

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02160808.3

C07H 21/00

C07K 14/435 C07K 16/18

C12N 15/11 C12N 15/63

C12P 21/02 A61K 31/7088

A61K 38/17 A61P 25/00

A61P 43/00

[43] 公开日 2004 年 7 月 14 日

[11] 公开号 CN 1511841A

[22] 申请日 2002.12.30 [21] 申请号 02160808.3

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区北沙滩大屯路 15 号

[72] 发明人 兰 蕾 刘 阳 刘 缨 薛金晓
薛志刚 赫荣乔

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 姜兆元

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 3 页

[54] 发明名称 一种来自鹤鹑的同源异型盒基因
qBm - 1 及其应用

[57] 摘要

本发明提供一种从鹤鹑胚胎 cDNA 文库中筛选得到的基因 qBm - 1 和该基因编码的转录调节因子、含有上述基因序列的重组载体及其亚克隆和重组微生物，以及由这些亚克隆获得的反义探针。该基因属于一种新的同源异型盒基因，其表达产物属于一种新的转录调节因子，本领域已部分了解同源异型盒基因及转录调节因子在基因的调控和胚胎发育过程中的重要功能。本发明的目的是通过提供该新基因的研究来进一步阐释上述功能。此外，本发明还提供该基因在临床医学中调控神经系统发育方面的应用。

1. 一种多核苷酸分子，该多核苷酸分子的序列与 SEQ ID NO.1 所示
5 序列的同源性至少为 80%。
2. 根据权利要求 1 所述的一种多核苷酸分子，其中，该多核苷酸分
子的序列与 SEQ ID NO.1 所示序列的同源性至少为 90%。
3. 一种具有 SEQ ID NO.1 所示序列多核苷酸分子。
4. 一种蛋白质分子，该蛋白质分子的氨基酸序列与 SEQ ID NO.2 所
10 示序列的同源性至少为 80%。
5. 根据权力要求 4 所述的一种蛋白质分子，其中，该蛋白质分子的
氨基酸序列与 SEQ ID NO.2 所示序列的同源性至少为 90%。
6. 一种具有 SEQ ID NO.2 所示氨基酸序列的蛋白质分子。
7. 一种重组载体，该重组载体的特征在于含有权利要求 1-3 任一项
15 所述的多核苷酸分子。
8. 一种含有权力要求 7 所述的重组载体的宿主细胞。
9. 根据权利要求 8 所述的宿主细胞，其中，选自原核细胞或真核细
胞。
10. 一种获得转录调节因子的方法，该方法包括：
20 1) 首先，培养一种权力要求 8 所述的宿主细胞； 以及
2) 回收宿主细胞所表达的转录调节因子。
11. 一种反义核酸探针，该反义核酸探针的特征在于它是以权利要
求 1-3 中任一项所述的多核苷酸分子为模板得到的。
12. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的多核苷酸分子在临床医学调
25 控神经系统发育中的应用。
13. 根据权利要求 4-6 中任一项所述的蛋白质分子在调控发育功能
的转录调节因子或免疫组织化学或制备抗体中的应用。

一种来自鹌鹑的同源异型盒基因 qBrn-1 及其应用

5

技术领域

本发明属于基因工程领域，具体地说，本发明涉及一种新的同源异型盒基因 qBrn-1。本发明还涉及该基因编码的转录调节因子、含有上述基因序列的重组载体及其亚克隆和重组微生物，以及由这些亚克隆获得的反义探针。此外，本发明还涉及该基因在临床医学中调控神经系统发育中的应用。

10

技术背景

神经系统是动物胚胎发育中最早形成的系统之一，它在动物的生长发育、再生、衰老及行为和学习等多种生命现象中起着十分重要的作用。神经发育生物学是发育生物学的一个重要分支，是目前系统动物发育基因研究的主要领域。对中枢神经系统的形态发生、细胞分化 and 功能区域定位过程中的基因水平的调控机制的认识是分子神经发育生物学中的关键问题之一。发育基因的研究是一门综合性的边缘学科，不仅涉及生物学和医学从基础理论研究，同时在提高我国人口素质、优生优育、减少和控制与神经系统有关的遗传疾病方面有着广泛的应用前景。发育基因的研究至今不过几十年，却已经取得了惊人的发展。现已证明，发育基因在动物胚胎发育过程中对形态发生和器官形成起直接的调控作用。该领域的研究成果可用于基于遗传工程手段的遗传疾病的防治和新的高科技药物市场。

15

20

25

大量研究表明，在神经系统的发育过程中，同源盒基因（homeobox gene, Hox）家族对神经系统的发育和分化具有关键的作用，这类基因的产物作为重要的转录调节因子（transcription factor）参与神经细胞命运的决定、神经细胞分化的时间与空间控制，以及神经系统的格局化等。迄今已发现了 650 多种 Hox 基因，它们广泛分布于从酵母得到人类的各种

30

真核生物中。

根据保守区内外序列的保守性, 可将 Hox 基因分为 42 类, 研究较多的是: HOX/HOM、Pax、POU 和 Wnt 四个家族。其中, 在脊椎动物发育过程中, POU 基因主要在胚胎发育早期中枢神经系统和成体大脑的特定区域表达。POU 蛋白在发育过程中的特定时间和空间表达, 并且集中于发育中的神经系统和处于增殖及多能状态的细胞, 显示其在胚胎特别是神经发育中的重要作用 (He et al., (1989) Nature 340 (6228), 35-41; Rosenfeld (1991) Genes Dev. 5 (6), 897-907)。POU 家族转录因子对神经系统的发育也起着非常重要的作用。如, 这一家族的 Tst-1/Oct-6/SCIP 主要在少树突神经胶质细胞的前体和发育中的施旺氏细胞中表达, 这两种细胞分别负责中枢神经系统和外周神经系统覆盖髓鞘的过程。当这一基因被敲除后, 中枢神经系统的髓鞘虽未受明显影响, 但外周神经系统的髓鞘却受到严重损伤 (Bermingham et al (1996) Genes Dev 10: 1751-1762; Jaegle et al (1996) Science 273: 507-510)。又如, Brn-2 在胚胎早期发生中的神经管广泛表达, 其正常的生理功能对于下丘脑和垂体后叶的某些神经元的发育是必须的 (Nakai et al (1995) Genes Dev. 9: 3109-3121; Schonemann et al (1995) Genes Dev. 9: 3122-3135)。在人类中, 某些 POU 转录因子发生突变可以引起神经系统的疾病, 如与镫骨相关的耳聋就是 POU3F4 突变所致 (deKok et al (1995) Science 267: 685-688)。

用鸟类为实验模型的优势在于: (1) 鸟类的发育过程与哺乳动物相似, 其结果可用于哺乳动物发育模式的研究; (2) 鸟类的胚胎发育在体外进行, 因此易于观察和收集, 并且可进行体外培养; (3) 鹌鹑和鸡胚可以很方便的移植 (grafting), 而鹌鹑细胞和鸡细胞可通过细胞核来区分 (Le Deourin, 1982, 《神经嵴》 剑桥出版社), 这为研究细胞谱系提供了极大的方便。

到目前为止, 尽管已经在许多动物种类中发现了 POU 蛋白并对其功能做了大量研究, 但在鸟类中这方面的工作却很少。根据果蝇、大鼠和小鼠的 POU 结构域的保守性, 本发明人从孵化 5 天的鹌鹑胚胎 cDNA 文库中筛选到一个新的 POU 结构域基因, 命名为 qBrn-1, 并且对其限制性酶谱和序列进行了分析。此外, 本发明人还研究了该基因的在鹌鹑胚胎

中的表达模式，发现该基因对神经系统的发育具有重要的调控作用。

发明内容

本发明提供一种从鹤鹑胚胎 cDNA 文库中筛选得到的基因 qBrn-1 和
5 该基因编码的转录调节因子、含有上述基因序列的重组载体及其亚克隆
和重组微生物，以及由这些亚克隆获得的反义探针。该基因属于一种新的
同源异型盒基因，其表达产物属于一种新的转录调节因子，本领域已
部分了解同源异型盒基因及转录调节因子在基因的调控和胚胎发育过程
10 中的重要功能。本发明的目的是通过提供该新基因的研究来进一步阐释
上述功能。此外，本发明还提供该基因在临床医学中调控神经系统发育
方面的应用。

本发明提供的基因 qBrn-1 具有如 SEQ ID NO.1 所示的多核苷酸分子
序列。另一方面，该基因中的一个或多个碱基的缺失、插入或替代产生
具有与 SEQ ID NO.1 所示序列具有相同功能的变异体也应包括在本发明
15 的内容之内。因此，本发明应当包括具有 SEQ ID NO.1 所示序列的多核
苷酸分子的变异体，这些变异体的序列与 SEQ ID NO.1 所示序列的同源
性至少为 80%，优选的至少为 90%。

所以本发明还提供了该基因的变异体的片段。

另一方面，本发明提供含有该基因及其变异体或其片段的重组载体。
20 选择的载体通常能在使用的特定宿主细胞内发挥功能，也就是说，载体与
宿主细胞兼容，从而能实现基因的扩增和（或）基因的表达。在本发明
的一个实施方案中，上述载体是 pBluescript II KS，插入的是 qBrn-1 或其
片段，插入位点可以是 EcoR I 和 BamH I 或 Cla I 和 Sca I 等。

用于实现本发明的优选载体是能够与细菌、酵母和哺乳动物宿主细
25 胞相容的那些载体。其中尤其包括 pCRII、pCR3 和 pcDNA3.1 (Invitrogen,
San Diego, CA)、pBSII(Stratagene, La Jolla, CA)、pET15(Novagen, Madison,
WI)、pGEX(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2(Clontech, Palo
Alto, CA)、pETL (BlueBacII, Invitrogen)、pDSR- α (PCT Pub. No.
WO90/14363) 和 pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY)。

30 另一方面，本发明还提供含有上述重组载体的重组微生物。当载体

构建完成，即将本发明多核苷酸分子插入到载体的适当部位之后，就可以将所得载体插入到适当的宿主细胞内，用于本发明多核苷酸的扩增和（或）表达。可以用本领域熟知的方法将载体转化到选定的宿主细胞内，这些方法包括，例如，转染法、感染法、氯化钙法、电穿孔法、显微注射法、脂转染法、DEAE-葡聚糖法，或已知的其他方法。选择的方法会根据所用宿主细胞的类型而有部分变化。这些方法以及其他适当的方法已为该领域的技术人员所熟知，并且在 Sambrook 等的《分子克隆实验手册》（Cold Spring Harbor Laboratories, 1989）和 Davis 等的《分子生物学基本方法》（Elsevier, 1986）中均有所描述。

10 本发明的多核苷酸分子的扩增和（或）表达可以在原核宿主细胞、酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞（杆状病毒系统）和（或）真核宿主细胞中进行。表达宿主细胞的选择在某种程度上取决于是否要对 IL-1ra-L 多肽进行翻译后修饰（如糖基化和（或）磷酸化）。如果需要，则优选的是酵母宿主细胞、昆虫宿主细胞或哺乳动物宿主细胞。有关表达载体的综述，可参考 Meth. Enz., Vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990)。

另一方面，本发明提供一种具有如 SEQ ID NO.2 所示的氨基酸序列。

另一方面，该氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基的缺失、插入或取代产生具有与 SEQ ID NO.2 所示序列相同功能的衍生物也应包括在本发明的内容之内。因此，本发明应当包括具有 SEQ ID NO.2 所示序列的蛋白质分子的衍生物，这些衍生物的序列与 SEQ ID NO.2 所示序列的同源性至少为 80%，优选的至少为 90%。

另一方面，本发明还提供一种方法，用以获得本发明的转录调节因子。该方法包括培养宿主细胞以合成该蛋白，然后收集和裂解宿主细胞，再用本领域熟知的方法选择性地回收产物。

25 另一方面，本发明还提供该基因及其变异体或其片段的反义核酸探针。在本发明的实施方案中，使用地高辛标记的核糖核苷三磷酸（DIG-NTP）作为底物来合成这些反义核酸探针，并且这些标记的反义核酸探针用于原位杂交以研究本发明的基因 qBrn-1 的表达模式，但不局限于此。

30 附图说明

图 1: 示本发明多核苷酸分子的限制性酶切图谱。其中方框内为本发明基因的可读框, 并且在该可读框中标示出保守的 POU 盒。POU_{SD} 指 POU sepecific domain, POU_{HD} 指 POU homeodomain。

图 2: 示本发明基因在发育中的鹤鹑中的表达模式。第 13 期的鹤鹑原位杂交的结果, 显示在前脑、中脑、菱脑节以及侧板中胚层有信号。A: 示整胚的结果; B: 示头部, 在听窝有较弱的信号; C: 示尾部及体节, 在神经管的信号强, 在侧板中胚层的信号较弱。

图 3: 通过 SDS-PAGE 检测纯化的本发明基因的表达产物。A: 标准分子量; B: 未纯化的宿主细胞全蛋白; C: 纯化的本发明蛋白质, 其分子量约为 29Kda。

图 4: 获得 qBrn-1 不同片段大小的亚克隆 9 种。

具体实施方案

以下结合优选的实施例对本发明作详细的说明, 但并不意味着对本发明的内容局限。

实施例 1: qBrn-1 的 cDNA 的分子克隆及序列测定

步骤 1: 筛库探针的制备

化学合成如下寡核苷酸序列:

引物 1: 5' CGACCTGGAGCAGTTCGCCAA 3'

引物 2: 5' AACCAGACACGCACCACCT 3'

取孵化五天的鹤鹑胚胎, 采用 mRNA purification Kit 和 cDNA synthesis Kit (Pharmacia Biotech), 按照说明书所述方法来制备 cDNA。利用引物 1 和引物 2, 使用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 反应, 97°C 保温 10 分钟后, 进入如下循环: 55°C 退火 1 分钟, 72°C 延伸 2 分钟, 94°C 变性 1 分钟, 循环 35 次, 得到筛库 DNA 片段, 它克隆于 pBluescriptII SK⁻ 质粒 EcoRI 位点, 总长 402 bp, 其序列如下图:

```

1   CGACCTGGAG CAGTTCGCCA AGCAGTTCAA GCAACGACGC ATCAAGCTGG
51  GCTTCACCCA GGCCGACGTG GGA CTGGCGC TGGGCACCCT CTACGGTAAC
101 GTGTTCTCGC AGACCACCAT CTGCCGTTTC GAGGCCCTGC AGCTGAGCTT
5   151 CAAGAACATG TGCAAGCTCA AGCCGCTGCT CAACAAGTGG CTGGAGGAGA
201 CCGACTCGTC CAGCGGCAGC CCCACCAACC TGGACAAGAT CGCGGCGCAG
251 GGCCGCAAGC GCAAGAAGCG CACGTCCATC GAGGTGGGTG TCAAAGGCGC
301 GCTCGGCCGT CTGCAGAGCC ACTTTCTCAA GTGTCCCAAG CACGAGATCA
351 CCGGCCTGGC CGACAGCCTG CAACTGGAGA AGGAGGTGGT GCGTGTCTGG
10  401 TT

```

采用随机引物标记法，将该 DNA 片段进行 ^{32}P 标记，制备成筛库探针。

步骤 2：孵化五天的鹌鹑的全胚胎 cDNA 文库的构建

15 取孵化五天的鹌鹑胚胎，按步骤 1 的方法制备 cDNA，并且在其末端连接 EcoRI adaptor，然后克隆至 pBluescript II KS (Stratagene) 载体中，转化 XL1-Blue (Stratagene) 菌株感受态细胞，构建成孵化五天的鹌鹑全胚胎 cDNA 文库。

20 步骤 3：用步骤 1 制备的探针对步骤 2 制备的文库进行筛选，采用常规方法(《Molecular Cloning》，Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)，得到 POU 家族基因 qBrn-1 的 cDNA 克隆。

25 步骤 4：根据载体 pBluescript II KS 的特性，采用 T3primer 和 T7primer 为引物，分别用 T3 聚合酶和 T7 聚合酶对 qBrn-1 的正反两个方向进行测序(上海生工)，该基因的 cDNA 总长 2013bp。其基因部分核苷酸序列(即全部的可读框)结果见 SEQ ID NO.1，由该核苷酸序列所推导的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

实施例 2：qBrn-1cDNA 的限制性酶切图谱的确定和各种亚克隆的构建

30 步骤 1：对本发明的 qBrn-1 克隆进行单酶切、双酶切及多酶切，并通过琼脂糖凝胶电泳计算各酶切片段大小，并分析其多克隆位点，绘制

出限制性酶切图谱，见图 1。

步骤 2:，用 Cla I 和 Sac I 对 qBrn-1 进行双酶切，并通过琼脂糖凝胶电泳回收该酶切片段，然后以 pBluescript II KS 为载体，用同样的酶 (Cla I 和 Sac I) 将其双酶切，最后通过连接反应构建得到亚克隆 A；以同样方法，用 BamHI 和 EcoRI 对 qBrn-1 双酶切，构建得到亚克隆 B；用 EcoRI 和 Cla I 对 qBrn-1 进行双酶切，构建得到亚克隆 C；用 Pst I 对 qBrn-1 单酶切，构建得到亚克隆 D、E、F 和 G；用 Pst I 和 Cla I 对 qBrn-1 双酶切，构建得到亚克隆 H；用 BamHI 和 Cla I 对 qBrn-1 双酶切，构建得到亚克隆 I。共获得 qBrn-1 不同片段大小的亚克隆 9 种，但不局限于此，见附图 4。

10

实施例 3: 反义核酸探针的制备

选用亚克隆 B、C 和 D 中的基因片段为模板来制备多种反义核酸探针。本发明的多核苷酸分子的各种亚克隆见实施例 2 中附图，选用三种探针的目的是为了相互验证其结果的可靠性。具体制备方法包括选择一种适当的限制性内切酶将环形的重组载体 (即亚克隆 B、C 和 D) 线性化，该限制性内切酶的酶切位点位于 qBrn-1 的 cDNA 正链 5'端，再用该 cDNA 正链 3'端上游所对应的聚合酶 (T3 聚合酶或 T7 聚合酶) 在体外对线性化模板进行转录，转录产物即为所需反义核酸探针。

本发明中，在体外转录中，所用的转录底物是地高辛标记的 NTP。目的是为了在原位杂交实验中，采用非放的方法进行检测。具体地说，地高辛标记的探针与目的 mRNA 杂交后，用抗地高辛的抗体再与杂交体孵育，该抗体上又耦联了碱性磷酸酶，最后就可以用碱性磷酸酶的显色底物使之显色 (信号)。

25 实施例 4: 整胚原位杂交以研究 qBrn-1 的表达模式

步骤 1: 由本实验室孵化获得不同发育时期的鹌鹑胚胎。孵化条件: 温度保持 $38\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，湿度约 70%，日翻蛋 3-4 次，在空气流通的恒温培养箱内孵化，并定时地收集所需的鹌鹑胚胎。方法是: 用弯头眼科剪由鹌鹑蛋的钝端将蛋开口，然后将卵黄和蛋清轻倒于预冷的 PBS 缓冲液 (8g NaCl, 0.2g KCl, 1.44g Na_2HPO_4 , 0.24g KH_2PO_4 , pH7.4) 中，用弯头眼科剪小心

30

地将胚胎剪下来，尽可能去除卵黄膜，立即用 4%的多聚甲醛固定。所收集的胚胎的具体发育期按体节数判定。

步骤 2：在进行整胚原位杂交过程中，所用的器皿和溶液都要严格的防止 RNase 的污染。所用探针为上述地高辛标记的 cRNA 探针，抗体为碱性磷酸酶标记的抗-DIG 抗体 (Roche 1093 274)，生色底物为 BM purple (Roche 1442 074)。具体的实施方法参照 Robert et al., (1993) Cell, Vol.75, 1401-1416 以及 Wilkinson, (1992) *In Situ Hybridization: A Practical Approach*, Oxford University Press 中所述。

步骤 3：进行显色后的胚胎用 4%多聚甲醛固定，PBS 清洗，为了使胚胎更为透明以提高摄影效果，可将其逐级置换到含 80%的甘油和 1%的 Tween-20 的 PBS 中，最后用体视显微镜进行显微摄影，分析结果可得 qBrn-1 在发育中的鹤鹑胚胎中的表达模式。所得部分照片见图 2。

实施例 4：qBrn-1 全长基因的表达与纯化。

步骤 1：表达质粒的构建。用 BstXI 和 SacII 酶切 qBrn-1 cDNA，同时将所用的表达载体 pBluescript II KS 也用这两种酶进行双酶切，然后用 T4 DNA 连接酶将上述片段连接起来，命名为 pBS/qBrn-1。酶切图谱和 DNA 测序结果表明表达质粒的构建准确无误。

步骤 2：重组多肽的表达和纯化。用 CaCl_2 法将 pBS/qBrn-1 转化 XL1-Blue (Stratagene) 菌株感受态细胞，用 LB 培养基 37°C 液体培养。当 $\text{OD}_{600}=0.6$ 时，加入 IPTG (终浓度 0.4 mM) 开始诱导本发明基因的表达，继续培养 3 小时，离心收集菌体。用添加蛋白酶抑制剂的磷酸缓冲液 (pH 7.3, aprotinin 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PMSF 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 悬浮菌体，每 1 升培养液用 50ml 缓冲液悬浮，于冰浴中超声裂解菌体。随后，加入 Triton X-100 (终浓度 1%)，轻轻搅拌均匀 30 分钟。离心取上清 (4°C, 10000 rpm)，用 Ni^{2+} -chelating Sepharose 4B 柱亲和吸附，用 50 mM 咪唑洗脱除去杂蛋白。然后收集 200 mM 咪唑洗脱组分，透析，冰冻干燥，最后用 SDS-PAGE 实验来验证该样品，结果显示其分子量与预期一致 (约为 29KDa)，并且其纯度在 90%以上，见图 3。

实施例 5: 应用纯化的 qBrn-1 产物以制备抗体。经纯化的重组表达的 qBrn-1 产物用 SDS-PAGE 进一步纯化后, 用干净小刀将目的条带切下, 直接溶于水中, 这样得到的混合物可用本领域所熟知的方法免疫动物以制备抗体。

5

实施例 6: 纯化的 qBrn-1 产物适用于发育生物学。已知该基因的产物是一种具有调控发育功能的转录调节因子, 因此应用该蛋白产物可研究其与 DNA 和蛋白质的相互作用, 以进一步明确胚胎发育过程中的调控网络。

10

实施例 7: qBrn-1 产物的抗体适用于免疫组织化学。按照 Liu Wei et al., 2001, *Int J. Dev. Biol.* 45: 415-420 中所述方法, 应用该抗体可检测整胚或切片的鹌鹑胚胎中 qBrn-1 基因的表达模式以及执行功能的时间和部位, 以及表达强度。

15

序列表

<110>	中国科学院生物物理所	
<120>	一种来自鹤鹑的同源异型盒基因qBrn-1及其应用	
<130>	一种来自鹤鹑的同源异型盒基因qBrn-1及其应用	
<160>	2	
<170>	PatentIn version 3.1	
<210>	1	
<211>	783	
<212>	DNA	
<213>	Coturnix japonica	
<400>	1	
	atggcctccc tgtactcgca gcccgggggc ttcacggtga acggcatgct gagccccgcg	60
	ggcggcggac agagcctggt gcacccccggg ctggtgcgcg gcggagagac ggcggagctg	120
	ggcgagcacc ccgggcatca ccatcaccac caccacccgc accccgggca ccacgcgccg	180
	caccacggcg ccgtcaacag ccacgaggcg cactcggacg aggacacgcc gacctcggac	240
	gacctggagc agttcgccaa gcagttcaag cagcggcgga ttaagctggg cttcacgcag	300
	gccgacgtgg ggctggcgct gggcacctg tacggcaacg tcttctcgca gaccaccatc	360
	tgccgcttcg aggccctgca gctcagcttc aagaacatgt gcaagctgaa gcctttgttg	420
	aacaagtggc tggaggaagc cgactcctcc accggcagcc ccaccagcat cgacaagatc	480
	gcggcgcagg gcaggaagag gaagaagcgg acctccatcg aggtgagtgt caagggggcc	540
	ttggagagcc actttctgaa atgccccaaag ccctccgccc aggagattac gaacctagcg	600
	gacagcctgc agctggagaa ggaggtggtc agggtttggt tttgcaatcg gaggcagaaa	660
	gagaaaacgca tgacccccgcc ggggatccag cagcagaccc ccgacgatgt ctactcgcag	720
	gtcggcgccg tcagctccga cacgccgccc cctcaccacg gactgcagag cggcgtgcag	780
	tga	783
<210>	2	
<211>	260	

<212> PRT

<213> Coturnix japonica

<400> 2

Met Ala Ser Leu Tyr Ser Gln Pro Gly Gly Phe Thr Val Asn Gly Met
1 5 10 15

Leu Ser Pro Ala Gly Gly Gly Gln Ser Leu Val His Pro Gly Leu Val
20 25 30

Arg Gly Gly Glu Thr Ala Glu Leu Gly Glu His Pro Gly His His His
35 40 45

His His His His Pro His Pro Gly His His Ala Pro His His Gly Ala
50 55 60

Val Asn Ser His Glu Ala His Ser Asp Glu Asp Thr Pro Thr Ser Asp
65 70 75 80

Asp Leu Glu Gln Phe Ala Lys Gln Phe Lys Gln Arg Arg Ile Lys Leu
85 90 95

Gly Phe Thr Gln Ala Asp Val Gly Leu Ala Leu Gly Thr Leu Tyr Gly
100 105 110

Asn Val Phe Ser Gln Thr Thr Ile Cys Arg Phe Glu Ala Leu Gln Leu
115 120 125

Ser Phe Lys Asn Met Cys Lys Leu Lys Pro Leu Leu Asn Lys Trp Leu
130 135 140

Glu Glu Ala Asp Ser Ser Thr Gly Ser Pro Thr Ser Ile Asp Lys Ile
145 150 155 160

Ala Ala Gln Gly Arg Lys Arg Lys Lys Arg Thr Ser Ile Glu Val Ser
165 170 175

Val Lys Gly Ala Leu Glu Ser His Phe Leu Lys Cys Pro Lys Pro Ser
180 185 190

Ala Gln Glu Ile Thr Asn Leu Ala Asp Ser Leu Gln Leu Glu Lys Glu
195 200 205

Val Val Arg Val Trp Phe Cys Asn Arg Arg Gln Lys Glu Lys Arg Met
210 215 220

Thr Pro Pro Gly Ile Gln Gln Gln Thr Pro Asp Asp Val Tyr Ser Gln
225 230 235 240

Val Gly Ala Val Ser Ser Asp Thr Pro Pro Pro His His Gly Leu Gln
245 250 255

Ser Gly Val Gln
260

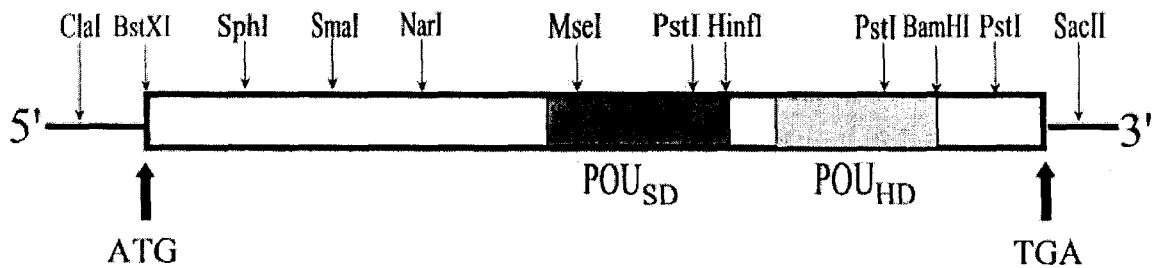


图 1

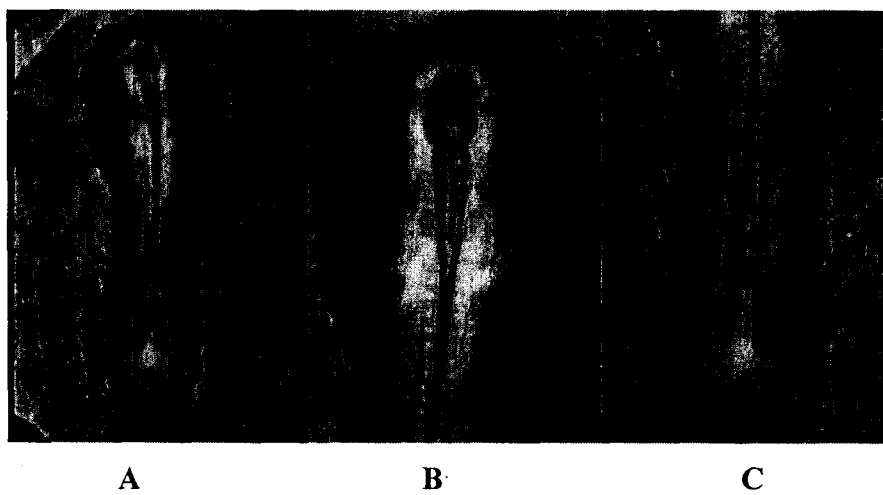


图 2

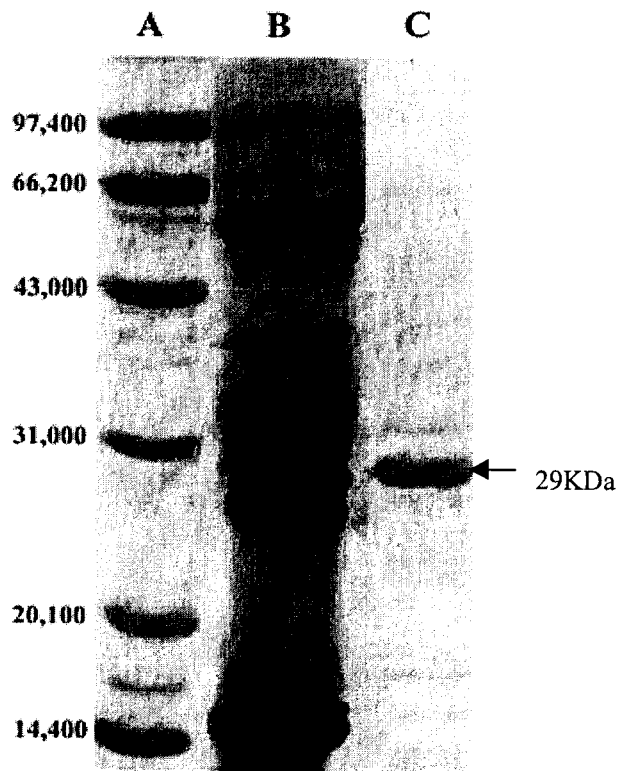


图 3

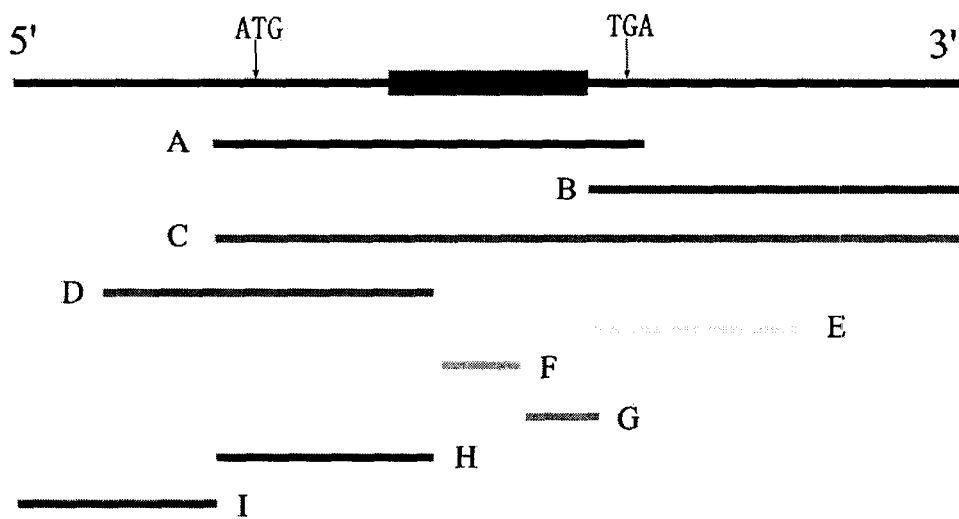


图 4