



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 108026567 B

(45) 授权公告日 2021.10.22

(21) 申请号 201680045182.1

(22) 申请日 2016.07.29

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108026567 A

(43) 申请公布日 2018.05.11

(30) 优先权数据  
62/199,663 2015.07.31 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.01.31

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/044788 2016.07.29

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/023782 EN 2017.02.09

(73) 专利权人 美国政府(由卫生和人类服务部的部长所代表)  
地址 美国马里兰州  
专利权人 美国国际生物技术有限公司

(72) 发明人 T·L·布罗特 M·D·哈里奇  
W·T·巴德 G·A·迈耶斯

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 刘妍璐 马莉华

(51) Int.Cl.  
C12Q 1/6806 (2018.01)  
C12Q 1/6869 (2018.01)  
C12Q 1/70 (2006.01)

(56) 对比文件  
W0 2014081937 A2, 2014.05.30  
Alexander Neverov et, al.. Massively parallel sequencing for monitoring genetic consistency and quality control of live viral vaccines.《PNAS》.2010, 第107卷(第46期),  
Alexander L. Greninger et, al.. A Metagenomic Analysis of Pandemic Influenza A (2009 H1N1) Infection in Patients from North America.《PLOS ONE》.2010, 第5卷(第10期), e13381.

审查员 蒋红云

权利要求书2页 说明书39页  
序列表16页 附图51页

(54) 发明名称

分析病毒来源治疗剂的方法

(57) 摘要

本文描述了用于病毒来源治疗剂, 例如病毒疫苗, 包括PVS-RIP0疫苗的大规模平行测序方法。该方法能够测定低频序列变体的微异质性并对其进行定量, 在PVS-RIP0的情况下, 有望替代目前用于筛选多批RNA病毒来源治疗剂的猴神经毒力安全性试验(MNVT) 以及通过PCR和限制性酶切割(MAPREC) 法进行的突变体分析。

1. 一种测定脊髓灰质炎病毒来源治疗剂中脊髓灰质炎病毒序列变体的方法,包括:

从主病毒库或工作细胞库提取RNA,其中主病毒库或工作细胞库包含含有脊髓灰质炎病毒来源治疗剂的宿主细胞;

将提取的RNA与2U/ $\mu$ l的4U脱氧核糖核酸酶在37℃下,于消化宿主细胞基因组DNA和宿主细胞线粒体DNA、但不消化病毒RNA分子的条件接触20-40分钟,由此产生富集的病毒RNA;

失活脱氧核糖核酸酶;

从富集的病毒RNA产生双链cDNA,使用寡聚(dT)<sub>x</sub>引物从而产生病毒双链cDNA;

扩增病毒双链cDNA;

定量病毒双链cDNA;

从500pg到1ng病毒双链cDNA产生测序文库,其中通过随机片段化双链cDNA产生cDNA片段,将5'衔接子和3'衔接子连接到cDNA片段以产生连接有衔接子的cDNA片段,并扩增连接有衔接子的cDNA片段从而产生测序文库;

使用结合于表面的或颗粒结合并与5'衔接子和3'衔接子互补的寡核苷酸,克隆扩增所述测序文库以产生克隆扩增的测序文库;

使用平行的单端或双端测序,对克隆扩增的测序文库进行测序,以产生包含多个序列读序的原始序列数据集;

将所述多个序列读序与脊髓灰质炎病毒来源治疗剂的参照脊髓灰质炎序列进行比对,以产生包含多个匹配的序列读序的匹配序列;和

从所述匹配序列确定脊髓灰质炎病毒序列变体。

2. 一种测定脊髓灰质炎病毒来源治疗剂中脊髓灰质炎病毒序列变体的方法,其特征在于,包括:

将脊髓灰质炎病毒来源治疗剂引入Vero宿主细胞;

在允许脊髓灰质炎病毒来源治疗剂增殖的条件下,培养Vero宿主细胞;

从Vero宿主细胞中提取脊髓灰质炎RNA分子;

在消化Vero宿主细胞基因组DNA和Vero宿主细胞线粒体DNA、但不消化脊髓灰质炎RNA的条件下,将提取的脊髓灰质炎RNA与2U/ $\mu$ l的4U DNA酶在37℃接触20-40分钟,从而产生丰富的脊髓灰质炎RNA;

失活DNA酶;

使用寡聚(dT)<sub>x</sub>引物逆转录所提取的病毒性脊髓灰质炎RNA,从而产生脊髓灰质炎双链cDNA;

扩增脊髓灰质炎双链cDNA;

定量脊髓灰质炎双链cDNA;

从500pg至1ng的脊髓灰质炎双链cDNA产生测序文库,其中通过随机片段化脊髓灰质炎双链cDNA以产生脊髓灰质炎cDNA片段,将5'衔接子和3'衔接子连接到脊髓灰质炎cDNA片段从而产生连接有衔接子的脊髓灰质炎cDNA片段,并扩增连接有衔接子的脊髓灰质炎cDNA片段从而产生测序文库;

使用结合于表面的或颗粒结合且与5'衔接子和3'衔接子互补的寡核苷酸,克隆扩增测序文库以产生克隆扩增的测序文库;

使用平行的单端或双端测序,对克隆扩增的测序文库进行测序,以产生包含多个序列读序的原始序列数据集;

将所述多个序列读序与脊髓灰质炎病毒来源治疗剂的参照脊髓灰质炎序列进行比对,以产生包含多个匹配的序列读序的匹配序列;和

从所述匹配序列确定脊髓灰质炎病毒序列变体。

3.如权利要求1或2所述的方法,其中所述方法进一步包括确定所述多个匹配的序列读序的平均读取长度、匹配读序的百分比、覆盖度、SNP或其组合。

4.如权利要求1或2所述的方法,其中,当产生未匹配的序列读序时,将所述未匹配的序列读序添加到未匹配的序列读序池以供识别。

5.如权利要求1或2所述的方法,其中所述方法进一步包括:报告所述脊髓灰质炎病毒来源治疗剂对所述脊髓灰质炎病毒来源治疗剂参考序列的共有同源性、每个位置的每种碱基覆盖度、大于0.1%读序的异源碱基、或其组合。

6.如权利要求1或3所述的方法,其中所述宿主细胞是大肠杆菌细胞或Vero细胞。

7.如权利要求1至6中任一所述的方法,其中使所述提取的核酸分子与DNA酶接触包括:在37°C下将所述提取的核酸分子与所述DNA酶温育30分钟。

8.如权利要求1至7中任一所述的方法,其中使用与所述5'衔接子和所述3'衔接子互补的引物,对所述测序文库进行克隆扩增。

9.如权利要求8所述的方法,其中克隆扩增所述测序文库还包括:在扩增期间向所述连接有衔接子的cDNA片段添加条码序列。

10.如权利要求6或9所述的方法,其中克隆扩增所述测序文库包括:桥连扩增,并且所述表面包含流动槽的表面。

11.如权利要求1至10中任一所述的方法,其中测序是平行的两端测序。

12.如权利要求5所述的方法,其中报告包括每个位置中每种碱基的覆盖度。

13.如权利要求1至12中任一所述的方法,还包括:当所述匹配的序列中每种碱基的覆盖度是4X或更大时,确定所述匹配的序列对于筛选所述脊髓灰质炎病毒来源治疗剂是可接受的。

14.如权利要求1至12中任一所述的方法,还包括:确定所述匹配序列中的每种碱基的覆盖度小于4X,并且执行Sanger测序以在整个的匹配序列上提供4X或更大的覆盖度。

15.如权利要求1所述的方法,其中所述脊髓灰质炎治疗剂是PVS-RIP0。

16.如权利要求15的方法,其中所述病毒序列变体包括在内部核糖体进入位点中的突变。

## 分析病毒来源治疗剂的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年7月31日递交的美国临时申请号62/199,663的优先权,其通过引用并入本申请。

[0003] 领域

[0004] 本发明涉及基于文库的深度测序方法,用于分析批量的病毒来源治疗剂,例如活的减毒脊髓灰质炎疫苗。

[0005] 背景

[0006] PVS-RIP0是一种嵌合脊髓灰质炎病毒(PV),由携带来自人类鼻病毒2型(HRV2)的外来的内部核糖体进入位点(IRES)的减毒口服1型萨宾(Sabin)疫苗株组成(Brown等,(2014) Cancer 120:3277-86;Goetz等,(2011) Future Virol. 9:1045-1058;Goetz& Gromeier (2010) Cytokine&Growth Fact Rev;21:197-203)。脊髓灰质炎病毒是严重的神经退行性疾病脊髓灰质炎的病原体。工程化的PVS-RIP0作为非致病性治疗性病毒用于治疗多形性成胶质细胞瘤(GBM)和其它CD155<sup>+</sup>癌症(WO2014/081937)。

[0007] IRES是微小核糖核酸病毒基因组RNA的5'非翻译区内的关键非编码序列元件,因其以5'末端、7-甲基-鸟苷('帽')-独立的方式介导翻译起始(Dobrikova等(2003) PNAS USA 100:15125-15130;Dobrikova等,(2003) Virology 311:241-253;Dufresne等,(2002) J Virol 76:8966-8972)。IRES是所有三种PV萨宾疫苗株和PVSRIPO的神经减毒表型的主要决定因素(Campbell等(2005) J Virol 79:6281-6290;Dobrikova等(2006) J Virol 80:3310-3321;Brown和Gromeier (2015) Curr Opin Virol 13:81-85)。从机制上看,神经减毒是由于形成阻止核糖体募集的神经元特异性(IRES)核糖核蛋白复合物。在萨宾疫苗株中,神经元IRES无能性依赖于映射到茎环结构域5的离散区域的单点突变;而导致神经减毒的这个少见碱基是导致它们臭名昭着的倾向于恢复神经毒力的可能原因。逆向反转可以通过随机基因突变或与野生型序列同源重组而发生,或者在疫苗生产期间,或者在患者施用后(若使用活病毒)。PVSRIPO具有完整的功能性整合的HRV2IRES,一种天然存在的肠道病毒。与萨宾型1/3IRES相比,其在组织培养中的缺陷经过选择,HRV2IRES在本质上比萨宾IRES更大程度上不可用于神经元。HRV2IRES中神经元功能不全的遗传印迹至少跨越茎环结构域5(约40nt)和结构域6(约25nt)的上部(Brown等,(2014) Cancer 120:3277-86;Dobrikova等,(2003) PNAS USA 100:15125-15130;Dobrikova等,(2003) Virology 311:241-253;Dufresne等,(2002) J Virol 76:8966-8972)。由于共同的HRV2IRES序列可能是由于人类进化了数千年而来的,因此它可能代表HRV2靶细胞(呼吸道上皮细胞中的有丝分裂活性细胞)的翻译起始介质的理想化版本。

[0008] 由于脊髓灰质炎病毒和PVS-RIP0是单链RNA(ssRNA)病毒,因此在病毒复制期间(例如在构建体开发和生产期间)突变的天然频率高于用DNA基因组的dsDNA病毒和生物体所观察到的频率。目前,在临床使用之前,必须通过体内灵长类动物神经毒性安全性测试和体外噬菌斑测序方法对每个临床批次的活的或灭活的脊髓灰质炎病毒进行验证,以证实该批次不包含能够再生神经毒性表型的罕见遗传回复突变而导致脊髓灰质炎。疫苗批次的灵



长类神经毒性测试通常需要几个月才能完成,体外噬菌斑测序方法的灵敏度相对较差。

[0009] 由于它们在PV神经减毒中的突出作用,文献中描述的用于评估潜在脊髓灰质炎疫苗神经毒性的大多数方法集中于IRES中明确定义的位点(Martin等,(2011)WHO工作组关于修订世界卫生组织关于脊髓灰质炎疫苗生产和控制的建议(口头)的讨论:TRS No.904和910.2010年7月20-22日在瑞士日内瓦举行的会议报告,Vaccine;29:6432-6436;Rezapkin等(1998)Virology 245:183-187;Chumakov等,(1994)J Med Virol 42:79-85;Laassri等,(2006)J Infect Diseases 193:1344-1349)。用PVSRIPO中的HRV2IRES完全替代脊髓灰质炎IRES提出了如何表征嵌合病毒毒理学特征的问题。由于脊髓灰质炎疫苗制造商使用的体外方法与HRV2IRES序列(即MAPREC)无关,因此这留下了作为产品安全性判断者的体内测试方法和病毒遗传稳定性的表征。根据WHO指南(Dobrikova等,(2012)J Virol 86:2750-2759),使用食蟹猴(*cynomolgus macaques*)进行体内灵长类神经毒性测试,包括施用后组织学检查。先前的HTB-15细胞异体移植物(在Balb/c小鼠中)和噬斑测序研究表明,PVSRIPO基因组在体内连续传代和病毒扩增后是稳定的且为非致病的。使用Sanger测序,在HTB-15异种移植研究中仅注意到两个多态性位点为第97和1824位(Dobrikova等人,(2008)Mol Ther 16:1865-1872;Cello J等人,(2008)J Med Virol 80:352-359。)。有趣的是,在PVSRIPO的依诺米那(Illumina)深度测序中,这两个位点都没有被鉴定为多态性,表明它们是在HTB-15细胞中传代后基因重新突变的结果。综上所述,前两项研究的结果表明PVSRIPO相对于野生型PV没有毒性。这两种通用方法已被用于确定PVSRIPO在灵长类动物中不表现出神经性表型,并且使用直接和基于斑块的Sanger测序方法,PVSRIPO表现出低水平的序列异质性。还使用了对病毒遗传稳定性和均一性进行总体评估的其它较不敏感的方法,例如温度敏感性(即RCT40)和一般安全性测试(例如体内外试剂测试和RT-qPCR)。随着测序技术的进步,Sanger测序固有的灵敏度限制(每个碱基变异约15-20%的LoD)已经用“下一代测序”(NGS)方法克服,其理论上能够对碱基变体<1%敏感(Cabannes等,(2014)PDA J Pharm Sci and Tech 68:631-638;Liu等,(2012)Comparison of next-generation sequencing systems.J Biomed Biotech 2012;2012:251364;Neverov&Chumakov)PNAS USA 107:20063-20068。)。大多数NGS深度测序方法的灵敏度仅受限于其内在的错误掺入或误确认错误率,其大于基础检测技术的灵敏度限制。

[0010] 所需要的是对多批病毒来源治疗剂(如PVS-RIPO)中突变进行检测的改进方法。

[0011] 概要

[0012] 本发明提供了测定病毒来源治疗剂的方法,用于检测病毒序列变体的存在。可以用所公开的方法分析的病毒来源治疗剂的例子包括但不限于:病毒、病毒模板质粒或疫苗,例如来源于脊髓灰质炎病毒(如PVS-RIPO)、麻疹病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、腺病毒、疱疹病毒、腮腺炎病毒、流感病毒、风疹病毒、HIV或HTLV。

[0013] 所公开的方法包括从病毒种子库、收获物和/或纯化的药物产品批次(例如主病毒库或工作细胞库)中提取(如分离)核酸分子,其中病毒种子库、收获物和/或纯化的药物产品批次(例如主要病毒库或工作细胞库)包括含有病毒来源治疗剂的宿主细胞。由于所得样品中存在不需要的宿主细胞基因组DNA和宿主细胞线粒体DNA,在基本上可消化宿主细胞基因组DNA和宿主细胞线粒体DNA、但基本不消化所需的病毒核酸分子(如病毒基因组RNA或DNA,或病毒模板质粒)的条件下所提取的核酸分子与DNA酶一起孵育(例如进行接触)。这种

条件的例子为:37℃下、30分钟。所得的经富集的病毒核酸分子可以是DNA或RNA。如果它们是RNA,则该方法包括从富集的病毒RNA产生双链(ds)DNA(例如dscDNA),例如,利用逆转录并产生第二病毒核酸链。病毒双链DNA(例如,dscDNA)经扩增(如使用PCR)后,对扩增的病毒双链DNA进行定量。然后从至少500pg扩增的病毒dsDNA产生测序文库。测序文库包括与病毒双链DNA相连的5'-衔接子和3'-衔接子(例如,病毒双链DNA片段包括与其相连的5'衔接子以及3'衔接子)。使用下一代测序(例如使用平行单端或双端测序)对得到的测序文库进行测序以产生包含多个序列读序的原始序列数据集。将多个序列读序与病毒来源治疗剂(如非突变序列)的参考序列进行比对,以产生包含多个匹配的序列读序的匹配序列。根据匹配的序列读序,可以确定病毒来源治疗剂的序列,并鉴定是否存在序列变异(例如突变)。

[0014] 在一些实施例中,在对来自MVB的病毒来源治疗剂进行测序之后,所述方法还包括:将来自MVB的病毒来源治疗剂引入宿主细胞,例如哺乳动物细胞(如Vero细胞)以产生病毒来源治疗剂。然后可以对从第二宿主细胞中产生获得的病毒来源治疗剂进行测序,并将其序列与从MVB获得并测序的病毒来源治疗剂进行比较。例如,该方法还可以包括将病毒来源治疗剂引入(例如转化)到哺乳动物宿主细胞中,并在允许病毒来源治疗剂增殖的条件下培养哺乳动物宿主细胞。提取(如分离)来自哺乳动物宿主细胞的病毒核酸分子。如上所述,所述分离的病毒核酸分子可以是DNA或RNA。如果它们是RNA,则该方法包括从分离的病毒RNA产生双链DNA(例如dscDNA),例如使用逆转录并产生第二病毒核酸链。扩增(如使用PCR)病毒双链DNA(如dscDNA),并对扩增的病毒双链DNA进行定量。然后如上所述,从至少500pg扩增的病毒双链DNA中产生测序文库,进行测序,将得到的多个序列读序与参考序列比对,确定病毒来源治疗剂的序列,若有,鉴定序列变异(如突变)的存在。

[0015] 该方法还能够同期或同时测定至少两种不同的病毒来源治疗剂(例如2、3、4或5种不同的病毒来源治疗剂),例如通过使用“条码序列”或“标签”使其能够鉴别不同的病毒来源治疗剂。在一些实施例中,不同的病毒来源治疗剂是不同的病毒。在其他实施例中,不同的病毒来源治疗剂是相同的病毒,但是来自不同的来源(例如来自不同的MVB)。在这些实施例中,产生测序文库可以包括为每种病毒来源治疗剂产生一个或多个测序文库,其中一个或多个测序文库包含5'衔接子和3'衔接子,并且其中一个或多个测序文库中的每一个包括独特的识别用条码序列。合并一个或多个测序文库并测序。合并的原始序列数据集可以使用条码序列进行去重(demultiplex),从而为每个测序文库生成一个去重的原始序列数据集。每个去重的原始序列数据集可以与病毒来源治疗剂的适当参考序列比对。在一些实施例中,当将每个去重的原始序列数据集与病毒来源治疗剂的适当参考序列比对时,确定匹配序列读序的平均读取长度、匹配读序的百分比、覆盖度、SNP或其组合。当产生未匹配的序列读序时,可以将未匹配的序列读序添加到未匹配序列读序库中进行识别。根据匹配的序列读序,可以确定所分析的每种病毒来源治疗剂的序列,并且若有,鉴定序列变异(突变)的存在。

[0016] 在一些实施例中,从双链DNA(例如dscDNA)产生测序文库包括将双链DNA进行随机片段化处理以产生DNA(例如cDNA)片段,将5'衔接子和3'衔接子连接到DNA(例如cDNA)片段以产生衔接子连接的DNA(例如,cDNA)片段。在这样的方法中,将衔接子连接的DNA(例如cDNA)片段进行扩增以产生测序文库。测序文库可以进行克隆扩增,例如使用与5'衔接子和3'衔接子互补的引物(在一些实施例中,所述引物与固体表面或颗粒相连),由此产生克隆

扩增的测序文库。对克隆扩增的测序文库进行测序以产生包含多个序列读序的原始序列数据集。例如,可以使用与5'衔接子和3'衔接子互补的引物对克隆扩增测序文库进行测序。

[0017] 在一些实施例中,当产生匹配的序列读序时,确定匹配序列读序的平均读取长度、匹配读序的百分比、覆盖度、SNP或其组合。

[0018] 在一些实施例中,当产生未匹配的序列读序时,将未匹配的序列读序添加到未匹配的序列读序库中进行识别。

[0019] 在一些实施例中,所述方法包括报告病毒来源治疗剂与病毒来源治疗剂的参考序列相比的一致同源性、每个位置每种碱基的覆盖度、大于所确定读序百分比的异源碱基(例如,异源碱基,大于读序的0.1%)、InDel或其组合。

[0020] 在一些实施例中,在对病毒来源治疗剂进行分析之后,如果所确定的病毒序列变体是非禁忌性的(例如,如果没有检测到会导致毒性表型的突变),所述方法还包括向对象施用经测序的病毒来源治疗剂。

[0021] 从参照附图进行的以下详细描述中,本申请的前述内容和其他目的和特征将变得更加显著。

## 附图说明

[0022] 图1是深度测序数据分析的一个实施例的流程图。

[0023] 图2显示了PVS-RIP0疫苗批次稀释文库的比对统计。显示参考序列的估计覆盖度。

[0024] 图3是PVP-RIP0疫苗批次100pg样品的读序长度示例图。

[0025] 图4是PVP-RIP0疫苗批次(毒理学批号L0603006) 100pg样品的覆盖示例图。

[0026] 图5A-500显示了主病毒种子库批次(SEQ ID NO.80)的变种。

[0027] 图6显示了PVSRIPO主要病毒库批号L0403006的覆盖深度。

[0028] 图7显示了PVSRIPO最终分装产品批号L0904010的覆盖深度。

[0029] 图8显示了PVSRIPO参考标准批号L1310001的覆盖深度。

[0030] 图9显示了PVSRIPO纯化无菌散装批号L1405001的覆盖深度。

[0031] 图10显示PVSRIPO最终分装产品批号L1402001的覆盖深度。

[0032] 图11显示了PVSRIPO主要病毒库批号L131100的覆盖深度。

[0033] 序列表

[0034] 使用37C.F.R. §1.822中定义的氨基酸的三字母代码和核苷酸碱基的标准字母缩写显示氨基酸和核酸序列。各核酸序列只显示一条链,但通过参考所显示的链,互补链被理解为包括在内。2016年7月29日生成并递交的序列表(24.3kb)作为参考并入文本。

[0035] SEQ ID NOS:1-79是用于测序试验的核酸引物序列。

[0036] SEQ ID NO.:80是PVS-RIP0主病毒种子批号L0403006病毒同源序列。末端3'端的碱基(29)缺失,而5'大部分碱基(位置#1)不正确,可能是由于引物碱基的错误。

## 具体实施方式

[0037] 除非另有说明,否则根据常规用法使用技术术语。分子生物学常用术语的定义可见于:Benjamin Lewin,基因七(Genes VII),牛津大学出版社出版,1999;Kendrew等人(编),分子生物学百科全书(The Encyclopedia of Molecular Biology),布莱克威尔科学

公司(Blackwell Science Ltd.)出版,1994;以及Robert A.Meyers(编辑),分子生物学和生物技术:综合案头参考(Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference),VCH出版公司出版,1995;和其他类似的参考文献。

[0038] 如本申请所使用的,除非上下文另有明确指示,否则单数形式“一”、“一个”和“该”是指单数以及复数形式。如本申请所使用的,术语“包含”意思是“包括”。因此,“包含核酸分子”是指“包括核酸分子”而不排除其他元素。应进一步理解的是,除非另有说明,给出的核酸的任何和所有碱基大小都是近似的,并且是为了描述的目的而提供。虽然可以使用与本申请描述的那些类似或等同的许多方法和材料,但是特别合适的方法和材料如下所述。数值范围的叙述仅仅意图作为单独指代落入该范围内的每个单独值的速记方法,除非在此另外指出,并且每个单独的数值被合并到说明书中,就好像其在本文中单独列举一样。所有范围的端点都包含在该范围内并可独立组合。本文所述的所有方法可以以合适的顺序执行,除非在本文中另外指出或与上下文明显矛盾。如有冲突,以本说明书,包括对术语的解释为准。另外,这些材料,方法和实施例仅是说明性的而不是限制性的。包括专利申请和专利在内的所有参考文献以及与列出的GenBank®登录号(截至2016年7月29日)相关的序列通过引用并入本申请。

[0039] 为了便于审阅本公开的各种实施方式,提供对特定术语的以下解释:

[0040] 3'端:核苷酸的末端,其在3'端的残基未结合有核苷酸。

[0041] 5'端:核苷酸序列的末端,其在5'端位置的残基未结合有核苷酸。

[0042] 佐剂:当与免疫原性剂(例如使用所公开的方法分析的病毒)组合使用时,增加或以其它方式改变或修饰所得免疫应答的化合物、组合物或物质。在一些实施例中,佐剂增加免疫原性试剂在对象中诱导的抗体滴度。在另一个实施例中,如果抗原剂是多价抗原剂,则佐剂会改变对象中诱导的抗体特异性结合的特定表位序列。

[0043] 示例性的佐剂包括但不限于弗氏不完全佐剂(Freund's Incomplete Adjuvant, IFA)、弗氏完全佐剂、B30-MDP、LA-15-PH、油佐剂(montanide)、皂苷、铝盐如氢氧化铝(Amphogel,惠氏实验室(Wyeth Laboratories),麦迪逊(Madison),新泽西(NJ))、明矾、脂质、匙孔血蓝蛋白、血蓝蛋白、MF59微乳、分枝杆菌抗原、维生素E、非离子嵌段聚合物、胞壁酰二肽、聚阴离子、两亲物质、ISCOM(免疫刺激复合物,如欧洲专利EP 109942公开的那些)、植物油、卡波姆(Carbopol)、氧化铝、油乳(例如Bayol F或Marcol 52)、大肠杆菌热不稳定毒素(LT)、霍乱毒素(CT)及其组合。

[0044] 在一个实施例中,佐剂包括刺激免疫激活的DNA基序,例如T细胞、B细胞、单核细胞、树突状细胞和天然杀伤细胞的先天性免疫应答或适应性免疫应答。刺激免疫激活的DNA基序的具体非限制性实施例包括CG寡聚脱氧核苷酸(如美国专利号6,194,388、6,207,646、6,214,806、6,218,371、6,239,116、6,339,068、6,406,705和6,429,199所描述)以及IL-2或其他免疫调节剂。

[0045] 给药:通过任何有效的途径向对象提供或给予试剂,如使用所公开的方法纯化的病毒。示例性的给药途径包括但不限于注射(例如皮下、肌内、真皮内、腹膜内、瘤内和静脉内)、口服、经皮、鼻内和吸入途径。

[0046] 扩增核酸分子:为增加核酸分子如病毒RNA或DNA的拷贝数。所得到的产物被称为扩增产物或扩增子。体外扩增的例子是聚合酶链式反应(PCR),其中在可使引物与样品中核

酸分子杂交的条件下将样品(如含有病毒核酸分子的样品)与一对寡核苷酸引物接触。所述引物在合适的条件下延伸,与模板解离,然后再退火、延伸和解离以扩增核酸分子的拷贝数。

[0047] 减毒病原体:在保持刺激如天然病原体免疫应答能力的同时,具有降低或减弱的产生疾病的能力的病原体。在另一个实施例中,通过在某些生长条件下选择无毒变体来减弱病原体(例如参见Sabin和Boulger. *J. Biol. Tstand.* 1:115-8;1973;Sutter等人,2003. *Poliovirus vaccine*-在SA Plotkin和WA Orenstein(编), *Vaccines*, Fourth编. WB桑德斯公司,费城(WB Saunders Company, Philadelphia))。减毒病原体的一个例子是萨宾脊髓灰质炎病毒。

[0048] 接触:直接物理接触方式放置,包括固体或液体形式。接触可以发生在体外或离体,例如通过向样品(如含有表达病毒模板质粒的细菌细胞的样品)中加入试剂,或者向对象体内施用(例如将用所公开方法分析的病毒进行施用)。

[0049] 有效量:足以实现有益的或期望的结果(例如保护性免疫应答,例如抗癌应答)的药剂(例如使用所公开的方法分析的病毒)的量。

[0050] 治疗有效量可根据以下一项或多项而变化:正在治疗的对象和疾病状况、对象的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式等,其可由本领域普通技术人员容易确定。有益的治疗效果可以包括通过诊断确定;改善疾病、症状、障碍或病理状况;减少或预防疾病、症状、障碍或病症的发作;并且通常减轻疾病、症状、病症或病理状态。在一个实施方式中,(例如使用所公开的方法分析的病毒的)“有效量”是足以降低肿瘤(例如成胶质细胞瘤)的体积/大小、肿瘤重量、转移瘤数目、减少转移瘤的体积/大小、转移瘤的重量或其组合,例如减少至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%或至少99%(与未施用治疗剂相比)。在一个实施方式中,(例如使用所公开方法分析的病毒的)“有效量”是足以增加体内免疫应答的量,例如对免疫原特异性抗体的产生增加至少10%、至少20%、至少25%、至少50%、至少70%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少100%至少200%、至少300%、至少400%、至少500%或至少600%(与未施用治疗剂相比)。

[0051] 宿主细胞(HC):可以在其中繁殖载体并表达其核酸的细胞。所述细胞可以是原核或真核的。该术语还包括目标宿主细胞的任何后代。因此,宿主细胞可以是转基因的,因为它们包括已被引入细胞的核酸分子,如病毒模板质粒核酸分子。在一个实施例中,所述宿主细胞是病毒(如PVS-RIP0)增殖的细胞(如哺乳动物细胞)。病毒在宿主细胞中的增殖可以用于生产病毒材料(例如,用于生产PVS-RIP0的Vero细胞),或者在一些情况下用于蛋白质表达。例如,重组杆状病毒可用于昆虫细胞中的重组蛋白表达(“杆状病毒表达系统”)。当病毒宿主细胞是生物体的一部分时,病毒增殖可以在体内或体外发生,例如在细胞培养中。

[0052] 免疫应答:免疫系统细胞如B细胞、T细胞、巨噬细胞、单核细胞或多形核细胞在对象中对免疫原性试剂(如使用所公开的方法分析的病毒)的反应。免疫应答可以包括涉及宿主防御应答的任何身体细胞,例如分泌干扰素或细胞因子的上皮细胞。所述免疫应答包括但不限于先天性免疫应答或炎症。

[0053] 应答可以对特定抗原,如脊髓灰质炎病毒是特异性的(“抗原特异性应答”)。在一个特定的例子中,免疫应答是T细胞应答,例如CD4+应答或CD8+应答。在另一个实施例中,应

答是B细胞应答,并且导致产生针对免疫原性试剂的特异性抗体。

[0054] 在一些实施例中,这样的免疫应答为对象提供免疫原性试剂或免疫原性试剂来源的保护。例如,应答可以保护诸如人类或兽医主体的对象免于病原体的感染,或者干扰病原体感染的进展。免疫应答可以是主动的并涉及对对象免疫系统的刺激,或者是由被动获得的免疫力产生的应答。

[0055] 增加或减少:与对照值(例如代表无治疗剂的值)相比在数量上分别具有统计学显著的正或负变化。增加是正变化,例如与对照值相比增加至少50%、至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。减少是负变化,例如与对照值相比减少至少20%、至少25%、至少50%、至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、或至少100%。在一些示例中,减小量小于100%,例如减少不超过90%,不超过95%或不超过99%。

[0056] 分离的:“分离的”生物组分(如使用所公开的方法产生和分析的病毒)已经与含有该组分的细胞或培养基中的其它生物组分如其他核酸分子和蛋白质(例如宿主细胞染色体和染色体外DNA和RNA以及蛋白质)基本分离、从其分离产生或从其纯化。在一些实施例中,使用所公开的方法分析的分离的病毒至少50%纯,例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、至少99.9999%或至少100%纯,例如通过残余宿主细胞(HC)DNA测量的。在一些实施例中,使用所公开的方法纯化的分离的病毒或使用所公开的方法扩增的病毒模板质粒在通过残余HC蛋白质(HCP)测量时具有较低的纯度,如至少3%纯,至少4%纯或至少5%纯(例如3-4%纯),例如当需要总PFU增加时。即使在约3%的蛋白质纯度下,HCP的水平在治疗产品的可接受范围内。在一些实施例中,使用所公开的方法分析的分离的病毒当通过残余HCP测量时为至少50%纯,例如至少75%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或至少99.9999%纯。

[0057] 主细胞库(MBC):一细胞群,其可通过用于生产材料(如生产疫苗,如脊髓灰质炎病毒)来源的单个克隆而建立。在一些实施例中,MCB的细胞包括质粒或载体,如编码脊髓灰质炎病毒的病毒模板质粒或脊髓灰质炎病毒,或包括病毒(因此可称为主病毒库,MVB)。来自MCB的细胞被扩增以形成工作细胞库(WCB)。MCB和WCB为创建细胞库提供了灵活而实用的方法。例如,在第一阶段,生长、收获、汇集并冷冻少量的细胞以产生MCB,例如含有10至20个小瓶。然后,从这个主库存,解冻并培养一个小瓶(一到两代),直到有足够的细胞产生最初的WCB,例如包含10至20个小瓶。可以使用本文的方法分析MCB和WCB,例如鉴定MCB和WCB不含有突变(例如可能导致不需要的毒性病毒)。

[0058] 下一代基因测序:也称为大规模平行测序或深度测序,描述了对数百万个小核酸片段(例如DNA)平行进行测序的核酸测序技术。使用生物信息学分析将这些片段拼接在一起,通过将各个读序映射到参考基因组。NGS是非选择性的,因此可以无偏倚地分析基因组。该方法通常包括使用DNA聚合酶,其在DNA合成的连续循环期间催化将荧光标记的dNTP掺入DNA模板链中。在每个循环中,在掺入点,通过荧光激发来鉴定核苷酸。数百万的片段以大规模并行的方式进行测序。这种方法的例子包括但不限于:那些来自于依诺米那(Illumina)(例如,通过合成测序(SBS))、粒子激流公司(Ion Torrent)(例如来自赛默飞世尔(ThermoFisher Scientific))、Solexa®测序、454®测序、链终止测序,染料终止测序或焦磷酸测序。在一些实施例中,使用单分子测序。

[0059] 药学上可接受的载体:用于本发明药学上可接受的载体是常规的。雷明顿药物科

学(Remington's Pharmaceutical Sciences), E.W.Martin著, 麦克出版公司, 伊斯顿, 宾夕法尼亚州, 第15版(1975)描述了适用于药物递送使用所公开的方法纯化的病毒的组合物和制剂。

[0060] 通常, 载体的性质取决于所采用的特定给药模式。例如, 胃肠外制剂通常包含可注射流体, 其包括药学上和生理上可接受的流体, 例如水, 生理盐水, 平衡盐溶液, 葡萄糖水溶液, 甘油等作为媒介物。除生物学中性载体外, 待施用的药物组合物可以包含少量的无毒辅助物质, 例如润湿剂或乳化剂, 防腐剂和pH缓冲剂等, 例如乙酸钠或山梨糖醇酐单月桂酸酯。

[0061] 脊髓灰质炎病毒(PV): 小儿麻痹症(脊髓灰质炎)病原体小核糖核酸病毒科的肠道病毒。脊髓灰质炎病毒有三种血清型。示例性的脊髓灰质炎序列提供于Toyoda等, J.Mol.Biol.174:561-85, 1984(在此通过引用并入本申请)。

[0062] 脊髓灰质炎病毒的非天然形式包括重组溶瘤性脊髓灰质炎病毒PVS-RIP0和减毒萨宾口服脊髓灰质炎疫苗(OPV), 并且可以使用所公开的方法分析。PVS-RIP0是一种重组的非致病性减毒活溶瘤病毒, 含有口服脊髓灰质炎病毒萨宾1型, 其中内部核糖体进入位点(IRES)被来自人类鼻病毒2型(HRV2)的IRES取代, 具有潜在的抗肿瘤活性(参见例如Brown等, 肿瘤“Cancer”120:3277-86, 2014和Goetz等, 细胞因子生长因子综述“Cytokine Growth Factor Rev.”201021(2-3):197-20)。OPV包括57个核苷酸替换, 其区分减毒Sabin 1毒株和其毒性亲本(马奥尼(Mahoney)血清型), 两个核苷酸替换减弱了萨宾2毒株, 并且在减毒萨宾3毒株中有10个替换。

[0063] 所有三种萨宾疫苗常见的主要减毒因子是位于病毒内部核糖体进入位点(IRES)的突变, 其改变了茎环结构, 并降低了脊髓灰质炎病毒在宿主细胞内翻译其RNA模板的能力。示例萨宾序列提供于基因库登录号E01572.1、E01571.1和E01570.1, 以及Nomoto等人, Proc Natl Acad Sci U SA.79(19):5793-5797, 1982。

[0064] PV的另一种形式是由Jonas Salk博士开发的化学灭活脊髓灰质炎疫苗(IPV)。这基于三个毒株马奥尼(1型脊髓灰质炎病毒), MEF-1(2型脊髓灰质炎病毒)和Saukett(3型脊髓灰质炎病毒)。这些PV毒株可以使用所公开的方法分析。

[0065] 纯化的: 术语纯化的不要求绝对纯度; 相反, 它只是一个相对的术语。因此, 例如, 纯化病毒制剂是其中病毒比病毒在宿主细胞或宿主细胞提取物中更富集的制剂。在一个实施例中, 纯化制剂使得纯化的病毒占制剂总核酸含量的至少50%。在其它实施例中, 在与其它制剂成分如药物载体, 赋形剂, 缓冲剂, 吸收增强剂, 稳定剂, 防腐剂, 助剂或其它联合成分混合之前, 病毒被纯化到如下程度: 在纯化的制剂中存在至少60%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或甚至至少99%的所有大分子物质。在一些实施例中, 纯化的制剂基本上是均匀的, 其中其它大分子物质不能通过常规技术检测到。这种纯化的制剂可以包括与活性剂共价结合的材料, 例如与活性剂混合或偶联的材料, 其可以是期望产生活性剂的修饰衍生物或类似物或产生组合的治疗制剂或偶联物。

[0066] 重组: 重组核酸分子是具有非天然存在的序列或具有通过将两个分开的序列片段人工组合成的序列的核酸分子。这种人工组合可以使用常规方法完成, 例如通过化学合成或通过人工操作分离核酸片段, 例如通过基因工程技术, 如Sambrook等人(编辑), 分子可控: 实验手册“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 第2版, 1-3卷, 冷泉港实验室出

版社,冷泉港,纽约,1989。术语重组包括仅通过添加,取代或缺失部分核酸分子而改变的核酸分子。类似地,重组蛋白质是由重组核酸分子编码的蛋白质。重组病毒包括其基因已被构建和/或置于非天然环境中的基因,例如用于表达,例如使用重组工程技术。

[0067] 对象:脊椎动物,例如哺乳动物,例如人。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿猴、人类、农场动物、运动动物和宠物。在一个实施方式中,对象是非人哺乳动物对象,如猴或其他非人灵长类动物、小鼠、大鼠、兔、猪、山羊、绵羊、狗、猫、马或牛。在一些实施例中,对象患有可使用所公开的方法分析的脊髓灰质炎病毒治疗的肿瘤,例如成胶质细胞瘤。在一些例子中,对象是实验室动物/生物体,如小鼠,兔子或大鼠。

[0068] 转化或转染:病毒或载体在将核酸转移到宿主细胞中时“转化”或“转导”宿主细胞。当DNA被细胞稳定复制时,通过将核酸掺入到细胞基因组中,或通过游离型复制,通过核酸转导到细胞中细胞被“转化”或“转染”。

[0069] 许多转染方法是本领域技术人员已知的,例如:化学方法(例如磷酸钙转染),物理方法(例如电穿孔,显微注射,粒子轰击),融合(例如脂质体),受体介导的胞吞作用(例如DNA-蛋白质复合物,病毒包膜/衣壳-DNA复合物)和通过病毒如重组病毒的生物感染(Wolff,JA编,基因治疗“Gene Therapeutics”,Birkhauser,波士顿,美国1994)。在被逆转录病毒感染的情况下,感染的逆转录病毒颗粒被靶细胞吸收,导致逆转录病毒RNA基因组的逆转录,并将所得前病毒整合到细胞DNA中。

[0070] 转基因:由载体提供的外源基因。在一个实施例中,转基因包括病毒模板序列,例如RNA病毒的病毒DNA模板序列,例如脊髓灰质炎(天然脊髓灰质炎病毒或非天然存在的脊髓灰质炎病毒)。

[0071] 治疗的,治疗和疗法:减轻或改善损伤、病理或病症的任何成功或成功标志,包括任何客观或主观的参数,如消除、缓解、减轻症状或使病况对患者更可耐受,表现为退化或衰退速度减慢,使退化的最终点弱化,改善对象的身体或精神状况,或延长生存期。治疗可以通过客观或主观的参数来评估,包括体格检查、血液和其他临床检查的结果等。在一些实施例中,用所公开的PV结果治疗导致肿瘤(例如,脑肿瘤)的数量、体积和/或重量和/或转移瘤的减少。

[0072] 在足以……的情况下:用于描述能够进行所需活动的任何环境的短语。在一个实施例中,期望的活动是通过病毒模板质粒转化宿主细胞,或这种转化的宿主细胞的生长。在一个实施例中,所需活动是例如使用下一代测序对靶病毒核酸分子进行的测序。在一个实施例中,期望的活动是体内治疗肿瘤和/或刺激免疫应答,例如采用使用所公开的方法纯化的病毒。

[0073] 疫苗:可以施用于动物或人以赋予针对疾病或其他病理状况的免疫力,例如主动免疫力的免疫原性组合物。疫苗可以预防性或治疗性使用。因此,可以使用疫苗来降低感染的可能性或降低疾病或病症症状的严重程度或限制疾病或病症的进展。在一个实施例中,疫苗包括使用所公开的方法纯化的一种或多种病毒(例如,天然脊髓灰质炎病毒或非天然存在的脊髓灰质炎病毒)。

[0074] 载体:一种核酸分子,引入到宿主细胞中,由此产生转化的宿主细胞。载体可以包括允许其在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体还可以包含一种或多种治疗性基因或选择标记基因以及本领域已知的其它遗传元件。载体可以转导、转化或感染细胞,



由此使得细胞表达除细胞天然核酸分子或蛋白以外的核酸分子或蛋白。载体任选地包括有助于实现核酸进入细胞的材料,例如病毒颗粒、脂质体、蛋白质涂层等。在一个实施例中,载体是质粒,如细菌质粒。

#### [0075] 概况

[0076] 在病毒来源治疗剂工业中,长期以来需要鉴定方法,以替代目前使用的猴神经毒力安全性试验(MNVT)方法和基于噬菌斑的测序方法(例如通过PCR和限制酶切割的突变分析(MAPREC))。例如,2010年瑞士日内瓦召开的WHO工作组关于修订WHO关于生产和控制脊髓灰质炎疫苗(口服)建议的讨论(见Vaccine 29(2011)6432-6436)指出,动物模型中特定突变的减毒效果可以取决于物种、遗传背景和接种途径,因此对人类进行的外推是不确定的。另外,MAPREC试验是一项非常费力的试验,所需的放射性同位素使用增加了它的技术难度,不同的实验室在试验的各个方面都有问题。目前用于测试或验证病毒来源治疗剂的神经毒力测试方法是昂贵且耗时的。此外,在本领域中,还不清楚目前使用的测定与评估人类神经毒力潜力是否有关。WHO工作组建议开发新的脊髓灰质炎疫苗质量控制技术。本文所述的方法提供了用于RNA病毒来源治疗剂、特别是疫苗的改进的有效/安全性测试方法,并且因此提供了在工业中长期需要的解决方案。所公开的方法目前正在请求US-FDA的批准。一旦获得该批准,则该方法将得到成功商业化。

[0077] 在疫苗接种者上生长以及在细胞培养物中繁殖期间,高神经毒力突变体的聚积已经导致了对神经毒力测试的需求,特别是病毒种子库的需求。目前,执行的是猴神经毒力安全性测试(MNVT)程序。简而言之,在MNVT程序中,取来自一批疫苗产品的样品,例如,注射到猕猴(Macaca)或长尾猴(Cercopithecus)的中枢神经系统的腰部区域,椎管内接种。一般来说,用11-18只猴子来评价疫苗制剂,还有11-18只猴子作为对照。在17-24天内观察猴子的病毒感染临床症状,例如脊髓灰质炎。所有在观察期存活的猴子都被安乐死,并进行分析处理,包括脑和脊髓组织病毒特异性病变的组织病理学评估。几乎没有证据支持MNVT试验评估人类的神经毒力潜力的相关性,特别是在脊髓灰质炎病毒的情况下(Rubin,“Toward replacement of the monkey neurovirulence test vaccine safety testing”, Procedure in Vaccinology,5,261-265(2011))。此外,这项检测费时费钱,而且结果也不可靠。例如Rubin认为,通过MNVT检测的腮腺炎疫苗与接种疫苗个体的脑膜炎有因果关系。

[0078] 除了MNVT程序之外,基于噬菌斑的测序方法也被用于评估多批RNA病毒来源治疗剂。通过PCR和限制性酶切(MAPREC)法进行的突变体分析用于确定病毒RNA中给定位点处的单个碱基突变的比例。如果该位点突变的计算值大于可接受的值,则单价散装疫苗(例如口服脊髓灰质炎疫苗)将不能通过MAPREC试验。在3型脊髓灰质炎病毒疫苗中,病毒RNA 5'NCR中第472位的U到C的突变与猴体内病毒的神经毒性直接相关。在1型和2型口服脊髓灰质炎疫苗中,5'NCR内存在突变,当在人肠道或细胞培养中传代时,突变则迅速恢复。这些包括1型碱基位置480G→A和525U→C和2型碱基位置481A→G。据信,当在病毒群体中高比例存在或通过与病毒基因组内其他突变进行相互作用时,这些突变导致了神经毒性的增加。有趣的是,当这些突变以通常在疫苗批次中发现的水平存在时,已经确定与猴子内的毒力无关。(世界卫生组织,“标准操作程序:用于口服脊髓灰质炎病毒(萨宾)疫苗1,2或3型的PCR和限制性酶切割(MAPREC)的突变分析”,第5版(2012))。因此,开发了用于1型和2型口服脊髓灰质炎疫苗的MAPREC测试来测量疫苗产品的一致性。然而,MAPREC测试仅限于确定已知含有

减毒标记的少量基因座 (Rubin, “朝向神经毒力测试疫苗安全测试的猴子 (Toward for the monkey of neurovirulence test vaccine safety testing)”, *Vaccinology Procedia*, 5, 261-265页 (2011))。

[0079] 使用依诺米那深度测序方案对7批单链RNA病毒PVSRIPO进行了分析。这些批次包括2004年生产的原始主病毒库 (MVB, 批号#L0403006) 和来源于2004年MVB的病毒产品批次, 包括非临床毒理学批次, 自2009年起的临床一阶段批次, 2014年制备的临床原料药和药物产品批次以及参考标准批次。依诺米那深度测序还在2013年利用质粒体外转录和转染在第二个MVB批次 (MVB, 批号#L1311002) 上进行。出乎意料的是, 所有检查的批次在整个嵌合病毒基因组上具有有限的序列微异质性, 平均读取深度超过每个碱基 $2 \times 10^5$ 。除了远端5'端 (脊髓灰质炎病毒中已知的超可变区域) 之外, 所观察到的序列变异与标准参考序列相比, 显示出的异质性碱基均 $<1\%$ ; 在多批PVSRIPO中仅重复观察到5个多态性位置。在所有的测试批次中, 观察到这五个异质位置及其相关的碱基变体模式是一致的。这表明, PVSRIPO临床批次中所存在的有限变异来源于最初存在于亲本MVB批次中的变异, 或可能代表在病毒复制或cDNA测序期间聚合酶错误掺入的优选模式。用于通过体外转录 (IVT) 产生MVB的质粒DNA可能是在七个PVSRIPO批次中观察到的碱基变异模式的第三个来源。PVSRIPO的深度测序验证了先前的分析和神经毒性数据, 这些数据表明PVSRIPO是个出乎意料的稳定单链RNA病毒。第二MVB批PVSRIPO (批号L1311002) 呈现低水平的序列微异质性, 并且观察到的序列变异模式与早期2004年的MVB批次及其随后的临床批次一致。

[0080] 本发明的方法不同于分析病毒来源治疗剂 (例如, 病毒种子库、收获物和纯化的药物产品批次, 例如主病毒种子库批次和工作细胞库批次) 的其它方法, 以确定整个病毒基因组中几乎所有潜在基因突变的存在和频率。例如, Neverov和Chumakov (PNAS 107:20063-8, 2010) 提供了测序方法来分析口服脊髓灰质炎病毒疫苗。Chumakov实验室开发了目前用于分析脊髓灰质炎疫苗批次的MAPREC方法。正如该文引言中指出的那样, 作者承认MAPREC方法的局限性, 比如它有限的的能力仅监测少数已知含有减毒标记和其它位点缺失突变的基因座。由于减毒的确定可能是未知的, 这限制了MAPREC方法的效用。该Neverov和Chumakov的参考文献提出了大量的平行测序方法来对活病毒疫苗进行测序。然而, 该文献未能提供关于病毒制备步骤的细节, 可能是因为使用了大量的高滴度培养物 (即澄清的上清液) 或“纯化的”疫苗批次 (病毒RNA从HeLa或Vero细胞的上清液获得)。也就是说, 作者在产生病毒RNA提取物时不受样本量的限制。相反, 本发明人发现需要DNA酶步骤来从主病毒库或工作细胞库样品中去除过量的宿主细胞核酸 (例如dsDNA), 以增加病毒核酸与宿主细胞核酸的比例 (这提供了更稳定的测序结果)。Neverov和Chumakov使用的PureLink病毒RNA试剂盒不包含DNA酶。

[0081] Hall等人 (J.Virol.Meth.195:194-204, 2014) 公开了使用离心、过滤和核酸酶处理来富集肠道病毒序列的方法。Hall等人教导了在提取核酸分子之前使用DNA酶, 由于在提取过程中去除了DNA酶, 因此在程序上更有效。相反, 本发明人发现, 通过在核酸与DNA酶接触之前提取核酸, 在提取和单独灭活后使用时, DNA酶反应的效率出乎意料地显著提高了。另外, 如Hall等人所教导的——在提取之前使用DNA酶, 却降低了提取过程的整体效率, 并且可以负面影响病毒RNA产量, 因为它会结合未包封的“游离”RNA。例如, 发明人在RNA提取后观察到使用DNA酶获得的病毒RNA的量增加了约2倍。Hall等人和Djikeng的论文完全依赖

于随机六聚体进行RT启动和/或扩增启动,这导致所有病毒序列两端覆盖深度的更大缺失。所公开的方法避免了单独使用的随机六聚体(对比与寡核苷酸(dT)和/或保守序列“全长”引物组合),因为其可能导致基因组内和末端的位置覆盖偏差而掩盖一些SNP。Djikeng等人提供了类似的方法(BMC Genomics 9:5,2008)。

[0082] 表1提供了将本发明公开方法与用于分析病毒来源治疗剂的其它方法进行比较的总结。

[0083] 表1:本发明公开方法与其它方法的比较

	本发明公开方法	Neverov 和 Chumakov	Hall等	Djikeng 等
[0084]	从主病毒库或工作细胞库的细胞内提取核酸	用 Purlink 病毒 RNA/DNA 微型试剂盒,从Hela或Vero细胞上清液中分离 RNA	将细胞培养物上清液进行离心、过滤,然后用DNA酶处理	将细胞培养上清液离心、过滤,然后在37℃下用 DNA 酶 (100U) 或 RNA 酶 (10ug/ml)处理 1小时
[0085]	将提取的核酸分子与 DNA 酶接触(例如37℃下30分钟)	无DNA酶	用PureLink病毒试剂盒提取RNA	分离 RNA 和 / 或DNA
	如果富集的病毒核酸分子是RNA,则产生双链cDNA	逆转录 RNA 并用 RNA酶H处理		将 RNA 逆转录为DNA
	对病毒双链DNA进行扩增和定量	PCR扩增cDNA	实时定量PCR,然后采用随机六聚体和RNA酶H消化进行逆转录	
	从至少 500pg 的病毒双链DNA产生序列库(酶法)	依诺米那 cDNA 机械剪切法		采用随机引物生成序列库
	采用NGS进行序列测序	采用大规模平行测序进行测序	采用 1 μ g DNA 进行宏基因组学测序	采用ABI 3730 x1序列系统的序列库

[0086] 分析病毒来源治疗剂的方法

[0087] 本发明描述的是使用下一代测序方法(例如,大规模平行测序),在体外快速并直

接筛选病毒来源治疗剂(例如,脊髓灰质炎和其它病毒疫苗产品)批次(例如,病毒种子库、收获物和纯化的药物产品批次,例如主病毒种子库批次和工作细胞库批次)的方法,用于测定整个病毒基因组中几乎所有潜在基因突变的存在及频率。与现有基于噬菌斑的测序方法相比,这种方法通常已经对于序列变体显示出几个数量级(通常 $\geq 4\log$ )更高的灵敏度,并且与通常需要几个月才能完成的灵长类神经毒性测试不同,其可以在1-2周内进行。此外,本发明报道的结果不能使用传统的Sanger测序方法获得,因为Sanger方法对所使用的引物序列的特异性有限,并且受限于其对总信号的约10-20%的检测灵敏度。换句话说,使用Sanger测序方法仅可以可靠地检测到整个样品中大于约10-20%构成的基因变体,并且通常只有那些在测序或PCR启动位点不存在的高频变体。

[0088] 本文所公开的测序方法不需要可能对测序结果造成偏倚的对靶病毒核酸具有特异性的测序或PCR引物。可以使用的测序方案如下:利用预扩增PCR引物和测序引物,其靶向于连接的5'-和3'-衔接子序列而不直接靶向于病毒cDNA序列(如依诺米那方案)。本发明所述方法在测序之前或在此期间减少了引物引起的偏倚(例如,隐藏在PCR起始位点发生的SNP和InDel),同时通过使用准随机cDNA片段保持重叠读取的优点。此外,本文所述的测序方法任选地使用最少量的靶向病毒来源治疗剂的PCR预扩增物,其中预扩增水平在后测序分析过程中容易补偿,其中使用较高的PCR循环同时降低了信噪比,但灵敏度阈值的增加可用于将假阳性结果的报告降到最低。该方法可以检测任何任意水平的序列变异(例如,已经达到了 $<0.0001\%$ 或PPM),并且仅受限于覆盖深度和/或样本中所存在的靶拷贝数。

[0089] 除了测试纯化的病毒之外,开发这种利用DNA酶方法的一种变化方式用于含有大量宿主细胞核酸的未纯化样品(例如来自MVB的粗制细胞培养物裂解物),对测定灵敏度和序列读取深度仅有很小的影响。一定样品体积中的背景质量和宿主细胞RNA和DNA的拷贝数可能比存在的病毒RNA的数量多几个对数值,由于在Sanger测序之前需要大量的预扩增(PCR循环),使得传统的Sanger测序方法不能实现或可能存在偏差。

[0090] 本文提供了测定病毒来源治疗剂是否存在病毒序列变体的方法。这些测序和筛选方法可用于分析多批病毒来源治疗剂(例如存在于MVB或WCB中的那些)以确定是否存在不需要的病毒序列变异(例如一个或多个核苷酸缺失、插入或取代)。可以使用所公开的方法分析的示例性病毒来源治疗剂的例子包括但不限于:病毒、病毒模板质粒或疫苗。可以使用本文公开的方法测序的示例性病毒来源治疗剂包括那些基于显示出高突变率的RNA病毒,例如脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、腮腺炎病毒、流感病毒、风疹病毒、HIV、HTLV等。可以用所公开的方法分析的示例性疫苗包括MMR(麻疹、腮腺炎、风疹)和MMRV(麻疹、腮腺炎、风疹、水痘)。在一个实施例中,RNA病毒来源治疗剂是疫苗,尤其是PVS-RIP0、活的减毒口服(萨宾)血清型1脊髓灰质炎疫苗,含有源于人类鼻病毒2型的异源内部核糖体进入位点。本发明公开的方法还能够一次分析多种病毒来源治疗剂,如通过使用多通道。

[0091] 所公开的方法包括从病毒种子库、收获物和纯化的药物产品批次(例如主病毒库(MVB)或工作细胞库(WCB))中提取(例如分离)核酸分子。可以使用本领域已知的方法从病毒种子库、收获物和纯化的药物产品批次中分离包含病毒基因组核酸(例如RNA)的核酸分子,例如市售可得的QIAamp®病毒RNA微型试剂盒(来自凯杰(Qiagen))。可以通过分光光度法或通过定量RT-PCR对总RNA进行定量。

[0092] 病毒种子库(例如MVB和WCB)包括含有病毒来源治疗剂的宿主细胞(例如大肠杆菌或其他细菌细胞及其不需要的宿主细胞基因组DNA和宿主细胞线粒体DNA)以及收获物(例如来自Vero细胞),可能包括不需要的宿主细胞基因组DNA和宿主细胞线粒体DNA。因此,在一些实施例中,待分析的病毒来源治疗剂存在于未经纯化的样品中,例如来自病毒种子库和收获物(例如MVB或WCB)的那些。在一个方面,病毒来源治疗剂的样品是未经纯化的样品,例如含有来自非病毒来源治疗剂来源的至少85%、至少90%或至少95%的总核酸,如宿主细胞基因组和线粒体DNA。在一个实施例中,所述方法包括用DNA酶对来自未纯化样品中分离的病毒基因组RNA进行处理,然后在从分离的病毒基因组RNA产生双链cDNA之前灭活DNA酶。DNA酶处理去除了游离DNA并且能够改进从目标病毒RNA的cDNA合成。在一个实施例中,所述方法包括用DNA酶处理来自未纯化样品中分离的病毒基因组DNA,然后灭活DNA酶并回收病毒基因组DNA。这种DNA酶处理除去了宿主细胞DNA,但能够回收病毒DNA(例如,若在衣壳中)。在一些实施例中,如果病毒来源治疗剂是DNA病毒,则可以在提取后使用合适的结构特异性核酸酶来代替DNA酶。在一些实施例中,如果病毒来源治疗剂是DNA病毒,则在核酸提取之前进行DNA酶处理。在一些实施例中,在提取核酸之前和之后进行DNA酶处理。

[0093] 在其他实施例中,待分析的病毒来源治疗剂存在于纯化的样品中,例如来自纯化的药物批次的那些。纯化的样品包括例如临床批次的疫苗。纯化样品通常含有来自RNA病毒来源治疗剂的总核酸超过70%,通常超过95%。在一些实施例中,这种纯化的样品不需要DNA酶处理。在一个实施例中,将纯化的样品中存在的病毒来源治疗剂的序列与先前从未经纯化的样品(例如,处理的较早阶段)获得的病毒来源治疗剂的序列进行比较。因此,所公开的方法可以包括使用本发明提供的方法分析未纯化样品中的病毒来源治疗剂,然后使用本发明提供的方法分析纯化样品中的病毒来源治疗剂。这使得人们能够确定在病毒来源治疗剂的制造期间病毒来源治疗剂的序列是否改变。

[0094] 由于在未纯化的样品中得到的提取样品中存在不需要的宿主细胞基因组DNA和宿主细胞线粒体DNA,提取的(例如分离的)核酸分子在基本上消化宿主细胞基因组DNA和宿主细胞线粒体DNA、但基本不消化所需的病毒核酸分子(如病毒基因组RNA或DNA,或病毒模板质粒)的条件下与DNA酶一起温育(例如接触)。这种条件的例子有:在37℃下至少10分钟(如至少15、至少20或至少30分钟)。在另一个实施例中,所述条件是在2℃至40℃下至少10分钟(如至少15分钟、至少20分钟、至少30分钟、至少60分钟、至少120分钟或至少180分钟)(较低的温度通常需要较长的温育时间)。如果使用热稳定的DNA酶,则样品可以在40℃以上温育。在一些实施例中,将提取的或分离的核酸分子与DNA酶一起孵育少于1小时,如少于45分钟,或不多于30分钟,如10-30分钟。在一些实施例中,将提取的或分离的核酸分子与少量的DNA酶一起温育,例如小于10U (2U/uL)、小于5U (2U/uL)、例如1U至10U (2U/uL) 或1U至5U (2U/uL),如4U (2U/uL)。令人惊讶的是,发现DNA酶未显著降解病毒RNA,尽管DNA酶具有一些RNA酶活性。DNA酶的存在增加了所需的病毒来源治疗剂核酸与不需要的宿主细胞核酸的信号:噪声比。在一些实施例中,DNA酶处理后需要的病毒来源治疗剂核酸的纯度为至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。在一些实施例中,在DNA酶处理期间降解的病毒来源治疗剂核酸的量小于10%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、小于1%或小于0.5%。在一些实施例中,在DNA酶处理过程中降解的宿主细胞核酸的量为至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或者至少95%。

[0095] 所得富集的病毒核酸分子可以是DNA或RNA。如果它们是RNA,则该方法包括从富集的病毒RNA产生双链(ds)DNA(例如dscDNA),例如通过采用逆转录并产生第二病毒核酸链。例如,来自生命技术公司(Life technologies)的ThermoScript™系统可以与寡聚(dT)<sub>x</sub>引物(如寡聚(dT)<sub>20</sub>引物和dNTP)一起使用来产生cDNA。在另一个实施例中,利用SMARTScribe系统(具有来自克隆技术公司(Clontech)的SMARTer寡聚IIA和寡聚(dT)<sub>x</sub>引物)从低病毒拷贝样品产生cDNA。可以添加RNA酶H以去除RNA/DNA杂合体。然后可以定量cDNA,例如分光光度法。第二链DNA的合成可以通过本领域已知的方法进行,例如来自新英格兰生物实验室(New England Biolabs)的NEBNext®第二链合成试剂盒。QIAquick®PCR纯化试剂盒可用于纯化ds cDNA,然后可以对其进行定量,如分光光度法。可以扩增(例如使用PCR)病毒双链DNA(例如,dscDNA)(不管是从宿主细胞中产生还是直接提取),并且可通过例如分光光度法定量扩增的病毒双链DNA。

[0096] 然后从至少500pg ng(例如至少1ng、至少2ng、至少5ng、或至少10ng)扩增的病毒双链DNA(例如ds cDNA)产生测序文库,例如500pg至1ng、500pg至5ng、500pg至10ng或1ng至5ng扩增的病毒ds DNA。测序文库包括连接到病毒双链DNA上的5'-衔接子和3'-衔接子(例如,病毒双链DNA片段具有与其连接的5'-衔接子和3'衔接子)。测序文库的产生可以通过随机片段化dsDNA(例如,ds cDNA)从而产生DNA(例如,cDNA)片段,将5'衔接子和3'衔接子连接到DNA(例如,cDNA)片段以及扩增(例如,克隆扩增)衔接子连接的DNA(例如cDNA)片段。在这样的方法中,衔接子连接的DNA(例如cDNA)片段得以扩增以产生测序文库。在一个实施例中,使用与5'-衔接子和3'-衔接子互补的寡核苷酸(其中所述引物可以连接至固体表面或颗粒,例如表面结合或颗粒结合)进行扩增以产生克隆扩增的测序文库。测序文库的DNA(例如cDNA)片段通常具有200至400个碱基对的大小。片段化dsDNA(例如,ds cDNA)和连接5'-和3-衔接子可以使用Illumina®Nextera®“标签化(tagmentation)”进行。在“标签化”过程中,片段化(例如酶促切割)双链DNA(例如双链cDNA)并用衔接子序列对片段进行标签化在一个步骤中进行。片段化和连接也可以通过不连续的步骤完成。将衔接子连接到ds DNA(例如ds cDNA)后,可以灭活DNA连接酶。因此测序文库是随机片段化的双链DNA分子,其在3'和5'端连接到衔接子序列。使用标签化过程可以更好地控制片段长度,同时提高样品收率。反过来,这可以实现更好的回收率和更大的潜在读取深度和样本覆盖度。标签化方法比动力学碎片化方法还更具有重现性。

[0097] 5'和3'衔接子的具体设计取决于要使用的NGS平台。衔接子序列提供了已知的序列组合,其能,例如使随后的文库扩增或测序引物退火。作为衔接子,可以使用已知序列的双链或部分双链核酸。衔接子可以具有钝端,具有3'或5'突出端的粘性端,可以由Y形衔接子或通过茎环形衔接子来提供。Y形衔接子如美国专利号7,741,463所述,茎环形衔接子如在US2009/0298075中所述,关于衔接子的具体设计通过引用并入本文。示例性衔接子具有至少7个、至少10个或至少15个碱基,例如10-100个碱基,15-75个碱基或20-60个碱基的长度。片段的3'和5'末端可以使用相同或不同的衔接子。对于两端使用相同类型的衔接子,例如Y形或茎环形衔接子,具有以下优点:由于衔接子错配而在文库制备期间没有片段丢失,这对于使用少量DNA时是有利的。

[0098] 一旦产生了标记的片段,就执行扩增步骤。使用最小量的目标病毒PCR预扩增可以提高信噪比并提高灵敏度阈值,以使假阳性结果报告最少。在测序后分析的过程中,扩增的

变化可以很容易地得到补偿。在一个实施例中,采用10至15个循环,例如12个循环的PCR扩增。任选地,在扩增期间,将条码序列添加到DNA(例如cDNA)片段中。条码序列是可用于鉴定原始样本的特定DNA序列。条码序列可以用来去重或区分来自不同样品的序列读序。条码序列的使用还能够用计算机进行连接分析两批或更多批次并对其进行直接批内比较等。独特的条码序列的使用也可以用来快速识别来自先前或伴随研究的实验室交叉污染。

[0099] 一旦产生测序文库并任选地对其进行条码序列化,则对测序文库进行克隆扩增,例如使用与5'衔接子和3'衔接子互补的表面结合或颗粒结合的寡核苷酸进行。在Illumina®方案中,克隆扩增使用了与5'衔接子和3'衔接子互补的寡核苷酸的桥扩增,所述寡核苷酸与流动细胞表面结合(例如附着)。因此模板簇直接在流动细胞上形成。在Ion Torrent PGM™方法中,文库片段克隆扩增到微珠上。

[0100] 然后使用NGS技术(例如,使用平行单端或双端测序)对产生的克隆扩增测序文库进行测序以产生包含多个序列读序的原始序列数据集。也就是说,克隆扩增的文库片段或来自多个文库的片段是通过平行合成进行的测序。一方面,使用平行两端测序。在双端测序中,对同一片段的两端进行测序。在Illumina®协议中,完成第一次读取后,克隆簇被原位修饰以再生模板用于成对读取。成对读取比单读取产生更大的基因组信息(例如,与150bp单一读序相比,2x75bp碱基配对读序)。在一个例子中,平行两端测序是2x75到2x200bp测序。在一个实施例中,使用与5'-衔接子和3'-衔接子互补的引物进行克隆扩增测序文库的测序。

[0101] 将得到的多个序列读序与病毒来源治疗剂的参考序列(例如相同病毒的非突变序列)比对以产生含有多个匹配序列读序的匹配序列。在一些实施例中,至少80%的序列读序与病毒来源治疗剂的参考序列匹配,比如至少85%、至少90%或至少95%。根据匹配的序列读序,可以确定病毒来源治疗剂的序列,并且鉴定(例如,报道)存在序列变异(例如,突变),如果有的话。在一些实施例中,多个序列读序的平均读取长度为约75至约150个碱基对。

[0102] 在一些实施例中,报告包括每个位置每种碱基的覆盖度。术语覆盖度是指在测序过程中读取特定核苷酸的次数。因此,覆盖度是在任一方向上匹配序列中代表特定核苷酸的平均读序。在一个实施例中,每个碱基的覆盖度至少是4X。因此,当匹配序列中每个碱基的覆盖度是4X或更大,例如至少4X、至少5X、至少6X、至少7X、至少8X、至少9X或至少10X时,所述方法可以包括确定匹配序列对于筛选批次病毒来源治疗剂是可接受的。平均覆盖度是基于碱基读序的总数除以参照(或观察到的)目标基因组的大小。然而,平均覆盖度因此可能是误导性的,因为当使用单个RT引物测序病毒基因组时,cDNA的3'末端通常比5'末端具有更大的覆盖深度。在一些实施例中,如果确定匹配序列中的每个碱基的覆盖度小于4X,则可对病毒来源治疗剂进行Sanger测序,以在整个匹配的序列上提供4X或更高的覆盖度。例如,在PVS-RIPO序列的5'末端,病毒IRES结构域中的强RNA结构可导致RT衰竭,导致覆盖度降低。例如,如果缺乏适当覆盖度的基因组部分接近基因组的5'末端,则可以仅使用反向引物进行PVS-RIPO cDNA的线性PCR扩增,以产生5'端的最小4X序列覆盖度。可以使用高循环数量的线性(非指数)PCR以防止用引物序列覆盖天然PVS-RIPO病毒序列,尤其是在如PVS-RIPO病毒的低代表(低拷贝dscDNA)和高度可变5'端。使用之前已经证明具有减少的序列变异性的靶位点,针对需要额外覆盖的区域选择或设计引物。最终报告中包括了与PVS-RIPO参考序列和Sanger测序区域任何异源碱基的共有同源性。



[0103] 在一些实施例中,当将原始序列数据集与病毒来源治疗剂的合适参考序列比对时,可确定匹配序列读序的平均读取长度、匹配读序的百分比、覆盖度、SNP或其组合。因此,可以确定匹配序列读序的SNP。可根据以下标准来定义变体(例如,用于脊髓灰质炎疫苗):如果给定碱基位置的测序深度等于或超过4,096,000,则可能的变化被称为大于0.1%;如果深度小于4,096,000,但大于4,096,则称为超过4096或更大频率的变体;如果给定碱基位置的覆盖深度小于4,096读序,则称为大于1.0%的潜在变体。例如,基于公布的脊髓灰质炎疫苗限制(其中在脊髓灰质炎IRES中关键神经毒性位点处的多态性大约>0.1%可以导致在猴子中观察到致病表型),0.1%阈值是示例性阈值。然而,阈值可以设定为任何值,仅受限于目标拷贝数和RT的保真度、预PCR和所采用的测序反应。

[0104] 在一些实施例中,所述方法包括报告病毒来源治疗剂对于病毒来源治疗剂的参考序列的共有同源性、每个位置每种碱基的覆盖度、大于确定读序百分比的异源碱基(例如大于读序0.1%的异源碱基)、InDel(插入/缺失)或其组合。病毒来源治疗剂与参考序列的共有同源性可以报告为共有序列和序列数据集的部分或全部的成对匹配、部分或全部共有序列和序列数据集的个体位置变体报告、或任何其他合适的形式。对于脊髓灰质炎病毒,预计到(并观察到)在每个病毒批次的5'末端(碱基位置1-34)多态性水平有所升高;已知脊髓灰质炎基因组的这个区域(VPg结合和Stem a/b)在体内表现出高的序列变异性。报告还可以包括部分或全部共有序列和序列数据集每个位置每种碱基的覆盖度。例如,这样的数据可以以表格或图表的形式呈现。覆盖度还可以包括通过将测序碱基的总数除以基因组大小而估计出的总覆盖度。报告还可以包括大于读序的0.1%的异质碱基,预计其高于信噪比阈值。虽然鉴定有害的标志物如减毒标志物是特别重要的,但是要求在疫苗批次中没有突变的积累将有助于保持疫苗的安全性。因此可以使用本文所述的方法来鉴定遗传不稳定性的区域。量化疫苗批次中的突变对于质量控制也是重要的,以维持病毒疫苗的生产一致性。另一方面,可以检查从源质粒到MVB/WVB(病毒种子)到制造临床批次的突变情况的变化。此外,该结果将提供病毒库遗传稳定性、以及该库是否仍然适合临床批次生产的指示。

[0105] 在一些实施例中,当产生未匹配的序列读序时,将未匹配的序列读序添加到未匹配的序列读序库以供识别。通常,可以通过NCBI BLASTn分析未匹配的读序序列以确定它们的身份;预计到未匹配的读序,特别是来自未纯化的病毒样本的那些,将来自宿主细胞基因组或线粒体DNA序列,尽管也可观察到人类DNA或其他实验室污染物DNA序列。通过BLASTn分析鉴定未匹配的序列读序能够鉴定宿主细胞(例如Vero)DNA以外的潜在污染物。换句话说,鉴定未匹配的读序可以作为病毒污染物PCR和AVA安全检测的辅助手段,也可以用来鉴定潜在过程或来自人类DNA的实验室污染。可以从未匹配的序列读序确定的信息包括:样本或测试实验室污染;制造污染(之前的产品、细胞系污染(例如,HeLa污染)、人类DNA等);检测和鉴定宿主细胞系中的外来物质(裂解或溶原性病毒、细菌、支原体等);通过mtDNA和/或gDNA序列对宿主细胞库进行唯一识别的潜力;可能鉴定过量的宿主细胞MCB/WCB年龄(传代次数)或由于mtDNA或gDNA序列(甚至mRNA表达水平)的变化引起的应激;未匹配的读序可能对样品制备方法和/或测序中的变化有诊断作用;和未匹配的读序作为样品纯度的量度,类似于残余的宿主细胞DNA测试。

[0106] 在一些实施例中,在对来自MVB或WCB的病毒来源治疗剂进行测序之后,所述方法进一步包括将得自MVB的病毒来源治疗剂和序列引入宿主细胞,如哺乳动物细胞(例如



Vero、HEK293、HeLa或PerC6细胞),用于生产病毒来源治疗剂(例如疫苗)。然后可以使用与在MVB或WCB所用的类似方案对在第二宿主细胞中产生的所得病毒来源治疗剂进行测序,除了通常不需要DNA酶,因为病毒来源治疗剂(例如疫苗)比从MVB或WCB获得的病毒来源治疗剂纯度更高。得到的病毒来源治疗剂序列可以与相应的参考序列和/或从MVB或WCB获得的病毒来源治疗剂序列进行比较。

[0107] 例如,该方法可以进一步包括将病毒来源治疗剂引入(例如,转化)到哺乳动物或其它宿主细胞中,并在能够使病毒来源治疗剂增殖的条件下培养哺乳动物宿主细胞。提取(例如分离)来自哺乳动物宿主细胞的病毒核酸分子(例如从上清液中)并且纯化。在一些实施例中,经过这样的提取和分离之后,所需的病毒来源治疗剂核酸的纯度为至少50%、至少60%、至少75%、至少80%、90%、至少95%、至少98%、至少99%、至少99.9%或至少99.99%。如上所述,分离的病毒核酸分子可以是DNA或RNA。任选地,可以如上所述用DNA酶处理分离的病毒核酸分子(在一些实施例中,宿主细胞或培养上清液在病毒核酸分离之前或之后用DNA酶处理)。如果它们是RNA,则该方法包括从分离的病毒RNA产生ds DNA(例如dscDNA),例如使用逆转录并产生第二病毒核酸链。扩增病毒双链DNA(例如,dscDNA)(例如使用PCR),并且对扩增的病毒双链DNA进行定量。然后从至少500pg ng(例如至少1ng、至少2ng、至少5ng、或至少10ng)扩增的病毒双链DNA(例如ds cDNA)产生测序文库,例如500pg至1ng、500pg至5ng、500pg至10ng或1ng至5ng扩增的病毒dsDNA,测序、所得到的多个序列读序与参考序列进行比对、确定病毒来源治疗剂的序列,并且如上所述如果有的话,鉴定出序列变异(例如突变)的存在。在一些实施例中,所得病毒来源治疗剂的序列可与来自MVB或WCB的病毒来源治疗剂的序列进行比较。

[0108] 该方法能够同时或共同测定至少两种不同的病毒来源治疗剂(例如至少3种、至少4种、至少5种、至少10种或至少20种,例如2、3、4或5种不同的病毒来源治疗剂),如通过使用能区分不同的病毒来源治疗剂的“条码序列”或“标签”。在一些实施例中,不同的病毒来源治疗剂是不同的病毒(例如,不同的脊髓灰质炎病毒或不同的RNA病毒)。在其他实施例中,不同的病毒来源治疗剂是相同的病毒(例如PVS-RIP0),但是来自不同的来源(例如来自不同的MVB或WCB)。所述方法可如上所述进行操作,除了产生测序文库可以包括为每个病毒来源治疗剂产生一个或多个测序文库,其中一个或多个测序文库包括5'-衔接子和3'-衔接子,并且其中一个或多个测序文库中的每一个包含用于识别的唯一一条码序列。将一个或多个测序文库合并,如本文所述使用NGS进行测序,并如上所述进行分析。合并的原始序列数据集可以使用条码序列进行去重,为每个测序文库生成一个去重的原始序列数据集。每个去重的原始序列数据集可以与病毒来源治疗剂的适当参考序列对比。根据匹配的序列读序,可以确定所分析的每种病毒来源治疗剂的序列,并且如果有,鉴定序列变异(例如,突变)的而存在。例如,基于它们与参考序列的匹配或未匹配,单独的序列读序可以被分类为匹配序列读序和未匹配的序列读序。可以针对平均读取长度、匹配读序的百分比、覆盖度、SNP、插入/删除(InDels)或其组合来评估匹配的序列读序。在一些实施例中,所述方法包括报告病毒来源治疗剂对于病毒来源治疗剂参考序列的共有同源性、每个位置每个碱基的覆盖度、大于确定读序数百分比的异源碱基(例如,大于读序0.1%的异源碱基)、InDel或其组合。

[0109] 因此,在一些实施例中,一旦已经产生了原始序列数据集,就将该数据集去重。去

重是指对多个一起测序的样品进行的分选,通常使用条码序列。例如,可以使用一批RNA病毒来源治疗剂的多个稀释物来形成文库,其中每个文库包含独特的条码序列。或者,可以使用几个单独批次的RNA病毒来源治疗剂来形成文库,其中每个文库包括独特的条码序列。分析不同的样品制备方法时,去重也很有用。可以合并文库,然后将合并的文库一起进行克隆扩增和测序。一旦测序完成,条码就被用来去重序列,即将序列分配给特定的库。然后可以进一步分析每个去重的原始序列。去重能够使用滴定(低拷贝)的样品(每个样品具有独特的条码序列)进行计算机连接分析。

[0110] 在一些实施例中,在对病毒来源治疗剂进行分析之后,如果所确定的病毒序列没有禁忌症(例如,如果没有检测到会导致毒性表型的突变),所述方法还包括将测序的病毒来源治疗剂施用于对象。如果使用所公开的方法检测到会导致无义突变或以其他方式改变病毒ORF/CDS的任何突变(Indel或SNP),则不施用病毒来源治疗剂。例如,如果在脊髓灰质炎病毒中检测到以下突变,则不施用病毒来源治疗剂,但是如果在脊髓灰质炎病毒中未检测到以下突变,则可以施用病毒来源治疗剂:对于3型脊髓灰质炎病毒疫苗,病毒RNA 5'NCR第472位碱基从U到C的突变;对于1型和2型口服脊髓灰质炎疫苗,5' NCR内的突变当在人肠道或细胞培养中传代时其快速恢复(例如1型,第480位碱基G→A和525位U→C,以及2型,第481位碱基茎环结构域5的A→G离散区);以及对于PV Sabin疫苗株和PVSRIP0的IRES区中突变,其将导致神经减毒表型的逆转。然而,对于PVS-RIP0,目前还没有已知的导致致病性或神经毒性表型的HRV-2IRES突变。因此,在一些例子中,如果PVS-RIP0是病毒来源治疗剂,则对整个PVSRIP0基因组进行检查,包括病毒的UTR, IRES和多蛋白CDS区域。

[0111] 示例性的病毒

[0112] 使用本发明提供的方法分析以鉴定一种或多种序列变体(例如相对于参考序列的突变,如核苷酸插入、缺失或取代、或其组合)的存在的病毒来源治疗剂可以是病毒、病毒质粒模板(例如是载体的一部分且包含病毒的模板序列)或含有病毒的疫苗。例如,病毒来源治疗剂可以包括含有待测序病毒的模板序列的质粒DNA(例如细菌质粒)。用于病毒的这种质粒DNA模板可以用于在宿主细胞中生产天然或重组病毒。可以使用所公开的方法分析的病毒的例子包括非天然存在的基于RNA的病毒,天然存在的基于RNA的病毒,非天然存在的基于DNA的病毒或天然存在的基于DNA的病毒,以及编码这种病毒的病毒质粒模板或含有这种病毒的疫苗。

[0113] 在一些实施例中,病毒来源治疗剂是非天然存在的基于RNA的病毒(例如,非天然存在的脊髓灰质炎病毒)。非天然存在的病毒在不同程度上可能与天然存在的病毒不同。非天然存在的病毒可以源自例如通过重组技术人工产生(“工程化”)的天然存在的病毒,在这种情况下,非天然存在的病毒可以被称为“重组的”。非天然存在病毒的一个例子是通过遗传操作或其它方法(例如选择或化学修饰)进行修饰从而降低或破坏它们的致病性的致病性病毒。该方法或者由此产生的修饰的病毒可以被称为“减毒”、“减毒的”或者其他相关的术语。

[0114] 示例性的非天然存在的病毒包括但不限于用作疫苗的病毒载体、溶瘤病毒和减毒或重组病毒。溶瘤病毒是用于选择性感染和/或破坏癌细胞的病毒。病毒载体是用于在体内或体外(在细胞培养中)将遗传物质递送到细胞中用于各种应用的病毒。例如,病毒载体可用于基因修饰、基因治疗、用于蛋白质表达或用作病毒疫苗。病毒疫苗用于将遗传物质递送

到细胞或生物体中,目的是引发保护性或治疗性免疫应答。例如,减毒活病毒可以用作疫苗来触发针对相同病毒(例如脊髓灰质炎病毒、风疹病毒、麻疹病毒等)的天然存在致病性版本的免疫应答。术语溶瘤病毒、病毒载体和病毒疫苗有时在含义上是重叠的,但是所有这些均可以人工制备,例如通过使用重组工程技术对天然存在的病毒进行遗传修饰。溶瘤病毒可以基于但不限于肠道病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、水泡性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、呼肠孤病毒、塞内卡病毒或牛痘病毒。病毒载体包括但不限于逆转录病毒载体,如慢病毒载体和基于莫洛尼鼠白血病毒载体的载体、腺病毒载体和基于腺伴随病毒的载体。病毒疫苗包括但不限于流感疫苗、麻疹疫苗株、腮腺炎疫苗、风疹疫苗、水痘(水痘)疫苗、天花疫苗、人乳头瘤病毒疫苗、HIV和HTLV疫苗、出血热疫苗或任何活的、减毒的或灭活的病毒疫苗。

[0115] 在一个实施例中,通过所公开方法测序的病毒来源治疗剂是重组的脊髓灰质炎病毒,例如由PVS-RIP0示例的溶瘤减毒重组体脊髓灰质炎病毒。PVS-RIP0是减毒形式的Sabin I型脊髓灰质炎病毒,通过将脊髓灰质炎病毒的同源内部核糖体进入位点(IRES)替换为人类鼻病毒2型(HRV 2)的对应部分从而获得在正常神经元细胞中不复制、但对脑肿瘤细胞表现出溶瘤活性的脊髓灰质炎病毒株而产生。在肿瘤内施用重组溶瘤性脊髓灰质炎病毒PVS-RIP0后,脊髓灰质炎病毒被表达CD155(脊髓灰质炎病毒受体,PVR或NECL5)的肿瘤细胞选择性吸收并在其中复制,最终导致肿瘤细胞溶解。CD155,一种癌胚细胞粘附分子和肿瘤抗原,在某些癌症(如多形性胶质母细胞瘤(GMB))中异位表达。由于该重组病毒中的异源HRV2IRES,PVS-RIP0仅在易感的非神经元细胞(例如GBM)中增殖。PVS-RIP0及其性质和应用如Goetz等人,Cytokine Growth Factor Rev.2010 21(2-3):197-20,Yang等人,J.Virol.Methods.2009(1):44-54,Cello等,J.Med.Chem.2008 80(2):352-9,和Dobrikova等,Molecular Therapy 2008 16(11):1865-1872中描述。

[0116] 在一个实施例中,通过所公开的方法测序的病毒来源治疗剂是减毒的萨宾脊髓灰质炎病毒(例如具有适当突变的1型、2型和/或3型脊髓灰质炎病毒)。在一个实施例中,通过所公开的方法测序的病毒来源治疗剂是在灭活的脊髓灰质炎疫苗(例如,1型,2型和/或3型脊髓灰质炎病毒)中使用的,其可以在使用所公开方法的分析后通过化学失活(例如用福尔马林)(例如,在施用于受试者之前)。

[0117] 在一个实施例中,通过所公开的方法测序的病毒来源治疗剂是封装的二十面体RNA病毒(例如,具有基于蛋白质的衣壳的RNA病毒),其中衣壳的存在保护RNA免遭DNA酶(的降解)。这种病毒的例子包括但不限于脊髓灰质炎病毒(如上所述的那些)、风疹病毒、甲病毒、丙型肝炎病毒、细小病毒(例如B19)、其他肠道病毒等。

[0118] 在一个实施例中,通过所公开的方法测序的病毒来源治疗剂是单链或双链的被包封的DNA病毒(例如,具有基于蛋白质的衣壳的DNA病毒),其中衣壳的存在保护DNA免受DNA酶或其他核酸酶(的降解)。这种病毒的实例包括但不限于腺病毒、乙型肝炎病毒、水痘-带状疱疹病毒,巨细胞病毒,E-B病毒或单纯疱疹病毒(HSV)。

[0119] 在一个实施例中,通过所公开的方法测序的病毒来源治疗剂是或来源于麻疹病毒、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、腮腺炎病毒、流感病毒、风疹病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)或人T淋巴细胞白血病毒(HTLV)。

[0120] 在一些实施例中,病毒来源治疗剂是病毒模板质粒。在一些实施例中,病毒模板质粒包括RNA病毒的DNA模板,例如脊髓灰质炎病毒(例如,用于PVS-RIP0的模板、灭活的脊髓

灰质炎病毒 (IPV)、减毒的脊髓灰质炎病毒 (即萨宾疫苗)。例如,病毒模板质粒包括用于正链RNA病毒的DNA模板, RNA病毒如小核糖核酸病毒 (例如口疮病毒 [例如口蹄疫病毒 (FMDV)]、甲型肝炎或小儿麻痹症); 心脏病病毒科; 肠病毒科 (例如柯萨奇病毒、埃可病毒、肠道病毒和脊髓灰质炎病毒); 鼻病毒科 (鼻病毒, 如鼻病毒A、B或C); 披膜病毒 (例如风疹; 甲病毒 (如西方马脑炎病毒、东方马脑炎病毒和委内瑞拉马脑炎病毒)); 黄病毒 (例如登革热病毒、寨卡病毒、西尼罗河病毒、丙型肝炎病毒和日本脑炎病毒); 和冠状病毒 (例如, SARS 冠状病毒, 如厄巴尼菌株)。在一个实施例中, 病毒模板质粒包括用于负链RNA病毒的DNA模板, 例如正粘病毒 (诸如流感, 诸如流感A或B), 棒状病毒 (诸如狂犬病), 丝状病毒科 (诸如埃博拉病毒) 和副粘病毒 (如麻疹病毒、呼吸道合胞病毒和副流感病毒)。在一些实施例中, 病毒模板质粒包括DNA病毒序列, 例如来自疱疹病毒 (例如水痘-带状疱疹病毒, 例如Oka株; 巨细胞病毒; 和单纯疱疹病毒 (HSV) 类型1和2), 腺病毒 (如1型, 14型, 5型, 40型或41型腺病毒), 痘病毒 (如牛痘病毒), 乙型肝炎病毒和细小病毒 (如细小病毒B19)。在一些实施例中, 病毒模板质粒包括用于逆转录病毒的RNA或DNA模板, 例如1型人免疫缺陷病毒 (HIV-1), 如亚型C, HIV-2; 马传染性贫血病毒; 猫免疫缺陷病毒 (FIV); 猫白血病病毒 (FeLV); 猿免疫缺陷病毒 (SIV); 和禽肉瘤病毒。

[0121] 示例性的NGS方法

[0122] 几种下一代测序技术是已知的。当前的公开内容不限于特定的NGS方法。一个例子是焦磷酸测序, 即通过合成技术进行的测序, 其依赖于在核苷酸掺入时检测焦磷酸释放, 而不是用双脱氧核苷酸进行链终止。可以使用焦磷酸测序方法, 例如市售可得的来自Biotage (用于低通量测序) 和454®生命科学 (用于高通量测序) 的那些方法。

[0123] 在另一个实施例中, 使用Illumina® (例如HiSeq)、Ion Torrent®、Helicos®、PacBio®、Solid® (应用生物系统) 或其他商业测序系统对测序文库扩增子进行测序。

[0124] 通过合成技术的Illumina®测序是基于可逆的染料终止剂。首先将DNA分子连接到表面上的引物并扩增, 从而形成局部克隆集落 (桥式扩增)。添加四种类型的可逆终止子碱基 (RT-碱基), 并且洗去未掺入的核苷酸。与焦磷酸测序不同, 一次只能延伸DNA一个核苷酸。照相机拍摄荧光标记的核苷酸图像, 然后将染料与末端3'阻断剂一起从DNA中进行化学性去除, 从而能够进行下一个循环。

[0125] Ion Torrent PGM™系统是一种基于离子的测序系统, 通过检测作为核苷酸掺入副产物产生的氢离子对核酸模板进行测序。离子传感器包括耦合到离子敏感检测层的场效应晶体管 (FET), 其可以感测H<sup>+</sup>离子的存在或溶液pH的变化。离子传感器提供指示核苷酸掺入的输出信号, 其可表示为其量值与相应孔或反应室中的H<sup>+</sup>离子浓度相关的电压变化。不同的核苷酸类型连续地流入反应室, 并且通过聚合酶以按模板序列确定的顺序掺入到延伸的引物 (或聚合位点) 中。每个核苷酸的掺入伴随着反应孔中H<sup>+</sup>离子的释放, 同时伴随局部pH的变化。H<sup>+</sup>离子的释放由传感器的FET记录, 其产生指示核苷酸掺入发生的信号。未在特定核苷酸流入中掺入的核苷酸将不会产生信号。来自FET的信号幅度还可以与掺入延伸的核酸分子中的特定类型的核苷酸数目相关, 从而能够解析均聚物区域。关于Ion Torrent PGM™测序仪的组成、设计和操作的进一步细节可以在美国专利公开号2009/0026082; 2010/0137143; 和2010/

0282617中可见,所有这些申请通过引用结合在此以用于其下一代测序的公开内容。

[0126] ABI SOLiD™ (“通过寡核苷酸连接和检测进行的测序”)方法(生命技术公司;WO 06/084132 A2)是基于通过通用衔接子序列将模板核酸的PCR扩增片段连接至磁珠,随后通过将标记的探针连接到与衔接子序列杂交的引物进行片段序列的序列检测。为了读出,使用一组四个荧光标记的双碱基探针。读出后,部分探针被切割,并进行新的连接、检测和切割循环。由于使用双碱基探针,对每个模板序列必须进行两轮测序。

[0127] PacBio RS是基于零模波导特性的单分子实时测序(SMRT)平台。一个DNA聚合酶附着在ZMW的底部,一个DNA分子作为模板。ZMW是一种结构,其产生的照明观察体积足够小,可以仅观察到用DNA聚合酶掺入的单个DNA核苷酸。四个DNA核苷酸中的每一个都连接到四种不同荧光染料之一上。当通过DNA聚合酶掺入核苷酸时,切割荧光标签并扩散出ZMW的观察区域,在那里不再能观察到荧光。检测器检测核苷酸掺入的荧光信号,并根据染料的相应荧光进行碱基响应。

[0128] 在Helicos Heliscope™技术中,片段被连接到阵列的polyT寡聚物捕获。在每个测序循环中,加入聚合酶和单荧光标记的核苷酸,并对阵列成像。随后去除荧光标签并重复该循环。

[0129] 通过以下非限制性实施例进一步对本发明进行说明。

[0130] 实施例1

[0131] 纯化病毒样品的测序和分析

[0132] RNA提取和逆转录:根据凯杰方案的修改版本,使用来自凯杰的QIAamp®病毒RNA微型试剂盒从所有测试样品中分离基因组RNA。简言之,将560μl不含载体RNA的缓冲液AVL(病毒裂解缓冲液“A”-离液洗涤剂溶液)加入到140μl样品中。将样品进行涡旋并在室温(23℃±2℃)下孵育10分钟。向样品中加入560μl的100%乙醇,涡旋混合,然后将一半样品(约630μl)加入到QIAamp®微型柱中,并以6000×g离心1分钟。样品的其余部分被添加到柱中,重复旋转步骤。然后用两缓冲液洗柱。每个40μl洗脱缓冲液进行双重洗脱,总体积约为80μl。使用NanoDrop™ 8000分光光度计以分光光度法定量总RNA。然后使用生命科技公司的ThermoScript™ RT-PCR系统将RNA用于制备cDNA。简而言之,将9μl RNA、1μl寡聚(dT)<sub>20</sub>引物和dNTP在65℃温育5分钟。温育后,向样品中加入cDNA合成缓冲液、DTT, RNaseOUT™和ThermoScript™ RT,样品在50℃温育45分钟,然后在85℃温育5分钟以终止反应。将RNA酶H加入到样品中,并在37℃温育20分钟。使用NanoDrop™ 8000分光光度计以分光光度法定量cDNA。然后使用来自新英格兰生物实验室的NEBNext™第二链合成试剂盒使用5μl的cDNA产物进行第二链反应。将cDNA与第二链合成缓冲液和第二链合成酶混合物合并,并在16℃温育2.5小时。使用来自凯杰的QIAquick®PCR纯化试剂盒纯化产物,并在30μl无核酸酶的水中洗脱。使用NanoDrop™ 8000分光光度计以分光光度法对dscDNA进行定量,并在-20±4℃下储存以进行短期储存。

[0133] 文库制备:用制备的dscDNA制备文库,以便在Illumina®HiSeq®2500上测序。从每个原始样本制备一个文库。使用Illumina®的Nextera®XT文库制备试剂盒来制备文库。基于先前的研究范围中使用1pg至1ng输入dscDNA的发现结果,dscDNA的起始总输入量为每个文库1ng。按照Illumina®Nextera®XT文库制备方案来制备文库。简言之,使用Nextera®标记化学试剂,将每个样品进行酶促片段化并用衔接子序列同时标记(连接)。该

过程将输入DNA片段化,并将衔接子序列添加到片段的末端用于下游处理。然后中和连接酶,并进行简短的12个循环扩增,以在5'-和3'-末端向每个样品添加条码序列。每个库可以分配不同的条码序列以在分析期间识别和标示不同的样品。使用两轮AMOure®XP珠洗涤清洁PCR反应物,然后在TE缓冲液中洗脱。然后使用高灵敏度DNA芯片在安捷伦生物分析仪上分析每个文库以评估文库的质量和数量。样本文库在 $-20\pm 4^{\circ}\text{C}$ 下进行短期保存。

[0134] **Illumina®DNA测序和分析:**对于每个样品,在Illumina®HiSeq®2500上运行快速流动槽。对于每个流动槽,将文库进行变性和稀释以在仪器上成簇。然后使用Illumina®SBS测序技术和试剂对每个文库进行两侧2x150bp测序。使用Illumina®HiSeq®软件对所得数据进行去重,然后进行分析。每个流动槽使用单个样品运行。为所有测序的组分生成FastQ文件。数据分析过程的总体流程如图1所述。Samtools和mpileup软件用于将输出文件从SAM转换为BAM格式和索引输出文件,以便在整合基因浏览器(Integrated Genome Viewer)中查看。Mpileup与标志一起使用来增加每个位置的深度,以便检查病毒的覆盖度并查找潜在的变化。

[0135] 由于Nextera®XT文库制备需要12个循环的PCR预扩增,所以在给定位置响应病毒序列变异体的阈值设为 $2^{12}=4096$ 或读序的0.1%,以较大者为准。根据以下标准定义变体:如果给定碱基位置处的测序深度等于或超过4,096,000,则称潜在变化大于0.1%;如果深度小于4,096,000,但大于4096,则确定为超过4096或更大频率的变体;如果给定碱基位置的覆盖深度小于4096个读序,如果大于1.0%,则确定为潜在的变体。在需要额外的测序工作(Illumina®或Sanger®)之前,每个碱基位置的最小读取覆盖度设置为4X(最小监管要求)。

[0136] 对每个样本使用Bowtie(短片段参考比对器)将序列读序与PVS-RIP0参考序列比对。计算每个样品的碱基总数、覆盖度和平均读取长度的值以及与参考匹配的读序的百分比,并将其与预先建立的用于测定有效性的规格进行比较。通过取总序列碱基并除以PVS-RIP0参考序列(7303个碱基对)的大小来发现所估计的覆盖度。制备与每个样品的参考位置相比较的覆盖度曲线,以及每个样品的样品读取长度的图。与参考序列比较时进行分析以检查每个样品中的变体。在每个病毒批次的5'末端(碱基位置1-34)预期到(并观察到)多态性水平的升高;脊髓灰质炎病毒基因组的这个区域(VPg结合和Stem a/b)在体内表现出高的序列变异性。可以通过NCBI BLASTn分析非匹配序列读序序列以确定它们的身份;预期未匹配结合的读序,特别是来自未纯化病毒样品的那些将来自Vero宿主细胞基因组或线粒体DNA序列,尽管也可观察到人类DNA或其他实验室污染物DNA序列。

[0137] 实施例2

[0138] 粗制和未纯化的病毒样品的测序和分析

[0139] **RNA提取和逆转录:**使用凯杰QIAamp®病毒RNA微型提取试剂盒从每个测试样品中提取病毒RNA,而不添加载体RNA。将每个样品的等分试样用于提取。由于未纯化病毒样品中的大部分核酸(通过拷贝数和质量)是宿主细胞基因组和线粒体DNA,因此需要额外的纯化步骤来除去这些干扰分子。使用样品中游离DNA的DNA酶消化,使病毒RNA不受影响。随后使用来自生命科技公司的TurboDNase-free™试剂盒对来自病毒库样品的提取RNA等分试样进行DNA酶处理。

[0140] 将样品用2μl Turbo DNA酶处理,在37°C下孵育30分钟,然后用DNA酶灭活试剂灭

活。使用Leidos/BDP-QC“P01PR”RT-qPCR测定法定量所得的富集的病毒RNA。然后使用来自克隆技术实验室(Clontech Laboratories)的SMARTer®Ultra™低输入RNA制备试剂盒,将RNA用作逆转录和第二链合成的输入。使用SMARTer®IIA CDS和寡核苷酸引物在42℃进行90分钟的第一链合成。当与PVSRIPO一起使用时,SMARTer IIA Oligo通过使用SMARTScribe RT的5'末端转移酶活性和SMARTer IIA Oligo来改善全长聚腺苷酸化的PVSRIPO RNA(和污染的Vero mRNA)序列的回收,所述SMARTer IIA Oligo防止由停滞的RT流程事件产生的cDNA的标记。

[0141] 然后使用在cDNA制备物中引入的寡聚dT和SMART引物通过长距离PCR扩增所得的全长cDNA。然后修饰样品以使用AMPure珠除去引物和dNTP,并在Qubit 2.0荧光计或NanoDrop 8000分光光度计上定量,并使用DNA芯片在安捷伦2100生物分析仪上验证其大小。或者,可以使用靶向HRV-2IRES或脊髓灰质多聚蛋白CDS序列5'端的定量PCR反应在测序前测定靶拷贝数。

[0142] 文库制备:将来自两种不同制剂的dscDNA用作文库制备的模板;使用来自Illumina®的Nextera®XT文库制备试剂盒。每个dscDNA样品取一纳克用于每个文库的制备。Nextera®试剂盒使用“标签化”技术,在单个孵育步骤中,输入物被片段化并用衔接子进行标记。然后中和连接酶,并通过短的12个循环扩增对每个样品进行条码序列化,然后使用AMPure®XP珠进行纯化。纯化后,使用安捷伦2100生物分析仪高灵敏度DNA芯片评估每个文库的数量和质量。

[0143] Illumina®测序:然后在Illumina®HiSeq®2500仪器上将文库用于测序。该仪器在快速运行模式下使用,每个文库在一个快速运行流通池上进行测序。将文库变性并稀释,然后使用仪器的机带集群能力来形成簇。使用2x100bp两端测序对文库进行测序。所产生的序列必须在所有碱基上获得至少4X的覆盖度,或将进行额外的Sanger测序来完成对那些区域的覆盖,预计到这发生在病毒5'端,此处由于病毒IRES域内强RNA结构发生RT枯竭。Illumina®序列分析程序遵循上文和图1中详述的纯化病毒样品程序。生成报告详细说明与PVSRIPO参考序列的共有同源性、每个碱基位置的覆盖度,以及大于读序0.1%或>4096个读序的异源碱基(如适用)。

[0144] 实施例3

[0145] Sanger测序

[0146] 如果参考序列的任何碱基对使用Illumina®方法覆盖了<4个测序读序,则将采用Sanger测序。如果缺乏适当覆盖度的基因组部分靠近基因组的5'末端,则可以使用几种间隙填充技术,包括替代的NGS方法如罗氏/454FLX和/或可选的预扩增方法,如“线性扩增”PVS-RIPO cDNA仅使用反向引物以防止引物掩盖5'序列变异性。采用高循环数量的线性(非指数)PCR来防止引物序列覆盖天然PVS-RIPO病毒序列,特别是在PVS-RIPO病毒的低代表(低拷贝dscDNA)和高变异性5'端。最后,如果这些方法都不能成功覆盖剩余的序列间隙,则可以进行传统的PCR然后进行Sanger荧光测序。从这些间隙填充方法获得的序列数据,包括与PVSRIPO参考序列的共有序列同源性以及观察到的任何异源碱基均包括在最终报告中。

[0147] 实施例4

[0148] 有效测试的标准



- [0149] 在实施例1和2中,有效测试的标准包括:
- [0150] 1.提取的RNA必须为每个样本至少5纳克。
- [0151] 2.所得到的cDNA必须是每个样品至少2纳克用于第二链反应。
- [0152] 3.使用安捷伦2100高灵敏度DNA芯片,文库必须是可检测的,并且大小合适用于测序(大约300bp)。
- [0153] 4.如果需要,将利用Sanger测序,从而为来自多个线性扩增(如果在可变的5'端)或来自多个引物组的所需位置提供最小4X覆盖,如果在病毒基因组中的其他位置。
- [0154] 在实施例1和2中,所述序列验收标准包括:
- [0155] 1.一个Illumina®流通池的总读序必须 $\geq 45$ 百万。
- [0156] 2.与参考匹配的读序百分比应该超过75%。
- [0157] 3.参考病毒序列的平均覆盖度 $\geq 18,000X$ 。
- [0158] 4.每个碱基必须覆盖4倍或更大。这可以来自单独的Illumina®,或Illumina®和Sanger测序的组合。
- [0159] 实施例5
- [0160] 纯化和粗制病毒样品的RT-PCR和Sanger染料终止子测序
- [0161] RNA提取和逆转录:按照批准的程序,将250 $\mu$ l测试样品加入到1120 $\mu$ l凯杰缓冲液AVL/载体RNA中,涡旋,并在室温下温育10分钟。将一半的样品+缓冲液AVL(685 $\mu$ l)转移到第二个微量离心管中,向每个管中加入560 $\mu$ l乙醇(96-100%),通过脉冲涡旋混合15秒,并短暂离心。然后将溶液加入QIAamp旋转柱,用合适的洗涤缓冲液洗涤,并在60 $\mu$ L缓冲液AVE中洗脱。按照批准的程序使用分光光度计对病毒RNA进行定量。然后将病毒RNA保存在 $\leq -65^{\circ}\text{C}$ 直至使用。
- [0162] PCR扩增和测序引物选择:用于测试品PCR扩增和Sanger序列分析的合成寡核苷酸来源于PVSRIPO参考序列(参见表2)。将引物设计成分开退火约250个碱基,具有约50%的GC含量,并且长度在18-24bp。设计引物位点,使得在测序cDNA的两条链时,根据每个引物延伸的预期读取长度,每个碱基对(每条链两)产生四个或更多个读序。
- [0163] 表2:用于PVSRIPO的Sanger测序的代表性寡核苷酸引物。还采用了列出的其他引物序列批次。

引物名称	5' to 3' 引物序列	SEQ ID NO:
PVSRIPO.f2	CAAACAATGGACAAGGTGT	1
PVSRIPO.f3	TCCTGATAAAAACATCCC	2
PVSRIPO.f4	ATTCGCCGTACCAGAGATG	3
PVSRIPO.f5	TGTGAGTTCAATGGATTAAG	4
PVSRIPO.f6	TGTTCTGTGGATCCATGATG	5
PVSRIPO.f7	CCGTGAAACGGTGGGGGCG	6
PVSRIPO.f8	GGGCATGCCTTAAATCAAG	7
PVSRIPO.f9	GCCCTGGAGTGGATTACAAG	8
PVSRIPO.f11	CAAGGTGACAGTTGGTTGAAG	9
PVSRIPO.f12	CAGGTAAATCTGTAGCAAC	10
PVSRIPO.f13	TGAAATGTGTAAGAACTGTC	11
PVSRIPO.f14	GCAGTGGCTGGAGTTGTCT	12
PVSRIPO.f15	CTGAGACAAATGATGGAGTC	13



[0165]

PVSRIPO.f16	AAACGATCCCAGGCTTAAG	14
PVSRIPO.f18	CCTACAAGGGCATAGATTTAG	15
PVSRIPO.f19	ATTGCTCCCAGAGTACTC	16
PVSRIPO.r33	TGGCATTACTGGATGAATAAG	17
PVSRIPO.r34	TCTCCGAATCCGATTTTCTC	18
PVSRIPO.r36	TCGCTTCAGGGCCGCTGC	19
PVSRIPO.r37	GGTGAAGCGTGGGTTGGTA	20
PVSRIPO.r38	CAGGAGGGGGACTCGTCTTG	21
PVSRIPO.r40	CTGACATTATTGAATAGAA	22
PVSRIPO.r41	TCAAGTTCTTAAGTAGCTTTTC	23
PVSRIPO.r42	CCCTGCGTTGCAATTGCAC	24
PVSRIPO.r43	TAGAGGGAGTCACCTAGTG	25
PVSRIPO.r44	CTGAGTTATCCACGGTTAT	26
PVSRIPO.r45	GACGACTATTCTGGTTTGG	27
PVSRIPO.r46	AGAGTATGGGATCGTCTG	28
PVSRIPO.r47	TACCATACTATCTATCGAG	29
PVSRIPO.r48	ATGTCCCGCAGTGCATCAG	30
PVSRIPO.r49	TGGTAGAACCACCATACGC	31
PVSRIPO.r50	CGACCAGCCAAACGATTTC	32
PVSRIPOrev1	GAG TCC CAT GTC CCG CAG	33
pVSRIPOREV2	CCA ACA TAC GGT ACC GAG ATC	34
pVSRIPOrev4	TGC TTT CAC CAG GTG AAG CGT	35
pVSRIPO.altREV1	TAC CCG TGA AAG TGC CTC CTT TCT	36
pVSRIPO.altf10	TGC AAC TAC CAT TTG GCC ACT CAG	37
pVSRIPOaltR39	AAT GTC CAT GTC GAA CGC AAA GCG	38
pVSRIPO.altender	ATT TAC CCC TAC AGC AGT ATG ACC CAA	39
pVSRIPO.altF17	TGT ATG TTC CTG TCG GTG CTG TGA	40
pVSRIPO altF1	TTA AAA CAG CTC TGG GGT TGT ACC C	41
RTPCR1 R51	TTTTTATCAGGACATCCTTGATGGGC	42
RT-PCR 1 F52	TATATTGGCACCATGGGAGCT	43
RTPCR2 F53	GGACCAACAACGTGTGCTACAC	44
RTPCR2 R54	AAGTCAAAGGGAATCATGGTG	45
RTPCR3 R55	GCTCTATATGTGTGGTATCTC	46
RTPCR3 R56	TATGTGTGGTATCTCGCATCA	47
RTPCR4 R57	TGGTGGAGAGGGGTGTAAGCG	48
RTPCR5 F58	GGTGACCAGTACCATCACTGA	49
RTPCR5 R59	TTTCAGCTATGGCTCTAGCAA	50
RTPCR8 F60	CATCTTTAGTGCCTCGAACCA	51
RTPCR8 F61	GACTATGGACTAACTATGACT	52
RTPCR8 R62	TTACATTCTCCCATGTGACTG	53
RTPCR8 F63	ATCACGTTTCGCTCTCTGTGCC	54
PVS2RIPO PCR2R	TGT GTT CCC AAC ATC GCC TCC TTA	55
PVSRIPO8 F64	CAG CCC TGC TTG GTT CGA GGC	56
PVSRIPO-1 REND	CTT CTA AGT TGA ATT CCT AAG	57
R35	TCT TCT TTC CCA TTG CTA C	58
PCR7-F17b	GAG CAG GAC AGT GTG GTG GAG T	59
PCR6-14a	GCA AGG GAG AGT TCA CTA TGT T	60
PVSRIPO-1 DSnew1	TGCGGTTAACGATCGCAGT	61
PVSRIPO-1 DSnew2	TCATCTGCCAGGTCTACCAG	62

[0166]	PVSRIP0-1 DSnew3	CTAGTACTCCGGTATTGCGGT	63
	PVSRIP0-2 DSnew1	CATCGCCTCCTTACGCTTC	64
	PVSRIP0-3 DSnew1	GTGGCCATTATAACCGTGGA	65
	PVSRIP0-3 DSnew2	GTTTGCCATGTGTAGTCGTC	66
	PVSRIP0-4 DSnew1	GATCTCGGTACCGTATGTTG	67
	PVSRIP0-4 DSnew2	CTCTATGGTGCAGCATCTCT	68
	PVSRIP0-4 DSnew3	ACTCAGCAGATTGGAGACA	69
	PVSRIP0-5 DSnew1	GATGGTTATCCATCCAGTC	70
	PVSRIP0-5 DSnew2	GTCGAAGTGTGATGGATC	71
	PVSRIP0-6 DSnew1	CATGGCATCCCTGGAGGAG	72
	PVSRIP0-6 DSnew2	AGCCTCCATACAATTGCCA	73
	PVSRIP0-6 DSnew3	GTCCTTTAGTGTGTGGTAAG	74
	PVSRIP0-6 DSnew4	TGGCATCCAAGATCTCCA	75
	PVSRIP0-7 DSnew1	CACTGTCCTGCTCTGGTTG	76
	PVSRIP0-PCR2	TAG TAA CGC GGC TTC GAA ACA GGA	77
	PVSRIP0-R51	TTTTTATCAGGACATCCTTGATGGGC	78

[0167] 提取后,使用SuperScript III RT-PCR试剂盒,在约1200个碱基片段中逆转录(RT)和PCR扩增PVSRIP0 RNA。将大约0.1微克提取的病毒RNA与25 $\mu$ l的2X反应混合物和10pmole的各正向和反向引物合并,并用无核酸酶的水使终体积达到50 $\mu$ l。按照批准的程序使用QIAquick PCR净化柱纯化扩增子。为了验证在PCR之后存在预期大小的扩增子,通过琼脂糖凝胶电泳分析每个PCR反应的等分试样,并用溴化乙锭染色进行成像。随后将成功的PCR反应物保存在-18 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C直到进一步使用。

[0168] 使用荧光染料终止子化学的Sanger测序:使用ABI BigDye v1.1测序试剂盒按照批准的程序进行测试品样品和pGEM3Z对照质粒的荧光染料终止子DNA循环测序。将2.0 $\mu$ l的5x BigDye测序缓冲液与2.0 $\mu$ l Ready反应预混合物、2 $\mu$ l 2 $\mu$ M测序引物、20ng纯化的PCR产物和纯化水合并,使最终反应体积为10 $\mu$ l。对于用作反应和仪器对照的pGEM3Z对照反应,用20ng(约3.2pmol)的M13F-20阳性对照引物(5'GTAAAACGACGGCCAGT-3';SEQ ID NO:79)对200ng的pGEM3Z进行测序。用每个测序装置(即平板)进行对照反应,并按照批准的程序在ABI3130x1上进行分析。按照批准的程序使用PTC-225Peltier热循环仪进行循环测序反应。在分析之前,使用Centriflex凝胶过滤柱从未掺入的染料终止剂、盐和低分子量化合物中纯化测序反应物。按照批准的程序使用ABI3130x1 DNA测序仪进行自动化的DNA序列分析。在毛细管电泳和检测过程中,通过测序计算机从3130x1的每个通道收集荧光序列数据并进行分析。对原始序列运行数据进行修整,并按照批准的程序,使用Sequencher软件(GeneCodes,安阿伯市,密歇根州(Ann Arbor,MI))将其匹配成连续排列序列,也称为“重叠群”(contig)。然后将每个样品的重叠群与PVSRIP0参考序列进行比对,在ABI软件、Sequencher、BioEdit、CloneManager和其他序列分析套件的自动协助下,手动进行碱基变化、插入缺失、间隙和多义性(多态)位点的搜索。

[0169] 基于Sanger方法的测序验收标准:在每个测序板上运行的pGEM3Z阳性对照测序反应必须产生至少500读序碱基长度(LOR)并且对于前500bp序列读序具有 $\geq 20$ 的质量值(QV)(由应用生物系统(Applied Biosystems)(ABI 3130x1)分析报告确定)。质粒对照的总体测序质量必须大于90%。

[0170] 实施例6

[0171] 对PVS-RIP0批次进行测序

[0172] DNA提取和逆转录:使用来自凯杰的QIAamp®病毒RNA微型试剂盒按照AIBSOP MOLBI000050的修改版本从所有测试样品中分离基因组RNA。简而言之,将560μl不含载体RNA的缓冲液AVL加入到140μl样品中。将样品涡旋混合并在室温(23℃±2℃)下孵育10分钟。将560μl、100%乙醇加入到样品中,涡旋混合,然后将一半样品(约630μl)加入到QIAamp®微型柱中并以6000xg离心1分钟。将其余样品加入到柱中,重复旋转步骤。然后用两缓冲液洗柱。每次进行40μl洗脱缓冲液的双倍洗脱,总终体积为约80μl。按照AIB SOP MOLBI000077使用NanoDrop™ 8000分光光度计以分光光度法对RNA进行定量。然后使用来自生命科技公司的ThermoScript™ RT-PCR系统取RNA用于制备cDNA。简言之,将7μl中的1μg RNA、1μl寡聚dT引物,dNTP和水在65℃温育5分钟。温育后,将cDNA合成缓冲液、DTT、RNase Out和ThermoScript™ RT加入到样品中,并将样品在50℃下温育45分钟,然后在85℃温育5分钟以终止反应。将RNA酶H加入到样品中,并将其在37℃下温育20分钟。按照AIBSOP MOLBI000077使用NanoDrop™ 8000分光光度计以分光光度法定量cDNA。然后使用来自新英格兰生物实验室的NEBNext™第二链合成试剂盒,使用总共100纳克的cDNA产物进行第二链反应。将cDNA与第二链合成缓冲液和第二链合成酶混合物合并,并在16℃温育2.5小时。使用来自凯杰的QIAquick®PCR纯化试剂盒纯化产物,并在30μl无核酸酶的水中洗脱。按照AIB SOP MOLBI000077使用NanoDrop™ 8000分光光度计以分光光度法定量dscDNA,并储存在-20±4℃以短期储存。

[0173] 文库制备:使用制备的dscDNA制备用于在Illumina®HiSeq®2500上进行测序的文库。从每个原始样本总共制备了11个文库。使用来自Illumina®的Nextera®XT文库制备试剂盒来制备文库。对于制备的每个文库,dscDNA的起始总输入不同,如下:文库1-1000pg、文库2-750pg、文库3-500pg、文库4-250pg、文库5-100pg、文库6-75pg、文库7-50pg、文库8-25pg、文库9-10pg、文库10-5pg、文库11-1pg。基于来自NanoDrop™ 8000分光光度计的定量,将dscDNA稀释至不同的输入量。按照Illumina®Nextera®XT文库制备方案制备文库。简而言之,使用Nextera®标记化学物质同时对每个样品进行标记和酶促片段化。该过程将输入DNA片段化,并将衔接子序列添加到片段的末端以用于下游处理。然后进行简短的12个循环扩增以在每个样品上添加条码序列。在分析过程中,每个稀释物被分配不同的条码序列以分离出不同的样品。使用两轮AMPure®XP珠洗涤清洁PCR,然后在TE缓冲液中洗脱。然后在安捷伦生物分析仪上分析每个文库以评估文库的质量和数量。这些文库储存于-20±4℃下用于短期保存。

[0174] 下一代DNA序列分析:对于每个原始样品,在Illumina®HiSeq®2500上运行两个流动池。第一个流动槽由一个单一的文库组成-最高的输入文库(文库1)。第二个流动槽具有以等摩尔浓度合并的全部11个文库。对于每个流动槽,将文库或文库池变性并稀释以在仪器上成簇。然后使用Illumina®SBS测序技术和试剂对每个文库进行两端2x150bp测序。适用时,使用Illumina®HiSeq®软件对结果数据进行去重,然后进行分析。将片段与所提供的参考基因组序列PVS-RIP0(SEQ ID NO.1)进行比对。为所有测序的组分生成FastQ文件,并将在驱动器上提供并邮寄。来自两条通道的FastQ文件合并成一个数据集并作为一个

样本进行分析。数据分析过程的总体流程如图1所述。使用Samtools和mpileup将输出文件从SAM转换为BAM格式和索引输出文件,以便在整合基因浏览器中查看。Mpileup与一个标志一起使用来增加每个位置的深度,以便检查病毒的覆盖度并寻找潜在的变化。根据以下标准定义变体:如果给定位置的测序深度等于或超过4,096,000个,则可能的变化大于0.1%;如果深度小于4,096,000且大于4096,则称为超过4096或更大频率的变体;如果覆盖深度小于4096,则称为大于1.0%的潜在变体。最小读取覆盖度设为4倍。如果一个位置的覆盖度低于最小值,那么该位置则没有数据报告。

[0175] PVSRIPO毒理学材料的测序结果,批号L0603006, QC-052548-02:稀释系列:使用Illumina® HiSeq®软件将片段去重。分离条码序列后,使用Bowtie (短读序参考校准器)将读序与参考序列进行比对。比对统计如表3和图2所示。在1000pg输入处,大约87%的读序与参考序列匹配。随着输入量的减少,匹配读序比例下降。使用1000pg样品进行另外的分析以鉴定潜在的污染序列。少量的未匹配读序与非冗余数据库进行比较,许多命中值(hit)返回到宿主细胞绿猴属(*Chlorocebus*) (*Vero*) DNA。

[0176] 表3:每个稀释文库的比对统计

	稀释 (输入质量 (pg))	读序数量	匹配的	百分比
	1000	4910983	4267441	86.90%
	750	3956379	3367519	85.12%
	500	5219665	4335411	83.06%
	250	6219724	4863890	78.20%
	100	5350547	3042589	56.87%
[0177]	75	8405898	5265675	62.64%
	50	4074065	2095240	51.43%
	25	3862454	1341020	34.72%
	10	2989317	109897	3.68%
	5	3769713	121189	3.21%
	1	4355564	19918	0.46%
	Undet*	1457557	599775	41.15%

[0178] \* = 条码序列中的错误防止将这些序列分配给特定样本。

[0179] 分析所有样品以确定最小、最大和平均读取长度(表4)。

[0180] 表4:每个稀释文库的读取长度统计。

	样本 ID	最小值	最大值	平均值
[0181]	1000 pg	35	151	88.20
	750 pg	35	151	99.54
	500 pg	35	151	96.89
	250 pg	35	151	97.43
	100 pg	35	151	92.22
	75 pg	35	151	93.58
	50 pg	35	151	90.53
	25 pg	35	151	86.30
	10 pg	35	151	77.35
	5 pg	35	151	77.10
[0182]	1 pg	35	151	79.87

[0183] 因此,在约500-1000pg ds-cDNA输入,匹配读序(即,含有病毒序列对“垃圾”/随机和宿主细胞DNA序列的读序)出峰,并且在约25pg输入以上就对读取长度没有明显的影响。

[0184] 样本读取长度图如图3所示。平均读取长度大约为100个碱基对。使用以下等式计算整个病毒的大致覆盖度。

[0185] 测序核苷酸数量

[0186] 病毒长度

[0187] 表5显示了稀释系列中包含的每个部分的估计覆盖度。估计覆盖度不反映下一代测序实验的真实性质,因为一个碱基到另一个的覆盖度是不同的,所以进行额外的分析来描述参考序列的覆盖度。示例性的覆盖图如图4所示。全长覆盖度用1纳克输入实现。病毒的5'末端比其它区域的覆盖度低。

[0188] 表5:基于读取长度和读序数量的各个稀释文库的PVSRIPO基因组估计覆盖度

	稀释	估计覆盖度
[0189]	1000pg	59307
	750pg	53924
	500pg	69249
	250pg	82980
	100pg	67564
	75pg	107713
	50pg	50500
	25pg	45644
	10pg	31662
	5pg	39796
	1pg	47633

[0190] 单次输入实验使用单个1000pg样品运行第二个流动槽。样品中有171,001,369个读序,其中87.2%与参考序列匹配。估计覆盖度为751,294倍。

## [0191] 实施例7

[0192] 使用Illumina深度测序分析了七批PVSRIPO,其中三个在之前已经测序,采用的是RT-PCR(病毒基因组的约1200个碱基部分),随后使用ABI BigDye® 终止子化学与ABI 3130xl测序仪进行Sanger荧光测序。最初的NGS开发工作的重点是确定哪种方法可提供最大的覆盖深度,同时最大限度地减少由于测序前的逆转录和预扩增引起的内在错误率。一个关键的标准是利用PCR和测序引物,其靶向不是病毒基因组部分的序列。这意味着衔接子被用于在病毒cDNA片段化之后选择的任何NGS方法。

[0193] 先前的Sanger测序方法使用PCR预扩增和来自理论病毒序列的测序引物,并直接靶向病毒cDNA序列。尽管使用了大量重叠的测序读序,直接PCR和测序启动的使用产生了有利于所使用的引物序列的巨大偏差,有效地防止了在启动位置恢复任何异源碱基。这种偏差效应在病毒cDNA的极限末端尤为突出,其中重叠读序限于单一方向。即使寡核苷酸dT引发用于逆转录(RT),这种效应也导致无法恢复含有聚腺苷酸化信号的病毒序列的极端3'末端。这种不能恢复极端3'序列的原因可能是由于荧光信号水平的降低以及序列同质性(即均聚腺嘌呤)的增加,从而阻碍了该区域精确的碱基响应。

[0194] NGS衔接子方法被用来最大限度地减少任何酶的限制,以恢复病毒的极端3'端,但它,但需要计算密集的基因组重新拼接(de novo genome assembly)。依诺米那系统深度测序使用7303核苷酸PVSRIPO MVB参考序列作为指导从而快速比对并产生病毒基因组共有序列和鉴定碱基变体。然而,不使用参考序列产生的重新匹配预计会恢复病毒的极端3'末端,并鉴定出存在于病毒基因组中的任何大(>10nt)插入缺失片段。

[0195] 自2004年以来的所有批次PVSRIPO都使用了来自主病毒库(种子)批号L0403006的Sanger序列作为参考序列。使用Sanger测序方法确定MVB序列与源质粒序列(批号L0401014)完全同源。用于测序分析的PVSRIPO样品分为四类-纯化质粒、大肠杆菌质粒库、粗制Vero收获物和MVB批次,以及纯化的病毒。四种样品类型所需的提取和制备方法有所不同。表6提供了一个总结。

[0196] 表6-为PVSRIPO完成的Sanger和NGS(依诺米那)测序总结

PVSRIPO 处理阶段	批号	Sanger测序	Illumina测序	评价
质粒	L0401014	QC-020658	未进行	N/A
MVB/种子* (原始MVB)	L0403006	QC-022271	QC-052548*	作为对照序列
毒理学*	L0603006	QC-029927	QC-052548*	来源于 2004 MVB 批次
临床DS	L0904009	QC-042162	未进行	来源于 2004 MVB 批次
临床DP	L0904010	QC-042162	QC-052908	来源于 2004 MVB 批次
参考Std.	L1310001	未进行	QC-052862	来源于 2004 MVB 批次

[0198]	MVB (新 批 次)	L1311002	进行从而恢复 极端5' 端	QC-052647	第二MVB 批次, 从质粒进行新的制 备
	临床DS (新 批 次)	L1405001	未进行	QC-053193	来源于 2004 MVB 批次
	临床DP (新 批 次)	L1402001	未进行	QC-053193	来源于 2004 MVB 批次

[0199] \*作为依诺米那方法开发处理 (非GLP) 的一部分进行测序。

[0200] 实施例8

[0201] 结果

[0202] 为了阐明PVSRIPO中碱基异质性的位置和程度,采用了深度测序的方法。先前的PVSRIPO批次,包括质粒和主病毒库材料,通过Sanger测序 (2003-2009) 进行分析。可选地,在2007-2008年用6个PVSRIPO分离物 (Dobrikova等人 (2008) Mol Ther 16:1865-1872) 进行HTB-15神经胶质瘤细胞传代和噬菌斑Sanger测序方法。这只确定了PVSRIPO基因组中的两个位点 (位置97和1824),其通过Sanger测序显示了多态性碱基 (即,由总病毒群体约15%以上组成)。通过Sanger测序在PVSRIPO中观察到的有限的病毒序列变异 (包括具有传代后斑块测序) 表明在Vero (和HTB-15神经胶质瘤细胞) 中繁殖期间,PVSRIPO比预期的脊髓灰质炎野生型或疫苗株 (Sanjuan等 (2010) J Virol 84:9733-48) 更稳定。然而,为了清楚地证明PVSRIPO的遗传稳定性,需要能够报告给定批次中的个体 (即,低拷贝) 病毒体序列的深度测序方法。表7中详细描述了商业深度测序方法的综述 (Liu等 (2012) J Biomed Biotech 2012:251364)。

[0203] 表7:相对于ssRNA病毒制剂的Sanger和深度测序方法的总结

[0204]	设备/方法	优点	缺点	备注
	Sanger, 带终止剂染料的毛细管 (ABI 3130xl)	稳健性; 易于获得; 便于理解; 对于非多态性序列, 读取长度长, 准确度高	检测所需的拷贝数较高; 多态性敏感度较低 (<20%); 尤其依赖于内部起始位点; 覆盖深度非常受限	与PVSRIPO 样本 2003-2009和 5' 末端测序 一起使用
	罗氏/454 FLX	读取长度长 (> 700 bp)	NGS的覆盖深度相对较低	与5' 末端测序一起使用
	依诺米那 HiSeq (采用 Nextera XT)	覆盖深度可能为最高 (> 1e <sup>9</sup> ); 理想用于高拷贝靶标	读取长度短 (约100 nt); 可能比其它方法表现出的错误率更	与PVSRIPO 样本 2003-2009一
[0205]			高	起使用, 除了 质粒DNA
	ABI SOLiD	低错误率; 覆盖深度中等	读取长度非常短, 导致拼接困难	未使用
	ION Torrent PGM	成本低; 使用相对简单	错误率最高, 且覆盖深度低于依诺米那 HiSeq	与5' 末端测序一起使用



[0206] 鉴于纯化的PVSRIPO样品中的短基因组长度( $<7400\text{nt}$ )和高病毒滴度( $>1 \times 10^9 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ),选择经依诺米那测序的衔接子文库制剂作为产生高质量读序的方法,同时伴有来自PVSRIPO样品的高读取深度(Neverov&Chumakov (2010) PNAS USA 107:20063-20068)。

[0207] 用2004年MVB批次(L0403006)和2006年非临床批次L0603006进行初始方法开发活动,在测试剩余批次之前对上述一般方法进行了若干改进。与MVB批次一起使用的SMARTer超低拷贝方法的优化结果之一是提高RT保真度,并识别常见RT错误基序,后来用于2013MVB批次测试分析。由于这个原因,PVSRIPO批号L0403006和L0603006具有的低频多态性(错误率)碱基位置的量比来源于L0403006MVB的其它批号更大。尽管用于方法开发的两个批次观察到较高的背景,但是它们都表现出与其他五个测试批次一致的多态性模式。

[0208] 表8显示了核酸提取和Nextera XT文库制备结果的总结。两个MVB库(L0403006和L01311002)均显示低提取质量,与这些样品中存在的较低拷贝数以及更高水平背景宿主细胞来源的核酸一致。观察到的所有七个批次的平均基因组覆盖深度范围在 $2.2 \times 10^5$ 和 $1.5 \times 10^6$ 之间,比基于回收病毒RNA质量的计算的理论最大覆盖度低大约1-2个对数。

[0209] 表8:使用PVSRIPO的依诺米那RNA提取、观察和理论最大覆盖度以及文库构建结果的总结

[0210]	PVSRIPO 批号	提取的总RNA质量	平均文库大小	理论最大覆盖度 <sup>1</sup>	观察到的平均覆盖度 <sup>2</sup>
	L1311002 (MVB) <sup>3</sup>	9.7 ng	396 bp	$\sim 2 \times 10^6$	$2.2 \times 10^5$
	L0403006 (MVB) <sup>3,4</sup>	37.0 ng	$\sim 300$ bp	$\sim 1 \times 10^7$	$1.4 \times 10^6$
	L0603006 <sup>4</sup>	228.8 ng	$\sim 300$ bp	$\sim 6 \times 10^7$	$7.5 \times 10^5$
	L0904010	214.6 ng	314 bp	$\sim 6 \times 10^7$	$4.1 \times 10^5$
	L1310001	356.9 ng	510 bp	$\sim 1 \times 10^8$	$5.1 \times 10^5$
	L1405001	376.4 ng	352 bp	$\sim 1 \times 10^8$	$1.5 \times 10^6$
[0211]	L1402001	348.5 ng	315 bp	$\sim 1 \times 10^8$	$5.7 \times 10^5$

[0212] <sup>1</sup>基于RNA提取回收和随后的cDNA合成和测序步骤的体积比例,假定100%的总RNA输入质量由PVSRIPO病毒RNA组成。

[0213] <sup>2</sup>计算与PVSRIPO参考序列匹配读序的所有碱基的平均覆盖度,假定覆盖整个病毒参考基因组的7303个碱基的深度相同。

[0214] <sup>3</sup>MVB批次未经过柱纯化,并且具有的宿主细胞核酸百分比更大,影响了病毒RNA提取产量。

[0215] <sup>4</sup>依诺米那方法开发研究结果。RNA提取和cDNA合成方法与用于后来的GLP研究使用的那些方法相似但不相同。

[0216] 如表9所详述的,各批次的平均读取长度在88和108bp之间,每个批次测序超过一个千兆碱基。在所有情况下,与来源于Sanger的MVB参考序列匹配的读序百分比都在85%和93%之间,绝大多数不匹配的读序对应于Vero细胞mtDNA、gDNA和mRNA序列,如采用随机选



择的非匹配读序通过nBLAST来确定。一小部分的非匹配读序代表了参考中缺失的极端病毒3'末端序列,并且可能包含更罕见(即迄今为止未观察到的)病毒序列,其可能含有“大”(>10nt)的且不易与PVSRIPO参考序列匹配的插入缺失标记。计算加强的病毒基因组重新拼接被用于鉴定和表征任何大的插入缺失标记(如果存在的话)以及PVSRIPO的3'末端序列异质性。表9还显示了超过“确定的变异阈值”水平的每个批次碱基位置数量-在大多数PVSRIPO基因组中,这个阈值 $\geq 0.1\%$ ,其中深度超过每个碱基4096个读序。

[0217] 表9:七批PVSRIPO的依诺米那读取深度、读取长度、参考序列匹配分数和变体位置比例的总结

[0218]	PVSRIPO 批号	经测序的总碱基 <sup>1</sup>	平均读取长度	读序与对照序列的匹配百分比	所确定的变体碱基位置数 <sup>2</sup>	变体位置与经测序碱基的比例 <sup>3</sup>
	L1311002 (MVB)	$1.61 \times 10^9$	88.9 bp	88.7%	27	$1:5.96 \times 10^7$
	L0403006 (MVB) <sup>4</sup>	$1.07 \times 10^{10}$	94.3 bp	93.1%	2183	$1:4.90 \times 10^6$
	L0603006 <sup>4</sup>	$6.29 \times 10^9$	88.2 bp	87.2%	461	$1:1.36 \times 10^7$
	L0904010	$3.47 \times 10^9$	97.3 bp	85.7%	50	$1:6.94 \times 10^7$
	L1310001	$4.06 \times 10^9$	88.0 bp	91.5%	29	$1:1.40 \times 10^8$
	L1405001	$1.27 \times 10^{10}$	108.3 bp	86.8%	331	$1:3.84 \times 10^7$
	L1402001	$4.75 \times 10^9$	106.7 bp	87.6%	112	$1:4.24 \times 10^7$

[0219] <sup>1</sup>包括不与参考序列匹配的读序。

[0220] <sup>2</sup>对于读取深度>4096的位置,多态性“确定”阈值设置为 $\geq 0.1\%$ ;对于读取深度 $\leq 4096$ ,阈值设置为 $\geq 1.0\%$ 。

[0221] <sup>3</sup>综合碱基多态性+方法错误率的总量度。

[0222] <sup>4</sup>依诺米那方法开发研究结果。RNA提取和cDNA合成方法与用于后来的GLP研究的那些方法相似但不相同,并具有较高的错误率。

[0223] 对于读取深度较大的批次,特别是对于使用Illumina方法的两个批次,观察到更多数量的多态性碱基位置。不包括两个方法开发批次(L0403006和L0603006),在其余五个测试批次中,所确定的不同碱基位置的数量在27和331之间。PVSRIPO(和脊髓灰质炎)基因组的5'端超可变区位于1至34位;如预期那样,并且尽管(或可能由于)读取深度低,如表10所述,这是病毒基因组中展现出碱基变体和多态性频率最高的区域。表10还分解了在PVSRIPO基因组每个主要区域中多态性和变体碱基位置的数目,大部分发生在脊髓灰质多聚蛋白编码序列-病毒基因组中最大的元件。

[0224] 表10:使用依诺米那深度测序比较7批次PVSRIPO中的序列变异频率和位置(碱基位置)

[0225]

PVSRIP0 批号	确定的 变异碱 基位置 数量 (Total)	变异碱 基读数 百分比 <sup>1</sup>	变异 碱基 位置/ 基因 组百 分比 <sup>2</sup>	在5' 末端 的变异碱 基位置 (1-34)	IRES中变 异碱基位 置 (35-622)	IRES V/VI结构 域中变异 碱基位置 (450-622) <sup>3</sup>	多聚蛋白 CDS中的 变异碱基 位置 (623-7255 )	3' UTR中 变异碱基 位置 (7256-730 3+)
L1311002 (MVB)	27	0.007%	0.37%	10	2	0	15	0
L0403006 (MVB) <sup>4</sup>	2183	0.189%	29.9%	25	18	0	2109	31
L0603006 <sup>4</sup>	461	0.080%	6.31%	9	3	1	442	7
L0904010	50	0.013%	0.68%	11	0	0	37	2
L1310001	29	0.007%	0.40%	4	1	1	22	2
L1405001	331	0.033%	4.53%	10	6	1	308	7
L1402001	112	0.025%	1.53%	11	1	1	97	3

[0226] <sup>1</sup>确定的变异碱基读数总数占基因组中读取的匹配碱基总数的百分比。综合碱基多态性+方法错误率的另一个总量度。

[0227] <sup>2</sup>确定的碱基变体频率作为参考基因组长度(不含29个3'UTR末端序列碱基的7303个核苷酸MVB参考标准序列)百分比。

[0228] <sup>3</sup>关键的IRES结构域,用于介导病毒基因组与eIF4G-核糖体复合物之间的相互作用。在基因组该区域中的序列多态性最可能导致对细胞内嗜性和病毒表达的潜在修饰。

[0229] <sup>4</sup>依诺米那方法开发研究结果。RNA提取和cDNA合成方法与用于后来的GLP研究的方法相似但不相同。

[0230] 细胞内病毒嗜性和致病性变化的最关键区域是介导eIF4G-核糖体复合物的结合和组装的IRES结构域V和VI。在PVSRIP0的这个区域,所分析的七个批次中的四个批次中仅观察到单个多态性(在位置618处)(表11)。由于经典鸟嘌呤占所有读序的>99.9%,因此在618位中没有发现其中三个批次具有多态性;而剩余的四批中,>97%的所有读序在第618位是鸟嘌呤。在618位呈现多态性的四个批次具有相同的替代模式(G>T>A>C)。尽管在来自于MVB的四批中在618位观察到多态性,但在亲本MVB批号(L0403006)或L0904010临床批号中没有观察到第618位的多态性。该转换是在生产中在病毒扩增期间代表位置618处的真实序列突变还是测序过程中聚合酶替代的优选位点不能立即确定,即使频率非常高(高达2.6%)提示了前者。有趣的是,在618位置取代最多(约2.6%)的PVSRIP0批次是非临床毒理学批号L0603006。该批次与以前的体内动物和异种研究一起使用,证明了PVSRIP0的非病原表型和稳定的基因型。如表11中所详述的,在一批以上的PVSRIP0中仅观察到总共5个序列变异位点,而在MVB批次中仅发现其中两个。所有5个位置都位于5'UTR IRES的位置:35、60、80、340和618。5个位点的优选的取代模式也是保守的,最关键的是两个多态性位点(位置35和60)存在于独立生成的主病毒库中。

[0231] 表11:在一个以上的批次中观察到的所有五种PVSRIP0 IRES序列变体,包括存在的多态碱基取代模式的比较。对于各个位置参考序列cDNA碱基示于列标题。

	PVSRIP0 批号	位置 35 (参考 - G)	位置60 (参考- T)	位置80 (参考- C)	位置340 (参考- A)	位置618 <sup>1</sup> (参考- G)
[0232]	L1311002 (MVB)	G 97.5% C 2.5%	T 98.4% G 1.6%	C ≥ 99.9%	A ≥ 99.9%	G ≥ 99.9%
	L0403006 (MVB)	G 98.5% C 1.0% A 0.5% T N/D <sup>2</sup>	T 98.5% G 0.7% A 0.4% C 0.4%	C ≥ 99.9%	A ≥ 99.9%	G ≥ 99.9%
	L0603006	G ≥ 99.9%	T ≥ 99.9%	C 97.7% G 2.2% T 0.1% A <0.1%	A 99.0% T 0.5% G 0.4% C <0.1%	G 97.4% T 2.5% A <0.1% C <0.1%
	L0904010 <sup>3</sup>	G ≥ 99.9%	T ≥ 99.9%	C ≥ 99.9%	A ≥ 99.9%	G ≥ 99.9%
	L1310001	G ≥ 99.9%	T ≥ 99.9%	C ≥ 99.9%	A ≥ 99.9%	G 98.1% T 1.8%
[0233]						A <0.1% C <0.1%
	L1405001 <sup>4</sup>	G 91.0% C 8.9% T 0.1% A <0.1%	T ≥ 99.9%	C 97.9% G 2.1% T 0.3% A 0.2%	A 99.1% T 0.5% G 0.4% C <0.1%	G 98.9% T 1.1% A <0.1% C <0.1%
	L1402001 <sup>4</sup>	G ≥ 99.9%	T ≥ 99.9%	C ≥ 99.9%	A ≥ 99.9%	G 99.0% T 1.0% A <0.1% C <0.1%

[0234] <sup>1</sup>618位是在关键IRES域V和VI中观察到的唯一碱基多态性。

[0235] <sup>2</sup>N/D- 未检出。

[0236] <sup>3</sup>PVSRIP0临床DP批号L0904010在病毒基因组的IRES区(位置35-622)内没有表现出“超过阈值”的碱基多态性。该区域的读取深度在3'方向上增加,并且对于每个批次的深度范围在约 $2 \times 10^2$ 到约 $8 \times 10^5$ 读长/碱基位置之间变化。请参阅附录以了解每个批次的更多详细信息。

[0237] <sup>4</sup>批号L1405001和L1402001由相同的纯化病毒组成(批量DS与瓶装DP),但批号L1402001仅显示在L1405001中观察到的碱基多态性之一。这两次检测的主要区别在于L1405001的读取深度增加了约2倍。35位的%G差异很大的原因是未知的,但可能与位置34处的显著G>A多态性和变异度高的5'UTR区域的末端相关联。

[0238] 由于RT耗竭和IRES结构域更强的二级结构,包含IRES的5'半数基因组(位置35-622)的读取深度低于平均值。尽管对RT效率有这些影响,但IRES域中读取深度仍在每个碱基位置 $10^3$ 到 $10^5$ 读序。有趣的是,2010年HTB-15异体移植研究中鉴定的两个多态性位置(位置97和1824)在PVSRIP0的依诺米那深度测序中未被鉴定为多态性,包括批次L0603006,表明在HTB-15异体移植中它们是传代之后碱基重新突变的结果。位置1824落入易发生突变的内部均聚腺嘌呤延伸范围内,但在依诺米那样品制备期间(见下文),其也可被内部寡聚dT引发部分掩蔽。

[0239] 当从3'UTR(和polyA第一链起始位点)进展到5'UTR和5'端的超可变区时,PVSRIP0依诺米那读取深度迅速减少(图4和6-11)。覆盖度的下降的发生是由于RT延迟,这可以观察到覆盖深度的周期性尖峰,以及从3'第一链引发位点进行时的RT耗竭。幸运的是,PVSRIP0在第1822-1833位(包含第1831位的单个插入性鸟嘌呤)含有11个碱基内部多腺嘌呤片段,

作为用于第一链合成的替代性内部寡聚-dT引发位点；尽管比3'聚腺嘌呤信号的延伸效率低得多。内部多腺嘌呤位点的存在使得在1822位以下(包括关键的IRES结构域)读取深度增加了约3倍。

[0240] 一个或多个PVSRIPO特异性的第一链引物序列可以用于改善病毒基因组中约4000和约2000位以下的读取深度和序列覆盖度。由于5'末端附近读取深度迅速衰减,特别是在2013年MVB批次中存在高宿主细胞背景的情况下,使用了其它几种方法来验证该区域中的病毒序列(1至约60位)。最初ION Torrent和FLX焦磷酸测序NGS方法在基因组中的位置低于35的情况下进行了最小程度的改善。即使使用3'PCR起始位点进行线性PCR“扩增”,使用NGS方法,最终极端5'末端(位置10以下)也不能恢复到每个碱基>3读长。虽然PVSRIPO的纯化批次观察到5'末端读取深度的快速降低,但是对于较低浓度和更高的宿主细胞背景MVB批次影响最严重。

[0241] 作为回收2013MVB批号L1311002 5'端的前~20个碱基的后备方法,使用Sanger方法和PVSRIPO特异性几何PCR扩增引物对其进行测序。不幸的是,这种方法回收了PCR引物序列,而不是病毒cDNA样品中存在的真实序列。这种效应的典型特征是碱基位置1作为胸腺嘧啶而不是腺嘌呤。胸腺嘧啶存在于5'PCR引物的第1位,并被错误地鉴定为Sanger来源参考序列中的第一个碱基。腺嘌呤已被无偏倚的依诺米那和其他NGS方法证实为PVSRIPO基因组cDNA第1位的真正碱基。靶向低于约2000碱基位置的PVSRIPO特异性第一链引物的使用能在极端5'末端改善cDNA拷贝数并大大提高读取深度,从而避免需要使用未纯化的低浓度病毒样品(如收获物、种子集和库)来用Sanger测序法进行补充。

[0242] 表8比较了公开的野生型脊髓灰质炎复制错误率以及用PVSRIPO深度测序的各种聚合酶估计掺入错误率。天然脊髓灰质炎碱基掺入的估计错误率为约 $9 \times 10^{-5}$ 至约 $9 \times 10^{-6}$ ,而用依诺米那扩增和测序的两种RT方法的错误率估计为约 $5 \times 10^{-4}$ ,相当于0.05%。因此,测序方法中碱基掺入错误率预期比感染细胞中的天然病毒复制错误率高出约5至55倍。

[0243] 表8:脊髓灰质炎病毒、聚合酶和PVSRIPO批次的报告和观察错误率比较。

[0244]

物种	所用处理方法	报告的掺入或复制错误率	备注
野生型脊髓灰质炎(萨宾) <sup>1</sup>	N/A - 体内速率	A. $\sim 8.9 \times 10^{-6}$ B. $\sim 9.0 \times 10^{-5}$	A. 每条链复制的错误率 B. 每个细胞感染的错误率
聚合酶: <sup>2</sup>			
ThermoScript AMV	第一链的合成	$\sim 1.0 \times 10^{-5}$	用纯化的PVSRIPO 批

[0245]

RT			次
SMARTScribe RT	MVB第一链的合成	估计约 $3 \times 10^{-5}$	用MVB 批次
NEBNext (高保真)	第二链的合成	约 $2.5 \times 10^{-6}$	用纯化的PVSRIPO 批次
SMARTer钛Taq DNA聚合酶混合物	第二链/扩增	约 $8.0 \times 10^{-5}$	用MVB 批次
Nextera XT 高保真聚合酶	文库扩增(12个循环)	估计约 $2.0 \times 10^{-6}$ 每个循环 (估计约 $2 \times 10^{-5}$ 每次扩增)	用所有PVSRIPO 批次
总体测序方法:		估计方法错误率:	
综合错误率 (估计值)	All PVSRIPO 批次	<b>估计约<math>5 \times 10^{-4}</math> (1:2000或 0.05%)</b>	受限于RT步骤的保真度
PVSRIPO 批次:		观察到的错误率:	
批次 L0403006 (MVB)	SMARTScribe RT	$1.9 \times 10^{-3}$ (0.19%)	早期开发的方法
批次 L0603006 (Tox)	ThermoScript AMV RT	$8.0 \times 10^{-4}$ (0.08%)	早期开发的方法
批次 L0904010 (DP)	ThermoScript AMV RT	$1.3 \times 10^{-4}$ (0.01%)	N/A
批次 L1310001 (Ref Std)	ThermoScript AMV RT	$6.7 \times 10^{-5}$ (0.01%)	N/A
批次 L1405001 (DS)	ThermoScript AMV RT	$3.3 \times 10^{-4}$ (0.03%)	N/A
批次 L1402001 (DP)	ThermoScript AMV RT	$2.5 \times 10^{-4}$ (0.03%)	N/A
平均错误率:	N/A	<b><math>5.8 \times 10^{-4}</math> (0.06%)</b>	所有批次来源于并包括MVB L0403006
第二MVB 批次:			
批次 L1311002 (MVB)	SMARTScribe RT	$7.2 \times 10^{-5}$ (0.01%)	来源于MVB批次的第二质粒

[0246] <sup>1</sup>参见Sanjuan等(2010) J Virol 84:9733-48获得更多细节。

[0247] <sup>2</sup>参见McInerney等(2014) Mol Biol Intl 2014:287430; Das等人(2001) Physiol Genomics 6:57-80; 和制造商的文献值。

[0248] 在分析的7批次的PVSRIPO序列中,对于匹配序列观察到的错误率在早期方法开发批次中为0.19%至0.8%,而使用最终测序方法的批次为0.01%至0.03%。在未纯化的MVB批次L1311002和纯化的病毒批次之间没有观察到错误率显著的差异。由于这些比率通常低于测序方法在0.05%时的估计的较差情况错误率,所以不能忽视的是观察到的许多较低频率变体事实上是聚合酶掺入错误的结果并且不代表真正的病毒序列变异。基于所观察到的高频率多态性碱基,在2004MVB和2006年毒理学批次预优化中,这一点似乎尤其确切。一个有趣的观察结果是,随着读取深度的增加而鉴定的多态性碱基也增加(即>0.1%变异);这在病毒基因组的3'末端(包含天然脊髓灰质炎聚合酶CDS和3'UTR区域)尤其明显。该区域的许多碱基变异可能是聚合酶误掺入的结果,而不是真正的病毒多态性。数据的额外分析正在进一步对这些变体进行表征,以努力鉴定在测序方法的体外聚合和扩增步骤期间促进聚合酶错误掺入事件的序列基序。

[0249] 附图5A-5NN中提供了附加的信息,其显示了PVSRIPO MVB的结果。

[0250] 讨论

[0251] 通过依诺米那深度测序检查的7批PVSRIPO病毒在整个嵌合病毒基因组上显示出惊人的序列微异质性限制,平均读取深度超过每个碱基 $2 \times 10^5$ 。观察到的序列变异,除了极端的5'末端之外,均显示出相对于经典参考序列 $<1\%$ 的总异质碱基响应,并且在一批以上的PVSRIPO中仅重复观察到仅5个多态性位置。这五个反复出现的异质性位置都位于HRV2IRES(位置35、60、80、340和618)内,并且在所有测试的批次中观察到其相关的碱基置换模式是一致的。这表明PVSRIPO临床批次中存在的有限变异来源于最初存在于亲本MVB批次(即位置35和60)中的变异,或可能代表病毒复制或cDNA测序期间聚合酶错误掺入的优选模式。用于通过体外转录和转染产生MVB的质粒DNA可能是七个PVSRIPO批次中观察到的基础变异模式的第三个来源。

[0252] PVSRIPO的NGS验证了先前的分析和神经毒性数据,这些数据表明PVSRIPO是出乎意料稳定的单链RNA病毒。因此,在使用第二MVB批次的PVSRIPO(批号L1311002)之前,考虑到所观察到的低水平微观异质性以及其序列变异模式与2004年制备的来源于第一批MVB的早期PVSRIPO临床批次的一致性,可能无需进行大规模非人灵长类体内神经毒性研究。另外的测序开发工作或者正在进行中(即用于回收3'UTR序列的重组装),或者有必要提高病毒序列关键5'UTR的覆盖深度。由于PVSRIPO相对于野生型脊髓灰质炎病毒的独特特征是由于存在HRV2衍生的IRES,所以使用NHP或患者来源样品的进一步施用后深度测序研究可用于确定突变率和临床相关的体内设置中HRV2IRES重组物的潜力。

[0253] 本发明提供的结果提供了一个基线,可以比较未来的临床研究。IRES区域缺乏显著的碱基异质性,包括2013MVB批次L1311002和在制造期间在Vero细胞内扩增的5个批次,证实了PVSRIPO在遗传上是稳定的,并且批次间病毒表达、表型和致病性的变化在使用良好表征的MVB时不太可能(发生的)。

[0254] 鉴于可以应用本发明原理的许多可能的实施例,应当认识到,所示的实施方式仅是本发明的例子,而不应被视为对于本发明范围的限制。相反,本发明的范围由随附权利要求限定。因此我们对属于这些权利要求范围和精神范围内的所有发明要求享有权利。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 美国政府(由卫生和人类服务部的部长所代表);
- [0003] 美国国际生物技术有限公司
- [0004] <120> 分析RNA病毒来源治疗剂的方法
- [0005] <130> 4239-96898-02
- [0006] <150> US 62/199,663
- [0007] <151> 2015-07-31
- [0008] <160> 80
- [0009] <170> PatentIn version 3.5
- [0010] <210> 1
- [0011] <211> 19
- [0012] <212> DNA
- [0013] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0014] <400> 1
- [0015] caaacaatgg acaaggtgt 19
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 18
- [0018] <212> DNA
- [0019] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0020] <400> 2
- [0021] tcctgataaa aacatccc 18
- [0022] <210> 3
- [0023] <211> 19
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0026] <400> 3
- [0027] attcgccgta ccagagatg 19
- [0028] <210> 4
- [0029] <211> 20
- [0030] <212> DNA
- [0031] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0032] <400> 4
- [0033] tgtgagttca atggattaag 20
- [0034] <210> 5
- [0035] <211> 20
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213> 人工序列(artificial sequence)
- [0038] <400> 5

[0039] tgttctgtgg atccatgatg 20  
[0040] <210> 6  
[0041] <211> 19  
[0042] <212> DNA  
[0043] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0044] <400> 6  
[0045] ccgtgaaacg gtgggggcg 19  
[0046] <210> 7  
[0047] <211> 19  
[0048] <212> DNA  
[0049] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0050] <400> 7  
[0051] gggcatgcct taaatcaag 19  
[0052] <210> 8  
[0053] <211> 20  
[0054] <212> DNA  
[0055] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0056] <400> 8  
[0057] gccctggagt ggattacaag 20  
[0058] <210> 9  
[0059] <211> 21  
[0060] <212> DNA  
[0061] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0062] <400> 9  
[0063] caaggtgaca gttggttgaa g 21  
[0064] <210> 10  
[0065] <211> 19  
[0066] <212> DNA  
[0067] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0068] <400> 10  
[0069] caggtaaadc ttagcaac 19  
[0070] <210> 11  
[0071] <211> 20  
[0072] <212> DNA  
[0073] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0074] <400> 11  
[0075] tgaaatgtgt aagaactgtc 20  
[0076] <210> 12  
[0077] <211> 19



[0078] <212> DNA  
[0079] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0080] <400> 12  
[0081] gcagtggctg gagttgtct 19  
[0082] <210> 13  
[0083] <211> 20  
[0084] <212> DNA  
[0085] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0086] <400> 13  
[0087] ctgagacaaa tgatggagtc 20  
[0088] <210> 14  
[0089] <211> 19  
[0090] <212> DNA  
[0091] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0092] <400> 14  
[0093] aaacgatccc aggcttaag 19  
[0094] <210> 15  
[0095] <211> 21  
[0096] <212> DNA  
[0097] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0098] <400> 15  
[0099] cctacaaggg catagattta g 21  
[0100] <210> 16  
[0101] <211> 18  
[0102] <212> DNA  
[0103] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0104] <400> 16  
[0105] attgctccca gagtactc 18  
[0106] <210> 17  
[0107] <211> 21  
[0108] <212> DNA  
[0109] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0110] <400> 17  
[0111] tggcattact ggatgaataa g 21  
[0112] <210> 18  
[0113] <211> 20  
[0114] <212> DNA  
[0115] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0116] <400> 18

---

[0117]	tctccgaatc cgattttctc 20
[0118]	<210> 19
[0119]	<211> 18
[0120]	<212> DNA
[0121]	<213> 人工序列 (artificial sequence)
[0122]	<400> 19
[0123]	tcgcttcagg gccgctgc 18
[0124]	<210> 20
[0125]	<211> 19
[0126]	<212> DNA
[0127]	<213> 人工序列 (artificial sequence)
[0128]	<400> 20
[0129]	ggtgaagcgt gggttggta 19
[0130]	<210> 21
[0131]	<211> 20
[0132]	<212> DNA
[0133]	<213> 人工序列 (artificial sequence)
[0134]	<400> 21
[0135]	caggaggggg actcgtcttg 20
[0136]	<210> 22
[0137]	<211> 19
[0138]	<212> DNA
[0139]	<213> 人工序列 (artificial sequence)
[0140]	<400> 22
[0141]	ctgacattat tgaatagaa 19
[0142]	<210> 23
[0143]	<211> 22
[0144]	<212> DNA
[0145]	<213> 人工序列 (artificial sequence)
[0146]	<400> 23
[0147]	tcaagttctt aagtagcttt tc 22
[0148]	<210> 24
[0149]	<211> 19
[0150]	<212> DNA
[0151]	<213> 人工序列 (artificial sequence)
[0152]	<400> 24
[0153]	ccctgcgttg caattgcac 19
[0154]	<210> 25
[0155]	<211> 19

[0156] <212> DNA  
[0157] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0158] <400> 25  
[0159] tagagggagt cacctagtg 19  
[0160] <210> 26  
[0161] <211> 19  
[0162] <212> DNA  
[0163] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0164] <400> 26  
[0165] ctgagttatc cacggttat 19  
[0166] <210> 27  
[0167] <211> 19  
[0168] <212> DNA  
[0169] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0170] <400> 27  
[0171] gacgactatt ctggtttgg 19  
[0172] <210> 28  
[0173] <211> 18  
[0174] <212> DNA  
[0175] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0176] <400> 28  
[0177] agagtatggg atcgtctg 18  
[0178] <210> 29  
[0179] <211> 19  
[0180] <212> DNA  
[0181] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0182] <400> 29  
[0183] taccatacta tctatcgag 19  
[0184] <210> 30  
[0185] <211> 19  
[0186] <212> DNA  
[0187] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0188] <400> 30  
[0189] atgtcccgca gtgcatcag 19  
[0190] <210> 31  
[0191] <211> 19  
[0192] <212> DNA  
[0193] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0194] <400> 31

[0195] tggtagaacc accatacgc 19  
[0196] <210> 32  
[0197] <211> 19  
[0198] <212> DNA  
[0199] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0200] <400> 32  
[0201] cgaccagcca aacgatttc 19  
[0202] <210> 33  
[0203] <211> 18  
[0204] <212> DNA  
[0205] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0206] <400> 33  
[0207] gagtcccatg tcccgcag 18  
[0208] <210> 34  
[0209] <211> 21  
[0210] <212> DNA  
[0211] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0212] <400> 34  
[0213] ccaacatacg gtaccgagat c 21  
[0214] <210> 35  
[0215] <211> 21  
[0216] <212> DNA  
[0217] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0218] <400> 35  
[0219] tgctttcacc aggtgaagcg t 21  
[0220] <210> 36  
[0221] <211> 24  
[0222] <212> DNA  
[0223] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0224] <400> 36  
[0225] tacccgtgaa agtgcctcct ttct 24  
[0226] <210> 37  
[0227] <211> 24  
[0228] <212> DNA  
[0229] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0230] <400> 37  
[0231] tgcaactacc atttgccac tcag 24  
[0232] <210> 38  
[0233] <211> 24

[0234] <212> DNA  
[0235] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0236] <400> 38  
[0237] aatgtccatg tcgaacgcaa agcg 24  
[0238] <210> 39  
[0239] <211> 27  
[0240] <212> DNA  
[0241] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0242] <400> 39  
[0243] atttaccctt acagcagtat gacccaa 27  
[0244] <210> 40  
[0245] <211> 24  
[0246] <212> DNA  
[0247] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0248] <400> 40  
[0249] tgtatgttcc tgcggtgct gtga 24  
[0250] <210> 41  
[0251] <211> 25  
[0252] <212> DNA  
[0253] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0254] <400> 41  
[0255] ttaaaacagc tctggggttg taccc 25  
[0256] <210> 42  
[0257] <211> 26  
[0258] <212> DNA  
[0259] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0260] <400> 42  
[0261] tttttatcag gacatccttg atgggc 26  
[0262] <210> 43  
[0263] <211> 21  
[0264] <212> DNA  
[0265] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0266] <400> 43  
[0267] tatattggca ccatgggagc t 21  
[0268] <210> 44  
[0269] <211> 21  
[0270] <212> DNA  
[0271] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0272] <400> 44

[0273] ggaccaacaa ctgtgctaca c 21  
[0274] <210> 45  
[0275] <211> 21  
[0276] <212> DNA  
[0277] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0278] <400> 45  
[0279] aagtcaaagg gaatcatggt g 21  
[0280] <210> 46  
[0281] <211> 21  
[0282] <212> DNA  
[0283] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0284] <400> 46  
[0285] gctctatatg tgtggtatct c 21  
[0286] <210> 47  
[0287] <211> 21  
[0288] <212> DNA  
[0289] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0290] <400> 47  
[0291] tatgtgtggt atctcgcatc a 21  
[0292] <210> 48  
[0293] <211> 21  
[0294] <212> DNA  
[0295] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0296] <400> 48  
[0297] tggtggagag ggggtgaagc g 21  
[0298] <210> 49  
[0299] <211> 21  
[0300] <212> DNA  
[0301] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0302] <400> 49  
[0303] ggtgaccagt accatcactg a 21  
[0304] <210> 50  
[0305] <211> 21  
[0306] <212> DNA  
[0307] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0308] <400> 50  
[0309] tttcagctat ggctctagca a 21  
[0310] <210> 51  
[0311] <211> 21

- [0312] <212> DNA  
[0313] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0314] <400> 51  
[0315] catcttttagt gcctcgaacc a 21  
[0316] <210> 52  
[0317] <211> 21  
[0318] <212> DNA  
[0319] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0320] <400> 52  
[0321] gactatggac taactatgac t 21  
[0322] <210> 53  
[0323] <211> 21  
[0324] <212> DNA  
[0325] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0326] <400> 53  
[0327] ttacattctc ccatgtgact g 21  
[0328] <210> 54  
[0329] <211> 21  
[0330] <212> DNA  
[0331] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0332] <400> 54  
[0333] atcacgttcg ctctctgtgc c 21  
[0334] <210> 55  
[0335] <211> 24  
[0336] <212> DNA  
[0337] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0338] <400> 55  
[0339] tgtgttccca acatgcctc ctta 24  
[0340] <210> 56  
[0341] <211> 21  
[0342] <212> DNA  
[0343] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0344] <400> 56  
[0345] cagccctgct tggttcgagg c 21  
[0346] <210> 57  
[0347] <211> 21  
[0348] <212> DNA  
[0349] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0350] <400> 57

[0351] cttctaagtt gaattcctaa g 21  
[0352] <210> 58  
[0353] <211> 19  
[0354] <212> DNA  
[0355] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0356] <400> 58  
[0357] tcttctttcc cattgctac 19  
[0358] <210> 59  
[0359] <211> 22  
[0360] <212> DNA  
[0361] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0362] <400> 59  
[0363] gagcaggaca gtgtggtgga gt 22  
[0364] <210> 60  
[0365] <211> 22  
[0366] <212> DNA  
[0367] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0368] <400> 60  
[0369] gcaagggaga gttcactatg tt 22  
[0370] <210> 61  
[0371] <211> 19  
[0372] <212> DNA  
[0373] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0374] <400> 61  
[0375] tgcggttaac gatcgcagt 19  
[0376] <210> 62  
[0377] <211> 20  
[0378] <212> DNA  
[0379] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0380] <400> 62  
[0381] tcattctgccca ggtctaccag 20  
[0382] <210> 63  
[0383] <211> 21  
[0384] <212> DNA  
[0385] <213> 人工序列(artificial sequence)  
[0386] <400> 63  
[0387] ctagtactcc ggtattgcgg t 21  
[0388] <210> 64  
[0389] <211> 19



[0390] <212> DNA  
[0391] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0392] <400> 64  
[0393] catcgctcc ttacgcttc 19  
[0394] <210> 65  
[0395] <211> 20  
[0396] <212> DNA  
[0397] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0398] <400> 65  
[0399] gtggccatta taaccgtgga 20  
[0400] <210> 66  
[0401] <211> 20  
[0402] <212> DNA  
[0403] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0404] <400> 66  
[0405] gtttgccatg tgtagtcgtc 20  
[0406] <210> 67  
[0407] <211> 20  
[0408] <212> DNA  
[0409] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0410] <400> 67  
[0411] gatctcggta ccgtatgttg 20  
[0412] <210> 68  
[0413] <211> 20  
[0414] <212> DNA  
[0415] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0416] <400> 68  
[0417] ctctatggtg cagcatctct 20  
[0418] <210> 69  
[0419] <211> 19  
[0420] <212> DNA  
[0421] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0422] <400> 69  
[0423] actcagcaga ttggagaca 19  
[0424] <210> 70  
[0425] <211> 19  
[0426] <212> DNA  
[0427] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0428] <400> 70

[0429] gatggttatc catccagtc 19  
[0430] <210> 71  
[0431] <211> 18  
[0432] <212> DNA  
[0433] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0434] <400> 71  
[0435] gtcgaagtgt gatggatc 18  
[0436] <210> 72  
[0437] <211> 19  
[0438] <212> DNA  
[0439] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0440] <400> 72  
[0441] catggcatcc ctggaggag 19  
[0442] <210> 73  
[0443] <211> 19  
[0444] <212> DNA  
[0445] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0446] <400> 73  
[0447] agcctccata caattgcc 19  
[0448] <210> 74  
[0449] <211> 20  
[0450] <212> DNA  
[0451] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0452] <400> 74  
[0453] gtcctttagt gtgtggtaag 20  
[0454] <210> 75  
[0455] <211> 18  
[0456] <212> DNA  
[0457] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0458] <400> 75  
[0459] tggcatccaa gatctcca 18  
[0460] <210> 76  
[0461] <211> 19  
[0462] <212> DNA  
[0463] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
[0464] <400> 76  
[0465] cactgtcctg ctctggttg 19  
[0466] <210> 77  
[0467] <211> 24

[0468] <212> DNA  
 [0469] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
 [0470] <400> 77  
 [0471] tagtaacgcg gcttcgaaac agga 24  
 [0472] <210> 78  
 [0473] <211> 26  
 [0474] <212> DNA  
 [0475] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
 [0476] <400> 78  
 [0477] tttttatcag gacatccttg atgggc 26  
 [0478] <210> 79  
 [0479] <211> 17  
 [0480] <212> DNA  
 [0481] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
 [0482] <400> 79  
 [0483] gtaaaacgac ggccagt 17  
 [0484] <210> 80  
 [0485] <211> 7303  
 [0486] <212> DNA  
 [0487] <213> 人工序列 (artificial sequence)  
 [0488] <400> 80  
 [0489] ttaaaacagc tctggggttg taccacccc agaggccac gtggcggcta gtactccggt 60  
 [0490] attgcggtac cctgtacgc ctgttttata ctcccttccc gtaacttagg aattcaactt 120  
 [0491] agaagttttt cacaaagacc aatagccggt aatcagccag attactgaag gtcaagcact 180  
 [0492] tctgtttccc cggatcaatgt tgatatgctc caacagggca aaaacaactg cgatcgtaa 240  
 [0493] ccgcaaagcg cctacgcaa gcttagtagc atctttgaaa tcgtttggct ggtcgatccg 300  
 [0494] ccatttcccc tggtagacct ggcagatgag gctagaaata cccactggc gacagtgttc 360  
 [0495] tagcctgcgt ggctgcctgc acaccctatg ggtgtgaagc caaacaatgg acaaggtgtg 420  
 [0496] aagagccccg tgtgctcgct ttgagtcctc cggccctga atgtggctaa ccttaaccct 480  
 [0497] gcagctagag cacgtaaccc aatgtgtatc tagtcgtaat gagcaattgc gggatgggac 540  
 [0498] caactacttt ggggtgtccgt gtttcacttt ctctttata tttgcttatg gtgacaatat 600  
 [0499] atacaatata tatattggca ccatgggagc tcaggtttca tcacagaaag tgggcgcaca 660  
 [0500] tgaaaactca aatagagcgt atggtggttc taccattaat tacaccacca ttaattatta 720  
 [0501] tagagattca gctagtaacg cggttcgaa acaggacttc tctcaagacc ctccaagtt 780  
 [0502] caccgagccc atcaaggatg tcctgataaa aacatcccca atgctaaact cgccaaacat 840  
 [0503] agaggcttgc gggatatagc atagagtact gcaattaaca ctgggaaact ccactataac 900  
 [0504] cacacaggag gcggctaatt cagtagtcgc ttatgggcgt tggcctgaat atctgaggga 960  
 [0505] cagcgaagcc aatccagtgg accagccgac agaaccagac gtcgctgcat gcaggtttta 1020  
 [0506] tacgctagac accgtgtcct ggacgaaaga gtcgcgaggg tgggtggtgga agttgcctga 1080

[0507]	tgcactgcgg	gacatgggac	tctttggcca	aaatatgtac	taccactacc	taggtaggtc	1140
[0508]	cgggtacacc	gtgcatgtac	agtgtaacgc	ctccaaattc	caccaggggg	cactaggggt	1200
[0509]	attcgccgta	ccagagatgt	gtctggccgg	ggatagcaac	accactacca	tgcacaccag	1260
[0510]	ctatcaaaat	gccaatcctg	gcgagaaagg	aggcactttc	acgggtacgt	tcactcctga	1320
[0511]	cgacaaccag	acatcacctg	cccgtagggt	ctgcccgggtg	gattacctct	ttggaaatgg	1380
[0512]	cacgttattg	gggaatgcct	ttgtgttccc	gcaccagata	ataaacctac	ggaccaacaa	1440
[0513]	ctgtgctaca	ctgggtactcc	cttacgtgaa	ctccctctcg	atagatagta	tggtaaagca	1500
[0514]	caataattgg	ggaattgcaa	tattaccatt	ggccccatta	aatttttgcta	gtgagtcctc	1560
[0515]	cccagagatt	ccaatcacct	tgaccatagc	ccctatgtgc	tgtgagttca	atggattaag	1620
[0516]	aaacattacc	ctgccacgct	tacagggcct	gccgggtcatg	aacaccccctg	gtagcaatca	1680
[0517]	atatcttact	gcagacaact	tccagtcacc	gtgtgcgctg	cctgaatttg	atgtgacccc	1740
[0518]	acctattgac	atacccggtg	aagttaagaa	catgatggaa	ttggcagaaa	tcgacaccat	1800
[0519]	gattcccttt	gacttaagtg	caaaaaaaaa	gaacaccatg	gaaatgtata	gggttcgggt	1860
[0520]	aagtgacaaa	ccacatacag	acgatcccat	actctgcctg	tcactctctc	cagcttcaga	1920
[0521]	tcctaggttg	tcacatacta	tgccttgaga	aatcctaaat	tactacacac	actgggcagg	1980
[0522]	atccctgaag	ttcacgtttc	tgttctgtgg	atccatgatg	gcaactggca	aactgttggt	2040
[0523]	gtcatacgcg	cctcctggag	ccgaccacc	aaagaagcgt	aaggaggcga	tgttggaac	2100
[0524]	acatgtgatc	tgggacatag	gactgcagtc	ctcatgtact	atggtagtgc	catggattag	2160
[0525]	caacaccacg	tatcgcaaaa	ccatagatga	tagtttcacc	gaaggcggat	acatcagcgt	2220
[0526]	cttctaccaa	accagaatag	tcgtccctct	ttcgacaccc	agagagatgg	acatccttgg	2280
[0527]	ttttgtgtca	gcgtgtaatg	acttcagcgt	gcgcttgatg	cgagatacca	cacatataga	2340
[0528]	gcaaaaagcg	ctagcacagg	ggttaggtca	gatgcttgaa	agcatgattg	acaacacagt	2400
[0529]	ccgtgaaacg	gtgggggcgg	caacgtctag	agacgctctc	caaacactg	aagccagtgg	2460
[0530]	accagcacac	tccaaggaaa	ttccggcact	caccgcagtg	gaaactgggg	ccacaaatcc	2520
[0531]	actagtcctt	tctgatacag	tgcaaacacc	acatgttgta	caacatagggt	caaggtcaga	2580
[0532]	gtctagcata	gagtctttct	tcgcgcgggg	tgcatgcgtg	gccattataa	ccgtggataa	2640
[0533]	ctcagcttcc	accaagaata	aggataagct	atttacagtg	tggaagatca	cttataaaga	2700
[0534]	tactgtccag	ttacggagga	aattggagtt	cttcacctat	tctagatttg	atatggaatt	2760
[0535]	tacctttgtg	gttactgcaa	atttcactga	gactaacaat	gggcatgcct	taaatacaagt	2820
[0536]	gtaccaaat	atgtacgtac	caccaggcgc	tccagtgcct	gagaaatggg	acgactacac	2880
[0537]	atggcaaacc	tcatcaaate	catcaatctt	ttacacctac	ggaacagctc	cagcccggat	2940
[0538]	ctcggtaccg	tatgttggtg	tttcgaacgc	ctattcacac	ttttacgacg	gtttttccaa	3000
[0539]	agtaccactg	aaggaccagt	cggcagcact	aggtgactcc	ctctatgggtg	cagcatctct	3060
[0540]	aaatgacttc	ggtattttgg	ctgttagagt	agtcaatgat	cacaaccoga	ccaaggtcac	3120
[0541]	ctccaaaatc	agagtgtatc	taaaacccaa	acacatcaga	gtctggtgcc	cgcgtccacc	3180
[0542]	gagggcagtg	gcgtactacg	gccctggagt	ggattacaag	gatggtacgc	ttacaccct	3240
[0543]	ctccaccaag	gatctgacca	cataatggatt	cggacaccaa	aacaaagcgg	tgtacactgc	3300
[0544]	aggttacaaa	atttgcaact	accatttggc	cactcaggaa	gatttgcaaa	acgcagtga	3360
[0545]	cgtcatgtgg	aatagagacc	tcttagtcac	agaatcaaga	gcccagggca	ccgattcaat	3420

[0546]	cgcaaggtgc aattgcaacg caggggtgta ctactgcgag tctagaagga aatactaccc	3480
[0547]	agtatccttc gttggcccaa cgttccagta catggaggct aataactatt acccagctag	3540
[0548]	gtaccagtcc catatgctca ttggccatgg attcgcatct ccaggggatt gtggtggcat	3600
[0549]	actcagatgt caccacgggg tgataggat cattactgct ggtggagaag ggttggttgc	3660
[0550]	atttacagac attagagact tgtatgccta cgaagaagaa gccatggaac aaggcatcac	3720
[0551]	caattacata gagtcacttg gggccgcatt tggaagtgga ttactcagc agattggaga	3780
[0552]	caaaataaca gagttgacta atatggtgac cagtaccatc actgaaaagc tacttaagaa	3840
[0553]	cttgatcaag atcatatcct cactagttat tataactagg aattatgaag acaccacaac	3900
[0554]	agtgcctgct accctggccc ttcttgggtg tgatgcttca ccatggcagt ggcttagaaa	3960
[0555]	gaaagcatgc gatgttctgg agatacctta tgtcaccaag caagtgaca gttggttgaa	4020
[0556]	gaagtttact gaagcatgca acgcagctaa gggactggag tgggtgtcaa acaaaatctc	4080
[0557]	aaaattcatt gattggctca aggagaaaat tatcccacaa gctagagata agttggaatt	4140
[0558]	tgtaacaaaa cttagacaac tagaaatgct ggaaaaccaa atctcaacta tacaccaatc	4200
[0559]	atgccctagt caggaacacc aggaaattct attcaataat gtcagatggt tatccatcca	4260
[0560]	gtctaagagg tttgccctc tttagcagtg ggaagccaaa agaatacaga aactagagca	4320
[0561]	taccattaac aactacatac agttcaagag caaacaccgt attgaaccag tatgtttgct	4380
[0562]	agtacatggc agccccggaa caggtaaate tgtagcaacc aacctgattg ctagagccat	4440
[0563]	agctgaaaga gaaaacacgt ccacgtactc gctacccccg gatccatcac acttcgacgg	4500
[0564]	atacaaacia caggagtggt tgattatgga cgacctgaat caaaaccag atggtgcgga	4560
[0565]	catgaagctg ttctgtcaga tggatatcaac agtggagttt ataccaccca tggcatccct	4620
[0566]	ggaggagaaa ggaatcctgt ttacttcaaa ttacgttcta gcatccacga actcaagcag	4680
[0567]	aatttcccc cccactgtgg cacacagtga tgcattagcc aggcgctttg cgttcgacat	4740
[0568]	ggacattcag gtcattgaatg agtattctag agatgggaaa ttgaacatgg ccatggctac	4800
[0569]	tgaaatgtgt aagaactgtc accaaccagc aaactttaag agatgctgtc ctttagtgtg	4860
[0570]	tggtaaggca attcaattaa tggataaatc ttccagagtt agatacagta ttgaccagat	4920
[0571]	cactacaatg attatcaatg agagaaacag aagatccaac attggcaatt gtatggaggc	4980
[0572]	tttgttccaa ggaccactcc agtataaaga cttgaagatt gacatcaaga cgagtcccc	5040
[0573]	tcctgaatgt atcaatgact tgctccaagc agttgactcc caggaggtga gagattactg	5100
[0574]	tgagaagaag ggttgatag tcaacatcac cagccaggtt caaacagaaa ggaacatcaa	5160
[0575]	cagggaatg acaattctac aagcgggtgac aaccttcgcc gcagtggctg gagttgtcta	5220
[0576]	tgtcatgtat aaactgtttg ctggacacca gggagcatac actggtttac caaacaaaa	5280
[0577]	accaacgtg cccaccatta ggacagcaaa ggtacaaggg ccagggttcg attacgcagt	5340
[0578]	ggctatggct aaaagaaaca ttgttacagc aactactagc aaggagagat tcactatgtt	5400
[0579]	aggagtccac gacaacgtgg ctattttacc aaccacgct tcacctgggtg aaagcattgt	5460
[0580]	gatcgatggc aaagaagtgg agatcttggg tgccaaagcg ctcgaagatc aagcaggaa	5520
[0581]	caatcttgaa atcactataa tcactctaaa gagaaatgaa aagttcagag acattagacc	5580
[0582]	acatatacct actcaaatca ctgagacaaa tgatggagtc ttgatcgtga acactagcaa	5640
[0583]	gtaccccaat atgtatgttc ctgtcgggtgc tgtgactgaa cagggatatc taaatctcgg	5700
[0584]	tgggcgcaaa actgctcgta ctctaattgta caactttcca accagagcag gacagtgtgg	5760

[0585]	tggagtcac	acatgtactg	ggaaagtc	cgggatgc	gttgggtgga	acggttcaca	5820
[0586]	cgggtttgca	gcggccctga	agcgatcata	cttcactcag	agtcaaggtg	aaatccagtg	5880
[0587]	gatgagacct	tcgaaggaag	tgggatatcc	aatcataaat	gccccgtcca	aaaccaagct	5940
[0588]	tgaacccagt	gctttccact	atgtgtttga	aggggtgaag	gaaccagcag	tcctcactaa	6000
[0589]	aaacgatccc	aggcttaaga	caaactttga	ggaggcaatt	ttctccaagt	acgtgggtaa	6060
[0590]	caaaattact	gaagtggatg	agcacatgaa	agaggcagta	gaccactatg	ctggccagct	6120
[0591]	catgtcacta	gacatcaaca	cagaacaaat	gtgcttggag	gatgccatgt	atggcactga	6180
[0592]	tggtctagaa	gcacttgatt	tgtccaccag	tgctggctac	ccttatgtag	caatgggaaa	6240
[0593]	gaagaagaga	gatatcttga	acaaacaaac	cagagacact	aaggaaatgc	aaaaactgct	6300
[0594]	cgacacatat	ggaatcaacc	tcccactggg	gacttatgta	aaggatgaac	ttagatccaa	6360
[0595]	aacaaaggtt	gagcagggga	aatccagatt	aattgaagct	tctagtttga	atgactcagt	6420
[0596]	ggcaatgaga	atggcttttg	ggaacctata	tgctgctttt	cacaaaaacc	caggagtgat	6480
[0597]	aacaggttca	gcagtagggg	gcgatccaga	tttgttttgg	agcaaaattc	cgggtattgat	6540
[0598]	ggaagagaag	ctgtttgcct	ttgactacac	agggtatgat	gcattctctca	gccctgcttg	6600
[0599]	gttcgaggca	ctaaagatgg	tgcttgagaa	aatcggattc	ggagacagag	ttgactacat	6660
[0600]	cgactaccta	aaccactcac	accacctgta	caagaataaa	acatactgtg	tcaagggcgg	6720
[0601]	tatgccatct	ggttgctcag	gcacttcaat	ttttaactca	atgattaaca	acttgattat	6780
[0602]	caggacactc	ttactgaaaa	cctacaaggg	catagattta	gaccacctaa	aatgattgc	6840
[0603]	ctatggatg	gatgtaattg	cttcctaccc	ccatgaagtt	gacgctagtc	tcctagccca	6900
[0604]	atcaggaaaa	gactatggac	taactatgac	tccagctgac	aaatcagcta	tatttgaaac	6960
[0605]	agtcacatgg	gagaatgtaa	cattcttgaa	gagattcttc	agggcagacg	agaaataccc	7020
[0606]	atttcttatt	catccagtaa	tgccaatgaa	ggaaattcat	gaatcaatta	gatggacaaa	7080
[0607]	agatcctagg	aacactcagg	atcacgttcg	ctctctgtgc	ctattagctt	ggcacaatgg	7140
[0608]	cgaagaagaa	tataacaaat	tcctagctaa	aatcaggagt	gtgccaattg	gaagagcttt	7200
[0609]	attgctccca	gagtactcaa	cattgtaccg	ccgttggctt	gactcatttt	agtaacccta	7260
[0610]	cctcagtcga	attggattgg	gtcactactgc	tgtaggggta	aat		7303

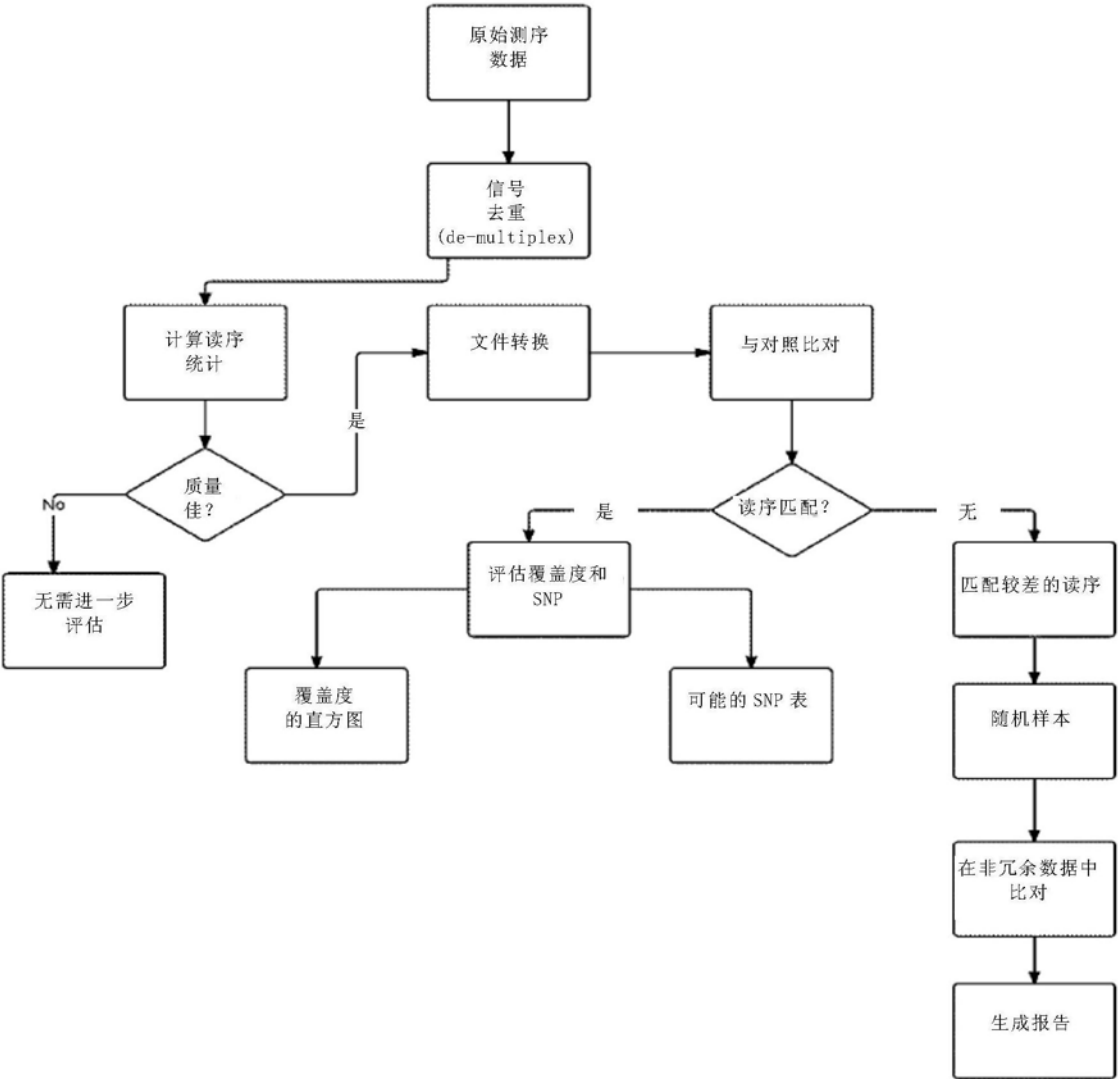


图1

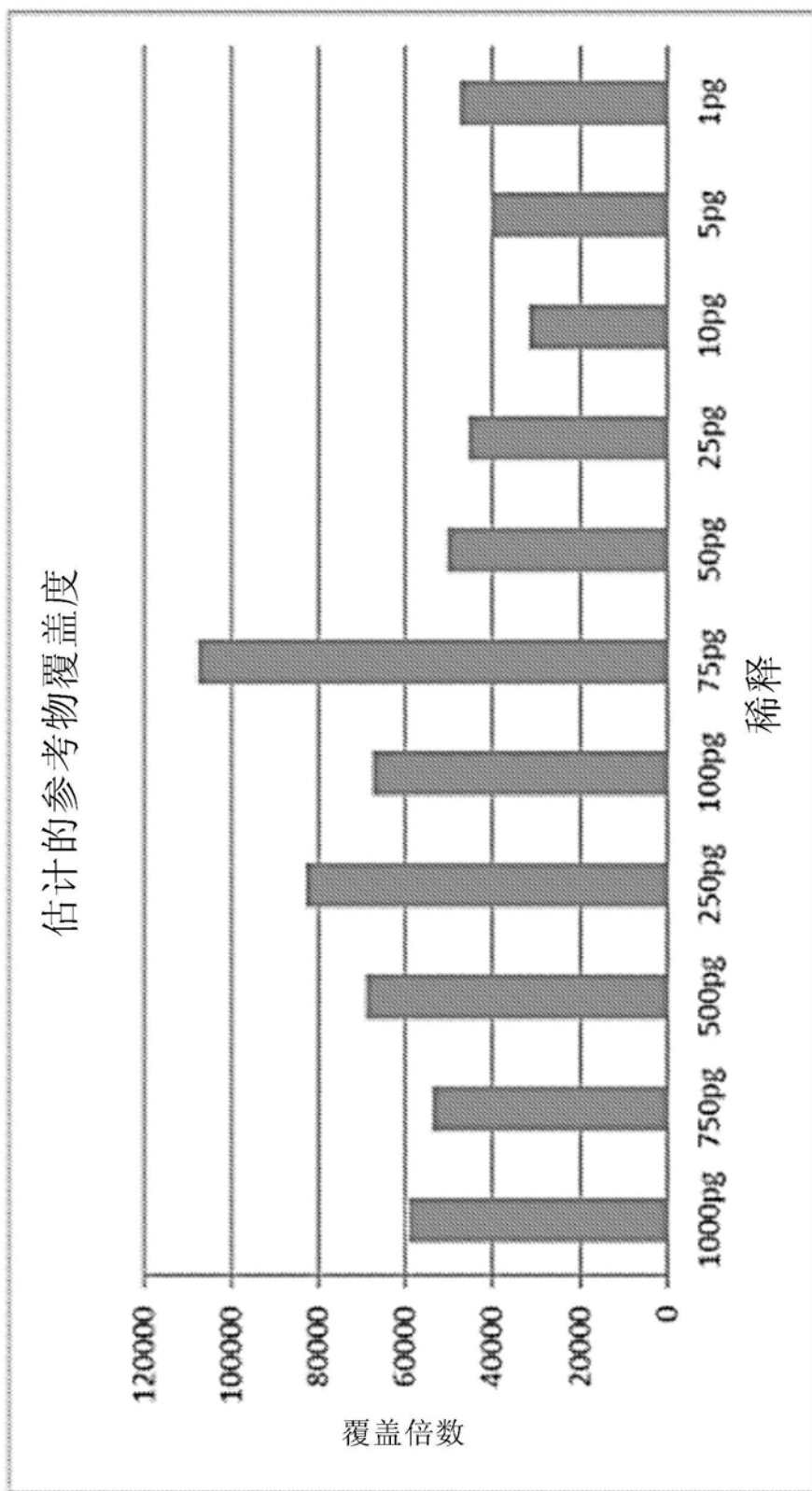


图2



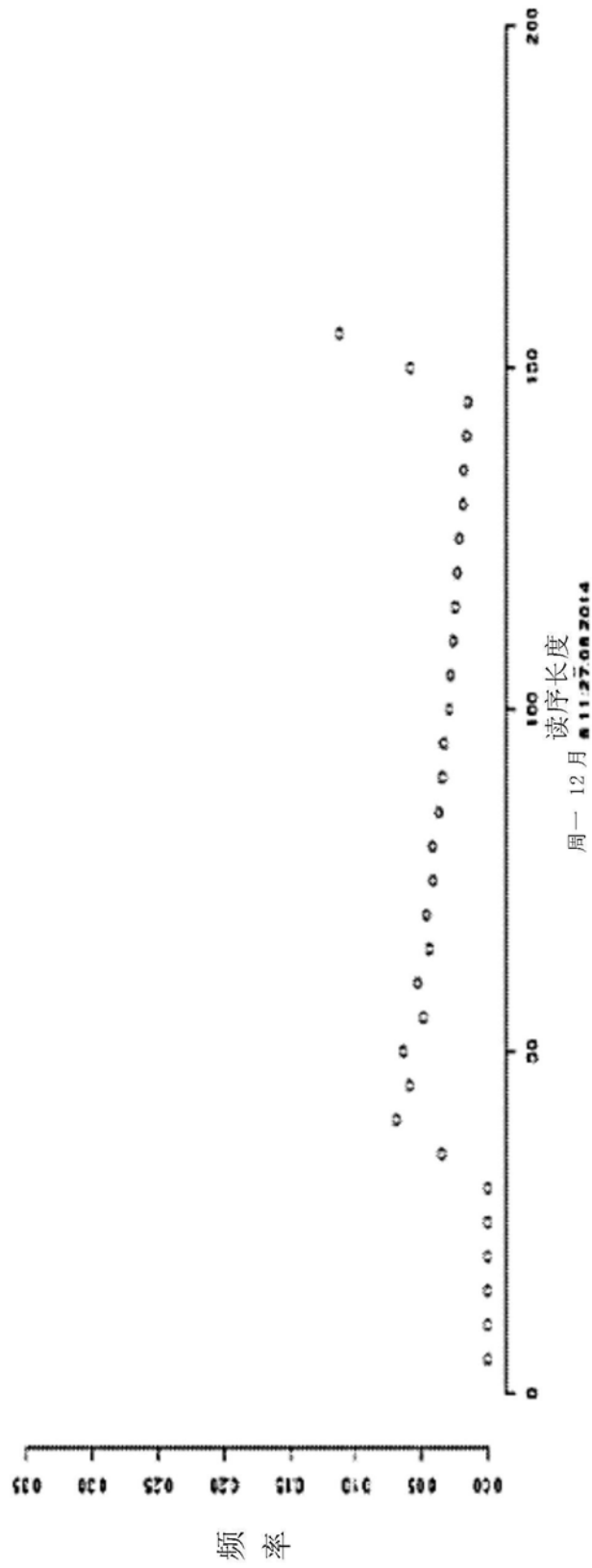


图3

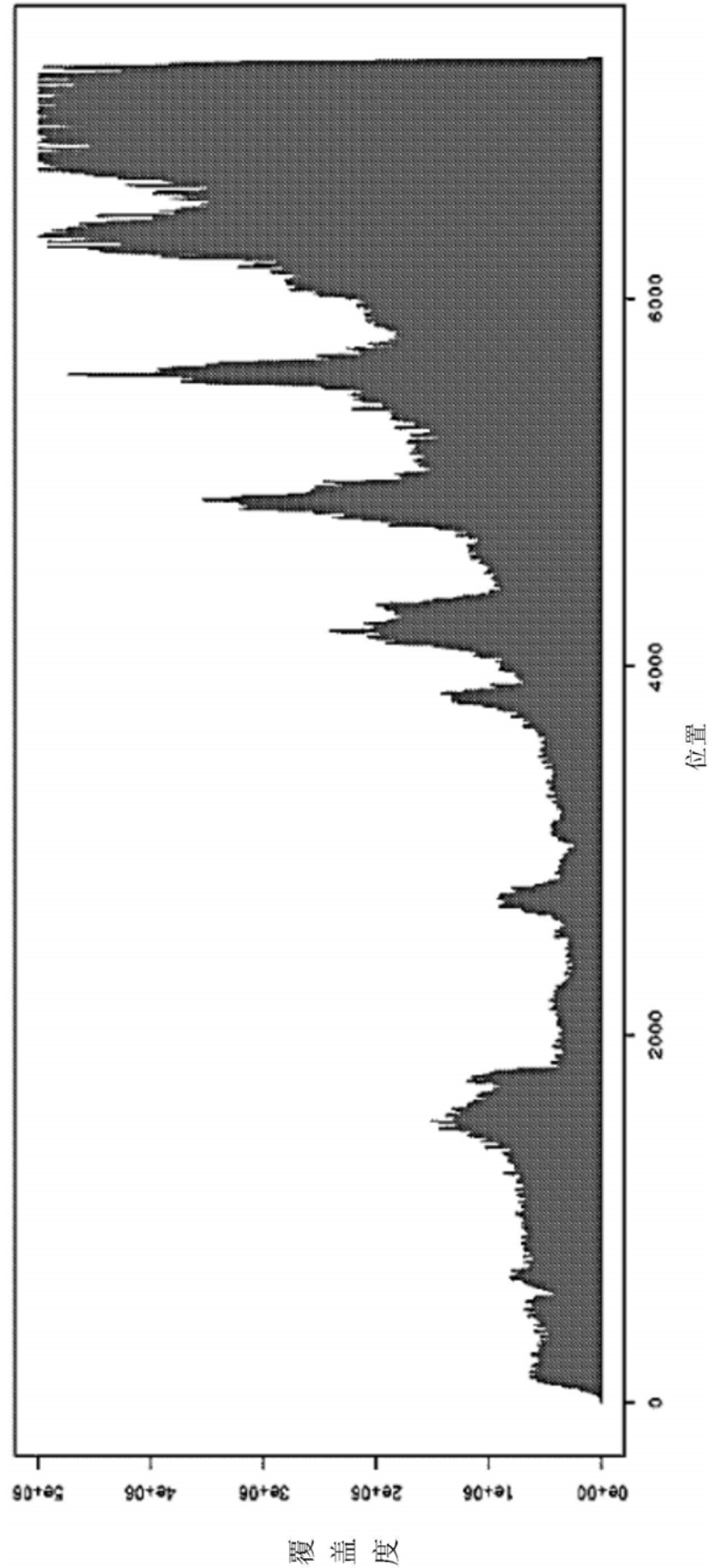


图4

位置	覆盖度	参考	A 计数	T 计数	C 计数	G 计数	N 计数	特异性百分比
1	1	T	0	0	0	2	0	0
3	3	A	3	0	0	0	0	100
4	5	A	4	0	0	0	1	80
5	5	A	4	0	0	1	0	80
6	6	A	5	0	0	1	0	83.33
7	8	C	0	0	7	1	0	87.5
9	61	G	0	0	0	57	4	93.44
10	79	C	0	0	78	0	1	98.73
11	80	T	0	79	0	1	0	98.73
12	84	C	0	0	82	2	0	97.62
13	85	T	0	84	0	1	0	98.82
14	99	G	0	0	0	98	1	98.99
15	124	G	0	0	0	121	3	97.58
18	147	T	0	140	0	7	0	95.24
19	147	T	0	140	0	7	0	95.24
20	170	G	1	0	0	168	1	98.82
22	189	A	187	0	0	0	2	98.94
23	196	C	0	0	194	2	0	98.98
24	197	C	0	0	193	2	0	98.98
25	212	C	4	0	208	0	0	98.11
26	218	A	215	1	0	1	1	98.62
27	301	C	1	2	283	2	11	94.68
29	345	C	0	0	333	6	4	97.1
34	399	G	4	1	0	393	1	98.5
35	410	G	2	0	4	404	0	98.54
39	437	A	427	1	0	9	0	97.71
40	453	C	0	1	442	10	0	97.57
41	466	G	4	1	0	461	0	98.93
42	467	T	2	460	0	5	0	98.5
45	514	C	0	1	503	8	0	98.25
46	593	G	1	1	0	587	4	98.99
48	661	C	0	0	632	7	2	98.64
49	683	T	0	669	0	12	2	97.95
50	687	A	679	0	0	8	0	98.84
54	907	C	1	0	897	3	6	98.9
59	1134	G	3	1	0	1119	11	98.68
60	1131	T	5	1114	4	8	0	98.5
62	1191	T	1	1174	1	9	6	98.57
65	1356	C	0	2	1338	12	4	98.67
70	1820	C	1	3	1799	4	13	98.85
73	2080	T	6	2049	2	14	9	98.51
86	2881	T	2	2852	0	17	10	98.99
651	157246	T	1248	152985	1041	1964	8	97.29
854	164370	T	1339	157620	1229	4027	155	95.89
867	177895	T	999	173688	860	1990	358	97.64
1061	268209	T	2008	259719	2162	4271	49	96.83
1128	360942	A	356174	1478	75	1609	1606	98.68
1143	382247	T	1252	377721	1205	1876	193	98.82

图5A

1152	446042	T	379	441363	567	1728	2005	98.95
1160	482910	C	389	577	478186	187	3391	99.02
1200	406194	T	2654	398198	2273	3420	19	97.94
1233	357036	A	351080	276	338	5212	110	98.33
1306	339635	T	1845	333668	1742	2235	123	98.24
1365	352479	A	347620	2322	74	2206	57	98.62
1385	444658	T	312	439191	366	1182	3607	98.77
1393	478224	G	825	261	79	474080	2979	99.13
1435	585445	T	1142	581317	1129	1837	20	99.29
1489	580125	T	1250	575073	1264	1799	739	99.13
1494	570329	T	1132	565745	1041	1545	866	99.2
1513	533453	A	528920	190	120	3901	322	99.15
1577	489806	A	482345	3293	111	3630	427	98.48
1638	402170	A	393379	4437	46	4064	224	97.81
1664	412703	A	406215	2847	185	3432	4	98.43
1821	51445	C	2560	2140	45997	561	187	89.41
2611	341779	T	1418	335828	1685	2833	15	98.26
3428	398718	T	1732	391777	1816	3390	3	98.26
3447	468502	T	2088	460498	2133	3762	21	98.29
3477	489262	A	483900	1926	83	1982	1371	98.9
3512	522236	A	517637	1182	1374	1922	111	99.12
3531	553448	A	548422	2184	69	2467	306	99.09
3542	596262	T	1624	590092	2005	2075	466	98.97
3554	566701	A	560999	905	465	3899	433	98.99
3588	540617	A	534535	522	510	4948	102	98.87
3592	545560	T	829	541370	1055	2117	189	99.23
3595	538524	T	1354	532441	1565	3069	95	98.87
3621	545392	T	3395	531029	4338	6462	168	97.37
3643	512524	T	1449	505991	1773	3267	44	98.73
3653	483115	T	1107	478237	1322	2096	353	98.99
3678	532253	A	527886	629	329	1315	2094	99.18
3737	491926	T	1633	485774	1594	2849	76	98.75
3807	596214	T	1484	590784	1375	2558	13	99.09
3892	682235	C	396	704	675687	247	3201	99.04
3893	682816	A	678370	1864	162	2394	26	99.35
3894	728310	C	372	915	723877	224	2922	99.39
3900	702930	C	533	601	697625	320	3851	99.25
3911	621323	A	613235	3405	175	3556	952	98.7
3929	605750	T	1947	596682	2350	4728	43	98.5
3950	615177	T	1216	609585	1440	2921	15	99.09
3985	597093	A	590727	2562	174	2478	1152	98.93
4006	504739	T	3014	493251	2901	5455	118	97.72
4061	429898	T	1215	424701	1387	2420	175	98.79
4065	428494	T	1575	421165	1907	3319	328	98.29
4187	650142	A	639812	659	98	1001	8572	98.41
4194	691603	A	687270	1838	142	2339	14	99.37
4195	687891	C	597	921	682983	256	3134	99.29
4198	688286	A	684069	208	136	557	3316	99.39
4242	867695	T	838	863411	1032	1773	641	99.51
4250	894752	T	1083	890445	1108	1985	131	99.52
4261	968067	G	817	676	296	962110	4168	99.38
4269	1022577	G	624	905	253	1017226	3569	99.48
4271	974354	T	3115	963433	3435	4248	123	98.88

图5B

4279	1074295	T	450	1068122	586	1168	3969	99.43
4287	1010660	C	769	934	1005361	431	3145	99.48
4290	1009006	T	1007	1003985	1236	2731	47	99.5
4297	973186	C	2117	616	968296	363	1794	99.5
4301	930691	A	925910	204	338	4040	199	99.49
4319	971263	C	688	1185	967031	374	1985	99.56
4322	944670	A	939864	2049	226	2022	509	99.49
4323	980267	C	596	1263	975453	361	2594	99.51
4332	1135888	A	1121106	839	198	1272	12473	98.7
4340	1126023	C	806	1235	1116367	313	7302	99.14
4343	1026546	T	1025	1022333	1148	1702	338	99.59
4350	1028958	G	1443	966	544	1024085	1920	99.53
4359	1020164	G	1576	602	214	1015902	1970	99.57
4360	1028399	T	2004	1021141	1822	2856	576	99.29
4367	990411	C	741	998	986262	342	2068	99.58
4371	943331	T	2095	936542	2183	2505	6	99.28
4378	975725	G	851	1503	661	971437	1273	99.56
4382	942743	G	993	1108	365	937684	2593	99.46
4383	946523	T	2655	938205	2275	3294	94	99.12
4385	954147	C	610	1432	949216	290	2599	99.48
4390	885632	C	505	1137	880987	718	2285	99.48
4392	851705	G	1423	880	3031	846061	310	99.34
4405	882498	T	7259	859839	6926	8381	93	97.43
4460	692009	T	1065	686753	1042	2020	1129	99.24
4466	723028	T	1241	718754	1165	1523	345	99.41
4474	721580	A	713353	3797	328	3672	430	98.86
4491	781387	A	776115	2215	335	2708	14	99.33
4508	925876	C	703	628	920748	394	3402	99.45
4516	936240	A	931442	587	937	2649	625	99.49
4518	917765	T	3080	905251	3274	5817	343	98.64
4521	927508	T	2875	915038	3441	6045	109	98.66
4523	962014	A	956850	605	620	1257	2682	99.46
4530	938681	A	934126	620	433	1657	1823	99.51
4533	924833	A	917471	2106	362	2940	1954	99.2
4545	932652	A	925251	2589	872	3390	550	99.21
4554	967957	G	1024	739	288	962871	3035	99.47
4555	955582	T	2582	945182	2574	5236	8	98.91
4582	964891	G	914	892	237	958601	4247	99.35
4583	983449	G	1160	1511	194	977444	3140	99.39
4584	966748	T	3936	953074	3542	6018	178	98.59
4590	976291	C	710	996	968242	330	6013	99.18
4593	896743	T	1440	890838	1628	2747	90	99.34
4596	959395	A	953795	542	708	1536	2814	99.42
4597	992927	G	673	1216	144	987369	3525	99.44
4598	956118	T	1170	980880	1420	2408	240	99.47
4604	1004776	C	1058	1531	997313	343	4531	99.26
4606	963828	A	956224	2130	438	2816	2220	99.21
4643	981494	A	975943	3048	454	1865	184	99.43
4653	1003055	A	998364	1964	174	1631	922	99.53
4656	992216	T	977	987393	1247	1760	839	99.51
4685	996048	T	955	986102	6249	2011	731	99
4686	1015381	C	624	7824	1005569	392	972	99.03
4693	1008630	C	5806	702	1001255	266	601	99.27

图5C

4684	999368	A	986780	2375	6926	3027	260	98.74
4695	983147	C	4514	1285	972128	416	4804	98.88
4697	1043714	G	1698	1253	279	1035529	4955	99.22
4698	1065595	T	1103	1059048	1370	3618	456	99.39
4699	1091394	G	1018	1141	322	1086620	2293	99.56
4700	1090194	G	2096	1375	557	1084766	1400	99.5
4702	1071017	A	1066553	1112	910	1903	539	99.58
4703	1088528	C	1025	1062	1083916	368	2157	99.58
4705	1103133	C	987	1604	1094645	645	5252	99.23
4707	1185369	G	1023	1022	264	1173124	9934	98.97
4708	1188346	T	1683	1178974	2126	4912	651	99.21
4709	1208644	G	1052	866	210	1204480	2036	99.66
4712	1257589	G	2074	961	305	1250227	4022	99.41
4713	1260628	C	830	1907	1255245	621	2025	99.57
4715	1263772	T	410	1257774	452	558	4578	99.53
4718	1215826	G	1765	1308	615	1211225	713	99.64
4720	1209392	C	1071	846	1204528	583	2364	99.6
4733	1173524	T	850	1169388	1069	2063	154	99.65
4743	1244639	A	1237738	1271	1744	3002	884	99.45
4744	1246313	C	1041	1336	1242091	478	1367	99.66
4750	1271831	G	839	1108	244	1266459	3181	99.58
4752	1273681	T	2071	1259585	5717	4723	1585	98.89
4758	1401366	A	1393468	576	523	3522	3277	99.44
4761	1355018	A	1349371	900	1527	3136	84	99.58
4762	1404451	G	1561	1122	251	1398372	3145	99.57
4763	1402926	T	4442	1388723	3159	6138	464	98.99
4764	1489038	A	1481246	474	282	2456	4580	99.48
4765	1527761	T	423	1522608	485	1200	3045	99.66
4767	1531107	C	1132	1845	1526995	681	454	99.73
4770	1533130	G	680	922	187	1527388	3953	99.63
4771	1516747	A	1512548	824	1066	2252	57	99.72
4772	1518956	G	1608	1012	212	1512385	3739	99.57
4773	1458886	A	1449442	1063	1373	3783	3225	99.35
4783	1450502	G	1203	1019	425	1446250	1605	99.71
4786	1430138	C	937	1761	1425835	655	950	99.7
4789	1433891	G	1058	1215	529	1429784	1305	99.71
4790	1451411	G	1972	1606	730	1445601	1502	99.6
4791	1452188	C	1109	1809	1447745	914	611	99.69
4795	1452312	G	1523	1745	812	1446832	1400	99.62
4796	1410321	G	1416	1384	628	1406014	879	99.69
4797	1391654	C	1297	1873	1384012	1083	3389	99.45
4799	1375272	A	1370935	1417	259	1412	1249	99.68
4805	1346294	A	1341090	385	373	1345	3101	99.61
4807	1373245	G	1550	1065	143	1365505	4982	99.44
4808	1276125	T	1947	1266945	2018	4575	640	99.28
4810	1267827	T	1151	1263170	1135	1786	585	99.63
4815	1288645	A	1282764	1375	227	1804	2475	99.54
4816	1342010	C	912	903	1337517	676	2002	99.67
4818	1333940	G	1450	857	244	1329718	1671	99.68
4819	1335775	T	1007	1331292	958	2363	155	99.66
4821	1316564	A	1348340	3271	434	4353	166	99.39
4833	1485624	A	1478876	2822	256	3119	551	99.55
4834	1548800	C	907	1116	1538290	4275	4212	99.32

图5D

4833	1543665	T	536	1539541	700	4697	191	99.6
4842	1548179	G	1073	891	226	1543099	2888	99.67
4846	1469713	C	1000	1835	1463243	761	834	99.7
4848	1584993	G	1582	936	234	1576750	5491	99.48
4849	1587309	T	1171	1381622	1161	3325	30	99.64
4850	1667253	C	985	1615	1659689	843	4121	99.55
4851	1667689	C	1460	3594	1661129	543	961	99.61
4856	1681370	G	1390	1108	223	1668206	10443	99.22
4857	1542855	T	2088	1534265	2088	4371	43	99.44
4858	1553008	G	1919	914	216	1543122	5797	99.43
4859	1478652	T	1623	1471072	1846	3971	140	99.49
4860	1534957	G	1361	935	139	1528859	3663	99.6
4861	1563241	T	1658	1553314	1783	4405	2079	99.37
4864	1546457	T	4041	1532192	2738	5392	2094	99.08
4869	1434107	C	1220	1371	1425959	926	4631	99.43
4896	1427743	G	664	863	232	1422852	3132	99.66
4898	1457949	G	816	1119	206	1451358	4450	99.55
4899	1454825	T	1009	1450080	1217	2257	262	99.67
4903	1551041	A	1544324	501	264	1228	4724	99.57
4904	1554143	T	409	1549625	350	808	2951	99.71
4906	1515749	C	1038	2418	1507477	508	4308	99.45
4908	1573271	G	1837	1111	278	1559560	10485	99.13
4909	1668100	T	1114	1662772	1090	2075	1049	99.68
4911	1709969	T	466	1702751	326	763	5663	99.58
4913	1667732	G	1378	1196	274	1662569	2315	99.69
4914	1664093	A	1658849	1640	578	2869	137	99.69
4915	1661580	C	2806	1767	1655368	621	1018	99.63
4916	1647682	C	1361	1655	1633820	685	10161	99.16
4918	1577185	G	1347	1102	263	1568432	6041	99.45
4920	1598858	T	811	1594755	466	1419	1407	99.74
4921	1603745	C	987	1304	1598741	471	2242	99.69
4922	1573996	A	1570665	2271	286	2679	95	99.66
4923	1681676	C	793	1626	1671852	587	6816	99.42
4926	1689762	C	1063	1581	1680903	463	5752	99.48
4931	1636695	A	1627128	707	637	1576	6647	99.42
4936	1517356	C	1026	1546	1513077	653	1054	99.72
4938	1512710	A	1508430	582	606	1144	1948	99.72
4942	1489989	G	1308	1163	396	1485650	1472	99.71
4948	1448996	C	1406	1598	1444658	646	688	99.7
4953	1489457	G	1621	1379	508	1484816	1133	99.69
4966	1474347	C	1291	1745	1469321	1390	600	99.66
4968	1489859	A	1485529	718	496	1113	2003	99.71
4971	1563389	G	1926	1201	267	1557171	2824	99.6
4972	1553853	T	2523	1545235	2330	3362	403	99.45
4976	1541079	G	1025	1003	435	1536501	2115	99.7
4979	1514911	G	1396	1036	548	1509881	2050	99.67
4980	1497349	C	1088	1564	1492700	967	1030	99.69
4985	1528333	T	1113	1523636	1212	2276	96	99.69
4986	1550794	T	697	1546514	708	1327	1548	99.72
4987	1574962	C	847	1375	1570207	564	1969	99.7
4992	1569663	G	1417	1361	636	1563370	2879	99.6
4993	1548168	A	1541192	2176	547	4172	81	99.55
4996	1561555	A	1554281	2972	543	3477	282	99.53

图5E

4997	1597096	C	550	1733	1587061	584	6868	99.37
4999	1633373	C	1636	1346	1627706	637	2028	99.63
5000	1622438	C	1478	1402	1616850	642	2066	99.66
5002	1633827	G	2178	1244	263	1647565	4577	99.5
5003	1680520	T	2294	1673236	1897	2977	116	99.57
5005	1647511	T	576	1636993	580	610	8750	99.36
5009	1373363	G	1738	1119	291	1368262	1953	99.63
5010	1382691	A	1374798	1410	687	2219	3577	99.43
5011	1329198	C	852	712	1325091	397	2146	99.69
5023	1208919	C	695	1338	1204398	358	2130	99.63
5035	1206544	T	2218	1193487	6327	4280	232	98.92
5036	1206635	C	872	6332	1198399	694	338	99.32
5040	1285426	C	1050	2799	1275563	532	5480	99.23
5041	1293330	T	638	1291216	1216	1280	980	99.68
5042	1348058	C	1170	1072	1340495	538	4783	99.44
5045	1360792	G	1356	992	303	1354336	3805	99.53
5048	1367677	T	585	1360140	495	1178	5279	99.45
5049	1296972	G	2096	850	309	1293743	1974	99.6
5050	1289025	T	2287	1280258	1921	2921	1638	99.32
5051	1302203	A	1297866	354	184	1269	2530	99.67
5057	1309144	G	943	886	266	1304195	2854	99.62
5058	1296688	A	1290462	1631	696	3617	282	99.52
5062	1334531	G	2079	1132	458	1328801	2061	99.57
5070	1317530	C	702	1323	1312538	588	2379	99.62
5075	1321431	G	1158	825	317	1317070	2061	99.67
5076	1323868	A	1320600	1368	719	2394	787	99.6
5078	1334861	T	692	1330277	2234	1459	199	99.66
5079	1349445	C	1041	1076	1345008	786	1534	99.67
5085	1348834	A	1341030	1029	1789	3201	1785	99.42
5086	1358233	G	927	975	232	1333944	2155	99.68
5087	1353264	G	1406	1200	305	1348075	2278	99.62
5088	1322395	T	10853	1281116	12283	18119	124	96.88
5090	1331603	A	1327018	762	793	2466	564	99.66
5092	1349527	A	1343490	751	1002	2474	1810	99.55
5094	1360519	A	1355491	638	933	1662	1795	99.63
5097	1335432	A	1330967	1423	336	1721	985	99.67
5098	1241224	C	791	1718	1236762	551	1402	99.64
5100	1235410	G	1319	731	152	1229758	3450	99.54
5101	1197668	T	1439	1191011	1630	3526	62	99.44
5110	1166913	G	764	978	242	1161710	3219	99.55
5113	1164829	T	2428	1155341	2620	4093	347	99.19
5118	1229584	T	657	1224330	439	870	3288	99.57
5120	1209921	G	1498	1010	234	1204624	2555	99.56
5121	1225161	T	2054	1217600	2084	3400	23	99.38
5122	1238745	C	1340	1167	1234378	744	1116	99.65
5125	1363922	C	1323	1793	1359262	793	751	99.66
5128	1379124	C	1247	1385	1373772	580	2140	99.61
5129	1354815	A	1346307	3302	445	4705	56	99.37
5132	1370211	A	1365288	457	2851	1248	367	99.64
5134	1425772	C	2102	1796	1420934	862	78	99.66
5135	1422783	C	1791	1436	1417170	1315	1071	99.61
5139	1475759	T	3728	1462637	3608	5731	55	99.11
5145	1337581	C	917	1138	1332270	531	2725	99.6

图5F



5147	1344445	G	841	817	187	1339811	2789	99.66
5152	1376320	G	945	912	246	1370459	3758	99.57
5154	1396252	A	1391851	1455	228	2480	238	99.68
5155	1419228	C	988	2017	1413472	658	2093	99.59
5158	1436460	C	1230	1645	1431033	681	1871	99.62
5161	1434550	C	1234	1449	1426062	1978	3827	99.41
5163	1381020	G	718	882	232	1376614	2574	99.68
5166	1504754	C	1312	1953	1499011	1075	1403	99.62
5171	1515972	A	1510677	1688	242	2638	727	99.65
5172	1526243	C	1507	1381	1519793	709	2853	99.58
5175	1561101	T	826	1556254	293	1147	2581	99.69
5177	1535256	C	1003	1210	1531100	601	1342	99.73
5180	1510498	C	1101	1884	1506148	457	908	99.71
5183	1495350	G	1102	1081	323	1490885	1959	99.7
5186	1503733	G	1174	669	268	1499238	2384	99.7
5187	1473658	T	3833	1457648	4475	7669	33	98.91
5189	1474221	A	1469853	1255	662	2432	19	99.7
5192	1471552	A	1462042	3756	218	4406	1130	99.35
5193	1455599	C	1546	1190	1451499	542	822	99.72
5194	1448029	C	1269	1103	1443157	631	1869	99.66
5204	1422418	G	1653	978	683	1417892	1212	99.68
5205	1521890	T	2003	1512725	2162	4727	263	99.4
5206	1569278	G	1203	1635	735	1562588	3117	99.57
5207	1570147	G	2177	1586	453	1565646	285	99.71
5212	1573374	A	1566639	1008	1395	4271	61	99.57
5213	1571163	G	1822	1160	405	1566081	1695	99.68
5214	1565578	T	2813	1548302	2926	7440	4097	98.9
5215	1582313	T	318	1576267	613	1363	3752	99.62
5216	1683674	G	1298	2813	384	1673070	6109	99.37
5217	1687939	T	1765	1678578	1982	5368	246	99.45
5218	1685885	C	2357	2589	1678998	1220	721	99.59
5219	1689621	T	536	1684998	948	953	2186	99.73
5220	1695298	A	1690995	1544	677	1316	766	99.75
5222	1710422	G	2278	1946	361	1703015	2822	99.57
5223	1698833	T	1386	1685661	1676	3734	6376	99.22
5224	1606365	C	1998	2194	1593754	841	7578	99.21
5225	1520075	A	1515038	631	1349	1284	1773	99.67
5226	1603030	T	723	1593898	739	1606	6064	99.43
5227	1677327	G	2670	2985	416	1666767	4489	99.37
5228	1684866	T	1823	1675362	1860	4600	1221	99.44
5230	1670336	T	640	1665422	583	613	3078	99.71
5233	1665534	A	1660498	1860	339	2435	402	99.7
5234	1660800	C	1451	1206	1651889	491	5763	99.46
5236	1583482	G	1342	1339	245	1576271	4285	99.54
5237	1557471	T	1381	1551341	1338	3341	70	99.61
5240	1595330	G	1626	1442	448	1590842	972	99.72
5241	1596898	C	957	2062	1592163	1059	657	99.7
5245	1636279	A	1629603	1004	929	2779	1964	99.59
5246	1639111	C	1067	1728	1634249	550	1517	99.7
5247	1638070	A	1629583	3196	645	4454	192	99.48
5248	1660434	C	1147	2211	1633285	607	3184	99.57
5249	1652748	C	1509	1682	1648226	709	422	99.73
5250	1658781	A	1654269	758	957	2050	747	99.73

图5G

5251	1676782	G	1420	2006	489	1671086	1781	99.66
5252	1736615	G	1350	1606	375	1732490	794	99.76
5253	1748415	G	1219	1414	428	1740223	5131	99.53
5254	1749041	A	1735614	1404	2001	6438	3384	99.23
5255	1782999	G	2515	2078	1029	1774080	3297	99.5
5256	1790006	C	1774	3732	1781599	1455	1446	99.53
5257	1795434	A	1790615	739	814	1590	1676	99.73
5259	1789146	A	1783248	2172	453	2579	694	99.67
5260	1796696	C	1362	2905	1789786	594	2049	99.62
5261	1779435	A	1773913	1804	837	2656	225	99.69
5262	1767429	C	1849	2087	1757059	781	5633	99.41
5263	1690019	T	671	1683922	1160	2128	2138	99.64
5264	1706678	G	1361	1576	303	1700219	3219	99.62
5265	1708490	G	1278	1928	417	1702736	2131	99.66
5266	1677864	T	2603	1665720	3667	5359	515	99.28
5269	1688688	A	1684141	1790	429	2147	181	99.73
5270	1688583	C	1545	1812	1683579	631	1016	99.7
5271	1677844	C	2110	1413	1672591	569	1161	99.69
5275	1620722	C	4458	1305	1613224	473	1262	99.54
5281	1673957	A	1667612	1823	1369	2927	226	99.62
5282	1674084	C	4973	922	1667315	382	492	99.6
5288	1691330	G	2569	1393	695	1685704	969	99.67
5289	1686633	T	2889	1674241	3037	6219	247	99.27
5290	1690407	G	2042	1535	1154	1685282	394	99.7
5291	1697086	C	1172	2203	1692556	736	419	99.73
5293	1707133	C	1240	1527	1702485	793	1088	99.73
5294	1716418	A	1705084	4346	1153	5545	290	99.34
5295	1979060	C	1730	2222	1958063	1228	15817	98.94
5296	2008306	C	2417	3243	1998215	1518	2913	99.5
5297	2035101	A	2030977	782	1268	1859	215	99.8
5301	2059146	G	1482	2162	552	2053793	1157	99.74
5302	2059138	G	2194	1762	512	2052544	2126	99.68
5303	2030748	A	2021477	1540	2777	3498	1456	99.54
5304	2006570	C	2137	2349	1993021	858	8205	99.32
5306	1899139	G	2294	1273	606	1891721	3245	99.61
5307	2089201	C	2295	2805	2082503	1213	385	99.68
5309	2099106	A	2094135	628	572	2073	1698	99.76
5310	2088754	A	2082727	866	772	3844	545	99.71
5311	2136251	G	3781	2616	785	2125911	3158	99.52
5312	2187266	G	2892	2357	570	2176964	4483	99.53
5313	2257667	T	12281	2222703	9666	12643	374	98.45
5314	2254798	A	2247806	2066	640	3557	729	99.69
5315	2218137	C	1902	4355	2209382	1027	1821	99.59
5318	2120597	G	1328	1706	426	2115792	1345	99.77
5319	2159428	G	1893	1919	745	2151279	3592	99.62
5320	2141419	G	3068	1883	911	2133022	2535	99.61
5321	2099011	C	1878	1974	2093517	1521	121	99.74
5322	2071448	C	1910	1819	2066404	1053	262	99.76
5323	2067311	A	2063033	963	899	2382	34	99.79
5324	2123750	G	1248	1791	316	2117133	3262	99.69
5325	2131122	G	1555	2514	399	2126418	236	99.78
5326	2136293	G	1855	1477	303	2131477	1181	99.77
5327	2065823	T	6539	2042526	6217	9093	1448	98.87

图5H

5329	2039037	C	971	3401	2030833	1162	2670	99.6
5330	2044824	G	1751	1684	340	2040668	381	99.8
5331	2099290	A	2093865	651	700	1500	2574	99.74
5332	2099156	T	573	2092933	628	1142	3880	99.7
5334	2064253	A	2058717	1462	342	2163	1569	99.73
5335	2061023	C	4504	3481	2051225	1011	802	99.52
5336	2063694	G	3462	1585	1546	2056798	303	99.67
5337	2067822	C	1224	2024	2060136	1095	3343	99.63
5339	2034414	G	1233	1509	559	2028493	2620	99.71
5340	2031381	T	2664	2022364	1912	4386	55	99.56
5341	2110783	G	1361	1913	663	2100954	5892	99.53
5342	2128013	G	2553	2463	730	2120866	1401	99.66
5343	2115029	C	1668	2853	2108312	1536	660	99.68
5347	2141563	G	1585	1579	490	2134282	3627	99.66
5348	2138294	G	2380	1797	535	2132223	1359	99.72
5349	2093458	C	2006	2777	2081480	1674	5521	99.43
5350	2024042	T	1705	2019166	976	1119	1076	99.76
5354	1994610	A	1988088	360	375	5673	114	99.67
5355	1972502	G	2521	904	244	1966292	2541	99.69
5359	1948229	C	1360	1843	1942159	671	2196	99.69
5361	1991123	T	546	1984607	461	1525	3984	99.67
5363	2042443	G	1516	1929	461	2033905	4632	99.58
5364	2055314	T	1264	2049437	1469	2906	238	99.71
5366	2022641	A	2016874	1944	508	3187	128	99.71
5367	2029449	C	864	1996	2023981	514	2094	99.73
5369	2015383	G	1906	1324	705	2009402	2046	99.7
5370	2004340	C	1403	2669	1998720	775	771	99.72
5372	2002028	A	1996595	1728	328	2529	848	99.73
5373	2048417	C	994	898	2041809	700	4016	99.68
5375	2068897	A	2061303	2748	438	2872	1536	99.63
5376	2058528	C	1143	1698	2054104	501	1082	99.79
5377	2087087	T	575	2082735	873	1341	1563	99.79
5378	2108384	A	2103617	455	409	1643	2260	99.77
5379	2135113	G	2767	1820	560	2127588	2378	99.65
5380	2129564	C	1839	2373	2123514	947	891	99.72
5381	2118222	A	2111438	540	793	2002	3449	99.68
5382	2067785	A	2062945	859	805	2412	764	99.77
5383	2067297	G	1253	1700	407	2063198	739	99.8
5384	2108892	G	1620	1702	367	2103358	1845	99.74
5385	2112757	G	1197	1671	553	2107326	2010	99.74
5386	2089400	A	2080631	1282	2028	5226	233	99.58
5387	2104028	G	1166	1581	480	2097151	3650	99.67
5388	2062991	A	2055669	1473	2118	3564	167	99.65
5389	2105534	G	2032	1685	600	2097776	3441	99.63
5390	2122839	T	2665	2111952	2916	4767	539	99.49
5392	2134634	C	1327	2666	2127675	862	2104	99.67
5393	2112825	A	2105796	2564	1000	3379	86	99.67
5394	1983624	C	1532	3538	1972790	1193	4571	99.45
5395	1969108	T	805	1964993	942	1341	1027	99.79
5396	2164114	A	2146829	812	529	1724	14220	99.2
5397	2206868	T	827	2193708	1102	2668	8563	99.4
5398	2189832	G	1420	2482	385	2181108	4437	99.6
5399	2183215	T	1676	2177989	1990	2831	729	99.67

图5I

5402	2161632	G	1918	2004	431	2136356	703	99.77
5403	2156931	G	1449	1418	385	2144683	8796	99.43
5404	2030767	A	2026414	601	376	2205	971	99.79
5405	2173806	G	2326	1902	612	2147693	21273	98.8
5406	2014760	T	2292	2003056	2719	5310	1383	99.42
5407	1976411	C	933	1494	1971928	638	1396	99.77
5409	1998362	A	1994173	1066	739	2161	203	99.79
5410	2000155	C	798	4225	1993323	671	1138	99.66
5411	1998191	G	2185	1175	396	1994055	180	99.79
5413	1935903	C	1907	2290	1923308	802	7596	99.35
5416	1833119	C	916	2016	1830928	676	583	99.77
5418	1833193	T	3123	1819259	3752	6137	922	99.24
5421	1844344	C	1227	1985	1839044	924	1164	99.71
5426	1865093	T	478	1860436	838	1229	2092	99.75
5428	1865340	A	1859088	2416	628	2972	236	99.66
5429	1838972	C	1049	1857	1834826	454	946	99.76
5430	1821866	C	1652	1983	1816635	540	1056	99.71
5432	1853745	A	1846510	1433	345	2124	3333	99.61
5433	1880685	C	1282	1135	1876000	629	1639	99.75
5434	1868871	C	1505	1174	1864323	665	1204	99.76
5436	1848140	A	1842274	1529	1338	2239	760	99.68
5437	1874099	C	914	2726	1867256	683	2520	99.63
5438	1875713	G	2392	1872	1196	1870092	161	99.7
5439	1871058	C	1271	1632	1866517	747	891	99.76
5440	1871886	T	792	1867088	1429	1459	1118	99.74
5442	1890061	C	1327	2220	1884823	715	976	99.72
5443	1928520	A	1919208	3174	1571	4454	113	99.52
5444	1951828	C	2166	2842	1944433	1052	1335	99.62
5445	1912332	C	1986	1972	1904802	753	2819	99.61
5447	1926119	G	1921	1366	354	1918554	3924	99.61
5448	1934406	G	1812	2204	526	1929158	706	99.73
5449	1927703	T	3773	1908573	5266	9920	171	99.01
5450	1933332	G	1542	990	305	1928948	1547	99.77
5452	1994724	A	1990283	816	817	1824	984	99.78
5454	1991435	G	2573	1051	663	1985782	1366	99.72
5455	2037060	C	1576	2690	2027915	1046	3833	99.55
5456	1999155	A	1995031	835	868	1731	690	99.79
5459	2009999	G	2475	2015	574	2002946	1989	99.65
5460	1977793	T	2079	1968388	2208	4870	248	99.52
5462	1952710	A	1947813	769	778	1891	1459	99.75
5463	1933383	T	899	1928513	644	1588	1739	99.75
5464	1855586	C	1089	2081	1851331	768	317	99.77
5466	1858964	A	1854329	802	1362	1798	673	99.75
5467	1861470	T	952	1855945	1024	1957	1592	99.7
5469	1854618	G	2394	1287	491	1849199	1247	99.71
5470	1848599	C	1350	2804	1842974	1192	279	99.7
5474	1886779	G	1425	1334	318	1880145	3557	99.65
5475	1883139	A	1878926	677	1124	1731	681	99.78
5477	1875797	G	1836	1176	390	1869594	2801	99.67
5478	1841170	T	6688	1818508	6282	9641	51	98.77
5480	1832965	G	1423	1525	505	1828807	705	99.77
5482	1883793	G	1495	1665	462	1878764	3407	99.63
5483	1856365	A	1851571	826	1326	1839	803	99.74

图5J

5484	1870006	T	1094	1865349	800	2254	509	99.75
5485	1857668	C	1137	1715	1852764	562	1490	99.74
5490	2098517	A	2091108	925	943	2206	3335	99.65
5491	2078366	T	752	2073957	892	1743	1022	99.79
5492	2064317	G	2630	1468	648	2059113	458	99.75
5493	2063266	C	2142	3138	2056245	1235	506	99.66
5494	2072260	C	2400	2318	2065954	1179	409	99.7
5498	1844213	G	2537	1866	1222	1836718	1870	99.59
5499	1819381	C	961	2029	1815239	827	325	99.77
5501	1846672	C	1220	1133	1841280	859	2180	99.71
5502	1843892	T	1080	1841594	701	2466	51	99.77
5503	1848985	C	1243	2104	1844642	910	86	99.77
5507	1743009	G	1019	985	172	1738497	2336	99.74
5509	1749031	T	700	1744260	486	1247	2338	99.73
5512	1758456	A	1752430	797	351	1887	2991	99.66
5513	1763873	G	2283	1692	476	1758643	779	99.7
5514	1778896	C	1455	2260	1773274	1224	683	99.68
5519	1797589	A	1791425	2393	287	3398	86	99.66
5520	1796128	C	1307	1342	1790651	645	2183	99.7
5521	1770123	C	1603	1671	1765618	663	568	99.75
5523	1804552	A	1799304	512	578	1204	2954	99.71
5525	1807533	C	1227	1456	1802440	482	1928	99.72
5531	1817522	A	1813110	361	254	1230	2567	99.76
5533	1844530	C	982	1377	1833952	703	7536	99.43
5534	1877766	A	1867993	2784	280	3660	3047	99.48
5535	1996931	C	982	1647	1985063	606	8233	99.43
5541	2029904	T	1293	2021572	601	1957	4481	99.59
5542	2001320	C	1942	1796	1992645	720	4217	99.57
5543	1966687	A	1944270	7787	396	9295	4939	98.86
5544	2083519	C	1335	931	2069290	753	11210	99.32
5546	2055035	C	1561	1063	2049667	578	2166	99.74
5551	2080353	G	4197	1374	332	2071714	2736	99.58
5552	2058874	A	2052021	645	680	1746	3782	99.67
5553	2014912	G	1453	1068	240	2009043	3108	99.71
5554	2075082	A	2070874	552	686	1910	1060	99.8
5558	2117825	G	2709	863	234	2113345	674	99.79
5562	2223893	A	2217599	468	506	5172	148	99.72
5563	2285615	G	2725	1371	335	2277351	3833	99.64
5564	2293881	T	2722	2284207	2288	4430	234	99.58
5566	2297550	C	1067	2523	2292715	772	473	99.79
5570	2300500	G	1579	1403	417	2296355	746	99.82
5571	2367354	A	2352859	2085	1743	3810	6857	99.39
5572	2449904	C	1199	2494	2437023	829	8359	99.47
5576	2456513	A	2451978	458	431	1792	1854	99.82
5577	2467993	G	2516	2184	610	2461571	1112	99.74
5578	2497886	A	2488945	2691	771	4646	833	99.64
5579	2516334	C	2255	2384	2506615	901	4179	99.61
5580	2503052	C	2035	2121	2491213	912	6771	99.53
5581	2769218	A	2739730	3245	1317	4710	20216	98.94
5582	3028022	C	1609	4365	3002818	961	18269	99.17
5584	3029804	T	926	3021440	4190	1603	1645	99.72
5585	3015231	A	3009564	730	1621	2178	1138	99.81
5586	3232949	T	1154	3216957	1124	3277	10437	99.51

图5K



5587	3226355	A	3203391	10501	760	11434	269	99.29
5588	3227994	C	5550	3235	3215847	1028	2334	99.62
5589	3183491	C	4644	2717	3137906	1136	17088	99.2
5590	2916887	T	1284	2907045	1868	1600	5090	99.66
5591	2942937	A	2927172	4942	780	5359	4684	99.46
5592	2930006	C	1725	1535	2945015	813	918	99.83
5593	2930844	T	1999	2944391	1251	3049	154	99.78
5594	2937004	C	2221	1567	2947360	690	5166	99.67
5598	2931626	T	2215	2944704	1040	3163	504	99.77
5599	2966304	C	1693	2461	2957939	870	3341	99.72
5600	2939135	A	2925628	5094	740	7427	246	99.54
5601	2921616	C	1338	1982	2917116	722	458	99.85
5602	2925097	T	1078	2920266	1296	2365	92	99.83
5603	2935059	G	2105	1737	544	2929614	1039	99.81
5604	2934952	A	2928542	1182	1522	3221	485	99.78
5605	2938948	G	2247	1699	491	2952842	1669	99.79
5606	2939574	A	2952263	1639	1567	3681	424	99.75
5607	2937810	C	2251	1935	2931473	913	1238	99.78
5608	2954483	A	2949069	755	693	2246	1720	99.82
5610	2976890	A	2970966	649	1105	2613	1557	99.8
5611	2976629	T	1138	2970767	1336	2633	755	99.8
5612	2974199	G	2255	2180	703	2968266	795	99.8
5613	3009004	A	2998765	1540	1865	3778	3056	99.66
5614	2979807	T	1435	2972413	1476	4341	142	99.75
5615	2980391	G	2545	2363	822	2974332	329	99.8
5616	2986595	G	2346	2593	1183	2978507	1966	99.73
5617	2976238	A	2967906	1325	1412	4185	1410	99.72
5618	3020096	G	2076	2502	919	3010976	3623	99.7
5619	3005765	T	5717	2983633	6931	9055	429	99.26
5620	3000623	C	2679	3232	2992820	1479	413	99.74
5621	3004190	T	954	2998245	1893	1942	1156	99.8
5622	3004630	T	510	3000414	1383	2221	102	99.86
5623	3006896	G	2568	3320	651	2999961	396	99.77
5624	3029793	A	3023310	1192	743	2362	2166	99.79
5625	3028949	T	1358	3020175	1422	2394	3600	99.71
5626	3004118	C	1938	3366	2994959	1466	2389	99.7
5627	2979015	G	3828	2366	1111	2969973	1737	99.7
5628	2963281	T	2799	2949907	3942	6588	45	99.55
5629	2968996	G	3316	2636	895	2961575	574	99.75
5631	3048397	A	3042710	1279	804	2576	1228	99.81
5632	3097865	C	2164	3312	3085614	1135	5640	99.6
5633	3072576	A	3064929	2521	1137	3866	123	99.75
5634	3030302	C	1848	3080	3019377	963	5034	99.64
5636	3060619	A	3053647	840	447	2549	3136	99.77
5637	3062978	G	4019	3310	1607	3053299	743	99.68
5638	3070040	C	2070	3738	3061727	1063	1442	99.73
5639	3075312	A	3069722	663	946	2183	1798	99.82
5640	3045898	A	3039916	659	815	2107	2401	99.8
5641	3033949	G	4768	2312	1021	3023514	2334	99.66
5642	3030723	T	8082	3004560	5744	7850	4487	99.14
5643	3028445	A	3011916	7469	760	6980	1320	99.45
5644	3026878	C	3860	3938	3009027	1043	9010	99.41
5645	3009762	C	2292	2584	3002997	1019	870	99.78

图5L

5646	3000753	C	2403	2568	2993127	1078	1377	99.73
5647	3012032	C	3230	1971	3003137	1138	2336	99.7
5648	3040783	A	3033701	987	2175	2627	1293	99.77
5649	3116855	A	3102728	1893	1401	3257	7376	99.55
5650	3083704	T	1394	3080531	1413	1510	836	99.83
5651	3141350	A	3131913	1023	908	2334	4932	99.7
5652	3167895	T	815	3155112	1180	2167	8621	99.6
5653	3176610	G	5334	3203	693	3158230	9150	99.42
5654	3437023	T	5013	3439355	4842	7013	798	99.49
5655	3473063	A	3464781	1041	896	2429	3916	99.76
5656	3424288	T	900	3418568	1523	1949	1348	99.83
5657	3423233	G	3403	2051	696	3410976	6107	99.64
5658	3430624	T	2263	3420901	2677	3844	939	99.72
5659	3419304	T	1471	3410860	1145	3221	2607	99.75
5660	3409562	C	4292	2457	3395417	1369	3827	99.59
5661	3304824	C	2506	2003	3292138	1116	7061	99.62
5662	3214233	T	814	3209057	1370	2046	946	99.84
5663	3233841	G	3041	2581	965	3225371	1883	99.74
5664	3440788	T	2228	3430273	2248	5476	563	99.69
5665	3549946	C	2282	3191	3541774	1319	1380	99.77
5666	3529737	G	3381	2503	522	3523058	273	99.81
5667	3573174	G	3060	2472	1167	3563973	2302	99.74
5668	3591098	T	4859	3568358	6723	10082	1076	99.37
5669	3590858	G	4376	2188	727	3582781	786	99.78
5670	3482938	C	2257	5198	3472014	1573	1896	99.69
5671	3463561	T	1100	3457748	1783	2852	78	99.83
5672	3502335	G	2940	1897	562	3493948	2988	99.76
5673	3562900	T	3295	3546359	4360	7958	928	99.54
5674	3575333	G	2793	3132	856	3567832	720	99.79
5675	3611294	A	3601010	2266	1736	4711	1571	99.72
5676	3587183	C	2823	3140	3576584	1134	3502	99.7
5677	3534821	T	983	3529953	1420	2132	333	99.86
5678	3626928	G	3957	2571	734	3614303	3343	99.65
5679	3698878	A	3693038	1776	1628	3349	87	99.82
5680	3687288	A	3679237	2613	752	4535	151	99.78
5681	3473998	C	3280	4728	3461280	1580	3130	99.63
5682	3419154	A	3413181	1074	1137	3492	270	99.83
5683	3321140	G	2184	3013	795	3310770	4378	99.69
5684	3436206	G	2535	4010	939	3428122	600	99.76
5685	3451540	G	2778	2413	529	3444716	1104	99.8
5686	3463606	A	3438182	3572	3789	9558	8505	99.27
5687	3260736	T	1651	3254408	1309	2534	834	99.81
5688	3389654	A	3378084	1897	1141	2726	5806	99.66
5689	3400768	T	1468	3394971	1083	2405	841	99.83
5690	3358198	C	4086	4055	3347087	2050	920	99.67
5691	3349260	T	1870	3340984	912	1452	4042	99.75
5692	3298823	A	3294242	672	591	2145	1173	99.86
5694	3317112	A	3312067	1289	867	2188	701	99.85
5695	3319151	T	2682	3309542	1050	5145	732	99.71
5696	3310135	C	2242	2942	3298234	1249	5468	99.64
5697	3229974	T	2288	3219608	1344	6054	680	99.68
5698	3217598	C	2297	2752	3211086	1244	219	99.8
5699	3215873	G	3443	2236	894	3209252	48	99.79

图5M

5700	3205948	G	2823	1669	601	3200060	795	99.82
5701	3232072	T	5759	3204811	7104	14306	92	99.16
5702	3230572	G	2086	2283	678	3224504	1021	99.81
5703	3227491	G	2149	2215	772	3222160	195	99.83
5704	3262836	G	2960	2362	1000	3254387	2127	99.74
5705	3274538	C	2671	4499	3262643	4578	147	99.64
5706	3276535	G	5113	1694	1278	3268314	136	99.75
5707	3305746	C	3131	4079	3295050	3248	238	99.68
5708	3291158	C	5102	3372	3280383	2121	178	99.67
5710	3305836	A	3300915	1275	945	2533	168	99.85
5711	3290868	A	3282570	3169	572	4485	72	99.75
5712	3308105	C	2194	2140	3297927	1147	4697	99.69
5713	3235149	T	904	3229595	1281	3268	101	99.83
5714	3273869	G	3819	3397	1814	3262517	2322	99.65
5715	3281086	C	2133	4133	3272141	1851	828	99.73
5716	3283510	T	2284	3273332	2488	3169	237	99.69
5717	3284559	C	1467	3399	3277731	1137	825	99.79
5718	3300138	G	5737	2145	683	3290337	1236	99.7
5719	3272029	T	3143	3258450	3642	6377	417	99.58
5720	3287278	A	3262062	12952	883	10439	942	99.23
5721	3336249	C	2677	3570	3325538	1266	3148	99.68
5722	3366000	T	1741	3358523	1062	2874	1800	99.78
5723	3387897	C	3316	3160	3373216	1804	6401	99.57
5724	3382138	T	874	3377880	1013	2062	309	99.87
5725	3406688	A	3400449	974	867	2625	1773	99.82
5726	3471249	A	3458790	1290	1176	3063	6930	99.64
5727	3412525	T	1382	3407343	939	2460	401	99.85
5728	3422811	G	4617	2434	588	3413164	2008	99.72
5729	3413629	T	4220	3395967	3827	5802	3813	99.48
5730	3349296	A	3339520	4524	373	4776	103	99.71
5731	3430420	C	2282	5742	3417703	1015	3678	99.63
5733	3339574	A	3327466	4498	629	5837	1144	99.64
5734	3295167	C	2750	4012	3280425	1495	6485	99.55
5735	3260890	T	881	3253930	1003	1799	3277	99.79
5737	3224417	T	1396	3219294	1009	2596	122	99.84
5738	3209416	C	1927	2048	3203956	1255	200	99.83
5739	3204776	C	1984	2534	3199026	934	298	99.82
5740	3225004	A	3219627	717	675	2565	1420	99.83
5741	3225674	A	3215165	3780	406	6012	311	99.67
5742	3387798	C	2677	2885	3380151	1143	942	99.77
5743	3362889	C	2470	2205	3351561	1349	5004	99.67
5745	3559193	G	2395	2586	515	3534222	19475	99.3
5746	3557447	A	3550329	1508	1109	4474	27	99.8
5747	3560435	G	4439	2620	751	3552026	599	99.76
5748	3533626	C	1857	6077	3522110	1486	2096	99.67
5749	3502641	A	3497114	1266	802	3429	30	99.84
5750	3508490	G	2297	2740	457	3499187	3809	99.73
5751	3505642	G	2156	2734	520	3500071	161	99.84
5752	3471256	A	3463252	1816	1297	4226	665	99.77
5753	3370888	C	3578	3482	3334335	1608	27885	99.92
5754	2934737	A	2930436	834	940	2464	63	99.85
5755	3103618	G	3575	2194	356	3088709	8784	99.52
5756	3198359	T	3612	3182436	3787	8422	102	99.5

图5N



5757	3318673	G	2828	1692	322	3307159	6672	99.65
5758	3345144	T	4432	3318313	5233	9308	7658	99.2
5759	3255572	G	2676	1659	261	3250224	752	99.84
5760	3266075	G	4500	2088	464	3256866	2157	99.72
5761	3243815	T	7395	3211606	7764	15062	1988	99.01
5762	3224628	G	2355	1834	380	3219185	874	99.83
5763	3217646	G	1932	1834	540	3191588	21752	99.19
5764	2952144	A	2942492	1454	1250	6152	796	99.67
5765	2981994	G	2725	1736	651	2963657	13225	99.39
5766	2844511	T	2633	2831924	3531	6211	212	99.56
5767	2855295	C	2224	3176	2845239	1254	3402	99.65
5768	2906460	A	2899823	955	676	3074	1932	99.77
5769	2918784	T	1114	2913531	793	2122	1224	99.82
5770	2999758	C	2402	3339	2987484	1365	5168	99.59
5771	2995690	A	2984953	3829	646	5578	684	99.64
5772	3005447	C	3171	4437	2993409	907	3523	99.6
5773	2990478	A	2979252	1271	1282	3747	4926	99.62
5774	2929674	T	788	2925013	982	2430	481	99.84
5775	2991013	G	3018	1882	513	2978285	7315	99.57
5776	2989048	T	3270	2971007	3222	9080	2469	99.4
5777	2960940	A	2952810	3364	582	3782	402	99.73
5778	2935655	C	2082	3621	2919754	1493	8705	99.46
5779	2837045	T	867	2831583	1320	3131	144	99.81
5780	2864727	G	2625	1767	484	2856180	3671	99.7
5781	2840758	G	2082	2349	685	2835511	131	99.82
5782	2854430	G	2275	1645	486	2849514	510	99.83
5783	2854385	A	2830674	877	707	13555	8572	99.17
5785	2704841	A	2700213	795	751	2494	588	99.83
5786	2732603	G	3981	1652	505	2722913	3752	99.64
5787	2727555	T	3237	2713528	3390	7013	387	99.49
5788	2699680	C	2414	2894	2690300	1815	2157	99.65
5790	2689766	T	1323	2684227	974	2963	279	99.79
5791	2686956	C	1625	3173	2680040	2018	100	99.74
5793	2718207	G	1294	1371	347	2712693	2502	99.8
5794	2712782	G	2026	1461	666	2706236	2393	99.76
5795	2693693	A	2684365	1723	2323	4143	1139	99.65
5796	2700097	T	1252	2693193	1506	3717	429	99.74
5797	2717506	G	3164	1603	942	2710257	1540	99.73
5798	2752208	C	2292	4652	2743169	1646	449	99.67
5799	2779856	A	2772964	1351	1190	2661	1690	99.75
5800	2789975	T	708	2784762	1111	2706	688	99.81
5801	2789383	G	2182	1750	454	2781159	3838	99.71
5802	2744289	T	1159	2737735	1199	3097	1099	99.76
5803	2733145	T	507	2728871	933	1772	1062	99.84
5804	2765968	G	2739	1824	575	2757954	2876	99.71
5805	2755890	G	3028	2328	524	2746520	3490	99.66
5806	2777891	T	6019	2746564	7440	17228	640	98.87
5807	2770368	G	2014	1577	490	2763176	3111	99.74
5808	2729921	G	1426	2093	520	2725435	447	99.84
5809	2752290	G	2733	1660	885	2745142	1870	99.74
5810	2789510	A	2783487	1052	862	3873	236	99.78
5811	2788578	A	2781662	2200	592	3888	236	99.75
5812	2793813	C	1659	4214	2784450	1496	3994	99.59

图50

5813	2749120	G	2752	2567	852	2742521	428	99.76
5814	2809873	G	2607	1920	690	2800923	3731	99.68
5815	2803150	T	3349	2788060	4342	7319	80	99.46
5816	2835045	T	973	2827962	1065	2920	2125	99.75
5817	2831620	C	1903	3360	2823692	1209	1456	99.72
5818	2817051	A	2811815	1300	539	3172	205	99.81
5819	2822651	C	1820	3672	2815638	1062	459	99.75
5820	2845030	A	2837548	1995	613	4152	722	99.74
5821	2809059	C	2673	5123	2798247	1416	1600	99.62
5822	2789901	G	2059	2427	479	2780455	4481	99.66
5823	2874311	G	1530	1604	414	2863332	7431	99.62
5824	2829414	G	2048	3426	367	2820258	3315	99.68
5825	2846773	T	6317	2821076	6987	12328	65	99.1
5828	2783083	G	3604	1569	435	2779294	181	99.79
5829	2778118	C	1542	4422	2769917	1347	890	99.7
5830	2768229	A	2763396	1137	681	3000	15	99.83
5831	2767814	G	2118	1695	638	2753615	9748	99.49
5832	2615870	C	1274	4145	2608522	1443	486	99.72
5833	2617809	G	2264	1654	625	2612679	587	99.8
5834	2615311	G	3302	2418	1922	2794617	13052	99.26
5835	2838836	C	2399	2965	2831016	2171	285	99.72
5836	2844631	C	2874	2797	2836341	2066	553	99.71
5837	2842039	C	2385	2072	2835400	1338	844	99.77
5838	2832637	T	717	2828436	1361	2104	19	99.85
5839	2842579	G	2489	1247	424	2837699	720	99.83
5840	2853857	A	2849241	1018	1243	2296	59	99.84
5841	2841652	A	2836236	1250	1047	2807	312	99.81
5842	2847418	G	2412	1423	527	2823276	19780	99.15
5843	2562714	C	1323	2532	2555350	1901	1608	99.71
5844	2572464	G	1892	1887	489	2566963	1235	99.79
5845	2759612	A	2743613	1833	1316	3176	9674	99.42
5846	2527859	T	1022	2523516	1043	1961	317	99.83
5847	2561079	C	1547	2446	2555413	895	778	99.78
5848	2583624	A	2577537	662	1094	2383	1948	99.76
5849	2613655	T	527	2608909	766	1340	2113	99.82
5850	2661570	A	2646218	5503	465	6085	3299	99.42
5851	2616849	C	1714	3406	2608189	705	2835	99.67
5852	2615878	T	1072	2611104	1041	1634	1027	99.82
5853	2606259	T	885	2596925	1081	1530	5838	99.64
5854	2515388	C	1433	2467	2509370	1065	1053	99.76
5855	2529629	A	2517651	3789	994	5773	1422	99.53
5856	2358336	C	1321	3329	2349979	1001	2706	99.65
5857	2364536	T	1233	2360017	837	2321	128	99.81
5858	2362942	C	1397	2088	2354872	958	3627	99.66
5860	2363786	G	1467	1711	410	2355918	4280	99.67
5861	2438727	A	2453260	1068	1147	3005	247	99.78
5862	2482887	G	2238	1222	609	2476826	1982	99.76
5863	2523204	T	3405	2507453	4483	6391	1472	99.38
5864	2527118	C	2149	2201	2520483	1240	1045	99.74
5866	2526587	A	2520926	1039	818	3025	779	99.78
5867	2551869	G	2887	2280	291	2544868	1543	99.73
5868	2590153	G	3038	1796	482	2578539	6298	99.55
5869	2562966	T	9040	2525693	10115	17919	199	98.55

图5P

5870	2553717	G	2516	1354	328	2547129	2390	99.74
5873	2624763	A	2620449	710	529	2012	1063	99.84
5874	2625263	T	1493	2619100	1166	2758	746	99.77
5875	2587568	C	2433	2102	2580846	948	1239	99.74
5876	2585228	C	1684	1826	2576832	963	3683	99.68
5877	2534111	A	2529989	936	827	2318	41	99.84
5878	2551283	G	2210	1627	329	2545535	1582	99.77
5879	2534180	T	3010	2530377	2987	7679	127	99.46
5880	2598933	G	1621	1604	416	2591352	3940	99.71
5881	2614306	G	1851	2115	501	2606917	2922	99.72
5882	2651824	A	2649914	1145	1281	3375	109	99.78
5883	2662236	T	1102	2656903	1324	2456	451	99.8
5884	2656748	G	2303	2175	837	2650307	1126	99.76
5885	2649840	A	2645239	949	739	2802	111	99.83
5886	2648823	G	2744	2633	712	2640975	1759	99.7
5887	2609880	A	2596053	5130	700	7762	215	99.47
5888	2644599	C	2528	2945	2633896	1582	3648	99.6
5889	2619823	C	3170	2580	2608986	1740	3347	99.59
5890	2645984	T	885	2641274	961	1887	977	99.82
5892	2653252	C	1714	2306	2649527	1468	237	99.78
5893	2656197	G	2821	1290	410	2651488	188	99.82
5894	2658180	A	2652871	810	1111	2403	985	99.8
5895	2648894	A	2644213	947	963	2604	167	99.82
5896	2656126	G	1390	1998	440	2650018	2280	99.77
5897	2688561	G	1760	1821	575	2689361	5044	99.66
5898	2700625	A	2683410	1106	1160	3136	1813	99.73
5899	2676310	A	2671443	925	934	2832	176	99.82
5900	2680782	G	3753	1871	620	2672626	1912	99.7
5901	2681118	T	7836	2650361	7347	15205	369	98.83
5902	2739465	G	2254	2121	638	2730112	4340	99.66
5903	2740718	G	1643	2446	373	2735808	448	99.82
5904	2781644	G	2224	1565	298	2776268	1289	99.81
5905	2761109	A	2747056	1531	1367	5424	5731	99.49
5906	2681166	T	1291	2675916	1459	1726	774	99.8
5907	2714152	A	2707512	1398	515	1975	2752	99.76
5908	2724798	T	1191	2718676	1275	2027	1629	99.78
5909	2703871	C	2808	2495	2695877	1172	1519	99.7
5910	2689474	C	2473	1843	2679962	868	4328	99.65
5911	2646085	A	2640256	1024	1016	2481	1308	99.78
5912	2698196	A	2689542	1377	692	2694	3891	99.68
5913	2690152	T	1318	2684514	874	2704	742	99.79
5914	2715295	C	2247	2616	2704804	1294	4334	99.61
5915	2722016	A	2716081	614	653	2097	2571	99.78
5916	2851741	T	1178	2836447	921	2295	10900	99.46
5919	2810504	A	2804520	719	1545	2228	1492	99.79
5920	2793302	T	1655	2784754	1561	2824	2478	99.7
5921	2764505	G	4128	2259	12331	2745233	354	99.3
5922	2804080	C	1931	3362	2794551	1722	2514	99.66
5923	2673810	C	3601	2502	2665495	1956	256	99.69
5924	2670086	C	2090	2140	2658057	1664	6135	99.55
5925	2584019	C	1687	2610	2578092	1491	129	99.77
5926	2687137	G	3522	1464	571	2675665	5915	99.57
5927	2700159	T	2933	2686256	4157	6642	171	99.49

图5Q

5928	2689049	C	1885	2313	2693615	1103	133	99.8
5929	2686580	C	3437	2255	2689683	913	290	99.74
5933	2760252	A	2747773	4180	1962	5834	503	99.55
5934	2603271	C	6775	1605	2588966	900	5005	99.45
5935	2513865	C	1997	1367	2509241	680	620	99.82
5937	2587221	A	2577129	847	1011	2319	5915	99.61
5938	2617100	G	2713	3420	875	2608089	2003	99.66
5939	2639378	C	1598	2741	2631530	1227	2282	99.7
5940	2635914	T	1069	2630774	897	2377	797	99.81
5942	2627386	G	3153	1982	701	2621372	178	99.77
5943	2632789	A	2628586	973	760	2133	337	99.84
5944	2667156	A	2647432	6634	619	9022	3449	99.26
5945	2557379	C	1647	2082	2548108	834	4708	99.64
5946	2491666	C	1936	1480	2486784	599	867	99.8
5947	2480241	C	1351	1739	2473327	555	3269	99.72
5949	2444671	G	3162	1876	704	2436684	2245	99.67
5950	2429652	T	3346	2415161	3526	7518	101	99.4
5951	2515626	G	2673	1899	913	2501536	8605	99.44
5952	2520146	C	1581	4712	2509246	1245	3362	99.57
5953	2496527	T	623	2491533	1360	1842	1169	99.8
5954	2517389	T	1004	2512394	1136	1486	1369	99.8
5955	2528410	T	948	2523961	1002	1910	589	99.82
5956	2574216	C	2110	2329	2563251	1075	5451	99.57
5957	2626185	C	1866	2406	2617876	835	3202	99.68
5958	2596764	A	2585639	4259	1031	5479	356	99.57
5959	2579649	C	1845	4299	2561286	1106	11113	99.29
5960	2432942	T	886	2428693	1611	1613	139	99.83
5961	2499906	A	2490349	1087	686	2273	5511	99.62
5962	2474431	T	602	2469949	1246	2042	592	99.82
5963	2555504	G	3556	1864	605	2540936	8543	99.43
5964	2545723	T	2974	2527092	3682	8094	3881	99.27
5965	2563354	G	2499	2000	599	2551849	6407	99.55
5966	2544558	T	1974	2534959	2390	4832	403	99.62
5967	2544404	T	616	2538136	987	1761	2904	99.75
5969	2472000	G	2097	1574	376	2463322	4631	99.65
5970	2423892	A	2419102	970	1063	2381	376	99.8
5971	2414384	A	2402948	1279	979	3304	5874	99.53
5972	2347483	G	2033	1926	549	2337155	5820	99.56
5973	2336052	G	1656	1891	738	2325809	5958	99.56
5974	2302783	G	2110	2347	798	2295076	2452	99.67
5975	2350645	G	2574	2118	485	2343296	2172	99.69
5976	2334663	T	13053	2277934	16229	27343	104	97.57
5977	2345179	G	2200	1501	685	2339520	1273	99.76
5978	2345727	A	2340478	1088	1187	2830	144	99.78
5979	2334699	A	2330431	962	783	2260	243	99.82
5980	2361269	G	2312	2288	430	2353096	3143	99.65
5981	2354361	G	1919	1975	527	2346567	3373	99.67
5982	2400186	A	2387425	748	775	2493	8745	99.47
5983	2359093	A	2352227	1987	354	3512	813	99.71
5984	2381043	C	1597	2247	2375038	826	1335	99.75
5985	2391348	C	1573	2588	2384060	799	2328	99.7
5987	2382857	G	3730	1524	1050	2375940	613	99.71
5988	2392497	C	1331	3116	2384915	1110	2025	99.68

图5R

5990	2385430	G	2402	1407	935	2374462	6204	99.54
5991	2417590	T	2221	2408057	3013	4236	63	99.61
5992	2435161	C	2207	1809	2428701	1258	1186	99.73
5993	2472790	C	2029	1332	2466229	1120	2080	99.73
5994	2457244	T	1178	2452864	1330	1794	78	99.82
5995	2528212	C	1568	2390	2517991	950	5313	99.6
5996	2563585	A	2555590	2577	1228	3861	329	99.69
5997	2535931	C	2719	2517	2546334	796	3165	99.62
5998	2556320	T	2267	2548565	1342	938	3208	99.7
6003	2499414	A	2489127	1643	1799	3317	3528	99.59
6004	2463386	C	1794	2449	2457139	1217	787	99.75
6005	2451810	G	2186	1277	674	2446252	1421	99.77
6006	2540854	A	2533886	1028	1195	1833	2862	99.73
6007	2547092	T	1595	2538604	3834	2429	630	99.67
6008	2522812	C	1861	1951	2517688	994	318	99.8
6009	2534063	C	1911	1696	2528933	1046	477	99.8
6010	2524693	C	1755	1987	2519907	826	218	99.81
6011	2523282	A	2518119	921	1628	2527	87	99.8
6012	2577462	G	1437	2975	782	2567782	4486	99.62
6013	2688976	G	3222	2793	1253	2678547	3161	99.61
6014	2651637	C	2361	2989	2642597	2159	1531	99.66
6018	2583782	A	2588939	964	879	2468	492	99.81
6019	2608005	G	2233	1862	729	2602138	1043	99.78
6020	2609047	A	2600938	1905	1907	3585	712	99.69
6021	2624745	C	2277	2363	2614621	960	4524	99.61
6023	2559955	A	2554259	1082	1189	2378	1047	99.78
6024	2610859	A	2586731	4065	1218	5671	3174	99.46
6025	2556072	C	1924	1694	2549950	1126	1378	99.76
6026	2609720	T	1071	2604272	1723	2392	262	99.79
6027	2607622	T	705	2603507	921	1619	870	99.84
6030	2602320	A	2594847	1589	1926	3912	46	99.71
6031	2605336	G	1384	2123	409	2600694	726	99.82
6032	2645922	G	1338	1677	559	2638734	3614	99.73
6033	2589763	A	2582279	1337	1648	3768	731	99.71
6034	2604500	G	1942	2342	696	2597839	1631	99.75
6035	2654779	G	2997	2284	792	2648564	142	99.77
6036	2672155	C	2345	3420	2663887	2129	374	99.69
6038	2620442	A	2608796	6885	1487	2357	917	99.56
6042	2691122	T	1061	2686291	878	2362	530	99.82
6043	2664280	C	1356	4269	2656057	1005	1593	99.69
6044	2659159	T	1928	2652046	1445	3659	81	99.73
6045	2671034	C	1825	1805	2664829	1161	1414	99.77
6046	2689563	C	2219	2254	2693430	819	841	99.77
6047	2708886	A	2703937	533	337	2884	1195	99.82
6049	2790906	G	2369	1914	507	2780934	5182	99.64
6050	2772589	T	4708	2757244	3858	6177	582	99.45
6051	2847855	A	2839203	3090	507	3802	1253	99.7
6052	2727290	C	1638	5015	2719232	1019	386	99.7
6053	2731063	G	3589	1576	531	2724260	1107	99.75
6054	2716558	T	2612	2704207	2742	6801	196	99.55
6055	2713991	G	1621	2063	523	2707659	2125	99.77
6056	2722263	G	2256	2523	586	2714934	1964	99.73
6057	2668944	G	2313	2053	481	2659441	4656	99.64

图5S



6058	2607938	T	9955	2575068	9919	12242	754	98.74
6061	2633971	C	3382	2907	2626593	849	2240	99.64
6063	2638641	A	2632817	622	776	2100	2326	99.78
6064	2538223	A	2533386	788	916	2320	813	99.81
6065	2551136	A	2546427	1162	550	1767	1230	99.82
6066	2544034	T	2019	2535561	518	2688	3248	99.67
6068	2546704	A	2540845	1859	274	2914	812	99.77
6069	2553403	C	1360	2267	2547280	984	1512	99.76
6071	2610108	G	3198	1503	324	2601214	3869	99.66
6072	2687488	A	2681235	987	828	2670	1768	99.77
6073	2666131	A	2661146	1053	808	2860	264	99.81
6074	2671351	G	2203	1549	352	2662335	4912	99.66
6075	2675491	T	5091	2655419	4321	10384	276	99.25
6076	2712260	G	2000	1997	319	2704230	3714	99.7
6077	2739255	G	2444	2450	520	2731747	2694	99.73
6078	2869822	A	2864568	1233	845	3053	123	99.82
6079	2871389	T	1135	2865799	1057	2407	991	99.81
6080	2865669	G	2730	1797	452	2857789	2901	99.73
6081	2821365	A	2816207	1077	717	3214	150	99.82
6082	2889614	G	3434	2261	526	2876282	7091	99.54
6083	2844710	C	2689	4430	2834716	1666	1209	99.65
6084	2842278	A	2832226	2827	284	4469	2472	99.65
6085	2903174	C	2287	5121	2885312	1458	8996	99.38
6086	2882596	A	2877896	874	526	3079	221	99.84
6087	2910919	T	647	2905414	777	2330	1751	99.81
6088	2965489	G	2993	1837	491	2955532	4636	99.66
6089	2975133	A	2970735	712	696	2470	520	99.85
6090	2985437	A	2973267	1290	883	2893	7104	99.59
6091	2859128	A	2853452	858	879	3136	803	99.8
6092	2857971	G	10903	2567	342	2843057	1102	99.48
6093	3075300	A	3064215	1071	856	3056	6102	99.64
6094	3032027	G	2372	3609	602	3023195	2249	99.71
6095	3057119	G	4448	2195	857	3046733	2886	99.66
6096	3030007	C	2457	3449	3017068	2294	4739	99.57
6097	2985980	A	2981306	1057	658	2840	119	99.84
6098	3064919	G	3744	1759	487	3051798	7131	99.57
6099	3077584	T	2265	3068962	1830	3927	600	99.72
6100	3081246	A	3075972	662	335	3439	838	99.83
6101	3099665	G	4304	3091	1241	3087883	3146	99.62
6102	3103736	A	3089148	5463	877	7822	426	99.53
6103	3268189	C	2258	4210	3247891	1287	12543	99.38
6104	3244848	C	2563	2398	3236163	1164	2560	99.73
6105	3228733	A	3210675	7316	771	9144	827	99.44
6106	3234028	C	2481	4775	3216796	1351	8625	99.47
6108	3331289	A	3316249	1140	478	2097	11325	99.55
6109	3316214	T	886	3310703	1163	2281	1181	99.83
6110	3302370	G	5907	2585	1504	3292075	319	99.69
6111	3274482	C	2374	5305	3256210	2131	8462	99.44
6112	3147551	T	954	3142109	1420	2891	77	99.83
6113	3210431	G	3009	2540	911	3199437	4534	99.66
6114	3228509	G	3547	2351	929	3220831	851	99.76
6115	3220866	C	2600	3671	3212424	1565	606	99.74
6116	3214047	C	2602	2558	3201616	1441	5830	99.61

图5T

6117	3133298	A	3129005	939	906	2338	105	99.86
6118	3218694	G	3609	1948	834	3206151	6152	99.61
6119	3342832	C	2819	4945	3332468	2223	377	99.69
6120	3343338	T	1678	3338608	1463	3432	137	99.8
6121	3364157	C	3417	3150	3352172	1798	3620	99.64
6122	3347509	A	3343318	900	692	2470	129	99.87
6123	3486245	T	793	3485877	1356	3140	5079	99.7
6124	3486196	G	3661	3211	961	3487389	974	99.75
6125	3571366	T	1849	3554611	2802	4922	7202	99.53
6126	3598311	C	2292	3564	3582789	1641	8025	99.57
6127	3545649	A	3531728	4939	1544	6987	451	99.61
6128	3773434	C	3004	3276	3764146	1246	1762	99.75
6129	3772821	T	1136	3767446	1126	2342	771	99.86
6130	3773657	A	3767377	1040	437	3927	876	99.83
6131	3810800	G	4198	2451	896	3796217	7038	99.62
6132	3826515	A	3816458	2537	822	5762	936	99.74
6133	4041023	C	2347	4593	4018841	1693	13549	99.45
6134	3991957	A	3984876	1229	1172	3451	1229	99.82
6135	3971463	T	1874	3964087	1325	3266	911	99.81
6136	3973349	C	3194	4756	3962220	1806	1373	99.72
6137	3962628	A	3957897	643	894	3167	27	99.88
6138	4061364	A	4048550	1760	916	3837	6301	99.68
6139	4057192	C	2888	3229	4047728	1229	2118	99.77
6140	4025774	A	4014940	3347	1347	6093	47	99.73
6141	4037614	C	3205	3794	4021184	1242	8189	99.59
6142	3899332	A	3893846	1288	1196	3179	23	99.85
6143	4076793	G	3707	3568	1173	4056696	11649	99.51
6144	4095988	A	4089667	1125	1415	3574	207	99.85
6145	4113736	A	4103785	3041	696	5615	599	99.76
6146	4125696	C	3373	3146	4113718	1189	4270	99.71
6148	4081796	A	4075506	1319	733	3280	958	99.85
6149	4143257	A	4139035	1260	1057	2686	1219	99.85
6150	4076984	T	1682	4070278	1444	3359	221	99.84
6151	4104257	G	3300	3484	705	4088308	8460	99.61
6152	4060131	T	7192	4027372	7279	15165	3123	99.19
6153	4135017	G	3948	3718	1027	4121789	4535	99.68
6154	4126259	C	2176	5553	4115271	2079	1180	99.73
6155	4122611	T	1623	4116300	1564	2928	196	99.85
6156	4124491	T	826	4119154	1210	2567	734	99.87
6157	4106524	G	2615	2419	592	4100221	677	99.85
6158	4173055	G	2224	2420	799	4165191	2421	99.81
6159	4166481	A	4154953	1792	2062	5737	1937	99.72
6160	4145094	G	2519	3061	706	4135995	2813	99.78
6161	4121738	G	3178	2295	618	4110600	5007	99.73
6162	4113005	A	4098756	2160	2749	6117	3223	99.65
6163	4114442	T	2028	4104803	2325	4850	436	99.77
6164	4201800	G	4635	2444	2023	4186149	6549	99.63
6165	4210235	C	2805	6320	4197291	2592	1227	99.69
6166	4177434	C	3175	4022	4166754	1728	1755	99.74
6167	4250365	A	4236445	2110	2349	4049	5412	99.67
6168	4251125	T	1105	4244518	1769	3188	545	99.84
6169	4582356	G	6750	3449	1038	4551694	19425	99.33
6170	4572148	T	4648	4548757	4565	10170	4008	99.49

图5U

6171	4544135	A	4537793	1513	777	3172	880	99.86
6172	4518493	T	1882	4502702	2435	4012	7462	99.63
6173	4399670	G	5730	6148	3157	4383860	775	99.64
6174	4442950	G	6813	4010	2702	4425839	3586	99.61
6175	4426963	C	2715	6190	4408704	2399	6955	99.59
6176	4369202	A	4353344	4728	2066	6911	153	99.68
6177	4338280	C	3143	4703	4312519	1751	16164	99.41
6178	4090980	T	943	4085306	1881	2735	215	99.86
6179	4108806	G	2687	2272	672	4101708	1467	99.83
6180	4126296	A	4115437	2359	2795	4540	1165	99.74
6181	4114601	T	1222	4108057	1482	3115	725	99.84
6182	4127268	G	3294	2940	806	4116180	4048	99.73
6183	4362643	G	3744	3942	1289	4334657	19011	99.36
6184	4365010	T	4104	4344664	5752	10098	372	99.53
6185	4519582	C	2967	4414	4509406	1655	1140	99.77
6187	4509372	A	4503741	1153	525	3398	555	99.88
6188	4489409	G	5042	4044	1641	4477631	1051	99.74
6189	4456825	A	4451652	907	1136	2569	561	99.88
6190	4445700	A	4438889	1453	954	3428	976	99.85
6191	4442219	G	6167	2867	1606	4409746	21833	99.27
6192	4153379	C	2369	3505	4142809	1785	2911	99.75
6193	4140545	A	4123915	6357	1353	8727	193	99.6
6194	4116183	C	2436	2473	4107500	1387	2387	99.79
6195	4115090	T	1387	4110224	1243	2063	173	99.88
6197	4184936	G	3144	2292	577	4177793	1130	99.83
6198	4186334	A	4178912	1764	2136	3355	167	99.82
6199	4117606	T	1494	4110394	1540	2641	1537	99.82
6200	4117459	T	1180	4108990	1377	2064	3848	99.79
6202	4137537	G	4616	3755	839	4122798	5529	99.64
6203	4119736	T	2956	4107435	2978	6277	90	99.7
6204	4025541	C	2095	3590	4018049	1364	443	99.81
6205	4045772	C	2173	3303	4035936	1138	3222	99.76
6206	4052017	A	4034321	6930	1377	9264	125	99.56
6207	4045573	C	2314	4886	4035311	1288	1774	99.75
6208	3930463	C	2948	3886	3920565	1425	1639	99.75
6209	3907266	A	3900806	1139	2003	3071	247	99.83
6210	4108177	G	3608	2819	867	4084143	16740	99.41
6211	4109583	T	4967	4087153	5490	11918	55	99.45
6212	4120164	G	5566	2667	1294	4109876	761	99.75
6213	4109329	C	4176	6096	4094929	1819	2309	99.65
6214	4191602	T	1582	4183035	2352	4071	562	99.8
6215	4289612	G	3303	3546	1645	4274805	6313	99.65
6216	4327659	G	5024	3455	1533	4317423	224	99.76
6217	4292125	C	6109	5751	4276193	2430	1642	99.63
6218	4279381	T	1696	4258100	2555	3110	13920	99.5
6219	4114724	A	4085454	13665	902	12566	2137	99.29
6220	4386410	C	2709	6462	4360455	1945	14839	99.41
6221	4378737	C	4445	3285	4368164	2085	758	99.76
6222	4375845	C	5782	4768	4358196	1890	5209	99.6
6223	4386793	T	2267	4368051	2713	3602	10160	99.57
6224	4296290	T	882	4290060	1463	2472	1413	99.85
6225	4367661	A	4354520	1787	1020	4682	5652	99.7
6226	4366833	T	1411	4360213	1681	3354	174	99.85

图5V



6227	4347086	G	4895	1940	446	4336905	2900	99.77
6228	4321053	T	4998	4281541	4609	7549	22356	99.09
6229	3966611	A	3958828	1228	1321	4586	648	99.8
6230	3978133	G	4141	2460	871	3966754	3907	99.71
6231	3966273	C	3193	5049	3951548	1904	4579	99.63
6232	3904632	A	3896976	1322	1837	3641	856	99.8
6233	3903306	A	3890284	2111	1316	3736	5859	99.67
6234	3788928	T	706	3782259	1188	4304	471	99.82
6235	3819253	G	2844	2068	545	3811417	2379	99.79
6236	3830561	G	2248	2663	491	3823218	1941	99.81
6237	3863526	G	2474	2452	640	3856417	1543	99.82
6238	3857509	A	3844706	1240	1693	9111	759	99.67
6239	3836464	A	3828964	1024	1310	4026	1140	99.8
6240	3827556	A	3820772	1470	1222	3873	219	99.82
6241	3951483	G	10535	2762	679	3929528	7979	99.44
6242	4065177	A	4057685	1012	1514	4165	801	99.82
6243	4058970	A	4052316	1278	945	3741	690	99.84
6244	3981457	G	3515	2999	509	3969402	5032	99.7
6245	4078410	A	4070632	1143	1431	3770	1434	99.81
6246	4056814	A	4050211	1526	960	3790	327	99.84
6247	4065168	G	2669	2575	495	4057353	2076	99.81
6248	4066544	A	4058193	1513	1779	4863	196	99.79
6249	4120529	G	2616	3245	969	4102344	11355	99.56
6250	4000669	A	3987516	2165	3473	7382	133	99.67
6251	4011183	G	5353	5086	637	3999110	997	99.7
6252	4088386	A	4076260	2327	2710	4822	2267	99.7
6253	4020996	T	4503	4008488	2028	5570	407	99.69
6254	4051255	A	4040078	1737	865	3534	5041	99.72
6255	4054184	T	5234	4039299	1122	7164	1365	99.63
6256	4042301	C	3073	3632	4033748	1339	509	99.79
6257	4074591	T	2268	4062883	1410	3751	4279	99.71
6258	4032908	T	1243	4026605	1561	2925	574	99.84
6259	4017850	G	3904	2326	1010	4009325	1285	99.79
6260	4003829	A	3997957	1097	1418	3317	40	99.83
6261	3998732	A	3991287	2214	805	4328	98	99.81
6262	3976957	C	2697	5069	3963207	1427	4557	99.65
6263	3959741	A	3954332	478	493	2450	1988	99.86
6264	3966680	A	3961560	891	794	2498	937	99.87
6265	3904021	A	3895872	2012	1211	4647	279	99.79
6266	3899574	C	2558	2820	3892338	967	891	99.81
6267	3897884	A	3893397	445	661	2745	636	99.88
6268	3912800	A	3904486	844	766	2745	3959	99.79
6269	3985014	A	3973407	3341	800	5500	1966	99.71
6270	3824276	C	2309	2230	3814959	1335	3443	99.76
6271	3819214	C	2016	3121	3809929	1448	2700	99.76
6272	3781051	A	3775608	892	1333	3000	218	99.86
6273	3780101	G	2305	2808	610	3773676	702	99.83
6274	3778232	A	3770237	1496	1474	4829	196	99.79
6275	3747829	G	4040	3551	974	3738387	877	99.75
6276	3808721	A	3790522	3902	2261	7984	4052	99.52
6277	3994772	C	2511	3170	3970684	1648	16759	99.4
6278	3974347	A	3957502	6470	1086	8804	485	99.58
6279	4014096	C	2446	3186	4003966	1311	3187	99.75

图5W

6280	3989060	T	2420	3981205	2211	3126	98	99.8
6281	3999307	A	3993579	712	864	3285	867	99.86
6282	3994635	A	3987526	1724	1349	3733	263	99.82
6283	3996210	G	2269	2701	479	3989503	1258	99.83
6284	3792626	G	2473	2240	559	3785170	2184	99.8
6285	3847470	A	3820769	1170	1048	3152	21331	99.31
6287	3537868	A	3530423	697	635	2065	4048	99.79
6288	3605646	T	2243	3591444	1528	4123	6308	99.61
6289	3613263	G	4892	3458	1009	3603044	860	99.72
6290	3645164	C	2340	4129	3637032	1247	416	99.78
6291	3641483	A	3636762	700	1079	2781	161	99.87
6292	3630117	A	3625735	750	597	2652	383	99.88
6293	3607816	A	3599475	2313	1760	4001	267	99.77
6296	3603243	C	2189	1293	3591493	761	7507	99.67
6297	3493010	T	1211	3487517	1237	2978	67	99.84
6298	3525723	G	4590	2037	960	3515982	2154	99.72
6299	3532655	C	2140	3954	3524967	1433	161	99.78
6300	3536809	T	1956	3529857	1535	3405	56	99.8
6301	3545499	C	1902	3847	3537282	1631	837	99.77
6302	3544492	G	3150	1699	643	3538848	152	99.84
6303	3673263	A	3652391	2290	1455	4280	12847	99.43
6304	3684753	C	2794	3613	3674569	1605	2172	99.72
6305	3682431	A	3670415	4126	839	6918	133	99.67
6306	3836216	C	2005	6660	3812494	1600	13457	99.38
6307	3928097	A	3918417	1319	1108	4307	2946	99.75
6308	3948445	T	1214	3939774	2604	2397	2456	99.78
6309	3951747	A	3945489	1062	1574	3028	594	99.84
6310	3946356	T	1321	3939817	1584	2895	739	99.83
6311	3802373	G	3560	2377	473	3786832	9131	99.59
6312	3743247	G	2871	2214	637	3731327	6198	99.68
6313	3767124	A	3760478	1236	816	4355	239	99.82
6314	3778538	A	3763153	1261	912	2333	10879	99.59
6315	3621070	T	2073	3611196	1149	2433	4219	99.73
6316	3499294	C	2451	3550	3490301	1145	1847	99.74
6318	3615418	A	3593723	6023	833	8386	6453	99.4
6319	3604379	C	2563	3433	3595190	1440	1753	99.75
6320	3417278	C	1858	1489	3410521	702	2708	99.8
6321	3430847	T	2441	3417169	3698	4299	3240	99.6
6322	3479078	C	1769	2288	3471578	935	2508	99.78
6323	3473397	C	2145	2136	3467547	1101	468	99.83
6324	3460239	C	2343	2866	3453417	893	720	99.8
6325	3482035	A	3468529	4239	2004	6285	978	99.61
6326	3499227	C	2158	4314	3479215	1272	12268	99.43
6327	3439210	T	975	3433787	1232	2710	506	99.84
6328	3465645	G	3230	1881	678	3457698	2158	99.77
6329	3466412	G	3415	2650	702	3455715	3930	99.69
6330	3451972	T	9136	3413938	10097	17622	1179	98.9
6331	3467950	G	2550	2019	626	3459409	3346	99.75
6332	3465354	A	3455118	2772	2306	4869	289	99.7
6333	3574535	C	3271	4234	3556713	1646	8671	99.5
6334	3566569	T	1528	3554933	1356	2472	6280	99.67
6335	3518074	T	735	3513294	1120	1547	1378	99.86
6336	3646914	A	3629637	1368	1349	3117	11443	99.53

图5X

6337	3619604	T	842	3613376	1826	2586	974	99.83
6338	3624504	G	4988	2145	534	3613614	1223	99.75
6339	3620803	T	4685	3602962	3738	5935	3483	99.51
6340	3569029	A	3564145	846	609	3340	89	99.86
6341	3573298	A	3556900	1097	882	3461	10958	99.54
6342	3325611	A	3319411	1111	1286	3276	527	99.81
6343	3405174	G	3072	2889	922	3391997	6294	99.61
6344	3475127	G	2967	3259	932	3458277	9692	99.52
6345	3341786	A	3331275	1701	1864	3542	3404	99.69
6346	3299262	T	1459	3291710	2379	3227	487	99.77
6347	3296397	G	2640	2328	691	3289796	942	99.8
6348	3298801	A	3292319	1302	1275	2658	1247	99.8
6349	3361914	A	3348460	3273	932	5061	4188	99.6
6350	3347005	C	2583	2224	3338163	1156	2879	99.74
6351	3335887	T	1012	3328999	1070	2026	2780	99.79
6352	3303559	T	779	3294979	1426	1429	4946	99.74
6353	3229218	A	3225080	937	753	2381	67	99.87
6354	3238032	G	3359	2576	852	3230623	622	99.77
6355	3445100	A	3437087	1302	1304	3296	2111	99.77
6356	3465483	T	1845	3457755	1776	2735	1372	99.78
6357	3447105	C	3079	2890	3436227	1219	3690	99.68
6358	3401431	C	4563	2132	3391568	1030	1838	99.71
6360	3425376	A	3418914	665	723	1860	3214	99.81
6361	3460542	A	3454120	766	1076	2550	2030	99.81
6362	3470813	A	3462382	2215	1248	4187	781	99.76
6363	3463301	C	2785	2084	3455435	1078	1939	99.77
6364	3438693	A	3433865	858	1293	2646	31	99.86
6365	3433927	A	3427236	1405	1736	3187	363	99.81
6366	3460471	A	3450396	1785	2255	4049	1986	99.71
6367	3513118	G	2440	3803	515	3502860	3500	99.71
6368	3519527	G	2187	3188	706	3511205	2241	99.76
6369	3457957	T	8208	3425321	7918	12054	4456	99.06
6371	3377382	G	2301	2239	771	3369301	2770	99.76
6372	3378780	A	3370965	1542	1804	4262	207	99.77
6373	3379974	G	4312	2460	1241	3371741	220	99.76
6374	3376712	C	2844	4574	3361918	2442	4934	99.56
6375	3302480	A	3293910	1382	1583	5028	577	99.74
6376	3398592	G	4969	2966	762	3382176	7719	99.52
6377	3507150	G	3131	4456	759	3498079	725	99.74
6378	3343447	G	2284	2479	719	3337720	245	99.83
6379	3343809	G	4820	1678	689	3333006	3616	99.68
6380	3278568	A	3246666	1311	2415	27389	587	99.03
6381	3300972	A	3294446	1066	1065	3523	872	99.8
6382	3321123	A	3313570	1444	1325	3196	1588	99.77
6383	3398219	T	2905	3389736	1733	3758	87	99.75
6384	3397292	C	4071	3027	3386578	2018	1598	99.68
6385	3375993	C	3421	3302	3360690	2090	6490	99.55
6386	3282469	A	3275348	1451	2191	3341	138	99.78
6387	3322673	G	2356	2368	521	3314947	2481	99.77
6388	3371360	A	3362437	1968	2585	4189	181	99.74
6389	3307092	T	1152	3301492	1163	2258	1027	99.83
6390	3296103	T	835	3289982	818	1318	3150	99.81
6391	3298142	A	3291390	779	552	2991	2430	99.8

图5Y

6392	3345559	A	3340932	978	834	2151	664	99.86
6393	3349898	T	975	3345701	835	2117	270	99.87
6394	3396206	T	1036	3391517	1509	1980	164	99.86
6395	3395555	G	3272	1982	538	3387367	2396	99.76
6396	3373229	A	3368453	1100	1095	2481	100	99.86
6397	3374763	A	3367989	1470	1089	3304	911	99.8
6398	3381141	G	2210	2063	674	3375135	1059	99.82
6399	3632205	C	2153	3285	3619059	1532	6166	99.64
6400	3609388	T	1469	3602861	1528	2908	622	99.82
6401	3612999	T	947	3608514	1115	2210	213	99.88
6402	3481099	C	2042	2496	3475164	1317	80	99.83
6403	3483527	T	1326	3478528	1237	2189	247	99.86
6404	3579402	A	3568277	1362	876	2991	5896	99.69
6405	3578286	G	1904	3569	506	3570430	1877	99.78
6406	3575087	T	2657	3563785	3073	5314	258	99.68
6407	3479478	T	1164	3466240	1205	2856	8013	99.62
6408	3342335	T	532	3337934	957	2707	205	99.87
6409	3372268	G	2204	1482	289	3364406	3887	99.77
6410	3369903	A	3363814	1048	687	4299	55	99.82
6412	3418375	T	1075	3407406	1126	2153	6615	99.68
6413	3290895	G	2696	2141	430	3284601	1027	99.81
6414	3397547	A	3378987	3718	772	6545	7525	99.45
6415	3418678	C	1727	2837	3409193	1269	3652	99.72
6416	3403524	T	1379	3398403	1439	2269	34	99.85
6417	3422928	C	1852	2652	3412158	1485	4781	99.69
6418	3365496	A	3359005	1161	1224	4065	41	99.81
6419	3346445	G	2746	2164	429	3337017	4089	99.72
6420	3358602	T	3712	3342572	3606	8379	333	99.52
6421	3393981	G	2562	2265	387	3385547	3220	99.75
6422	3354510	G	3500	2376	643	3342213	5778	99.63
6423	3265137	C	2555	4630	3252569	2009	3374	99.62
6424	3226161	A	3220454	1080	936	3316	375	99.82
6425	3224953	A	3219459	1022	798	2233	1441	99.83
6426	3200163	T	817	3195730	897	2143	576	99.86
6427	3170982	G	1995	1630	318	3159762	7257	99.65
6428	3106023	A	3101748	809	324	2836	306	99.86
6429	3102282	G	1775	1764	367	3083519	4857	99.72
6431	3055634	A	3051269	887	591	2174	713	99.86
6432	3016847	T	1022	3011904	951	2367	603	99.84
6433	3035192	G	1853	1618	352	3029712	1657	99.82
6434	2990520	G	2457	2018	771	2982455	2819	99.73
6435	2866071	C	1676	5847	2853721	2547	2280	99.57
6436	2850246	T	871	2836447	10127	2317	484	99.52
6437	2861384	T	821	2855563	1006	1855	2139	99.8
6438	2852414	T	686	2847525	929	2197	1077	99.83
6439	2845022	T	451	2832473	1111	10821	166	99.56
6440	2848613	G	2518	4297	936	2840360	502	99.71
6441	2850481	G	2892	3181	1427	2842391	590	99.72
6442	2870883	G	2730	1960	572	2858983	6638	99.59
6443	2841290	A	2832105	1196	1375	5187	1427	99.68
6444	2782397	A	2768531	5133	729	7258	746	99.5
6445	3191373	C	2495	3600	3152741	2035	30502	98.79
6446	3190222	C	3835	2719	3180500	1733	1435	99.7

图5Z

6447	3211360	T	762	3206892	1256	2083	367	99.86
6448	3273814	A	3264141	1999	2461	2760	4453	99.64
6450	3234980	A	3229160	1001	501	2030	2288	99.82
6451	3230793	T	825	3226425	1272	1323	948	99.86
6452	3218008	G	4743	1996	548	3209798	923	99.74
6453	3202685	C	2372	3782	3174215	1744	20572	99.11
6454	2906843	T	982	2901283	1906	2479	193	99.81
6455	2933318	G	2875	1694	747	2925857	2145	99.75
6456	2932008	C	1624	7239	2918878	1526	2741	99.55
6457	2893505	T	645	2887179	3895	1711	75	99.78
6461	2872209	C	1495	4039	2864390	1098	1187	99.73
6462	2868063	A	2861958	1794	675	3529	107	99.79
6463	2868557	C	1771	3910	2859984	665	2227	99.7
6468	2992364	A	2967250	5453	2620	7875	9166	99.16
6469	3000909	C	3100	1577	2993733	918	1581	99.76
6470	3207816	C	1947	2548	3202285	864	172	99.83
6471	3179004	C	2693	2722	3171501	1283	805	99.76
6472	3169062	A	3161263	1498	2045	4207	49	99.75
6473	3193723	G	1743	2878	637	3186714	1751	99.78
6474	3258659	G	1921	2617	649	3250878	2594	99.76
6475	3227255	A	3310950	2347	2804	7242	3912	99.51
6476	3374894	G	2824	2861	492	3357329	11388	99.48
6477	3281217	T	15986	3218180	15555	30483	1013	98.08
6478	3338775	G	3124	2458	443	3328372	4378	99.69
6479	3402162	A	3394568	1318	1037	3348	1891	99.78
6480	3782766	T	2247	3776280	1193	2409	637	99.83
6481	3902569	A	3896051	903	679	2882	2054	99.83
6482	3871164	A	3861937	3172	527	5159	369	99.76
6483	3868144	C	3275	5327	3850345	1460	7737	99.54
6484	3784746	A	3775297	1408	1442	3977	2622	99.75
6485	3798385	G	2197	3391	1053	3788792	2932	99.75
6486	4029994	G	2897	2808	436	4016282	7571	99.66
6487	4038934	T	6471	4012391	6831	10978	2263	99.34
6488	3976787	T	1266	3971712	1043	2479	287	99.87
6489	4125072	C	2069	5031	4106392	2257	9303	99.55
6490	4119287	A	4111511	1311	1547	4744	174	99.81
6491	4256147	G	4915	2867	1153	4238694	8518	99.59
6492	4242363	C	2803	7720	4225303	2732	3805	99.6
6493	4196369	A	4187132	1766	1607	5201	663	99.78
6494	4285755	G	5645	1889	673	4267923	9625	99.58
6495	4406499	T	6272	4384031	5402	9612	1182	99.49
6496	4396762	A	4389621	1436	804	4448	453	99.84
6497	4406455	G	2843	3538	710	4388267	11097	99.59
6498	4257954	G	3325	3015	536	4250317	761	99.82
6499	4282228	G	5791	3117	743	4262979	9598	99.55
6500	4172566	T	21069	4089850	21802	39746	69	98.02
6501	4170943	G	2956	2109	1013	4164087	778	99.84
6502	4167930	C	2450	8901	4151474	2939	2166	99.61
6503	4138611	G	3519	2008	478	4132333	273	99.85
6504	4300947	A	4283090	3708	2585	5297	6267	99.58
6505	4223725	T	1671	4216463	1841	3253	497	99.83
6506	4219268	C	3364	3662	4208841	2123	1258	99.75
6507	4193464	C	3073	2861	4183489	1889	2152	99.76

图5AA



6508	4165233	A	4158863	1507	1116	3488	259	99.85
6509	4200066	G	2373	2240	341	4193074	2038	99.83
6510	4197447	A	4188539	2439	2533	3808	128	99.79
6511	4197504	T	1238	4192277	1201	2357	431	99.83
6512	4193122	T	936	4183556	1134	2086	5410	99.77
6514	4125445	G	1814	3682	379	4118247	1323	99.83
6515	4050733	T	3327	4034786	3989	8371	260	99.61
6517	4168356	T	642	4163400	658	2048	1608	99.88
6518	4161435	T	539	4156726	790	3261	119	99.89
6519	4162862	G	2216	5454	489	4154459	244	99.8
6520	4132097	G	2741	2363	669	4125519	805	99.84
6521	4210606	A	4196570	2924	3744	7339	29	99.67
6522	4188062	G	4836	2334	811	4178763	1318	99.78
6523	4191740	C	5089	6727	4176844	2794	286	99.64
6525	4211226	A	4205365	850	1280	2623	1108	99.86
6527	4220277	A	4213680	2409	959	2303	926	99.84
6528	4250928	T	1422	4244222	951	2657	1676	99.84
6529	4242985	T	1220	4237077	1728	2911	49	99.86
6530	4236343	C	3394	3829	4225272	2909	939	99.74
6531	4229677	C	3896	3935	4218352	3393	101	99.73
6532	4233489	G	3852	2782	452	4226124	279	99.83
6533	4274852	G	3059	1966	651	4265544	3632	99.78
6534	4243068	T	11085	4204134	10459	17262	128	99.08
6535	4267799	A	4256813	1840	985	3917	4244	99.74
6536	4255176	T	907	4249426	774	2600	1469	99.86
6537	4274288	T	605	4267491	896	2723	2473	99.84
6538	4304451	G	2966	3205	564	4294545	3171	99.77
6539	4324929	A	4312776	2578	1698	5707	2220	99.72
6540	4328530	T	1338	4320459	1014	5015	704	99.81
6541	4320603	G	3952	4480	516	4309750	1905	99.75
6542	4351467	G	4541	2425	468	4339864	4169	99.73
6543	4358503	A	4343949	2260	2466	5426	4402	99.67
6544	4297955	A	4291162	1281	1023	4162	327	99.84
6545	4314121	G	3015	2566	396	4303696	4448	99.76
6546	3952917	A	3946067	1234	952	4076	388	99.83
6547	3944915	G	2529	2044	371	3936800	3171	99.79
6548	3941215	A	3936070	937	1094	2764	350	99.87
6549	3887887	A	3881416	1732	800	3777	162	99.83
6550	3900420	G	3957	2140	587	3891576	2160	99.77
6551	3911995	C	2241	4111	3900474	1812	3337	99.71
6552	3875346	T	796	3870724	848	2904	74	99.88
6553	3895009	G	3188	2069	412	3886846	2494	99.79
6554	3877265	T	1869	3869574	1747	4012	63	99.8
6555	3885702	T	977	3881143	1023	1991	568	99.88
6557	3994835	G	3022	1816	599	3986215	3183	99.78
6558	4052304	C	2702	5740	4040118	2353	1391	99.7
6559	4045228	C	3222	3610	4034532	1900	1964	99.74
6560	4090769	T	1576	4084002	1429	2604	1158	99.83
6561	4104568	T	871	4099067	793	2376	1461	99.87
6562	4429308	T	786	4399408	1601	4925	22588	99.32
6563	4483159	G	3075	7977	812	4467825	3470	99.66
6564	4512391	A	4500150	3092	681	6928	1540	99.73
6565	4559281	C	2478	5942	4542950	1944	5967	99.64

图5BB

6566	4509750	T	1174	4504221	1085	2019	1251	99.88
6567	4654740	A	4633764	4206	536	5796	10438	99.55
6568	4550527	C	2271	7386	4537327	1201	2342	99.71
6569	4549506	A	4538807	3138	896	5707	958	99.76
6570	4542240	C	2855	8465	4513143	1738	16039	99.36
6571	4257050	A	4248765	1638	1579	4691	377	99.81
6572	4895005	G	3393	5696	897	4843400	41619	98.95
6573	4921105	G	3204	12767	1037	4901019	3078	99.59
6574	5109213	G	6972	3666	1047	5083668	13860	99.5
6575	5267581	T	17980	5196594	21531	24294	7182	98.65
6576	5172232	A	5161699	990	529	3384	5630	99.8
6577	5113833	T	1026	5104560	2055	4420	1772	99.82
6578	5095343	G	4524	2626	629	5086948	616	99.84
6579	5158213	A	5141649	1869	1415	3841	9439	99.68
6580	5095902	T	2011	5054859	2207	3669	33156	99.19
6581	4626561	G	6139	2770	906	4604926	11820	99.53
6582	4526979	C	2320	7678	4505681	1543	9757	99.53
6583	4406386	A	4398664	2041	1185	4205	291	99.82
6584	4558422	T	1393	4538958	1461	3722	12888	99.57
6585	4445633	C	2168	3393	4437251	1103	1718	99.81
6586	4816887	T	1916	4789721	2395	4635	18220	99.44
6587	4821988	C	3531	2019	4810411	1187	4840	99.76
6588	4806671	T	1777	4800165	1662	2995	72	99.86
6589	4715577	C	2503	3943	4706175	1172	1784	99.8
6590	4693559	A	4687376	1076	1128	3937	42	99.87
6591	4785594	G	5841	3449	1642	4768757	5905	99.65
6592	4878596	C	2761	6718	4863732	2100	3285	99.7
6593	4871354	C	6309	3391	4858262	2615	777	99.73
6594	4877837	C	3663	2616	4857448	2210	11900	99.58
6595	4733347	T	1046	4726212	2081	2583	1425	99.85
6596	4916276	G	4985	2614	1164	4896748	10765	99.6
6597	5055803	C	3841	8151	5040795	2683	333	99.7
6598	5051713	T	1473	5045635	1660	2762	183	99.88
6599	5058141	T	1048	5047278	1602	2371	5842	99.79
6600	4972331	G	2631	3615	589	4964817	679	99.85
6601	5035601	G	4471	2638	1529	5023323	3620	99.76
6602	5150809	T	3445	5132262	5886	8700	516	99.64
6603	5146911	T	1180	5139163	1299	2844	2425	99.85
6604	5088780	C	2036	6881	5074491	1790	3582	99.72
6605	5035913	G	3214	2595	1407	5028575	122	99.85
6606	5054036	A	5043434	1907	2656	4913	1126	99.79
6607	5050859	G	4003	4926	2028	5039413	489	99.77
6608	5355539	G	8830	3450	1812	5333086	8361	99.58
6609	5462982	C	3095	5307	5446018	3020	5542	99.69
6610	5470620	A	5447344	7667	1484	10696	3429	99.57
6611	5671278	C	3808	5627	5649268	2403	10172	99.61
6612	5681555	T	1299	5674072	2629	3156	399	99.87
6613	5722908	A	5714021	1492	1350	4468	1577	99.84
6614	5732097	A	5723314	1158	1899	4075	1651	99.85
6615	5732515	A	5723715	1394	1269	4119	2018	99.85
6616	5742998	G	11416	4242	1150	5716719	9471	99.54
6617	5763846	A	5748037	2677	2571	5512	5049	99.73
6618	5777285	T	2756	5762736	3276	5277	3240	99.75

图5CC

6619	5725432	G	5801	3878	1574	5713009	1170	99.78
6620	5770669	G	4266	3366	1074	5730060	11903	99.64
6621	5636728	T	19091	5532989	20326	43629	693	98.51
6622	5639170	G	4865	3986	1289	5627850	1180	99.8
6623	5640004	C	3833	10289	5621199	3114	1369	99.67
6624	5621620	T	1918	5613252	2069	3690	691	99.83
6625	5657814	T	1151	5631294	2382	2611	376	99.88
6626	5653418	G	3532	2554	1274	5645508	550	99.86
6627	5671057	A	5659105	2557	2451	6774	170	99.79
6628	5665035	G	7387	2684	928	5649246	4790	99.72
6629	5656998	A	5649860	1085	1472	4164	417	99.87
6632	5684680	A	5677058	2519	1212	3579	312	99.87
6633	5738182	T	7327	5722583	2309	5560	403	99.73
6634	5708866	C	2425	4982	5698428	2630	411	99.82
6635	5705370	G	4345	3359	1498	5695918	250	99.83
6636	5686165	G	3656	3392	1455	5686669	993	99.83
6637	5702381	A	5689146	2913	3480	6703	139	99.77
6638	5787118	T	2884	5771186	2441	5359	5248	99.72
6639	5762949	T	3202	5749201	1395	8811	340	99.76
6640	5751938	C	2835	6425	5737655	3883	1140	99.75
6641	5750835	G	4836	4434	1689	5739751	125	99.81
6642	5780167	G	3622	2898	1302	5770800	1545	99.84
6643	5755075	A	5732801	4117	5385	11740	1032	99.61
6644	5748470	G	5198	3508	2067	5736408	1289	99.79
6645	5735671	A	5716886	3661	5186	9476	462	99.67
6646	5722982	C	3722	6810	5706853	2468	3129	99.72
6647	5667079	A	5658810	1293	1912	4973	91	99.85
6648	5822370	G	3150	4001	1400	5804031	9788	99.69
6649	5861473	A	5847766	2658	3035	7478	536	99.77
6650	5926402	G	5393	4193	1720	5909919	5177	99.72
6651	5902537	T	11239	5860588	12032	16377	2301	99.29
6652	5951740	T	1360	5939738	2258	4079	4305	99.8
6653	5998273	G	4684	5005	1119	5984274	3191	99.77
6654	5978801	A	5962566	5352	1832	8956	95	99.73
6655	5998825	C	5279	8761	5979391	3163	2231	99.68
6656	5983037	T	1510	5965738	2142	2827	10820	99.71
6657	5820470	A	5810278	3502	1196	4685	809	99.82
6658	5776146	C	3057	8475	5757353	1571	5690	99.67
6659	5715902	A	5707492	1673	1412	4509	816	99.85
6660	5724728	T	3380	5707842	1547	5105	6854	99.71
6661	5625603	C	2956	5904	5610971	2648	3124	99.74
6662	5609415	G	5200	3522	1646	5598426	621	99.8
6663	5347561	A	5328820	5217	3343	9369	812	99.65
6664	5265146	C	2860	3522	5255256	1537	1971	99.81
6665	5259256	T	1348	5250349	2466	2697	2396	99.83
6666	5764192	A	5689090	18646	1138	18111	37207	98.7
6667	5684379	C	2877	7355	5668286	2276	3585	99.72
6668	5648938	C	4786	3557	5638270	1613	712	99.81
6669	5703167	T	2566	5695243	1586	2067	1705	99.86
6670	5728906	A	5718640	1407	1191	3685	3973	99.82
6671	5743327	A	5736721	1330	1549	3499	228	99.88
6672	5772560	A	5756250	5877	985	8752	696	99.72
6673	5315758	C	6312	3340	5298566	1685	5855	99.68

图5DD



6674	5160190	C	3780	3674	5131807	1816	19113	99.45
6675	4925267	A	4898711	9740	1060	11309	4447	99.46
6676	4899746	C	2201	4479	4888971	1330	2763	99.78
6677	4915385	T	3140	4905022	1868	5134	222	99.79
6678	5063694	C	2716	4486	5041601	1832	13059	99.56
6679	5048884	A	5038578	6532	1665	9945	164	99.64
6680	5057581	C	1764	4510	5044423	884	6000	99.74
6681	5081635	A	5050992	12471	1638	15800	714	99.4
6682	5143483	C	2646	6310	5123577	1277	9673	99.61
6683	5142174	C	3188	4697	5126829	1308	6132	99.7
6684	5246880	A	5186396	22747	1705	25694	10338	98.85
6685	5232120	C	4339	6199	5210326	1470	9786	99.58
6686	5131593	C	4289	3869	5110282	1962	11191	99.58
6687	5001733	T	1963	4993711	2166	3804	89	99.84
6688	5208403	G	12863	2907	1048	5175013	16572	99.36
6689	5172529	T	4106	5155068	4795	8271	289	99.66
6690	5200456	A	5190692	2996	1169	5103	496	99.81
6691	5186550	C	4531	10295	5162840	2144	6440	99.54
6692	5075115	A	5061027	1148	1338	4404	7198	99.72
6693	4963394	A	4951026	2117	1182	4811	4258	99.75
6694	5095937	G	5023	4149	1183	5066820	18582	99.43
6695	5043174	A	5035004	1042	1494	4229	1405	99.84
6696	5289620	A	5271687	1301	946	3320	12366	99.66
6697	5069625	T	2831	5055632	1742	2274	7146	99.72
6698	5328702	A	5305279	2740	572	3495	16616	99.56
6699	5350303	A	5340726	1536	1298	5249	1494	99.82
6700	5470084	A	5454220	1511	1952	3808	8593	99.71
6701	5491755	A	5478229	3221	2866	6149	1290	99.75
6702	5469474	C	2984	4230	5452010	1184	9066	99.68
6703	5358240	A	5347189	1490	2123	3643	3795	99.79
6704	5364128	T	1457	5355667	1738	2148	3118	99.84
6705	5348564	A	5335867	4328	1251	5315	1803	99.76
6706	5258774	C	3527	6573	5232238	1917	14519	99.5
6707	4993075	T	1641	4985513	2305	3313	303	99.85
6708	5214049	G	5555	3165	663	5184553	20113	99.43
6709	5201477	T	6462	5170833	8027	14772	1383	99.41
6710	5429324	G	5895	3205	895	5404700	14629	99.55
6711	5460068	T	4470	5437084	5291	9597	3626	99.58
6712	5322303	C	3280	6039	5309814	2191	979	99.77
6713	5324126	A	5314540	1053	2136	4901	1496	99.82
6714	5289507	A	5281582	1567	1620	4356	382	99.85
6715	5300198	G	5010	4632	1142	5287455	1959	99.76
6716	5298138	G	3237	4135	1496	5284016	5254	99.73
6717	5328664	G	4490	3871	2668	5304273	13362	99.54
6718	5345355	C	3408	6412	5320582	5574	9379	99.54
6719	5216174	G	5176	3613	1102	5205895	388	99.8
6720	5304943	G	6230	2746	1192	5289803	4972	99.71
6721	5269806	T	16058	5217235	15231	21093	189	99
6722	5310644	A	5302201	1273	1398	2928	2844	99.84
6723	5631149	T	1689	5621695	2383	3957	1425	99.83
6724	5648810	G	7399	3933	3817	5630838	2823	99.68
6725	5741630	C	3777	8900	5719043	2933	6977	99.61
6726	5681514	C	3578	4515	5669514	1832	2075	99.79

图5EE

6727	5679272	A	5666129	2888	3214	5486	1555	99.77
6728	5677687	T	1983	5667413	2722	3546	2021	99.82
6729	5669224	C	3380	4275	5653092	1967	6510	99.72
6730	5605218	T	1723	5592420	3268	4812	2995	99.77
6731	5589633	G	4294	4494	1590	5578080	1175	99.79
6732	5593252	G	3933	4335	2117	5580419	2448	99.77
6733	5679120	T	5891	5646079	8383	12200	6567	99.42
6734	5669786	T	1338	5660200	2886	3766	1596	99.83
6735	5709250	G	9214	5143	2775	5688458	3660	99.64
6736	5782308	C	3231	6699	5767008	2950	2420	99.74
6737	5795516	T	2579	5782413	3838	5915	771	99.77
6738	5738954	C	3071	4627	5726736	2033	2487	99.79
6739	5702610	A	5691561	1925	2665	6014	445	99.81
6740	5708879	G	4598	5021	2055	5696104	1101	99.78
6741	5702334	G	8831	4696	2723	5685404	680	99.7
6742	5709258	C	3875	5506	5695272	2508	2097	99.76
6743	5680317	A	5654617	10474	2499	10988	1739	99.55
6744	5718938	C	2941	4295	5702560	1843	7299	99.71
6745	5682220	T	2236	5674359	2093	3500	32	99.86
6746	5814910	T	2265	5807289	1581	3498	277	99.87
6747	5878808	C	3969	5056	5867696	1786	301	99.81
6748	5914663	A	5907118	1215	1674	4400	256	99.87
6749	5906187	A	5881077	13619	3534	4466	3491	99.57
6750	5903236	T	3180	5895227	1298	2691	840	99.86
6751	5915697	T	1780	5907445	1567	3191	1714	99.86
6752	5930401	T	1733	5920125	1467	3069	4007	99.83
6754	5864045	T	8293	5851958	2026	1617	151	99.79
6756	5873803	A	5863828	2627	1125	5160	1063	99.83
6757	5879708	C	3328	4137	5867717	1968	2558	99.8
6758	5875706	T	4762	5861392	1780	7524	248	99.76
6759	5891140	C	3364	3266	5879232	2419	2859	99.8
6760	5862664	A	5954323	1682	1903	4637	119	99.86
6761	5992561	A	5984453	1897	2323	3862	26	99.86
6762	5980030	T	2210	5971739	1979	3933	169	99.86
6763	5995773	G	4703	4003	878	5984657	1332	99.82
6764	5996934	A	5984034	2951	3299	5747	903	99.78
6765	5976065	T	2182	5967037	1540	4330	976	99.85
6766	5956460	T	1856	5949641	1997	2683	283	99.89
6767	5572489	A	5566016	1301	857	3163	1152	99.88
6768	5544365	A	5533924	3307	1169	5743	222	99.81
6769	5615917	C	3176	5335	5596788	1805	8813	99.66
6770	5521633	A	5515537	834	1184	3861	217	99.89
6771	5591595	A	5574240	5011	1354	6560	4430	99.69
6772	5566547	C	3516	4340	5550796	1510	6385	99.72
6773	5530825	T	2904	5518819	2031	5616	1455	99.78
6774	5514301	T	1139	5507150	1854	3822	336	99.87
6775	5511886	G	4089	3677	820	5501154	2146	99.81
6776	5528017	A	5516902	2143	2256	4558	2158	99.8
6777	5503531	T	1917	5493679	1430	4008	2497	99.82
6778	5656860	T	911	5640714	1966	3973	9296	99.71
6779	5575184	A	5566453	1320	721	3777	2913	99.84
6780	5605637	T	1929	5593583	1712	3774	4639	99.78
6781	5553170	C	2639	5353	5537949	2251	4978	99.73

图5FF

6782	5505208	A	5495787	1629	1564	5397	831	99.83
6783	5547884	G	4872	6239	1274	5526356	9143	99.61
6784	5492694	G	4681	6133	1570	5477722	2168	99.73
6785	5379164	A	5361561	5107	2129	10154	213	99.67
6786	5296872	C	3389	3584	5280672	1652	7575	99.69
6787	5195755	A	5153711	19284	1586	20735	439	99.19
6788	5401740	C	2874	7452	5363990	2278	25146	99.3
6789	5366082	T	2251	5358021	1525	4033	252	99.85
6790	5426080	C	4359	3582	5411574	1448	5117	99.73
6791	5393918	T	1848	5381603	2095	2700	5672	99.77
6793	5369133	A	5351743	5969	965	8084	2372	99.68
6794	5191943	C	3118	5598	5177316	1836	4075	99.72
6795	5157045	T	1431	5150379	1605	3278	352	99.87
6796	5164555	G	7524	3027	848	5133044	20112	99.39
6797	4844696	A	4838322	1064	1451	3476	383	99.87
6798	4936686	A	4929297	872	870	2782	2865	99.85
6799	4749524	A	4743812	943	869	3316	384	99.88
6800	4827232	A	4800914	7510	2226	9803	6779	99.45
6801	4839318	C	8568	2621	4817415	1451	9263	99.55
6802	4827277	C	4035	2806	4812179	3808	4449	99.69
6804	4837807	A	4827012	4285	1144	5134	232	99.78
6805	4820971	C	2540	7601	4807969	1562	1299	99.73
6806	4812591	A	4805902	843	700	4252	894	99.86
6807	4799247	A	4791296	1998	1316	4026	611	99.83
6808	4841612	G	3375	4347	969	4823676	9245	99.63
6809	4816869	G	3885	4764	1466	4789436	17318	99.43
6810	4818829	G	5608	6595	1341	4799379	5926	99.6
6811	4806028	C	2468	4342	4596227	1949	1042	99.79
6812	4605188	A	4597743	1515	2040	3820	70	99.84
6813	4711250	T	1329	4705650	1089	2364	818	99.88
6814	4706606	A	4700048	1397	721	4072	368	99.86
6815	5258055	G	3779	5055	1022	5212420	35779	99.13
6816	5278161	A	5263629	2289	1617	4535	6091	99.72
6817	5204899	T	2233	5184895	1899	3136	12736	99.62
6818	5010790	T	1721	5002537	2508	2959	1065	99.84
6819	4999297	T	1238	4992797	1524	2571	1167	99.87
6820	4982504	A	4975249	2309	720	4123	103	99.85
6821	4930964	G	4077	3689	1087	4921751	360	99.81
6822	5030905	A	5009401	7418	2272	11700	114	99.57
6823	5001430	C	4081	4315	4965813	1780	25441	99.29
6824	4556187	C	3077	3844	4543530	1334	4402	99.72
6825	4628111	A	4585337	15731	1773	18469	6801	99.08
6826	4914345	C	2877	4726	4890947	1621	14174	99.52
6827	4907786	C	4471	3090	4898186	1731	308	99.8
6828	4920746	T	6551	4906055	6240	1762	138	99.7
6829	4940775	A	4927645	7460	1545	2517	1608	99.73
6832	5122854	A	5116897	1187	935	3562	273	99.88
6833	5151801	A	5126818	10029	1206	3474	10274	99.52
6834	5011922	T	2369	4992735	1330	9020	6468	99.62
6835	4912958	G	4040	3554	1063	4898710	5591	99.71
6836	4824628	A	4817538	1843	1011	3994	242	99.85
6837	4810397	T	1914	4802259	1225	3244	1755	99.83
6838	4904433	T	1232	4890285	1458	4739	6719	99.71

图5GG

6539	5049137	G	4328	5286	2202	5028433	8888	99.59
6540	5095338	C	3022	6028	5078911	3685	3692	99.68
6541	5116653	C	5382	4269	5102008	2384	2610	99.71
6542	5102893	T	1800	5095142	2072	2645	1234	99.83
6543	5154399	A	5145276	1544	938	3142	3499	99.82
6544	5170649	T	2067	5160108	2440	4878	1156	99.8
6545	5133233	G	4883	3807	844	5122594	1105	99.79
6546	5245371	G	3810	3805	1226	5219544	16986	99.51
6547	5075597	T	13756	5012267	15177	27660	6737	98.75
6548	4989679	G	3194	2770	1334	4978171	4210	99.77
6549	4955624	A	4942446	2227	2833	4994	3124	99.73
6550	4924927	T	1425	4915001	1957	4011	2533	99.8
6551	4943779	G	4414	3709	691	4929522	5443	99.71
6552	5054317	A	5032574	2532	1985	4586	12640	99.57
6553	5072740	T	1502	5062829	2084	3642	2683	99.8
6554	5080360	G	4773	3500	1756	5062015	8514	99.63
6555	5034541	T	6112	5012976	6711	7760	982	99.57
6556	5053748	A	5044975	1381	1173	4182	2037	99.83
6557	5044102	A	5037471	1705	1009	3154	763	99.87
6558	5101740	T	1444	5092613	1221	2848	3614	99.82
6559	5068972	T	1065	5063196	1748	2311	652	99.89
6560	5075660	G	5789	4128	1717	5052213	11813	99.54
6561	5142097	C	2809	5191	5126564	2027	5506	99.7
6562	5157676	T	1823	5148114	2443	2835	2441	99.81
6563	5282553	T	2133	5265310	1904	4604	8602	99.67
6564	5275634	C	2595	3719	5267250	1498	572	99.84
6565	5277794	C	5157	3751	5266708	1603	575	99.79
6566	5277346	T	1510	5271124	2017	2394	301	99.88
6567	5290818	A	5262288	13136	1941	12458	995	99.46
6568	5338888	C	6041	7236	5320830	1460	3321	99.66
6569	5314207	C	3663	3523	5300916	1340	4765	99.75
6570	5354481	C	4991	3098	5335650	1727	9015	99.65
6571	5416362	C	2988	2438	5399794	1344	9798	99.69
6572	5272852	C	3867	4080	5263101	834	970	99.82
6573	5368194	A	5355359	1548	7087	3430	770	99.76
6574	5426379	T	2241	5417339	2111	4547	141	99.83
6575	5428405	G	5194	3358	771	5417942	1140	99.81
6576	5433955	A	5422303	1931	1855	4818	3048	99.79
6577	5392138	A	5380145	2686	2780	5478	1049	99.78
6578	5432805	G	4146	3946	1688	5415216	7809	99.68
6579	5360673	T	7132	5332433	7581	11370	2157	99.47
6580	5319717	T	936	5312744	1996	3188	853	99.87
6581	5276050	G	7119	6556	3225	5258795	355	99.67
6582	5374641	A	5363133	2427	1359	4838	2884	99.79
6583	5437553	C	2479	7839	5423048	2669	1518	99.73
6584	5434777	G	5824	3920	2895	5421232	906	99.75
6585	5481751	C	5355	3941	5465017	2238	5200	99.69
6586	5464112	T	2015	5449866	3540	3977	4714	99.74
6587	5413303	A	5405378	1284	1242	3801	1598	99.85
6588	5418806	G	4664	3860	1014	5408585	683	99.81
6589	5188253	T	6795	5159798	8598	12397	665	99.45
6590	5416907	C	3475	4758	5386284	2800	19590	99.43
6591	5541288	T	2199	5528113	3083	4804	3089	99.76

图5HH

6892	5539441	C	5329	4445	5524532	3509	1626	99.73
6893	5544630	C	5751	4862	5528983	2443	2591	99.72
6894	5507028	T	1465	5501007	1457	2323	776	99.89
6895	5522437	A	5512811	1619	804	4070	3133	99.83
6896	5518126	G	6409	3993	3052	5503144	1528	99.73
6897	5531050	C	6705	6022	5514507	2929	887	99.7
6898	5515516	C	8355	5602	5482150	4332	15057	99.4
6899	5267255	C	5149	3178	5253319	2554	3055	99.74
6900	5306961	A	5300211	1373	1118	3462	797	99.87
6901	5287837	A	5276527	1923	1524	4250	3613	99.79
6902	5210199	T	1830	5203028	1691	3402	248	99.86
6903	5395824	C	3749	4730	5180649	3095	3601	99.71
6904	5170639	A	5160129	1557	1770	6181	1002	99.8
6905	5350254	G	4176	4498	895	5327212	13473	99.57
6906	5499168	G	12761	6178	1372	5478284	573	99.62
6907	5497704	A	5482251	2237	3355	9476	383	99.72
6908	5494745	A	5485065	1453	2359	4711	1157	99.82
6909	5450142	A	5439173	1297	1612	5036	3024	99.8
6910	5271228	A	5248786	1573	1675	16769	2425	99.57
6911	5350157	G	5801	4441	1369	5331364	7182	99.65
6912	5473443	A	5445865	6672	1822	10199	8885	99.5
6913	5493778	C	2867	5139	5473031	1572	11169	99.62
6915	5438647	A	5430224	2152	1320	3298	1653	99.85
6916	5041641	T	2055	5033084	1901	3919	682	99.83
6917	5088120	G	3676	3357	851	5074874	5362	99.74
6918	5181476	G	3432	5243	1177	5162412	9212	99.63
6919	5176093	A	5151990	6709	3725	12143	1526	99.53
6920	5237620	C	3521	4655	5218122	2786	8536	99.63
6921	5109072	T	1869	5098799	1721	5463	1420	99.8
6922	5437562	A	5401390	1809	901	7996	25466	99.33
6923	5471050	A	5453846	5115	871	8732	2466	99.69
6924	5545401	C	4032	3664	5524959	1941	10805	99.63
6925	5582636	T	2427	5570259	2398	3904	3648	99.78
6926	5541281	A	5526082	1942	1237	2742	9278	99.73
6927	5237656	T	1749	5229593	1875	4088	351	99.85
6928	5260294	G	4648	3558	925	5247793	3370	99.76
6929	5277503	A	5250430	9639	1510	15546	378	99.49
6930	5349374	C	4268	5684	5323768	2287	13367	99.52
6931	5186709	T	3824	5172411	2558	6755	1161	99.72
6932	5183320	C	3440	2969	5168005	2112	6794	99.7
6933	5074447	C	2948	3388	5064853	1748	1510	99.81
6934	5055945	A	5047708	1710	1955	4436	136	99.84
6935	5062263	G	5753	3804	1495	5049923	1288	99.76
6936	5037695	C	2966	6393	5024515	1875	1946	99.74
6937	5026909	T	1347	5019197	2103	3398	864	99.85
6938	5036913	G	4622	3421	1171	5025538	2161	99.77
6939	5058237	A	5044311	3647	2536	7632	111	99.72
6940	5040802	C	4255	6458	5025437	2511	2141	99.7
6941	5031718	A	5026147	817	1091	3356	307	99.89
6942	5034430	A	5028034	1199	911	2787	1499	99.87
6943	5101672	A	5093084	1819	1447	3692	1630	99.83
6944	5096204	T	2970	5086787	1183	5026	238	99.82
6945	5086505	C	3337	4139	5074375	2005	2649	99.76

图5II



6946	5062688	A	5054199	1339	1768	4720	442	99.83
6947	5073193	G	6277	3430	1322	5056480	5684	99.67
6948	5092913	C	4007	5165	5078748	3186	1807	99.72
6949	5097997	T	1333	5091367	1697	3526	74	99.87
6950	5201592	A	5188220	1265	1014	2727	8366	99.74
6951	5180348	T	1253	5173573	1556	2152	1814	99.87
6952	5418461	A	5394239	2030	1239	3567	17386	99.55
6953	5311029	T	1632	5304621	953	2310	1513	99.88
6954	5273646	T	1595	5266351	1521	2642	1537	99.86
6955	5248016	T	1417	5236116	2027	4128	4328	99.77
6956	5186120	G	4518	3910	928	5175837	927	99.8
6957	5191497	A	5184236	1425	1512	3762	562	99.86
6958	5195685	A	5181500	1616	1557	4367	6645	99.73
6959	5093268	A	5080351	3263	1042	6798	1814	99.75
6960	5077703	C	3522	5280	5048156	4270	16475	99.42
6961	4838669	A	4830544	1288	1526	4457	854	99.83
6962	4870513	G	4016	3216	1581	4855714	5986	99.7
6963	4926343	T	5673	4893155	6037	18583	2895	99.33
6964	4890078	C	3890	13361	4867677	2343	2807	99.54
6965	4962719	A	4940935	5030	1375	9632	5747	99.56
6966	5035930	C	2683	6004	5017299	3390	6544	99.63
6967	5033991	A	5022685	2054	1970	6724	558	99.78
6968	5040797	T	1344	5027902	1816	5990	3745	99.74
6969	4992752	G	4670	3671	840	4981880	1691	99.78
6970	5089004	G	4357	3795	1034	5069690	10128	99.62
6971	5009000	G	2982	4545	968	4890605	9900	99.63
6972	4866046	A	4846217	2769	3828	12771	461	99.59
6973	4919869	G	4098	3683	983	4898224	12881	99.56
6974	4925417	A	4906284	2284	3286	6423	7140	99.61
6975	4995793	A	4973656	2028	1455	7864	10790	99.56
6976	4987111	T	1198	4977370	1765	5326	1452	99.8
6977	4998002	G	5041	3090	750	4985490	3631	99.75
6978	4994238	T	8978	4956293	8020	11411	9536	99.24
6979	4834454	A	4828599	1366	591	3760	138	99.88
6980	4849441	A	4838033	2911	975	6749	773	99.76
6981	4845886	C	3074	4920	4828502	3038	6352	99.64
6982	4812427	A	4804995	1253	1321	3852	1006	99.85
6983	4988539	T	1423	4958188	1438	4316	23174	99.39
6984	4802639	T	1357	4796121	1527	3337	297	99.86
6985	4860489	C	2723	4296	4844768	1352	7350	99.68
6986	4833394	T	1563	4826352	2216	2742	521	99.85
6987	4843565	T	916	4837591	2067	2565	426	99.88
6988	4835989	G	4064	2553	553	4827552	1247	99.83
6989	4830586	A	4821428	1746	2087	4708	617	99.81
6990	4821468	A	4813984	1861	1128	4363	132	99.84
6991	4656765	G	3011	3199	1038	4635710	13807	99.55
6992	4636344	A	4625196	1622	1545	4575	3406	99.76
6993	4641010	G	2920	3739	693	4628064	5594	99.72
6994	4677350	A	4668396	1577	2151	4561	665	99.81
6995	4725370	T	1680	4717754	1814	3314	808	99.84
6996	4704017	T	1422	4698150	1375	2554	516	99.88
6997	4911407	C	3182	4787	4885014	2791	15633	99.46
6998	4899441	T	2086	4891459	1914	3874	108	99.84

图5JJ

6999	4901415	T	1493	4894730	1611	3401	180	99.86
7000	4891031	C	2553	6121	4873091	1904	7362	99.63
7001	4789155	A	4781730	1311	1633	4411	70	99.84
7002	4795455	G	4219	5013	1743	4780710	3770	99.69
7003	4924128	G	4776	7438	2617	4809003	294	99.69
7004	4944371	G	7175	4031	2456	4929717	992	99.7
7005	4806341	C	3602	5621	4777934	5242	13942	99.41
7006	4601147	A	4594291	1495	1230	3978	153	99.85
7007	4702317	G	3491	3590	881	4685882	8473	99.65
7008	4820368	A	4810584	2414	1629	5630	111	99.8
7009	4837128	C	3237	6814	4823033	2441	1603	99.71
7010	4850289	G	4308	3009	840	4838149	3983	99.75
7011	4812285	A	4799518	2078	2127	6267	2295	99.73
7012	4819192	G	4099	4223	1075	4803705	6090	99.68
7013	4814473	A	4803411	2020	3241	5285	516	99.77
7014	4796492	A	4789390	1274	1602	3965	261	99.85
7015	4822185	A	4805952	1096	1466	3413	10258	99.66
7016	4660235	T	1793	4653457	1646	2518	821	99.85
7017	4759942	A	4716037	19718	898	17553	5736	99.08
7018	4667931	C	2953	5168	4654334	1510	3966	99.71
7019	4645461	C	4252	3415	4634933	1536	1325	99.77
7020	4642847	C	3346	3417	4627718	1544	6822	99.67
7021	4684616	A	4684733	2906	2147	3532	1298	99.79
7022	4813966	T	1289	4799849	1111	3015	8702	99.71
7023	4709076	T	880	4701993	1067	1943	3193	99.85
7025	4743603	C	3847	3906	4727894	1344	6612	99.67
7026	4674687	T	1598	4667071	1611	2515	1892	99.84
7027	4753094	T	853	4744267	1759	2491	3724	99.81
7028	4908563	A	4900306	1400	906	4053	1898	99.83
7029	4937357	T	1751	4929574	1352	2400	2280	99.84
7030	4952859	T	1646	4939499	1332	2773	7609	99.73
7031	4876198	C	3184	4625	4861082	2031	3276	99.69
7032	4950522	A	4956066	1672	1233	3790	7761	99.71
7033	4955055	T	3275	4943129	1797	5198	1656	99.76
7034	4941838	C	3573	4501	4930466	2565	733	99.77
7035	5016832	C	4208	4040	4995948	3213	9425	99.58
7036	5010868	A	4998486	1910	1892	5219	3361	99.75
7037	5047706	G	3847	3513	1070	5035866	3410	99.77
7038	5178651	T	5247	5160031	4466	7301	1606	99.64
7039	5151708	A	5142804	1021	764	4761	2358	99.83
7040	5207601	A	5191873	1298	1039	3829	9562	99.7
7041	5083645	T	1635	5074681	1247	3732	2350	99.82
7042	5086913	G	5074	3483	1181	5076282	883	99.79
7043	5098187	C	4794	6409	5077528	2855	6601	99.59
7044	5015533	C	4266	4099	4999173	1970	6025	99.67
7045	4969501	A	4959785	1832	1006	4491	2187	99.81
7046	4950318	A	4943090	1678	1307	3877	366	99.85
7047	4965170	T	1173	4959708	1242	2491	556	99.89
7048	4935837	G	3676	2730	722	4925406	3303	99.79
7049	4965312	A	4955043	1674	1604	4066	2925	99.79
7050	4932185	A	4925651	1745	858	3190	741	99.87
7051	4875028	G	3806	4720	842	4864112	1548	99.78
7052	4880145	G	4980	3781	988	4868695	1700	99.77

图5KK

7053	4769342	A	4760645	1305	1086	4097	2209	99.82
7055	4759736	A	4752031	1372	1001	4003	1329	99.84
7056	4928403	T	4527	4913943	1090	4318	4525	99.71
7057	4912130	T	1420	4903884	1461	4176	1189	99.83
7058	4948206	C	3798	4653	4936311	2586	858	99.76
7059	4941433	A	4935117	1068	659	3396	1193	99.87
7060	4927257	T	1209	4921760	1367	2386	535	99.89
7061	4916047	G	4177	2788	842	4905773	2467	99.79
7062	4944784	A	4938045	1219	729	3624	1167	99.86
7063	4913554	A	4903850	1804	1436	3901	2563	99.8
7064	4888528	T	2773	4876928	939	4217	3671	99.76
7065	4898645	C	3121	3524	4880503	1859	9638	99.63
7066	4913315	A	4905263	1506	940	3883	1723	99.84
7067	4869882	A	4863963	856	637	3055	1371	99.88
7068	4886190	T	2023	4881133	1004	2241	189	99.89
7069	4880727	T	1289	4873207	1251	2933	2047	99.85
7070	4860609	A	4854316	1144	624	3228	1297	99.87
7071	4769721	G	2303	3476	982	4761456	1504	99.83
7072	4761279	A	4751720	1759	1513	4091	2196	99.8
7073	4745430	T	2270	4728737	1250	4399	8774	99.65
7074	4629560	G	3829	3539	926	4614865	6401	99.68
7075	4663502	G	3726	3775	1159	4650878	3964	99.73
7076	4539128	A	4526571	3451	1361	7408	337	99.72
7077	4637796	C	4545	3132	4623558	2298	4263	99.69
7078	4628631	A	4621959	1074	1095	4229	274	99.86
7079	5020707	A	5014020	1139	1009	3265	1274	99.87
7080	5019931	A	5012917	1667	1276	3302	769	99.86
7081	5008494	A	4967507	1490	1044	38075	378	99.18
7082	5048299	G	25661	4892	1099	5008560	8087	99.21
7083	5069191	A	5051441	2079	1430	4483	9758	99.65
7084	4997247	T	3036	4978847	2260	5860	7244	99.63
7085	4996455	C	3160	3254	4981122	2151	6768	99.69
7086	4972231	C	4819	3467	4959102	2256	2587	99.74
7087	5040054	T	1796	5025909	1905	4867	5577	99.72
7088	5036904	A	5027554	1512	940	5998	900	99.81
7089	5052627	G	2861	4601	829	5042379	1957	99.8
7090	5124334	G	5052	3735	1295	5108898	5354	99.7
7091	5094792	A	5076889	1496	1619	5544	9244	99.65
7092	4971413	A	4953725	3699	780	7169	6040	99.64
7093	4877737	C	3667	4974	4861331	2901	4864	99.66
7094	4962636	A	4933420	10051	988	12670	5507	99.41
7095	5010945	C	3290	4134	4993645	1998	7878	99.65
7096	4959747	T	2517	4950507	1820	4854	49	99.81
7097	4838653	C	4123	5195	4822797	2527	4013	99.67
7098	4801542	A	4792797	1241	993	5080	1431	99.82
7099	4876717	G	2805	4110	791	4861981	7030	99.7
7100	4911198	G	3891	4280	934	4899149	2944	99.75
7101	4889606	A	4879620	1925	1588	3988	2285	99.8
7102	4900719	T	2626	4883577	1749	4109	8658	99.65
7103	4757073	C	2787	3997	4745203	1358	3728	99.75
7104	4830051	A	4813190	6309	985	9019	548	99.65
7105	4908904	C	3484	7503	4889646	2576	5695	99.61
7106	4910967	G	5480	3845	606	4897612	3424	99.73

图5LL



7107	4917806	T	2704	4901705	2671	4810	5916	99.67
7108	4773345	T	1893	4763555	1375	3826	2696	99.79
7109	4760180	C	1888	3838	4750780	1778	1896	99.8
7110	4758329	G	7482	2960	1389	4746404	94	99.73
7111	4726238	C	2996	4757	4714007	2345	2133	99.74
7112	4741130	T	1878	4733055	1433	4289	475	99.83
7113	5107032	C	3326	3327	5078901	1755	19723	99.45
7114	5065330	T	2245	5057321	1557	4019	188	99.84
7115	5076699	C	3681	3872	5060438	1217	7491	99.68
7116	5093793	T	1633	5087013	1497	3565	85	99.87
7117	5194834	G	7255	3821	1206	5173201	9351	99.58
7118	5180961	T	3355	5165752	3676	7949	229	99.71
7119	5269841	G	5004	3422	1413	5252663	7339	99.67
7120	5408785	C	6746	10347	5378802	2937	9953	99.43
7121	5539827	C	7682	5741	5507686	2281	16437	99.42
7122	5379675	T	1297	5371594	1279	3162	2343	99.83
7123	5561977	A	5545446	2754	1588	3607	8582	99.7
7124	5413837	T	1477	5407325	1523	2837	675	99.88
7125	5412883	T	869	5395489	1046	2703	12776	99.68
7126	5236701	A	5228959	1102	792	4501	1347	99.85
7127	5333672	G	4929	4203	1413	5312868	10259	99.61
7128	5474880	C	5337	5687	5447070	2746	14040	99.49
7129	5275383	T	2515	5260060	1876	5180	5752	99.71
7130	5227217	T	1934	5215254	1542	4249	4238	99.77
7131	5191755	G	4165	4711	757	5181431	691	99.8
7132	5266675	G	8383	3270	1079	5248638	5305	99.66
7133	5204474	C	2679	11104	5187442	2281	968	99.67
7134	5193197	A	5179974	4385	1219	7252	367	99.75
7135	5153828	C	4036	7892	5128386	1464	12050	99.51
7136	4996610	A	4990670	1262	921	3634	123	99.88
7137	4980825	A	4973747	1355	826	3563	834	99.87
7138	4970432	T	1643	4961565	1318	3137	2769	99.82
7139	4974951	G	4267	4114	980	4962587	3003	99.75
7140	5027472	G	4391	3725	1058	5009936	8362	99.63
7141	4902674	C	3086	5826	4890626	3032	104	99.75
7142	4907465	G	5317	2338	705	4898626	479	99.82
7143	4925956	A	4915769	1303	1540	3474	3870	99.79
7144	4887970	A	4881315	1852	874	3847	82	99.86
7145	4958001	G	5278	3008	1094	4942274	6347	99.68
7146	4965523	A	4957058	1089	1580	3208	588	99.83
7147	4937743	A	4949312	1703	784	4400	1544	99.83
7148	5073014	G	5183	3607	744	5049979	13501	99.55
7149	5012136	A	5003561	1711	1903	4802	149	99.83
7150	5084263	A	5072899	1805	919	4977	3663	99.78
7151	5075494	T	4345	5065646	1049	2742	1712	99.81
7152	5054482	A	5048690	1572	805	2844	571	99.89
7153	5147721	T	9311	5125186	1952	2710	8562	99.56
7154	5080823	A	5073326	769	740	3014	2974	99.85
7155	5110820	A	5089971	3306	517	5414	1612	99.79
7156	5118706	C	11004	5219	5087831	1378	13274	99.4
7158	5087788	A	5078915	1037	947	2744	4145	99.83
7159	5024825	A	5012327	7509	1572	2832	585	99.75
7160	5041658	T	3170	5031944	1402	3411	1731	99.81

图5MM

7218	3449024	C	362905	9081	3267011	6840	4361	99.62
7219	5409178	A	3398036	1730	1085	3737	4370	99.79
7220	5314307	A	5475500	13150	532	13368	11737	99.29
7221	5412931	C	92316	24335	3269565	9105	17310	97.36
7222	5341962	A	4990185	138576	963	12046	192	97.05
7223	5171204	T	1998	5145019	1340	4866	17983	99.49
7224	4906215	T	2758	4846854	1021	53235	316	98.83
7225	4948313	G	11170	72581	576	4861329	2657	98.24
7226	4939310	T	23678	4891048	3844	14943	5797	99.02
7227	4844204	A	4717525	63999	383	62182	103	97.38
7228	4790311	C	1470	7335	4764646	755	16085	99.46
7229	4321352	C	1878	4209	4314200	746	319	99.84
7230	4534835	G	3977	2054	1017	4526713	1074	99.82
7231	4559661	C	1134	2428	4550087	1344	4658	99.79
7232	4475732	C	3084	3191	4468360	939	158	99.84
7233	4475023	G	3640	1569	574	4467995	1245	99.84
7234	4442065	T	1930	4433462	1713	3851	109	99.81
7236	4452108	G	1461	2446	802	4446581	1018	99.87
7237	4455323	G	3834	1736	641	4448933	179	99.86
7238	4427720	C	2902	7571	4414767	2111	369	99.71
7239	4410553	T	908	4405407	1061	1763	1414	99.88
7241	4353286	G	2331	3176	616	4346790	373	99.85
7242	4347306	A	4351819	4409	1860	8483	735	99.65
7243	4356979	C	2346	3704	4349247	1331	351	99.82
7244	4351447	T	1333	4346187	927	1908	1092	99.88
7245	4320001	C	2404	2939	4312014	616	2028	99.82
7246	4310519	A	4303287	1623	2037	3269	303	99.83
7250	4290663	T	939	4284384	479	1108	3753	99.83
7251	4229163	A	4222620	3543	507	2293	200	99.85
7252	4227951	G	3072	2526	768	4220787	798	99.83
7253	4214193	T	4109	4193558	3500	5613	7413	99.51
7254	4105077	A	4099872	731	487	2322	1663	99.87
7255	4121950	A	4106173	4515	456	7464	3314	99.62
7256	4160834	C	2966	1700	4149855	1422	4891	99.74
7257	4117371	C	3896	1781	4105449	907	5338	99.71
7258	4023897	C	3123	1495	4008636	746	9897	99.62
7259	3863437	T	1126	3838427	1756	1726	402	99.87
7260	3865537	A	3822357	22248	1192	19462	278	98.88
7261	3855979	C	2602	4031	3848360	663	303	99.8
7262	3850970	C	5463	1963	3838834	589	4121	99.68
7263	3776644	T	1717	3758646	1184	2825	12272	99.52
7264	3562791	C	1599	1808	3529179	766	29439	99.06
7265	3060318	A	3055323	1007	1527	2451	10	99.84
7266	3055078	G	2254	1306	301	3050897	120	99.86
7267	3042417	T	3036	3028346	3856	5604	1575	99.54
7268	3015374	C	1329	2421	3009263	790	1571	99.8
7269	2985924	G	2371	1303	532	2981038	680	99.84
7270	2956494	A	2947305	2105	3359	3721	4	99.69
7271	2934856	A	2950210	1288	1039	2282	37	99.84
7274	2758372	G	1243	1533	305	2732454	2837	99.79
7276	2705478	A	2698029	2031	1841	3556	21	99.72
7277	2694159	T	1143	2684875	654	1152	6335	99.66
7282	2530291	T	4155	2488674	5599	8571	13292	98.75
7283	2312052	C	1109	3006	2305341	472	2124	99.71
7284	2276273	A	2272142	931	867	2290	43	99.82
7287	2247527	C	3650	2718	2196574	764	43821	97.73
7288	1500620	T	604	1491216	583	833	7384	99.37
7289	1385133	G	2956	891	439	1374128	6719	99.21
7290	1271215	C	1385	2475	1262600	414	4341	99.32
7292	1204327	G	1831	917	252	1186573	14754	98.53
7293	972301	T	753	964953	868	1209	4518	99.24
7295	897681	G	866	1061	354	870306	25094	96.95
7297	450093	G	389	378	121	399215	10010	97.35

图5NN

7215	5583623	A	5482102	59769	569	32639	8544	98.18
7216	5477338	C	6889	24402	5437632	3771	4644	99.28
7217	5412647	T	34891	5358172	1232	18257	95	98.99
7218	5449024	C	162903	9687	3263027	6840	4367	96.62
7219	5409178	A	1398036	1730	1085	3757	4570	99.79
7220	5514507	A	5475500	13150	512	13568	11737	99.29
7221	5412931	C	92316	24335	3269565	9105	17310	97.36
7222	5141962	A	4990185	138576	963	12046	192	97.05
7223	5171204	T	1998	5145019	1340	4866	17981	99.49
7224	4906215	T	2759	4848854	1021	53235	316	98.83
7225	4948313	G	11170	72581	576	4861319	2657	98.24
7226	4939310	T	23678	4891048	3844	14943	5797	99.02
7227	4844204	A	4717525	63999	383	62182	103	97.38
7228	4790311	C	1470	7355	4764646	755	16085	99.46
7229	4521352	C	1878	4209	4314200	746	319	99.84
7230	4534835	G	3977	2054	1017	4526713	1074	99.82
7231	4559661	C	1134	2428	4550097	1344	4658	99.79
7232	4475732	C	3084	3191	4468360	939	158	99.84
7233	4475023	G	3640	1569	574	4467995	1245	99.84
7234	4442065	T	1930	4433462	2713	3851	109	99.81
7236	4452108	G	1461	2446	802	4446381	1018	99.87
7237	4453323	G	3834	1736	641	4448933	179	99.86
7238	4427720	C	2902	7571	4414767	2111	369	99.71
7239	4410553	T	908	4465407	1061	1763	1414	99.88
7241	4353286	G	2331	3176	616	4346790	373	99.85
7242	4347306	A	4351819	4409	1860	8483	735	99.65
7243	4356979	C	2346	3704	4349247	1331	351	99.82
7244	4351447	T	1333	4346187	927	1908	1092	99.88
7245	4320001	C	2404	2939	4312014	616	2028	99.82
7246	4310519	A	4303287	1623	2037	3269	303	99.83
7250	4290663	T	939	4284384	479	1108	3753	99.83
7251	4229163	A	4222620	3543	507	2293	200	99.85
7252	4227951	G	3072	2526	768	4220787	798	99.83
7253	4214193	T	4109	4193558	3500	5613	7413	99.51
7254	4105077	A	4099872	731	487	2322	1663	99.87
7255	4121950	A	4106173	4515	456	7464	3314	99.62
7256	4160834	C	2966	1700	4149855	1422	4891	99.74
7257	4117371	C	3896	1781	4105449	907	5358	99.71
7258	4023897	C	3123	1495	4008636	746	9897	99.62
7259	3863437	T	1126	3838427	1756	1726	402	99.87
7260	3865537	A	3822357	22248	1192	19462	278	98.88
7261	3853979	C	2602	4031	3848360	663	303	99.8
7262	3850970	C	5463	1963	3838834	589	4121	99.68
7263	3776644	T	1717	3758646	1184	2825	12272	99.52
7264	3562791	C	1599	1808	3529179	766	29439	99.06
7265	3060318	A	3055323	1007	1527	2451	10	99.84
7266	3055078	G	2254	1306	501	3050897	120	99.86
7267	3042417	T	3036	3028346	3856	5604	1375	99.54
7268	3015374	C	1329	2421	3009263	790	1571	99.8
7269	2985924	G	2371	1303	532	2981038	680	99.84
7270	2956494	A	2947305	2105	3359	3721	4	99.69
7271	2954856	A	2950210	1288	1039	2282	37	99.84
7274	2758372	G	1243	1533	305	2752454	2837	99.79
7276	2705478	A	2696029	2031	1841	3556	21	99.72
7277	2684159	T	1143	2684875	654	1152	6335	99.66
7282	2508291	T	4155	2488674	5599	8571	13292	98.75
7283	2312052	C	1109	3006	2305341	472	2124	99.71
7284	2276273	A	2272142	931	867	2290	43	99.82
7287	2247527	C	3650	2718	2196574	764	43821	97.73
7288	1500620	T	604	1491216	583	833	7384	99.37
7289	1385133	G	2956	891	439	1374128	6719	99.21
7290	1271215	C	1385	2475	1262600	414	4341	99.32
7292	1204327	G	1831	917	252	1186573	14754	98.53
7293	972301	T	753	964953	868	1209	4518	99.24
7295	897681	G	566	1061	354	870306	25094	98.95
7297	450093	G	389	378	121	399215	10010	97.35
7298	211393	G	264	217	74	206634	4204	97.75

图500

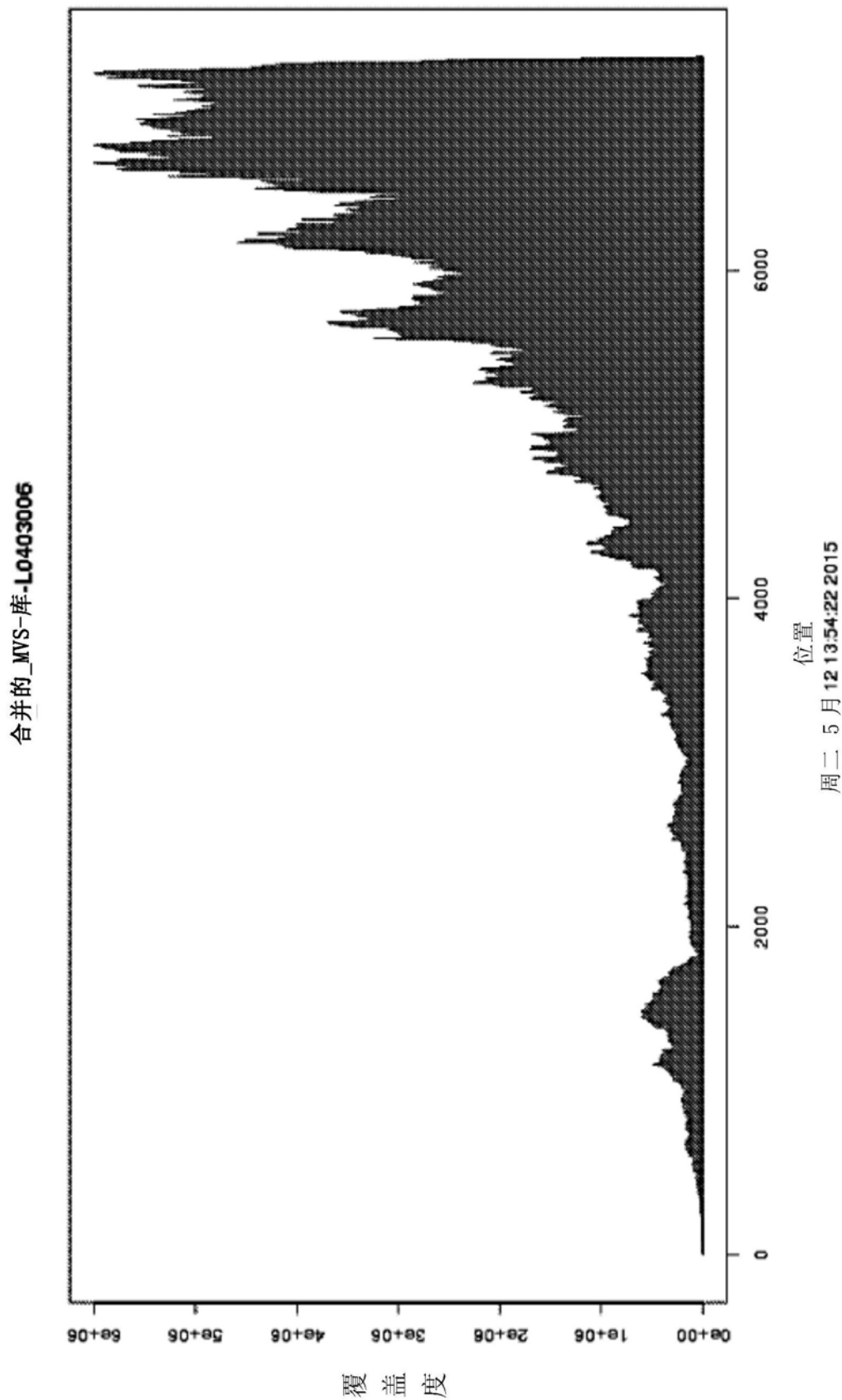


图6

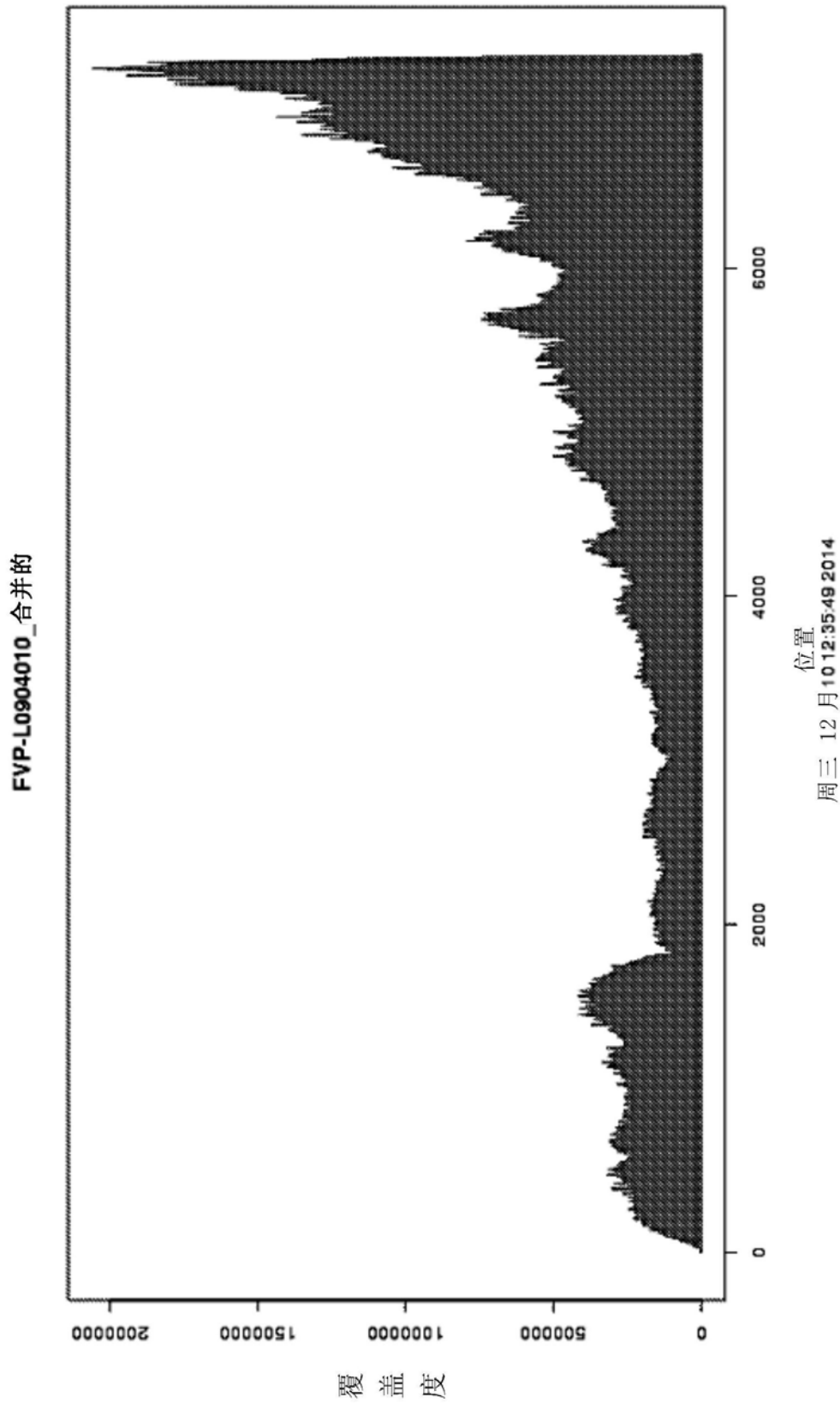


图7

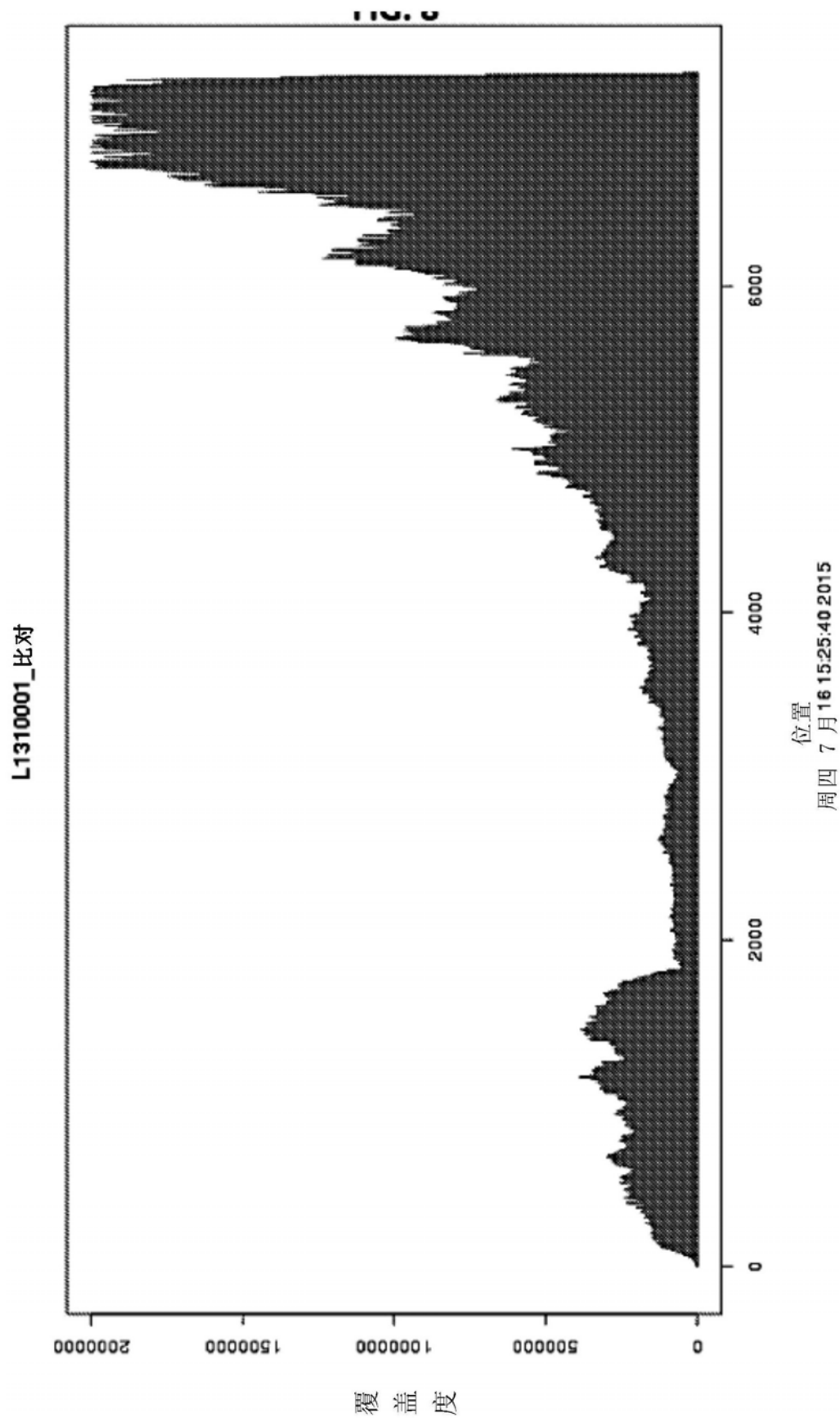


图8

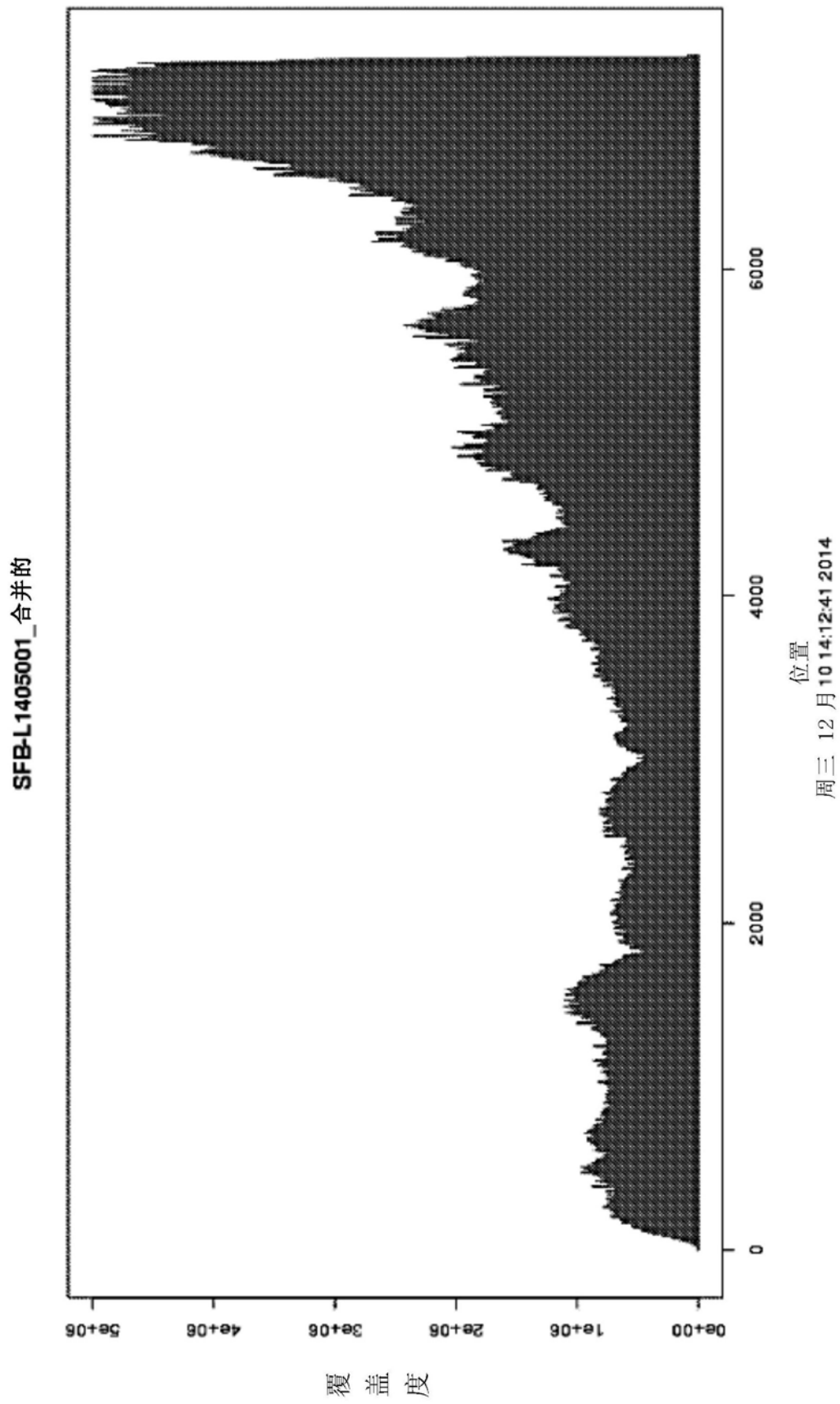


图9

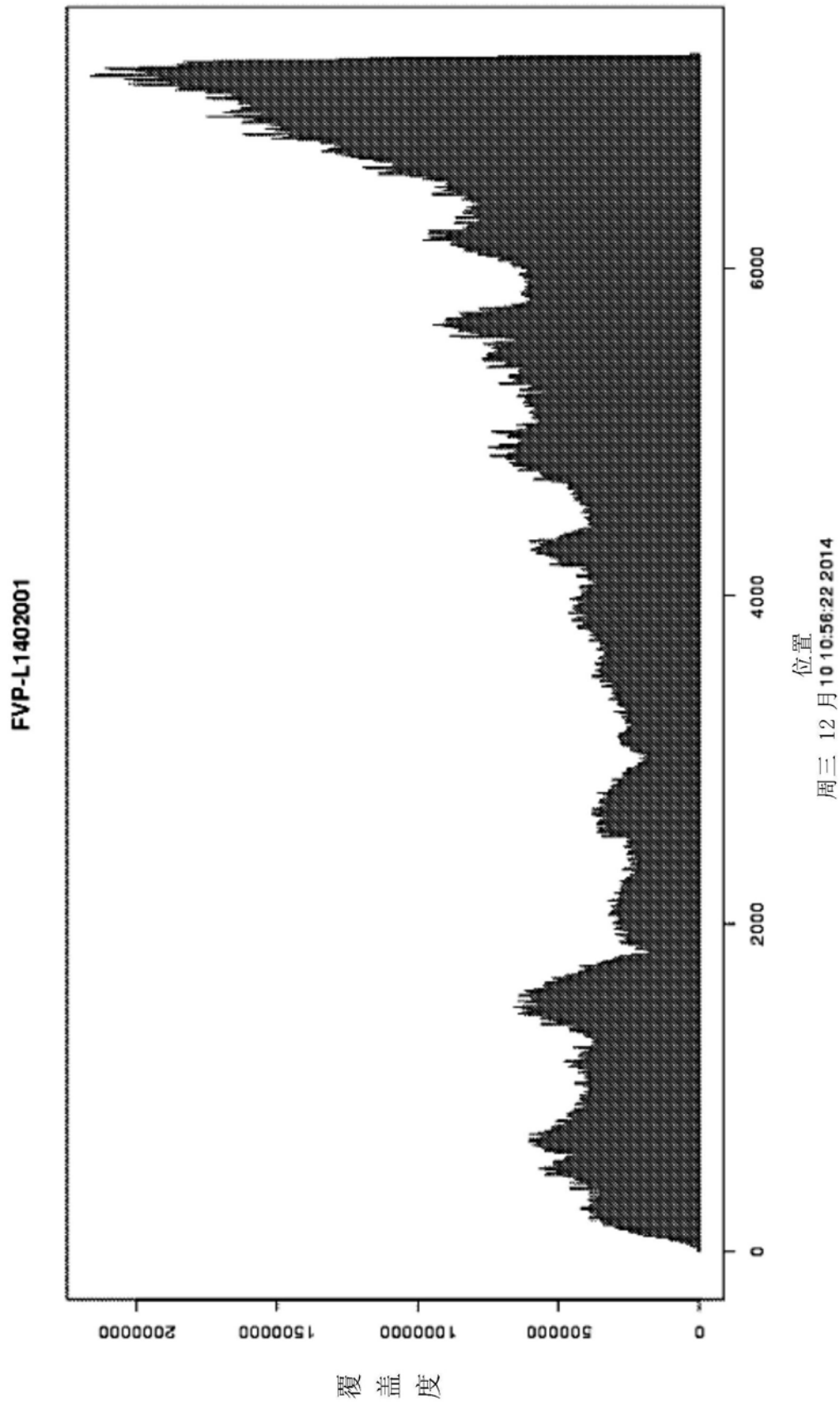


图10



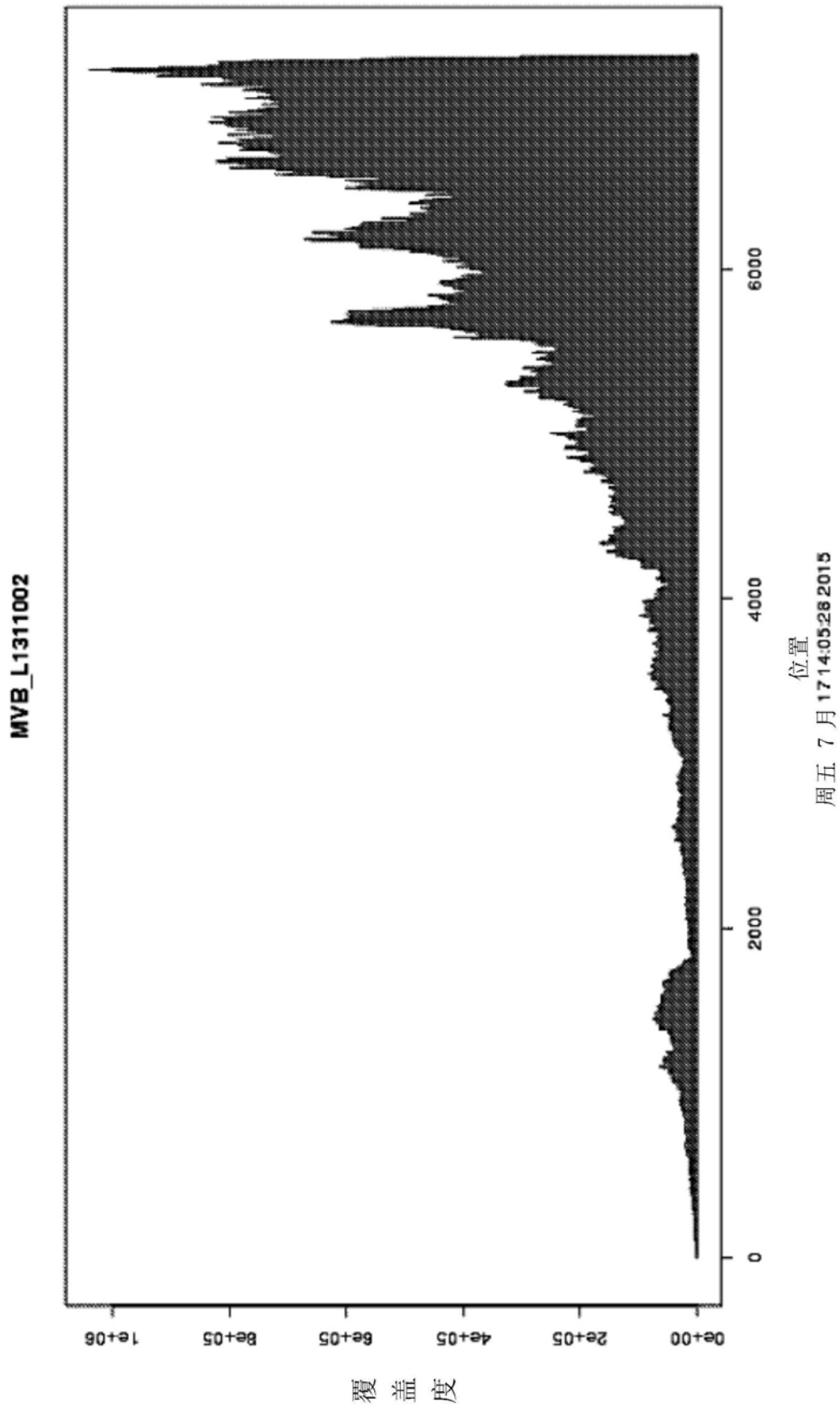


图11