



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106754756 A

(43) 申请公布日 2017. 05. 31

(21) 申请号 201510822766. 2

(22) 申请日 2015. 11. 23

(71) 申请人 中国科学院武汉物理与数学研究所
地址 430071 湖北省武汉市小洪山西 30 号

(72) 发明人 贾凡 徐富强 胡新天 吴诗昊
朱续涛

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001
代理人 龚莹莹 王敏锋

(51) Int. Cl.

C12N 7/01(2006. 01)

C12N 7/04(2006. 01)

A61K 49/00(2006. 01)

C12R 1/93(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子及应用,所述西门利克森林病毒复制子为含有荧光蛋白基因和SEQ ID NO. 4所示序列的pSFV-replicon。利用该复制子可制备出携带绿色荧光蛋白基因且具有单次感染性的SFV病毒,该复制子或其制备的病毒颗粒在非人灵长类,特别是猴神经细胞的标记、细胞精细形态的描绘、神经环路标记、药物筛选平台的建立、药物抑制病毒作用机制、病毒疫苗和诊断试剂的研发、动物模型的建立、病毒复制和致病机制的分析等方面具有广泛的应用价值。

1. 一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子或其制备的病毒类病毒颗粒在制备非人灵长类神经细胞标记药物中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,所述的非人灵长类神经细胞为猴神经细胞。

一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子及应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体涉及一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子及应用。

背景技术

[0002] 人脑是自然界中最为复杂的系统之一,而神经网络是大脑行使功能的基础,神经网络的正常连接,使得机体产生正常的生理活动,如认知、学习、记忆和恐惧等;神经网络的异常往往导致神经疾病的出现,尚无有效手段来治疗这些神经疾病。目前,正常生理活动和致病机制均不清楚,主要的原因在于脑神经网络连接信息的缺乏。因此,开展脑神经环路的研究而绘制高精度的脑功能连接图谱,对于了解人的生理活动和致病机制具有重要的意义。

[0003] 西门利克森林病毒(Semliki forest virus, SFV)属于披膜病毒科甲病毒属,其基因组为单股正链 RNA,长度约为 12kb。基因组编码的多聚蛋白可切割成 4 个结构蛋白(C、P62、6K 和 E1)和 4 个非结构蛋白(nsP1、nsP2、nsP3 和 nsP4)。塞姆利基森林病毒具有广泛的宿主范围,包括:人、鼠、猴等,能够感染神经系统,一方面不利于人类的健康和农业生产,另一方面,这种感染特性可以使得其成为介导外源基因到宿主体内的载体,另外,西门利克森林病毒感染脑神经系统的特性使其成为具备解析神经环路的能力。但是因为存在一系列工艺和技术改造方面的问题,所以目前其还没有应用到细胞精细形态的描绘、灵长类神经环路的标记等方面。而本发明通过一系列的条件优化、系统的改造和升级,获得了一种高效且稳定的具有单次感染特性的表达绿色荧光蛋白的 SFV 系统,明确了其在非人灵长类神经环路应用方面的效果,为开展脑科学研究提供了良好的工具系统。

[0004] 随着分子生物学的不断发展,科学家已经能够通过反向遗传学的手段来定向改造病毒,为深入开展相关的病毒学研究提供了良好的工具。因此,本发明分别采用不同的技术途径获得了一种高效且稳定的具有单次感染特性的表达绿色荧光蛋白的 SFV 系统。将在神经细胞和非神经细胞精细形态的描绘、灵长类和非灵长类解析脑神经环路、病毒抗原表位分析和药物(如抗体药物)筛选、疫苗和诊断试剂的研发、动物模型的建立和病毒复制与致病机制的分析等方面具有广泛的应用价值和前景。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供了一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子,该复制子为含有荧光蛋白基因和 SEQ ID NO. 4 所示序列的 pSFV-replicon。该复制子可用于西门利克森林病毒类病毒颗粒的制备。

[0006] 本发明还有一个目的在于提供了一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子的应用,包括该复制子可用于制备西门利克森林病毒类病毒颗粒。制备出的病毒样颗粒可用于非人灵长类神经细胞快速标记,同时,该复制子还可用于蛋白表

达、基因治疗、神经细胞精细形态的描绘、神经环路的解析、神经环路稀疏标记、病毒抗原表位分析和药物（如抗体药物）筛选、疫苗和诊断试剂的研发、动物模型的建立和病毒复制与致病机制的分析等方面具有广泛的应用价值。

[0007] 为了实现以上目的，本发明采用如下技术方案：

[0008] 一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子，该复制子为含有荧光蛋白基因和 SEQ ID NO. 4 所示序列的 pSFV-replicon。

[0009] 优选的，使用 BamHI+XhoI 酶切 pSFV-replicon (Lundstrom, K et al., (2003) Mol. Ther. 7, 202-209.)，然后采用 Vazyme 同源重组试剂盒将 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:4 片段插入到 pSFV-replicon，将重组产物转化感受态 HB101，PCR 鉴定为阳性的克隆进行培养并抽提质粒进行测序，测序正确的克隆命名为 pSFV-replicon-EGFP，其序列为 SEQ ID NO:8 所示。

[0010] 一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子的应用，包括：

[0011] 1. 西门利克森林病毒复制子制备表达绿色荧光蛋白的单次感染性的西门利克森林病毒类病毒颗粒：

[0012] 使用 NruI 分别酶切 pSFV-replicon-EGFP 和 pSFV-helper (Berglund, P et al., (1993) Biot echnology 11, 916-920.)，使用 MEGAscript SP6 Transcription Kit 分别体外转录酶切后的 pS FV-replicon-EGFP 和 pSFV-helper 为 RNA，并转染 BHK21 细胞，37℃，5% (v/v) CO₂ 培养箱中培养，收集上清，即得。

[0013] 2. 西门利克森林病毒复制子制备出的病毒样颗粒在制备非人灵长类神经细胞快速标记药物中的应用，特别是用于猴神经细胞的快速标记。

[0014] 本发明提供的一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子的制备方法也适合于与西门利克森林病毒同科的病毒的构建，例如委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV) 和辛德毕斯病毒 (Sindbis virus, SINV)。西门利克森林病毒复制子或其制备出的病毒样颗粒不仅可用于非人灵长类神经细胞的快速标记，还可用于蛋白表达、基因治疗、神经细胞精细形态的描绘、神经环路的解析、神经环路稀疏标记、病毒抗原表位分析和药物（如抗体药物）筛选、疫苗和诊断试剂的研发、动物模型的建立和病毒复制与致病机制的分析。

[0015] 本发明与现有技术相比，具有以下优点和效果：

[0016] 1. 本发明提供了一种高效、便捷的表达外源蛋白的类西门利克森林病毒的颗粒，该平台制备的病毒具有可视化的特点，便于开展相关的研究。

[0017] 2. 本发明对于开展非人灵长类神经细胞的标记具有重要价值，同时对于其他应用性研究（如蛋白表达、基因治疗、细胞精细结构描绘、神经环路标记、药物筛选、抗原表位分析、新型疫苗和诊断试剂等）和基础性研究（如复制、包装盒致病机制等）具有重要的现实意义和广泛的应用价值。

[0018] 3. 本发明制备的类病毒颗粒能够在数天的时间内快速标记非人灵长类神经细胞。

[0019] 4. 解析神经环路结构是开展脑科学研究的基础，良好用于神经环路标记的工具对于解析神经环路的结构具有重要意义。SFV 能够感染人和鼠等动物的神经细胞，具有作为神经环路标记的潜力。本发明不仅能够用于非人灵长类动物，而且还能用于非灵长类动物的

脑科学研究。

附图说明

[0020] 图 1 为一种携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒的构建和制备示意图。

[0021] A :一种携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒复制子的构建示意图 ;

[0022] B :一种携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒的制备示意图。

[0023] 图 2 为一种携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒表达荧光示意图。

[0024] A :未转染 RNA 的细胞 ;

[0025] B :共转染 pSFV-replicon-EGFP 和 pSFV-helper 的 RNA 的 BHK21 细胞表达绿色荧光蛋白 ;

[0026] 图 3 为一种携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒单次感染细胞。

[0027] A :类病毒颗粒感染 BHK21 细胞后表达绿色荧光蛋白 ;

[0028] B :类病毒颗粒感染 BHK21 细胞后收集的上清感染 BHK21 细胞,没有荧光蛋白的表达,即没有病毒产生 ;

[0029] 图 4 为一种携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒生长曲线。

[0030] A :类病毒颗粒感染 BHK21 细胞后表达绿色荧光蛋白 ;

[0031] B :不同时间收集类病毒颗粒的滴度分析 ;

[0032] 图 5 为一种稳定携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒快速标记非人灵长类动物(猴)神经细胞的示意图。

[0033] 猴脑感染表达 EGFP 的西门利克森林病毒类病毒颗粒后 2 天,神经细胞被绿色荧光蛋白标记。

具体实施方式

[0034] 本发明所述技术方案,如未特别说明,均为本领域的常规技术。

[0035] 实施例 1 :

[0036] 一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子,包括下述步骤制备步骤 :

[0037] ① 以 pEGFP-N2(Invitrogen 公司)为模板扩增 EGFP 基因,其序列为 SEQ ID NO:1,使用 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 所示引物扩增片段 SEQ ID NO:1 ;以 pSFV-replicon(Lundstrom, K et al., (2003)Mol. Ther. 7, 202-209.)为模板扩增 capsid 的 N 端 102bp(即 C34),其序列为 SEQ ID NO:4,使用 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 所示引物扩增片段 SEQ ID NO:4 ;按常规方式检测回收扩增出的 DNA 片段。C34 和 EGFP 之间通过 F2A 连接,其序列为 SEQ ID NO:7,其序列包含在引物 SEQ ID NO:6 和 SEQ ID NO:2 中。

[0038] PCR 的反应体系均为 50 μ l :5 \times Reaction Buffer :10 μ l,10mM dNTPs :1 μ l,10 μ M Forward Primer :2.5 μ l,10 μ M Reverse Primer :2.5 μ l,Template DNA :0.5 μ l,DNA Polymerase :0.5 μ l,Nuclease-Free Water :33 μ l。扩增条件为 :98 $^{\circ}$ C 60s,98 $^{\circ}$ C 10s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 10min,16 $^{\circ}$ C 10min,30 个循环 ;

[0039] 使用 BamHI 和 XhoI 酶切 pSFV-replicon(Lundstrom, K et al., (2003)Mol. Ther. 7, 202-209.),然后采用 Vazyme 同源重组试剂盒将 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:4 片段

插入到 SFV 复制子质粒 Ubc-SFV-replicon, 将重组产物转化感受态 HB101, PCR 鉴定为阳性的克隆进行培养并抽提质粒进行测序, 测序正确的克隆命名为 pSFV-replicon-EGFP, 其序列为 SEQ ID NO:8 所示。

[0040] 实施例 2:

[0041] 一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子的应用: 制备表达绿色荧光蛋白的单个感染性的西门利克森林病毒类病毒颗粒:

[0042] 用 NruI 分别酶切 pSFV-replicon-EGFP 和 pSFV-helper (Berglund, P et al., (1993) Biotec hnology 11, 916-920.), 使用 MEGAscript SP6 Transcription Kit 分别体外转录酶切后的 pSFV-replicon-EGFP 和 pSFV-helper 为 RNA, 并转染 BHK21 细胞, 37°C, 5% (v/v) CO₂ 培养箱中培养, 通过倒置荧光显微镜观察细胞状态和荧光表达, 在感染后的不同时间收集病毒上清。使用终浓度为 500 μg/ml 的 α-chymotrypsin (Sigma) 在 37 度处理收集的上清 30min, 然后加入终浓度为 250 μg/ml aprotinin (Sigma)。然后检测不同时间点收集病毒的滴度, 选择滴度最高的病毒进行后续的实验。

[0043] 图 2 中 A: 没有转染 RNA 的 BHK21 细胞, 作为实验的对照;

[0044] 图 2 中 B: 共转染 pSFV-replicon-EGFP 和 pSFV-helper 的 RNA 的 BHK21 细胞, 1 天后即可产生绿色的荧光信号, 表明依赖于西门利克森林病毒复制子能高效快速表达外源蛋白。

[0045] 利用实施例 2 所述的方法而制备的表达绿色荧光蛋白的西门利克森林病毒类病毒颗粒经过 α-chymotrypsin 和 aprotinin 处理后, 用于以下实施例。

[0046] 实施例 3:

[0047] 西门利克森林病毒复制子制备出的西门利克森林病毒类病毒颗粒具有单个感染性:

[0048] 取 1 μl 类病毒颗粒感染 BHK21 细胞, 在感染后 1 天观察绿色荧光的表达情况, 并收集培养基上清。取收集的培养基上清 100 μl 感染 BHK21 细胞, 感染后不同时间观察荧光的表达情况。

[0049] 图 3 中 A: 携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒感染 BHK21 细胞后表达绿色荧光蛋白, 表明本发明能够用于体外表达外源蛋白, 具有在体内的应用价值。

[0050] 图 3 中 B: 将感染 BHK21 细胞后收集的上清再次感染新制备的 BHK21 细胞, 观察后不同时间没有观察到荧光蛋白的表达, 表明该病毒样颗粒具有单个感染细胞的特点。

[0051] 实施例 4:

[0052] 西门利克森林病毒复制子制备出的西门利克森林病毒类病毒颗粒生长曲线分析:

[0053] 分别取不同时间点收集的类病毒颗粒 100 μl 感染 BHK21 细胞, 在感染后 2 天观察绿色荧光的表达情况, 并计数荧光细胞的数量, 计算病毒的滴度。

[0054] 图 4 中 A: 携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒感染 BHK21 细胞后表达绿色荧光蛋白。不同时间收集的病毒均能感染 BHK21 细胞, 并表达绿色荧光蛋白, 表明本发明能够用于体外表达外源蛋白, 具有在体内的应用价值。

[0055] 图 4 中 B: 携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒在 BHK21 细胞中的生长曲线。在将 pSFV-replicon-EGFP 和 pSFV-helper 的 RNA 共转染 BHK21 细胞后 1 天, 病毒滴

度即达到 7×10^6 FFU/ml, 而后逐渐升高, 转染后 3 天, 滴度到达 1.8×10^8 FFU/ml。该数据对于选择最佳的时间收集携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒具有重要意义。

[0056] 实施例 5:

[0057] 携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒在标记猴神经细胞中的应用, 其步骤是:

[0058] 手术前, 无菌的条件下肌肉注射氯胺酮 45mg 到猕猴 (体重 4.5kg), 然后肌肉注射戊巴比妥 135mg 和阿托品 0.18mg。然后移除面积为 $7\text{cm} \times 2.8\text{cm}$ 的颅骨, 剥除硬脑膜以暴露皮层, 注射 $4 \mu\text{l}$ 携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒 (滴度是 1.8×10^8 FFU/ml) 定位注射到猴脑 (猕猴, 猴龄 12 年) 到猴脑。当注射器的针头达到目的脑区后, 等待 2min, 然后开始缓慢的注射, 每次注射使用时间约为 20min, 注射完毕后等待约 10min, 然后再拔出针头。术后 3 天, 每天肌肉注射头孢菌素 112.5mg。

[0059] 采用逆差计时的方式分别在取脑组织前 1、2、5、7、10 天麻醉猴后, 用 0.9% (V/V) 生理盐水灌流, 然后用 4% (V/V) 多聚甲醛固定, 取出脑组织浸泡于 4% (V/V) 多聚甲醛液中 2 周, 然后将脑组织先置于 20% (V/V) 蔗糖溶液中 1 天, 然后置于 30% (V/V) 蔗糖溶液中; 将脑组织底部切平, 置于底座上包埋冰冻 1h 后切片; 取脑片后使用荧光显微镜观察。在注射携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒后 2 天, 可见明显的绿色荧光蛋白的表达, 表明携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒能够感染猴脑神经细胞, 并能在其中复制和表达蛋白 (图 5), 该结果表明携带 EGFP 基因的西门利克森林病毒类病毒颗粒具有标记非人灵长类动物神经网络的潜力, 其标记的速度快速 (只需要 2 天), 因此是一种高效的标记非人灵长类动物神经元的工具。

[0060] 最后, 还需要注意的是, 上述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法, 并且以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然, 本发明不限于以上实施例, 还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形, 均应认为是本发明的保护范围。

SEQUENCE LISTING

- <110> 中国科学院武汉物理与数学研究所
 <120> 一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子及应用
 <130> 一种用于非人灵长类神经细胞快速标记的西门利克森林病毒复制子及应用
 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 717
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 1
 atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaage tgcccgtgcc ctggcccacc 180
 ctctgtacca ccctgacctc eggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggetacg tccaggagcg caccatcttc 300
 ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
 ggcataaagg tgaacttcaa gatecgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
 gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
 tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggate actctcggca tggacgagct gtacaag 717
 <210> 2
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 2
 ccttctcaag ctggcgggag acgtcgagtc caaccctggg ccaatggtga gcaagggcg 59
 <210> 3
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <400> 3
 ggatcgacta gtgaactega gttacttgta cagctcgtcc atgcc 45
 <210> 4
 <211> 102
 <212> DNA

<213> 人工序列	
<400> 4	
atgaattaca tccctacgca aacgttttac ggccgccggt ggcgcccgcg cccggcggcc	60
cgtcacctggc cgttgccagge cactccgggtg gctcccgtcg tc	102
<210> 5	
<211> 50	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 5	
aatacacaga attctgattg gatccacat gaattacatc cctacgcaaa	50
<210> 6	
<211> 59	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 6	
ctcccgcag cttgagaagg tcaaaattca acagctgccc ggggacgacg ggagccacc	59
<210> 7	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 7	
cagctgttga attttgacct tctcaagctg gcgggagacg tcgagtccaa ccctgggcca	60
<210> 8	
<211> 11471	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 8	
gatggcggat gtgtgacata cacgacgcca aaagattttg ttccagctcc tgccacctcc	60
gctacgcgag agattaacca cccacgatgg ccgccaagt gcatgttgat attgaggctg	120
acagcccatt catcaagtct ttgcagaagg catttccgtc gttcagaggct gagtcattgc	180
aggtcacacc aatgacat gcaaatgcca gagcattttc gcacctggct accaaattga	240
tcgagcagga gactgacaaa gacacactca tcttgatata cggcagtgcg ccttcagga	300
gaatgatgtc tacgcacaaa taccactgcg tatgccctat gcgcagcgca gaagaccccg	360
aaaggctcgt atgctacgca aagaaactgg cagcggcctc cgggaaggct ctggatagag	420
agatcgcagg aaaaatcacc gacctgcaga ccgtcatggc tacgccagac gctgaatctc	480
ctaccttttg cctgcataca gacgtcacgt gtcgtacggc agccgaagtg gccgtatacc	540
aggacgtgta tgctgtacat gcaccaacat cgctgtacca tcaggcgatg aaagggtgca	600
gaacggcgta ttggattggg ttgacacca ccccgtttat gtttgacgag ctagcaggcg	660
cgtatccaac ctacgccaca aactgggccc acgagcaggt gttacaggcc aggaacatag	720

gactgtgtgc	agcatecttg	actgagggaa	gactcggcaa	actgtccatt	ctccgcaaga	780
agcaattgaa	accttgcgac	acagtcattg	tctcggtagg	atctacattg	tacactgaga	840
gcagaaagct	actgaggagc	tggeacttac	cctccgtatt	ccacctgaaa	ggtaaacaat	900
cctttacctg	taggtgcat	accategtat	catgtgaagg	gtacgtagtt	aagaaaatca	960
ctatgtgccc	cggcctgtac	ggtaaaacgg	tagggtagc	cgtgacgtat	cacgcggagg	1020
gattcctagt	gtgcaagacc	acagacactg	tcaaaggaga	aagagtctca	ttccctgtat	1080
gcacctacgt	cccctcaacc	atctgtgate	aatgactgg	catactagcg	accgacgtca	1140
caccggagga	cgcacagaag	ttgttagtgg	gattgaatca	gaggatagtt	gtgaacggaa	1200
gaacacagcg	aaacactaac	acgatgaaga	actatctgct	tccgattgtg	gccgtcgc	1260
ttagcaagtg	ggcgagggaa	tacaaggcag	accttgatga	tgaaaaacct	ctgggtgtcc	1320
gagagaggtc	acttacttgc	tgctgcttgt	gggcatttaa	aacgaggaag	atgcacacca	1380
tgtacaagaa	accagacacc	cagacaatag	tgaaggtgcc	ttcagagttt	aactcgttcg	1440
tcatcccag	cctatggtct	acaggcctcg	caatcccagt	cagatcacgc	attaagatgc	1500
ttttggccaa	gaagaccaag	cgagagttaa	tacctgttct	cgacgcgtcg	tcagccaggg	1560
atgctgaaca	agaggagaag	gagaggttgg	aggccgagct	gactagagaa	gccttaccac	1620
ccctcgtccc	catcgcgccg	gcgagacgg	gagtcgtcga	cgtcgacgtt	gaagaactag	1680
agtatcacgc	aggtgcaggg	gtcgtggaaa	cacctcgcag	cgcgttgaaa	gtcaccgcac	1740
agccgaacga	cgtactacta	ggaaattacg	tagttctgtc	cccgcagacc	gtgtcaaga	1800
gctccaagtt	ggccccctg	caccctctag	cagagcaggt	gaaaataata	acacataacg	1860
ggagggccgg	cgttaccag	gtcgacggat	atgacggcag	ggcctacta	ccatgtggat	1920
cggccattcc	ggtcctgag	tttcaggctt	tgagcgagag	cgccactatg	gtgtacaacg	1980
aaagggagtt	cgtaacagg	aaactatacc	atattgccgt	tcacggacce	tcgctgaaca	2040
ccgacgagga	gaactacgag	aaagtcagag	ctgaaagaac	tgacgccgag	tacgtgttcg	2100
acgtagataa	aaaatgctgc	gtcaagagag	aggaagcgtc	gggtttggtg	ttggtgggag	2160
agctaacc	cccccgctc	catgaattcg	cctacgaagg	gctgaagatc	aggccgtcgg	2220
caccatataa	gactacagta	gtaggagtct	ttggggttcc	gggatcaggc	aagtctgcta	2280
ttattaagag	cctcgtgacc	aaacacgata	tggtcaccag	cggcaagaag	gagaactgcc	2340
aggaaatagt	caacgacgtg	aagaagcacc	gcgactgga	catccaggca	aaaacagtg	2400
actccatcct	gctaaacggg	tgctcgtcgtg	ccgtggacat	cctatatgtg	gacgaggctt	2460
tcgcttgcca	tcccgttact	ctgctagccc	taattgctct	tgtaaacct	cggagcaaaag	2520
tggtgttatg	cggagacccc	aagcaatgcg	gattcttcaa	tatgatgcag	cttaaggtga	2580
acttcaacca	caacatctgc	actgaagtat	gtcataaaaag	tatatccaga	cgttgcacgc	2640
gtccagtcac	ggccatcgtg	tctacgttgc	actacggagg	caagatgcgc	acgaccaacc	2700
cgtgcaacaa	accataatc	atagacacca	caggacagac	caagcccaag	ccaggagaca	2760
tcgtgttaac	atgcttccga	ggctgggtaa	agcagctgca	gttgactac	cgtggacacg	2820
aagtcatgac	agcagcagca	tctcagggcc	tcacccgcaa	aggggtatac	gccgtaagge	2880
agaaggtgaa	tgaaaatccc	ttgtatgccc	ctgcgtcgga	gcacgtgaat	gtactgctga	2940
cgcgactga	ggataggctg	gtgtggaaaa	cgctggccgg	cgatccctgg	attaaggtcc	3000
tatcaaacat	tccacagggt	aactttacgg	ccacattgga	agaatggcaa	gaagaacacg	3060

acaaaataat	gaaggtgatt	gaaggaccgg	ctgcgcctgt	ggacgcgttc	cagaacaaag	3120
cgaacgtgtg	ttgggcgaaa	agcctggtgc	ctgtcctgga	cactgccgga	atcagattga	3180
cagcagagga	gtggagcacc	ataattacag	catttaagga	ggacagagct	tactctccag	3240
tggtggcctt	gaatgaaatt	tgcaccaagt	actatggagt	tgacctggac	agtggcctgt	3300
tttctgcccc	gaaggtgtcc	ctgtattacg	agaacaacca	ctgggataac	agacctggtg	3360
gaaggatgta	tggattcaat	gccgaacag	ctgccaggct	ggaagctaga	cataccttcc	3420
tgaaggggca	gtggcatacg	ggcaagcagg	cagttatcgc	agaaagaaaa	atccaaccgc	3480
tttctgtgct	ggacaatgta	attcctatca	accgcaggct	gccgcacgcc	ctggtggctg	3540
agtacaagac	ggttaaaggc	agtagggttg	agtggctggt	caataaagta	agagggtacc	3600
acgtcctgct	ggtgagtgag	tacaacctgg	ctttgcctcg	acgcgacgtc	acttggttgt	3660
caccgctgaa	tgtcacaggc	gccgataggt	gctacgacct	aagttagga	ctgccggctg	3720
acgccggcag	gttcgacttg	gtctttgtga	acattcacac	ggaattcaga	atccaccact	3780
accagcagtg	tgtcgaccac	gccatgaagc	tgcagatgct	tgggggagat	gcgctacgac	3840
tgctaaaacc	cggcggcagc	ctcttgatga	gagcttacgg	atacgccgat	aaaatcagcg	3900
aagccgttgt	ttcctcctta	agcagaaagt	tctcgtctgc	aagagtgttg	cgcccggatt	3960
gtgtcaccag	caatacagaa	gtgttcttgc	tgttctccaa	ctttgacaac	ggaaagagac	4020
cctctacgct	acaccagatg	aataccaagc	tgagtgccgt	gtatgccgga	gaagccatgc	4080
acacggccgg	gtgtgcacca	tcttacagag	ttaagagagc	agacatagcc	acgtgcacag	4140
aagcggctgt	ggttaacgca	gctaacgccc	gtggaactgt	aggggatggc	gtatgcaggg	4200
ccgtggcgaa	gaaatggccg	tcagccttta	agggagaagc	aacaccagtg	ggcacaatta	4260
aaacagtcat	gtgcggctcg	taccccgtea	tccacgctgt	agcgcctaata	ttctctgcca	4320
cgactgaagc	ggaaggggac	cgcgaattgg	ccgctgtcta	ccgggcagtg	gccgccgaag	4380
taaacagact	gtcactgagc	agcgtagcca	tcccgtgct	gtccacagga	gtgttcagcg	4440
gcggaagaga	taggctgcag	caatccctca	accatctatt	cacagcaatg	gacgccacgg	4500
acgctgacgt	gaccatctac	tgcagagaca	aaagttggga	gaagaaaatc	caggaagcca	4560
tagacatgag	gacggctgtg	gagttgctca	atgatgacgt	ggagctgacc	acagacttgg	4620
tgagagtgca	cccggacagc	agcctggtgg	gtcgttaagg	ctacagtacc	actgacgggt	4680
cgctgtactc	gtactttgaa	ggtacgaaat	tcaaccaggc	tgctattgat	atggcagaga	4740
tactgacggt	gtggcccaga	ctgcaagagg	caaacgaaca	gatatgccta	tacgcgctgg	4800
gcgaaacaat	ggacaacatc	agatccaaat	gtccggtgaa	cgattccgat	tcatcaacac	4860
ctcccaggac	agtgccctgc	ctgtgccgct	acgcaatgac	agcagaacgg	atcgcccgcc	4920
ttaggtcaca	ccaagttaa	agcatggtgg	tttgctcctc	ttttcccctc	ccgaaatacc	4980
atgtagatgg	ggtgcagaag	gtaaagtgcg	agaaggttct	cctgttcgac	ccgacggtac	5040
cttcagtgg	tagtccgcgg	aagtatgccg	catctacgac	ggaccactca	gatcggtcgt	5100
tacgagggtt	tgacttggac	tggaccaccg	actcgtcttc	cactgccagc	gataccatgt	5160
cgctaccag	tttgcagtcg	tgtgacatcg	actcgatcta	cgagccaatg	gctcccatag	5220
tagtgacggc	tgacgtacac	cctgaaccgg	caggcatcgc	ggacctggcg	gcagatgtgc	5280
atcctgaacc	cgcagaccat	gtggacctgg	agaaccggat	tcctccaccg	cgcccgaaga	5340
gagctgcata	ccttgcctcc	cgcgcgggcg	agcgaccggt	gccggcgccg	agaaagccga	5400

cgctgcccc	aaggactgcg	tttaggaaca	agctgccttt	gacgttcggc	gactttgacg	5460
agcacgaggt	cgatgcgttg	gcctecggga	ttactttcgg	agacttcgac	gacgtcctgc	5520
gactaggccg	cgcggtgca	tatatTTTT	cctcggacac	tggcagcgga	catttacaac	5580
aaaaatccgt	taggcagcac	aatctccagt	gcgcaaac	ggatgcggtc	gaggaggaga	5640
aaatgtacce	gccaaaattg	gatactgaga	gggagaagct	gttgctgctg	aaaaatgcaga	5700
tgcacccate	ggaggctaat	aagagtcgat	accagtctcg	caaagtggag	aacatgaaag	5760
ccacggtggt	ggacaggctc	acatecggggg	ccagattgta	cacgggagcg	gacgtaggcc	5820
gcataccaac	atacgcggtt	cggtaccccc	gccccgtgta	ctccccctacc	gtgatcgaaa	5880
gatttctcaag	ccccgatgta	gcaatcgcag	cgtgcaacga	atacctatcc	agaaattacc	5940
caacagtggc	gtcgtaccag	ataacagatg	aatacgcgc	atacttgac	atggttgacg	6000
ggtcggatag	ttgcttgac	agagcgacat	tctgccccggc	gaagctccgg	tgctaccgga	6060
aacatcatgc	gtaccaccag	ccgactgtac	gcagtgccgt	cccgtcacc	ttcagaaca	6120
cactacagaa	cgtgctagcg	gctgccacca	agagaaactg	caacgtcacg	caaatgcgag	6180
aactaccac	catggactcg	gcagtgttca	acgtggagtg	cttcaagcgc	tatgcctgct	6240
ccggagaata	ttgggaagaa	tatgctaaac	aacctatccg	gataaccact	gagaacatca	6300
ctacctatgt	gaccaaattg	aaaggccccga	aagctgctgc	cttgttcgt	aagaccaca	6360
acttggttcc	gctgcaggag	gttcccatgg	acagattcac	ggtcgcacatg	aaacgagatg	6420
tcaaagtac	tccagggacg	aaacacacag	aggaaagacc	caaagtccag	gtaattcaag	6480
cagcggagcc	attggcgacc	gcttacctgt	gcgcatcca	caggaatta	gtaaggagac	6540
taaagtctgt	gttacgcct	aacgtgcaca	cattgtttga	tatgtcggcc	gaagactttg	6600
acgcgatcat	cgctctcac	ttccaccag	gagaccgggt	tctagagacg	gacattgcat	6660
cattcgacia	aagccaggac	gactccttgg	ctcttacagg	tttaatgatc	ctcgaagatc	6720
taggggtgga	tcagtacctg	ctggacttga	tcgaggcagc	ctttggggaa	atatccagct	6780
gtcacctacc	aactggcacg	cgcttcaagt	tcggagctat	gatgaaatcg	ggcatgtttc	6840
tgactttgtt	tattaacact	gttttgaaca	tcaccatagc	aagcagggta	ctggagcaga	6900
gactactga	ctcgcctgt	gcggccttca	tcggcgacga	caacatcggt	cacggagtga	6960
tctccgacia	gctgatggcg	gagaggtgcg	cgctcgtgggt	caacatggag	gtgaagatca	7020
ttgacgctgt	catgggcaaa	aaacccccat	atTTTTgtgg	gggattcata	gtttttgaca	7080
gcgtcacaca	gaccgcctgc	cgtgtttcag	accacttaa	gcgctgttc	aagtgggta	7140
agccgctaac	agctgaagac	aagcaggacg	aagacaggcg	acgagcactg	agtgcaggag	7200
ttagcaagtg	gttccggaca	ggcttggggg	ccgaactgga	ggtggcacta	acatctaggt	7260
atgaggtaga	gggctgcaaa	agtatcctca	tagccatggc	caccttggcg	agggacatta	7320
aggcgtttaa	gaaattgaga	ggacctgtta	tacacctcta	cggcggtcct	agattgggtgc	7380
gttaatacac	agaattctga	ttggatccac	catgaattac	atccctacgc	aaacgtttta	7440
cgcccgccgg	tgccgcccgc	gcccggcggc	ccgtccctgg	ccgttgcagg	ccactccggt	7500
ggctcccgtc	gtccccgggc	agctgttgaa	ttttgacctt	ctcaagctgg	cgggagacgt	7560
cgagtccaac	cctgggcaaa	tggtgagcaa	gggcgaggag	ctgttcaccg	gggtggtgcc	7620
catcctggtc	gagctggacg	gcgacgtaaa	cggccacaag	ttcagcgtgt	ccggcgaggg	7680
cgaggcgcat	gccacctacg	gcaagctgac	cctgaagttc	atctgcacca	ccggcaagct	7740

gccccgtgccc	tggecccaccc	tegtgaccac	cctgacctac	ggcgtgcagt	gcttcagccg	7800
ctaccccgcac	cacatgaagc	agcacgactt	cttcaagtcc	gccatgcccc	aaggctacgt	7860
ccaggagcgc	accatcttct	tcaaggacga	eggcaactac	aagacccgcg	ccgaggtgaa	7920
gttcgagggc	gacaccctgg	tgaaccgcat	cgagctgaag	ggcatcgact	tcaaggagga	7980
cggcaacatc	ctggggcaca	agctggagta	caactacaac	agccacaacg	tctataatcat	8040
ggccgacaag	cagaagaacg	gcatcaaggt	gaacttcaag	atccgccaca	acatcgagga	8100
cggcagcgtg	cagctcgccg	accactacca	gcagaacacc	cccatcgccg	acggccccgt	8160
gctgctgccc	gacaaccact	acctgagcac	ccagtccgcc	ctgagcaaag	acccaacga	8220
gaagcgcgat	cacatggtec	tgctggagtt	cgtgaccgcc	gccgggatca	ctctcggcat	8280
ggacgagctg	tacaagtaac	tcgagttcac	tagtcgatcc	cgcgcccgct	ttcgaaccta	8340
ggcaagcatg	cgggcccagt	gggtaattaa	ttgaattaca	tccctacgca	aacgttttac	8400
ggccgcccgt	ggcgcccgcg	cccggcggcc	cgtccctggc	cgttgcaggc	cactccggtg	8460
gctcccgtcg	tccccgactt	ccaggcccag	cagatgcagc	aactcatcag	cgccgtaaat	8520
gcgctgacaa	tgagacagaa	cgcaattgct	cctgctagga	gcttaattcg	acgaataatt	8580
ggatTTTTAT	TTTTTTTTgc	aattggTTTT	taatatttcc	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	8640
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaactaga	aatcgcgatt	8700
tctagtctgc	attaatgaat	cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgcg	tattgggcgc	8760
tcttccgctt	cctcgctcac	tgactcgctg	cgctcggctg	ttcggctgcg	gcgagcggta	8820
tcagctcact	caaaggcggg	aatacggtta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	8880
aacatgtgag	caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	8940
TTTTTccata	ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgaccctc	aagtcaaagg	9000
ggcgaaaacc	cgacaggact	ataaaaatac	caggcgtttc	cccctggaag	ctccctcggg	9060
cgctctcctg	ttccaaccct	gccgcttacc	ggatacctgt	ccccctttct	cccttcggga	9120
agcggggcgc	tttctcatag	ctcacgctgt	aggtatctca	gttcgggtgta	ggtcgttcgc	9180
tccaagctgg	gctgtgtgca	caaaccccc	gttcagcccc	accgctgcgc	cttatccggg	9240
aactatcgtc	ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	9300
ggtaacagga	ttagcagagc	gaggtatgta	ggcgggtgcta	cagagttctt	gaagtgggtg	9360
cctaactacg	gctacactag	aagaacagta	tttggatatct	gcgctctgct	gaagccagtt	9420
accttcggaa	aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	aaaccaccgc	tggtagcggg	9480
ggTTTTTTTT	tttgcaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	aaggatctca	agaagatcct	9540
ttgatctttt	ctacggggtc	tgacgctcag	tggaacgaaa	actcacgtta	agggatTTTg	9600
gtcatgagat	tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	taaattaaaa	atgaagTTTT	9660
aaatcaatct	aaagtatata	tgagtaaact	tggtctgaca	gttaccaatg	cttaatcagt	9720
gaggcaccta	tctcagcgat	ctgtctatTT	cgttcatcca	tagttgcctg	actccccgtc	9780
gtgtagataa	ctacgatacg	ggagggcTTa	ccatctggcc	ccagtgtgct	aatgataaccg	9840
cgagaccac	gctcaccggc	tccagattTTa	tcagcaataa	accagccagc	cggaagggcc	9900
gagcgcagaa	gtggctcctg	aactttatcc	gcctccatcc	agtctattaa	ttgttgccgg	9960
gaagctagag	taagtagttc	gccagTTaat	agtttgcgca	acgttgTTg	cattgctaca	10020
ggcatcgtgg	tgtcacgctc	gtcgtttggg	atggcttcat	tcagctccgg	ttcccaacga	10080

tcaaggcgag	ttacatgate	ccccatgttg	tgcaaaaaag	cggttagctc	cttcggtcct	10140
ccgategttg	tcagaagtaa	gttggecgca	gtgttatcac	tcatggttat	ggcagcactg	10200
cataattctc	ttactgtcat	gccatecgta	agatgctttt	ctgtgactgg	tgagtactca	10260
accaagtcac	tctgagaata	gtgtatgcgg	cgaccgagtt	gctcttgccc	ggcgtcaata	10320
cgggataata	ccgcgccaca	tagcagaact	ttaaaagtgc	tcatcattgg	aaaacgttct	10380
tcggggcgaa	aactctcaag	gatettaccg	ctgttgagat	ccagttcgat	gtaaccact	10440
cgtgcacca	actgatcttc	agcatctttt	actttcacca	gcgtttctgg	gtgagcaaaa	10500
acaggaaggc	aaaatgccgc	aaaaaagggg	ataagggcga	cacggaaatg	ttgaatactc	10560
atactcttcc	tttttcaata	ttattgaagc	atztatcagg	gttattgtct	catgagcggg	10620
tacatatattg	aatgtattta	gaaaaataaa	caaatagggg	ttccgcgcac	atttccccga	10680
aaagtgccac	ctgacgtcta	agaaaccatt	attatcatga	cattaaccta	taaaaatagg	10740
cgtatcacga	ggccctttcg	tctcgcgcgt	ttcgggtgatg	acggtgaaaa	cctctgacac	10800
atgcagctcc	cggagacggt	cacagcttgt	ctgtaagcgg	atgccgggag	cagacaagcc	10860
cgtcagggcg	cgtcagcggg	tgttggcggg	tgtcggggct	ggcttaacta	tgcgcatca	10920
gagcagattg	tactgagagt	gcaccattcg	acgctctccc	ttatgcgact	cctgcattag	10980
gaagcagccc	agtagtaggt	tgaggccggt	gagcaccgcc	gccgcaagga	atggtgcatg	11040
caaggagatg	gcgccaaca	gtcccccggc	cacggggcct	gccaccatac	ccacgccgaa	11100
acaagcgctc	atgagcccga	agtggcgagc	ccgatcttcc	ccatcggtga	tgtcggcgat	11160
ataggcgcca	gcaaccgcac	ctgtggcgcc	ggtgatgccg	gccacgatgc	gtccggcgta	11220
gaggatctgg	ctagegatga	ccctgctgat	tggttcgctg	accatttccg	ggtgcgggac	11280
ggcgttacca	gaaactcaga	aggttcgtcc	aaccaaaccg	actctgacgg	cagtttacga	11340
gagagatgat	agggtctgct	tcagtaagcc	agatgctaca	caattaggct	tgtacatatt	11400
gtcgttagaa	cgcggctaca	attaatacat	aaccttatgt	atcatacaca	tacgatttag	11460
gtgacactat	a					11471

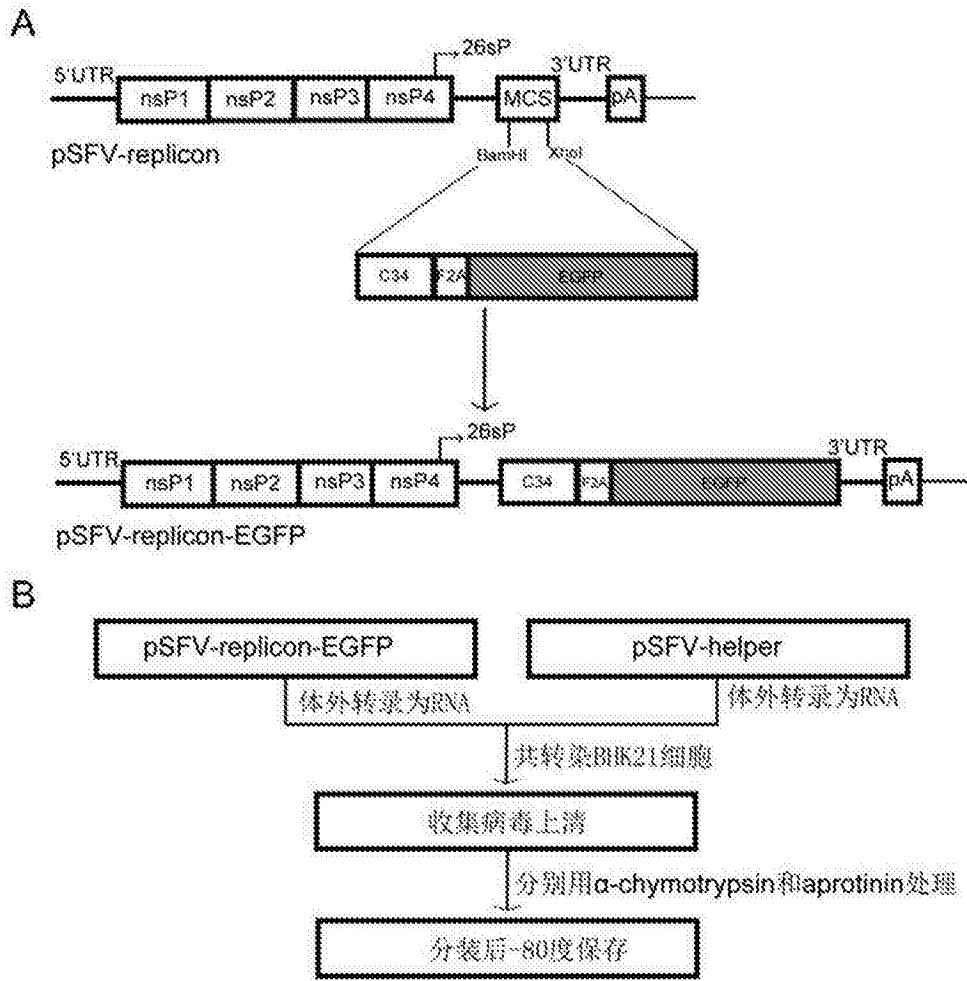


图 1

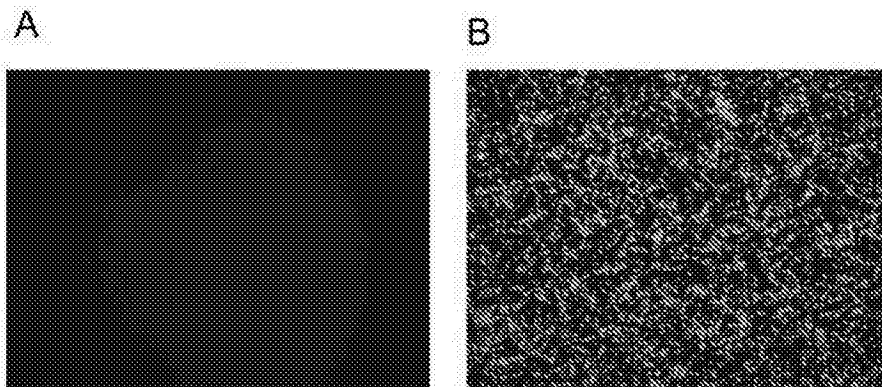


图 2

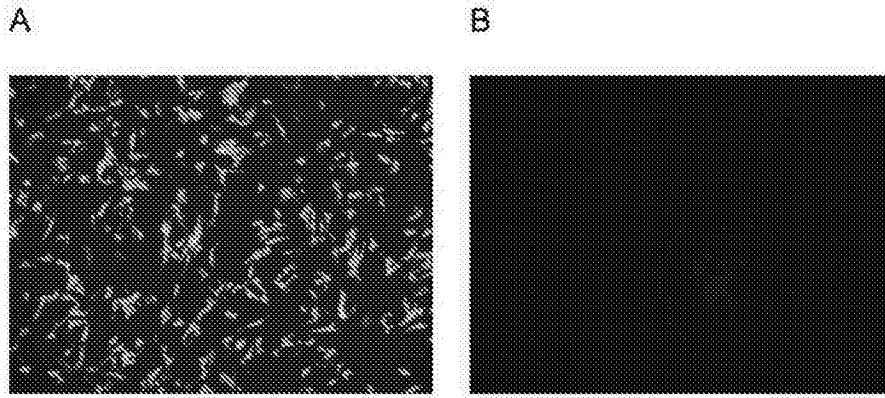


图 3

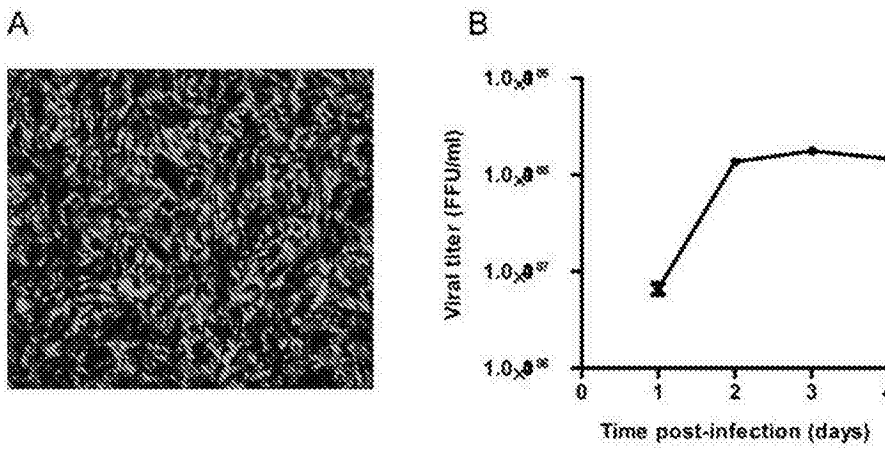


图 4

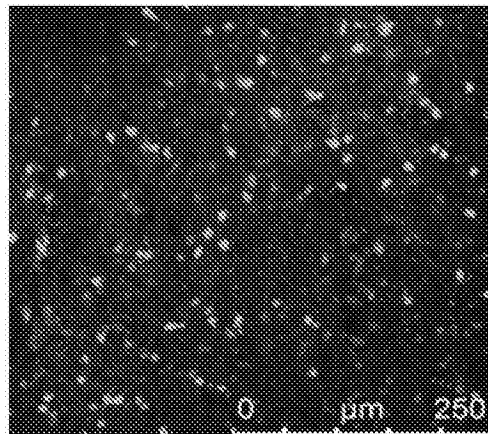


图 5