



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1867669 B

(45) 授权公告日 2011.10.19

(21) 申请号 200480030037.3
 (22) 申请日 2004.10.12
 (30) 优先权数据
 0324044.7 2003.10.14 GB
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2006.04.13
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/SE2004/001453 2004.10.12
 (87) PCT申请的公布数据
 W02005/038019 EN 2005.04.28
 (73) 专利权人 阿斯特拉曾尼卡有限公司
 地址 瑞典南泰利耶
 (72) 发明人 C·芬格 A·勒夫格伦 A·特林
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 程淼 刘玥
 (51) Int. Cl.
 C12N 5/10 (2006.01)
 C12N 15/81 (2006.01)
 C12N 15/85 (2006.01)
 C12N 15/79 (2006.01)

gamma-carboxylation of recombinant factor X using a chimeric construct containing the prothrombin propeptide..Biochemistry39 46.2000,14322-4329.
 Jorgensen Maria J., et al..Expression of completely γ - carboxylated recombinanthuman prothrombin..The Journal of Biological Chemistry262 14.1987,6729-6734.
 Kaufman Randal J., et al.. Expression, purification, and characterization of recombinant γ -carboxylated factor IX synthesized in chinese hamster ovary cells..The Journal of Biological Chemistry261 21.1986,9622-9628.
 Hallgren, Kevin W., et al..Carboxylaseoverexpressingineffectsfullcarboxylationbutpoorrelease andsecretion offactorIX:implication forthereleaseof vitaminK-dependentproteins..Biochemistry41 .2002,15045-15055.

审查员 宋智刚

(56) 对比文件
 WO 0229045 A2, 2002.04.11, 权利要求 1 - 66.
 Camire RM, et al..Enhanced

权利要求书 3 页 说明书 47 页
 序列表 24 页 附图 2 页

(54) 发明名称
 生产伽马-羧化的蛋白的方法

(57) 摘要
 本发明涉及生产大量的伽马-羧化的蛋白的方法和工具,包括:(i) 培养细胞,所述细胞被改造来以至少 10 : 1 的比例表达需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶,在适合于表达这两种蛋白的条件下培养,和(ii) 分离伽马-羧化的蛋白。

CN 1867669 B

1. 一种包含至少一种表达载体的真核宿主细胞,所述表达载体包含编码需要伽马-羧化作用的蛋白的核酸分子和相连的包含第一启动子的表达控制序列,和编码 γ -谷氨酰羧化酶的核酸分子和相连的包含第二启动子的表达控制序列,

其中第一启动子选自人类巨细胞病毒 (hCMV) 即时-早期启动子, pEF-1 α , pRSV 或 pUbC, 并且

第二启动子选自 SV40 即时早期启动子,最小化的 FIX 启动子或 HSV 胸苷激酶启动子。

2. 如权利要求 1 中所要求的真核宿主细胞,其中所述核酸分子在单个表达载体中。

3. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述第一启动子是人类巨细胞病毒 (hCMV) 即时-早期启动子,和所述第二启动子是 SV40 早期启动子。

4. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白选自由凝固因子 VII、凝固因子 IX、凝血酶原(凝固因子 II)、凝固因子 X、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、骨 Gla 蛋白、基质 Gla 蛋白、生长停滞-特异性蛋白 6 和 Acanthophiinae FXa-样蛋白构成的组。

5. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是维生素 K 依赖性凝固因子。

6. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 IX。

7. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 X。

8. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是凝血酶原。

9. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是蛋白 C。

10. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 VII。

11. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是人类蛋白。

12. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中 γ -谷氨酰羧化酶是人类蛋白。

13. 如权利要求 1 或 2 中所要求的真核宿主细胞,其中所述细胞选自由哺乳动物细胞、酵母细胞或昆虫细胞构成的组。

14. 如权利要求 13 所要求的真核宿主细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

15. 一种载体,包含编码需要伽马-羧化作用的蛋白的核酸分子和相连的包含第一启动子的表达控制序列,和编码 γ -谷氨酰羧化酶的核酸分子和相连的包含第二启动子的表达控制序列,

其中第一启动子选自人类巨细胞病毒 (hCMV) 即时-早期启动子, pEF-1 α , pRSV 或 pUbC, 并且

第二启动子选自 SV40 即时早期启动子,最小化的 FIX 启动子或 HSV 胸苷激酶启动子。

16. 如权利要求 15 中所要求的载体,其中所述第一启动子是人类巨细胞病毒 (hCMV) 即时-早期启动子,和所述第二启动子是 SV40 早期启动子。

17. 如权利要求 15 或 16 中所要求的载体,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白选自自由凝结因子 VII、凝结因子 IX、凝血酶原(凝结因子 II)、凝结因子 X、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、骨 Gla 蛋白、基质 Gla 蛋白、生长停滞-特异性蛋白 6 和 Acanthophiinae FXa-样蛋白构成的组。

18. 如权利要求 15 或 16 中所要求的载体,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 IX。

19. 如权利要求 15 或 16 中所要求的载体,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 X。

20. 如权利要求 15 或 16 中所要求的载体,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是凝血酶原。

21. 如权利要求 15 或 16 中所要求的载体,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是蛋白 C。

22. 如权利要求 15 或 16 中所要求的载体,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 VII。

23. 一种生产伽马-羧化的蛋白的方法,包括:

(i) 培养包含至少一种表达载体的真核细胞,所述表达载体包含编码需要伽马-羧化作用的蛋白的核酸分子和相连的包含第一启动子的表达控制序列,和编码 γ -谷氨酰羧化酶的核酸分子和相连的包含第二启动子的表达控制序列,

其中第一启动子选自人类巨细胞病毒(hCMV)即时-早期启动子, pEF-1 α , pRSV 或 pUbC,并且第二启动子选自 SV40 即时早期启动子,最小化的 FIX 启动子或 HSV 胸苷激酶启动子,和

(ii) 分离所述伽马-羧化的蛋白。

24. 如权利要求 23 所要求的方法,其中所述伽马-羧化的蛋白选自自由凝结因子 VII、凝结因子 IX、凝血酶原(凝结因子 II)、凝结因子 X、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、骨 Gla 蛋白、基质 Gla 蛋白、生长停滞-特异性蛋白 6 和 Acanthophiinae FXa-样蛋白构成的组。

25. 如权利要求 23 或 24 所要求的方法,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是维生素 K 依赖性凝结因子或其活化形式。

26. 如权利要求 23 或 24 所要求的方法,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 IX 或其活化形式。

27. 如权利要求 23 或 24 所要求的方法,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 X 或其活化形式。

28. 如权利要求 23 或 24 所要求的方法,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是凝血酶原或其活化形式。

29. 如权利要求 23 或 24 所要求的方法,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是蛋白 C 或其活化形式。

30. 如权利要求 23 或 24 所要求的方法,其中所述需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 VII 或其活化形式。

31. 一种生产适合于诱导血液凝固或促进增加的凝结或促进减少的凝结的药物组合物的方法,包括纯化从包含至少一种表达载体的真核宿主细胞表达的活性羧化蛋白,所述

表达载体包含编码需要伽马 - 羧化作用的蛋白的核酸分子和相连的包含第一启动子的表达控制序列, 和编码 γ - 谷氨酰羧化酶的核酸分子和相连的包含第二启动子的表达控制序列,

其中第一启动子选自人类巨细胞病毒 (hCMV) 即时 - 早期启动子, pEF-1 α , pRSV 或 pUbC, 并且

第二启动子选自 SV40 即时早期启动子, 最小化的 FIX 启动子或 HSV 胸苷激酶启动子, 和

将所述纯化的羧化蛋白与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合。

生产伽马 - 羧化的蛋白的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包含表达载体的宿主细胞,所述表达载体包含编码需要伽马 - 羧化作用的蛋白的核酸分子和相连的包含第一启动子的表达控制序列,和编码 γ - 谷氨酰羧化酶的核酸分子和相连的包含第二启动子的表达控制序列。本发明进一步涉及以高产量生产需要 γ - 羧化作用的蛋白的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 出血是常见的临床问题。它是疾病、外伤、手术和药物治疗的结果。机械性地阻止出血是必要的。由于出血的位置或由于从许多(小)脉管散开,这是非常困难的或甚至是不可能的。因而出血的病人可能需要用支持止血的试剂治疗。这可以是血液衍生产品(血治疗, haemotherapy)、引起内源止血剂的释放的试剂、重组凝血因子(F)或延迟血液凝块分解的试剂。

[0004] 通常从地方医院获得的血液衍生产品之中第一线的治疗(first line treatment)是用于容量置换和支持止血的全血,包装的红细胞用于改善氧转运容量,血小板浓缩物以提高血小板数量(如果数量低或有缺陷)和新鲜的冷冻血浆用于支持止血(血液凝结和血小板聚集)。支持止血的第二线的血浆衍生产品是血浆冷沉淀物、凝血酶原复合物浓缩物、活化的凝血酶原复合物浓缩物和纯化的凝血因子。作为人类重组蛋白,无活性的(凝血因子 VIII 和 IX)和活化的(凝血因子 VIIa),一些凝血因子当今是可获得的。

[0005] 血友病是遗传的或后天的出血失调,有异常的或缺陷的凝血因子或抑制促凝血功能的针对凝血因子的抗体。最常见的血友病是血友病 A(缺乏凝血因子 VIII)和血友病 B(因子 IX)。提纯的或重组的单独的凝血因子是血友病病人的主要治疗手段。有抑制性抗体的病人遇到了治疗难题,因为抗体也可以中和向该病人施用的凝血因子。通过降解活化的凝血因子 Va 和 VIIIa,蛋白 C 的活性形式(APC)是血浆凝结的抑制物。已经显示重组的 APC 是败血症病人中不适当的血浆凝结的有效治疗手段。

[0006] 尽管纯化过程并不简单和需要许多步骤,某些步骤目的在于消除污染的病毒,用于治疗用途的凝血因子可以从人类血浆获得。但是尽管有血液衍生产品的大量的安全性测量和测试,也无法排除感染性病毒或朊病毒的污染。由于这种风险,非常期望从无动物衍生成分的培养基中生长的重组细胞中产生人类治疗性蛋白。这不总是简单的,因为许多蛋白需要哺乳动物宿主来以完全功能性的形式产生,即,被正确地翻译后修饰。在重组细胞中商业化生产的凝血因子有 FVII(NovoSeven)、FVIII(Kogenate, Recombinate, Refacto)和 FIX(BeneFix)(Roddie and Ludlam. Blood Rev. 11:169-177, 1997)和 Active Protein C(Xigris)。在获取大量的全功能重组人凝血因子时的一个主要障碍在于 FII、FVII、FIX、FX 和蛋白 C 中存在的 Gla 结构域。这个结构域含有通过添加羧基基团翻译后修饰的谷氨酸残基。这些因子的生产受到如下事实的妨碍,即它们的过量表达引起羧化不足,由此产生无活性的蛋白。Gla 修饰是被称为 γ - 谷氨酰羧化酶(GGCX)的维生素 K 依赖性酶的作用的结果。许多科学家,特别是那些致力于凝血因子研究的科学家已经对这个酶进行了广泛的研究(WO-A-8803926; Wu et al. Science 254(5038):1634-1636, 1991;

Rehmtulla et al., Proc Natl Acad Sci USA 90 :4611-4615, 1993 ; Stanley J. Biol. Chem. 274(24) :16940-16944, 1999 ; Vo et al., FEBS letters 445 :256-260, 1999 ; Begley et al., The Journal of Biological Chemistry 275(46) :36245-36249, 2000 ; Walker et al., The Journal of Biological Chemistry 276(11) :7769-7774, 2001 ; Bandyopadhyay, et al. Proc Natl Acad Sci USA 99(3) :1264-1269, 2002 ; Czerwiec et al., Eur J Biochem 269 :6162-6172, 2002 ; Hallgren et al., Biochemistry 41(50) :15045-15055, 2002 ; Harvey et al., The Journal of Biological Chemistry 278(10) :8363-8369, 2003)。至少两个科学团队已经进行了通过与凝血因子 FIX 共表达 GGCX 来提高产量的尝试, 但是没有成功 (Rehmtulla, et al. 1993, *ibid* ; Hallgren et al. 2002, *ibid*)。考虑到在 γ -羧化蛋白方面的巨大兴趣, 可以推测有更多的共表达试验失败了并因此没有被报道。

[0007] 对于人类 FII (凝血酶原), 为了获得全功能的凝血酶原, 10 个 Glu 残基中的至少 8 个必需被正确地修饰 (Malhotra, et al., J. Biol. Chem. 260 :279-287, 1985 ; Seegers and Walz' Prothrombin and other vitamin K proteins', CRC Press, 1986)。获得 rhFII 的高生产水平的广泛的努力已经利用了几种不同的系统, 例如, CHO 细胞、BHK 细胞、293 细胞和牛痘病毒表达系统, 但是都失败了或产生了羧化不足的产物, 因而是功能上无活性的凝血酶原 (Jørgensen et al., J. Biol. Chem. 262 :6729-6734, 1987 ; Russo et al., Biotechnol Appl Biochem 14(2) :222-233, 1991 ; Fischer et al., J Biotechnol 38(2) :129-136, 1995 ; Herlitschka et al. Protein Expr. Purif. 8(3) :358-364, 1996 ; Russo et al., Protein Expr. Purif. 10 :214-225, 1997 ; Vo et al. 1999, *ibid* ; Wu and Suttie Thromb Res 96(2) :91-98, 1999)。较早报道的羧化的重组人类凝血酶原的生产能力很低 ; 突变凝血酶原 20 mg/L (Cote et al., J. Biol. Chem 269 :11374-11380, 1994), 在 CHO 细胞中表达的人类凝血酶原 0.55 mg/L (完全羧化的, Jørgensen et al. 1987, 同上), 在 CHO 细胞中的 25 mg/L (羧化的程度未显示, Russo et al. 1997, 同上)。

[0008] WO 92/19636 公开了人类和牛的维生素 K 依赖性羧化酶的克隆和序列鉴定。该申请建议在适合的宿主细胞中共表达维生素 K 依赖性羧化酶和维生素 K 依赖性蛋白来制备维生素 K 依赖性蛋白。没有例举羧化酶和维生素 K 依赖性蛋白的共表达。

[0009] 需要改进的方法来以高产量生产活化的凝血因子。本发明要解决这种需求。

[0010] 发明概述

[0011] 根据本发明的第一个方面, 提供了包含表达载体的宿主细胞, 所述表达载体包含编码需要伽马-羧化作用的蛋白的核酸分子和相连的 (associated) 包含第一启动子的表达控制序列, 和编码 γ -谷氨酰羧化酶的核酸分子和相连的包含第二启动子的表达控制序列, 其中所述第一启动子比所述第二启动子更强, 足以使得需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶以至少 10 : 1 的比例表达。

[0012] 根据本发明的另一个方面, 提供了细胞, 其被工程化以表达 (i) 需要伽马-羧化作用的蛋白, 和 (ii) γ -谷氨酰羧化酶, 其中所述蛋白 (i) 和 (ii) 以 10 : 1 到 500 : 1 之间的比例表达。

[0013] 根据本发明的另一个方面, 提供了遗传地修饰的真核宿主细胞, 其包含 :

[0014] (i) 编码 γ -谷氨酰羧化酶蛋白的多核苷酸序列, 其中所述 γ -谷氨酰羧化酶蛋白编码序列可操作地与表达控制序列连接, 所述表达控制序列允许所述细胞表达 γ -谷氨酰

羧化酶蛋白；和

[0015] (ii) 编码需要所述 γ -谷氨酰羧化酶蛋白的羧化作用的蛋白的多核苷酸,可操作地与表达控制序列连接,所述表达控制序列允许所述细胞表达所述需要羧化作用的蛋白；

[0016] 其中所述细胞能够以至少 1 : 10 的比例表达所述 γ -谷氨酰羧化酶蛋白和所述需要羧化作用的蛋白。

[0017] 根据本发明的进一步的方面,提供了载体,所述载体包含编码需要伽马-羧化作用的蛋白的核酸分子和相连的包括第一启动子的表达控制序列,和编码 γ -谷氨酰羧化酶的核酸分子和相连的包含第二启动子的表达控制序列,其中所述第一启动子比所述第二启动子更强,足以使得需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶以至少 10 : 1 的比例表达。

[0018] 根据本发明的又一个方面,提供了生产伽马-羧化的蛋白的方法,包括:(i) 培养细胞,所述细胞被改造(adapted)来以至少 10 : 1 的比例表达需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶,在适合于表达这两种蛋白的条件下培养,和(ii) 分离伽马-羧化的蛋白。在一个实施方式中,该方法用于生产伽马-羧化的人类因子 IX,在另一个实施方式中该方法用于生产伽马-羧化的人类凝血酶原。在另一个实施方式中,所述生产的伽马-羧化的蛋白是人类伽马-羧化的因子 X。

[0019] 根据本发明的另一个方面,提供了在哺乳动物细胞系中生产伽马-羧化的蛋白的方法,包括在所述哺乳动物细胞系中使所述需要伽马-羧化作用的蛋白与 γ -谷氨酰羧化酶共表达的步骤,其中表达的需要伽马-羧化作用的蛋白的数量至少是表达的 γ -谷氨酰羧化酶的数量 10 倍,和(ii) 分离伽马-羧化的蛋白。在一个实施方式中,该方法用于生产伽马-羧化的人类因子 IX,在另一个实施方式中该方法用于生产伽马-羧化的人类凝血酶原。在另一个实施方式中,所述生产的伽马-羧化的蛋白是人类伽马-羧化的因子 X。

[0020] 根据本发明的进一步的方面,提供了根据上述方法生产的分离的伽马-羧化的蛋白,根据上述方法生产的分离的伽马-羧化的蛋白在凝结治疗中的用途,或根据上述方法生产的分离的伽马-羧化的蛋白用于制造用于凝结治疗(coagulation therapy)的药物的用途。

[0021] 根据本发明的再进一步的方面,提供了生产适合于诱导血液凝固或促进增加的或减少的凝结的药物组合物的方法,包括纯化从宿主细胞表达的活性羧化的蛋白,所述宿主细胞被改造来以 10 : 1 到 500 : 1 之间的比例表达需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶,和将所述纯化的羧化蛋白与一种或多种药学上可接受的载体(carrier)或赋形剂混合,以及可从该方法获得的药物组合物。在一个实施方式中,所述活性羧化的蛋白是伽马-羧化的人类因子 IX,在另一个实施方式中所述活性羧化的蛋白是伽马-羧化的人类凝血酶原。在另一个实施方式中,所述活性羧化的蛋白是人类伽马-羧化的因子 X。

[0022] 附图的简要说明

[0023] 附图 1a 说明了 PN32(凝血酶原+GGCX)共表达载体的质粒图。

[0024] 附图 1b 表示了 Ptext5(凝血酶原)表达载体的质粒图。

[0025] 附图 2 表示了 PP6(凝血酶原+GGCX)共表达载体的质粒图。

[0026] 附图 3a 表示了 F9NopA(因子 IX+GGCX)共表达载体的质粒图。

[0027] 附图 3b 表示了 F9hg1x(因子 IX+GGCX)共表达载体的质粒图。

[0028] 发明的详细说明

[0029] 我们设计了高水平表达适当羧化的重组维生素 K 依赖性凝血因子的不同方法,包括以不同的比例共表达维生素 K 依赖性凝血因子和 γ -谷氨酰羧化酶 (GGCX)。作为一个实例,我们表达了人类凝血酶原 (rhFII) 和人类 GGCX。与其他人 (Rehmtulla et al., 1993, 同上; Hallgren et al., 2002, 同上) 已经尝试的对 rhFII 和 GGCX 都使用强启动子不同,我们使用一种策略,旨在强表达 FII 结合弱或极弱表达 GGCX,使得表达的 GGCX 的数量是表达的 rhFII 的 1/10 以下。出乎我们意料,这种策略引起了高水平的、分泌的正确修饰的 rhFII 和宿主细胞的良好生存力,即使是细胞在无动物成分的化学成分明确的培养基中生长时。

[0030] 我们已经以这样的方式将 GGCX 和人类凝血酶原克隆到表达载体中,以使凝血酶原 mRNA 水平超过 GGCX mRNA 水平的至少 9 倍。这引起了与 GGCX 蛋白相比产生大量过剩的凝血酶原蛋白。

[0031] 作为进一步的实例,我们使用相同的 GGCX 共表达载体表达了 rhFIX。这产生了细胞系,在一种情况中细胞系产生因子 IX mRNA 的水平超过 GGCX mRNA 水平的至少 9 倍。在另一个细胞系中,因子 IX:GGCX mRNA 比例大约 4-5 : 1。仅有产生至少 10 : 1 的比例的细胞系显示了显著提高的 rhFIX 生产力(表 1)。

[0032] 表 1. 生产力和羧化的蛋白:GGCX mRNA 比例的总览

[0033]

克隆名称/构建体	生产的蛋白	完全活性蛋白的产量* (mg/L)	羧化的蛋白:GGCX 大概的 mRNA 比例	数据的来源
P1E2/PN32	人类凝血酶原	40	250:1	实施例 3
B2F4/PP6		26	50:1	实施例 5
H3B10/PP6		30	30:1	实施例 5
E1A9/PText5		3.5	无 GGCX	实施例 3
N4D5/F9NopA	人类 FIX	7.3	45:1	实施例 7
P1G9/F9hglx		1.3	4:1	实施例 7
IC4		1.1	无 GGCX	Rehmtulla 1993, US 5,460,950

[0034] * 生产力是在类似生长条件下从旋转培养物测量的。

[0035] □ 数据来自 Rehmtulla 1993 和美国专利 No. 5, 460, 950。

[0036] 通过与 GGCX 共表达的当前方法产生的维生素 K 依赖性凝血因子 (FII、FVII、FIX、FX 和它们的活化形式 FIIa 或凝血酶、FVIIa、FIXa、FXa) 可以预期在预防和治疗外伤、手术后的出血或肝、肾、血小板或血液凝固因子(血友病)的疾病方面是有用的。同样地,凝固因子蛋白 C 和它的活化形式 APC 可以预期在预防和治疗有或没有蛋白 C 水平降低的升高的

凝结失调方面是有用的。该方法还适合于需要翻译后羧化作用的其他蛋白。

[0037] 根据本发明的第一个方面,提供了包含表达载体的宿主细胞,所述表达载体包含编码需要伽马-羧化作用的蛋白的核酸分子和相连的包含第一启动子的表达控制序列,和编码 γ -谷氨酰羧化酶的核酸分子和相连的包含第二启动子的表达控制序列,其中所述第一启动子比所述第二启动子更强,足以使得需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶以至少 10 : 1 的比例表达。

[0038] 在优选的实施方式中,表达的蛋白的比例在 10 : 1 到 1000 : 1 之间,更优选的 10 : 1 到 500 : 1 之间,再更优选的在 25 : 1 到 250 : 1 之间。特别合适的比例是约 200 : 1。

[0039] 在独立的实施方式中,两种表达的蛋白的比例可以是至少 10 : 1, 30 : 1, 45 : 1, 50 : 1, 100 : 1, 200 : 1, 250 : 1, 300 : 1, 400 : 1, 500 : 1 和 1000 : 1。

[0040] 在一个特定的实施方式中,编码需要伽马-羧化作用的蛋白和相连的表达控制序列的核酸分子,和编码 γ -谷氨酰羧化酶和相连的表达控制序列的核酸分子,位于相同的表达载体上。在另一个实施方式中,这两个核酸分子位于独立的表达载体上。

[0041] 根据本发明的进一步的方面,提供了根据 SEQ ID NO :14 和 SEQ ID NO :15 的核酸。

[0042] 根据本发明的进一步的方面,提供了宿主细胞,所述宿主细胞用包含 SEQ ID NO : 14 或 SEQ ID NO :15 的序列的载体转染或转化了,用于表达人类因子 IX。

[0043] 根据本发明的进一步的方面,提供了能表达人类凝结因子 IX 和人类伽马羧化酶的宿主细胞,其中编码人类凝结因子 IX 的核酸和编码伽马羧化酶的核酸分别可操作地与控制序列连接,所述控制序列能够以至少 10 : 1 的比例表达两种蛋白。

[0044] 根据本发明的进一步的方面,提供了非人类真核宿主细胞,所述宿主细胞被改造来以至少 10 : 1 的比例表达人类凝结因子 IX 和人类伽马羧化酶。在特定的实施方式中,编码人类凝结因子 IX 的核酸和编码伽马羧化酶的核酸分别可操作地与控制序列连接,所述控制序列能以至少 10 : 1 的比例表达两种蛋白。

[0045] 根据本发明的进一步的方面,提供了携带外源核酸的宿主细胞,所述外源核酸包含在 hCMV 启动子控制下的人类凝结因子 IX 编码核酸和在 SV40 启动子控制下的人类羧化酶编码核酸。

[0046] 根据本发明的进一步的方面,提供了根据 SEQ. ID NO :1、SEQ IDNO :2 或 SEQ. ID NO :3 的核酸。

[0047] 根据本发明的进一步的方面,提供了宿主细胞,所述宿主细胞用包含 SEQ. ID NO : 1、SEQ. ID NO :2 或 SEQ ID NO :3 的序列的载体转染或转化了,用于表达人类凝血酶原。

[0048] 根据本发明的进一步的方面,提供了能表达人类凝血酶原和人类伽马羧化酶的宿主细胞,其中编码人类凝血酶原的核酸和编码伽马羧化酶的核酸分别可操作地与控制序列连接,所述控制序列能够以至少 10 : 1 的比例表达两种蛋白。

[0049] 根据本发明的进一步的方面,提供了非人类真核宿主细胞,所述宿主细胞被改造来以至少 10 : 1 的比例表达人类凝血酶原和人类伽马羧化酶。在特定的实施方式中,编码人类凝血酶原的核酸和编码伽马羧化酶的核酸分别可操作地与控制序列连接,所述控制序列能以至少 10 : 1 的比例表达两种蛋白。

[0050] 根据本发明的进一步的方面,提供了携带外源核酸的宿主细胞,所述外源核酸包

含在 hCMV 启动子控制下的人类凝血酶原编码核酸和在 SV40 启动子控制下的人类羧化酶编码核酸。

[0051] 本申请使用凝血酶原和凝血因子 IX 作为需要羧化作用的蛋白进行了例证。然而,除了凝血酶原和因子 IX 以外的一些蛋白,它们的完全生物学活性取决于正确的 γ -羧化作用。在人们已知的这些蛋白之中有凝血因子 FVII,当前它仅以相对低的水平在重组哺乳动物细胞中商业化生产(约 10mg/L 或更低)。本发明适用于改善依赖于 γ -羧化作用的任何蛋白的生产率,这种蛋白包括,但不限于:凝血酶原、凝血因子 II(FII)、凝血因子 VII(FVII)、凝血因子 IX(FIX)、凝血因子 X(FX)、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、骨 Gla 蛋白(也称为:BGP 或骨钙蛋白)、基质 Gla 蛋白(MGP)、富脯氨酸 Gla 多肽 1(prolinerich Gla polypeptide 1)(PRRG1)、富脯氨酸 Gla 多肽 2(PRRG2)、生长停滞-特异性蛋白 6(Growth arrest-specific protein 6)(Gas 6)。其他适合的蛋白是:在毒蛇(Acanthophiina 亚科)的毒液和锥形蜗牛(Conus textile)毒液中的 FXa 样蛋白。

[0052] 这些蛋白的每一种,包括它们的核酸和氨基酸序列,都是公知的。表 2 列出了可用于本发明的各种蛋白的野生型和突变形式的代表性序列。

[0053] 表 2.

[0054]

说明	CDNA EMBL ACC#	剪接变体 (蛋白)	突变	GENE EMBL ACC#
谷氨酸伽马羧化酶	BC013979	2 ;BC013979 ; AF253530	1 SNP (EMBL#U65896) ;2 SNPs (OMIM#137167)	U65896
凝血酶原	V00595	1 ;V00595	approx. 100 SNP' s (EMBL# AF478696)	AF478696
因子 VII	AF466933	4 ;AF466933 ; AF272774 ;AR030786 ; AAN60063	21 SNPs (OMIM#277500)	J02933
因子 IX	A01819	3 ;A01819 ;A34669 ; M19063	5SNPs (EMBL# AF536327) ;108SNPs OMIM#306900)	AF536327
因子 X	BC046125	4 ;BC040125 ;M57285 ; AR095306 ;AB005892	118 SNPs (EMBL# AF503510) ;14 SNPs (MIM# 227600)	AF503510
蛋白 C	BC034377	7 ;AB083690 ; AB083693 ;109623 ; S50739 ;S72338	57SNPs (EMBL# AF378903) ;25SNPs (OMIM#176860)	AF378903
骨钙蛋白	AF141310	5 ;AF141310 ; AF141310 ;BC033656 ; X04143 ;X51699		X04143

基质 GLA 蛋白	BC005272	1 ;BC005272		
生长停滞特异性 6 ; AXL 刺激因子	BC038984	1 ;BC038984		
蛋白 Z	M55670	2 ;AB033749 ; AB033749		
富脯氨酸 G1a (G- 羧基谷氨酸) 多肽 1	AF009242	2 ; AP009242 ;BC030786		
富脯氨酸 G1a (G- 羧基谷氨酸)	AF009243	2 ;AF009243 ; BC026032		

[0055]

多肽 2				
维生素 K 依赖性 蛋白 S 前体	BC015801	1 ;BC015801	approx. 100SNPs (EMBL#AY308744) ;8 SNPs (OMIM#176880)	AY308744

[0056] 需要理解的是,本发明不限于特定蛋白或有待共表达的这些蛋白之一的蛋白编码序列。此外,特别对于血液凝结因子,本领域中已经公开了蛋白的许多突变形式。本发明同样的适合于这些突变形式,包括蛋白的天然发生的等位变体,就象适合野生型序列一样。在一个实施方式中,本发明可以采取任何野生型蛋白或与其具有至少 90%、优选的至少 95% 的序列同一性的蛋白。

[0057] 两个序列之间的序列同一性可以通过配对方式的计算机比对分析,使用例如 BestFit、PILEUP、Gap 或 FrameAlign 的程序来确定。优选的比对工具是 BestFit。在实践中,当从序列数据库中搜索查询检索的相似 / 相同序列时,一般必需使用适合的算法,例如 Blast、Blast2、NCBI Blast2、WashU Blast2、FastA 或 Fasta3 和计分矩阵例如 Blosum62 来进行相似序列的初步鉴定。这些算法力图紧密地接近 Smith-Waterman 的“金标准 (gold-standard)” 比对算法。因而,用于评定相似性,即,两种原始多肽序列如何排列的优选的软件 / 搜索引擎程序是 Smith-Waterman。同一性是指直接匹配,相似性容许保守性替换。

[0058] 在此使用的术语“ γ -谷氨酰羧化酶”或“GGCX”是指催化谷氨酸残基的羧化作用的维生素 K 依赖性酶。

[0059] GGCX 酶是广泛分布的,已经从许多不同的物种,例如白鲸 *Delphinapterus leucas*、蟾鱼 *Opsanus tau*、鸡 (*Gallus gallus*)、盲鳗 (*Myxine glutinosa*)、鲎 (*Limulus polyphemus*) 和锥形蜗牛 *Conus textile* (Begley et al., 2000, *ibid*; Bandyopadhyay et al. 2002, *ibid*) 克隆出来。来自圆锥蜗牛的羧化酶类似于牛羧化酶,已经在 COS 细胞中表达 (Czerwicz et al. 2002, *ibid*)。类似于 GGCX 的其他蛋白可以在昆虫和原核生物中发现,例如 *Anopheles gambiae*、*Drosophila melanogaster* 和 *Leptospira*, NCBI 登记号分别为:

gi 31217234、gi 21298685、gi24216281、gi 24197548 和 (Bandyopadhyay et al., 2002, ibid)。羧化酶显示了显著的进化保守性。一些非人类酶已经显示了、或预测具有类似于我们使用的人类 GGCX 的活性,因而可被用作人类酶的替代物。

[0060] 表 3 列出了可被用于本发明中、与人类 GGXC 同源的(按物种来源分类的)预测的蛋白的代表性序列。

[0061] 表 3.

[0062]

物种	数据库登记号 #/ID
Homo sapiens(人)	NM_00821. 2 HUMGLUCARB HUMHGCA BC004422 HSU65896 AF253530. 1
Papio hamadryas(红狒狒)	AC116665. 1
Delphinapterus leucas(白鲸)	AF278713
Bos taurus(牛)	NM_174066. 2 BOVCARBOXG BOVBGCA
Ovis aries(家养绵羊)	AF312035
Rattus norvegicus(褐鼠)	NM_031756. 1 AF065387
Mus musculus(小鼠)	NM_019802. 1 AF087938

[0063]

Opsanus tau(有骨鱼)	AF278714. 1
Conus textile(软体动物)	AY0044904. 1 AF382823. 2
Conus imperialis(软体动物)	AF448234. 1
Conus episcopatus(软体动物)	AF448233. 1
Conus omaria(软体动物)	AF448235. 1

<i>Drosophila melanogaster</i> (果蝇)	NM_079161.2
<i>Anopheles gambiae</i> (蚊子)	XM_316389.1
<i>Secale cereale</i> (单子叶植物)	SCE314767
<i>Triticum aestivum</i> (普通小麦)	AF280606.1
<i>Triticum urartu</i> (单子叶植物)	AY245579.1
<i>Hordeum vulgare</i> (大麦)	BLYHORDCA
<i>Leptospira interrogans</i> (螺旋体)	AE011514.1
<i>Streptomyces coelicolor</i> (高 GC Gram+ 细菌)	SC0939109 SC0939124 AF425987.1
<i>Streptomyces lividans</i> (高 GC Gram+ 细菌)	SLU22894
<i>Streptomyces virginiae</i> (高 GC Gram+ 细菌)	SVSNBDE
<i>Micrococcus luteus</i> (高 GC Gram+ 细菌)	MLSPCOPER
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (绿藻)	AF479588.1
<i>Dictyostelium discoideum</i> (粘菌)	AC115612.2
<i>Coturnix coturnix</i> (鸟)	AF364329.1
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (α -蛋白细菌)	AP005937.1
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (α -蛋白细菌)	RSY14197
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (α -蛋白细菌)	RME603647 AF119834
<i>Mesorhizobium loti</i> (α -蛋白细菌)	AP003014.2
<i>Chromobacterium violaceum</i> (β -蛋白细菌)	AE016910.1 AE016918.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (γ -蛋白细菌)	AE004613.1 AF165882

[0064]

Xanthomonas axonopodis(γ-蛋白细菌)	AE011706.1
Human herpesvirus 8	KSU52064 KSU75698 AF305694 AF360120 AF192756

[0065] 以上确定的每种 GGCX 蛋白和来自其他物种的 GGCX 蛋白可被用作本发明中的羧化酶。

[0066] 实现差别表达两种共表达的蛋白的一种途径是使用不同的启动子作为各自的表达控制序列的部分。本领域有大量能以不同程度或幅度表达异源蛋白的不同启动子和其他表达控制序列的实例。已经适当地发展了重组表达技术使得蛋白表达领域的技术人员能够选择启动子和其他控制序列来以期望的比例共表达需要羧化作用的蛋白和羧化酶。选择使用哪些特定的启动子和其他表达控制序列是各人的选择问题。

[0067] 在一个实施方式中,与需要伽马-羧化作用的蛋白相连的控制序列包含强启动子。在一个实施方式中,这个启动子是人类巨细胞病毒(hCMV)即时-早期(immediate-early)启动子。强启动子在此被定义为产生超过1000个转录产物/细胞的启动子。弱启动子在此被定义为产生少于1000个转录产物/细胞的启动子。

[0068] 在另一个实施方式中,与γ-谷氨酰羧化酶相连的控制序列包含弱启动子。在一个实施方式中,这个启动子是SV40早期启动子。在另一个实施方式中,需要伽马-羧化作用的蛋白和γ-谷氨酰羧化酶处于不同的启动子元件的控制之下,控制γ-谷氨酰羧化酶表达的启动子比控制需要伽马-羧化作用的蛋白表达的启动子更弱。

[0069] 在另一个实施方式中,γ-谷氨酰羧化酶处于SV40早期启动子的控制之下,需要伽马-羧化作用的蛋白处于人类巨细胞病毒(hCMV)即时-早期启动子的控制之下。在根据本发明的这个特定方面的一个实施方式中,需要伽马-羧化作用的蛋白是人类因子X。在另一个实施方式中,需要伽马-羧化作用的蛋白是人类凝血酶原。在另一个实施方式中,需要伽马-羧化作用的蛋白是人类因子IX。

[0070] 已经使用强CMV启动子(Boshart et al. Cell 41:521-530,1985)来过量表达因子IX或凝血酶原,和更弱的SV40启动子(Wenger et al. Anal Biochem 221:416-418,1994)来控制GGCX表达,例证了本发明。能根据本发明使用的其他强启动子包括,但不限于,pEF-1α[人类延伸因子1α亚基基因](Mizushima and Nagata, Nuc Acids Res 18:5322,1990;Goldman et al., Bio Techniques 21:1013-1015,1996)、pRSV[劳氏肉瘤病毒(Rous sarcoma virus)(Gorman et al., Proc Natl Acad Sci USA79:6777-6781,1982)]和pUbc[人类遍在蛋白(Schorpp et al., Nuc Acids Res 24:1787-1788,1996)]。

[0071] 确保生产的蛋白(需要羧化作用的蛋白)与修饰酶相比是过量的,产生至少10:1的比例,是很重要的。实现低水平表达修饰酶(γ-谷氨酰羧化酶)的途径包括:

[0072] 1) 使用弱启动子来控制修饰酶的表达,包括、但不限于,SV40即时早期启动子、最小化的FIX启动子(Rouet et al., The Journal of Biological Chemistry 267:20765-20773,1992)或HSV胸苷激酶启动子(Wenger et al.,1994,ibid)。

[0073] 2) 对启动子、或强启动子的增强子序列进行突变来降低启动子强度。

[0074] 3) 移除或改变 Kozak 序列 (翻译起始信号) 来降低翻译效率 (Kozak. Nuc Acids Res 15 :8125-8148, 1987 ;Kozak. Proc Natl Acad Sci USA87 :8301-8305, 1987, 1990)。

[0075] 4) 将编码待生产的蛋白 (需要羧化作用的蛋白) 的核酸和编码 GGCX 的核酸克隆到独立的载体上, 用大量过剩的含待生产蛋白的构建体转染, 以产生具有含待生产蛋白的构建体的多个拷贝的细胞。

[0076] 5) 将编码待生产的蛋白的 DNA 和编码 GGCX 修饰载体的 DNA 克隆到独立的载体上, 共转染或单独转染, 使用放大系统来放大待生产蛋白的表达。

[0077] 6) 分离重组表达低水平 (但高于内源水平) 的 GGCX 的稳定的细胞系, 用作表达需要 γ -羧化作用的蛋白的宿主细胞系。

[0078] 7) 向 GGCX 中导入突变来降低 GGCX 底物亲合性。

[0079] 除了这些之外, 重组蛋白表达领域的技术人员知道能够用于产生宿主细胞的其他的方法, 所述宿主细胞以至少 10 : 1 的比例表达需要羧化作用的蛋白和羧化酶蛋白。

[0080] 根据本发明的进一步的方面, 提供了细胞, 其被工程化或被改造以表达 (i) 需要伽马-羧化作用的蛋白, 和 (ii) γ -谷氨酰羧化酶, 其中所述蛋白 (i) 和 (ii) 以 10 : 1 到 500 : 1 之间的比例表达。在特定的实施方式中, γ -谷氨酰羧化酶在内源水平 (即, 在未工程化或改造的细胞中的水平) 的 2 到 5 倍之间被表达。

[0081] 根据本发明的进一步的方面, 提供了重组细胞, 其被改造以表达 (i) γ -谷氨酰羧化酶蛋白, 高于在相当的未改造细胞中的组成性水平, 和 (ii) 需要羧化作用的蛋白, 其中表达的 γ -谷氨酰羧化酶蛋白和需要羧化作用的蛋白的数量处于至少 1 : 10 的比例中。

[0082] 根据本发明的进一步的方面, 提供了遗传地修饰的真核宿主细胞, 其包含:

[0083] (i) 编码 γ -谷氨酰羧化酶蛋白的多核苷酸序列, 其中所述 γ -谷氨酰羧化酶蛋白编码序列可操作地与表达控制序列连接, 所述表达控制序列允许所述细胞表达 γ -谷氨酰羧化酶蛋白; 和

[0084] (ii) 编码需要所述 γ -谷氨酰羧化酶蛋白的羧化作用的蛋白的多核苷酸, 可操作地与表达控制序列连接, 所述表达控制序列允许所述细胞表达所述需要羧化作用的蛋白;

[0085] 其中所述细胞能够以至少 1 : 10 的比例表达所述 γ -谷氨酰羧化酶蛋白和所述需要羧化作用的蛋白。

[0086] 根据本发明的进一步的方面, 提供了细胞, 其被改造以表达需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶, 其中编码需要伽马-羧化作用的蛋白的核酸和编码 γ -谷氨酰羧化酶的核酸处于调节序列的控制之下, 所述调节序列适合于确保表达的需要伽马-羧化作用的蛋白的数量是 γ -谷氨酰羧化酶蛋白的数量的至少 10 倍。

[0087] 在一个实施方式中, 需要伽马羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶中的至少一个是从已经通过重组技术导入到细胞中的核酸表达的。进行本发明的一个替换性途径是表达内源蛋白 (需要羧化作用的蛋白或羧化酶), 但是用异源序列替换内源控制序列 (启动子等等) 来实现期望的表达水平。

[0088] 宿主细胞优选的是真核细胞。典型的宿主细胞包括, 但不限于昆虫细胞、酵母细胞和哺乳动物细胞。哺乳动物细胞是特别优选的。适合的哺乳动物细胞系包括, 但不限于, CHO、HEK、NS0、293、Per C. 6、BHK 和 COS 细胞, 和它们的衍生物。在一个实施方式中, 宿主细

胞是哺乳动物细胞系 CHO-S。

[0089] 早先,羧化作用依赖性蛋白的过量表达一般产生羧化不足的产物。这是由于内源性宿主细胞羧化作用能力是有限的。另一方面,GGCX 活性的极大(16 到 70 倍)过量表达没有改善产物产率(Rehmtulla et al., Proc Natl Acad Sci USA 90 :4611-4615,1993), (Berkner and Pudota, Proc Natl Acad Sci USA. 95 :446-471,1998), (Hallgren et al., Biochemistry 41(50) :15045-15055,2002)。这一点的原因还未完全了解。我们的发明需要 GGCX 的中度过量表达。这确保了高于内源水平的 GGCX 从细胞中表达出来,例如,GGCX 活性水平仅升高 1.5 到 5 倍。在这种适度升高的水平之下,如在实施例 1 中所示,获得了令人惊讶的高水平的完全羧化的 rhFII。

[0090] 因此应当理解的是,使本发明与上述共表达教导相区分的、需要羧化作用的蛋白和羧化酶的表达比例,不包括内源性产生的 GGCX 的水平。为了满足所需要的高产量,必需以高于普通细胞中存在的水平来表达羧化酶和需要羧化作用的蛋白。

[0091] 在优选的实施方式中,使用的细胞或细胞系具有很少的或没有组成性表达的羧化酶和 / 或需要羧化作用的蛋白。

[0092] 在一个实施方式中, γ -谷氨酰羧化酶以低于或等于需要伽马-羧化作用的蛋白的数量的 10% 表达。在替换性的、进一步的实施方式中, γ -谷氨酰羧化酶以低于或等于需要伽马-羧化作用的蛋白的数量的 5%、2%、1%、0.5%、0.25%、0.1%、0.05% 或 0.01% 表达。

[0093] 可以使用本领域技术人员熟知的技术来测量两种蛋白的表达程度。这包括直接测量,例如,测量蛋白的生物学活性、或蛋白的数量(例如,使用抗体),或间接测量,例如通过测量 mRNA 转录产物水平(例如,如实施例 3 中的 Taqman 分析)。以下参考文献公开了测量 GGCX 酶活性的途径(Lingenfelter et al., Biochemistry 35 :8234-8243, 1996 ;Berkner et al., Proc Natl Acad Sci USA 95 :446-471,1998 ;Hallgren et al., Biochemistry 41(50) :15045-15055,2002 ;and, Berkner et al., Proc Natl Acad Sci USA 89 :6242-6246,1992)。

[0094] 对于本发明,两种蛋白的表达比例通过 mRNA 转录产物水平(例如,通过 Taqman 分析)来间接地确定。

[0095] 在一个实施方式中,需要伽马羧化作用的蛋白是维生素 K 依赖性凝结因子。在进一步的实施方式中,需要伽马-羧化作用的蛋白优选的选自由凝血酶原、凝结因子 II、凝结 FII、凝结因子 VII、凝结 FVII、凝结因子 IX、凝结 FIX、凝结因子 X、凝结 FX、蛋白 C、蛋白 S、蛋白 Z、骨 Gla 蛋白、基质 Gla 蛋白、生长停滞-特异性蛋白 6 和 Acanthophiinae FXa- 样蛋白构成的组。

[0096] 在一个特定的实施方式中,需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 IX。在另一个特定的实施方式中,需要伽马-羧化作用的蛋白是凝血酶原。在另一个实施方式中,需要伽马-羧化作用的蛋白是因子 X。

[0097] 本发明对于任何来源的需要羧化作用的蛋白具有普通的应用。然而,如果表达的蛋白将用于人类治疗目的,人类蛋白是特别优选的。

[0098] 在一个实施方式中, γ -谷氨酰羧化酶是小鼠、大鼠、牛或锥形蜗牛(conus snail)来源的。在另一个实施方式中, γ -谷氨酰羧化酶是人类蛋白。

[0099] 根据本发明的进一步的方面,提供了生产伽马-羧化的蛋白的方法,包括:(i) 培养细胞,所述细胞被改造来以至少 10 : 1 的比例表达需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶,在适合于表达这两种蛋白的条件下培养,和(ii) 分离伽马-羧化的蛋白。

[0100] 根据本发明的进一步的方面,提供了在哺乳动物细胞系中生产伽马-羧化的蛋白的方法,包括在所述哺乳动物细胞系中使所述需要伽马-羧化作用的蛋白与 γ -谷氨酰羧化酶共表达的步骤,其中表达的需要伽马-羧化作用的蛋白的数量至少是表达的 γ -谷氨酰羧化酶的数量 10 倍;和(ii) 分离伽马-羧化的蛋白。

[0101] 生产伽马-羧化的蛋白的方法,包括:

[0102] a) 遗传修饰真核细胞,来导入编码需要羧化作用的蛋白和伴随的表达控制序列的第一多核苷酸,和编码 γ -谷氨酰羧化酶和伴随的表达控制序列的第二多核苷酸,来产生真核宿主细胞,所述真核宿主细胞能以至少 10 : 1 的比例共表达需要羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶蛋白;

[0103] b) 在容许第一和第二多核苷酸序列表达的条件下在适合的培养基中培养所述细胞;和 c) 从培养基或宿主细胞分离羧化的蛋白。

[0104] 表达载体通常包括复制起点、启动子、翻译起始位点、任选的信号肽、多聚腺苷酸位点和转录终止位点。这个载体通常还含有用于选择的一个或多个抗生素抗性标记基因。适合的表达载体可以是质粒、粘粒或病毒,例如噬菌体或逆转录病毒。将多肽的编码序列置于适合的启动子(即,HSV、CMV、TK、RSV、SV40 等等)、控制元件和转录终止子(这些是相连的表达控制序列)的控制下,使得在被该表达载体构建体转化或转染的宿主细胞中,编码所述多肽的核酸序列被转录成 RNA。编码序列可以,或不含有用于将多肽分泌出宿主细胞的信号肽或前导序列。优选的载体通常包含至少一个多克隆位点。在某些实施方式中,克隆位点或多克隆位点处于启动子和要表达的基因之间。通过将第二核酸序列克隆到克隆位点中使得其是连续的并且是符合基因序列的读码框的,从而这些克隆位点可以用于产生 N-末端融合蛋白。在其他实施方式中,可以有克隆位点或多克隆位点位于基因的紧接着的下游,以与如上所述的 N-末端融合物类似的方式,来便于 C-末端融合物的生成。

[0105] 可以通过本领域技术人员公知的很多种方法,例如转染、转化和电穿孔,来遗传地修饰宿主细胞(导入额外核酸)。

[0106] 本发明还扩展到通过本发明的方法生产的纯化的伽马羧化的蛋白,和它们在凝结治疗中的用途。

[0107] 根据本发明的再另一个方面,提供了一种在受试者中促进提高或降低的凝结的方法,包括向需要的病人施用药理学上有效量的、通过以上描述的方法获得的分离的伽马-羧化的蛋白。

[0108] 根据本发明的进一步的方面,提供了生产适合于诱导血液凝固的药物组合物的方法,包括纯化从宿主细胞表达的活性羧化的蛋白,所述宿主细胞被改造来以至少 10 : 1 的比例表达需要伽马-羧化作用的蛋白和 γ -谷氨酰羧化酶,和将所述纯化的羧化蛋白与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂混合。

[0109] 基于蛋白的治疗剂通常是冷冻保存的、冷藏保存的、在室温下保存的,和/或处在冻干的状态。

[0110] 本发明的组合物可以通过本领域公知的常规步骤、使用常规的药物赋形剂来获

得,但是最可能的是处于适合于注射的形式,胃肠外地注射或直接注射到受伤部位。

[0111] 水性悬浮液一般含有细粉状形式的活性成分和一种或多种悬浮剂,例如,羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯-吡咯烷酮、黄耆树胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂,例如卵磷脂或环氧烷(alkylene oxide)与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸酯)、或环氧乙烷(ethylene oxide)与长链脂族醇的缩合产物,例如 heptadecaethyleneoxycetanol,或环氧乙烷与来源于脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯,或环氧乙烷与长链脂族醇的缩合产物,例如 heptadecaethyleneoxycetanol,或环氧乙烷与来源于脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物,例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯,或环氧乙烷与来源于脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物,例如聚乙烯单油酸山梨醇酐酯。水性悬浮液也可含有一种或多种防腐剂(例如对羟基苯甲酸乙酯或丙酯)、抗氧化剂(例如抗坏血酸)、着色剂、调味剂、和/或甜味剂(例如蔗糖、糖精或阿斯巴甜)。

[0112] 油性悬浮液可以通过将活性成分悬浮在植物油(例如,花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(例如液体石蜡)中来配制。油性悬浮液也可含有稠化剂,例如蜂蜡、固体石蜡或十六醇。可以添加甜味剂,例如以上列出的,和调味剂来提供适口的口服制品。可以通过添加抗氧化剂,例如抗坏血酸来保存这些组合物。

[0113] 适合于通过添加适合的稀释剂来制备用于注射的水性制品的粉末,一般地含有活性成分和适合的载体和赋形剂、悬浮剂和一种或多种稳定剂或防腐剂。稀释剂可含有其他适合的赋形剂,例如防腐剂、渗透压调节剂和稳定剂。

[0114] 本发明的药物组合物也可处于水包油乳化剂(oil-in-water emulsions)的形式。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或任何这些的混合物。适合的乳化剂可以是,例如,天然发生的树胶,例如阿拉伯树胶或黄耆树胶,天然发生的磷脂例如大豆、卵磷脂,来源于脂肪酸和己糖醇酐的酯或偏酯(例如单油酸山梨醇酐酯)和所述偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯单油酸山梨醇酐酯。

[0115] 本发明的药物组合物也可以处于无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌溶液或悬浮液形式,其可以根据已知步骤使用一种或多种适合的分散或润湿剂和悬浮剂来配制,这些已经在上文记载了。无菌可注射制品也可以是无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如,1,3-丁二醇溶液。

[0116] 关于制剂的进一步的信息,读者可参考 Comprehensive Medicinal Chemistry(Corwin Hansch;Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990 的卷 5 的 25.2 章;或者 Drugs and the pharmaceutical sciences;Protein formulation and delivery(Eugen J. McNally, executive editor), Marcel Dekker Inc 2000 的卷 99。

[0117] 与一种或多种赋形剂组合产生单个剂量形式的活性成分的数量可以取决于治疗的宿主和施用的特定途径而变化。例如,打算向人类注射的制剂一般含有,例如,0.5mg 到 2g 的活性试剂,与适合的和方便数量的赋形剂复合,赋形剂可以从总组合物重量的约百分之 5 到约百分之 98 变化。剂量单位形式一般含有约 1mg 到约 500mg 的活性成分。蛋白性的治疗剂通常是冷冻保存的或是冻干的。关于施用途径和剂量方案的进一步信息,读者可参考 Comprehensive Medicinal Chemistry(Corwin Hansch;Chairman of Editorial Board),

Pergamon Press 1990 的卷 5 的 25.3 章。

[0118] 用于治疗或预防目的的化合物的剂量大小将根据状况的性质和严重程度、动物或病人的年龄和性别和施用途径,根据医学的公知原则自然地改变。在使用化合物用于治疗或预防目的时,一般地这样施用,使得日剂量在例如每公斤体重接受 0.5mg 到 75mg 的范围内,如果需要,以分开的剂量给药。一般地,当采用胃肠外途径时,施用更低的剂量。因而,例如,对于静脉内施用,一般使用在例如每公斤体重 0.5mg 到 30mg 的范围内的剂量。类似地,例如,对于通过吸入的施用,使用在例如每公斤体重 0.5mg 到 25mg 的范围内的剂量。

[0119] 通过以下非限制性的实施例进一步描述本发明:

[0120] 除非另有陈述,本发明的实施将采用本领域技术人员能力之内的分子生物学和重组 DNA 技术的常规方法。这些技术已经在文献中完整地说明了。参见,例如, Sambrook et al., eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY (2002); Glover & Hames, eds., *DNA Cloning 3: A Practical Approach*, Vols. I, II, & III, IRL Press, Oxford (1995); Colowick & Kaplan, eds., *Methods in Enzymology*, Academic Press; Weir et al., eds., *Handbook of Experimental Immunology*, 5th ed., Blackwell Scientific Publications, Ltd., Edinburgh, (1997)。

[0121] 实施例 1

[0122] 编码人类 FII (hPT) 和人类 GGCX 的 cDNA 的扩增

[0123] 人类肝脏 mRNA 从 Clontech 购买,使用来自 Invitrogen 的 Superscript 系统进行 cDNA 合成。获得的 cDNA 用作扩增人类 FII 的模板,使用:

[0124] 引物 PTF0 5' -ATTCTCAGTGACCCAGGAGCTGACA-3', (SEQ ID NO :3) 和

[0125] 引物 PTEXT 5' -CTACTCTCCAACTGATCAATGACCTTCTGTATCCACTTCTT-3', (SEQ ID NO :4)。

[0126] 扩增人类 GGCX, 使用:

[0127] 引物 hglx5, 5' -TCCGCAGAGCAATGGCGGTGTCT-3', (SEQ ID NO :5) 和

[0128] hglx3, 5' -CCAACATCTGGCCCCTCAGAACT-3', (SEQ ID NO :6)。

[0129] 将编码 FII 的 PCR 产物直接克隆到用 TA-TOPO 处理的载体 pCDNA3.1V5/His (Invitrogen) 中。选择按正确方向插入 hFII cDNA 的克隆,得到 Ptext5 对照构建体 (附图 1b)。在 SV40 启动子的控制下的 GGCX 编码 cDNA 通过使用限制性内切酶 BamHI 和 NotI, 将 GGCX 编码片段从 pCDNA3.1V5/His TA-TOPO 转移到 pZeoSV2+ 载体 (Invitrogen) 来获得。除去 GGCX 插入物下游的 EcoRV-NotI 限制性位点。然后将来自产生的 pZeoSV2-GGCX 质粒的平端 ClaI-BclI 片段 (含有 SV40 启动子和含有 GGCX 的插入物,但不含 GGCX 编码序列下游的多聚腺苷酸位点和多聚腺苷酸信号) 克隆到 pCDNA3.1+ (Invitrogen) 的平端 DraIII 限制性位点中。选择相对于 CMV 启动子具有串联插入的 (相同的转录方向) pSV40-GGCX 片段的克隆,将来自 Ptext5 的平端 KpnI-NotI FII 编码片段克隆到 EcoRV 位点中,来获得 PN32 构建体 (附图 1a)。PN32 和 Ptext5 的 DNA 序列在附录 2 中。所有的克隆方法是根据标准方法和 / 或厂商推荐的步骤。

[0130] PN32 构建体包括以下关键特征:

[0131] - 人类巨细胞病毒 (hCMV) 即时 - 早期启动子控制人类凝血酶原 cDNA 的转录, 后面是牛生长激素 (BGH) 多聚腺苷酸信号用于有效的转录终止, 和 mRNA 的多聚腺苷酸化。

[0132] -SV40 早期启动子控制人类 γ -羧化酶 cDNA (GGCX) 的转录, 没有明显的多聚腺苷酸位点或信号。

[0133] - 其他特征如附图 1a) 所示。

[0134] 为了比较, 使用无 GGCX 的 PText5 构建体 (附图 1b)。PTEXT5 的核苷酸序列在 SEQ ID NO :1 中示出。PN32 的核苷酸序列在 SEQ IDNO :2 中示出。

[0135] 获得凝血酶原生产细胞系

[0136] 将附图 1 中的两个构建体转染到 CHO-S 细胞 (Invitrogen) 中。选择稳定的转染子, 使用商业上可获得的凝血酶原活性化验 (Chromogenix) 筛选高产的克隆。在这个化验中, 首先用蛇毒毒素 (Ecarin, 可从 Sigma 获得) 处理含凝血酶原的样品来产生凝血酶。然后通过添加生色底物 (S-2238) 化验凝血酶活性, 生色底物在被凝血酶处理时产生颜色。两种构建体并行地进行转染和克隆的选择。在含有 9% 热钝化的胎牛血清的 DMEM 培养基中进行细胞培养。然后改造获得的克隆以在无动物成分的培养基中生长。获得的最好的生产克隆来自用 PN32 (FII+GGCX) 的转染, 当在无动物成分的化学成分明确的培养基中培养时, 其产生了多达 400mg/L 的人类重组凝血酶原 (远远超过任何已公开的水平)。纯化重组生产的 rhFII (根据 Josic et al., Journal of Chromatography B, 790 :183-197, 2003 中公开的方法), 根据标准技术通过使用 Q-Sepharose 柱的离子交换层析来分级, 获得纯的完全羧化的 rhFII。达到 78mg/L 的发酵罐生产的 rhFII 是完全羧化的, 与从人类血浆纯化的凝血酶原具有相同的生物学活性。通过蛋白的 N-末端测序和通过凝血酶原酶化验 (Mao et al. JBC, 273 :30086-30091, 1998) 分析羧化作用。在人类乏血小板血浆 (platelet-poor plasma) 中通过添加组织因子触发凝血酶产生, 基本上如 Stig 等描述的 (Blood Coagulation and Fibrinolysis, 14 :457-462, 2003) 测量内源凝血酶潜力 (potential)。

[0137] 在无动物成分的化学成分明确培养基中, 用 PText5 构建体获得的最好的克隆得到达 10mg/L 的生产率, 这与文献中报道的处在相同的范围。从 PText5 克隆获得的完全羧化的凝血酶原的部份估计约 50%。因而, 使用含 γ -羧化酶的低表达水平配置的 PN32 构建体, 最终获得的完全活性 rhFII 至少要十倍高。对于每种构建体, 鉴定了具有类似表达水平的几个克隆。

[0138] 实施例 2

[0139] 在 CHO 细胞系中 ggcx 活性的测量

[0140] 分别通过用 PN32 构建体 (共表达人类 GGCX) 和 PTEXT5 (没有共表达 GGCX) 转染获得的两个生产 rhFII 的 CHO-S 细胞系, 使用补充有 5 μ g/ml 维生素 K 的无蛋白培养基在旋转瓶中生长。每天替换十分之一的生长培养基。培养 7 天后收获细胞, 如 Berkner 等 (Proc Natl Acad Sci USA 89 :6242-6246 1992) 描述的制备微体 (microsomes)。从收获的培养物上清液纯化人类重组 FII。如 Berkner 和 Pudota (Proc Natl Acad Sci USA 95 :446-471 1998) 以及 Lingenfelter 和 Berkner (Biochemistry 35 :8234-8243, 1996) 描述的测量 GGCX 活性。我们的测量显示, 使用相同的生长条件, 在人类 GGCX 共表达 CHO 细胞系中, GGCX 活性是仅表达 rhFII 的 CHO 细胞系的 1.5 倍。

[0141] 实施例 3

[0142] 在 CHO-S 细胞系中 γ -羧化酶和凝血酶原的 mRNA 表达的实时逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 分析

[0143] 通过用 PN32(FII+GGCX) 和 Ptext5(仅 FII) 构建体分别稳定转染获得的两个 CHO-S 细胞系, 使用补充有维生素 K 的无蛋白培养基在旋转瓶中培养。培养 4、5 和 6 天后抽取培养物样品来覆盖 (cover)mRNA 产生方面的估计的峰值水平。根据卖主 Invitrogen 提供的方案, 用 Trizol™ 分离 RNA。用来自 Ambion 的 DNA-free™ 试剂盒对分离的 RNA 进行 DNaseI 处理。使用随机的六聚引物和来自用于 RT-PCR 的 Superscript™ First-Strand Synthesis System, Invitrogen 的试剂盒内容物, 进行 cDNA 合成。

[0144] 使用软件 Primer Express™, Applied Biosystems 选择用于实时 RT-PCR 的引物和 Vic 标记的探针。

[0145] 人类 γ -羧化酶寡核苷酸

[0146] 5' ACACCTCTGGTTCAGACCTTTCTT 3' 正向引物 (SEQ ID NO :7)

[0147] 5' AATCGCTCATGGAAGGAGTATTT 3' 反向引物 (SEQ ID NO :8)

[0148] 5' CAACAAAGGCTCCAGGAGATTGAACGC 3' 探针 (SEQ ID NO :9)

[0149] 扩增子长度 86bp

[0150] 人类凝血酶原寡核苷酸

[0151] 5' TGGAGGACAAAACCGAAAGAGA 3' 正向引物 (SEQ ID NO :10)

[0152] 5' CATCCGAGCCCTCCACAA 3' 反向引物 (SEQ ID NO :11)

[0153] 5' CTCCTGGAATCCTACATCGACGGGC 3' 探针 (SEQ ID NO :12)

[0154] 扩增子长度 69bp

[0155] 通过 Operon/Qiagen 制造引物, 探针从 Applied Biosystems 订购。还使用了啮齿动物 GAPDH 对照引物和探针 (Applied Biosystems ;ABI#4308318 TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents Protocol)- 扩增子长度 177bp。在 ABI Prism™ 7700 Sequence detector, Applied Biosystems 上进行实时 RT-PCR 反应。在琼脂糖凝胶上确认预期长度的扩增的 PCR 产物。对所有三个基因进行稀释系列 (dilution series) 来研究 PCR 反应的效率。相对于对照基因啮齿动物 GAPDH 的表达, 表示了 γ -羧化酶和凝血酶原的表达水平。

[0156] 凝血酶原

[0157]

	CHO-S	CHO-S	CHO-S	CHO-S	CHO-S	CHO-S
	PText5 第4天	PText5 第5天	PText5 第6天	PN32 第4天	PN32 第5天	PN32 第6天
2 ^{-delta Ct}	0.008014	0.076239	0.066677	0.204948	0.322343	0.364334

[0158] γ -羧化酶

[0159]

	CHO-S	CHO-S	CHO-S	CHO-S	CHO-S	CHO-S
	PText5 第4天	PText5 第5天	PText5 第6天	PN32 第4天	PN32 第5天	PN32 第6天
2 ^{-delta Ct}	3.39E-07	0	0	0.000277	0.00159	0.001568

[0160] 根据检测的 rhFII :GGCX 的相对表达水平,取决于采样的天数计算出约 74-232 : 1 的比例。对于用 PN32 转染的细胞系,共表达 rhFII 和 GGXC,每个细胞的转录产物数目计算为 GGXC mRNA 是大约 8, rhFII mRNA 是大约 2000,因而得出 rhFII :GGCX 比例大约 250 : 1。对于相同的样品,GAPDH 对照 mRNA 转录产物 / 细胞大约 4000。

[0161] 实施例 4

[0162] 人类 FII 的生产

[0163] 与实施例 1 中类似地,将实施例 1 中克隆的人类 FII 和 GGXC cDNA 插入到 pCDNA3.1 中。为了得到更高的 GGXC 水平,将来自 pZeoSV2+ 的多聚腺苷酸信号包括在被克隆入 pCDNA3.1 的平端化 DraIII 位点中的 pSV40-GGXC-pA 片段中。与实施例 1 相比,选择具有反向的含 GGXC 的片段的克隆。然后按与实施例 1 相同的方法进行 FII 片段的克隆。最终的构建体 PP6 在附图 2 中示出,PP6 的核苷酸序列在 SEQ IDNO :13 中示出。

[0164] 如实施例 1 中描述的通过转染 CHO-S 获得两个凝血酶原生产细胞系,B2F4 和 H3B10。如实施例 1 中一样从这两个细胞系中纯化和表征凝血酶原。B2F4 的培养物得到了 30-70mg/L 的生产率,完全羧化的部分为 55-87% (rhFII 越多,完全羧化的越少)。添加丁酸盐得到了稍高一些的生产率,但是降低了完全羧化的 rhFII 的部分,被认为不是有益的。H3B10 生长缓慢,得到约 50mg/L 的生产率,相对于培养物中的细胞数目来说是很高的,完全羧化的 rhFII 的部分是约 60%。与在实施例 1 中获得的细胞系相比,对 CHO 细胞系使用 PP6 构建体产生了较少的完全羧化的 rhFII。然而,完全活性的重组凝血酶原的产生仍然远高于先前公开的水平。

[0165] 实施例 5

[0166] 通过测量 mRNA 的数量在 CHO-S 细胞系中 γ -羧化酶和凝血酶原的表达的实时 RT-PCR 分析

[0167] 通过与实施例 3 相同的方法和相同的引物,通过实时 PCR 分析,分析了实施例 4 的 B2F4 和 H3B10 细胞系。在峰值生产率收集 10ml 的培养物样品,以与实施例 3 中的样品相当。由于这个克隆的缓慢生长,克隆 H3B10 的样品来自第 10 天,对于克隆 B2F4,样品来自第 6 天。

[0168] 表 4,共表达 GGXC 的凝血酶原生产细胞系的实时 RT-PCR 分析结果。对每个 B2F4 和 H3B10 的两个独立 100ml 旋转器培养物取样用于实时 RT-PCR 分析。

[0169]

转录物	总细胞	产生的总 RNA 数	RT-PCR 使用的总 RNA	RT-PCR 中的 mRNA 数	RT-PCR 中的细胞数	Ct	mRNA 拷贝数	mRNA/ 细胞拷贝数
P1E2* 第 6 天								
PT	2.00E+07	2.39E-04	1.25E-08	2.50E-09	1.05E+03	19	2.10E+06	2005
GGCX	2.00E+07	2.39E-04	1.25E-08	2.50E-09	1.05E+03	27	8.19E+03	8
GAPDH	2.00E+07	2.39E-04	1.25E-08	2.50E-09	1.05E+03	18	4.19E+06	4010
B2F4-1 第 6 天								

PT	1.30E+07	2.20E-04	1.25E-08	2.50E-09	7.39E+02	19.2	1.83E+06	2472
GGCX	1.30E+07	2.20E-04	1.25E-08	2.50E-09	7.39E+02	24.1	6.11E+04	83
GAPDH	1.30E+07	2.20E-04	1.25E-08	2.50E-09	7.39E+02	19.8	1.20E+06	1631
B2F4-2 第 6 天								
PT	1.10E+07	1.40E-04	1.25E-08	2.50E-09	9.82E+02	19.2	1.83E+06	859
GGCX	1.10E+07	1.40E-04	1.25E-08	2.50E-09	9.82E+02	24.1	6.11E+04	62
GAPDH	1.10E+07	1.40E-04	1.25E-08	2.50E-09	9.82E+02	19	2.10E+06	2135
H3B10-1 第 10 天								
PT	1.10E+07	2.90E-04	1.25E-08	2.50E-09	4.74E+02	17.77	4.92E+06	1.0375
GGCX	1.10E+07	2.90E-04	1.25E-08	2.50E-09	4.74E+02	23.4	9.93E+04	210
GAPDH	1.10E+07	2.90E-04	1.25E-08	2.50E-09	4.74E+02	17.96	4.31E+06	9095
H3B10-2. 第 10 天								
PT	8.90E+06	3.10E-04	1.25E-08	2.50E-09	3.59E+02	19.2	1.83E+06	5087
GGCX	8.90E+06	3.10E-04	1.25E-08	2.50E-09	3.59E+02	25.3	2.66E+04	74
GAPDH	8.90E+06	3.10E-04	1.25E-08	2.50E-09	3.59E+02	18.9	2.25E+06	6263

[0170] *来自实施例 3 的 P1E2 数据用于对比。

[0171] 对于克隆 H3B10, 计算的 rhFII mRNA :GGCX mRNA 比例大约是 30 : 1, 对于克隆 B2F4 大约 50 : 1, 对于克隆 P1E2 大约 250 : 1。

[0172] 实施例 6

[0173] 人类凝集因子 IX(FIX) 的生产

[0174] 从购自 Invitrogen 的人类基因库肝脏 cDNA 扩增人类凝集因子 (human coagulation factor) IX cDNA。寡核苷酸引物为 :5'-末端 ;F9f. ampl. :5' -CACCATGCAGC GCGTGAACATGAT-3' (SEQ ID NO :16), 和 3' 末端 ;F9r. ampl. :5' CCTTGAAATCCATCTTTCATT A-3' (SEQ ID NO :17)。

[0175] 通过 DNA 测序确认正确序列的克隆。使用 Pfx 聚合酶 (Invitrogen) 和克隆引物 PCR 扩增人类 FIX 片段来产生平端片段。使用 T4 多核苷酸激酶将平端片段磷酸化, 克隆来自实施例 1 和实施例 4 的、EcoRV 消化的和去磷酸化的 pCDNA-GGCX 载体中。这样, 获得了类似于用于生产人类凝血酶原的共表达构建体 (实施例 1 和实施例 4) 的、用于共表达人类 FIX 和 GGCX 的构建体。通过 DNA 测序和在 COS-7 细胞中的瞬时表达确认正确序列的克隆。载体构建体 F9NopA 可以在附图 3a 中看到, 载体构建体 F9hg1x 在附图 3b 中示出。载

体 F9NopA 和 F9hglx 之间的差异是 GGCX 基因的转录方向。F9NopA 的核苷酸序列在 SEQ ID NO:14 中示出, F9hglx 的核苷酸序列在 SEQID NO:15 中示出。

[0176] 生产 rhFIX 的细胞系的建立

[0177] 使用实施例 1 中描述的步骤将 rhFIX 构建体转染到 CHO-S 细胞中。通过细胞上清液的 ELISA 对每个 FIX 构建体根据 rhFIX 表达筛选约 3000 个克隆。使用的抗体来自 Haemathology Technology Inc. 和 DakoCytomation。选择克隆, 进行改造以在无蛋白的化学成分明确的 CHO 培养基上生长。细胞在 T- 烧瓶中 37°C 生长, 或在旋转瓶中 32-37°C 生长。两种培养物的 CO₂ 浓度都是 5%。通过在 pH 7.0 进行 Q-Sepharose 阴离子交换色谱将产生的 rhFIX 纯化到同质。通过使用 FIX 缺陷血浆 (Precision Biologic) 的凝结化验, 测定重组 hFIX 活性。获得的最好的生产 rhFIX 的克隆是 N4D5, 其是使用 F9NopA 构建体获得的, 在 T- 烧瓶中无蛋白的化学成分明确培养基中生长产生多达 4 μg/ml 的活性 rhFIX。相同的克隆在旋转瓶中生长产生达 7.1 μg/ml 的 rhFIX。总的生产率, 还包括不完全羧化的、非活性的 rhFIX, 通过 Western 印迹分析估计至少 30 μg/ml。用 rhFIX 构建体 F9hglx 获得的最好的生产克隆是 P1G9, 在相似条件下产生 0.7(T- 烧瓶)-1.3(旋转) μg/ml 的 rhFIX。结果指明, 通过使用 F9NopA 构建体以低水平共表达 GGCX 改进了 rhFIX 生产率, 而使用构建体 F9hglx 共表达 GGCX 没那么有益。还注意到, 在细胞系发育过程期间在同时的生产率筛选中, 产生 N4D5 克隆的 F9NopA 构建体, 一般地得出比产生 P1G9 克隆的 F9hglx 构建体更高的 ELISA 信号。

[0178] N4D5 细胞系的生产率是早先公开的、在可比较的状况下获得的水平的 4-6 倍, 其中 IC4、IG8、r-FIX BHK 和 r-FIX 293 是在参考文献中提及的克隆的名称 (表 5)。

[0179] 表 5. 人类 FIX 生产细胞系的生产率的比较

[0180]

细胞系/构建体	产生的活性 rhFIX 数量		总生产率 (μg/ml)	参考
	T-烧瓶 (μg/ml)	旋转器 (μg/ml)		
N4D5/F9NopA CHO, 低度 GGCX 共表达	4	7.1	>30	实施例 6
P1G9/F9hglx CHO, 中度 GGCX 共表达	0.7	1.3	nd	实施例 6
IC4	0.9	nd	30	Rehemtulla 1993.

[0181]

CHO, HA (对照) 共表达				
IC4 CHO. 高度GGCX共表达	1	nd	29	Rehemtulla 1993.
IC4	0.9	nd	20	US 5,460,950
1G8 CHO	1.5	nd	43	Kaufman, RJ et al 1986 JBC 261:9622-9628
r-FIX BHK	0.004/24h	nd	0.004/24h	Hallgren 2002
r-FIX 293	0.004/24h	nd	0.004/24h	Hallgren 2002

[0182] 实施例 7

[0183] 通过测量 mRNA 的数量在 CHO-S 细胞系中 γ -羧化酶和因子 IX 的表达的实时 RT-PCR 分析

[0184] 重组 hFIX 生产克隆在 32-37°C 在旋转瓶子中、在 100ml 补充有维生素 K 的无蛋白的化学成分明确培养基中生长。在峰值 rhFIX 浓度收集 5-10ml 样品,分析人类 FIX 和 GGCX 转录产物,以及 GAPDH 对照 (持家, house-keeping) 基因的转录产物的含量。步骤和实施例 3 中一样。rhFIX 的引物如下:

[0185] 人类因子 IX 引物

[0186] 5' AATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTG 3' 正向引物 (SEQ ID NO :18)

[0187] 5' CACTGCTGGTTCACAGGACTTCT 3' 反向引物 (SEQ ID NO :19)

[0188] 5' TCCTGTACTGAGGGATATCGACTGCAGAAAAC 3' 探针 (SEQ ID NO :20)

[0189] 扩增子长度 84bp

[0190] 取决于培养物温度和培养物接种量,在不同的天数信使 RNA 水平出现峰值。发现 mRNA 的峰值水平与培养基中 rhFIX 的峰值浓度符合得很好。

[0191] 表 6. rhFIX 生产克隆的实时 RT-PCR 分析的结果

[0192]

细胞系 - 批次	培养天数	2 ⁻ -delta Ct FIX	2 ⁻ -delta Ct GGCX	mRNA 比例 FIX :GGCX
N4D5-100	11	0.255253	0.005461	47 : 1
N4D5-2	14	0.264866	0.006201	43 : 1
P1G9-A	6	0.022982	0.005601	4 : 1
P1G9-B	8	0.04181	0.007687	5 : 1

[0193] 根据实时 RT-PCR 分析我们还发现,尽管 2⁻-delta Ct- 值随培养时间和条件变化,

对于每个克隆 FIX :GGCX mRNA 比例大约是相同的。对于最好的 rhFIX 生产克隆 N4D5, 该比例是大约 45 : 1。另一个克隆 P1G9 的分析得出了大约 4.5 : 1 的更低的比例。P1G9 克隆仅生产了 N4D5 生产的 rhFIX 数量的 20%。

[0194] 序列表:

[0195] SEQ ID NO :1

[0196] GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT
[0197] GCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTG
[0198] CGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATC
[0199] TGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATAACGCGTTGA
[0200] CATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCAT
[0201] ATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCCTGGCTGACCGCCCAAC
[0202] GACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC
[0203] TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCA
[0204] AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCCT
[0205] GGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTAT
[0206] TAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAG
[0207] CGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT
[0208] TTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGC
[0209] AAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAAC
[0210] TAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCC
[0211] AAGCTGGCTAGTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATT
[0212] GCCCTTATTCCTCAGTGACCCAGGAGCTGACACACTATGGCGCACGTCCGAGGCTTGC
[0213] AGCTGCCTGGCTGCCTGGCCCTGGCTGCCCTGTGTAGCCTTGTGCACAGCCAGCATGT
[0214] GTTCCTGGCTCCTCAGCAAGCACGGTCGCTGCTCCAGCGGGTCCGGCGAGCCAACAC
[0215] CTTCTTGGAGGAGGTGCGCAAGGGCAACCTGGAGCGAGAGTGCGTGGAGGAGACGTG
[0216] CAGCTACGAGGAGGCCCTTCGAGGCTCTGGAGTCCCTCCACGGCTACGGATGTGTTCTGG
[0217] GCCAAGTACACAGCTTGTGAGACAGCGAGGACGCCTCGAGATAAGCTTGTGTCATGTC
[0218] TGGAAAGGTAACCTGTGCTGAGGGTCTGGGTACGAACTACCGAGGGCATGTGAACATCAC
[0219] CCGGTCAGGCATTGAGTGCCAGCTATGGAGGAGTCGCTACCCACATAAGCCTGAAAATC
[0220] AACTCCACTACCCATCCTGGGGCCGACCTACAGGAGAATTTCTGCCGAACCCCGACA
[0221] GCAGCACCACGGGACCCTGGTGCTACACTACAGACCCCACCGTGAGGAGGCAGGAAT
[0222] GCAGCATCCCTGTCTGTGGCCAGGATCAAGTCACTGTAGCGATGACTCCACGCTCCGA
[0223] AGGCTCCAGTGTGAATCTGTCACTCCATTGGAGCAGTGTGTCCCTGATCGGGGGCAG
[0224] CAGTACCAGGGGCGCTGGCGGTGACCACACATGGGCTCCCTGCCTGGCCTGGGCC
[0225] AGCGCACAGGCCAAGGCCCTGAGCAAGCACCAGGACTTCAACTCAGCTGTGCAGCTGG
[0226] TGGAGAACTTCTGCCGAACCCAGACGGGGATGAGGAGGGCGTGTGGTGTCTATGTGG
[0227] CCGGGAAGCCTGGCGACTTTGGGTACTGCGACCTCAACTATTGTGAGGAGGCCGTGGA
[0228] GGAGGAGACAGGAGATGGGCTGGATGAGGACTCAGACAGGGCCATCGAAGGGCGTAC
[0229] CGCCACCAGTGAGTACCAGACTTTCTTCAATCCGAGGACCTTTGGCTCGGGAGAGGCA

[0230] GACTGTGGGCTGCGACCTCTGTTTCGAGAAGAAGTCGCTGGAGGACAAAACCGAAAGAG
[0231] AGCTCCTGGAATCCTACATCGACGGGCGCATTGTGGAGGGCTCGGATGCAGAGATCGG
[0232] CATGTACCTTGGCAGGTGATGCTTTTCCGGAAGAGTCCCCAGGAGCTGCTGTGTGGG
[0233] GCCAGCCTCATCAGTGACCGCTGGGTCTCACCGCCGCCACTGCCTCCTGTACCCGC
[0234] CCTGGGACAAGAACTTCACCGAGAATGACCTTCTGGTGCGCATTGGCAAGCACTCCCG
[0235] CACCAGGTACGAGCGAAAACATTGAAAAGATATCCATGTTGGAAAAGATCTACATCCACC
[0236] CCAGGTACAACCTGGCGGGAGAACCTGGACCGGGACATTGCCCTGATGAAGCTGAAGAA
[0237] GCCTGTTGCCCTTCAGTGACTACATTACCCCTGTGTGTCTGCCCGACAGGGAGACGGCA
[0238] GCCAGCTTGCTCCAGGCTGGATAACAAGGGGCGGGTGACAGGCTGGGGCAACCTGAAG
[0239] GAGACGTGGACAGCCAACGTTGGTAAGGGGCGAGCCAGTGTCTGCAGGTGGTGAAC
[0240] CTGCCCATTTGTGGAGCGGCCGGTCTGCAAGGACTCCACCCGGATCCGCATCACTGACA
[0241] ACATGTTCTGTGCTGGTTACAAGCCTGATGAAGGGAAAACGAGGGGATGCCTGTGAAGG
[0242] TGACAGTGGGGGACCCCTTTGTCATGAAGAGCCCTTTAACAACCGCTGGTATCAAATGG
[0243] GCATCGTCTCATGGGGTGAAGGCTGTGACCGGGATGGGAAATATGGCTTCTACACACA
[0244] TGTGTTCCGCCTGAAGAAGTGGATACAGAAGGTCATTGATCAGTTTGGAGAGTAGAAGG
[0245] GCAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCCGCGGTT
[0246] CGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATC
[0247] ATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC
[0248] CAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTTCTTGGACCCTGGAAGGTGCCACTCC
[0249] CACTGTCCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTC
[0250] TATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAG
[0251] CAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTG
[0252] GGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGT
[0253] GGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTC
[0254] GCTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCGCGGCTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCG
[0255] GGGCATCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTG
[0256] ATTAGGGTGTGGTTACGTTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTG
[0257] ACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAAC
[0258] CCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGGGATTTTCGGCCTATTGGTTAA
[0259] AAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTA
[0260] GGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTC
[0261] AATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGC
[0262] AAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCCATCCCC
[0263] CCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATT
[0264] TATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCT
[0265] TTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGAT
[0266] CTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCA
[0267] GGTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAA
[0268] TCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTT

[0269] TGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTA
[0270] TCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAG
[0271] CGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCA
[0272] CCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACG
[0273] CTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAC
[0274] GTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGG
[0275] GCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGA
[0276] TCTCGTCGTGACCCATGGCGATG CCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCCG
[0277] TTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG
[0278] CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCT
[0279] CGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG
[0280] ACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGCGAAAATGACCGACCAAGCGACGCCCA
[0281] ACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGA
[0282] ATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGT
[0283] TCTTCGCCCCACCCAACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCA
[0284] TCACAAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACT
[0285] CATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATAACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATC
[0286] ATGGTCATAGCTGTTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACG
[0287] AGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAA
[0288] TTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAA
[0289] TGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCCT
[0290] CGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTC
[0291] AAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA
[0292] GCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
[0293] ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCG
[0294] AAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGC
[0295] TCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGAAG
[0296] CGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCT
[0297] CCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGG
[0298] TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCA
[0299] CTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTG
[0300] GTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
[0301] CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGT
[0302] AGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGA
[0303] AGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAG
[0304] GGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATG
[0305] AAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTA
[0306] ATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCGCTGACTC
[0307] CCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAA

[0308] TGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGC
[0309] CGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATT
[0310] AATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGT
[0311] TGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCT
[0312] CCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
[0313] AGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCAT
[0314] GGTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGT
[0315] GACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT
[0316] CTTGCCCGGGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTC
[0317] ATCATTGGAACCGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATC
[0318] CAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAG
[0319] CGTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCG
[0320] ACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGG
[0321] GTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGG
[0322] TTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC//
[0323] SEQ ID NO :2
[0324] GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGAT
[0325] GCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTG
[0326] CGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATC
[0327] TGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGA
[0328] CATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT
[0329] ATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAAC
[0330] GACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC
[0331] TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC
[0332] AAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGC
[0333] TGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTA
[0334] TTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA
[0335] GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
[0336] TTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACG
[0337] CAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAA
[0338] CTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACC
[0339] CAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTG
[0340] TGGTGGAAATGCCCTTATTCTCAGTGACCCAGGAGCTGACACACTATGGCGCACGTCC
[0341] GAGGCTTGACGTGCCTGGCTGCCTGGCCCTGGCTGCCCTGTGTAGCCTTGTGCACAG
[0342] CCAGCATGTGTTCTGGCTCCTCAGCAAGCACGGTCGCTGCTCCAGCGGGTCCGGCGA
[0343] GCCAACACCTTCTTGGAGGAGGTGCGCAAGGGCAACCTGGAGCGAGAGTGCGTGGAG
[0344] GAGACGTGCAGCTACGAGGAGGCCCTTCGAGGCTCTGGAGTCTCCACGGCTACGGAT
[0345] GTGTTCTGGGCCAAGTACACAGCTTGTGAGACAGCGAGGACGCTCGAGATAAGCTTG
[0346] CTGCATGTCTGGAAGGTAACCTGTGCTGAGGGTCTGGGTACGAACTACCGAGGGCATGT

[0347] GAACATCACCCGGTCAGGCATTGAGTGCCAGCTATGGAGGAGTCGCTACCCACATAAG
[0348] CCTGAAATCAACTCCACTACCCATCCTGGGGCCGACCTACAGGAGAATTTCTGCCGCAA
[0349] CCCCACAGCAGCACACCACGGGACCCTGGTGCTACACTACAGACCCCACCGTGAGGAG
[0350] GCAGGAATGCAGCATCCCTGTCTGTGGCCAGGATCAAGTCACTGTAGCGATGACTCCA
[0351] CGCTCCGAAGGCTCCAGTGTGAATCTGTACCTCCATTGGAGCAGTGTGTCCCTGATC
[0352] GGGGGCAGCAGTACCAGGGGCGCCTGGCGGTGACCACACATGGGCTCCCCTGCCTGG
[0353] CCTGGGCCAGCGCACAGGCCAAGGCCCTGAGCAAGCACCAGGACTTCAACTCAGCTGT
[0354] GCAGCTGGTGGAGAACTTCTGCCGCAACCCAGACGGGGATGAGGAGGGCGTGTGGTG
[0355] CTATGTGGCCGGGAAGCCTGGCGACTTTGGGTACTGCGACCTCAACTATTGTGAGGAG
[0356] GCCGTGGAGGAGGAGACAGGAGATGGGCTGGATGAGGACTCAGACAGGGCCATCGAA
[0357] GGGCGTACCGCCACCAGTGAGTACCAGACTTTCTTCAATCCGAGGACCTTTGGCTCGG
[0358] GAGAGGCAGACTGTGGGCTGCGACCTCTGTTTCGAGAAGAAGTCGCTGGAGGACAAAAC
[0359] CGAAAGAGAGCTCCTGGAATCCTACATCGACGGGCGCATTGTGGAGGGCTCGGATGCA
[0360] GAGATCGGCATGTCACCTTGGCAGGTGATGCTTTTCCGGAAGAGTCCCCAGGAGCTGC
[0361] TGTGTGGGGCCAGCCTCATCAGTGACCGCTGGGTCTCACCGCCGCCACTGCCTCCT
[0362] GTACCCGCCCTGGGACAAGAACTTCAACGAGAATGACCTTCTGGTGCGCATTGGCAAG
[0363] CACTCCCGCACCAGGTACGAGCGAAAACATTGAAAAGATATCCATGTTGGAAAAGATCTA
[0364] CATCCACCCCAGGTACAACCTGGCGGGAGAACCTGGACCGGGACATTGCCCTGATGAAG
[0365] CTGAAGAAGCCTGTTGCCTTCAGTGACTIONTACCTTACCCTGTGTGTCTGCCCGACAGGGA
[0366] GACGGCAGCCAGCTTGCTCCAGGCTGGATACAAGGGGCGGGTGACAGGCTGGGGCAA
[0367] CCTGAAGGAGACGTGGACAGCCAACGTTGGTAAGGGGACGCCAGTGTCTGCAGGT
[0368] GGTGAACCTGCCATTGTGGAGCGGCCGGTCTGCAAGGACTCCACCCGGATCCGCATC
[0369] ACTGACAACATGTTCTGTGCTGGTTACAAGCCTGATGAAGGGAAAACGAGGGGATGCCT
[0370] GTGAAGGTGACAGTGGGGGACCCTTTGTCATGAAGAGCCCCTTTAACAACCGCTGGTA
[0371] TCAAATGGGCATCGTCTCATGGGGTGAAGGCTGTGACCGGGATGGGAAAATATGGCTTC
[0372] TACACACATGTGTTCCGCCTGAAGAAGTGGATACAGAAGGTCATTGATCAGTTTGGAGA
[0373] GTAGAAGGGCAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGC
[0374] CCGTTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT
[0375] TGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCCCTA
[0376] ATAAAAATGAGGAAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTG
[0377] GGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGG
[0378] GATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGG
[0379] TATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGC
[0380] AGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTC
[0381] CTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAG
[0382] GGTTCGGATTTAGTGCTTTACGGCACCTTCGACCCCAAAAAAATTGATTAGGGCTGTGG
[0383] AATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGC
[0384] AAAGCATGCATCTCAATTAGTCAG CAACCAGGTGTGGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCA
[0385] GGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCC GCCCTAAC

[0386] TCCGCCCATCCC GCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGA
[0387] CTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAA
[0388] GTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCC TAGGCTTTTGCAAAAAGCTCTCTGGCTAACTAG
[0389] AGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAG
[0390] CTGGCTAGCGTTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGT
[0391] GGAATTGCCCTTTCCGCAGAGCAATGGCGGTGTCTGCCGGGTCCGCGGGACCTCGC
[0392] CCAGCTCAGATAAAAGTACAGAAAAGACAAGGCTGAACTGATCTCAGGGCCCAGGCAGGA
[0393] CAGCCGAATAGGGAAA ACTCTTGGGTTTTGAGTGGACAGATTTGTCCAGTTGGCGGAGG
[0394] CTGGTGACCCTGCTGAATCGACCAACGGACCCTGCAAGCTTAGCTGTCTTTTCGTTTTCT
[0395] TTTTGGGTTCTTGATGGTGTCTAGACATTCCCCAGGAGCGGGGGCTCAGCTCTCTGGAC
[0396] CGGAAAATACCTTGATGGGCTGGATGTGTGCCGCTTCCCCTTGCTGGATGCCCTACGCC
[0397] CACTGCCACTTGACTGGATGTATCTTGTCTACACCATCATGTTTCTGGGGGCACTGGGC
[0398] ATGATGCTGGGCCTGTGCTACCGGATAAGCTGTGTGTTATTCCTGCTGCCATACTGGTA
[0399] TGTGTTTCTCCTGGACAACATCATGGAACAACCACTCCTATCTGTATGGGTTGTTGG
[0400] CCTTTCAGCTAACATTCATGGATGCAAACTACTGGTCTGTGGACGGTCTGCTGAAT
[0401] GCCCATAGGAGGAATGCCACGTGCCCTTTGGA ACTATGCAGTGTCCGTGGCCAGA
[0402] TCTTCATTGTGTACTTCATTGCCGGTGTGAAAAAGCTGGATGCAGACTGGGTTGAAGGC
[0403] TATTCATGGAATATTTGTCCCGGCACTGGCTCTTCAGTCCCTTCAA ACTGCTGTTGTCT
[0404] GAGGAGCTGACTAGCCTGCTGGTTCGTGCACTGGGGTGGGCTGCTGCTTGACCTCTCAG
[0405] CTGGTTTCTGCTCTTTTTTGTATGTCTCAAGATCCATTGGCCTGTTCTTTGTGTCTACTT
[0406] CCACTGCATGAATTCAGCTTTTCAGCATTGGTATGTTCTCCTACGTCATGCTGGCCA
[0407] GCAGCCCTCTCTTCTGCTCCCTGAGTGGCCTCGGAAGCTGGTGTCTACTGCCCCCG
[0408] AAGGTTGCAACA ACTGTTGCCCTCAAGGCAGCCCTCAGCCCAGTGTTCCTGTGTGT
[0409] ATAAGAGGAGCCGGGGCAAAAAGTGGCCAGAAGCCAGGGCTGCGCCATCAGCTGGGAG
[0410] CTGCCTTACCCTGCTCTACCTCCTGGAGCAGCTATTCTGCCCATTCTCATTTTTCTCA
[0411] CCCAGGGCTATAACA ACTGGACAAATGGGCTGTATGGCTATTCTGGGACATGATGGTG
[0412] CACTCCCGCTCCCACCAGCACGTGAAGATCACCTACCGTGATGGCCGCACTGGCGAAC
[0413] TGGGCTACCTTAACCTGGGGTATTTACACAGAGTCGGCGATGGAAGGATCATGCAGA
[0414] CATGCTGAAGCAATATGCCACTTGCTGAGCCGCTGCTTCCCAAGTATAATGTCACTG
[0415] AGCCCCAGATCTACTTTGATATTTGGGTCTCCATCAATGACCGCTTCCAGCAGAGGATTT
[0416] TTGACCCTCGTGTGGACATCGTGCAGGCCGCTTGGTCAACCTTTCAGCGCACATCCTG
[0417] GGTGCAACCACTCTTGATGGACCTGTCTCCCTGGAGGGCCAAGTTACAGGAAATCAAG
[0418] AGCAGCCTAGACAACCACACTGAGGTGGTCTTCATTGCAGATTTCCCTGGACTGCACTT
[0419] GGAGAATTTTGTGAGTGAAGACCTGGGCAACACTAGCATCCAGCTGCTGCAGGGGGAA
[0420] GTGACTGTGGAGCTTGTGGCAGAACAGAAGAACCAGACTCTTCGAGAGGGAGAAAAAA
[0421] TGCAGTTGCCCTGCTGGTGTGAGTACCATAAGGTGTATAACGACATCACCTAGCCCTTCTTGC
[0422] TACATGTACGTCTATGTCAACACTACAGAGCTTGC ACTGGAGCAAGACCTGGCATATCT
[0423] GCAAGAATTAAGGAAAAAGGTGGAGAATGGAAGTGAAAACAGGGCCTCTACCCCCAGAG
[0424] CTGCAGCCTCTGTTGGAAGGGGAAGTAAAAGGGGGCCCTGAGCCAACACCTCTGGTTC

[0425] AGACCTTTCTTAGACGCCAACAAAGGCTCCAGGAGATTGAACGCCGGCGAAATACTCCT
[0426] TTCCATGAGCGATTCTTCCGCTTCTTGTTGCGAAAAGCTCTATGTCTTTCGCCGCAGCTTC
[0427] CTGATGACTTGTATCTCACTTCGAAATCTGATATTAGGCCGTCTTCCCTGGAGCAGCT
[0428] GGCCCAGGAGGTGACTTATGCAAACCTTGAGACCCCTTTGAGGCAGTTGGAGAACTGAAT
[0429] CCCTCAAACACGGATTCTTCACATTCTAATCCTCCTGAGTCAAATCCTGATCCTGTCCAC
[0430] TCAGAGTTCTGAAGGGGGCCAGATGTTGGAAGGGCAATTCGAGTCTAGAGGGCCCGCC
[0431] CTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTT
[0432] GTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGAT
[0433] TTTGCCGATTTCCGCCATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAA
[0434] TTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGG
[0435] CAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAG
[0436] GCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTC
[0437] CCGCCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGC
[0438] CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCTGCCTCTGAG
[0439] CTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCC
[0440] GGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCA
[0441] TGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATT
[0442] CGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTG
[0443] TCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATG
[0444] AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCG
[0445] CAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGT
[0446] GCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATG
[0447] GCTGATGCAATGCGGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACC
[0448] AAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAICTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCA
[0449] GGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCCAGGCT
[0450] CAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTT
[0451] GCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTG
[0452] GGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGC
[0453] TTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTC
[0454] GCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTT
[0455] CGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCGCC
[0456] GCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCC
[0457] TCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTTTATTGCAGCT
[0458] TATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTTCAC
[0459] TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATAACCGTC
[0460] GACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTA
[0461] TCCGCTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTG
[0462] CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCG
[0463] GGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTT

[0464] TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTTCG
[0465] GCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA
[0466] GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTA
[0467] AAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAA
[0468] AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCG
[0469] TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATA
[0470] CCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGT
[0471] ATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGT
[0472] TCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGAC
[0473] ACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATTGT
[0474] AGGCGGTGCTACAGAGTTCCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACA
[0475] GTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTC
[0476] TTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTA
[0477] CGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
[0478] CAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
[0479] ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAAGTATATATGAGTAAAC
[0480] TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATT
[0481] TCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
[0482] TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGA
[0483] TTTATCAGCAATAAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTCAACT
[0484] TTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGC
[0485] AGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGT
[0486] CGTTTGGTATGGCTTCATTACAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCC
[0487] CCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAA
[0488] GTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCAT
[0489] GCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA
[0490] GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCA
[0491] CATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCATTGGAACCGTCTTCGGGGCGAAAACTCTCA
[0492] AGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATC
[0493] TTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATG
[0494] CCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTC
[0495] AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTAT
[0496] TTAGAAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACG
[0497] TC//
[0498] SEQ ID NO :13
[0499] PP6 序列
[0500] //gacggatcgggagatctcccgatcccctatggtgcactctcagtacaatctgctctgatgccgata
gttaagccagtatctgctc
[0501] cctgcttgtgtgttggaggtcgctgagtagtgcgagcaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttg

accgacaattgcatga

[0502] agaatctgcttaggggttaggcgcttttgcgctgcttcgcatgtacggccagatatacgcgcttgacatt
gattattgactagttattaata

[0503] gtaatcaattacggggtcatttagttcatagcccatatattggagttcccgcttacataacttacggtaaa
tggccccgctggctgaccg

[0504] cccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttc
cattgacgtcaatgggt

[0505] ggagtatcttacggtaaacgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctat
tgacgtcaatgacggtaa

[0506] atggccccgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgt
attagtcategctattacat

[0507] ggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtct
ccacccattgacgtcaat

[0508] gggagtttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaaacactccgccccattgacg
caaatgggcggtaggc

[0509] gtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactagagaaccactgcttactggctta
tcgaaattaatacagactc

[0510] actataggagacccaagctggctagcgtttaaacttaagcttggtagcagctcgatccactagtc
agtgtggtggaattgcc

[0511] cttattcctcagtgaccagagctgacacactatggcgcacgtccgaggcttgacagctgcctggctgc
ctggccctggctgcct

[0512] gtgtagccttgtgcacagccagcatgtgttctggctcctcagcaagcaggtcgtgctccagcgggt
ccggcgagccaacacc

[0513] ttcttggaggaggtgcgcaagggaacctggagcgagagtgcgtggaggagacgtgcagctacgaggag
gccttcgaggctc

[0514] tggagtcctccacggctacggatgtgttctggccaagtacacagcttgtgagacagcaggacgcctc
gagataagcttgcctgc

[0515] atgtctggaaggtaactgtgctgagggtctgggtacgaactaccgaggcatgtgaacatcaccggctc
aggcattgagtgcc

[0516] gctatggaggagtcgctaccacataagcctgaaatcaactccactaccatcctggggccgacctaca
ggagaatttctgccc

[0517] caaccccgacagcagcaccacgggacctgggtgctacactacagacccaccgtgaggagcaggaatg
cagcatecctgt

[0518] ctgtggccaggatcaagtactgttagcgtgactccacgctccgaaggctccagtgatgaatctgtcacc
tccattggagcagtggt

[0519] ccctgatcgggggcagcagtagcagggggcctggcggtgaccacacatgggctcccctgctggcctg
ggccagcgcacag

[0520] gccaaaggccctgagcaagcaccaggacttcaactcagctgtgcagctggtggagaacttctgccgcaac
ccagacggggatg

gtgggagtggcaccttcc

[0541] aggggtcaaggaaggcacgggggaggggcaaacaacagatggctggcaactagaaggcacagtcgaggct
gatcagcggg

[0542] tttaaacgggacctctagactcgaattgcccttccaacatctggecccttcagaactctgagtggaca
ggatcaggatttgactca

[0543] ggaggattagaatgtgaagaatccgtgtttgaggattcagttctccaactgcctcaaagggtctcaag
tttgcataagtcacctct

[0544] gggccagctgctccaggaaggacggcctaataatcagatttcgaagttagatacaagtcacaggaagc
tgcggcgaaagac

[0545] atagagctttcgcaacaagaagcggagaagaatcgtcatggaaaggagtatttcgccggcggttcaatctc
ctggagcctttgttggc

[0546] gtctaagaaagggtctgaaccagagggtgttggctcaggggcccccttttacttcccccttccaacag
aggctgcagctctgggggtaga

[0547] ggccctgtttcacttccattctccaccttttctttaattcttgcagatatgccagggtcttgcctcagt
gcaagctctgtagtgttgacatag

[0548] acgtacatgtagcaagaagggttaggtgatgtcgtatacaccttatgggtactcaccagcaggcaactgc
atTTTTTctccccctctcgaa

[0549] gagtctggttcttctgttctgccacaagctccacagtcacttccccctgcagcagctggatgctagtgt
tgcccagggtcttcaactcaca

[0550] aaattctccaagtgcagtcagggaaatctgcaatg aagaccacctcagtggtgttcttaggctgct
cttgatttctgtacttggc

[0551] cctccaggagacaggtccatcaagagtgggtgcaccaggatgtgcgctgaaagggtgaccaagcggc
ctgcacgatgtcc

[0552] acacgagggtcaaaaatcctctgctggaagcggctcattgatggagacccaaatatcaaagtagatctgg
ggctcagtgacattat

[0553] acttgggaagcaggcggctcaggcaagtggcatattgcttcageatgtctgcatgactcttccatcgcc
gactctgtgtaaataccc

[0554] cagggttaaggtagccagttcgccagtgccgcatcacgtaggtgatcttcacgtgctggtgggagc
gggagtgcaccatcat

[0555] gtcccaggaatagccatacagcccatttgtccagttgttatagccctgggtgagaaaatgagaataggg
caggaatagctgctcc

[0556] aggaggtagagcagggtgaaggcagctcccagctgatggcgcagccctggcttctggccacttttgccc
cggctcctcttataca

[0557] cacaggaacactgggctgaggggctgccttgaggggcaacagttgttgaaccttcgggggcagtagg
acaccagcttccga

[0558] ggccactcaggggagcagaagagagggtgctggccagcatgacgtaggagaacataccaatgctgaaa
agctgggaattc

[0559] atgcagtggaagtaggacacaaagaacaggccaatggatcttgagacatcaaaaaagagcaggaaacca
gctgagaggtc

[0560] aagcagcagcccaccccagtgcacgaccagcaggctagtcagctcctcagacaacagcagtttgaagg
actgaagagcca

[0561] gtgccgggacaaatattccatggaatagccttcaaccagctctgcatccagctttttcacacccgcaat
gaagtacacaatgaaga

[0562] tctggccacgggagcactgcatagttccaaaggggcacgtgggcattcctcctatgggcattcagcagac
cgtccacagaccagt

[0563] agtggtttgcattccatgaatgtagctgaaaggccaacaaccatacagataggagtggttgttccatg
atgtcttgtccaggagaa

[0564] acacataccagtatggcagcaggaataacacacagcttatccggtagcagagcccagcatcatgcca
gtgccccagaaa

[0565] catgatggtgtagacaagatacatccagtcagtggcagtgggcgtaggcatccagcaaggggaagcg
gcacacatccagc

[0566] ccatcaaggtatttccggtccagagagctgagccccgctcctggggaatgtctagcaccatcaagaac
ccaaaaagaaaacg

[0567] aaagacagctaagcttgcagggtccggttggtcgattcagcagggtcaccagcctccgccaactggacaa
atctgtccactcaaa

[0568] acccaagagtttccctattcggctgtcctgctgggcccctgagatcagttcagccttgtctttctgtac
tttatctgagctgggagaggtc

[0569] cgcgcggacccggcagacaccgccattgctctgcggaaggcaattccaccacactggactagtggat
ccgagctcggtacc

[0570] aagcttaagtttaaacgctagccagcttgggtctccctatagtgagtcgtattaatttcgataagccag
taagcagtggttctctagtt

[0571] agccagagagctttttgcaaaaagcctagcctccaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcag
aggccgagggcgct

[0572] cggcctctgcataaataaaaaaaattagtcagccatggggcggagaatgggcggaactgggcggagtta
ggggcgggatgg

[0573] gcggagttagggcgggactatggttgcctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgctgctg
gggagcctggggactttcc

[0574] acaccctaactgacacacattccacagccggatcgatgtgggcatcgccctgatagacggtttttcgc
cctttgacgttggagtc

[0575] acgttctttaatagtggaactcttgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggtctattctttt
g atttataagggattttgcccattt

[0576] cggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattaattctgtggaatgtgtg
tcagttagggtgtggaaagt

[0577] ccccaggctcccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaa
agtccccaggtcc

[0578] ccagcagcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcceggcccctaactccg
cccatcccgcctta

[0579] actccgcccagttccgcccattctccgcccattggtgactaattttttttttttttatgagaggccgag

gcccgcctctgcctctgagcta

[0580] ttccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctaggcttttgcaaaaagctccccgggagcttgtata
tccatttttcggatctgatea

[0581] agagacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttg
ggtggagaggctattc

[0582] ggctatgactgggcacacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcagggg
cgcccggttctttttgtc

[0583] aagaccgacctgtccgggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcgcggctatcgtggctggccacg
acgggcgttccttg

[0584] cgcagctgtgctcgacgttgtcactgaagcgggaaggactggctgctattgggcgaagtgccggggca
ggatctcctgtcatct

[0585] caccttgctcctgccgagaaaagtatccatcatggctgatgcaatgccggcggtgcatacgttgatccg
gctacctgcccattcgac

[0586] caccaagcgaacatcgcacgagcagcactcggatggaagccggtcttgtcgcacagatgat
ctggacgaagagc

[0587] atcaggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcacgcccacggcgaggatctcg
tccgtgacctatggc

[0588] gatgcctgcttgccgaatatcatgggtggaaaatggccgcttttctggattcactgactgtggccggctg
ggtgtggcggaccgctatc

[0589] aggacatagcgttggctaccctgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttcctcg
tgctttacggtatcgccg

[0590] ctcccgatcgcagcgcacgccttctatcgccttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggtt
cgaaatgaccgaccaagc

[0591] gacgcccacctgccatcacgagatttcgattccaccgcccttctatgaaaggttgggcttcggaat
cgttttccgggacgcgc

[0592] gctggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcccaccccaacttgtttattgcag
cttataatggttacaataa

[0593] agcaatagcatcacaatttcacaaataaagcatttttttactgcattctagttgtggtttgtccaaa
ctcatcaatgtatcttateatgctc

[0594] tgtataccgctgcacctctagctagagcttggcgtaatcatggctcatagctgtttcctgtgtgaaattgt
tatecgetcacaattccacac

[0595] aacatacgagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgcactaacacattaatt
gcgttgcgctcactgc

[0596] ccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaaatcgccaacgcgcggggagaggcg
gtttgcgtattgggcg

[0597] ctcttccgcttctcctcactgactcgtcgcctcggtcgttccggctgcggcgagcggtatcagctca
ctcaaaggcggtaatacg

[0598] gttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaa
ccgtaaaaag

- [0599] gccgcgttgctggcggtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagt
cagaggtggcgaaac
- [0600] ccgacaggactataaagataaccaggcggttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacc
ctgccgcttaccggatac
- [0601] ctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcg
gtgtaggtcgttcgctccaagc
- [0602] tgggctgtgtgcacgaacccccggttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagt
ccaaccggtaagacac
- [0603] gacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtctaca
gagttcttgaagtgg
- [0604] ggccaaactacggctacactagaagaacagtatTTGGTatctgcgctctgctgaagccagttaccttcg
gaaaaagagttggtagct
- [0605] cttgatccggcaacaaaccaccgctggtagcggttttttggtttgaagcagcagattacgcgcagaa
aaaaaggatctcaaga
- [0606] agatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggattttgg
catgagattatcaaaaagg
- [0607] atcttcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaataaatctgagtatatatgagtaaactt
ggtctgacagttaccaatgctt
- [0608] aatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatttcgctcatccatagttgctgactccccgctcgt
gtagataactacgatacggg
- [0609] agggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttat
cagcaataaaccagc
- [0610] cagccggaagggccgagcgcagaagtggcctgcaactttatccgctccatccagctctattaattggt
gccgggaagctagagt
- [0611] aagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacggtgttgccattgctacaggcatcgtgggtgcacgctc
gtcgtttggtatggcttcattc
- [0612] agctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggtagctcc
ttcggtcctccgategtt
- [0613] gtcagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtc
atgccatccgtaagatgctttt
- [0614] ctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgctggcgaccgagttgctcttgcc
cggcgtcaatacgggata
- [0615] ataccgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacggtcttccggggcgaaaactct
caaggatcttaccgctg
- [0616] ttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagc
gtttctgggtgagcaaaaaac
- [0617] aggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggggaataagggcgacacggaaatggtgaatactcactcttcc
ttttcaatattattgaa
- [0618] gcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaatatg

gggttccgcgcacatttccc

[0619] cgaaagtgccacctgacgtc//

[0620] SEQ ID NO :14

[0621] F9NopaA 序列

[0622] gacggatcgggagatctcccgatcccctatgggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagt
taagccagtatctgctcc

[0623] ctgcttggtgtgttggaggctcgtgagtagtgcgcgagcaaaatttaagctacaacaaggcaaggcttga
ccgacaattgcatgaa

[0624] gaatctgcttagggtaggcgttttgcgctgcttcgcgatgtacgggccagatatacgcgttgacattg
attattgactagttattaatag

[0625] taatcaattacggggtcattagttcatagcccataatggagttccgcgttacataacttacggtaaat
ggcccgcctggctgaccgc

[0626] ccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttcc
attgacgtcaatgggtg

[0627] gagtatttacggtaaactgccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgcccaagtacgccccatt
gacgtcaatgacggtaaa

[0628] tggcccgcctggcattatgccagttacatgaccttatgggactttctacttggcagttacatctacgta
ttagtcategctattaccatg

[0629] gtgatgcggttttggcagttacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctc
caccattgacgtcaatg

[0630] ggagtttggtttggcaccacaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgc
aaatgggcggttaggcgt

[0631] gtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaaactagagaaccactgcttactggcttacc
gaaattaatacactcac

[0632] tataggagacccaagctggctagccgtttaaacttaagcttggtagcagctcggatccactagttcca
gtgtggtggaattgccctt

[0633] attcctcagtgaccaggagctgacacacttagaagggaattctgcagatccatgcagcgcgtgaa
catgatcatggcaga

[0634] atcaccagcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagtgctgaatgtacagttttcttga
tcatgaaaacgccaacaaaat tctgaatcgccaaagaggtataattcaggtaattggaagagtttgttcaagg
gaaccttgagagagaatgtatggaagaaaa

[0635] gtgtagttttgaagaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttggaagcagta
tgttgatggagatcagt

[0636] gtgagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtc
cctttggatttgaaggaaag

[0637] aactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgct
gataacaaggtggtttgct

[0638] cctgtactgagggatatcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtg
gaagagtttctgtttcac

[0639] aaacttctaagctcaccgctgctgagactgttttctctgatgtggactatgtaaattctactgaagctg
aaaccatthttggataacatca

[0640] ctcaaagcaccatcatttaatagacttcactcgggttgttggaggagaagatgccaaccagggtcaat
tcccttggcaggttgttttg

[0641] aatggtaaagttgatgcattctgtggaggtctatcgtaatagaaaatggattgtaactgctgcccac
tgtgttga aactgggtgtaa

[0642] aattacagttgtcgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgtgat
tgaattattcctcac

[0643] cacaactacaatgcagctattaataagtaacaacctgacattgcccttctggaactgg
acgaacccttagtgctaaacagctacgt

[0644] tacacctatthtgattgctgacaaggaatacacgaacatcttctcaaatttggatctggctatgtaag
tggctggggaagggtcttcc

[0645] acaaaggagatcagcttttagttcttcagtaccttagagttccacttgttgaccgagccacatgtcttc
gatctacaaagttcaccatc

[0646] tataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggagtagagattcatgtcaaggagatagtggggga
cccatgttactgaagtg

[0647] gaagggaccagtttcttaactggaattatagctggggtgaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatgga
atatataccaaggtatc

[0648] ccggtatgtcaactggattaaggaaaaacaaagctcacttaatagaaagatggatttccaaggatccag
cacagtggcggcgg

[0649] ctcgagtctagaggcccgtttaaaccgctgatcagcctcactgtgcttcttagttgccagccatct
gttgtttgccccctccccgt

[0650] gccttcttgaccctggaagggtgccactcccactgtccttcttaataaaatgaggaaattgcatcgca
ttgtctgagtaggtgtcatc

[0651] tattctggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctgggg
atgcggtggg

[0652] ctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctaggggtatccccacgcgcctgtagcgg
cgcattaagcgcggc

[0653] ggggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgtacacttgccagcgccttagcggcctcctttcgcttt
cttcccttctttctcgcac

[0654] gttegcggctttccccgtcaagctctaaatcgggggtccctttagggttccgatttagtgctttacg
gcaccttcgacccccaaaa

[0655] acttgattagggtgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaaagtccccaggctccccagcaggcaga
agtatgcaaagcatgc

[0656] atctcaattagtcagcaaccagggtgtggaagtccccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagca
tgcatctcaattagt

[0657] cagcaacctagtcggcccctaactccgcccataccgcccctaactccgcccagttccgcccattctc
cgccccatggctgacta

[0658] atthttttttatthttatgcagaggccgaggccgctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggc

ttttttggaggcctaggctttt

[0659] gcaaaaagctctctggctaactagagaaccactgcttactggcttatcgaaattaatacactcacta
tagggagaccaagct

[0660] ggctagcgtttaaacttaagcttggtagcagctcgatccactagtcagtggtggaattgcectt
tccgagagcaatggcgg

[0661] tgtctgccgggtccgcgcggacctcgccagctcagataaagtacagaaagacaaggctgaactgatct
cagggcccaggca

[0662] ggacagccgaatagggaaactcttgggttttgagtggacagatttgtccagttggcggaggctggtagc
cctgctgaatcgacca

[0663] acggacctgcaagcttagctgtctttcgttttcttttgggttcttgatgggtgctagacattccccag
gagcgggggctcagctctctgg

[0664] accggaaataccttgatgggctggatgtgtgccgcttcccccttggatgcctacgccactgccac
ttgactggatgtatcttgtc

[0665] tacaccatcatgtttctgggggcaactgggcatgatgctgggctgtgctaccggataagctgtgtgtta
ttctgctgccatactggtat

[0666] gtgtttctctggacaagacatcatggaacaaccactcctatctgtatgggttgttggcctttcagcta
acattcatggatgcaaacca

[0667] ctactggctctgtggacggtctgctgaatgccataggaggatgccacgtgccctttggaactatgc
agtgctccgtggccagat

[0668] cttcattgtgtacttcattgcggtgtgaaaagctggatgcagactgggttgaaggctattccatgga
atatttgcceggcactggc

[0669] tcttcagtccttcaaactgctgttgtctgaggagctgactagcctgctggtcgtgactgggggtgggc
tgctgcttgacctctcagctg

[0670] gtttctgctctttttgatgtctcaagatccattggcctgttctttgtgctacttccactgcatga
attcccagcttttcagcattggtatggt

[0671] ctctacgtcatgctggccagcagccctctctctgctccccctgagtggcctcggaagctggtgtccta
ctgccccgaaggttgcga

[0672] caactgttggccctcaaggcagccctcagccagtggttctctgtgtgtataagaggagccggggcaaa
agtggccagaagcca

[0673] gggctgcgccatcagctgggagctgccttaccctgctctacctctggagcagctattcctgccctat
tctcattttctcaccagg

[0674] ctataacaactggacaaatgggctgtatggctattcctgggacatgatggtgactcccgtcccacca
gcacgtgaagatcact

[0675] accgtgatggccgactggcgaactgggctaccttaaccctggggtatttacagagtcggcgatgga
agg atcatgcagaca

[0676] tgctgaagcaatatgccacttgctgagccgctgcttcccagataatgtcactgagccccagatct
actttgatatttgggtctcc

[0677] atcaatgaccgcttccagcagaggattttgaccctcgtgtggacatcgtgcaggccgcttggtcaccc
tttcagcgcacatcctgg

[0678] gtgcaaccactcttggatggacctgtctccctggaggccaagttacaggaatcaagagcagcctagac
aaccacactgaggt

[0679] ggtcttcattgcagatttccctggactgcacttggagaatgttgtagtgaagacctgggcaacactag
catccagctgctgcaggg

[0680] ggaagtgactgtggagcttgtggcagaacagaagaaccagactcttcgagagggagaaaaatgcagtt
gcctgctggtgagt

[0681] accataaggtgtatacgacatcacctagcccttcttgcctacatgtacgtctatgtcaacactacagagc
ttgcaactggagcaagacc

[0682] tggcatactctgcaagaattaaaggaaaaggtggagaatggaagtgaacagggcctctacccccagagc
tgcagcctctgttg

[0683] gaaggggaagtaaaagggggccctgagccaacacctctggttcagaccttcttagacgccaacaaagg
ctccaggagattga

[0684] acgccggcga aatactccttccatgagcgattcttccgcttcttgttgcaaaagctctatgtctttc
gccgcagcttctgatgacttgt

[0685] atctcacttcgaaatctgatattaggccgtcctccctggagcagctggcccaggaggtgacttatgca
aacttgagaccctttgag

[0686] gcagttggagaactgaatccctcaaacacggattcttcacattetaatcctcctgagtc aaatcctgat
cctgtccactcagagttctg

[0687] aagggggccagatggttgaagggaattcgagcttagagggcccgcctgatagacggtttttcgccct
ttgacgttggagtcac

[0688] gttctttaatagtgactcttgttccaaactggaacaacactcaacctatctcggtctattcttttga
tttataagggattttgccgatttcg

[0689] gcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattaattctgtggaatgtgtgtc
agttagggtgtggaagtc

[0690] ccaggctccccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtggaag
tccccaggctcccc

[0691] agcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcgcccccctaactccgcc
catcccccccctaac

[0692] tccgccagttccgccattctccgcccatggctgactaattttttttatattatgcagaggccgaggc
cgctctgcctctgagctatc

[0693] cagaagtagtgaggaggttttttggaggcctaggttttgcaaaaagctccccggagcttgtatatcc
attttcggatctgatcaag

[0694] agacaggatgaggatcgtttcgcatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttggg
tggagaggctattcgg

[0695] ctatgactgggcacaacagacaatcggtgctctgatgccgccgtgttccggctgtcagcgcaggggcg
cccggttctttttgtcaa

[0696] gaccgacctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacaggcagcgcggctatcgtggctggccacgac
gggcgttccctgag

[0697] cagctgtgctcgacgttgtcactgaagcggg aagggactggctgctattgggcaagtgccggggcag

gatctcctgtcatctca

[0698] ccttgctcctgccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgcatacgttgatccggc
tacctgcccattcgacca

[0699] ccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggctcttgatcgatcaggatgatct
ggacgaagagcattc

[0700] aggggctcgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcattgcccgacggcgaggatctcgtcg
tgacctatggcga

[0701] tgcctgcttgccgaatatcatgggtggaaaatggccgcttttctggattcactgactgtggccggctggg
tgtggcggaccgctatcag

[0702] gacatagcgttggtaccctgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcctgtg
ctttacggtatcgccgctc

[0703] ccgattcgcagcgcattccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttcga
aatgaccgaccaagcgc

[0704] gcccaacctgccatcag agatttcgattccaccgcccttctatgaaaggttgggcttcggaatcg
ttttccgggacgcggctg

[0705] gatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcgccacccaacttgtttattgcagctta
taatggttacaataaagc

[0706] aatagcatcacaatttcacaataaagcattttttcactgcattctagtttggtttgtccaaactc
atcaatgtatcttatcatgtctgt

[0707] ataccgtcgacctctagcttagagcttggcgtaatcatggctcatagctgttctcctgtgtgaaattgttat
ccgctcacaattccacacaac

[0708] atacgagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcctaatg agtgagctaactcattaattgc
gttgcgctcactgccc

[0709] ctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaaatcgccaacgcgcggggagaggcggtt
tgcgtattgggcgctct

[0710] tccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggtcgttcggttgcggcgagcggatcagctcactca
aaggcggtaatacgggta

[0711] tccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgt
aaaaaggcc

[0712] gcgttgctggcggtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcag
aggtggcgaaaccg

[0713] acaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctctgttccgacctg
ccgcttaccggatacctg

[0714] tccgctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtg
taggtcgttcgctccaagctg

[0715] ggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccagcctgctgccttatccggtaactatcgtcttgagtc
aacccggtaagacag

[0716] acttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacag
agttcttgaagtgggtg

[0717] gcctaactacggctacactagaagaacagtatttggatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgg
aaaaagagttggttagctc

[0718] ttgatccggcaaaacaaaccaccgctggtagcggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaa
aaaaggatctcaagaa

[0719] gatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaaggat tttggtc
atgagattatcaaaaaggat

[0720] cttcacctagatccttttaaatataaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttg
gtctgacagttaccaatgctta

[0721] atcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctat ttcgttcatccatagttgectgactccccgctcgtg
tagataactacgatacggga

[0722] gggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttacc
agcaataaaccagcc

[0723] agccggaagggccgagcgcagaaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagtcattaatgttg
ccgggaagctagagta

[0724] agtagttcgccagttaatagtttgcgcaacggtgttgccattgctacaggcatcgtgggtgcacgctcg
tcgtttggatggcttcattca

[0725] gctcgggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgtttgtgcaaaaaagcggttagctcct
tcggctcctccgatcgtttgt

[0726] cagaagtaagttggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcat
gccatccgtaagatgcttttct

[0727] gtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttgcccc
gcgtcaatacgggataat

[0728] accgcgccacatagcagaactttaaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctca
aggatcttaccgctgtt

[0729] gagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgt
ttctgggtgagcaaaaaaca

[0730] ggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaaataagggcgacacggaaatgttgaatactcactcttctct
tttcaatattattgaag

[0731] catttatacagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaatagg
ggttcccgccacatttcccc

[0732] gaaaagtgccacctgacgctc//

[0733] SEQ ID NO :15

[0734] F9hglx

[0735] gacggatcgggagatctcccgatcccctatgggtgactctcagtacaatctgctctgatgccgcatagt
taagccagtatctgctcc

[0736] ctgcttggtgtgttgaggctcgtgagtagtgcgcgagcaaaat ttaagctacaacaaggcaaggcttgac
cgacaattgcatgaa

[0737] gaatctgcttagggtaggcgttttgcgctgcttcgcatgtacgggccagatatacgcgttgacattg
attattgactagttattaatag

[0738] taatcaattacggggctcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataacttacggtaaat
ggcccgcctggctgaccgc

[0739] ccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacccaatagggactttcc
attgacgtcaatgggtg

[0740] gagtatttacggtaaactgccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgcccaagtacccccctatt
gacgtcaatgacggtaaa

[0741] tggcccgcctggcattatgccacgtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgta
ttagtcategctattaccatg

[0742] gtgatgcggttttggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtc
cacccattgacgtcaatg

[0743] ggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgc
aatgggcggttaggcgt

[0744] gtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaac tagagaacccactgcttactggcttacc
gaaattaatacgaactcac

[0745] tatagggagaccaagctggctagcgtttaaacttaagcttggtagcagctcggatccactagtccag
tgtggtggaattgccctt

[0746] attcctcagtgaccaggagctgacacacttagaagggaattctgcagataccatgcagcgcgtgaac
atgatcatggcagaa

[0747] tcaccaggcctcatcaccatctgccttttaggatatctactcagtgctgaatgtacagttttcttgat
catgaaaacgccaacaaaatt

[0748] ctgaatcgcccaagagggtataattcaggtaaaattggaagagtttgttcaagggaaccttgagagagaa
tgtatggaagaaaag

[0749] tgtagttttgaagaagcacgagaagttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttggaagcagtat
gttgatggagatcagtg

[0750] gagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccc
tttgatttgaaggaaaga

[0751] actgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtctg
ataacaaggtggtttgctc

[0752] ctgtactgagggatatcgacttgcagaaaaccaga agtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtg
gaagagtttctgtttcaca

[0753] aacttctaagctcaccgtgctgagactgttttccctgatgtggactatgtaaattctactgaagctga
aaccattttggataacatcact

[0754] caaagcaccaatcatttaatgacttcactcgggttgttggtggagaagatgccaaaccagggtcaattc
ccttggcaggttgttttga

[0755] atggtaaagttgatgcattctgtggaggtctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgctgcccact
gtgttgaaactggtgttaaa

[0756] attacagttgtcgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaatgtgatt
cgaattatctcacc

[0757] acaactacaatgcagctattaataagtaaacatgacattgccttctggaactggacgaacccttag

tgctaaacagctacgtt

[0758] acacctatttgcattgctgacaaggaatacacgaacatcttctcaaatttggatctggctatgtaagt
ggctggggaagggtcttcc

[0759] acaaaggagatcagcttttagttcttcagtaccttagagttccacttgttgaccgagccacatgtcttc
gatctacaaagttcaccate

[0760] tataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtggggga
ccccatgttactgaagtg

[0761] gaagggaccagtttcttaactggaattattagctgggggtgaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatgga
atatataccaaggtatc

[0762] ccggtatgtcaactggattaaggaaaaacaaagctcacttaatgaaagatggatttccaaggatccag
cacagtggcgcccg

[0763] ctcggttcttagagggcccgtttaaacccgctgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatc
tgtttgtttgccccctccccgt

[0764] gccttcttgaccctggaagggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgca
ttgtctgagtaggtgtcattc

[0765] tattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctgg
ggatgcgggtggg

[0766] ctctatggcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctagggggtatccccacgcgcctttagcgg
cgcattaagcgcggc

[0767] ggggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagcgccttagcgcgcccttctcgtttt
cttcccttctttctcgcacc

[0768] gttcgcggctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttagggttccgatttagtgctttacg
gcacctcgacccccaaaaa

[0769] cttgattagggtgatggttcacatcgatgcaatttctcattttattaggaaaggacagtgggagtggc
accttccagggtcaaggaa

[0770] ggcacgggggaggggcaaacacagatggctggcaactagaaggcacagtcgaggctgatcagcgggtt
taaacgggccc

[0771] tctagactcgaattgcccttccaacatctggcccccttcagaactctgagtggacaggatcaggatttg
actcaggaggattagaat

[0772] gtgaagaatccgtgtttgagggttcagttctccaactgcctcaaagggtctcaagtttgcataagtca
cctcctgggccagctgctc

[0773] caggaaggacggcctaataatcagatttcaagtgagatacaagtcacaggaagctgcggcgaagac
atagagctttcgca

[0774] acaagaagcgggaagaatcgctcatggaaaggagtatttcgccggcgttcaatctcctggagcctttgtt
ggcgtctaagaaaggt

[0775] ctgaaccagaggtgttggtcagggcccccttttacttccccctccaacagaggctgcagctctggggg
tagaggccctgtttcactt

[0776] ccattctccaccttttcttttaattcttgcagatatgccaggtcttctcagtgcaagctctgtagtg
ttgacatagacgtacatgtagca

- [0777] agaagggctaggtgatgtcgtatacaccttatggtactcaccagcaggcaactgcattttttctcctc
tcgaagagtctggttcttctg
- [0778] ttctgccacaagctccacagtcacttccccctgcagcagctggatgctagtgttgcccaggcttctact
cacaaaattctccaagtgc
- [0779] agtcagggaatctgcaatgaagaccctcagtggtgtcttagctgctcttgatttctgtaac
ttggccctccaggagac
- [0780] aggtccatcaagagtggttgcacccaggatgtgcgctgaaagggtgaccaagcggcctgcacgatgtcc
acacgagggtcaa
- [0781] aaatcctctgctggaagcggtcattgatggagacccaaatacaaatagatctggggctcagtgcacat
tatacttggaagcag
- [0782] gcggctcaggcaagtggcatattgcttcagcatgtctgcatgatccttccatcggcactctgtgtaa
taccacagggttaaggta
- [0783] gccagttcgccagtgcggccatcacgtaggtgatcttcacgtgctggtgggagcgggagtgcacat
catgtcccaggaata
- [0784] gccatacagcccatttgtccagttgttatagccctgggtgagaaaatgagaatagggcaggaatagctg
ctccaggaggtagag
- [0785] cagggtgaaggcagctcccagctgatggcgcagccctggcttctggccacttttgccccggctcctctt
atacacacaggaaaca
- [0786] tgggctgaggggctgccttgaggggcaacagttgttgcaaccttcgggggcagtaggacaccagcttcc
gaggccactcagg
- [0787] ggagcagaagagagggctgctggccagcatgacgtaggagaaacataccaatgctgaaaagctgggaatt
catgcagtggaa
- [0788] gtaggacacaaagaacaggccaatggatcttgagacatcaaaaaagagcaggaaaccagctgagaggtc
aagcagcagc
- [0789] ccaccccagtgcacgaccagcaggctagtcagctcctcagacaacagcagtttgaagggactgaagagc
cagtgccgggac
- [0790] aaatattccatggaatagccttcaaccagctctgcatccagctttttcacaccgcaatgaagtacaca
atgaagatctggccacg
- [0791] gagcactgcatagttccaaaggggcacgtgggcattcctcctatgggcattcagcagaccgtccacaga
ccagtagtggtttgca
- [0792] tccatgaatgtagctgaaaggccaacaaccatacagataggagtggttgttccatgatgtcttgtcc
aggagaaacacatacca
- [0793] gtatggcagcaggaataacacacagcttatccggtagcacaggcccagcatcatgccagtgccccag
aaacatgatggtgt
- [0794] agacaagatacatccagtcagtggtggcagtgggcgtaggcatccagcaagggaagcggcacacatcca
gcccataaggt
- [0795] atttccggtccagagagctgagccccgctcctggggaatgtctagcaccatcaagaacccaaaaagaa
aacgaaagacagc
- [0796] taagcttgagggtccgttggtcgattcagcagggtcaccagcctccgccaactggacaaatctgtcca

ctcaaaaccaagagt

[0797] ttcctattcggctgtcctgcctgggccctgagatcagttcagccttgtctttctgtactttatctgag
ctgggcgaggtecgcgcgacc

[0798] cggcagacaccgccattgctctgcggaaagggcaattccaccacactggactagtggatccgagctcgg
taccaagcttaagttt

[0799] aaacgctagccagcttgggtctccctatagtgagtcgtattaatttcgataagccagtaagcagtggg
tctctagtttagccagaga

[0800] gctttttgcaaaagcctaggcctccaaaaaagcctcctcactacttctggaatagctcagaggccgagg
cgccctcgccctctgc

[0801] ataaataaaaaaattagtcagccatggggcgagaaatgggcggaactgggcggagttagggcgggat
gggcggagttag

[0802] gggcgggactatggttgctgactaattgagatgcatgctttgcatacttctgectgctggggagcctgg
ggactttccacaccctaac

[0803] tgacacacattccacagccggatcgatgtgggccatcgccctgatagacggttttcgccctttgacgt
tggagtccacgttctttaat

[0804] agtggactcttgttccaaactggaacaacactcaaccctatctcggctctattcttttgattataagg
atcttgccgatttcggcctattg

[0805] gttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaattaattctgtggaatgtgtgtcagttagg
tgtgaaagtccccaggct

[0806] cccagcaggcagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccaggtgtgg
aaagtccccaggctccccagcagg

[0807] cagaagtatgcaaagcatgcatctcaattagtcagcaaccatagtcgcccccactcggccatccc
gccccactcggccc

[0808] agttcggccattctccgccccatggctgactaatttttttatttatgcagaggccgaggccgcctct
gcctctgagctattccagaagt

[0809] agtgaggaggcttttttgaggcctaggcttttgcaaaaagctcccgggagcttgtatatccattttcg
gatctgatcaagagacagg

[0810] atgaggatcgtttcgatgattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggccgcttgggtggagag
gctattcggctatgactg

[0811] ggcacaacagacaatcggctgctctgatgccgccgtgttcggctgtcagcgcaggggcgccggttct
ttttgtcaagaccgac

[0812] ctgtccggtgccctgaatgaactgcaggacgaggcagcggctatcgtggctggccacgacgggcgtt
ccttgcgcagctgtg

[0813] ctcgacgttctcactgaagcgggaaggactggctgctattgggcgaagtgccggggcaggatctcctg
tcattctaccttgcctct

[0814] gccgagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggtgcatacgettgatccggctacctgcca
ttcgaccaccaagcg

[0815] aaacatcgcatcgagcgcagcactcggatggaagccggtcttctgatcaggatgatctggacgaa
gagcatcaggggct

[0816] cgcgccagccgaactgttcgccaggctcaaggcgcgcgatgcccacggcgaggatctcgtcgtgacca
tggcgatgcctgctt

[0817] gccgaatatcatggtggaaaatggccgcttttctggattcatcactgtggccggctgggtgtggcgga
ccgctatcaggacatag

[0818] cgttggctaccctgatattgctgaagagcttggcggcgaatgggctgaccgcttctcgtgctttacg
gtatcgccgctcccgatc

[0819] gcagegcategccttctatcgcttcttgacgagttcttctgagcgggactctggggttcgaaatgacc
gaccaagcgacgccc

[0820] cctgccatcacgagatttcgattccaccgccccttctatgaaaggttgggcttcggaatcgttttcg
ggacgcccggctggatgac

[0821] ctccagecggggatctcatgctg gagttcttcgccacccaacttgtttattgcagcttataatgg
ttacaaataaagcaatagca

[0822] tcacaaatttcacaaataaagcatttttttcaactgcattctagttgtggtttgtccaaactcatcaatg
tatcttatacatgtctgtataaccgtc

[0823] gacctctagctagagcttggcgtaatcatggctcatagctgtttctgtgtgaaattgttatccgctcac
aattccacacaacatacgag

[0824] ccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgct
cactgccccgctttccagt

[0825] cgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattg
ggcgctcttccgcttcc

[0826] tcgctcactgactcgtcgcctcggctcgttcggctcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggt
atacggttatccacaga

[0827] atcaggggataaacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggc
cgcgttgctg

[0828] gcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcga
aacccgacaggact

[0829] ataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgacctgccgttac
cggataacctgtccgctttc

[0830] tcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttc
gctccaagctgggctgtgtgc

[0831] acgaacccccgttcagcccagccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaa
gacacgacttategcca

[0832] ctggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctacagagttcttgaag
tggtggcctaactac

[0833] ggctacactagaagaacagatatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagtt
ggtagctcttgatccggc

[0834] aaacaaaccaccgctggtagcggttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatct
caagaagatcctttgat

[0835] cttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagggttttggctcatgagattatc

aaaaaggatcttcacctag

[0836] atccttttaaatataaaatgaagttttaaatcaatctaaagtataatagagtaaacttggctctgacagt
taccaatgcttaatcagtgag

[0837] gcacctatctcagcgatctgtctatcttgcgtcatccatagttgectgactccccgctgctgtagataact
acgatacgggagggettacc

[0838] atctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccgctccagatttatcagcaataaa
ccagccagccggaa

[0839] gggccgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagctctattaattggtgcccgggaag
ctagagtaagtagttcgc

[0840] cagttaatagtttgcgcaacgttggtgcatctgctacagcctcgtgggtgacgctcgtcgtttggtg
tggttccattcagctccggttc

[0841] ccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatggttgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctcc
gatcgttgtcagaagta

[0842] agttggccgcagtggtatcactcatggatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgt
aagatgcttttctgtgactggt

[0843] gagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttgcccggcgtcaata
cgggataataccgcgc

[0844] cacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgcttcttcggggcgaaaactctcaaggatct
taccgctggtgagatcca

[0845] gttcgatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgggt
gagcaaaaacaggaaggca

[0846] aaatgccgcaaaaaaggggaataagggcgacacggaaatggtgaataactcactcttctttttcaata
ttattgaagcatttatcag

[0847] ggttattgtctcatgagcggatacatatttgaaatgtatttagaaaaataaacaataggggttccgcgc
acatttccccgaaaagtgc

[0848] cacctgacgtc//

序列表

<110>AstraZeneca AB

<120> 蛋白

<130>101165-1P WO

<140>PCT/SE2004/001453

<141>2004-10-12

<150>0324044.7

<151>2003-10-14

<160>15

<170>PatentIn version 3.2

<210>1

<211>7422

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 载体

<400>1

```

gacggatcgg gagatctccc gateccctat ggtegactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
tggagtcccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgceca cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720

```

aaaatcaacg	ggactttcca	aatgtctgta	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	780
gtaggcgtgt	acgggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaaccca	840
ctgcttactg	gcttategaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagt	900
taagcttggg	accgagctcg	gatccactag	tccagtgtgg	tggaattgcc	cttattcctc	960
agtgaccag	gagctgacac	actatggcgc	acgtccgagg	cttgacagctg	cctggctgcc	1020
tggccctggc	tgccctgtgt	agccttgtgc	acagccagca	tgtgttcctg	gctcctcagc	1080
aagcacggtc	gctgctccag	cgggtccggc	gagccaacac	cttcttggag	gaggtgcgca	1140
agggcaacct	ggagcgagag	tgctggagg	agacgtgcag	ctacgaggag	gccttcgagg	1200
ctctggagtc	ctccacggct	acggatgtgt	tctgggcca	gtacacagct	tgtgagacag	1260
cgaggacgcc	tcgagataag	cttgctgcat	gtctggaagg	taactgtgct	gagggctctg	1320
gtacgaacta	ccgagggcat	gtgaacatca	cccggtcagg	cattgagtgc	cagctatgga	1380
ggagtcgcta	cccacataag	cctgaaatca	actccactac	ccatcctggg	gccgacctac	1440
aggagaatth	ctgccgcaac	cccagacagca	gcaccacggg	accctgggtgc	tacactacag	1500
accccaccgt	gaggaggcag	gaatgcagca	tcctgtctg	tggccaggat	caagtactg	1560
tagcgatgac	tccacgctcc	gaaggctcca	gtgtgaaatct	gtcacctcca	ttggagcagt	1620
gtgtccctga	tcgggggcag	cagtaccagg	ggcgcctggc	ggtgaccaca	catgggctcc	1680
cctgcctggc	ctgggccagc	gcacaggcca	aggccctgag	caagcaccag	gacttcaact	1740
cagctgtgca	gctggtggag	aacttctgcc	gcaaccaga	cggggatgag	gagggcgtgt	1800
ggtgctatgt	ggccgggaag	cctggcgact	ttgggtactg	cgacctcaac	tattgtgagg	1860
aggccgtgga	ggaggagaca	ggagatgggc	tggatgagga	ctcagacagg	gccatcgaag	1920
ggcgtaccgc	caccagttag	taccagactt	tcttcaatcc	gaggaccttt	ggctcgggag	1980
aggcagactg	tgggctgcga	cctctgttcg	agaagaagtc	gctggaggac	aaaaccgaaa	2040
gagagctcct	ggaatcctac	atcgacgggc	gcattgtgga	gggctcggat	gcagagatcg	2100
gcatgtcacc	ttggcaggtg	atgcttttcc	ggaagagtcc	ccaggagctg	ctgtgtgggg	2160
ccagcctcat	cagtgaccgc	tgggtectca	ccgccgccca	ctgcctcctg	tacccgccct	2220
gggacaagaa	cttcaccgag	aatgaccttc	tgggtcgcct	tggcaagcac	tcccgcacca	2280
ggtacgagcg	aaacattgaa	aagatatcca	tgttggaaaa	gatctacatc	caccccaggt	2340
acaactggcg	ggagaacctg	gaccgggaca	ttgccctgat	gaagctgaag	aagcctgttg	2400
ccttcagtga	ctacattcac	cctgtgtgtc	tgcccagacag	ggagacggca	gccagcttgc	2460
tccaggctgg	atacaagggg	cgggtgacag	gctggggcaa	cctgaaggag	acgtggacag	2520
ccaacgttgg	taaggggcag	cccagtgtcc	tgcaggtggg	gaacctgccc	attgtggagc	2580
ggccggtctg	caaggactcc	accggatcc	gcatactga	caacatgttc	tgtgctggtt	2640
acaagcctga	tgaagggaaa	cgaggggatg	cctgtgaagg	tgacagtggg	ggaccctttg	2700
tcatgaagag	cccctttaac	aaccgctggg	atcaaatggg	catcgtctca	tggggatgaag	2760
gctgtgaccg	ggatgggaaa	tatggcttct	acacacatgt	gttccgctg	aagaagtgga	2820
tacagaaggt	cattgatcag	tttgagaggt	agaagggcaa	ttctgcagat	atccagcaca	2880
gtggcggccg	ctcagatcta	gagggcccgc	ggttcgaagg	taagcctatc	cctaaccctc	2940
tcctcggtct	cgattctacg	cgtaccggtc	atcaccacca	tcaccattga	gtttaaaccc	3000
gctgatcagc	ctcactgtg	ccttctagtt	gccagccatc	tgttgtttgc	ccctccccgc	3060

tgccttcctt	gaccctggaa	ggtgccactc	ccactgtcct	ttcctaataa	aatgaggaaa	3120
ttgcatcgca	ttgtctgagt	aggtgtcatt	ctattctggg	gggtgggggtg	gggcaggaca	3180
gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	ggcatgctgg	ggatgcggtg	ggctctatgg	3240
cttctgaggc	ggaaagaacc	agctggggct	ctagggggta	tccccacgcg	ccctgtagcg	3300
gcgcattaag	cgcggcgggt	gtggtgggta	cgcgcagcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	3360
ccctagcgcc	cgctcctttc	gctttcttcc	cttcctttct	cgccacgttc	gccggctttc	3420
cccgtcaagc	tctaaatcgg	ggcatccctt	tagggttccg	athtagtgct	ttacggcacc	3480
tgaccecaa	aaaacttgat	tagggatgat	gttcacgtag	tgggccatcg	ccctgataga	3540
cggtttttctg	ccctttgacg	ttggagtcca	cgttctttta	tagtggactc	ttgttccaaa	3600
ctggaacaac	actcaaccct	atctcggctc	attcttttga	tttataaggg	attttgggga	3660
tttcggccta	ttggttaaaa	aatgagctga	tttaacaaaa	atttaacgcg	aattaattct	3720
gtggaatgtg	tgctcagttag	ggtgtggaaa	gtccccaggc	tccccaggca	ggcagaagta	3780
tgcaagcat	gcatctcaat	tagtcagcaa	ccagggtgtg	aaagtcccca	ggctccccag	3840
caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccatagtc	ccgcccctaa	3900
ctccgcccat	cccgcccta	actccgccca	gttccgccca	ttctccgcc	catggctgac	3960
taatTTTTTT	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctctgc	ctctgagcta	ttccagaagt	4020
agtgaggagg	cttttttggg	ggcctaggct	tttgcaaaaa	gctcccggga	gcttgtatat	4080
ccattttcgg	atctgatcaa	gagacaggat	gaggatcggt	tcgcatgatt	gaacaagatg	4140
gattgcacgc	aggttctccg	gccgcttggg	tggagaggct	attcggctat	gactgggcac	4200
aacagacaat	cggtctctct	gatgccgccg	tgttccggct	gtcagcgcag	gggcgcccgg	4260
ttctttttgt	caagaccgac	ctgtccggtg	ccctgaatga	actgcaggac	gaggcagcgc	4320
ggctatcgtg	gctggccacg	acgggcgttc	cttgcgcagc	tgtgctcgac	gttgtcactg	4380
aagcgggaag	ggactggctg	ctattgggcg	aagtgccggg	gcaggatctc	ctgtcatctc	4440
accttgctcc	tgccgagaaa	gtatccatca	tggtgatgc	aatgcggcgg	ctgcatacgc	4500
ttgatecggc	tacctgcccc	ttegaccacc	aagegaaaca	tcgcatcgag	cgagcacgta	4560
ctcggatgga	agccggctct	gtcgatcagg	atgatctgga	cgaagagcat	caggggctcg	4620
cgccagccga	actgttcgcc	aggctcaagg	cgcgcatgcc	cgacggcgag	gatctcgtcg	4680
tgacctatgg	cgatgcctgc	ttgccgaata	tcatggtgga	aaatggccgc	ttttctggat	4740
tcategactg	tggccggctg	ggtgtggcgg	accgctatca	ggacatagcg	ttggctaccc	4800
gtgatattgc	tgaagagctt	ggcggcgaat	gggctgaccg	cttcctcgtg	ctttacggta	4860
tcgccgctcc	cgattecgag	cgcategcct	tctategcct	tcttgacgag	ttcttctgag	4920
cgggactctg	gggttcgcga	aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	4980
ttcgattcca	cgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	5040
ggctggatga	tctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcccc	ccccacttg	5100
tttattgcag	cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaattt	cacaaataaa	5160
gcattttttt	cactgcattc	tagttgtggt	ttgtccaaac	tcataaatgt	atcttatacat	5220
gtctgtatac	cgtegacctc	tagctagagc	ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	5280
gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	5340
aaagcctggg	gtgcctaattg	agtgagctaa	ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	5400

gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	gaatcggcca	acgcgcgggg	5460
agaggcggtt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttcctcgc	tactgactc	gctgcgctcg	5520
gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	cggtaatacg	gttatccaca	5580
gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	5640
cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggetcc	gccccctga	cgagcatcac	5700
aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcacag	gactataaag	ataccaggcg	5760
tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgtttccga	ccctgccgct	taccggatac	5820
ctgtccgcct	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	aatgctcacg	ctgtaggtat	5880
ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	tgcacgaacc	ccccgttcag	5940
cccgaccgct	gcgccttate	cggtaactat	cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	6000
ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	gagcgaggta	tgtagcggtt	6060
gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	ctagaaggac	agtattttggt	6120
atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	6180
aaacaaacca	ccgctggtag	cgggtggtttt	tttgtttgca	agcagcagat	tacgcgcaga	6240
aaaaaaggat	ctcaagaaga	tcctttgatc	ttttctacgg	ggtctgacgc	tcagtggaac	6300
gaaaactcac	gttaagggat	tttggctcatg	agattatcaa	aaaggatctt	cacctagatc	6360
cttttaaat	aaaaatgaag	ttttaaatca	atctaaagta	tatatgagta	aacttggctt	6420
gacagttacc	aatgcttaat	cagtgaggca	cctatctcag	cgatctgtct	atttcgttca	6480
tccatagttg	cctgactccc	cgtcgtgtag	ataactacga	tacgggaggg	cttaccatct	6540
ggccccagtg	ctgcaatgat	accgcgagac	ccacgctcac	cggctccaga	tttatcagca	6600
ataaaccagc	cagccggaag	ggccgagcgc	agaagtggtc	ctgcaacttt	atccgcctcc	6660
atccagtcta	ttaattgttg	ccgggaagct	agagtaagta	gttcgccagt	taatagtttg	6720
cgcaacgttg	ttgccattgc	tacaggcatc	gtgggtgtcac	gctcgtcgtt	tggtatggct	6780
tcattcagct	ccggttccca	acgatcaagg	cgagttacat	gateccccat	gttgtgcaaa	6840
aaagcggtta	gctccttcgg	tcctccgatc	gttgtcagaa	gtaagttggc	cgcagtgtta	6900
tactcatggt	ttatggcagc	actgcataat	tctcttactg	tcatgccatc	cgtaagatgc	6960
ttttctgtga	ctggtgagta	ctcaaccaag	tcattctgag	aatagtgtat	gcggcgaccg	7020
agttgctctt	gcccggcgtc	aatacgggat	aataccgcgc	cacatagcag	aactttaaaa	7080
gtgctcatca	ttggaaaacg	ttcttcgggg	cgaaaactct	caaggatctt	accgctgttg	7140
agatccagtt	cgatgtaacc	cactcgtgca	cccaactgat	cttcagcatc	ttttactttc	7200
accagcgttt	ctgggtgagc	aaaaacagga	aggcaaaatg	ccgcaaaaaa	gggaataagg	7260
gcgacacgga	aatgttgaat	actcatactc	ttcctttttc	aatattattg	aagcatttat	7320
cagggttatt	gtctcatgag	cggatacata	tttgaatgta	tttagaaaaa	taaacaaata	7380
ggggttccgc	gcacatttcc	ccgaaaagtg	ccacctgacg	tc		7422

<210>2

<211>10139

<212>DNA

<213>人工

<220>

<223> 载体

<400>2

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtegct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggacttcc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctagc	900
gtttaaactt aagcttggta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattgccc	960
ttattcctca gtgaccagg agctgacaca ctatggcgca cgtccgagge ttgcagctgc	1020
ctggctgcct ggccctggct gccctgtgta gccttgtgca cagccagcat gtgttcctgg	1080
ctcctcagca agcacggteg ctgctccagc gggtecggcg agccaacacc ttcttggagg	1140
aggtgcgcaa gggcaacctg gagcgagagt gcgtggagga gacgtgcagc tacgaggagg	1200
ccttcgagge tctggagtc tccacggcta cggatgtgtt ctgggccaag tacacagctt	1260
gtgagacagc gaggacgct cgagataagc ttgctgcatg tctggaaggt aactgtgctg	1320
agggctctggg tacgaactac cgagggcatg tgaacatcac ccggtcagge attgagtgcc	1380
agctatggag gagtcgctac ccacataagc ctgaaatcaa ctccactacc catcctgggg	1440
ccgacctaca ggagaatttc tgccgcaacc ccgacagcag caccacggga ccctgggtgct	1500
acactacaga cccaccgtg aggaggcagg aatgcagcat ccctgtctgt ggccaggatc	1560
aagtcactgt agcgatgact ccacgctccg aaggctccag tgtgaatctg tcacctccat	1620
tggagcagtg tgctccctgat cgggggcagc agtaccaggg gcgcctggcg gtgaccacac	1680
atgggctccc ctgcctggcc tgggccagcg cacaggccaa ggccctgagc aagcaccagg	1740
acttcaactc agctgtgcag ctggtggaga acttctgccg caaccagac ggggatgagg	1800
agggcgtgtg gtgctatgtg gccgggaagc ctggcgactt tgggtactgc gacctcaact	1860
attgtgagga ggccgtggag gaggagacag gagatgggct ggatgaggac tcagacaggg	1920
ccatcgaagg gcgtaccgcc accagtgagt accagacttt ctccaatccg aggacctttg	1980
gctcgggaga ggcagactgt gggctgcgac ctctgttcga gaagaagtcg ctggaggaca	2040

aaaccgaaag	agagctcctg	gaatcctaca	tcgacgggcg	cattgtggag	ggctcggatg	2100
cagagatcgg	catgtcacct	tggcaggtga	tgcttttccg	gaagagtccc	caggagctgc	2160
tgtgtggggc	cagcctcacc	agtgaccgct	gggtcctcac	cgccgcccac	tgctcctgtg	2220
acccgccctg	ggacaagaac	ttcaccgaga	atgaccttct	ggtgcgcatt	ggcaagcact	2280
cccgcaccag	gtacgagcga	aacattgaaa	agatatccat	gttggaaaag	atctacatcc	2340
accccaggta	caactggcgg	gagaacctgg	accgggacat	tgccctgatg	aagctgaaga	2400
agcctgttgc	cttcagtgac	tacattcacc	ctgtgtgtct	gcccgcacagg	gagacggcag	2460
ccagcttgct	ccaggctgga	tacaaggggc	gggtgacagg	ctggggcaac	ctgaaggaga	2520
cgtggacagc	caacgttggg	aaggggcagc	ccagtgctct	gcaggtgggtg	aacctgccc	2580
ttgtggagcg	gccggtctgc	aaggactcca	cccgatccg	catcactgac	aacatgttct	2640
gtgctggtta	caagcctgat	gaagggaaac	gaggggatgc	ctgtgaaggt	gacagtgggg	2700
gaccctttgt	catgaagagc	cccttaaca	accgctggta	tcaaattggc	atcgtctcat	2760
ggggtgaagg	ctgtgaccgg	gatgggaaat	atggcttcta	cacacatgtg	ttccgcctga	2820
agaagtggat	acagaaggtc	attgatcagt	ttggagagta	gaagggcaat	tctgcagata	2880
tccagcacag	tgccggccgc	tcgagtctag	agggcccggt	taaaccgct	gatcagcctc	2940
gactgtgcct	tctagttgcc	agccatctgt	tgtttgcccc	tccccgtgc	cttccttgac	3000
cctggaaggt	gccactccca	ctgtcctttc	ctaataaaat	gaggaaattg	catcgcatgt	3060
tctgagtagg	tgtcattcta	ttctgggggg	tggggtgggg	caggacagca	agggggagga	3120
ttgggaagac	aatagcaggc	atgctgggga	tgcggtgggc	tctatggctt	ctgaggcgga	3180
aagaaccagc	tggggctcta	gggggtatcc	ccacgcgccc	tgtagcggcg	cattaagcgc	3240
ggcgggtgtg	gtggttacgc	gcagcgtgac	cgctacactt	gccagcgc	tagcgcgcgc	3300
tcctttcgct	ttcttccctt	ctttctcgc	cacgttcgcc	ggctttcccc	gtcaagctct	3360
aaatcggggg	ctccctttag	ggttccgatt	tagtgcttta	cggcaccttc	gaccccaaaa	3420
aacttgatta	gggctgtgga	atgtgtgtca	gttaggggtg	ggaaagtccc	caggctcccc	3480
agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccaggt	gtggaaagtc	3540
cccaggctcc	ccagcaggca	gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	cagcaaccat	3600
agtcccgc	ctaactccgc	ccatcccgc	cctaactccg	cccagttccg	cccattctcc	3660
gccccatggc	tgactaattt	tttttattta	tgcagaggcc	gaggccgcct	cggcctctga	3720
gctattccag	aagtagtgag	gaggcttttt	tggaggccta	ggcttttgca	aaaagctctc	3780
tggctaacta	gagaaccacc	tgcttactgg	cttategaaa	ttaatacgac	tcaactatagg	3840
gagaccaag	ctggctagcg	tttaaaactta	agcttgggtac	cgagctcgga	tccactagtc	3900
cagtgtgggtg	gaattgcctt	ttccgcagag	caatggcggt	gtctgccggg	tccgcgcgga	3960
cctcgcggc	ctcagataaa	gtacagaaa	acaaggctga	actgatctca	gggcccaggc	4020
aggacagccg	aatagggaaa	ctcttgggtt	ttgagtggac	agatttgtcc	agttggcgga	4080
ggctgggtgac	cctgctgaat	cgaccaacgg	accctgcaag	cttagctgtc	tttcgttttc	4140
tttttgggtt	cttgatgggtg	ctagacattc	cccaggagcg	ggggctcagc	tctctggacc	4200
ggaaatacct	tgatgggctg	gatgtgtgcc	gcttcccctt	gctggatgcc	ctacgcccac	4260
tgccacttga	ctggatgtat	cttgtctaca	ccatcatggt	tctgggggca	ctgggcatga	4320
tgctgggcct	gtgctaccgg	ataagctgtg	tgttattcct	gctgccatac	tggtatgtgt	4380

ttctcttgga	caagacatca	tggaacaacc	actcctatct	gatatgggttg	ttggcctttc	4440
agctaacatt	catggatgca	aaccactact	ggtctgtgga	cggctctgctg	aatgcccata	4500
ggaggaatgc	ccacgtgccc	ctttggaact	atgcagtgct	ccgtggccag	atcttcattg	4560
tgtacttcat	tgcgggtgtg	aaaaagctgg	atgcagactg	ggttgaaggc	tattccatgg	4620
aatatattgtc	ccggcactgg	ctcttcagtc	ccttcaaact	gctgtttgtct	gaggagctga	4680
ctagcctgct	ggtcgtgcac	tgggggtgggc	tgctgcttga	cctctcagct	ggtttcctgc	4740
tcttttttga	tgtctcaaga	tccattggcc	tgttctttgt	gtcctacttc	cactgcatga	4800
attcccagct	tttcagcatt	ggtatgttct	cctacgtcat	gctggccagc	agccctctct	4860
tctgctcccc	tgagtggcct	cggaaagctgg	tgctcactg	ccccgaagg	ttgcaacaac	4920
tgttgcccct	caaggcagcc	cctcagccca	gtgtttcctg	tgtgtataag	aggagccggg	4980
gcaaaagtgg	ccagaagcca	gggctgcgcc	atcagctggg	agctgccttc	accctgctct	5040
acctcctgga	gcagctattc	ctgcctatt	ctcattttct	caccagggc	tataacaact	5100
ggacaaatgg	gctgtatggc	tattcctggg	acatgatggg	gcactcccgc	tcccaccagc	5160
acgtgaagat	cacctaccgt	gatggccgca	ctggcgaact	gggctacctt	aaccctgggg	5220
tatttacaca	gagtcggcga	tggaaggatc	atgcagacat	gctgaagcaa	tatgccactt	5280
gcctgagccg	cctgcttccc	aagtataatg	tactgagcc	ccagatctac	tttgatattt	5340
gggtctccat	caatgaccgc	ttccagcaga	ggatttttga	ccctcgtgtg	gacatcgtgc	5400
aggccgcttg	gtcacccttt	cagcgcacat	cctgggtgca	accactcttg	atggacctgt	5460
ctccctggag	ggccaagtta	caggaaatca	agagcagcct	agacaaccac	actgaggtgg	5520
tcttcattgc	agatttccct	ggactgcact	tggagaattt	tgtgagtga	gacctgggca	5580
acactagcat	ccagctgctg	cagggggaag	tgactgtgga	gcttgtggca	gaacagaaga	5640
accagactct	tcgagaggga	gaaaaaatgc	agttgcctgc	tgggtgagtac	cataaggtgt	5700
atacgacatc	acctagccct	tcttgctaca	tgtacgtcta	tgtcaacact	acagagcttg	5760
cactggagca	agacctggca	tatctgcaag	aattaaagga	aaaggtggag	aatggaagtg	5820
aaacagggcc	tctaccccca	gagctgcagc	ctctgttggga	agggggaagta	aaagggggcc	5880
ctgagccaac	acctctgggt	cagacctttc	ttagacgcca	acaaaggctc	caggagattg	5940
aacgccggcg	aaatactcct	ttccatgagc	gattcttccg	cttcttgttg	cgaaagctct	6000
atgtctttcg	ccgcagcttc	ctgatgactt	gtatctcact	tcgaaatctg	atattagccc	6060
gtccttccct	ggagcagctg	gcccaggagg	tgacttatgc	aaacttgaga	ccctttgagg	6120
cagttggaga	actgaatccc	tcaaacacgg	attcttcaca	ttctaactct	cctgagtcaa	6180
atcctgatec	tgtccactca	gagttctgaa	gggggcccaga	tgttgggaagg	gcaattcgag	6240
tctagagggc	ccgccctgat	agacggtttt	tcgccctttg	acgttggagt	ccacgttctt	6300
taatagtgga	ctcttgttcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	tctattcttt	6360
tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	ctattggtta	aaaaatgagc	tgatttaaca	6420
aaaatttaac	gcgaattaat	tctgtggaat	gtgtgtcagt	taggggtgtg	aaagtcccca	6480
ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	aaccaggtgt	6540
ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	6600
gcaacctag	tcccgccct	aactccgcc	atcccgcctc	taactccgcc	cagttccgcc	6660
cattctccgc	cccatggctg	actaattttt	tttatttatg	cagaggccga	ggccgcctct	6720

gcctctgagc	tattccagaa	gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	cttttgcaaa	6780
aagctcccgg	gagcttgtat	atccattttc	ggatctgate	aagagacagg	atgaggatcg	6840
tttcgcatga	ttgaacaaga	tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	ggtggagagg	6900
ctattcggct	atgactgggc	acaacagaca	atcggctgct	ctgatgccgc	cgtgttccgg	6960
ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttcttttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	tgccctgaat	7020
gaactgcagg	acgaggcagc	gcggtatcgc	tggctggcca	cgacgggctg	tccttgcgca	7080
gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	agggactggc	tgctattggg	cgaagtgccg	7140
gggcaggatc	tcctgtcacc	tcaccttgct	cctgccgaga	aagtatccat	catggctgat	7200
gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	gtacctgcc	cattcgacca	ccaagcghaa	7260
catcgcacgc	agcgagcacg	tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	ggatgatctg	7320
gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	gaactgttcg	ccaggctcaa	ggcgcgcatg	7380
cccagcggcg	aggatctcgt	cgtgacctat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	tatcatgggtg	7440
gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	ggaccgctat	7500
caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	atgggctgac	7560
cgttctctcg	tgctttacgg	tategccgct	cccgatctgc	agcgcacgc	cttctatcgc	7620
cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	tggggttcga	aatgaccgac	caagcgacgc	7680
ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	ccgccgcctt	ctatgaaagg	ttgggcttcg	7740
gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	tcctccagcg	cggggatctc	atgctggagt	7800
tcttcgccc	ccccacttg	tttattgcag	cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	7860
tcacaaatth	cacaaataaa	gcattttttt	cactgcattc	tagttgtggg	ttgtccaaac	7920
tcataaatgt	atcttatcat	gtctgtatac	cgctgacctc	tagctagagc	ttggcgtaat	7980
catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	cacaacatac	8040
gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaatt	agtgagctaa	ctcacattaa	8100
ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	ctgcattaat	8160
gaatcggcca	acgcgcgggg	agaggcgggt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	gcttccctgc	8220
tcactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	cactcaaagg	8280
cggtaatacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	tgagcaaaag	8340
gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	cataggctcc	8400
gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	aaccgcagac	8460
gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	cctgttccga	8520
ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgctt	ttctcccttc	gggaagcgtg	gcgctttctc	8580
atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	ctgggctgtg	8640
tgcacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttate	cggtaactat	cgtcttgagt	8700
ccaaccgggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cactggtaac	aggattagca	8760
gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	tacggctaca	8820
ctagaagaac	agtatttggg	atctgcgctc	tgtcgaagcc	agttaccttc	ggaaaaagag	8880
ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cggttttttt	gtttgcaagc	8940
agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	tctacggggg	9000
ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	ggatcatgaga	ttatcaaaaa	9060

ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	taaatcaate	taaagtatat	9120
atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	atctcagcga	9180
tctgtctatt	tcgttcatcc	atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	9240
gggagggcct	accatctggc	cccagtgctg	caatgatacc	gcgagacca	cgctcaccgg	9300
ctccagatth	atcagcaata	aaccagccag	ccggaaggge	cgagcgcaga	agtggtcctg	9360
caactttatc	cgctccatc	cagtctatta	attggtgccg	ggaagctaga	gtaagtagtt	9420
cgccagttaa	tagtttgcgc	aacgttggtg	ccattgctac	aggcatcgtg	gtgtcacgct	9480
cgtegtttgg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	gttaccatgat	9540
cccccatgth	gtgcaaaaaa	gcggttagct	ccttcgggtc	tccgatcgtt	gtcagaagta	9600
agttggccgc	agtgttatca	ctcatgggta	tggcagcact	gcataattct	cttactgtca	9660
tgccatccgt	aagatgctth	tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	ttctgagaat	9720
agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cggegtcaat	acgggataat	accgcgccac	9780
atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	aaactctcaa	9840
ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgtaaccac	tcgtgcacc	aactgatctt	9900
cagcatctth	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaaatgccg	9960
caaaaaaggg	aataagggcg	acacggaaat	gttgaatact	catactcttc	ctttttcaat	10020
attattgaag	catttatcag	ggttattgtc	tcatgagcgg	atacatattt	gaatgtattt	10080
agaaaaataa	acaaataggg	gttccgcgca	catttccccg	aaaagtgcc	cctgacgtc	10139

<210>3

<211>26

<212>DNA

<213> 智人

<400>3

attcctcagt gaccaggag ctgaca 26

<210>4

<211>42

<212>DNA

<213> 智人

<400>4

ctactctcca aactgatcaa tgacctctg tatecacttc tt 42

<210>5

<211>23

<212>DNA

<213> 智人

<400>5 tccgcagagc aatggcggtg tct	23
<210>6 <211>24 <212>DNA <213> 智人	
<400>6 ccaacatctg gcccccttcag aact	24
<210>7 <211>24 <212>DNA <213> 智人	
<400>7 acacctctgg ttcagacctt tctt	24
<210>8 <211>24 <212>DNA <213> 智人	
<400>8 aatcgctcat ggaaaggagt attt	24
<210>9 <211>27 <212>DNA <213> 智人	
<400>9 caacaaaggc tccaggagat tgaacgc	27
<210>10 <211>22 <212>DNA <213> 智人	

<400>10		
tggaggacaa aaccgaaaga ga		22
<210>11		
<211>18		
<212>DNA		
<213> 智人		
<400>11		
catccgagcc ctccacaa		18
<210>12		
<211>25		
<212>DNA		
<213> 智人		
<400>12		
ctcctggaat cctacatcga cgggc		25
<210>13		
<211>10238		
<212>DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> 载体		
<400>13		
gacggatcgg gagatctccc gatecccctat ggtgcactct cagtacaate tgctctgatg		60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctcccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg		120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc		180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt		240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata		300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc		360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc		420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgceca cttggcagta catcaagtgt		480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt		540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca		600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacaatcaa tgggcgtgga tagcggtttg		660

actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720
aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccatgacg	caaatgggcg	780
gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaaccca	840
ctgcttactg	gcttatcgaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagc	900
gtttaaactt	aagcttggta	ccgagctcgg	atccactagt	ccagtgtggt	ggaattgccc	960
ttattcctca	gtgaccacag	agctgacaca	ctatggcgca	cgtccgaggc	ttgcagctgc	1020
ctggctgcct	ggccctggct	gccctgtgta	gccttgtgca	cagccagcat	gtgttcctgg	1080
ctcctcagca	agcacggtcg	ctgctccagc	gggtccggcg	agccaacacc	ttcttggagg	1140
aggtgcgcaa	gggcaacctg	gagcgagagt	gcgtggagga	gacgtgcagc	tacgaggagg	1200
ccttcgaggc	tctggagtcc	tccacggcta	cggatgtggt	ctgggccaag	tacacagctt	1260
gtgagacagc	gaggacgcct	cgagataagc	ttgctgcatg	tctggaaggt	aactgtgctg	1320
agggtctggg	tacgaactac	cgagggcatg	tgaacatcac	ccggtcaggc	attgagtgcc	1380
agctatggag	gagtcgctac	ccacataagc	ctgaaatcaa	ctccactacc	catcctgggg	1440
ccgacctaca	ggagaatttc	tgccgcaacc	ccgacagcag	caccacggga	ccctgggtgct	1500
acactacaga	ccccaccgtg	aggaggcagg	aatgcagcat	ccctgtctgt	ggccaggatc	1560
aagtcactgt	agcgatgact	ccacgctccg	aaggctccag	tgtgaaatctg	tcacctccat	1620
tggagcagtg	tgtccctgat	cgggggcagc	agtaccaggg	gcgcctggcg	gtgaccacac	1680
atgggctccc	ctgcctggcc	tgggccagcg	cacaggccaa	ggccctgagc	aagcaccagg	1740
acttcaactc	agctgtgcag	ctggtggaga	acttctgccg	caaccacagc	ggggatgagg	1800
agggcgtgtg	gtgctatgtg	gccgggaagc	ctggcgactt	tgggtactgc	gacctcaact	1860
attgtgagga	ggccgtggag	gaggagacag	gagatgggct	ggatgaggac	tcagacaggg	1920
ccatcgaagg	gcgtaccgcc	accagtgagt	accagacttt	cttcaatccg	aggacctttg	1980
gctcgggaga	ggcagactgt	gggctgcgac	ctctgttcga	gaagaagtgc	ctggaggaca	2040
aaaccgaaag	agagctcctg	gaatectaca	tcgacgggcg	cattgtggag	ggctcggatg	2100
cagagatcgg	catgtcacct	tggcaggtga	tgcttttccg	gaagagtccc	caggagctgc	2160
tgtgtggggc	cagcctcacc	agtgaccgct	gggtcctcac	cgccgccac	tgccctctgt	2220
acccgccctg	ggacaagaac	ttcaccgaga	atgaccttct	ggtgcgcatt	ggcaagcact	2280
cccgcaccag	gtacgagcga	aacattgaaa	agatatccat	gttggaaaag	atctacatcc	2340
accccaggta	caactggcgg	gagaacctgg	accgggacat	tgccctgatg	aagctgaaga	2400
agcctgttgc	cttcagtgc	tacattcacc	ctgtgtgtct	gcccgcacag	gagacggcag	2460
ccagcttgct	ccaggctgga	tacaaggggc	gggtgacagg	ctggggcaac	ctgaaggaga	2520
cgtggacagc	caacgttggg	aaggggcagc	ccagtgtcct	gcaggtgggtg	aacctgceca	2580
ttgtggagcg	gccggtctgc	aaggactcca	cccggatccg	catcactgac	aacatgttct	2640
gtgctggtta	caagcctgat	gaagggaaac	gaggggatgc	ctgtgaaggt	gacagtgggg	2700
gaccctttgt	catgaagagc	ccctttaaca	accgctggta	tcaaatgggc	atcgtctcat	2760
ggggtgaagg	ctgtgaccgg	gatgggaaat	atggcttcta	cacacatgtg	ttccgcctga	2820
agaagtggat	acagaaggtc	attgatcagt	ttggagagta	gaagggcaat	tctgcagata	2880
tccagcacag	tggeggccgc	tcggttctca	gagggcccgt	ttaaaccgcg	tgatcagcct	2940
cgactgtgcc	ttctagttgc	cagccatctg	ttgtttgccc	ctccccctg	ccttccttga	3000

ccctggaagg	tgccactccc	actgtccttt	cctaataaaa	tgaggaaatt	gcategcatt	3060
gtctgagtag	gtgtcattct	attctggggg	gtgggggtggg	gcaggacagc	aagggggagg	3120
attgggaaga	caatagcagg	catgctgggg	atgcbgggtggg	ctctatggct	tctgaggcgg	3180
aaagaaccag	ctggggctct	aggggggtatc	cccacgcgcc	ctgtagcggc	gcattaagcg	3240
cggcgggtgt	ggtggttacg	cgcagcgtga	ccgtacact	tgccagcgcc	ctagcggccc	3300
ctcctttcgc	tttcttcct	tcctttctcg	ccacgttcgc	cggctttccc	cgtcaagctc	3360
taaategggg	gctcccttta	gggttccgat	ttagtgcttt	acggcacctc	gaccccaaaa	3420
aacttgatta	gggtgatggt	tcacatcgat	gcaatttcct	cattttatta	ggaaaggaca	3480
gtgggagtgg	caccttcag	ggtcaaggaa	ggcacggggg	aggggcaaac	aacagatggc	3540
tggcaactag	aaggcacagt	cgaggctgat	cagcgggttt	aaacgggccc	tctagactcg	3600
aattgccctt	ccaacatctg	gcccccttca	gaactctgag	tggacaggat	caggatttga	3660
ctcaggagga	ttagaatgtg	aagaatccgt	gtttgaggga	ttcagttctc	caactgcctc	3720
aaagggtctc	aagtttgc	aagtcacctc	ctggggccagc	tgctccaggg	aaggacggcc	3780
taatatacaga	tttcgaagtg	agatacaagt	catcaggaag	ctgcggcgaa	agacatagag	3840
ctttcgcaac	aagaagcggg	agaatcgctc	atggaaagga	gtatttcgcc	ggcgttcaat	3900
ctcctggagc	ctttgttggc	gtctaagaaa	ggtctgaacc	agaggtgttg	gctcagggcc	3960
cccttttact	tccccttcca	acagaggctg	cagctctggg	ggtagaggcc	ctgtttcact	4020
tccattctcc	accttttct	ttaattcttg	cagatatgcc	aggtcttgct	ccagtgcaag	4080
ctctgtagtg	ttgacataga	cgtacatgta	gcaagaaggg	ctaggtgatg	tcgtatacac	4140
cttatggtac	tcaccagcag	gcaactgcat	ttttctccc	tctcgaagag	tctggttctt	4200
ctgttctgcc	acaagctcca	cagtcacttc	cccctgcagc	agctggatgc	tagtgttgcc	4260
caggtcttca	ctcacaaaat	tctccaagtg	cagtccaggg	aaatctgcaa	tgaagaccac	4320
ctcagtgtgg	ttgtctagge	tgctcttgat	ttcctgtaac	ttggccctcc	agggagacag	4380
gtccatcaag	agtggttgca	cccaggatgt	gcgctgaaag	ggtgaccaag	cggcctgcac	4440
gatgtccaca	cgagggtcaa	aaatcctctg	ctggaagcgg	tcattgatgg	agacccaaaat	4500
atcaaagtag	atctggggct	cagtgcacatt	atacttggga	agcaggcggc	tcaggcaagt	4560
ggcatattgc	ttcagcatgt	ctgcatgate	cttccatcgc	cgactctgtg	taaatacccc	4620
agggttaagg	tagcccagtt	cgccagtgcg	gccatcacgg	taggtgatct	tcacgtgctg	4680
gtgggagcgg	gagtgcacca	tcatgtccca	ggaatagcca	tacagcccat	ttgtccagtt	4740
gttatagccc	tgggtgagaa	aatgagaata	gggcaggaat	agctgctcca	ggaggtagag	4800
cagggtgaag	gcagctccca	gctgatggcg	cagccctggc	ttctggccac	ttttgccccg	4860
gctctcttta	tacacacagg	aaacactggg	ctgaggggct	gccttgaggg	gcaacagttg	4920
ttgcaacctt	cgggggcagt	aggacaccag	cttccgagge	cactcagggg	agcagaagag	4980
agggtctgtg	gccagcatga	cgtaggagaa	cataccaatg	ctgaaaagct	gggaattcat	5040
gcagtggaag	taggacacaa	agaacaggcc	aatggatctt	gagacatcaa	aaaagagcag	5100
gaaaccagct	gagaggtcaa	gcagcagccc	accccagtgc	acgaccagca	ggctagtcag	5160
ctcctcagac	aacagcagtt	tgaagggact	gaagagccag	tgccgggaca	aatattccat	5220
ggaatagcct	tcaaccagct	ctgcatccag	ctttttcaca	cccgcaatga	agtacacaat	5280
gaagatctgg	ccacggagca	ctgcatagtt	ccaagggggc	acgtgggcat	tcctcctatg	5340

ggcattcagc	agaccgtcca	cagaccagta	gtggtttgca	tccatgaatg	ttagctgaaa	5400
ggccaacaac	ccatacagat	aggagtggtt	gttccatgat	gtcttgtcca	ggagaaacac	5460
ataccagtat	ggcagcagga	ataacacaca	gcttatccgg	tagcacaggc	ccagcatcat	5520
gcccagtgcc	cccagaaaca	tgatggtgta	gacaagatac	atccagtcaa	gtggcagtgg	5580
gcgtagggca	tccagcaagg	ggaageggca	cacatccage	ccatcaaggt	atctccggtc	5640
cagagagctg	agcccccgct	cctggggaat	gtctagcacc	atcaagaacc	caaaaagaaa	5700
acgaaagaca	gctaagcttg	cagggtccgt	tggtcgatc	agcagggtea	ccagcctccg	5760
ccaactggac	aaatctgtcc	actcaaaacc	caagagtctc	cctatccggc	tgtcctgcct	5820
gggcccctgag	atcagttcag	ccttgtcttt	ctgtacttta	tctgagctgg	gcgaggtccg	5880
cgcggaaccg	gcagacaccg	ccattgctct	gcggaaaggg	caattccacc	acactggact	5940
agtggatccg	agctcggtac	caagcttaag	tttaaaccgt	agccagcttg	ggtctcccta	6000
tagtgagtcg	tattaatttc	gataagccag	taagcagtgg	gttctctagt	tagccagaga	6060
gctttttgca	aaagcctagg	cctccaaaaa	agcctcctca	ctacttctgg	aatagctcag	6120
aggccgaggc	ggcctcggcc	tctgcataaa	taaaaaaaat	tagtcagcca	tggggcggag	6180
aatgggcgga	actgggcgga	gttaggggcg	ggatgggagg	agttaggggc	gggactatgg	6240
ttgctgacta	attgagatgc	atgctttgca	tacttctgcc	tgctggggag	cctggggact	6300
ttccacacce	taactgacac	acattccaca	gccggatcga	tgtgggcat	cgccctgata	6360
gacggttttt	cgccctttga	cgttggagtc	cacgttcttt	aatagtggac	tcttgttcca	6420
aactggaaca	acactcaacc	ctatctcggt	ctattctttt	gatttataag	ggattttgcc	6480
gatttcggcc	tattggttaa	aaaatgagct	gatttaacaa	aaatttaacg	cgaattaatt	6540
ctgtggaatg	tgtgtcagtt	agggtgtgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	6600
atgcaaagca	tgcattctca	ttagtcagca	accaggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccca	6660
gcaggcagaa	gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccgcccta	6720
actccgcccc	tcccgcacct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	6780
ctaatttttt	ttatttatgc	agaggccgag	gcccctctg	cctctgagct	attccagaag	6840
tagtgaggag	gcttttttgg	aggcctaggc	ttttgcaaaa	agctcccggg	agcttgtata	6900
tccatttttcg	gatctgatca	agagacagga	tgaggatcgt	tctcagatgat	tgaacaagat	6960
ggattgcacg	caggttctcc	ggccgcttgg	gtggagaggc	tattcggcta	tgactgggca	7020
caacagacaa	tcggctgctc	tgatgccgcc	gtgttccggc	tgtcagcgca	ggggcgcccc	7080
gttctttttg	tcaagaccga	cctgtccggt	gccctgaatg	aactgcagga	cgaggcagcg	7140
cggtatcgt	ggctggccac	gacgggcggt	ccttgcgcag	ctgtgctcga	cgttgtcact	7200
gaagcgggaa	gggactggct	gctattgggc	gaagtgccgg	ggcaggatct	cctgtcatct	7260
caccttgctc	ctgccgagaa	agtatccatc	atggctgatg	caatgcggcg	gctgcatacg	7320
cttgatccgg	ctacctgccc	atcgaccac	caagcgaaac	atcgatcga	gcgagcacgt	7380
actcggatgg	aagccggtct	tgtcagatcag	gatgatctgg	acgaagagca	tcaggggctc	7440
gcgccagccg	aactgttcgc	caggctcaag	gcgcgcatgc	ccgacggcga	ggatctcgtc	7500
gtgacctatg	gcgatgcctg	cttgccgaat	atcatggtgg	aaaatggccg	cttttctgga	7560
ttcatcgact	gtggccggct	gggtgtggcg	gaccgctatc	aggacatagc	gttggctacc	7620
cgtgatattg	ctgaagagct	tggcggcgaa	tgggctgacc	gcttctcgt	gctttacggt	7680

atcgccgctc	ccgattcgca	gcgcatcgcc	ttctatcgcc	ttcttgacga	gttcttctga	7740
gcgggactct	ggggttcgaa	atgaccgacc	aagegacgcc	caacctgcca	tcacgagatt	7800
tcgattccac	cgccgccttc	tatgaaaggt	tgggcttcgg	aatcgtttc	cgggacgccg	7860
gctggatgat	cctccagcgc	ggggatctca	tgctggagtt	cttcgcccac	cccaacttgt	7920
ttattgcagc	ttataatggt	tacaaataaa	gcaatageat	cacaaatttc	acaataaaag	7980
catttttttc	actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	catcaatgta	tcttatcatg	8040
tctgtatacc	gtcgacctct	agctagagct	tggegtaatc	atggtcatag	ctgtttcctg	8100
tgtgaaattg	ttatccgctc	acaattccac	acaacatacg	agccggaagc	ataaagtgta	8160
aagcctgggg	tgcctaatga	gtgagctaac	tcacattaat	tgcgttgccg	tactgccccg	8220
ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgccagc	tgcattaatg	aatcggccaa	cgcgcgggga	8280
gaggcggttt	gcgtattggg	cgctcttccg	cttctcgcct	cactgactcg	ctgcgctcgg	8340
tcgttcggct	gcggcgagcg	gtatcagctc	actcaaaggc	ggtaatacgg	ttatccacag	8400
aatcagggga	taacgcagga	aagaacatgt	gagcaaaagg	ccagcaaaag	gccaggaacc	8460
gtaaaaaggc	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	ccccctgac	gagcatcaca	8520
aaaatcgacg	ctcaagtcag	aggtggcgaa	accgcacagg	actataaaga	taccaggcgt	8580
ttccccctgg	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	cctgccgctt	accggatacc	8640
tgtecgctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	tagctcacgc	tgtaggtatc	8700
tcagttcggt	gtaggtcggt	cgctccaagc	tgggctgtgt	gcacgaacct	cccgttcagc	8760
ccgaccgctg	cgcttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	caaccggta	agacacgact	8820
tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	agcgaggtat	gtaggcgggtg	8880
ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	tagaagaaca	gtatttggta	8940
tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	tggtagctct	tgatccggca	9000
aacaaaccac	cgctggtagc	ggtttttttg	tttgcaagca	gcagattacg	cgcagaaaaa	9060
aaggatctca	agaagatcct	ttgatctttt	ctacggggtc	tgacgctcag	tggaacgaaa	9120
actcacgtta	agggattttg	gtcatgagat	tatcaaaaag	gatcttcacc	tagatccttt	9180
taaattaaaa	atgaagtttt	aaatcaatct	aaagtatata	tgagtaaact	tggcttgaca	9240
gttaccaatg	cttaatcagt	gaggcaccta	tctcagcgat	ctgtctattt	cgttcatcca	9300
tagttgcctg	actccccgtc	gtgtagataa	ctacgatacg	ggagggctta	ccatctggcc	9360
ccagtgctgc	aatgataccg	cgagaccac	gctcaccggc	tccagattta	tcagcaataa	9420
accagccagc	cggaagggcc	gagcgcagaa	gtggctctgc	aactttatcc	gcctccatcc	9480
agtctattaa	ttgttgccgg	gaagctagag	taagtagttc	gccagttaat	agtttgcgca	9540
acgttgttgc	cattgctaca	ggcatcgtgg	tgtcacgctc	gtcgtttgg	atggcttcat	9600
tcagctccgg	ttcccaacga	tcaaggcgag	ttacatgate	ccccatgttg	tgcaaaaaag	9660
cggttagctc	cttcggctct	ccgatcgttg	tcagaagtaa	gttgcccgca	gtgttatcac	9720
tcatggttat	ggcagcactg	cataattctc	ttactgtcat	gccatccgta	agatgctttt	9780
ctgtgactgg	tgagtactca	accaagtcac	tctgagaata	gtgtatgcgg	cgaccgagtt	9840
gctcttgccc	ggcgtcaata	cgggataata	ccgcgccaca	tagcagaact	ttaaaagtgc	9900
tcatcattgg	aaaacgttct	tcggggcgaa	aactctcaag	gatcttaccg	ctgttgagat	9960
ccagttcgat	gtaaccctct	cgtgcacca	actgatcttc	agcatctttt	actttcacca	10020

gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga 10080
cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg 10140
gttattgtct catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg 10200
ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtc 10238

<210>14

<211>9683

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 载体

<400>14

gacggatcgg gagatctccc gateccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg tccccatagt aacgccaata gggactttcc 420
attgacgtca atgggtggag tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt 480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
atgcccagta catgacctta tgggacttcc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctagc 900
gtttaaactt aagcttggta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattgccc 960
ttattcctca gtgaccagg agctgacaca cttagaaggg caattctgca gatcaccatg 1020
cagcgcgtga acatgatcat ggcagaatca ccaggcctca tcaccatctg ctttttagga 1080
tatctactca gtgctgaatg tacagttttt cttgatcatg aaaacgcccc caaaattctg 1140
aatcggccaa agaggataaa ttcaggtaaa ttggaagagt ttgttcaagg gaaccttgag 1200
agagaatgta tggaagaaaa gtgtagtttt gaagaagcac gagaagtttt tgaaaacact 1260
gaaagaacaa ctgaattttg gaagcagtat gttgatggag atcagtgtga gtccaatcca 1320
tgtttaaatg gcggcagttg caaggatgac attaattcct atgaatggtg gtgtcccttt 1380
ggatttgaag gaaagaactg tgaattagat gtaacatgta acattaagaa tggcagatgc 1440
gagcagtttt gtaaaaatag tgctgataac aagggtggtt gctcctgtac tgagggatat 1500

cgacttgcag	aaaaccagaa	gtcctgtgaa	ccagcagtg	catttccatg	tggaagagtt	1560
tctgtttcac	aaacttctaa	gctcaccctg	gctgagactg	tttttcctga	tgtggactat	1620
gtaaattcta	ctgaagctga	aaccattttg	gataacatca	ctcaaagcac	ccaatcattt	1680
aatgacttca	ctcgggttgt	tgggtggagaa	gatgccaaac	caggtcaatt	cccttggcag	1740
gttgttttga	atggtaaagt	tgatgcattc	tgtggagget	ctatcgttaa	tgaaaaatgg	1800
attgtaactg	ctgcccactg	tgttgaaact	ggtgttaaaa	ttacagttgt	cgcaggtgaa	1860
cataatattg	aggagacaga	acatacagag	caaaagcgaa	atgtgattcg	aattattcct	1920
caccacaact	acaatgcagc	tattaataag	tacaaccatg	acattgccct	tctggaactg	1980
gacgaaccct	tagtgctaaa	cagctacgtt	acacctat	gcattgctga	caaggaatac	2040
acgaacatct	tctcaaatt	tggatctggc	tatgtaagt	gctggggaag	ggtcttcac	2100
aaagggagat	cagctttagt	tcttcagtac	cttagagttc	cacttgttga	ccgagccaca	2160
tgtcttcgat	ctacaaagtt	caccatctat	aacaacatgt	tctgtgctgg	cttccatgaa	2220
ggaggtagag	attcatgtca	aggagatagt	gggggacccc	atgttactga	agtggaaggg	2280
accagtttct	taactggaat	tattagctgg	ggtgaagagt	gtgcaatgaa	aggcaaatat	2340
ggaatatata	ccaaggtatc	ccggtatgtc	aactggatta	aggaaaaaac	aaagctcact	2400
taatgaaaga	tggatttcca	aggatccagc	acagtggcgg	ccgctcgagt	ctagagggcc	2460
cgtttaaacc	cgctgatcag	cctcgactgt	gccttctagt	tgccagccat	ctgttgtttg	2520
cccctcccc	gtgccttct	tgaccctgga	aggtgccact	cccactgtcc	tttctaata	2580
aaatgaggaa	attgcatcgc	attgtctgag	taggtgtcat	tctattctgg	gggggtgggt	2640
ggggcaggac	agcaaggggg	aggattggga	agacaatagc	aggcatgctg	gggatgcggt	2700
gggctctatg	gcttctgagg	cggaaagaac	cagctggggc	tctagggggt	atccccacgc	2760
gccctgtagc	ggcgcattaa	gcgcgcggg	tgtgggtggt	acgcgcagcg	tgaccgctac	2820
acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	cgctttcttc	ccttcctttc	tcgccaggtt	2880
cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	2940
tttacggcac	cttcgacccc	aaaaaacttg	attagggctg	tggaatgtgt	gtcagttagg	3000
gtgtggaaag	tccccaggct	ccccagcagg	cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	3060
gtcagcaacc	aggtgtggaa	agtccccagg	ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	3120
gcatctcaat	tagtcagcaa	ccatagtcct	gcccttaact	ccgcccatcc	cgcccctaac	3180
tccgcccagt	tccgcccatt	ctccgcccc	tggtgacta	atTTTTTTT	tttatgcaga	3240
ggccgaggcc	gcctcggcct	ctgagctatt	ccagaagtag	tgaggaggct	tttttggagg	3300
cctaggcttt	tgcaaaaagc	tctctggcta	actagagaac	ccactgctta	ctggcttatac	3360
gaaattaata	cgactcacta	tagggagacc	caagctggct	agcgtttaaa	cttaagcttg	3420
gtaccgagct	cggatccact	agtccagtgt	ggtggaattg	ccctttccgc	agagcaatgg	3480
cgggtgtctg	cgggtccgcg	cggacctcgc	ccagctcaga	taaagtacag	aaagacaagg	3540
ctgaactgat	ctcagggccc	aggcaggaca	gccgaatagg	gaaactcttg	ggttttgagt	3600
ggacagat	gtccagttgg	cggaggctgg	tgaccctgct	gaatcgacca	acggaccctg	3660
caagcttagc	tgtctttcgt	tttctttttg	ggttcttgat	ggtgctagac	attccccagg	3720
agcgggggct	cagctctctg	gaccggaaat	accttgatgg	gctggatgtg	tgccgcttcc	3780
ccttgcctgga	tgccctacgc	ccactgccac	ttgactggat	gtatcttgtc	tacaccatca	3840

tgtttctggg	ggcactgggc	atgatgctgg	gcctgtgcta	cggataaagc	tgtgtgttat	3900
tcctgctgcc	atactggtat	gtgtttctcc	tggacaagac	atcatggaac	aaccactcct	3960
atctgtatgg	gttgttggcc	ttcagctaa	cattcatgga	tgcaaaccac	tactggctctg	4020
tggacggtct	gctgaatgcc	cataggagga	atgcccacgt	gcccccttgg	aactatgcag	4080
tgctccgtgg	ccagatcttc	attgtgtact	tcattgceggg	tgtgaaaaag	ctggatgcag	4140
actgggttga	aggctattcc	atggaatatt	tgtcccggca	ctggctcttc	agtcacctca	4200
aactgctgtt	gtctgaggag	ctgactagcc	tgctggctgt	gactgggggt	gggctgctgc	4260
ttgacctctc	agctggtttc	ctgctctttt	ttgatgtctc	aagatccatt	ggcctgttct	4320
ttgtgtecta	cttccactgc	atgaattccc	agcttttcag	cattggtatg	ttctcctacg	4380
tcattgctggc	cagcagccct	ctcttctgct	cccctgagtg	gcctcggaag	ctgggtctct	4440
actgcccccg	aaggttgcaa	caactgttgc	ccctcaaggc	agccccctag	cccagtgttt	4500
cctgtgtgta	taagaggagc	cggggcaaaa	gtggccagaa	gccagggctg	cgccatcagc	4560
tgggagctgc	cttaccctg	ctctacctcc	tggagcagct	attcctgccc	tattctcatt	4620
ttctcaccia	gggtataaac	aactggacaa	atgggctgta	tggctattcc	tgggacatga	4680
tgggtgcactc	ccgctcccac	cagcacgtga	agatcaccta	ccgtgatggc	cgcactggcg	4740
aactgggcta	ccttaaccct	ggggatatta	cacagagtcg	gcatggaag	gatcatgcag	4800
acatgctgaa	gcaatatgcc	acttgccctga	gccgcctgct	tccaagtat	aatgtcactg	4860
agccccagat	ctactttgat	atttgggtct	ccatcaatga	ccgcttcag	cagaggattt	4920
ttgaccctcg	tgtggacatc	gtgcaggccg	cttggtcacc	ctttcagcgc	acatcctggg	4980
tgcaaccact	cttgatggac	ctgtctccct	ggagggccaa	gttacaggaa	atcaagagca	5040
gcctagacaa	ccacactgag	gtggctttca	ttgcagattt	ccctggactg	cacttggaga	5100
atdddgtgag	tgaagacctg	ggcaacacta	gcatccagct	gctgcagggg	gaagtgactg	5160
tggagcttgt	ggcagaacag	aagaaccaga	ctcttcgaga	gggagaaaaa	atgcagttgc	5220
ctgctggtga	gtaccataag	gtgtatacga	catcacctag	cccttcttgc	tacatgtacg	5280
tctatgtcaa	cactacagag	cttgcaactg	agcaagacct	ggcatatctg	caagaattaa	5340
aggaaaaggt	ggagaatgga	agtgaaacag	ggcctctacc	cccagagctg	cagcctctgt	5400
tggaagggga	agtaaaaggg	ggccctgagc	caacacctct	ggttcagacc	tttcttagac	5460
gccaacaaag	gctccaggag	attgaacgcc	ggcgaaatac	tcctttccat	gagcgattct	5520
tecgttctt	gttgcgaaag	ctctatgtct	ttcgccgcag	cttctgatg	acttgtatct	5580
cacttcgaaa	tctgatatta	ggccgtcctt	ccctggagca	gctggcccag	gaggtgactt	5640
atgcaaactt	gagacccttt	gaggcagttg	gagaactgaa	tccctcaaac	acggattctt	5700
cacattctaa	tctctctgag	tcaaatectg	atcctgtcca	ctcagagttc	tgaagggggc	5760
cagatgttgg	aagggcaatt	cgagtctaga	gggcccggcc	tgatagacgg	tttttcgccc	5820
tttgacgttg	gagtccacgt	tctttaatag	tggactcttg	ttccaaactg	gaacaacact	5880
caaccctatc	tcggctctatt	cttttgattt	ataagggatt	ttgccgattt	cgccctattg	5940
gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	taacgcgaat	taattctgtg	gaatgtgtgt	6000
cagttagggt	gtggaaagtc	cccaggctcc	ccagcaggca	gaagtatgca	aagcatgcat	6060
ctcaattagt	cagcaaccag	gtgtggaaag	tccccaggct	ccccagcagg	cagaagtatg	6120
caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	atagtcccgc	ccctaactcc	gccccatccc	6180

ccctaactc	cgcccagttc	cgcccattct	cgccccatg	gctgactaat	tttttttatt	6240
tatgcagagg	ccgaggccgc	ctctgcctct	gagctattcc	agaagtagtg	aggaggcttt	6300
tttgagggcc	taggcttttg	caaaaagctc	ccgggagctt	gtatatccat	tttcggatct	6360
gatcaagaga	caggatgagg	atcgtttcgc	atgattgaac	aagatggatt	gcacgcaggt	6420
tctccggccg	cttgggtgga	gaggctattc	ggctatgact	gggcacaaca	gacaatcggc	6480
tgctctgatg	ccgccgtggt	ccggctgtca	gcgcaggggc	gcccggttct	ttttgtcaag	6540
accgacctgt	ccggtgcctt	gaatgaactg	caggacgagg	cagcgcggct	atcgtaggctg	6600
gccacgacgg	gcgttccttg	cgcagctgtg	ctcgacgttg	tactgaagc	gggaaggac	6660
tggtctctat	tgggcgaagt	gccggggcag	gatctcctgt	catctcacct	tgctcctgcc	6720
gagaaagtat	ccatcatggc	tgatgcaatg	cgccggctgc	atacgttga	tccggctacc	6780
tgcccattcg	accaccaagc	gaaacatcgc	atcgagcgag	cacgtactcg	gatggaagcc	6840
ggtcttgctg	atcaggatga	tctggacgaa	gagcatcagg	ggctcgcgcc	agccgaactg	6900
ttcgccaggc	tcaaggcgcg	catgcccgc	ggcgaggatc	tcgtcgtgac	ccatggcgat	6960
gcctgcttgc	cgaatatcat	ggtggaaaat	ggccgctttt	ctggattcat	cgactgtggc	7020
cggctgggtg	tggcggaccg	ctatcaggac	atagcgttgg	ctaccctga	tattgctgaa	7080
gagcttggcg	gcgaatgggc	tgaccgcttc	ctcgtgcttt	acggtatcgc	cgctcccgat	7140
tcgcagcgca	tcgccttcta	tcgccttctt	gacgagttct	tctgagcggg	actctggggg	7200
tcgaaatgac	cgaccaagcg	acgcccacc	tgccatcacg	agatttcgat	tccaccgccg	7260
ccttctatga	aaggttgggc	ttcggaatcg	ttttccggga	cgccggctgg	atgatcctcc	7320
agcgcgggga	tctcatgctg	gagttcttcg	cccaccccaa	cttgtttatt	gcagcttata	7380
atggttacia	ataaagcaat	agcatcacia	atctcacia	taaagcattt	ttttcactgc	7440
attctagttg	tggtttgctc	aaactcatca	atgtatctta	tcatgtctgt	ataccgtcga	7500
cctctagcta	gagcttggcg	taatcatggt	catagctggt	tcctgtgtga	aattgttata	7560
cgctcacaat	tccacacaac	atacagaccg	gaagcataaa	gtgtaaagcc	tggggctgct	7620
aatgagtgag	ctaactcaca	ttaattgcgt	tgcgctcact	gcccgccttc	cagtcgggaa	7680
acctgtcgtg	ccagctgcat	taatgaatcg	gccaacgcgc	ggggagaggc	ggtttgcgta	7740
ttgggcgctc	ttccgcttcc	tcgctcactg	actcgtcgcg	ctcggctggt	cggctgcggc	7800
gagcggatc	agctcactca	aaggcggtaa	tacggttata	cacagaatca	ggggataacg	7860
caggaaagaa	catgtgagca	aaaggccagc	aaaaggccag	gaaccgtaaa	aaggccgcgt	7920
tgctggcggt	tttccatagg	ctccgcccc	ctgacgagca	tcacaaaaat	cgacgctcaa	7980
gtcagagggtg	gcgaaaccgc	acaggactat	aaagatacca	ggcgtttccc	cctggaagct	8040
ccctcgtcgc	ctctcctggt	ccgaccctgc	cgcttaccgg	atacctgtcc	gcctttctcc	8100
cttcgggaag	cgtggcgctt	tctcatagct	cacgctgtag	gtatctcagt	tcgggttagg	8160
tcgttcgctc	caagctgggc	tgtgtgcacg	aacccccgt	tcagcccgc	cgctgcgcct	8220
tatccggtaa	ctatcgtctt	gagtccaacc	cggtaagaca	cgacttatcg	ccactggcag	8280
cagccactgg	taacaggatt	agcagagcga	ggtatgtagg	cgggtctaca	gagttcttga	8340
agtgggtggc	taactacggc	tacactagaa	gaacagtatt	tggtatctgc	gctctgctga	8400
agccagttac	cttcggaaaa	agagttggta	gctcttgatc	cggcaaaaa	accaccgctg	8460
gtagcgggtt	ttttgtttgc	aagcagcaga	ttacgcgcag	aaaaaaagga	tctcaagaag	8520

atcctttgat	cttttctacg	gggtctgacg	ctcagtgga	cgaaaactca	cgtaaagga	8580
ttttggtc	gagattatca	aaaaggatct	tcacctagat	ccttttaaat	taaaaatgaa	8640
gttttaaatc	aatctaaagt	atatatgagt	aaacttggtc	tgacagttac	caatgcttaa	8700
tcagtgagge	acctatctca	gcgatctgtc	tatttcgttc	atccatagtt	gcctgactcc	8760
ccgtcgtgta	gataactacg	atacgggagg	gcttaccate	tgccccagc	gctgcaatga	8820
taccgcgaga	cccacgctca	ccggctccag	atztatcagc	aataaaccag	ccagccggaa	8880
gggcccagc	cagaagtgg	cctgcaactt	tatecgcctc	catccagtct	attaattggt	8940
gccgggaagc	tagagtaagt	agttcgccag	ttaatagttt	gcgcaacggt	gttgccattg	9000
ctacaggeat	cgtgggtgca	cgctcgtcgt	ttggatggc	ttcattcagc	tccggttccc	9060
aacgatcaag	gcgagttaca	tgatcccca	tgttgtgcaa	aaaagcgggt	agctccttcg	9120
gtcctccgat	cgttgtcaga	agtaagtgg	ccgcagtggt	atcactcatg	gttatggcag	9180
cactgcataa	ttctcttact	gtcatgccat	ccgtaagatg	cttttctgtg	actggtgagt	9240
actcaacca	gtcattctga	gaatagtgt	tgcggcgacc	gagttgctct	tgccccgct	9300
caatacggga	taataccgcg	ccacatagca	gaactttaaa	agtgctcacc	attggaaaac	9360
gttcttcggg	gcgaaaactc	tcaaggatct	taccgctggt	gagatccagt	tcgatgtaac	9420
ccactcgtgc	acccaactga	tcttcagcat	cttttacttt	caccagcgtt	tctgggtgag	9480
caaaaacagg	aaggcaaaa	gccgcaaaaa	agggaataag	ggcgacacgg	aaatggtgaa	9540
tactcact	cttctttttt	caatattatt	gaagcattta	tcagggttat	tgtctcatga	9600
gcggatacat	atgtgaatgt	athtagaaaa	ataaacaat	aggggttccg	cgcacatttc	9660
cccgaaaagt	gccacctgac	gtc				9683

<210>15

<211>9781

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 载体

<400>15

gacggatcgg	gagatctccc	gatecccctat	ggtgcactct	cagtacaatc	tgctctgatg	60
ccgcatagtt	aagccagtat	ctgctccctg	cttgtgtggt	ggaggtcgtc	gagtagtgcg	120
cgagcaaaa	ttaagctaca	acaaggcaag	gcttgaccga	caattgcatg	aagaatctgc	180
ttagggtag	gcgttttgcg	ctgcttcgcg	atgtacgggc	cagatatacg	cgttgacatt	240
gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	agccccatata	300
tggagttccg	cgttacataa	cttacggtaa	atggccccgc	tggtgaccg	cccaacgacc	360
cccgccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	420
attgacgtca	atgggtggag	tatttacggt	aaactgcccc	cttggcagta	catcaagtgt	480
atcatatgcc	aagtacgccc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	540
atgcccagta	catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	600

tcgctattac	catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	660
actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720
aaaatcaacg	ggactttcca	aatgtctgta	acaactccgc	cccattgacg	caaattggcg	780
gtaggcgtgt	acgggtggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaaccca	840
ctgcttactg	gcttatcgaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagc	900
gtttaaactt	aagcttggta	ccgagctcgg	atccactagt	ccagtgtggt	ggaattgccc	960
ttattcctca	gtgaccagg	agctgacaca	cttagaaggg	caattctgca	gataccatgc	1020
agcgcgtgaa	catgatcatg	gcagaatcac	caggcctcat	caccatctgc	cttttaggat	1080
atctactcag	tgctgaatgt	acagtttttc	ttgatcatga	aaacgccaac	aaaattctga	1140
atcgccaaa	gaggtataat	tcaggtaa	tggaagagtt	tgttcaaggg	aaccttgaga	1200
gagaatgtat	ggaagaaaag	tgtagttttg	aagaagcacg	agaagttttt	gaaaacactg	1260
aaagaacaac	tgaattttgg	aagcagtatg	ttgatggaga	tcagtgtgag	tccaatccat	1320
gtttaaatgg	cggcagttgc	aaggatgaca	ttaattccta	tgaatgttgg	tgtccctttg	1380
gatttgaagg	aaagaactgt	gaattagatg	taacatgtaa	cattaagaat	ggcagatgcg	1440
agcagttttg	taaaaatagt	gctgataaca	aggtggtttg	ctcctgtact	gagggatatac	1500
gacttgcaga	aaaccagaag	tcctgtgaac	cagcagtgcc	atttccatgt	ggaagagttt	1560
ctgtttcaca	aacttctaag	ctcaccctg	ctgagactgt	ttttcctgat	gtggactatg	1620
taaattctac	tgaagctgaa	accattttgg	ataacatcac	tcaaagcacc	caatcattta	1680
atgacttcac	tcgggttggt	ggtggagaag	atgccaaacc	aggtcaattc	ccttggcagg	1740
ttgttttgaa	tggtaaagtt	gatgcattct	gtggaggctc	tatcgttaat	gaaaaatgga	1800
ttgtaactgc	tgcccactgt	gttgaaactg	gtgttaaaat	tacagttgtc	gcaggtgaac	1860
ataatattga	ggagacagaa	catacagagc	aaaagcgaaa	tgtgattcga	attattcctc	1920
accacaacta	caatgcagct	attaataagt	acaacatga	cattgccctt	ctggaactgg	1980
acgaaccctt	agtgcataac	agctacgtta	cacctatttg	cattgctgac	aaggaataca	2040
cgaacatctt	cctcaaat	ggatctggct	atgtaagtgg	ctggggaagg	gtcttccaca	2100
aaggagagtc	agcttttagt	cttcagtacc	ttagagttcc	acttgttgac	cgagccacat	2160
gtcttcgac	tacaaagttc	accatctata	acaacatggt	ctgtgctggc	ttccatgaag	2220
gaggtagaga	ttcatgtcaa	ggagatagtg	ggggacccca	tgttactgaa	gtggaagggga	2280
ccagtttctt	aactggaatt	attagctggg	gtgaagagtg	tgcaatgaaa	ggcaaatatg	2340
gaatatatac	caaggtatcc	cggtatgtca	actggattaa	ggaaaaaaca	aagctcactt	2400
aatgaaagat	ggatttccaa	ggatccagca	cagtggcggc	cgctcggttc	ctagagggcc	2460
cgtttaaacc	cgctgatcag	cctcgactgt	gccttctagt	tgccagccat	ctgttgtttg	2520
cccctcccc	gtgccttctt	tgaccctgga	aggtgccact	cccactgtcc	tttccataata	2580
aaatgaggaa	attgcatcgc	attgtctgag	taggtgtcat	tctattctgg	ggggtggggt	2640
ggggcaggac	agcaaggggg	aggattggga	agacaatagc	aggcatgctg	gggatgctgt	2700
gggctctatg	gcttctgagg	cggaaagaac	cagctggggc	tctagggggg	atccccacgc	2760
gccctgtagc	ggcgcattaa	gcgcggcggg	tgtggtggtt	acgcgcagcg	tgaccgctac	2820
acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	cgctttcttc	ccttcccttc	tcgccacggt	2880
cgccggcttt	ccccgtcaag	ctctaaatcg	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	2940

tttacggcac	ctcgacceca	aaaaacttga	ttagggatgat	ggttcacatc	gatgcaat	3000
cctcatttta	ttaggaaagg	acagtgggag	tgccaccttc	cagggcaag	gaaggcacgg	3060
gggaggggca	aacaacagat	ggctggcaac	tagaaggcac	agtcgaggct	gatcagcggg	3120
tttaaacggg	ccctctagac	tcgaattgcc	cttccaacat	ctggccccct	tcagaactct	3180
gagtggacag	gatcaggatt	tgactcagga	ggattagaat	gtgaagaatc	cgtgtttgag	3240
ggattcagtt	ctccaactgc	ctcaaagggt	ctcaagtttg	cataagtcac	ctcctgggcc	3300
agctgctcca	gggaaggacg	gcctaataatc	agatttcgaa	gtgagataca	agtcacacagg	3360
aagctgcggc	gaaagacata	gagctttcgc	aacaagaagc	ggaagaatcg	ctcatggaaa	3420
ggagtatttc	gccggcgctc	aatctcctgg	agcctttgtt	ggcgtctaag	aaaggtctga	3480
accagaggtg	ttggctcagg	gccccctttt	acttccccct	ccaacagagg	ctgcagctct	3540
gggggtagag	gccctgtttc	acttccattc	tccacctttt	cttttaattc	ttgcagatat	3600
gccaggtctt	gctccagtgc	aagctctgta	gtgttgacat	agacgtacat	gtagcaagaa	3660
gggctaggtg	atgtcgtata	caccttatgg	tactcaccag	caggcaactg	cattttttct	3720
ccctctcgaa	gagtctgggt	cttctgttct	gccacaagct	ccacagtcac	ttccccctgc	3780
agcagctgga	tgctagtgtt	gcccaggtct	tcactcaca	aattctcca	gtgcagtcca	3840
gggaaatctg	caatgaagac	cacctcagtg	tggttgtcta	ggctgctctt	gatttctgt	3900
aacttgccc	tccagggaga	caggtccatc	aagagtgggt	gcaccagga	tgtgcgctga	3960
aagggtgacc	aagcggcctg	cacgatgtcc	acacgagggt	caaaaatcct	ctgctggaag	4020
cggtcattga	tggagacca	aatatcaaag	tagatctggg	gctcagtgc	attatacttg	4080
ggaagcaggc	ggctcaggca	agtggcatat	tgcttcagca	tgtctgcatg	atccttccat	4140
cgccgactct	gtgtaaatac	cccaggggta	aggtagccca	gttcgccagt	gcggccatca	4200
cggtaggtga	tcttcacgtg	ctgggtgggag	cgggagtgca	ccatcatgtc	ccaggaatag	4260
ccatacagcc	catttgtcca	gttgttatag	ccctgggtga	gaaaatgaga	atagggcagg	4320
aatagctgct	ccaggaggta	gagcagggtg	aaggcagctc	ccagctgatg	gcgcagccct	4380
ggcttctggc	cacttttgcc	ccggctctct	ttatacacac	aggaaacact	gggctgaggg	4440
gctgccttga	ggggcaacag	ttgttgcaac	cttcgggggc	agtaggacac	cagcttccga	4500
ggccactcag	gggagcagaa	gagagggctg	ctggccagca	tgacgtagga	gaacatacca	4560
atgctgaaaa	gctgggaatt	catgcagtgg	aagtaggaca	caaagaacag	gccaatggat	4620
cttgagacat	caaaaaagag	caggaaacca	gctgagaggt	caagcagcag	cccaccccag	4680
tgcacgacca	gcaggctagt	cagctcctca	gacaacagca	gtttgaaggg	actgaagagc	4740
cagtgcggg	acaaatattc	catggaatag	ccttcaacc	agtctgcac	cagctttttc	4800
acaccgcaa	tgaagtacac	aatgaagatc	tggccacgga	gcactgcata	gttccaaagg	4860
ggcacgtggg	cattctctct	atgggcattc	agcagaccgt	ccacagacca	gtagtgggtt	4920
gcatccatga	atgttagctg	aaaggccaac	aaccataca	gataggagtg	gttgttccat	4980
gatgtcttgt	ccaggagaaa	cacataccag	tatggcagca	ggaataaac	acagcttatac	5040
cggtagcaca	ggcccagcat	catgcccagt	gccccagaa	acatgatggt	gtagacaaga	5100
tacatccagt	caagtggcag	tgggcgtagg	gcatccagca	aggggaagcg	gcacacatcc	5160
agcccatcaa	ggtatttccg	gtccagagag	ctgagcccc	gctcctgggg	aatgtctagc	5220
accatcaaga	acccaaaaag	aaaacgaaag	acagctaagc	ttgcagggtc	cgtttggtcga	5280

ttcagcaggg	tcaccagcct	ccgccaactg	gacaaatctg	tccactcaaa	acccaagagt	5340
ttccctattc	ggctgtcctg	cctgggcccct	gagatcagtt	cagccttgtc	tttctgtact	5400
ttatctgagc	tgggcgaggt	ccgcgcggac	ccggcagaca	ccgccattgc	tctgcggaaa	5460
gggcaattcc	accacactgg	actagtgat	ccgagctcgg	taccaagctt	aagtttaaac	5520
gctagccagc	ttgggtctcc	ctatagttag	tcgtattaat	ttcgataagc	cagtaagcag	5580
tgggttctct	agtttagccag	agagcttttt	gcaaaaagcct	aggcctccaa	aaaagcctcc	5640
tcactacttc	tggaatagct	cagaggccga	ggcggcctcg	gcctctgcat	aaataaaaaa	5700
aattagtcag	ccatggggcg	gagaatgggc	ggaactgggc	ggagttaggg	gcgggatggg	5760
cggagttagg	ggcgggacta	tggttgctga	ctaattgaga	tgcattgctt	gcatacttct	5820
gcctgctggg	gagcctgggg	actttccaca	ccctaactga	cacacattcc	acagccggat	5880
cgatgtgggc	catcgcccctg	atagacgggt	tttcgccctt	tgacgttggg	gtccacgttc	5940
tttaatagtg	gactcttggt	ccaaactgga	acaacactca	accctatctc	ggtctattct	6000
tttgatttat	aagggatatt	gccgatctcg	gcctattggg	taaaaaatga	gctgatttaa	6060
caaaaattta	acgcgaatta	attctgtgga	atgtgtgtca	gtaggggtgt	ggaaagtccc	6120
caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccaggt	6180
gtggaaagtc	cccaggctcc	ccagcaggca	gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	6240
cagcaacat	agtcccggcc	ctaactccgc	ccatcccggc	cctaactccg	cccagttccg	6300
cccattctcc	gccccatggc	tgactaattt	tttttattta	tgcagaggcc	gaggccgcct	6360
ctgcctctga	gctattccag	aagtagtgag	gaggcttttt	tggaggccta	ggcttttgca	6420
aaaagctccc	gggagcttgt	atatccattt	tcggatctga	tcaagagaca	ggatgaggat	6480
cgtttcgcat	gattgaacaa	gatggattgc	acgcaggctc	tccggccgct	tgggtggaga	6540
ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggtctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	6600
ggctgtcagc	gcagggggcg	ccggttcttt	ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	6660
atgaactgca	ggacgaggca	gcgcggctat	cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	6720
cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	6780
cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	ctcctgccga	gaaagtatcc	atcatggctg	6840
atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	cggtacctg	cccattcgac	caccaagcga	6900
aacatcgcat	cgagcgagca	cgtactcgga	tggaagccgg	tcttgctgat	caggatgata	6960
tggacgaaga	gcatcagggg	ctcgcgccag	ccgaactggt	cgccaggctc	aaggcgcgca	7020
tgcccagcgg	cgaggatctc	gtcgtgacce	atggcgatgc	ctgcttgccg	aatatcatgg	7080
tggaaaatgg	ccgcttttct	ggattcatcg	actgtggccg	gctgggtgtg	gcggaccgct	7140
atcaggacat	agcgttggct	accctgata	ttgctgaaga	gcttggcggc	gaatgggctg	7200
accgcttct	cgtgctttac	ggtatcgccg	ctcccgatc	gcagcgcate	gccttctatc	7260
gccttcttga	cgagttcttc	tgagcgggac	tctggggctc	gaaatgaccg	accaagcgac	7320
gcccacctg	ccatcacgag	atttcgattc	caccgccgcc	ttctatgaaa	ggttgggctt	7380
cggaatcggt	ttccgggacg	ccggttgat	gatcctccag	cgcggggata	tcatgctgga	7440
gttcttcgcc	caccccaact	tgtttattgc	agcttataat	ggttacaaat	aaagcaatag	7500
catcacaat	ttcacaata	aagcattttt	ttactgcat	tctagttgtg	gtttgtccaa	7560
actcatcaat	gtatcttata	atgtctgtat	accgtcgacc	tctagctaga	gcttggcgta	7620

atcatggtca	tagctgtttc	ctgtgtgaaa	ttgttatccg	ctcacaatte	cacacaacat	7680
acgagccgga	agcataaagt	gtaaagcctg	gggtgcctaa	tgagtgagct	aactcacatt	7740
aattgcgttg	cgctcactgc	ccgctttcca	gtcgggaaac	ctgtcgtgcc	agctgcatta	7800
atgaatcggc	caacgcgcgg	ggagaggcgg	tttgcgtatt	gggcgctctt	ccgcttcctc	7860
gctcactgac	tcgctgcgct	cggctgttcg	gctgcggcga	gcggtatcag	ctcactcaaa	7920
ggcggtaata	cggttatcca	cagaatcagg	ggataacgca	ggaaagaaca	tgtgagcaaa	7980
aggccagcaa	aaggccagga	accgtaaaaa	ggccgcgttg	ctggcgtttt	tccataggct	8040
ccgccccct	gacgagcadc	acaaaaatcg	acgctcaagt	cagagggtggc	gaaacccgac	8100
aggactataa	agataccagg	cgtttccccc	tggaagetcc	ctcgtgcgct	ctcctgttcc	8160
gaccctgccg	cttaccggat	acctgtccgc	ctttctccct	tcgggaagcg	tggcgctttc	8220
tcatagctca	cgctgtaggt	atctcagttc	ggtgtaggtc	gttcgctcca	agctgggctg	8280
tgtgcacgaa	cccccgttc	agccccgaccg	ctgcgcctta	tccggttaact	atcgtcttga	8340
gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	acaggattag	8400
cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tgggtggccta	actacggcta	8460
cactagaaga	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	tcggaaaaag	8520
agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaac	caccgctggg	agcggttttt	ttgtttgcaa	8580
gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	8640
gtctgacgct	cagtggaacg	aaaactcacg	ttaagggatt	ttggtcatga	gattatcaaa	8700
aaggatcttc	acctagatcc	ttttaaatta	aaaatgaagt	tttaaatcaa	tctaaagtat	8760
atatgagtaa	acttggctctg	acagttacca	atgcttaate	agtgaggcac	ctatctcagc	8820
gatctgtcta	tttcgttcat	ccatagttag	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	8880
acgggagggc	ttaccatctg	gccccagtgc	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgctcacc	8940
ggctccagat	ttatcagcaa	taaaccagcc	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtggctc	9000
tgcaacttta	tccgcctcca	tccagtctat	taattgttgc	cgggaagcta	gagtaagtag	9060
ttcgccagtt	aatagtttgc	gcaacgttgt	tgccattgct	acaggcatcg	tgggtgcacg	9120
ctcgtcgttt	ggataggctt	cattcagctc	cggttcccaa	cgatcaaggc	gagttacatg	9180
atcccccatg	ttgtgcaaaa	aagcggttag	ctccttcggg	cctccgatcg	ttgtcagaag	9240
taagttggcc	gcagtgttat	cactcatggt	tatggcagca	ctgcataatt	ctcttactgt	9300
catgcatcc	gtaagatgct	tttctgtgac	tggtgagtac	tcaaccaagt	cattctgaga	9360
atagtgtatg	cggcgaccga	gttgctcttg	cccggcgctca	atacgggata	ataccgcgcc	9420
acatagcaga	actttaaaag	tgctcatcat	tggaaaacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	9480
aaggatctta	ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaacce	actcgtgcac	ccaactgac	9540
ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	9600
cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaata	ctcactactct	tcctttttca	9660
atattattga	agcatttate	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	9720
ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	9780
c						9781

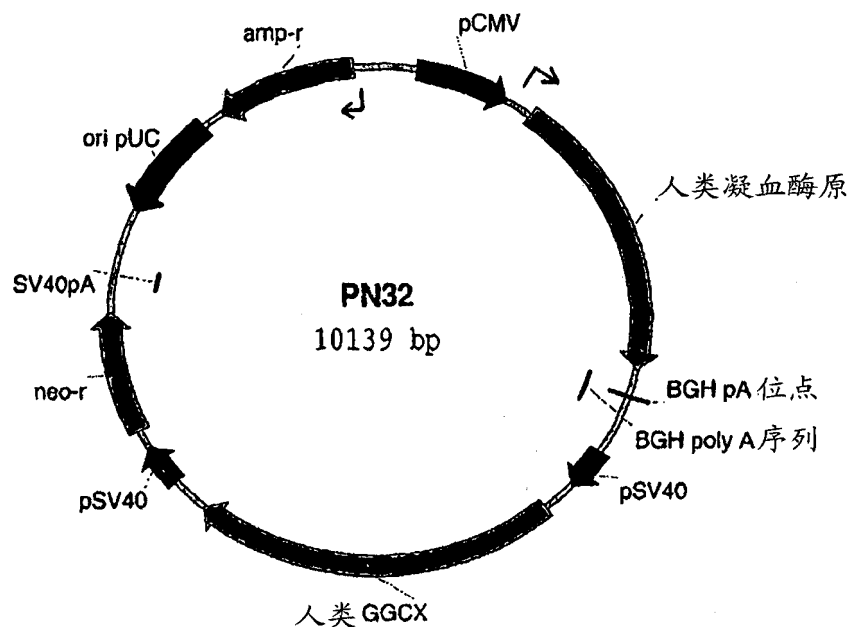


图 1a

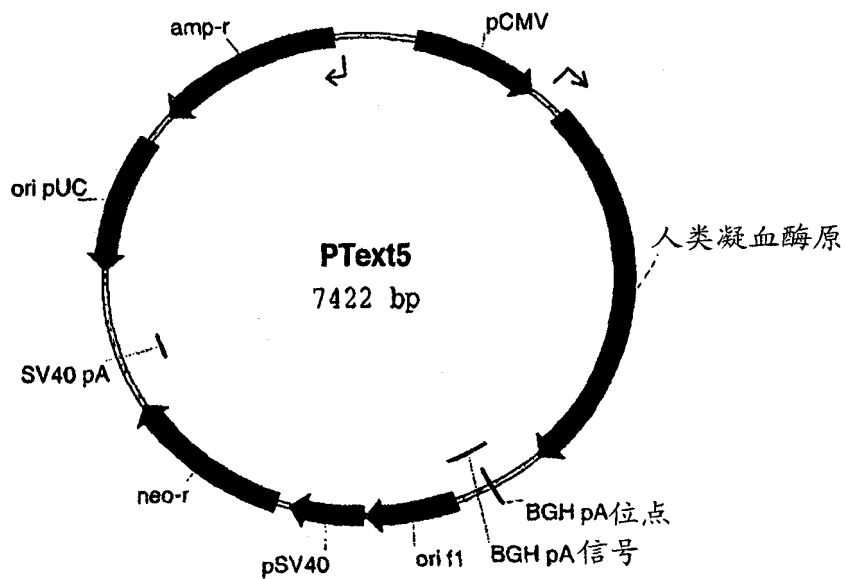


图 1b

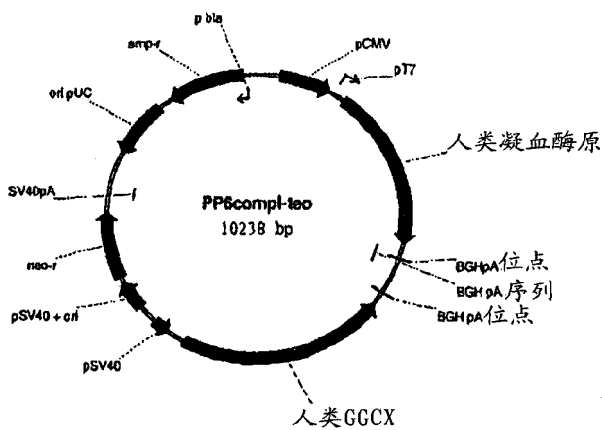


图 2

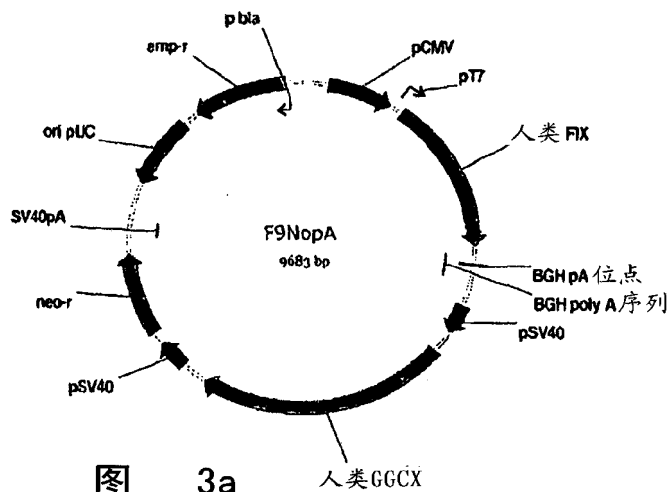


图 3a

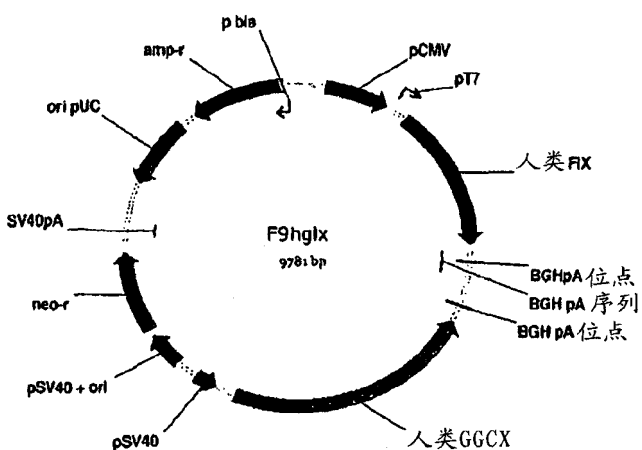


图 3b