



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106754756 B

(45)授权公告日 2020.01.14

(21)申请号 201510822766.2

C12R 1/93(2006.01)

(22)申请日 2015.11.23

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106754756 A

US 2006019395 A1,2006.01.26,
Kenneth Lundstrom等.Novel Semliki

(43)申请公布日 2017.05.31

Forest Virus Vectors with Reduced
Cytotoxicity and Temperature Sensitivity
for Long-Term Enhancement of Transgene
Expression.《MOLECULAR THERAPY》.2003,第7卷
(第2期),

(73)专利权人 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

Nele Tamberg等.Insertion of EGFP into
the replicase gene of Semliki Forest
virus results in a novel, genetically
stable marker virus.《Journal of General
Virology》.2007,第88卷

(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

审查员 刘东川

(51)Int.Cl.

C12N 7/01(2006.01)

C12N 7/04(2006.01)

A61K 49/00(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,所述的复制子的序列为SEQ ID NO:8所示。

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 SP6Transcription 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°C,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(Venezu elan 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 $^{\circ}$ C60s,98 $^{\circ}$ C10s,55 $^{\circ}$ C15s,72 $^{\circ}$ C60s,72 $^{\circ}$ C10min,16 $^{\circ}$ C10min,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 SP6Transcription 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500μg/ml的α-chymotrypsin (Sigma) 在37度处理收集的上清30min,然后加入终浓度为250μg/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1μl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100μl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100μl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7cm×2.8cm的颅骨,剥除硬脑膜以暴露皮层,注射4 μ 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。

[0001]		SEQUENCE LISTING	
[0002]	<110>	中国科学院武汉物理与数学研究所	
[0003]	<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	
[0004]	<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	
[0005]	<160>	8	
[0006]	<170>	PatentIn version 3.1	
[0007]	<210>	1	
[0008]	<211>	717	
[0009]	<212>	DNA	
[0010]	<213>	人工序列	
[0011]	<400>	1	
[0012]		atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
[0013]		ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
[0014]		ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
[0015]		ctctgacca ccctgacctc cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
[0016]		cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggetacg tccaggagcg caccatcttc	300
[0017]		ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgagg cgacaccctg	360
[0018]		gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
[0019]		aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
[0020]		ggcatcaagg tgaactcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
[0021]		gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
[0022]		tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gacccaacg agaagcgcga tcacatggtc	660
[0023]		ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgca tggacgagct gtacaag	717
[0024]	<210>	2	
[0025]	<211>	59	
[0026]	<212>	DNA	
[0027]	<213>	人工序列	
[0028]	<400>	2	
[0029]		ccttetcaag ctggcgggag acgtcgagtc caaccctggg ccaatggtga gcaagggcg	59
[0030]	<210>	3	
[0031]	<211>	45	
[0032]	<212>	DNA	
[0033]	<213>	人工序列	
[0034]	<400>	3	
[0035]		ggatcgacta gtgaactcga gttacttgta cagctcgtcc atgcc	45
[0036]	<210>	4	
[0037]	<211>	102	
[0038]	<212>	DNA	
[0039]	<213>	人工序列	
[0040]	<400>	4	
[0041]		atgaattaca tccctacgca aacgttttac ggccgccggt ggcgcccgcg cccggcggcc	60

[0042]	cgtcctggc cgttgcaggc cactccgggtg gctcccgtcg tc	102
[0043]	<210> 5	
[0044]	<211> 50	
[0045]	<212> DNA	
[0046]	<213> 人工序列	
[0047]	<400> 5	
[0048]	aatacacaga attctgattg gatccacat gaattacatc cctacgcaaa	50
[0049]	<210> 6	
[0050]	<211> 59	
[0051]	<212> DNA	
[0052]	<213> 人工序列	
[0053]	<400> 6	
[0054]	ctcccgcag cttgagaagg tcaaaattca acagctgccc ggggacgacg ggagccacc	59
[0055]	<210> 7	
[0056]	<211> 60	
[0057]	<212> DNA	
[0058]	<213> 人工序列	
[0059]	<400> 7	
[0060]	cagctgttga attttgacct tctcaagctg gcgggagacg tcgagtcaa ccctgggcca	60
[0061]	<210> 8	
[0062]	<211> 11471	
[0063]	<212> DNA	
[0064]	<213> 人工序列	
[0065]	<400> 8	
[0066]	gatggcggat gtgtgacata cacgacgcca aaagatthttg ttccagctcc tgccacctcc	60
[0067]	gctacgcgag agattaacca cccacgatgg ccgcaaaagt gcatgttgat attgaggctg	120
[0068]	acagcccatt catcaagtct ttgcagaagg catttccgtc gttcgaggtg gagtcattgc	180
[0069]	aggtcacacc aatgacat gcaaatgcca gagcattttc gcacctggct accaaattga	240
[0070]	tcgagcagga gactgacaaa gacacaetca tcttgatata cggcagtgcg ccttcagga	300
[0071]	gaatgatgtc tacgcacaaa taccactgcg tatgcctat gcgcagcgca gaagaccccg	360
[0072]	aaaggctcgt atgctacgca aagaaactgg cagcggcctc cgggaaggtg ctggatagag	420
[0073]	agatcgcagg aaaaatcacc gacctgcaga ccgtcatggc tacgccagac gctgaatctc	480
[0074]	ctaccttttg cctgcataca gacgtcacgt gtcgtacggc agccgaagtg gccgtatacc	540
[0075]	aggacgtgta tgctgtacat gcaccaacat cgctgtacca tcaggcgatg aaaggtgtca	600
[0076]	gaacggcgta ttgattggg tttgacacca ccccgtttat gtttgacgcg ctagcaggcg	660
[0077]	cgatatccaac ctacgccaca aactgggccc acgagcaggt gttacaggcc aggaacatag	720
[0078]	gactgtgtgc agcatccttg actgagggaa gactcggcaa actgtccatt ctccgcaaga	780
[0079]	agcaattgaa accttgcgac acagtcatgt tctcggtagg atctacattg tacactgaga	840
[0080]	gcagaaagct actgaggagc tggcacttac cctccgtatt ccacctgaaa ggtaaacaat	900
[0081]	cctttacctg taggtgcgat accatcgtat catgtgaagg gtacgtagtt aagaaaatca	960
[0082]	ctatgtgccc cggcctgtac ggtaaaacgg tagggtacgc cgtgacgtat cacgcggagg	1020
[0083]	gattcctagt gtgcaagacc acagacactg tcaaaaggaga aagagtctca ttccctgtat	1080

[0084]	gcacctacgt cccctcaacc atctgtgata aatgactgg catactagcg accgacgtca	1140
[0085]	caccggagga cgcacagaag ttgttagtgg gattgaatca gaggatagtt gtgaacggaa	1200
[0086]	gaacacagcg aaacactaac acgatgaaga actatctgct tccgattgtg gccgtcgcat	1260
[0087]	ttagcaagtg ggcgagggaa tacaaggcag accttgatga tgaaaaacct ctgggtgtcc	1320
[0088]	gagagaggtc acttacttgc tgctgcttgt gggcatttaa aacgaggaag atgcacacca	1380
[0089]	tgtacaagaa accagacacc cagacaatag tgaaggtgcc ttcagagttt aactcgttcg	1440
[0090]	tcateccgag cctatggtct acaggcctcg caateccagt cagatcacgc attaagatgc	1500
[0091]	ttttggccaa gaagaccaag cgagagttaa tacctgttct cgacgcgtcg tcagccaggg	1560
[0092]	atgctgaaca agaggagaag gagaggttg aggccgagct gactagagaa gccttaccac	1620
[0093]	ccctcgtecc catcgcgccg gcggagacgg gagtcgtcga cgtcgacgtt gaagaactag	1680
[0094]	agtatcacgc aggtgcaggg gtcgtggaaa cacctcgag cgcgttgaaa gtcaccgcac	1740
[0095]	agccgaacga cgtactacta ggaaattac tagttctgtc cccgcagacc gtgctcaaga	1800
[0096]	gctccaagtt ggccccgtg caccctctag cagagcaggt gaaaataata acacataacg	1860
[0097]	ggagggccgg ccgttaccag gtcgacggat atgacggcag ggtcctacta ccatgtggat	1920
[0098]	cggccattcc ggtccctgag tttcaggctt tgagcgagag cgccactatg gtgtacaacg	1980
[0099]	aaaggagtt cgtcaacagg aaactatacc atattgccg tcaaggacc tcgctgaaca	2040
[0100]	ccgacgagga gaactacgag aaagtcagag ctgaaagaac tgacgccgag tacgtgttcg	2100
[0101]	acgtagataa aaaatgctgc gtcaagagag aggaagcgtc gggtttggtg ttggtgggag	2160
[0102]	agctaacc aaacccccgttc catgaattcg cctacgaagg gctgaagatc aggccgtcgg	2220
[0103]	cacatataa gactacagta gtaggagtct ttggggttcc gggatcaggc aagtctgcta	2280
[0104]	ttattaagag cctcgtgacc aaacacgac tggtcaccag cggcaagaag gagaactgcc	2340
[0105]	aggaaatagt caacgacgtg aagaagcacc gcggactgga catccaggca aaaacagtgg	2400
[0106]	actccatcct gctaaacggg tgctcgtcgt ccgtggacat cctatatgtg gacgaggctt	2460
[0107]	tcgcttgcca tcccgtact ctgctagccc taattgctct tgttaaacct cggagcaaag	2520
[0108]	tggtgttatg cggagacccc aagcaatgcg gattcttcaa tatgatgcag ctttaaggtga	2580
[0109]	acttcaacca caacatctgc actgaagtat gtcataaaag tatatccaga cgttgcacgc	2640
[0110]	gtccagtcac ggccatcgtg tctacgttgc actacggagg caagatgcgc acgaccaacc	2700
[0111]	cgtgcaacaa acccataatc atagacacca caggacagac caagcccaag ccaggagaca	2760
[0112]	tcgtgttaac atgcttccga ggctgggtaa agcagctgca gttggactac cgtggacacg	2820
[0113]	aagtcatgac agcagcagca tctcagggcc tcaccgcaa aggggtatac gccgtaaggc	2880
[0114]	agaaggtgaa tgaaaatccc ttgtatgccc ctgcgtcgga gcacgtgaat gtactgtgta	2940
[0115]	cgcgactgga ggataggctg gtgtggaaaa cgctggccgg cgatccctgg attaaggtcc	3000
[0116]	tatcaaacat tccacagggt aactttacgg ccacattgga agaattggca gaagaacacg	3060
[0117]	acaaaataat gaaggtgatt gaaggaccgg ctgcgcctgt ggacgcgttc cagaacaaag	3120
[0118]	cgaacgtgtg ttggcgaaa agcctggtgc ctgtcctgga cactgccgga atcagattga	3180
[0119]	cagcagagga gtggagcacc ataattacag catttaagga ggacagagct tactctccag	3240
[0120]	tggtggcctt gaatgaaatt tgcaccaagt actatggagt tgacctggac agtggcctgt	3300
[0121]	tttctgcccc gaaggtgtcc ctgtattacg agaacaacca ctgggataac agacctggtg	3360
[0122]	gaaggatgta tggattcaat gccgcaacag ctgccaggct ggaagctaga cataccttc	3420
[0123]	tgaaggggca gtggcatacg ggcaagcagg cagttatcgc agaaagaaaa atccaaccgc	3480
[0124]	tttctgtgct ggacaatgta attcctatca accgcaggct gccgcacgcc ctggtggctg	3540
[0125]	agtacaagac ggttaaaggc agtagggttg agtggctggt caataaagta agagggtacc	3600

[0126]	acgtcctgct ggtgagtgag tacaacctgg ctttgccctg acgcgacgtc acttggttgt	3660
[0127]	caccgctgaa tgtcacaggc gccgataggt gctacgacct aagtttagga ctgccggctg	3720
[0128]	acgccggcag gttcgacttg gtctttgtga acattcacac ggaattcaga atccaccact	3780
[0129]	accagcagtg tgtcgaccac gccatgaagc tgcagatgct tgggggagat gcgctacgac	3840
[0130]	tgctaaaacc cggcggcagc ctcttgatga gagcttacgg atacgccgat aaaatcagcg	3900
[0131]	aagccgttgt ttctcctta agcagaaagt tctcgtctgc aagagtgttg cgcccggatt	3960
[0132]	gtgtcaccag caatacagaa gtgttcttgc tgttctccaa ctttgacaac ggaaagagac	4020
[0133]	cctctacgct acaccagatg aataccaagc tgagtgccgt gtatgccgga gaagccatgc	4080
[0134]	acacggccgg gtgtgcacca tcctacagag ttaagagagc agacatagcc acgtgcacag	4140
[0135]	aagcggctgt ggttaacgca gctaaccgcc gtggaactgt aggggatggc gtatgcaggg	4200
[0136]	ccgtggcgaa gaaatggccg tcagcctta agggagaagc aacaccagtg ggcacaatta	4260
[0137]	aaacagtcat gtgcggctcg taccctgca tccacgctgt agcgcctaat ttctctgcca	4320
[0138]	cgactgaagc ggaaggggac cgcgaattgg ccgctgtcta ccgggcagtg gccgccgaag	4380
[0139]	taaacagact gtactgagc agcgtagcca tcccgtgct gtccacagga gtgttcagcg	4440
[0140]	gcggaagaga taggctgcag caatccctca accatctatt cacagcaatg gacgccacgg	4500
[0141]	acgtgacgt gaccatctac tgcagagaca aaagttggga gaagaaaatc caggaagcca	4560
[0142]	tagacatgag gacggctgtg gagttgctca atgatgacgt ggagctgacc acagacttgg	4620
[0143]	tgagagtgca cccggacagc agcctggtgg gtcgtaaggc ctacagtacc actgacgggt	4680
[0144]	cgctgtactc gtactttgaa ggtacgaaat tcaaccaggc tgctattgat atggcagaga	4740
[0145]	tactgacgtt gtggcccaga ctgcaagagg caaacgaaca gatatgccta tacgcgctgg	4800
[0146]	gcgaaacaat ggacaacatc agatccaaat gtccggtgaa cgattccgat tcatcaacac	4860
[0147]	ctcccaggac agtgcctgc ctgtgccgt acgcaatgac agcagaacgg atcgcgcccc	4920
[0148]	ttaggtcaca ccaagttaa agcatggtgg tttgctcctc ttttcccctc ccgaaatacc	4980
[0149]	atgtagatgg ggtgcagaag gtaaagtgcg agaaggttct cctgttcgac ccgacggtac	5040
[0150]	cttcagtggg tagtccgcgg aagtatgcc catctacgac ggaccactca gatcggtcgt	5100
[0151]	tacgagggtt tgacttgac tggaccaccg actcgtcttc cactgccage gataccatgt	5160
[0152]	cgctaccagc tttgcagtcg tgtgacatcg actcgatcta cgagccaatg gctcccatag	5220
[0153]	tagtgacggc tgacgtacac cctgaaccgg caggcatcgc ggacctggcg gcagatgtgc	5280
[0154]	atctgaacc cgcagaccat gtggacctgg agaaccgat tctccaccg cgcccgaaga	5340
[0155]	gagctgcata cttgcctcc cgcgcggcgg agcgaccggt gccggcgccg agaaagccga	5400
[0156]	cgctgcccc aaggactgcg tttaggaaca agctgccttt gacgttcggc gactttgacg	5460
[0157]	agcacgaggt cgatgcgttg gcctccggga ttactttcgg agacttcgac gacgtcctgc	5520
[0158]	gactaggccg cgcgggtgca tatattttct cctcggacac tggcagcggga catttacaac	5580
[0159]	aaaaatccgt taggcagcac aatctccagt gcgcacaact ggatgcggtc gaggaggaga	5640
[0160]	aaatgtacc gccaaaattg gatactgaga gggagaagct gttgctgctg aaaatgcaga	5700
[0161]	tgcaccatc ggaggctaat aagagtcgat accagtctcg caaagtggag aacatgaaag	5760
[0162]	ccacggtggt ggacaggctc acatcggggg ccagattgta cacgggagcg gacgtaggcc	5820
[0163]	gcataccaac atacgcggtt cggtagcccc gccctgtgta ctcccctacc gtgategaaa	5880
[0164]	gattctcaag ccccgatgta gcaatcgcag cgtgcaacga atacctatcc agaaattacc	5940
[0165]	caacagtggc gtcgtaccag ataacagatg aatacgcgc atacttgac atggttgacg	6000
[0166]	ggtcggatag ttgcttgac agagcgacat tctgccggc gaagctccgg tgctaccga	6060
[0167]	aacatcatgc gtaccaccag ccgactgtac gcagtgccgt cccgtcacc tttcagaaca	6120

[0168]	cactacagaa	cgtagctagcg	gctgccacca	agagaaactg	caacgtcacg	caaatgcgag	6180
[0169]	aactaccac	catggactcg	gcagtgttca	acgtggagtg	cttcaagcgc	tatgcctgct	6240
[0170]	ccggagaata	ttgggaagaa	tatgctaaac	aacctatccg	gataaccact	gagaacatca	6300
[0171]	ctacctatgt	gaccaaattg	aaaggcccga	aagctgctgc	cttgttcgtc	aagaccaca	6360
[0172]	acttggttcc	gctgcaggag	gttcccatgg	acagattcac	ggtcgacatg	aaacgagatg	6420
[0173]	tcaaagtcac	tccaggagac	aaacacacag	aggaaagacc	caaagtccag	gtaattcaag	6480
[0174]	cagcggagcc	attggcgacc	gcttacctgt	gcggcatcca	cagggaatta	gtaaggagac	6540
[0175]	taaagtctgt	gttacgcct	aacgtgcaca	cattgtttga	tatgtcggcc	gaagactttg	6600
[0176]	acgcgatcat	cgctctcac	ttccaccag	gagaccggg	tctagagacg	gacattgcat	6660
[0177]	cattcgacaa	aagccaggac	gactccttgg	ctcttacagg	tttaatgac	ctcgaagac	6720
[0178]	taggggtgga	tcaatctctg	ctggacttga	tcgaggcagc	ctttggggaa	atatccagct	6780
[0179]	gtcactacc	aactggcagc	cgcttcaagt	tcggagctat	gatgaaatcg	ggcatgtttc	6840
[0180]	tgactttgtt	tattaacact	gttttgaaca	tcaccatagc	aagcagggta	ctggagcaga	6900
[0181]	gactactga	ctccgcctgt	gcggccttca	tcggcgacga	caacatcgtt	cacggagtga	6960
[0182]	tctccgacaa	gctgatggcg	gagagtgctg	cgctcgtggg	caacatggag	gtgaagatca	7020
[0183]	ttgacgctgt	catggcgcaa	aaacccccat	atTTTTgtgg	gggattcata	gtttttgaca	7080
[0184]	gcgtcacaca	gaccgcctgc	cggtttcag	accacttaa	gcgcctgttc	aagttgggta	7140
[0185]	agccgtaac	agctgaagac	aagcaggacg	aagacaggcg	acgagcactg	agtgcagagg	7200
[0186]	ttagcaagtg	gttccggaca	ggcttggggg	ccgaactgga	ggtggcacta	acatctaggt	7260
[0187]	atgaggtaga	gggtgcaaaa	agtatcctca	tagccatggc	caccttggcg	aggacatta	7320
[0188]	aggcgtttaa	gaaattgaga	ggacctgtta	tacacctcta	cgccggtcct	agattggtgc	7380
[0189]	gttaatacac	agaattctga	ttgatccac	catgaattac	atccctacgc	aaacgtttta	7440
[0190]	cgccgcccg	tgccgccgcg	gcccggcggc	ccgtccctgg	ccgttgcagg	ccactccggt	7500
[0191]	ggctccgctc	gtccccgggc	agctgttgaa	ttttgacctt	ctcaagctgg	cgggagacgt	7560
[0192]	cgagtccaac	cctgggcaaa	tggtgagcaa	ggcgaggag	ctgttcaccg	gggtggtgcc	7620
[0193]	catcctggtc	gagctggacg	gcgacgtaaa	cgccacaag	ttcagcgtgt	ccggcgaggg	7680
[0194]	cgagggcgat	gccacctacg	gcaagctgac	cctgaagttc	atctgcacca	ccggcaagct	7740
[0195]	gcccgtgccc	tgccccaccc	tcgtgaccac	cctgacctac	ggcgtgcagt	gcttcagccc	7800
[0196]	ctaccccgac	cacatgaagc	agcacgactt	cttcaagtc	gccatgccc	aaggctacgt	7860
[0197]	ccaggagcgc	accatcttct	tcaaggacga	cgccaactac	aagaccgcg	ccgaggtgaa	7920
[0198]	gttcgagggc	gacaccctgg	tgaaccgat	cgagctgaag	ggcatcgact	tcaaggagga	7980
[0199]	cgccaacatc	ctggggcaca	agctggagta	caactacaac	agccacaacg	tctatatcat	8040
[0200]	ggccgacaag	cagaagaacg	gcatcaaggt	gaacttcaag	atccgccaca	acatcgagga	8100
[0201]	cggcagcgtg	cagctcgccg	accactacca	gcagaacacc	cccatcggcg	acggccccgt	8160
[0202]	gctgctgccc	gacaaccact	acctgagcac	ccagtccgcc	ctgagcaaa	accccaacga	8220
[0203]	gaagcgcgat	cacatggtcc	tgctggagtt	cgtagaccgc	gccgggatca	ctctcggcat	8280
[0204]	ggacgagctg	tacaagtaac	tcgagttcac	tagtcgatcc	cgcgccgct	ttcgaaccta	8340
[0205]	ggcaagcatg	cgggcccagt	gggtaattaa	ttgaattaca	tcctacgca	aacgttttac	8400
[0206]	ggccgccggt	ggcgcccgcg	cccggcgccc	cgctccctgg	cgttgcagge	cactccggtg	8460
[0207]	gctcccgtcg	tccccgactt	ccaggcccag	cagatgcagc	aactcatcag	cgccgtaaat	8520
[0208]	gcgctgacaa	tgagacagaa	cgcaattgct	cctgctagga	gcttaattcg	acgaataatt	8580
[0209]	ggatTTTTat	TTTTTTTTgc	aattggtttt	taatatTTcc	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	8640

[0210]	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaactaga aatcgcgatt	8700
[0211]	tctagtctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc	8760
[0212]	tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg ttccgctcgc gcgagcggta	8820
[0213]	tcagctcact caaaggcgg aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaag	8880
[0214]	aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg	8940
[0215]	ttttccata ggctccgcc ccctgacgag catcacaata atcgaccctc aagtcaaagg	9000
[0216]	gggcgaaacc cgacaggact ataaaaatac caggcgttc cccctggaag ctccctcggg	9060
[0217]	cgctctcctg ttccaacct gccgcttacc ggatacctgt cccctttct ccttcggga	9120
[0218]	agcggggcgc tttctcatag ctacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc	9180
[0219]	tccaagctgg gctgtgtgca caaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt	9240
[0220]	aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cagcacttat cgccactggc agcagccact	9300
[0221]	ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcgggtgcta cagagttctt gaagtggtag	9360
[0222]	cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt	9420
[0223]	accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg	9480
[0224]	ggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct	9540
[0225]	ttgatctttt ctacggggtc tgacgtcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg	9600
[0226]	gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatcctt taaattaaaa atgaagtttt	9660
[0227]	aatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt	9720
[0228]	gaggcaccta tctcagcgt ctgtctatct cgttcatcca tagttgctg actccccgtc	9780
[0229]	gtgtagataa ctacgatac ggagggtta ccatctggcc ccagtctgc aatgataccg	9840
[0230]	cgagaccac gtcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaaggcc	9900
[0231]	gagcgcagaa gtggtcctgc aactttatcc gcctcatcc agtctattaa ttggtgccc	9960
[0232]	gaagctagag taagtagttc gccagttaat agtttgccga acgttgttgc cattgctaca	10020
[0233]	ggcatcgtgg tgacacgctc gtcgtttggt atggttcat tcagctccg tteccaacga	10080
[0234]	tcaaggcgag ttacatgat ccccatgtt tgcaaaaaag cggttagct cttcggctct	10140
[0235]	ccgatcgttgc tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg	10200
[0236]	cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgcttt ctgtgactgg tgagtactca	10260
[0237]	accaagtcac tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata	10320
[0238]	cgggataata ccgcgccaca tagcagaact taaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct	10380
[0239]	tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgt gtaaccact	10440
[0240]	cgtgcacca actgatctc agcatcttt actttacca gcgtttctgg gtgagcaaaa	10500
[0241]	acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcgca cacggaatg ttgaatactc	10560
[0242]	atactcttcc ttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgg	10620
[0243]	tacatatttg aatgtattta gaaaaataa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga	10680
[0244]	aaagtccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg	10740
[0245]	cgtatcacga ggcccttcg tctcgcgctg ttcggtagat acggtgaaaa cctctgacac	10800
[0246]	atgcagctcc cggagacgg cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc	10860
[0247]	cgtcagggcg cgtcagcggg tgttggcggg tgctggggct ggcttaacta tgcggcatca	10920
[0248]	gagcagattg tactgagagt gcaccattcg acgctctccc ttatgcgact cctgcattag	10980
[0249]	gaagcagccc agtagtaggt tgaggccgtt gagcaccgcc gccgcaagga atggtgcatg	11040
[0250]	caaggagatg gcgccaaca gtccccggc cacggggcct gccaccatac ccacccgaa	11100
[0251]	acaagcgtc atgagcccga agtggcgagc ccgatcttcc ccatcggtga tctcggcgat	11160

[0252]	ataggcgcca gcaaccgcac ctgtggcgcc ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta	11220
[0253]	gaggatctgg ctagcgatga ccctgctgat tggttcctg accatttccg ggtgcgggac	11280
[0254]	ggcgttacca gaaactcaga aggttcgtcc aaccaaaccg actctgacgg cagtttacga	11340
[0255]	gagagatgat aggttctgct tcagtaagcc agatgctaca caattaggct tgtacatatt	11400
[0256]	gtcgtagaa cgcggctaca attaatacat aaccttatgt atcatacaca tacgatttag	11460
[0257]	gtgacactat a	11471

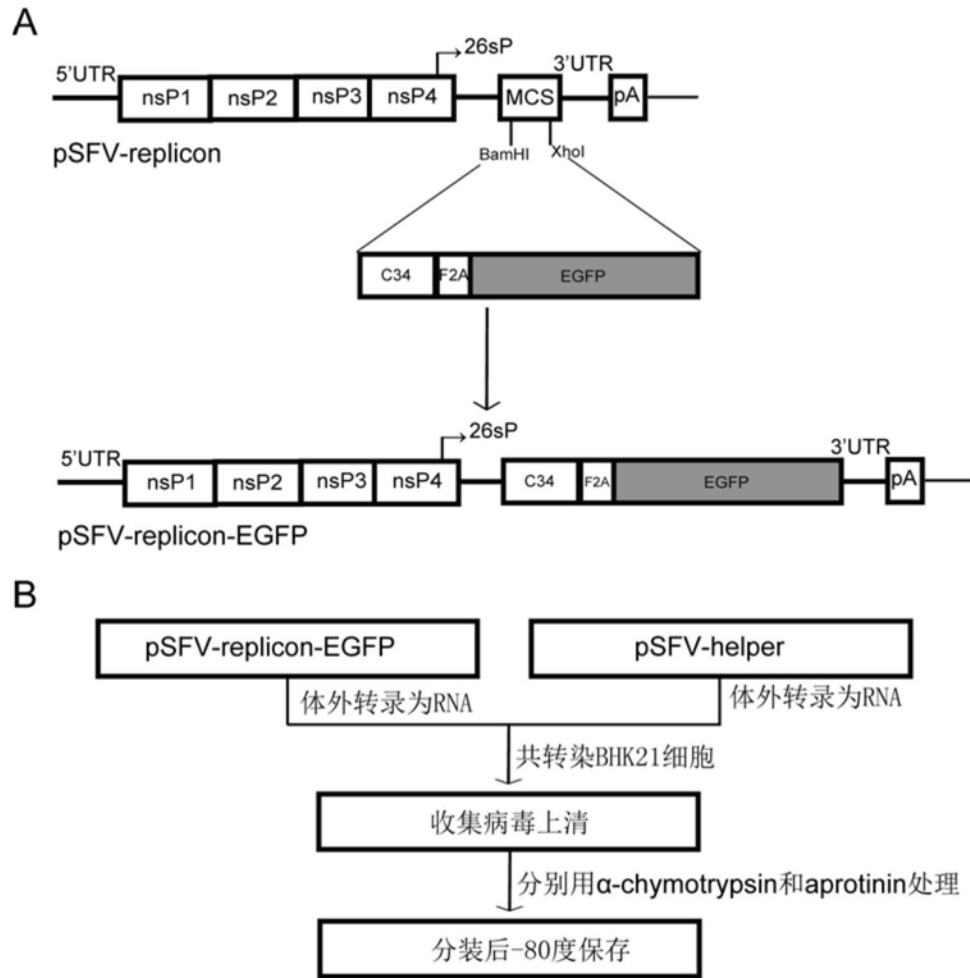


图1

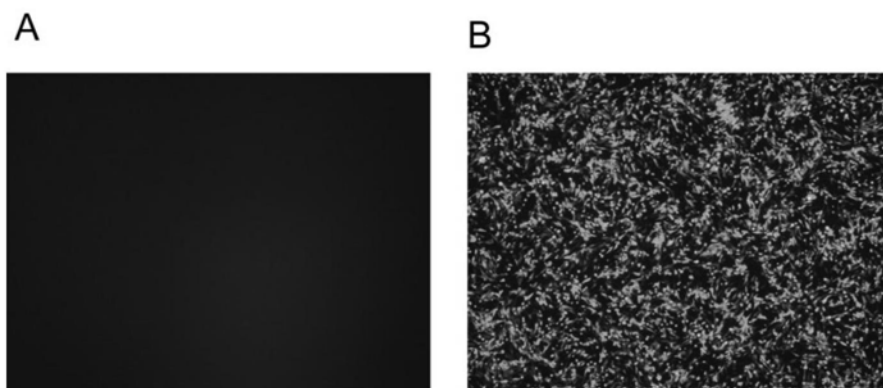


图2

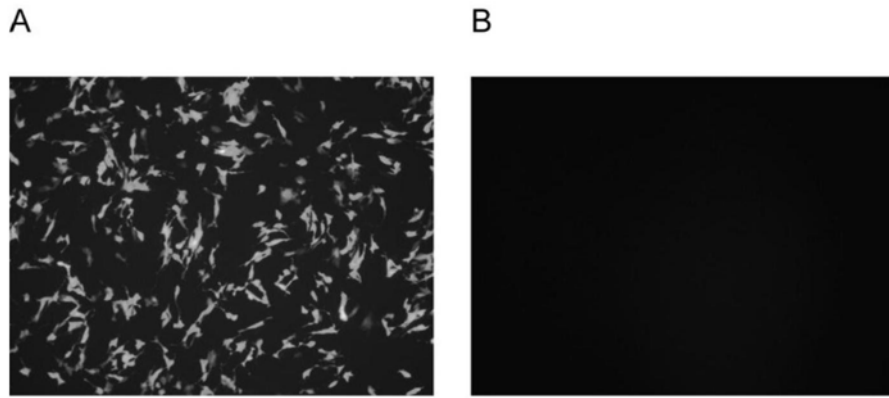


图3

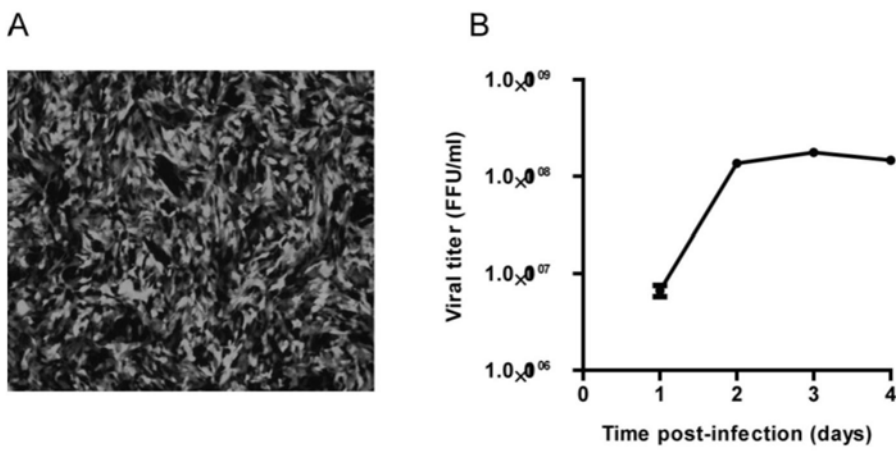


图4

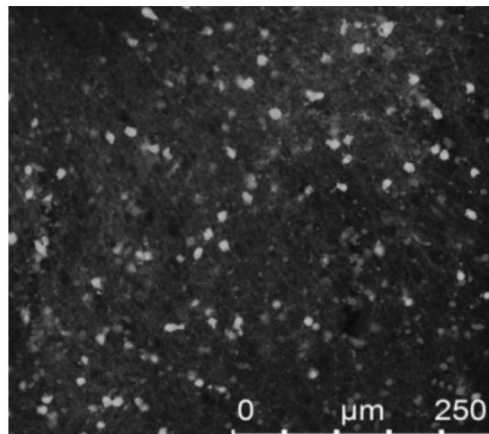


图5