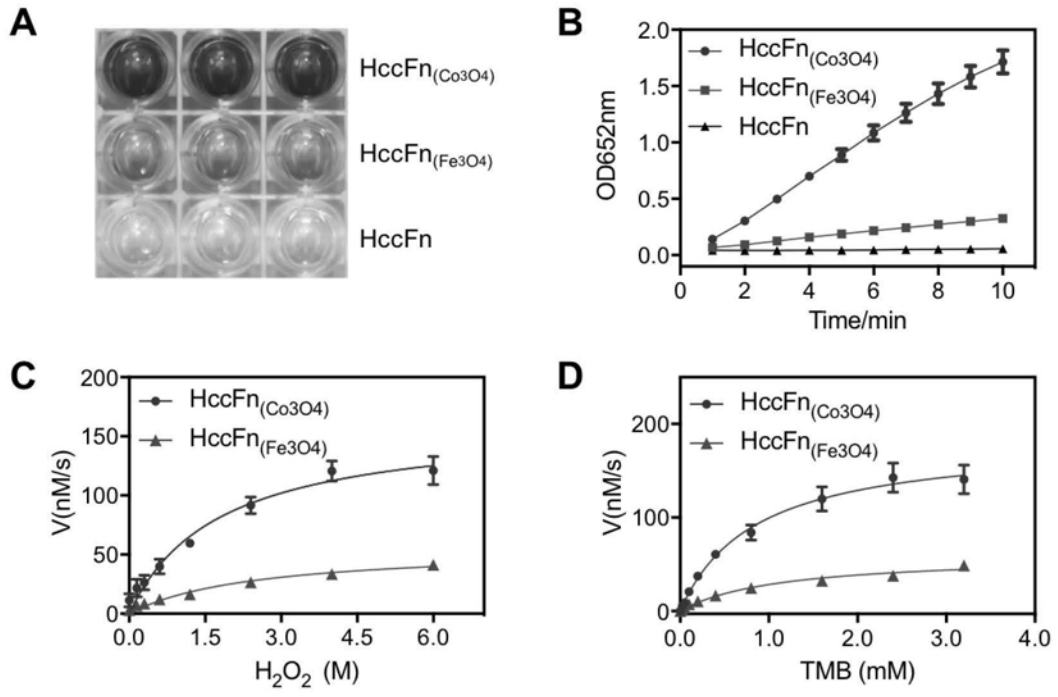


图4

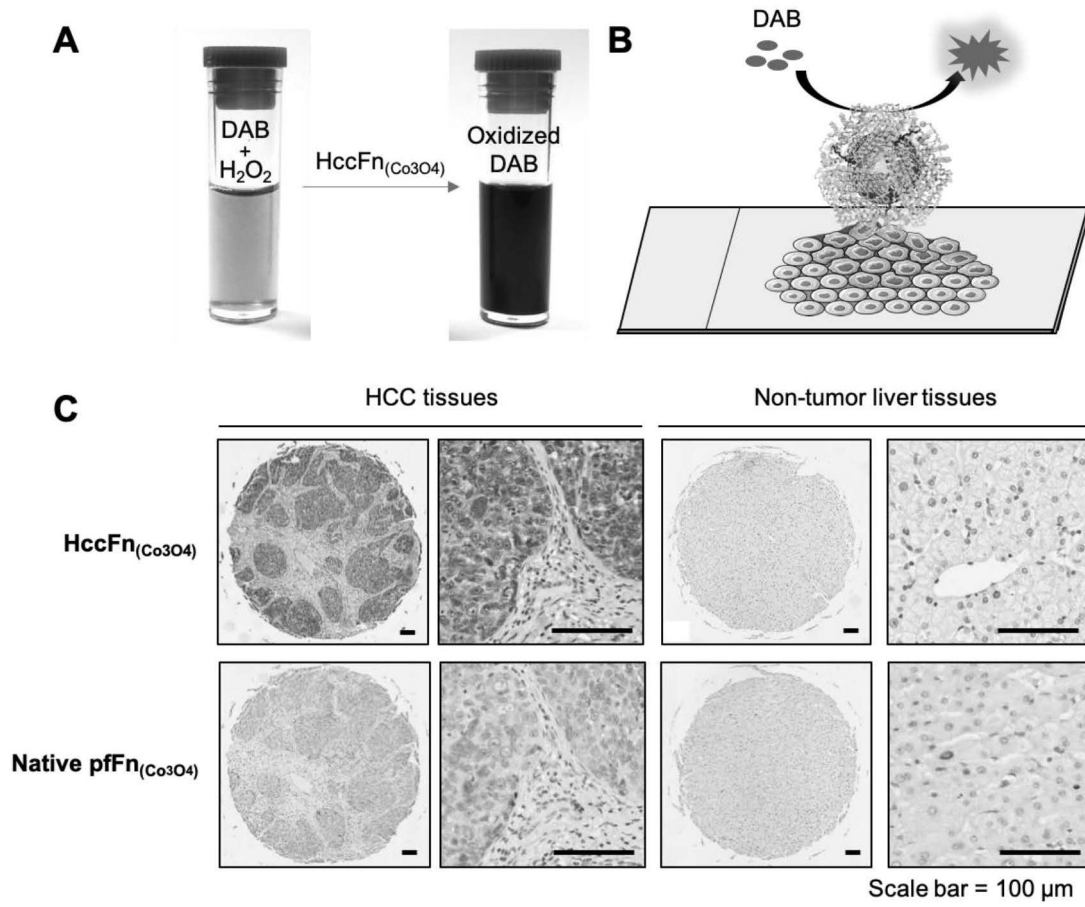


图5

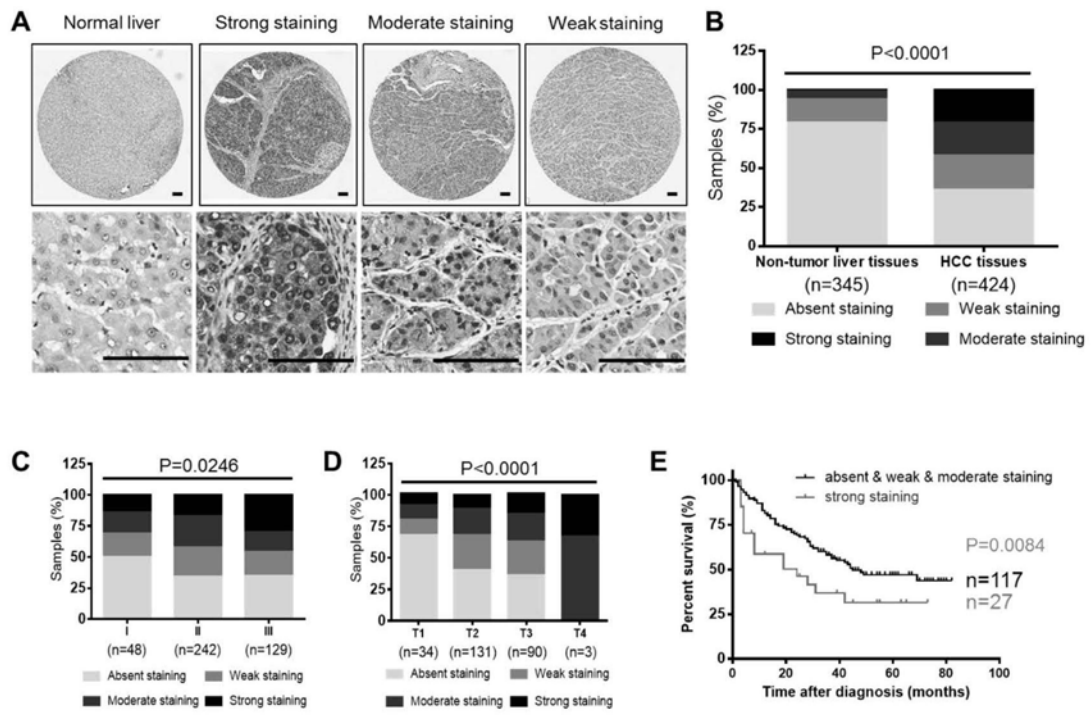


图6