



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107304432 A

(43)申请公布日 2017. 10. 31

(21)申请号 201610248592.8

(22)申请日 2016.04.20

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号中  
国科学院生物物理研究所8号楼214房  
间

(72)发明人 翟宇佳 孙飞

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限  
公司 11245

代理人 关畅 何叶喧

(51)Int. Cl.

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/866(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页  
序列表16页 附图3页

(54)发明名称

一种同时表达n个蛋白或蛋白亚基的方法及  
其专用系统

(57)摘要

本发明公开了一种同时表达n个目的物的方法及其专用系统。同时表达n个目的物的系统,包含DNA甲和DNA乙;n为2以上的自然数;目的物为蛋白或蛋白亚基或蛋白片段或多肽或多肽片段;所述DNA甲依次包括如下元件:启动子甲、融合基因甲、终止序列甲;所述DNA乙依次包括如下元件:启动子乙、融合基因乙、终止序列乙。实验证明,将编码人源COPI复合体的各个亚基的编码基因插入重组质粒pFBD-mCEG-COPI,转化受体菌获得重组杆状病毒穿梭载体,进一步转染昆虫细胞,可获得有活性的人源COPI复合体。因此,本发明所提供的同时表达n个目的物的系统在同时表达多个蛋白或蛋白亚基或多肽或多肽片段中具有重要的应用价值。

1. 一种同时表达n个目的物的系统,包含DNA甲和DNA乙;  
所述DNA甲依次包括如下元件:启动子甲、融合基因甲、终止序列甲;所述融合基因甲中含有片段I;所述片段I包括m1个区段,每个区段编码一个所述目的物,每相邻两个区段之间具有一个以上特异区;所述特异区编码蛋白酶的酶切识别序列;  
所述DNA乙依次包括如下元件:启动子乙、融合基因乙、终止序列乙;所述融合基因乙中含有片段II;所述片段II包括m2个区段,每个区段编码一个所述目的物,每相邻两个区段之间具有一个以上所述特异区;融合基因乙中还含有编码所述蛋白酶的区段;所述编码所述蛋白酶的区段与所述片段II之间具有一个以上所述特异区;  
所述目的物为蛋白或蛋白亚基或蛋白片段或多肽或多肽片段;  
m1为2以上的自然数;m2为2以上的自然数;m1+m2=n。
2. 如权利要求1所述的系统,其特征在于:  
所述融合基因甲中还含有一个编码荧光蛋白甲的区段,所述编码荧光蛋白甲的区段与所述片段I之间具有一个以上所述特异区;  
所述融合基因乙中还含有一个编码荧光蛋白乙的区段,所述编码荧光蛋白乙的区段与所述片段II之间具有一个以上所述特异区。
3. 如权利要求1或2所述的系统,其特征在于:  
所述融合基因甲依次包括:所述片段I、所述编码荧光蛋白甲的区段;  
所述融合基因乙依次包括:所述编码所述蛋白酶的区段、所述片段II、所述编码荧光蛋白乙的区段。
4. 如权利要求1至3任一所述的系统,其特征在于:  
所述启动子甲为P10启动子或P6.9启动子;  
所述启动子乙为P10启动子或P6.9启动子;  
所述终止序列甲为HSV tk polyadenylation信号序列或SV40polyadenylation信号序列;  
所述终止序列乙为HSV tk polyadenylation信号序列或SV40polyadenylation信号序列;  
所述编码荧光蛋白甲的区段为编码绿色荧光蛋白的基因或编码红色荧光蛋白的基因;  
所述编码荧光蛋白乙的区段为编码绿色荧光蛋白的基因或编码红色荧光蛋白的基因。
5. 如权利要求1至4任一所述的系统,其特征在于:所述蛋白酶为TEV蛋白酶。
6. 如权利要求1至5任一所述的系统,其特征在于:所述系统为同时表达Alpha亚基、Beta亚基、Beta'亚基、Gamma亚基、Delta亚基、Epsilon亚基和Zeta亚基的系统;  
所述Alpha亚基、所述Beta亚基、所述Beta'亚基、所述Gamma亚基、所述Delta亚基、所述Epsilon亚基和所述Zeta亚基组成人源COPI复合体。
7. 如权利要求1至6任一所述的系统,其特征在于:  
所述DNA甲的核苷酸序列的反向互补序列如序列表中序列3自5'末端起第3992至第12927位所示;  
所述DNA乙的核苷酸序列如序列表中序列3自5'末端起第12951至第22314位所示。
8. 一种转移载体,其特征在于:所述转移载体是在骨架载体的不同多克隆位点分别插入权利要求1至6中任一所述DNA甲和权利要求1至6中任一所述DNA乙得到的重组载体。

9. 权利要求1至7任一所述的系统,或,权利要求8所述转移载体在同时表达n个目的物中的应用;所述目的物为蛋白或蛋白亚基或蛋白片段或多肽或多肽片段;n为2以上的自然数。

10. 一种同时表达n个目的物的方法,包括如下步骤:将权利要求8所述转移载体转化受体菌并培养,获得重组杆状病毒穿梭载体;将所述重组杆状病毒穿梭载体转染昆虫细胞,继而表达的n个目的物。

## 一种同时表达n个蛋白或蛋白亚基的方法及其专用系统

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种同时表达n个蛋白或蛋白亚基的方法及其专用系统。

### 背景技术

[0002] 杆状病毒表达系统(Baculovirus Expression System, BVES)是在昆虫细胞中高效表达外源蛋白质的有力工具,具有安全性好、表达水平高、可进行翻译后加工等优点。由于杆状病毒的基因组庞大,外源基因的克隆不能通过酶切连接的方法直接插入,所以人们对杆状病毒基因组进行改造,并构建与之相匹配的转移载体,使两者重组为能够感染昆虫细胞的含外源基因的重组杆状病毒。在目前广泛使用的Bac to Bac系统中,杆状病毒穿梭载体(Bacmid)既可以在大肠杆菌中复制,又可以感染鳞翅目昆虫细胞,其在大肠杆菌中可以与含外源基因的匹配转移载体发生Tn7位点特异性重组。重组得到的杆状病毒穿梭载体能在大肠杆菌中高效复制,被提纯后可用于转染昆虫细胞。

[0003] 杆状病毒基因组容量大,可以在转移载体上插入多个开放阅读框(ORF, Open Reading Frame),继而使得到的重组杆状病毒穿梭载体在昆虫细胞中同时表达多个蛋白质。这也是目前在昆虫细胞中实现多种蛋白质共表达的通用思路。

[0004] 质粒pFastBac-Dual含有两个头对头放置的开放阅读框(ORF, Open Reading Frame),一个ORF以p10启动子起始,HSV tk polyadenylation信号序列终止;另一个ORF以polyhedrin启动子起始,SV40polyadenylation信号序列终止。质粒pFastBac-Dual可以作为转移载体,但只能同时表达两种蛋白质,若要表达两种以上的蛋白质,则需要另构建其它转移载体。例如要表达由四种不同亚基构成的蛋白质复合物,需要经过如下步骤:(1)构建重组质粒pFastBac-Dual-A-B(含A基因和B基因的质粒pFastBac-Dual)和重组质粒pFastBac-Dual-C-D(含C基因和D基因的质粒pFastBac-Dual);(2)将步骤(1)构建的重组质粒分别与Bacmid进行重组,得到两种重组Bacmid;(3)将步骤(2)得到的两种重组Bacmid分别转染昆虫细胞,得到两种病毒。(4)用步骤(3)得到的两种病毒同时感染昆虫细胞,实现四种亚基的共表达。这种多病毒共感染方法的蛋白表达量通常要低于单一病毒感染细胞的蛋白表达量。

[0005] 近几年流行的MultiBac系统考虑到这一点,只用一种重组Bacmid感染细胞,进行蛋白质复合体的表达。该系统的表达思路也是一个ORF表达一种蛋白质。通过受体质粒与供体质粒上LoxP位点介导的重组,实现质粒的融合,将不同来源的ORF整合到一个转移载体上,然后与Bacmid重组,实现多种蛋白质的共表达。这种方法的局限性为要构建多种含目的基因的供体质粒与受体质粒,供体质粒与受体质粒要经过多次整合与筛选,才能得到最终用于表达的转移载体,耗时耗力。

[0006] 上述两种方法除了分子克隆操作繁琐外,还含有以下几种缺陷:一是在表达过程中无法控制各个亚基的拷贝数,最终无法纯化到性质较为均一的蛋白质复合物;二是在病毒感染过程中无法判断目的蛋白是否表达。

## 发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是如何同时表达n个蛋白或蛋白亚基。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了一种同时表达n个目的物的系统,所述目的物为蛋白或蛋白亚基或蛋白片段或多肽或多肽片段。

[0009] 本发明所提供的一种同时表达n个目的物的系统,包含DNA甲和DNA乙;

[0010] 所述DNA甲依次包括如下元件:启动子甲、融合基因甲、终止序列甲;所述融合基因甲中含有片段I;所述片段I包括m1个区段,每个区段编码一个所述目的物,每相邻两个区段之间具有一个特异区;所述特异区编码蛋白酶的酶切识别序列;

[0011] 所述DNA乙依次包括如下元件:启动子乙、融合基因乙、终止序列乙;所述融合基因乙中含有片段II;所述片段II包括m2个区段,每个区段编码一个所述目的物,每相邻两个区段之间具有一个所述特异区;融合基因乙中还含有编码所述蛋白酶的区段;所述编码所述蛋白酶的区段与所述片段II之间具有一个所述特异区;

[0012] 所述目的物为蛋白或蛋白亚基或蛋白片段或多肽或多肽片段;

[0013] m1为2以上的自然数;m2为2以上的自然数;m1+m2=n。

[0014] 所述融合基因甲整体形成一个完整的开放阅读框,5'末端为起始密码子,3'末端为终止密码子。

[0015] 所述融合基因乙整体形成一个完整的开放阅读框,5'末端为起始密码子,3'末端为终止密码子。

[0016] 所述DNA甲和所述DNA乙可分别存在,也可以存在于同一个DNA分子中。

[0017] 所述DNA甲和所述DNA乙可分别存在于不同的表达载体,也可存在于同一个表达载体。

[0018] 上述系统中,所述融合基因甲中还可含有一个编码荧光蛋白甲的区段,所述编码荧光蛋白甲的区段与所述片段I之间具有一个以上所述特异区。

[0019] 上述系统中,所述融合基因乙中还可含有一个编码荧光蛋白乙的区段,所述编码荧光蛋白乙的区段与所述片段II之间具有一个所述特异区。

[0020] 上述系统中,所述融合基因甲依次可包括:所述片段I、所述编码荧光蛋白甲的区段。

[0021] 上述系统中,所述融合基因乙依次可包括:所述编码所述蛋白酶的区段、所述片段II、所述编码荧光蛋白乙的区段。

[0022] 所述编码所述蛋白酶的区段可位于所述片段II的上游。

[0023] 上述系统中,所述启动子甲可为P10启动子或P6.9启动子。

[0024] 上述系统中,所述启动子乙可为P10启动子或P6.9启动子。

[0025] 上述系统中,所述终止序列甲可为HSV tk polyadenylation信号序列或SV40polyadenylation信号序列。

[0026] 上述系统中,所述终止序列乙可为HSV tk polyadenylation信号序列或SV40polyadenylation信号序列。

[0027] 上述系统中,所述编码荧光蛋白甲的区段可为编码绿色荧光蛋白的基因或编码红色荧光蛋白的基因。

- [0028] 上述系统中,所述编码荧光蛋白乙的区段可为编码绿色荧光蛋白的基因或编码红色荧光蛋白的基因。
- [0029] 上述系统中,所述P10启动子的反向互补序列如序列表中序列2自5'末端起第7820至7929位所示。
- [0030] 上述系统中,所述P6.9启动子的核苷酸序列如序列表中序列2自5'末端起第7953至8047位所示。
- [0031] 上述系统中,所述编码绿色荧光蛋白的基因如序列表中序列1自5'末端起第778至1497位所示。
- [0032] 上述系统中,所述编码红色荧光蛋白的基因的反向互补序列如序列表中序列1自5'末端起第9至719位所示。
- [0033] 上述系统中,所述目的物中不具有所述蛋白酶的酶切识别序列。
- [0034] 所述蛋白酶具体可为TEV蛋白酶。
- [0035] 上述系统中,所述TEV蛋白酶的编码基因如序列表中序列2自5'端起8051至8821位所示。
- [0036] 上述系统中,所述TEV蛋白酶的酶切识别序列如序列表中序列2自5'末端起第16304至16324位所示。
- [0037] 上述系统中,所述DNA甲和所述DNA乙,可同向表达,也可反向表达。
- [0038] 上述系统中,所述融合基因甲的核苷酸序列的反向互补序列如序列表中序列2自5'末端起第1至第7812位所示。
- [0039] 上述系统中,所述融合基因乙的核苷酸序列如序列表中序列2自5'末端起第8051至第10324位所示。
- [0040] 上述系统中,所述DNA甲的核苷酸序列的反向互补序列如序列表中序列3自5'末端起第3992至第12927位所示。
- [0041] 上述系统中,所述DNA乙的核苷酸序列如序列表中序列3自5'末端起第12951至第22314位所示。
- [0042] 上述任一所述系统可为同时表达Alpha亚基、Beta亚基、Beta'亚基、Gamma亚基、Delta亚基、Epsilon亚基和Zeta亚基的系统;所述Alpha亚基、所述Beta亚基、所述Beta'亚基、所述Gamma亚基、所述Delta亚基、所述Epsilon亚基和所述Zeta亚基可组成人源COPI复合体。
- [0043] 为解决上述技术问题,本发明还提供了一种转移载体。本发明所提供的转移载体可为将上述任一所述DNA甲和上述任一所述DNA乙分别插入骨架载体的多克隆位点,得到的重组载体。
- [0044] 所述转移载体的制备方法具体如下:
- [0045] (1)将质粒pFastbac-Dual的限制性内切酶KpnI识别序列和限制性内切酶HindIII识别序列间的DNA小片段替换为核苷酸序列是序列表的序列1所示的DNA分子,得到重组质粒;
- [0046] (2)将步骤(1)得到的重组质粒的限制性内切酶XbaI识别序列和切刻内切酶Nb.BbvCI识别序列间的DNA小片段替换为核苷酸序列是序列表的序列2所示的DNA分子,得到转移载体。

[0047] 所述转移载体具体可为重组质粒pFBD-mCEG-COPI。重组质粒pFBD-mCEG-COPI的核苷酸序列如序列表中序列3所示。

[0048] 上述任一所述同时表达n个目的物的系统或所述转移载体在表达n个目的物中的应用也属于本发明的保护范围；所述目的物为蛋白或蛋白亚基或蛋白片段或多肽或多肽片段；n为2以上的自然数。

[0049] 为解决上述技术问题，本发明还提供了一种同时表达n个目的物的方法。

[0050] 本发明所提供的同时表达n个目的物的方法，包括如下步骤：将上述任一所述转移载体转化受体菌并培养，获得重组杆状病毒穿梭载体；将所述重组杆状病毒穿梭载体转染昆虫细胞，继而表达的n个目的物；

[0051] 所述目的物为蛋白或蛋白亚基或蛋白片段或多肽或多肽片段；n为2以上的自然数。

[0052] 上述方法中，所述受体菌为含有杆状病毒穿梭载体的受体菌。

[0053] 本发明中，所述蛋白酶的种类可为一种或多种。

[0054] 实验证明，将编码人源COPI复合体的各个亚基的基因插入重组质粒pFBD-mCEG-COPI，转化受体菌，获得重组杆状病毒穿梭载体；将所述重组杆状病毒穿梭载体转染昆虫细胞，即为获得有活性的人源COPI复合体。因此，利用本发明提供的同时表达n个目的物的系统可以同时表达多个蛋白或蛋白亚基或多肽或多肽片段。本发明所提供的同时表达n个目的物的系统具有如下优点：一是在表达过程中可控制各个蛋白亚基的拷贝数，可纯化到性质较为均一的蛋白质复合体；二是在病毒感染过程中可判断目的蛋白是否表达；三是省时省力。本发明提供的同时表达n个目的物的系统在同时表达多个蛋白或蛋白亚基或多肽或多肽片段中具有重要的应用价值。

## 附图说明

[0055] 图1为重组质粒pFBD-mCEG的图谱。

[0056] 图2为人源COPI复合体各亚基的位置示意图。

[0057] 图3为重组质粒pFBD-mCEG-COPI的图谱。

[0058] 图4为实施例2步骤二的荧光显微镜观察结果。

[0059] 图5为COPI复合体的SDS-PAGE。

[0060] 图6为实施例2步骤三的COPI复合体的生物学活性检测结果。

## 具体实施方式

[0061] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述，给出的实施例仅为了阐明本发明，而不是为了限制本发明的范围。

[0062] 下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。

[0063] 下述实施例中所用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径得到。

[0064] 以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

[0065] KpnI-HF、HindIII-HF和CIP为NEB公司产品。胶回收试剂盒为GenStar公司产品。DNA ligation Kit为TakaRa公司产品。质粒pFastbac-Dual和DH10Bac感受态细胞均为Invitrogen公司产品。质粒pmCherry-N1和质粒peGFP-N1均为Clontech公司产品。sf9细胞、

cellfectin II、Sf-900™ II SFM培养基和Grace's Insect Cell Culture Medium, Unsupplemented均为Invitrogen公司产品,产品目录号分别为B82501、10362100、10902096和11595030。Mono Q 5/50GL阴离子交换柱为GE公司产品,产品目录号为17-5166-01。GTP  $\gamma$  S为Sigma-alorich公司产品,产品目录号为G8634。1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DOPC)、1,2-二-(9Z-十八碳烯酰基)-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,2-二-十八碳烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DSPC)、phosphoinositides(PIPs)和sphingolipid(在下文中简称SM)和胆固醇为Avanti公司的产品。NZCYM培养基和肉豆蔻酸钠为Sigma公司产品,货号分别N3643M8005和M8005。

[0066] 裂解缓冲液:含100mM NaCl、10%甘油和1mM DTT的pH8.0、50mM Tris-Cl缓冲液。

[0067] 洗脱缓冲液:含100mM NaCl、10%甘油、1mM DTT和5mM 脱硫生物素的pH8.0、50mM Tris-Cl缓冲液。

[0068] 低盐buffer:含100mM NaCl和10%甘油的pH8.0、20mM Bicine缓冲液。

[0069] 高盐buffer:含1M NaCl和10%甘油的pH8.0、20mM Bicine缓冲液。

[0070] buffer A:含1mM EDTA、0.2mM GDP和1mM DTT的pH8.0、20mM Tris缓冲液。

[0071] Buffer B:含1mM MgCl<sub>2</sub>、5 $\mu$ M GDP和1mM DTT的pH8.0、20mM Tris缓冲液。

[0072] Buffer C:含1M NaCl的Buffer B。

[0073] buffer D:含1mM MgCl<sub>2</sub>、5 $\mu$ M GDP和1mM DTT的pH5.7、10mM MES缓冲液。

[0074] buffer E:含0.5M NaCl的buffer D。

[0075] buffer F:含2.5mM Mg(OAc)<sub>2</sub>、0.2M蔗糖、25mM KCl的pH7.2、20mM Hepes缓冲液。

[0076] 质粒pET11d-Arf1记载在如下文献中:Manneville JB, Casella JF, et al. COPI coat assembly occurs on liquid-disordered domains and the associated membrane deformations are limited by membrane tension. Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Nov 4; 105(44):16946-51.

[0077] 质粒pBB131-nmt记载在如下文献中:Duronio RJ, Jackson-Machelski E, Heuckeroth RO, et al. Protein N-myristoylation in Escherichia coli: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 1990 Feb; 87(4):1506-10.

[0078] 实施例1、重组质粒pFBD-mCEG的构建

[0079] 构建重组质粒pFBD-mCEG的步骤如下:

[0080] 1、引物合成

[0081] 表1. TAIL-PCR扩增引物



[0082]

引物名称	引物序列(5' -3' )
mCherry-F	AAAGGTACCTTAGTCAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGC (下划线为限制性内切酶 Kpn I 的识别序列)
mCherry-mut-F	TGTAGGTGGTCTTGACTTCAGCGTCGTAGTGGC
mCherry-mut-R	GCCACTACGACGCTGAAGTCAAGACCACCTACA
mCherry-R1	GGATCCTCTAGACAGGCTCCTCCCCTCAGCAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG
mCherry-R2	CTGCTGAGGAGATCCACCGGTCTAGAGGATCCTCTAGACAGGCTCCTCCCC
eGFP-F	TCTAGACCGGTGGATCTCCTCAGCAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
eGFP-R	TTTAAGCTTTTAGTCAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG (下划线为限制性内切酶 HindIII 的识别序列)

[0083] 人工合成表1中所示的引物。

[0084] 2、第一轮PCR反应

[0085] (1)以质粒pmCherry-N1为模板,以步骤1合成的mCherry-F和mCherry-mut-R为引物,进行PCR扩增,获得PCR扩增产物mCherry-L。

[0086] 反应程序为:98℃2min;98℃15s,57℃15s,72℃1min40s,共30个循环;72℃10min。

[0087] (2)以质粒pmCherry-N1为模板,以步骤1合成的mCherry-mut-F和mCherry-R1为引物,进行PCR扩增,获得PCR扩增产物mCherry-R。

[0088] 反应程序为:98℃2min;98℃15s,57℃15s,72℃1min40s,共30个循环;72℃10min。

[0089] (3)以质粒peGFP-N1为模板,以步骤1合成的eGFP-F和eGFP-R为引物,进行PCR扩增,获得PCR扩增产物eGFP。

[0090] 反应程序为:98℃2min;98℃15s,57℃15s,72℃1min40s,共30个循环;72℃10min。

[0091] 3、第二轮PCR反应

[0092] (1)将步骤2中(1)获得的PCR扩增产物mCherry-L和步骤2中(2)获得的PCR扩增产物mCherry-R等摩尔比混合,得到混合液甲。

[0093] (2)以混合液甲为模板,以步骤1合成的mCherry-F和mCherry-R2为引物,进行PCR扩增,获得PCR扩增产物mCherry-mut。

[0094] 反应程序为:98℃2min;98℃15s,57℃15s,72℃1min40s,共30个循环;72℃10min。

[0095] 4、第三轮PCR反应

[0096] (1)将步骤3中获得的PCR扩增产物mCherry-mut和步骤2中(3)获得的PCR扩增产物eGFP等摩尔比混合,得到混合液乙。

[0097] (2)以混合液乙为模板,以步骤1合成的mCherry-F和eGFP-R为引物,进行PCR扩增,获得PCR扩增产物mCherry-eGFP。

[0098] 反应程序为:98℃2min;98℃15s,57℃15s,72℃1min40s,共30个循环;72℃10min。

[0099] 5、用限制性内切酶KpnI-HF和HindIII-HF酶切PCR扩增产物mCherry-eGFP,然后利用胶回收试剂盒回收酶切产物。

[0100] 6、用限制性内切酶KpnI-HF和HindIII-HF酶切质粒pFastbac-Dual1;然后加入CIP,37℃处理1h;最后利用胶回收试剂盒回收约4.8kb的载体骨架。

[0101] 7、将酶切产物与载体骨架通过DNA ligation Kit连接,得到重组质粒pFBD-mCEG。重组质粒pFBD-mCEG的图谱见图1。

[0102] 根据测序结果,对重组质粒pFBD-mCEG进行结构描述如下:将质粒pFastbac-Dual的限制性内切酶KpnI和HindIII的识别序列间的DNA小片段替换为核苷酸序列是序列列表的序列1所示的DNA分子,得到重组质粒pFBD-mCEG。序列列表中的序列1自5'末端起,第9至719位为mCherry蛋白的编码基因的反向互补序列,第722至728位为切刻内切酶Nb.BbvCI的识别序列的反向互补序列,第740至745位为限制性内切酶XbaI的识别序列,第746至751位为限制性内切酶BamHI的识别序列,第752至757位为限制性内切酶XbaI识别位点,第757至762位为限制性内切酶AgeI识别位点,第769至775位为切刻内切酶Nb.BbvCI识别序列;第778至1497位为EGFP蛋白的编码基因。

[0103] 实施例2、利用实施例构建的重组质粒pFBD-mCEG在昆虫细胞中表达人源COPI复合体

[0104] 人源COPI复合体由7种单拷贝亚基组成,7种单拷贝亚基分别为Alpha亚基、Beta亚基、Beta'亚基、Gamma亚基、Delta亚基、Epsilon亚基和Zeta亚基,其总分子量高达558kDa。人源COPI复合体以下简称COPI复合体。

[0105] 一、构建重组质粒pFBD-mCEG-COPI

[0106] 构建重组质粒pFBD-mCEG-COPI的方法有两种:

[0107] 第一种方法是按照如下步骤构建:(1)用限制性内切酶XbaI和切刻内切酶Nb.BbvCI双酶切实例1构建的重组质粒pFBD-mCEG,回收约6300bp的线性化质粒。(2)完成步骤(1)后,将线性化质粒和序列列表中的序列2所示的双链DNA分子按照Gibson Assembly的方法(Gibson DG,Young L,Chuang RY,Venter JC,Hutchison CA 3rd,Smith HO.Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.Nat Methods.2009May;6(5):343-5.)进行单段重组或多段重组,得到重组质粒pFBD-mCEG-COPI。重组质粒pFBD-mCEG-COPI的序列如序列列表中的序列3所示。

[0108] 第二种方法是将重组质粒pFBD-mCEG和序列列表中序列3所示的核苷酸序列提供给基因公司,由基因公司完成重组质粒pFBD-mCEG-COPI的构建。

[0109] 本发明采用第二种方法构建重组质粒pFBD-mCEG-COPI,完成构建的基因公司为苏州金唯智生物科技有限公司。重组质粒pFBD-mCEG-COPI的图谱见图3。

[0110] 根据测序结果,重组质粒pFBD-mCEG-COPI的核苷酸序列如序列列表中序列3所示。重组质粒pFBD-mCEG-COPI含有序列表中的序列2所示的双链DNA分子,序列列表中的序列2自5'末端起,第1至21位为TEV酶剪切位点(TEV Cleavage Site,TCS)识别序列的反向互补序列,第22至552位为Zeta亚基的编码基因(又称Zeta基因)的反向互补序列,第553至582位为Myc标签的编码基因的反向互补序列,第583至603位为TCS识别序列的反向互补序列,第604至2136位为Delta亚基的编码基因(又称Delta基因)的反向互补序列,第2137至2160位为Flag标签的编码基因的反向互补序列,第2161至2181位为TCS识别序列的反向互补序列,第2182至4803位为Gamma亚基的编码基因(又称Gamma基因)的核苷酸序列,第4804至4827位为Flag标签的编码基因的核苷酸序列,第4828至4848位为TCS识别序列的反向互补序列,第4849至7707位为Beta亚基的编码基因(又称Beta基因)的反向互补序列,第7708至7812位为Twin-Strep Tag的编码基因(又称Twin-Strep基因)的反向互补序列,第7820至7929位为P10启动

子的反向互补序列,第7953至8047位为P6.9启动子的核苷酸序列,第8051至8821位为TEV酶的编码基因(又称TEV基因)的核苷酸序列,第8822至8842位为TCS的识别序列,第8843至8866位为Flag标签的编码基因的核苷酸序列,第8867至12565位为Alpha亚基的编码基因(又称Alpha基因)的核苷酸序列,第12566至12586位为TCS的识别序列,第12587至12616位为Myc标签的编码基因的核苷酸序列,第12617至15334位为Beta'亚基的编码基因(又称Beta'基因)的核苷酸序列,第15335至15355位为TCS的识别序列,第15356至15379位为Flag标签的编码基因(又称Flag基因)的核苷酸序列,第15380至16303位为Epsilon亚基的编码基因(又称Epsilon基因)的核苷酸序列,第16304至16324位为TCS的识别序列。Alpha亚基、Beta亚基、Beta'亚基、Gamma亚基、Delta亚基、Epsilon亚基和Zeta亚基的位置示意图如图2所示。

[0111] 二、在昆虫细胞中表达人源COPI复合体

[0112] 参考Invitrogen公司的“Bac-to-Bac®Baculovirus Expression System”的操作手册,在昆虫细胞中表达人源COPI复合体(下文简称COPI复合体)。具体步骤如下:

[0113] 1、将重组质粒pFBD-mCEG-COPI转化DH10Bac感受态细胞,得到重组菌落。

[0114] 2、完成步骤1后,提取重组菌落的重组Bacmid DNA。

[0115] 3、用Grace's Insect Cell Culture Medium,Unsupplemented稀释处于对数生长期的sf9细胞,得到稀释液,稀释液中sf9细胞的密度为 $5.0 \times 10^5$ 个/mL。

[0116] 4、向直径为35mm的平皿中加入2mL步骤3得到的稀释液,28℃、培养4h。

[0117] 5、向溶液B中加入溶液A,混匀,室温放置25min,得到混合物;其中溶液A的制备方法为向100μL Grace's Insect Cell Culture Medium,Unsupplemented加入2.5μg步骤2提取的重组Bacmid DNA;溶液B的制备方法为取100μL Grace's Insect Cell Culture Medium,Unsupplemented加入8μL cellfectin II。

[0118] 6、完成步骤4后,取所述平皿,逐滴加入步骤5得到的混合物,然后28℃、培养4h;弃上清,加入2mL Sf-900™ II SFM培养基,28℃静置培养144h。

[0119] 完成步骤6后,取所述平皿,用Nikon TS100倒置荧光显微镜观察。结果见图4(左图为EGFP的荧光(使用Nikon B-2A荧光模块观察,激发波长范围450~490nm),右图为mCherry的荧光(使用Nikon-2A荧光模块观察,激发波长范围510~560nm)。结果表明,用荧光显微镜可以观察到红光和绿光。因此,Alpha亚基、Beta亚基、Beta'亚基、Gamma亚基、Delta亚基、Epsilon亚基和Zeta亚基均可以正常表达。

[0120] 7、完成步骤6后,取上清,获得P1代病毒液。

[0121] 8、完成步骤7后,取P1代病毒液200μL,接种于装有180mL、sf9细胞浓度为 $2.0 \times 10^6$ 个/mL的昆虫细胞培养基的2L三角摇瓶中,28℃、150rpm培养96h。然后4℃、2000g离心5min,取上清液,获得P2代病毒液。

[0122] 9、取10mL P2代病毒液,接种于装有500mL、sf9细胞浓度为 $2.0 \times 10^6$ 个/mL的昆虫细胞培养基的2L三角摇瓶中,28℃、150rpm培养72h。然后4℃、2000g离心5min,收集沉淀,即为感染细胞。

[0123] 10、完成步骤9后,取所述感染细胞,先用裂解缓冲液重悬,使用Dounce匀浆器匀浆40次(整个匀浆过程中,细胞一直处于冰浴中)得到细胞裂解液;然后4℃、15000rpm离心40min,收集上清液。

[0124] 11、完成步骤10后,将收集的上清液上样至Strep自装柱(Strep亲和介质为IBA公司产品),先用50个柱体积的裂解缓冲液洗脱以去除杂蛋白,再用10个柱体积的洗脱缓冲液洗脱,收集过柱后的洗脱液。

[0125] 12、完成步骤11后,将收集的过柱后的洗脱液上样至Mono Q 5/50GL阴离子交换柱,然后用洗脱液进行洗脱,Bio-rad NGC层析仪进行检测。洗脱液由低盐buffer和高盐buffer组成,流速为1mL/min。梯度洗脱程序:洗脱液中高盐buffer的体积百分含量由0%匀速增至1000%,低盐buffer的体积百分含量由100%匀速降至0%,线性梯度洗脱20个柱体积。检测波长为280nm。收集并合并洗脱峰。得到的溶液即为COPI复合体溶液。

[0126] 实验结果见图5。结果表明,经过上述步骤可获得纯度在95%以上的COPI复合体,每升昆虫细胞中可以纯化得到1.5mg COPI复合体。

[0127] 三、在昆虫细胞中表达COPI复合体的生物学活性检测

[0128] 1、Myr-Arf1蛋白的表达和纯化

[0129] (1)Myr-Arf1蛋白的表达

[0130] 将质粒pET11d-Arf1和质粒pBB131-nmt导入大肠杆菌BL21(DE3),得到重组大肠杆菌,将该重组大肠杆菌的单克隆接种于25mL含50 $\mu$ g/ml卡那霉素和50 $\mu$ g/ml氨苄青霉素的NZCYM培养基中,37 $^{\circ}$ C、200rpm振荡培养至OD<sub>600</sub>值为0.8,得到培养菌液1;取5mL培养菌液1,以1:180(体积比)接种至NZCYM培养基中,37 $^{\circ}$ C、180rpm振荡培养至OD<sub>600</sub>值为0.4,得到培养菌液2;向培养菌液2中加入肉豆蔻酸钠水溶液(使肉豆蔻酸钠在培养体系中的浓度为50 $\mu$ M),37 $^{\circ}$ C、180rpm振荡培养至OD<sub>600</sub>值为0.8,得到培养菌液3;向培养菌液3中加入IPTG(使其在培养体系中的浓度为1mM),37 $^{\circ}$ C诱导4h,离心收集菌体。

[0131] (2)Myr-Arf1蛋白的纯化

[0132] ①取步骤(1)收集到的菌体,置于冰上超声破碎(功率300W,工作时间8s,间歇5s,总破碎时间10min),得到菌体破碎液。

[0133] ②将菌体破碎液4 $^{\circ}$ C、100000g离心20min,得到上清液1;将上清液1 4 $^{\circ}$ C、100000g离心60min,得到上清液2。

[0134] ③将上清液2置于冰上,边搅拌边按照35%饱和度缓缓加入硫酸铵粉末(加入总时间控制在45min内,加入硫酸铵的作用为富集修饰过的Arf1蛋白),然后继续在冰上搅拌1h,得到混合体系。

[0135] ④将混合体系4 $^{\circ}$ C、8000g离心25min,弃上清,沉淀用buffer A悬浮,得到悬浮液;然后将悬浮液4 $^{\circ}$ C、10000rpm离心40min,得到上清液3。

[0136] ⑤将上清液3上样至buffer B平衡的HiTrap Desalting层析脱盐柱(GE公司产品)上,用buffer B进行洗脱,得到脱盐后溶液;将脱盐后溶液上样至buffer B平衡的Hitrap DEAE FF层析柱(GE公司产品)上,用混合液(由buffer C和buffer B组成,体积比为1:19)洗脱目的蛋白,根据SDS-PAGE考染检测结果,将只含有修饰过的Arf1蛋白的洗脱液用截留值为3kDa的缩滤管浓缩,得到浓缩液。

[0137] ⑥将浓缩液上样至buffer B平衡的HiTrap Desalting层析脱盐柱中,用buffer B进行洗脱,得到脱盐后的浓缩液。

[0138] ⑦将脱盐后的浓缩液上样至buffer D平衡好的Mono S 5/50GL阳离子交换层析柱(GE公司产品)上,然后用20mL洗脱液进行洗脱。洗脱液由buffer E和水组成。梯度洗脱程

序:洗脱液中buffer E的体积百分含量由0%匀速增至100%,水的体积百分含量由100%匀速降至0%。根据SDS-PAGE考染检测结果收集只含有修饰过的Arf1蛋白的洗脱液,然后用截留值为3kDa的缩滤管浓缩,得到浓度为10mg/mL的Myr-Arf1蛋白溶液。分装后-80℃保存。

[0139] 2、脂质体的制备

[0140] 将快速冻融法和extrusion方法结合使用制备脂质体,具体步骤如下:

[0141] (1)将DOPC、DOPE、DOPS、SM和PIPs溶解于氯仿中,得到混合液甲,混合液甲中DOPC、DOPE、DOPS、SM和PIPs的浓度均为10mg/mL。

[0142] (2)将胆固醇溶解于60℃的甲醇中,得到混合液乙,混合液乙中胆固醇的浓度为5mg/mL。

[0143] (3)将混合液甲和混合液乙按照不同的比例混合,用氮气小心吹干,在真空腔体内抽气3h以上,保证有机溶剂全部除去,得到脂质混合物。

[0144] (4)完成步骤(3)后,将脂质混合物用buffer F重悬,37℃涡旋震荡孵育30min。

[0145] (5)完成步骤(4)后,将脂质混合物用液氮快速冷冻1min,37℃水浴融化1min,如此反复冻融5次,以减少多室脂质体。最后将extruder(Avanti公司产品)装配上0.2μm的滤膜在室温下反复挤压脂质混合物21次,即为制备的脂质体。

[0146] 3、制备COPI活性检测体系

[0147] 对照组i的检测体系包括步骤2制备的脂质体。

[0148] 对照组ii的检测体系包括步骤2制备的脂质体、步骤1制备的Myr-Arf1蛋白溶液和GTP γ S。

[0149] 对照组iii的检测体系包括步骤2制备的脂质体、步骤二制备的COPI复合体和GTP γ S。

[0150] 对照组iv的检测体系包括步骤2制备的脂质体、步骤1制备的Myr-Arf1蛋白溶液和步骤二制备的COPI复合体。

[0151] 检测组的检测体系包括步骤2制备的脂质体、步骤1制备的Myr-Arf1蛋白溶液、步骤二制备的COPI复合体和GTP γ S。

[0152] 上述各检测体系的体积均为250μL,反应环境为buffer F。

[0153] 上述各组的检测体系中,Myr-Arf1蛋白的浓度为0.1mg/mL,GTP γ S的浓度为25μM,脂质体的浓度为1.5mg/mL,COPI复合体的浓度为0.1mg/mL。

[0154] 4、完成步骤3后,将各检测体系均37℃孵育30min。

[0155] 5、完成步骤4后,向Beckman 344090离心管底部依次加入10μL含45%(质量体积比)蔗糖的buffer F、50μL的含37.5%(质量体积比)蔗糖的buffer F,然后用Beckman超速离心机的MLS-50转子和适配器356860,以100000g离心50min,吸取两层蔗糖间的10μL液相作为样品。

[0156] 6、完成步骤5后,各取样品5μL,加到经过辉光放电处理的、碳包被的电镜载网(LifeTrust公司产品)上,用超纯水漂洗后,然后加入浓度为2%(质量体积比)的醋酸铀水溶液,室温染色1分钟。用200KV的FEI Talos场发射电镜观察载网上的样品。

[0157] 实验结果见图6(i为对照组i,ii为对照组ii,iii为对照组iii,iv为对照组iv,v为检测组,标尺为200nm,白色虚线方框为重组小泡)。结果表明,仅有检测组中产生重组小泡。因此,步骤二制备的COPI复合体是有生物活性的。

<110> 中国科学院生物物理研究所  
 <120> 一种同时表达 n 个蛋白或蛋白亚基的方法及其专用系统  
 <160> 3  
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 1505  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223>  
 <400> 1

[0001]

```

ttagtcagtt acctgtacag ctctccatg ccgccggtgg agtggcggcc ctgggcgct 60
tegtactgtt ccacgatggt gtagtctctg ttgtgggagg tgatgtccaa cttagatgtt 120
acgltgtagg cgcggggcag ctgcacgggc ttcttggcct tgtaggiggt cttagactca 180
gcgtcgtagt ggccgccgtc cttcagcttc agcctctgct tgatctcgcc cttcagggcg 240
ccgtcctgg ggtacatccg ctggaggag gcctccacc ccattggtctt cttctgcatt 300
acggggcctt cggaggggaa gttggtgcc cgcagcttca cctttagat gaactcgcc 360
tctgcaggg aggagtctg ggtcacggc accacgccg cgtcctcgaa gttcatcac 420
cgtcccaact tgaagcctc ggggaaggac agcttcaagt agtcgggat gtcggcggg 480
tcttcaagt agcccttga gccgtacatg aactgagggg acaggatgct ccaggcgaag 540
ggcagggggc cacccttggc caccctcagc ttggcggctt ggggtccctc gtagggcgg 600
ccctgcctt cgcctcgtat ctgaaactg ttggcgttca cggagcctc catgtgcacc 660
ttgaagcga tgaactcctt gatgatgccc atgttatect cctcgcctt gctcaccatt 720
tgctgagggg aggagcctg cttagaggat ctctagaccg gtggatctc tcagcagatg 780
gtgagcaagg gcgaggagct gttcacggg gtggtgccc tccctgctga gctggacggc 840
gacgtaaacg gccacaagt cagcgtgtc ggcgagggcg agggcgtgc cactacggc 900
aagctgacc lgaagttcat ctgcaccacc ggcaagctc ccgtgccctg gccaccctc 960
gtaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgt accccgacca catgaagcag 1020
cagacttct teaagtccg catgcccgaa ggctacgtc aggagcgac catcttctc 1080
aaggacgac gcaactacaa gaccgcgcc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg 1140
aaccgcatg agctgaagg catcgactc aaggaggac gcaacatct ggggcacaag 1200
ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc 1260
atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggac gcagcgtgca gctcgcgac 1320
cactaccagc agaacacccc catcgccgac ggcctcgtg tctgcccga caaccactc 1380
ctgagcacc agtccgcct gagcaagac cccaacaga agcgcgatca catggtctg 1440
ctggagtctg tgaccgccg cgggateact ctggcctatg acgagctgta caagtaactg 1500
actaa. 1505
    
```

<210> 2  
 <211> 16324  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223>

	<400> 2	
	tgactggaaa tataagtct cccgaaggag tgaccacttg atctgttctt tggctgactg	60
	cagcacctga gacacggtct gctccgtaag ggggacatct tcacccctta atgccaccgg	120
	gtgtaccacc tgcctgggat cactctctag gatcaccctt ccacttaciaa ttteatccac	180
	agccaagaac agccctcca tgtctecag cagtgtctgc tttttacat tttctctag	240
	catctggctc aatgagtga agagacagtt cagaacagcc ataagcatca gctcattttc	300
	ataggagetg ccaatccat agaaatagag atctatactg cttttgtata ccactgtcag	360
	gccttccaag agggcaattt cactgtcagt ccgatgggtc ttgttgaaaa tgtttctctc	420
	aaaggcclll tgcctctga cactgggta ggtgltcga tagtacltg caaaaagctg	480
	atctccatca ttgtccagaa tcaggatggc ttgtacagta tacaggaag gttccaaaat	540
	cagcgcctc atcaagtctt ctctcctaat caacttttgc tgggattgaa agtataaatt	600
	ctccagaatt tcatactat ccactaggaa agtggctctt gtggaaaacc tgacggggct	660
	gtttccatct acctgggtca ctttggtaac ctgtatgta cagtaatttt tcttgagac	720
	aaaggaaact tgaacagga agaagtcatt gggctgcca gcaatgctaa actccaggct	780
	gccactctta tttttggcat caatcacagg caggcaccac tccagggtat ttctctgact	840
	gtcaltcga tactcccat cgtctcacc gataacagge gcgcgacac cagacgggag	900
	tgggatggtg ataaccacat cttcagttc taaattatct tctttagct catattctat	960
	gttgacatca cagccattc cactctcga gggccageaa ttaattgca gtggaataaa	1020
	agattcctct gtggtttgta gtctccactt tagcaccctt aegtactgt tgactggaaa	1080
	tgacttctct ggattctca ggccaattag agactctgca gtgaaaagtt ttttatccac	1140
	atttggatgg gtctgtagct gcaccctttt ctctctctca ttttccat gaagaagaat	1200
	tcggccatc ttgtcatctg agatcctaag catgatcatg ccatgcaact ccatattctg	1260
[0002]	taactctcgg tctctccac aggttaatgt tatctttct tcaatctca tatgtacact	1320
	ttccatatta atgggtggag catgcatttt ggttcttca gaagtactgt tgcccatact	1380
	agaggacatg atggtttcac ctccagattt taatttgctt acaaagttat ctacttctt	1440
	tcttttggct ccaagtttta aagccttctt ggggctgaa ggcttggctg gtgcagggtc	1500
	cacttttggc ttatcagttt caatgatgtt ctctgtgatc atggcagctg tctctctc	1560
	agatactgca gagctgcaa atccgcaaa tcttgggtct tttttgctt gtctctctg	1620
	atctcttggc gctgtttgta attcctttgc ttacgacgc atctcagct tagcttcacg	1680
	ttcttgagt cctctgacgg ctctgaacac ctctctctca tgagaatcca tttctgtgaa	1740
	ggtctctgat tgtccaagt taacattctc ccggtatccc agtgcgacaa tttcatcaaa	1800
	agcaaaaatc aaatcaaac agtctcaga tatttcatc tcttetaagg ctccgcaata	1860
	ttcagggatc actctlgaga agagcttag ggtctccaaa tcttetaaaa tgttctgtt	1920
	tttggtagtg atcagtacca tatacagttt ctccatagge tggtagacat atcttacct	1980
	ctctgttca acaaacgfat gttgttttcc agtgttcatg agctttggaa aagctgctaa	2040
	taagccctca atccgagttc ggtctattc cacaacctgt cgagaacaa tagcctttcc	2100
	tgtttttgtg cagaccctg ctgccaacag caccatttta tcatctctgt ctttataatc	2160
	agattggaaa tacaagtttt ctccacaga tgccaagatg atgtctactg gcagctctc	2220
	caaaactctg gctgtcact gcattgtcac tgtgtccaaa agcagcagcc gggagcgcac	2280
	caggatgca tgaccacccc ggaacacacc agccaggagc aacgltggg tglcttltt	2340
	atccgcaact ttgtctgacc tctcacaagg gtgcattccc aagaactca caatattacc	2400
	cacagctct tcaagtgtct tgatgtaga caaggtsac gtttctctct tctcaaatc	2460
	atccctacc tcatccagg ctgtctcga gttcagttc atgacctttt gaatgtgatc	2520
	agctacagta acttccagat ctccagcac atacteatcc tcatagctt cgtcatcagt	2580
	ctccccagtg gttggatcac agtctctgac agtgaacttc atcatgcagc tgaattgtca	2640

gcccacagct	gtggggtctt	ctttgggcag	tcccaccagt	gtgtagcagg	tcccgggctg	2700	
gttgtagggc	aggtccggg	caggcacgta	acagagcacc	tcataggcct	cagtgggctc	2760	
caatcgcact	gtgacattct	ccaaggctcg	gtcattgagt	gtgtttgtgc	agtcaaacctg	2820	
aaaaaccatg	tggttggatg	aggigtgttt	ggcgcagcgg	atgacatact	ccgtctctga	2880	
ctcgggtgagg	gccacgggct	caggcgagga	cttgaagagg	ggccccagac	cgcggaactc	2940	
tggcactgct	gccaactgct	ccctggaagat	ctcctgcctg	gtagctgcca	ctttctcagg	3000	
ctgtttgact	gcctgtgatg	gggtacttcc	tgttctctgc	tctgceatgg	gcgcctgagg	3060	
caggggcaca	gacttgaggt	caaaagggtt	ttctgatggt	tctagagtgt	actgctgcag	3120	
agcctctctc	agaccagga	tggacacagt	cagaccattt	aggatatagc	ctgcattaag	3180	
ggccttctgc	ttctgctcca	ggacatttag	gtagaagggt	gctcggctcc	ttacttcaat	3240	
gtcaicctcc	atcacacacc	tcttcagcaa	caccaagata	ctgggtaaca	tctcttcatt	3300	
ctgggctcca	aacttcgcca	gagcactcac	agcactgccc	cggacctctc	catgctccaa	3360	
gaccactcgg	ttatagatga	agcggatgta	ctttgaggga	ttgggtgctc	tgggcccctc	3420	
ctggcccagg	agatgtagaa	tacgggtggc	cagcactgtg	aactcgcagt	ccctcgatgaa	3480	
ctcgcacaga	lgtgacagcc	ctgtctctct	gcctctctgag	ttctcttcaa	tgatgctgat	3540	
gatgcagtc	acgatagcgc	gcttatactc	aaagccaccc	tcttcccgca	gcatggtgaa	3600	
cagggaagtc	ataaggacgg	cgtgtttgcg	aggatatttc	tgacacaggg	cactgatggc	3660	
ctggacaacc	accaccttga	attcatccga	gattctcgac	atgaaggagg	agatctgctt	3720	
catgaggcgg	tcatgctgc	tctcgtctcc	cgtcttaagg	agggctggtg	tggccagcgt	3780	
ggcaatgctg	cggtttgaat	ctgtgaccag	gttctccaga	tccagattac	aagctgtcac	3840	
agetgacgga	tgcttcatgg	caaccttatt	gagggtacga	acagcagcat	agcggagagc	3900	
agccttgggt	gagctgcaga	aaagctggag	caclgacaca	gccggggcca	gctcttgggc	3960	
[0003]	actgcagcct	ggcagattga	cgatggccga	ggcggcttca	tacaccacca	tctctgtctt	4020
gttgcgcaag	cagctctcga	tgaagtcaaa	cagtgggctg	tcacggctgc	catctctctc	4080	
ttccagetgc	ttgctggcca	cccgatcat	catgcagtag	gcaaagggag	acttaaggcc	4140	
atgccgtgtg	accttgcctg	tcactctatt	gacggctagg	cggctcattc	tacgcacatg	4200	
gtacaggagc	ccctagtgcg	ggctactggc	catgatgta	tcactggatg	ctgcctcctg	4260	
agcctcattc	accacagcct	tgaaccagtc	aaagctgcac	ttcagcaggt	gcaaggaaga	4320	
cacgagggca	gagctggaga	cactgggcac	cttgtccaca	atggcttgtt	tcctgtagcg	4380	
ctcaatagcc	tgcagcatgg	tgcctatcagt	gatctggcag	agggctcgca	cgccggggcc	4440	
ccggtagtgt	tctttttctc	cagctcatgtc	ttttgttagg	ctgctgggtg	caatgatgac	4500	
atcctctgca	atgcaagaca	tctccttgat	ggctcaagtag	cacatccgac	ggagtgtggg	4560	
atcattggac	tgaagagct	tggctcatggc	aaagaaggcc	tggctcctct	ccgtgtctcc	4620	
caggigtctc	ccctggttta	tgagataaag	aatcttgggt	aggatgtggg	cacanttccg	4680	
agggttgatg	ggagtttcat	taaatacacg	ggcctcctgg	agtaccgca	tcttctcaag	4740	
gtgctggaat	gggttggagc	ctccacctga	ctcctcctcc	ttcttctcga	attcttcaa	4800	
caatttgcga	tcctcctctt	tatagctcct	ctggaaatac	agattctcgc	gaaactgcag	4860	
aggactgate	cttaaaccaa	tcacatcttt	gccaatctct	gtcactgtgg	tgacctgca	4920	
gatttgacct	ttgaactcag	gggaatagca	ggccccactg	agtgacactt	ttcttactgg	4980	
ctttccacgg	tagatgggccc	gatatgatgc	agcacaaatg	tcaaagggtt	tgtgcatgtc	5040	
ataatfagc	tggtaggcat	ctgtgggatt	cttctcagag	gcagacagga	tttttggggt	5100	
ctgttgggccc	acctcagcct	tgggcccagag	ttctagtagg	cgccagca	aggtggcagc	5160	
tgtcttgaag	ttcttgcagc	tgaagaacag	attgaggctt	gtacgcagca	ccaggatcat	5220	
gtgcacagge	tgcaggtttg	agtgggtgaa	ataggetgccc	atctcagaga	tgccttctgt	5280	
ctgttctaga	gtctctttgg	gcagcttctt	ctttctctg	tccacggaca	aaccacaat	5340	



gtactcacgg caaatggtga tgagctgctg ggcctctgca atctcttgtt tattgtccac	5400
aacaagaagt ggcacactga gaaggatgga acggaatitt tccacagcct cctcaaattt	5460
gccaaactgtg gtgagctggt agcacagctg caaccgttgg atgaggatcat taagcttcag	5520
gcccacagct ggtacacccat tcttcagccc tgcatectte cagtttgcgat taggatagcc	5580
alacalggag gglaggecagg gcagagcctg ataggtttgg cggeecggg cglatgctg	5640
taggaacagt tgcctgtagg ggocaaactg gattaccctt acttggatcat gaaggagccg	5700
catggctggt tcgaaagagc ctgdcaggat gtgatcaact ggaagctgag agttattaca	5760
ccagatctga gttggacttg ttcccttggg tgggggcaca aagaaacctt cttcagcccc	5820
accagctgcc ccaggggata tatccagctc aggagggagc tccagatctt cttctacatc	5880
ccagccacct ccttcttctt gtcccttggc aagageatea tcccccaaac cttctgtagc	5940
ctccacaaac ccattctcat ccaactgcag ctctgcatcc tctccccage cctctgtacc	6000
aacagtgtca atgtcaatgt cagcagccag tgcctctccc ttccctttgc tggcaatggt	6060
gccttcaaaa aatcctttgg atacagtcaa faaaggccaa ttggtatcca atggcatgat	6120
agggtcaggt ggetggagca gcttggcatt agggtcaatg tctgggattg tctccttctc	6180
tgggtcaaat gctccttta ggetctcagc ttcttcaftt aagccatggg tagcagctgt	6240
gagatagccc agggacttct gtccacagtt cttcaggatc cgcacaogct ctgacacatc	6300
accaggtat agggcattct gatagtggcc actcatgtcc tttctgatct cagcaatctt	6360
catcatcttg cgaagttttt ctaagtgcc agigataaga tacaggaagg aaagttgtc	6420
aaagtttttg gtacgtgat agcacatttc cacaatctgg tggttccctt gcagcagggc	6480
cacttctccc agcttttccc agcagttctt gtcatecagt gctttggctg cttccagagc	6540
aatctcaatg ttccacact ccagtgccag actaaagcga gttttctcat ccttgacaaa	6600
atgcagtgcc acttcaggat agcccttctt ctggagataa gcaataatag actggccaac	6660
[0004] tagtttggca ttccctacca tgtgcagtae ctcatcatat tttctgttga tcagggccag	6720
cttgaatttg aactcagttg gatcaatggt gactaccctg ggacgacact ccctgtctag	6780
gcagtataca ttgttgcctt tcaccctgtt gacatagatg ggtaaatcca gagtctgaat	6840
gatcccgttg tcccagttg tgacagcata ttgatgtgg ttgcttggg tatagataaa	6900
taccccactc tcatccagg ccccactctt gacacgaatg ttctcatgaa tgttacataa	6960
agcatccagt ttgggttac agatcacaat ggctgtaaga ggcaaagggc atgagtgttc	7020
glgtttggct agtagtgctc catgtgacat gctctctgac cagalaacgt atttcacltt	7080
agaaatcttc acagatgcca gagtccgctt ctgctgtacg tcaaagagtg tgatagagtc	7140
cgcattctga agcaggagat tgcctgtgcc agcatagaag atctcatcac agtttggcac	7200
ctgtaccctt ttggtgatct cattcttcag attcttgatc agaagcgaat gcatccgatc	7260
taggacagca aaccgatttc gagegaccca aacggctgtc aggcctgagg atcgtttccc	7320
ttcaggcga tcaggattct gggagtcagc atctttaggg atggtgtaca ggtcataggt	7380
actattctct agattgetag ctcttgtaca aagcaggact gcattttctg ctggattgta	7440
tgacatattg aatactggaa acttgaacc actcccacac tgcatecag ctacatcttt	7500
ggagctgttg aaatccagct gtogtaagaa toggctcctg acatagtgtg gcatattgcc	7560
atgaacagca taggctggcc gttcccgttc cagcttaaac acaatcatac caccatcatg	7620
gectgtgca aagaggttaa ggttagggtg agcagctagg acccagaaac gateatggtc	7680
tctgcgaaa gctgtaacce cagtccgctt agacafatcc cagactcgaa tactcttgtc	7740
ctcagaattg ctgaggatca actcttggcg aggggtgaag acggcacaag atacattgtt	7800
gtaattggccc eggcaggat caacctccca tgcctttgat tcaatcarg gccagatctt	7860
cacttgacga tcatctgccc cagatacaat aaggggcata gtgggttga aggcagccca	7920
gtttactcca cgategtgac cctctagtae atgcttccac actgcatctg tagttccaaa	7980
tagatcaacc ccagttattc ctctcacatc cgattccacc gcaccagggg acaggttttt	8040

	tttctcaga ccgaaatat cccaaacgcg cacagctctgg tccagcttgg ctgatactac	8100
	caagtcttct glggggigga actgagcaca calcacataa tggtligicc cigtlaacac	8160
	acaaacacag gttctagatt gccagttcca cactcggatg gtctgatcat cggaggcact	8220
	cagaatccag ggatattcat gatgaaaaa cgtggtgcga atataatcta agtgcccaag	8280
	caatgtgaaa agacacgcgc gaagcttgta attccaaacc ttaattctat agtcatctcc	8340
	tcagagacg aacagtggct gctgcttatg gaagtcfaat cctcgcactg gaccatcatg	8400
	ttcatcaaac ttgtcaatga gagtgcacat ccgatagtcc cataactgga tgaecceatt	8460
	atgtaaaacta gtcaggatcc aaggctcttt ggggtgaaag ctgagccctt tgaccgcgcg	8520
	gctcttggtc tcgaatttgg ttaacatctt atcgtctgca tccctttagt ctgactggaa	8580
	gtacaggttt tctcagatt gegagtacac caattcattc atgagttgag tcgcttctct	8640
	aactggctga naaggctctt caggttcac catgaaaact ttatggcccc cccacaatac	8700
	tgagtcagca ttaatcgcc aaccactaac ccactgctgc gccctcigat ttgtcaacaa	8760
	ttccatgaag tttttcgca cgtttgtgaa ataattgttt gtttgggga aattcgatgc	8820
	tgagtgtata ccaacaatga acccatctct agttgatact aatggactgc cacactgccc	8880
	atccttgggt tgaatccaat gcttccagaa tatgccatca gatgaaggga atgtcaact	8940
	agtgtctgac accatgctag acatgctctt agtttggaa gttggttgc caagacatac	9000
	gcgctcttcc ctttgtggct ctctaaattt cagcttttga ggaaatggtg ggaaatcctt	9060
	aggcatgca ataattatca tctccctccc atcaatgagg tgtttgtgca aagtcgtggt	9120
	gttcttgacc ttgaatcac catgtagtga ttggaccaac agtttccat talttctct	9180
	aaacaagtgc ttgtttgtaa tgatgaaggg accaaatcca ataccataca acgatgttgt	9240
	gtgccatca gattcattcg tcaaatgaca aatggtgctc gatatcgggt tgtaatcaag	9300
	cgccccctta aacaagcttt ctccgaattc ggcgtagtea ggcacgtcgt aaggataagc	9360
[0005]	catgatecgt ttaattgtg taatttatgt agctgtaatt ttaccttat taatatcttt	9420
	tacgcttgc attcgacgac tgaactccg atatacagaa cctattaata ttccggagta	9480
	tacggacctt taattcaacc caacacaata tattatagtt aaataagaat tattatcaaa	9540
	tcatttgiat attaatlaaa atactatact glaaattaca ttttatttac aatcactcga	9600
	catggcctgg agccatcgc aatttgaaa aggtggcggg tccggcggag gtagcggcgg	9660
	aggtcttgg tctcaccctc agttcgagaa ggatgacgat gataaaatga cggcgctga	9720
	gaacgtatgc tacacgttaa ttaacgtgcc aatggattca gaaccaccat ctgaaattag	9780
	cttaaaaaat gatctagaaa aaggagatgt aaagtcaaag actgaagctt tgaagaaagt	9840
	aatcattatg attctgaatg gtgaaaaact tcttggactt ctgatgacca tcattcgttt	9900
	tgtctacct ctccaggac aactatcaa gaaattactt ctggtatttt gggaaattgt	9960
	tcctaaaaa actccagatg ggagactttt acatgagatg atccttgtat gtgatgcata	10020
	cagaaaggat ctcaacatc ctaatgaatt tattcgagga tctactcttc gtttctttg	10080
	caaatgaaa gaagcagaat tcttagaacc ttaaatgcca gctattcgtg catgtttgga	10140
	gcatcgacac agctalglia gaagaaatgc tgtttlgccc atctatacca tctatagaaa	10200
	ttttgaacat ctataccctg atgctctgca actgatacat gattttctgg tgaatgagaa	10260
	ggatgcaagt tgcanaagga atgcatttat gatgctaat catgcagatc aggatcagc	10320
	tttgattac ttaagtactt gcattgatca agttcaasca tttgagaca ttctgcagct	10380
	ggttattgtt gaactgattt ataaggctctg tcatgctaat ccatcagaaa gagctcgttt	10440
	tattcctgc atctataact tattacagtc atccagccct gctgtaaaat atgaagctgc	10500
	tgggacatta gtgacactc ctagtgcacc aactgcaate aaggetgctg ctcaagtgtt	10560
	catgattta attattaagg agagcgacaa caatglaaaa ctcalagttt tggatcgctt	10620
	gatagaatta aaagagcacc ctgctcatga acgagtacta caggatctgg ttatggatat	10680
	cctaagagta ttgagcacac cagacttaga agtacgaaag aaaactctgc agttagcact	10740

	ggatcttgc tctctagaa atgttgaaga gctggitatt gtcctgaaga aggaagtgat	10800
	aaaaacaaat aatgtgtctg agcatgaaga tactgacaaa tacagacaac tcctagtgcg	10860
	aacattgcatt tccgtttctg tccgatttcc agataatggt gcaaatgtta ttccgtgttt	10920
	aatggaattt ctacagtaca acaacgaagc agcagctgct gatgtcttgg agtttcttcg	10980
	tgaagccatt cagcgtttg ataacctgag aatgcttatt gttgagaaga tgccttgaagt	11040
	cttctatgct attaaatctg tcaagattia ccgaggagca ttatggatcc tgggagaata	11100
	ctgtagtacc aaggaagaca ttcagagtgt gatgactgag atccgcaggt cccttggaga	11160
	gatcccaatt giagagtcag aaataaagaa agaagctggt gaattaaaac ctgaagaaga	11220
	aafaactgta gggccagtcc agaaattggt tactgaaatg ggtacctatg caactcagag	11280
	tgcctttagc agttctagac ccaccaagaa agaggaagac agacctccct tgagaggatt	11340
	ccctctggat ggagatttct ttgttctgc ctcccttccc acaactctga ccaagattgc	11400
	attgcctat gtactcttgg ttcaggagaa gaaaaagcaa aattcttttg ttgtctgaggc	11460
	tatgttgcct atggctacta tccctgattt gggaaaatcc tctcttccca agaagccaat	11520
	tactgatgat gatgtggatc gaatttccct gtgcctcaag gtcttctctg aatgttccac	11580
	ttlaatgaal gacattttca ataaggaaatg cagacagtcc ctllctcaca tglilatctg	11640
	taactagaa gaagagaaat tatcccaaaa gaaagaatct gaaaagagga atgtgacagt	11700
	acagcctgat gacccattt ccttcatgca actaactgct aagaatgaaa tgaactgcaa	11760
	ggaagatcag tttcagctga gtttactggc agcaatgggt aacacacaga ggaaagaggc	11820
	agcagatccc ctgactctca aacttaacaa ggctaccocaa ttgacaggtt tctcagatcc	11880
	tgtatatgca gaagcttacg ttcattgcaa ccaatatgat attgtcttgg atgtacttgt	11940
	tgtgaaccaa accagtgata ctttgcagaa ttgcacatta gaactagcta cactagggga	12000
	tcgaaaactt gggaaaagc cgtctcttll gactcttggc cctcatgact tgcgaaalat	12060
[0006]	taaagctaac gtcaaagtag catcaacaga aaatggaata atttttggt atatagttta	12120
	tgatgtctct ggagcagcaa gtgacagaaa ttgtgtgggt ctacagtata ttcacatgca	12180
	catcatggac tatatccagc ctgcaacttg cactgatgca gaattccgct agatgtgggc	12240
	cgaatttgaa tgggaaaaca aagtgacagt taacaaccaac atggttgatt taaatgacta	12300
	cttacagcac atattaagt caaccaatat gaaatgctg actccagaaa aggcccttcc	12360
	tggttactgt ggetttatgg cagccaacct ttatgtctgt tccatatttg gtgaagatgc	12420
	acttgcfaat gtcagcattg agaagccaat tcaccagggc ccagatgctg ctgttaccgg	12480
	ccatataaga attcgtgcaa agagccaggg aatggcctta agtcctggag ataaaaatca	12540
	cttgcacag aagaaaacta gtatagaaaa cctgtacttc cagtcagagc agaaactcat	12600
	ctcagaagag gatctgatgc ctctgcgact tgatatcaaa agaaagctaa ctgctagatc	12660
	tgatcgagtt aagagtgtgg atctgcatcc tacagagcca tggatgttgg caagcttcta	12720
	caatggcagt gtgtgtgttt ggaatcatga aacacagaca ctggtgaaga catttgaagt	12780
	atgtgatctt cctgttcgag ctgcaaagtt tgttgcagg aagaattggg ttgtgacagg	12840
	agcggatgac atgcagatta gagtgttcaa ttacaatact ctggagagag ttcatatgtt	12900
	tgaagcacac tcagactaca ttogctgtat tgccttctat ccaacccegc ctttcttct	12960
	aactagcagt gatgacatgc ttattaagct ctgggactgg gataaaaaat ggtcttgcct	13020
	acaagtgtll gaaggacaca cccallatgt taigcagall glgatcaacc ccaaagataa	13080
	caatcagttt gccagtgctt ctttggacag gactatcaag gtgtggcagt tgggctcttc	13140
	gtcaccnaac ttacttttgg aaggacatga gaaaggcgtg aattgcattg attactacag	13200
	tggttgggac aagccatacc tcatttcagg tgcagatgac cgtcttctta aaatatggga	13260
	ttatcagaat aaaacatgtg tgcagacact ggaaggacat gcccnaaatg tgtcttctgc	13320
	cagctttcat cctgagttgc caatcattat cacaggttca gaagatggaa cagtacgtat	13380
	ttggcattca agcaccctacc ggcttgagag cacactgaat tatggaatgg agagggtatg	13440

	gtgcgtggcc agtctaagag ggtcaaacaa tgtcgctttg ggctatgatg aagggagcat	13500
	cattgttaag cttggctggg aggaacctgc catgtccatg gatgccaatg gaaagataat	13560
	ttgggccaag caticagaag tccagcagge caacctaaaa gcaatgggag atgctgaaat	13620
	taaagatggt gaaagattgc cactggcagt aaaggatatg ggcagttgtg aaatataccc	13680
	tcagactatt cagcacaatc ctaatgggcg gtttgtggtg gtgtgtggtg atggggagta	13740
	tatcatctac acagcaatgg cattgagaaa caagagcttt ggatctgctc aggagtttgc	13800
	atgggcccac gatttctcag agtatgcaat aagagagagc aacagcattg taaagatatt	13860
	taagaacitt aaggaaaaaa aatcatttaa accagatttt ggagcagaaa gstatciacgg	13920
	cggettctta ttgggagtca gatctgtaa ttgcttagcc ttctatgact gggacaatac	13980
	agaactcata cgaagaatig aaatteagcc caaacatatt ttctggctcg actctggaga	14040
	gctagtctgt attgctaact aggaatcatt ttttatcctt aagtatctgt cagaaaaagt	14100
	cttggctgca caggaaacac atgagggagt tactgaagat ggcattgaag atgaccttga	14160
	ggttcttggg gagattcagg aaattgtgaa aacagggctt tgggtaggcg attgcttcat	14220
	ttacacaagt tctgtgaaca gattaaatta ttatgttga ggagaaatag tcaccattgc	14280
	ccactlggac aggacgatgt atctctagg ctacalictt aaagacaaca ggccttatct	14340
	gggggataaa gaattgaaca tcattagcta ttccctgctg gtttcagtc tggaaatacca	14400
	gacagetgic atgctggagg acctttagcat ggctgataag gtccttcccta ccattccaaa	14460
	agaacagagg accagagtig cacacttttt ggaaaagcag ggcctcaagc ageaagetct	14520
	tacagtatcc acagatctcg agcatcgttt tgagcttgcct ctteagcttg gagagttaa	14580
	aatgcatcac cagtttagcag tggaaagcaga gtcagaacag aagtggaaac aactttgctga	14640
	acttgccatt agtaaatgic agtttggcct agcccaggag tgcctgcac atgcacagga	14700
	llatgggggc ctgcctcttt tggccactgc ctctggaaat gclaatatgg tgaacaagct	14760
[0007]	agcagagggg cgggagagag atggcaaaaa taatgtggca ttcatgagct actttttaca	14820
	ggccaagggt gatgcctgcc tagagctctt aattagaact ggaccgctgc cagaagctgc	14880
	cttcttggcc cgaacttact taccagtca ggtttcaagg gtagtgaaac tctggagaga	14940
	gaatctctca aaagtcaatc agaaagcagc agaatecctt gctgacccaa cagagtatga	15000
	aaacctgttc cctggattaa aagaagcctt tgttgttga gaatgggtga aggaacaca	15060
	tgtgatctg ttggccagcca aacaataccc acttgtcag ccaaatgaag agagaaatgt	15120
	catggaagag gaaaaagact ttcagcctc aagatctaca gctcaacagg aacttgatgg	15180
	gaaacctgct tctctactc cgttatigt ggcctccac acagccaaca aagaagaaaa	15240
	gagtttactc gaactagaag tagatttga taatttggaa ttagaagata ttgacacaac	15300
	agatateaat ctggatgaag atattttga tgatgaaaat ttgtatitc aaagcatta	15360
	caaaagcgt gaagacaaga ttggcctcc ggcctccggc cggcctcccg gcgctccgg	15420
	ggaggtagac gagctgttc acgtaaagaa cgcctctac atcggcagct accagcagt	15480
	cataaacgag ggcagcggg tgaagctatc aagcccagag agagacgtgg agagggagct	15540
	cttctgtat agagcgtacc ttggcagag gaagtctgg gtgtctctgg atgagatcaa	15600
	gcccctctcg gccctgagc tccagccgt gcgcatgtt gctgactacc tgcaccaaga	15660
	gagctggagg gacagcatcg ttggcagct ggaccgagag atgagcagga gcgtggacgt	15720
	gaccaacacc accttctgc tcatggcgc ctccatctat ctccagacc agaaccggga	15780
	tgcgccttg ctgtcctgc accaggggga cagcctggag tgcacagcea tgacagtgc	15840
	gatctgtct aagctggacc gctggacct cgcctggag gagctgaaga gaatgcagga	15900
	cttggacgag gatgccaacc tcaccagct cgcctctgc ttggctcagc ttggccaggg	15960
	ttgtgagaag ctgcaggatg cctactacat ctccagag atggctgaca agtgcctgce	16020
	cacctgtct ctgctcaatg ggcagcggc ctgccacatg gccagggcc gctgggaggg	16080
	cgctgagggc ctgctgcagg aggcctaga caaggatagt ggctaccag agacgctggt	16140

caacctcacc	gacctgtccc	agcaacctggg	caagccccct	gaggtgacaa	accgatacct	16200
glcccagcig	aaggatgccc	acaggcccac	ccccccacc	aaggagacc	aggccaagga	16260
gaacgacitti	gacaggttgg	tgctacagta	cgctcccage	gccgagaact	tgtactttca	16320
gagt						16324
<210>	3					
<211>	22590					
<212>	DNA					
<213>	人工序列					
<220>						
<223>						
<400>	3					
ttctctgtca	cagaatgaaa	atftttctgt	catctcttcc	ttattaatgt	ttgtaattga	60
ctgaatatca	acgcttattt	gcagccfgaa	tgccgaatgg	gacgcgccct	gtagcggcgc	120
attaagcgcg	gccgggtgtg	tggttaccgc	cagcgtgacc	gctacacttg	ccagcgcctt	180
agcgcgccct	cccttcgctt	tcttcccttc	ctttctcgcc	acgttcgcgc	gctttcccgc	240
tcaagctcta	aatcgggggc	cccccttagg	gttccgattt	agtgccttac	ggcacctcga	300
ccccaaaaaa	cttgatttag	gtgatgttcc	acgtatgtgg	ccatcgcctt	gatagacggt	360
tttctgcctt	ttgacgttgg	agtcacgttt	cttttaatagt	ggactcttct	tccaaactgg	420
aacaacactc	aacctatctt	cggtctattc	ttttgattta	taagggattt	tgccgatttc	480
ggcctatttg	ttaaaaaatg	agetgattta	acaaaaattt	aacgcgaatt	ttacaaaaat	540
attaacgctt	acaatttagg	tggcactttt	cggggaaatg	tgcgcggaac	ccctattttg	600
ttatftttct	aaatacattc	aaatattgat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	660
cttcaatact	attgaaaaag	gaagagtatg	agtattcaac	atttccgtgt	cgcccttatt	720
ccctfttttg	cgccattttg	cttctctgtt	tttgcctacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	780
aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	glgggttaca	tccaacttga	ctcacaacgc	840
ggtgaagatc	ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cacttttaaa	900
gttctgctat	gtggcgcggt	attatccctg	attgaecgcg	ggcaagagca	actcggctgc	960
cgcatacact	attctcagaa	tgacttgggt	gagtactcac	cagtcacaga	aaagcatctt	1020
acggatggca	tgacagtaag	agaattatgc	agtgetgcca	taacctgag	tgataacaat	1080
gcccgaactt	tacttctgac	aacgatcgga	ggaccgaagg	agctaaccgc	ttttttgcac	1140
aacatggggg	atcatgtaac	tcgcttgat	cgttgggaac	cgagctgaa	tgaagccata	1200
ccaaaagcag	agcgtgacac	cacgatccct	gtagcaatgg	caacaacgtt	gcgcaaaacta	1260
ttaactggcg	aactacttac	tctagcttcc	cggcaacaat	taatagactg	gatggaggcg	1320
gataaagttg	caggaccact	ctcgcctcgc	gcccctccgg	ctggctggtt	tattgctgat	1380
aaatctggag	ccggtgagcg	tgggtctcgc	ggtatcattg	cagcactggg	gccagatggt	1440
aagccctccc	gtatcgtagt	tatctacacg	acggggagtc	aggcaactat	ggatgaacga	1500
aatagacaga	tcgctgagat	aggtgcctca	ctgattaagc	attgttaact	gtcagaccaa	1560
gttactctat	atatacttta	gattgattta	aaacttcat	tttaatttaa	aaggatctag	1620
gtgaagatcc	tttttgataa	tctcatgacc	aaaatccctt	aacgtgagtt	ttcgttccac	1680
tgagcgtcag	accccgtaga	aaagatcaaa	ggatctctct	gagatctttt	ttttctgcgc	1740
gtaactctgt	gcttgcacac	aaaaaaacca	ccgctaccag	cggtggtttg	tttgcgggat	1800
caagagctac	caactctttt	tcogaaggta	actggcttca	gcagagcgca	gataccaaat	1860
actgtctctc	tagtgtagcc	gtagttagcc	caccacttca	agaactctgt	agcaccgcct	1920
acatacctcg	ctctgctaata	ccgtttacca	gtggetgctg	ccagtggcga	taagtcgtgt	1980

[0008]

	cttaccgggl tggactcaag acgatagtta ccggalaagg cgcagcggtc gggcigaacg	2040
	gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acacogaact gagatacct	2100
	cagcgtgagc attgagaaag cggcacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg	2160
	gtaagcggca gggcgggaac aggagagcgc acgagggagc ticcaggggg aaacgcctgg	2220
	tatctttata gtctgtogg gtttcgccac ctctgacttg agegtcgatt tttgtgatgc	2280
	tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg	2340
	gccttttgcg ggccttttgc tcacatgttc ttctctgctg tatccctga ttctgtgat	2400
	aaccgtatta ccgcclltga glgagctgat accgcctgccc gcagccgaac gaccgagcgc	2460
	agcagtcag tgagcagga agcgggaagc gcctgatgc ggtattttct ccttacgcat	2520
	ctgtcgggta tttcacaccg catagaccag ccgcgtaacc tggcaaaatc ggttacggtt	2580
	gagtaataaa tggatgccct gcgtaagcgg gtgtggcggg acaataaagt cttaactga	2640
	acaaaataga tctaaactat gacaataaag tcttaacta gacagaatag ttgtaactg	2700
	aaatcagtc agttatgctg tgaanaagca tactggactt ttgttatgge taaagcaaac	2760
	tcctcatitt ctgaagtgea aattgccctg cgtattaaag aggggcgtgg ccaaggcat	2820
	ggtaaaagct atattccggc cgttgtgaca atttaccgaa caactccgcg gccgggaagc	2880
	cgatctcggc ttgaacgaat tgttaggtgg cggtaacttg gtcgatatca aagtgatea	2940
	cttctcccg tatgcccaac tttgtataga gagccactgc gggatcgtca ccgtaactg	3000
	cttgcacgta gatcadataa gcaccaagcg cgttggccic algctlgagg agatlgatga	3060
	gcgcggtggc aatgccctgc ctccggtgct cgcgggagac tgcgagatca tagatataga	3120
	tctactacg cggctgctca aacttgggca gaacgtaagc cgcgagagcg ccaacaaccg	3180
	cttcttggtc gaaggeagca agcgcgatga atgtctact accggacaag ttcccgaggt	3240
	aatcggagtc cggctgatgt tgggagtagg tggctacgtc tccgaactca cgaccgaaaa	3300
[0009]	gatcaagagc agcccgatg gatttgactt ggtcagggcc gagectacat gtgcgaatga	3360
	tgccatact tgagccacct aactttgttt tagggcgact gccctgctgc gtaacatcgt	3420
	tgtgtctgcg taacatcgtt gctgctccat aacataaac atcgaccac ggcgtaacgc	3480
	gcttctctgt tggatgcccg aggcatagac tgtacaaaaa aacagtcata acaagccatg	3540
	aaaaccgcca ctgcgcgctt accaaccctg cgttcggtea aggttctgga ccagttgctg	3600
	gagcgcatac gtaacttgea ttacagtta cgaaccgaac aggettatgt caactgggtt	3660
	cgtgccttca tccgtttcca cgggtgtcgt caccggcaa ccttgggcag cagcgaagtc	3720
	gaggcatttc tgcctggct ggogaacgag cgaaggttt cggctctcac gcctcgtcag	3780
	gcattggcgg ccttgcgtt ctctacgce aaggtgctgt gcacggatct gcccttgett	3840
	caggagatcg glagacctg gcctcgcgg cgttgcggg tggctcagac ccggatgaa	3900
	gtggttcgca tctctggttt tctggaagge gagcctcgtt tgttcgccc ggaacttagc	3960
	tatagtteta gtggttggct acgtaccctg agtggctatg gcaggccttg ccgcccagc	4020
	gttggctcgc agccctgggc cttcaccga acttgggggt tgggtggggg aaaaggaaga	4080
	aacgcgggog tattggctcc aatggggtct cgggtgggta tgcacagagt gccagccctg	4140
	ggaccgaacc ccgcgtttat gaacaaaaga ccaacaccc gtgcgtttta ttctgtctti	4200
	ttatigccgt catagecgg gttccttccg gtattgtctc cttecggtt tcagttagcc	4260
	tcceccatct ccgggtacct tagtcagtta ctgttacagc tctccatgc cgcgggtgga	4320
	gtggcggccc tggcgcgctt cgtactgttc cactatggtg tagtctcgt tgtgggaggt	4380
	gatgtccaac ttgatgttga cgtttaggac gccgggcagc tgcacggct tcttggcctt	4440
	glaggtggtc ttgaactcag cgtcgtatg gccgcgtcc ttcagcttca gccctcgtt	4500
	gatctcggcc ttcagggcgc cgtcctcggg gtacatccgc toggaggagg cctcccagcc	4560
	catggctctt ttctgcatta cggggccgct ggaggggaag ttgggtccgc gcagcttcc	4620
	ctttagatg aactcgcctt cctgcagga ggagtcctgg gtcacggtea ccacgccgc	4680

gtctcgaag	ttcatcacgc	gtcccactt	gaagcctcg	gggaaggaca	gcttcaagta	4740	
gtcggggatg	tcggcgggt	gcttcacgta	ggccllgag	cogtacaiga	acigagggga	4800	
caggatgtcc	caggcgaagg	gcagggggcc	acccttggtc	accttcaget	tggeggctg	4860	
ggtgccctcg	tagggggcgc	cctcgcctc	gccctcgatc	tcgaactcgt	ggccgttcac	4920	
ggagccctcc	atgtgcacct	tgaagcgcct	gaactccttg	atgatggcca	tgttatectc	4980	
ctcgcccttg	ctcaccattg	actggaata	taagttctcc	cgaaggagtg	accacttgat	5040	
ctgttctttg	getgaactga	gcacctgaga	cacggctctg	tcctgaaggg	ggacatcttc	5100	
accctttaat	gccaccggg	gtaccacctg	ctggggatca	ctctctagga	tcaccctccc	5160	
atctacaatt	tcattccacag	ccaagaacag	ccccctcatg	ttctccagca	gtgctcgett	5220	
ttctacattt	ttcctcagca	tctggctcaa	tgagtccaag	agacagtcca	gaacagccat	5280	
aagcatcage	tcattttcat	aggagctgcc	aatcacatag	aaatagagat	ctatactgct	5340	
ttgtataacc	actgcaggc	cttccaagag	ggcaallcca	ctgtcagccc	gatgggtctt	5400	
gttgaanaatg	ttctttctca	aggccttttg	ctccttgaca	ctggggtagg	tgtctgcata	5460	
gtacttggca	aaaagtcgat	ctccatcatt	gtccagaatc	aggatggctt	tgacagtata	5520	
caggaaggt	tccaaaatca	ggcctccat	caagtctctc	tcgctaatca	acttttgcctc	5580	
ggattgaaaag	tataaattct	ccagaatttc	atacttctcc	actaggaaaag	tggtctctgt	5640	
ggaaaacctg	acggggctgt	ttccatctac	ctgggtcact	ttggtaacct	gtatgttaca	5700	
gtaatttttc	ttggagacaa	aggaaacttg	aacagggag	aagtcattgg	gctgccaccg	5760	
aatgclaaac	tcaggctgc	cactcttatt	ttggcctcca	atccacagca	ggcaccctc	5820	
cagggatatt	cgtcgaactg	catgtcgata	ctccccatcg	atctcaccga	taacaggcgc	5880	
gcccacacca	gaocgggagtg	ggatgggtgat	aaccacatca	ttcagttctc	aatttatcttc	5940	
ttgtagctca	tattctatgt	tgacatcaca	gccatttcca	ctctccgagg	gccagcaatt	6000	
[0010]	aattgtcagt	ggaataaaag	attctctctg	ggtttgtagt	ctccacttta	gcaccctcac	6060
	gtcactgttg	actggaatg	actctctctg	attcttcagg	ccaattagag	actctgcagt	6120
	gaaaagtttt	ttatccacat	ttggatgggt	ctgtagctgc	accctttctc	tatcttcatt	6180
	ttccacatga	agacgaattc	ggccatcatt	glcactcgag	atcccaagca	tgatcatgcc	6240
	atgcaactcc	atattctgta	atctctcgtc	tcgtccacag	gtaaatgita	tcctttcttc	6300
	aatcttcaata	tgtaacattt	ccatattaat	gggtggagca	tgcattttgg	ttgettccaga	6360
	agtacgcttg	ccatactag	aggacatgat	ggtttcacct	tcagatttta	atctgtccac	6420
	aaagtattct	acttcccttc	ctttggetcc	aagttttaaa	gccttgcctg	ggcctgaagg	6480
	cttggetggt	gcaggtgcca	cttttggttt	atcagttcca	atgatggctc	ctgtgateat	6540
	ggcagctgtg	ctgcctccag	atactgcaga	gctgccaaat	ccgccaaate	ctgggtcttt	6600
	tttgccctgt	ctctctgcat	ctcttcgggc	ctgtttgtaat	tcctttgett	taagagcctc	6660
	ctcagcctta	gcttcaagtt	cttgagctc	tcagacgct	ctgaacacct	ctctctcatg	6720
	agaatccatt	tcgtggaagg	ttctgatctg	tgccaagtta	acattctccc	ggatcccacg	6780
	tgcaacaall	tcattcaaaag	caaaaalcaa	atcaaaaacag	tgctcagata	ttctattctc	6840
	ttetaaggct	cggcaatatt	cagggatcac	tcttgagaag	agccttaggg	tcctccaaatc	6900
	ttctaaaatg	ttgctgtttt	tggtagtgat	cagtaaccata	tacagtttct	ccataggctg	6960
	gtagacatat	cttacactct	ctgtttcaac	aaacgtatgt	tgttttccag	tgttcatgag	7020
	ctttggaaaa	getgctaata	agccctcaat	ccgagttcgg	gtcattttcca	caaactgtcc	7080
	agaacaata	gcctttctctg	cttttctgca	gaccgctgct	gccaacagca	ccattttatc	7140
	atcgtctctc	ttataatcag	attggaata	caagttttct	cccacagatg	ccaagatgat	7200
	gtctactggc	agctctctca	aaattctggc	tgtaacctgc	attgtcactg	tgctcaaaaag	7260
	cagcagccgg	gagcgcacca	ggatgtcatg	accaccocgg	aacacaccag	ccaggagcaa	7320
	cgtgtgggtg	ttcttgttat	ccggcacttt	gtctgacctc	tcacaagggt	gcattcccac	7380

gaacttcaca atattacceca cagcctcttc aagtgtcttg atggtagaca aggtgaacgt	7440
ttctctcttc tcaaattcat cccctacctc atcccagget gettegaagt tcagtttcat	7500
gaccttttga aigtgatcag ctacagtaac ttccagatct tccagcaccat acctcctctc	7560
atagccttcg tcatcagtct ccccagtggg gggatcacag tccttgacag tgaacttcat	7620
catgcagctg aatgtgcagg ccacagctgt ggggtcttct ttgggcagtg ccaccagtgt	7680
gtagcaggtc cgggctggt ttagggcag gctccgggca ggcaagtaac agagcacctc	7740
ataggcctca gtgggtcca tetgcactgt gacattctcc aaggtctggt cattgagtgt	7800
gtttgtgcag tcaaaactgaa aaacctatgt gttggigaag gtgtgttttg tgcagcggat	7860
gacatactcc gtctctgact cggtaggggc caggggctca ggccaggact tgaagagggg	7920
cccaagaccg cggaaactctg gcaactgtgc caactgetcc tggaagatct cctgcctggt	7980
agctgccact ttctcaggt gtttgactgc tgtgatgggg gtactttctg ttctctgctc	8040
tgccatgggc gccgtggcca ggggcacaga ettgaggtca aaaggttttt ctgatggttc	8100
tagagtgtac tctgcagag cctctctcag accaggatg gacacagtca gaccatttag	8160
gatatagect gcattaaggc cctctctctt ctgctccagg acatttaggt agaagggtgc	8220
tcggctccctt acttcattgt catcatccat cacacacctc ttccagcaaca ccaagatact	8280
gggtaacate tcttcattct gggtctcaaa ctctgccaga gcactcacag cacttgcctg	8340
gacctctca tgcctcaaga ccactcgggt atagatgaag cggatgtact ttgagggatt	8400
ggtggtcttg ggcctctct ggcccaggag atgtagaata cgggtggcca gcactgtgaa	8460
ctcgcagctc tcgatgaact cgcacagatg tgacagccct gtctccttgc tctctgagtt	8520
ctcttcaalg atgtatgaa tgcagtcac gatagcgcgc ttacttcaa agccacctc	8580
ttcccgcage atggtgaaca ggaagttcat aaggacggcg tgtttgcgag gatatttctg	8640
acacagggca ctgatggcct ggacaaccac cacttgaat tcctccgaga ttcttgacat	8700
[0011] gaaggaggag atctgetca ttaggcggtc gatctctc tccttgcctc tcttaaggag	8760
ggtggtgatg gccagcgtgg caatgetgct gtttgaatct gtgaccaggt tctccagatc	8820
cagattacaa gctgteacag ctgacggatg ctctatggca acctattga gggtaacgac	8880
agcagcatag cggagagcag ccttgggtga gctgcagaaa agctggagca ctgacacagc	8940
cggggccagc tctttggcac tgcagcctgg cagattgacg atggccgagg cggttcata	9000
caccaccate tctgtcttgt tgcgcaagca gctctcagtg aagtcacaca glgggctgtc	9060
acggtgcca tctctctctt ccagctgctt gctggccacc cggatcatca tgcagtaggc	9120
aaaggagac ttaaggccat gccgtgtgac ctgtctgate atcttattga cggctaggcg	9180
gtcattctta cgcacatggt acaggagccc tagtgcgtgg tactggacca tgatgtatc	9240
actggatgct gcctctgag cctcattcac ccagccttg accacgtca agctgcactt	9300
cagcaggtgc aaggaagaca cgagggcaga gctggagaca ctgggcacct tctccacaat	9360
ggcttgttc atgtagcct caatagcctg cagcatggtg ctatcagtga tctggcagag	9420
ggctcgcag gccgggcccc ggtagtgtc ttctttccca gtcattgtct ttgttaggct	9480
gtgggtgaca atgatgacat cctctgcaat gcaagacatc tctttgatgg tcaagtagca	9540
catccgacgg agtgtgggat cattggactg aaagagcttg gtcattggca agaaggcctc	9600
ggtccttcc gtggctccca ggtgctcccc ctggtttatg agataaagaa tcttggtag	9660
gatgtgggca cattctcgag gttgatggg agtttcatta aatacacggg cctctggag	9720
taaccacctc ttctcaaggt gctggaatgg gttggagcct ccacctgact cctcactctt	9780
cttctegaat ttctcaaca ttgtctcacc atcactctta tagtctctt ggaaafacag	9840
attctctata ctgattttct tetgtgacaa gttgatitaa tctcaagac ttaaggccat	9900
tccttggtc ttgcaagaa ttcttatatg gccgtaaca gcagcatctg gtcctgggtg	9960
aattggctc tcaatgctga catttgcag tgcacttca ccaaatatgg aacgagcata	10020
aaggttggct gccataaagc cacagtaacc agaaagggcc tttctggag tcaggcattt	10080



	catattggtt gactttaata tigtctgtaa gtatgcattt aaatcaacca tgttgggttt	10140
	aactgtcaact ttgttttccc attcaaattc ggcccacatc tgacggaatt ctgcatcagt	10200
	gcaagtttga ggcctggatc agtccatgat gtctgatgta atatcaactga gaaccacaca	10260
	atttctgtca ctgtctgtct cagagacatc ataaactata ttaccaaaaa ttattccatt	10320
	ttctgttgat gctactttga cgttagcttt aatatttgcg aagtcatgag gagcaagagt	10380
	caaaggagac ggcctttcca caagtttcag atcccctagt gtagctagtt cfaatgtgca	10440
	attctgcaaa gtaactctgg ttgggttcac aacaagtaca tccaggacaa tateatattg	10500
	gttgacaiga acgtaagctt ctgcataac aggatctgag aaacctgtca attgggtgac	10560
	cttgttaagt tttagatgcta ggggatctgc tgcctcttcc ctctgtgtgt taccattgct	10620
	tgcagtaaa ctacagctga actgatcttc ctggcagttc atttcattct taccagttag	10680
	ttgcatgaag gaaatgggtt catcagctgt tactgtcaca ttctctttt cagattcttt	10740
	cttttgggat aatttctctt ctctagtttt agcagataac atgtgagaaa gggactgtct	10800
	gcattcctta ttgaaaatgt ctttcattaa aggtgaacat tcagacaaga cctttgaggca	10860
	cagggaatt ctatccatc catcctcagt aattgcttcc tttaggaagag aggttttctc	10920
	caaatgcagg atagtagcca tgagcaacal agcctcagca acaaaagaal ttgtctttt	10980
	cttctctga accaaagctc catcagcaga gaatctctc aagggaggtc tctctctctc	11040
	ttcttgggtg ggtctagaac tcttaagggc actctgagtt gcataggtac ccattcagt	11100
	aaccaatttc tgaactggcc ctacagttat ttcttcttca ggttttaatt caccagcttc	11160
	ttcttttatt tctgactcta caattgggat ctctccaagg gacctgcgga tctcagtcct	11220
	caactctga atgtctctt ttgtaactaca gtattctccc aggtatccata atgtctctctg	11280
	gtaaatcttg acagatttaa tagcatgaaa gaactcaagc atcttctcaa caalaagcat	11340
[0012]	tctcaggtta tcaaagcctt gaattggctc acgaacaaac tccaagacat cagcagctgc	11400
	tgtctctgtg ttgtcactga gaaattccat taacacagga ataacatttg cagccatctc	11460
	tggaaatcgg acagaacagg aatgcaatgt tctcactagg agttgtctgt atttctcagt	11520
	atcttctatc tcagacacat tatttgtttt taactcttcc ttcttcagga caataaccag	11580
	ctcttcaaca ttctctagaag agacaagatc cagtgtctaac tgcagagttt tctttctgac	11640
	ttctaatgtt ggtgtctca ataactctag gatattccata accagatctt gtactctctg	11700
	ttcatgagca ggatctctt ttaattctat caagcctacc aaaactatga gttttacatt	11760
	gttctctctc tcttaataa ttaaatcaat gtaacactga gcagcagcct tgattctcagt	11820
	tgttgcacta gagagtgtca ctaatgtccc agcagcttca tattttacag cagggtctga	11880
	tgaactgtaat aagttataga tgcagcgaat aaaacgagct ctctctgatg gatttagctg	12000
	acagacctta taaatcagtt caacaataac cagctgcaga atgtctccaa atgtttgaac	12060
	ttgatcaatg caagtaactta agtaatccaa agctctgctc tgatctgcat gaattagcat	12120
	cataaatgca ttctttttgc aacttgcctc ctctctcttc accagaaaat catgtatcag	12180
	ttcaggagca tcaaggtataa gatgttcaaa atttctatag atggtataga tggccaaaac	12240
	agcatttctt ctaacatagc tgtgtctgat ctccaacat gcacgaatag ctggcattaa	12300
	aggtctctagc aattctctct ctctcaattt gcaaaagaaa cgaagagtag atctctgaat	12360
	aaattcatta ggaigtgaa gatcttctt gtaatgctca catacaagga tcatctctatg	12420
	taaaagtctc ccatctggag ttgttttagg aacaatttcc caaaatacca gaagtaattt	12480
	cttgatagtg tgatctgaa gaggtagcac aaaacgaatg atggtctca gaagtcagg	12540
	aagtttttca ccaactgaa tcataatgat taacttcttc aaagctctag tctttgaatt	12600
	tacatctctt ttctctagat ctttttttaa gctaaattca gatgtgtgtt ctgaatccat	12660
	tggcacgtta attaacgtgt agcatacgtt ctccagcctc gtcattttat catctctctc	12720
	cttctcgaac tgagggtgag accaagaacc tccgccgcta cctccgccgg atccgccacc	12780

ttttcaaat tgcgatggc tccaggccat gtcagatgat tgtaataaaa atgtaattta	12840
cagtatagta ttttaattaa tatacaaatg atttgataat aattcttatt taactataat	12900
atattgtgtt gggttgaatt aaaggtecgt atactecgga atattaatag gttgcigata	12960
tcgggagttc agtcgtegaa tgcaaacgt aaaaaatatt aataaggtaa aaattacagc	13020
tacataaatt acacaattta aacggatcat ggcttatect tacgacgtgc ctgactacgc	13080
cgaaatcggg gaaagcttgt ttaaggggcc gcgtgattac aacccgatat cgagcaccat	13140
ttgtcatttg acgaatgaat ctgatgggca cacaacatcg ttgtatggta ttggatttgg	13200
tccttctate attacaaaca agcacttgtt tagaagaaat aatggaacac tgttggcca	13260
atcactacat ggtgtattca aggtcaagaa caccacgact ttgcaacaac acctcattga	13320
tgggagggac atgataattt ttgcgatgcc taaggatttc ccaccatttc cteaaaagct	13380
gaaaattaga gagccacaaa gggaagagcg catatgtctt gtgacaacca acctccaaac	13440
taagagcatg tctagcatgg tctcagacac tagttgcaca ttcccttcat ctgatggcat	13500
attctggaag cattggattc aaaccaagga tgggcagtgt ggcagtecat tagtatcaac	13560
tagagatggg ttctattgtg gtatacactc agcctcgaat ttccaacaaca caaacaatta	13620
ttccacaagc glccgaaaa acctcatgga atlglgaca aatcaggagg cgcagcagtg	13680
ggttagtggg tggcgattaa atgctgactc agtattgtgg gggggccata aagtittcat	13740
ggtgaaacct gaagagcctt ttccagcagt taaggaagcg actcaactca tgaatgaatt	13800
ggtgtactcg caactcagag aaaacctgta ctccagtea gactacaagg atgacgacga	13860
taagatgta accaaattcg agaccaagag cgcgcgggtc aaaggctca gcttccccc	13920
caaaagacct tggatcctga ctagtttaca taatggggtc atccagttat gggactatcg	13980
gatgtgcact ctcaattgaca agtttgatga acatgatggg ccagtcgag gcattgaact	14040
ccataagcag cagccactgt tgcctctgg aggagatgac talaagatta aggttggaa	14100
[0013] ttacaagctt cggcctgtc ttccacatt gcttgggca ttagattata ttccaccac	14160
gttttttcat catgaatc cctggattct gactgctcc gatgatcaga ccatccgagt	14220
gtggaactgg caatctagaa cctgtgtttg ttgtttaaca gggeacaacc attatgtgat	14280
gtgtgctcag ttccacccca cagaagactt ggtagtatca gccagcctgg accagactgt	14340
gcgcgtttgg gatattttg gtcfgaggaa aaaaaacctg tccctgggtg cgggtggaatc	14400
ggatgtgaga ggaataactg gggttgatct atttggaact acagatgcag tggatgaagca	14460
tgtactagag ggtcacgata gtggagttaa ctgggctgcc ttccacccca ctatgcccc	14520
tattgtatct ggggcagatg atcgtcaagt gaagatctgg cgcattgatg aatcaaggc	14580
atgggaggtt gataacctgcc ggggcaatta caacaatgta tcttgtgccc tcttcacccc	14640
tcgccaagag ttgatctca gcaattctga ggacaagat attcagctc gggatagtgc	14700
taagcggact ggggttcaga ctttccgag agaccatgat cgtttctggg tcttagctgc	14760
tcaccctaac cttaacctct ttgcagcagg ccatgatggg ggtatgattg tgtttaagct	14820
ggaacgggaa cggccagcct atgctgttca tggcaatag ctacactatg tcaaggaccg	14880
attcttacga cagctggatt tcaacagctc caaagatgta gctgtgatgc agttgocggg	14940
tgtttccaag ttccagtat tcaatatgct atacaatcca gcagaaaatg cagtcctgct	15000
ttgtacaaga gctagcaate tagagaatag tacctatgac ctgtacacca tccctaaaga	15060
tgtgactcc cagaatcttg atgcgcctga agggaaacga tctcaggcc tgacagccgt	15120
ttgggtcct cgaaatcggg ttgctgtcct agatcggatg cattccttc tgatcaagaa	15180
ctgaagaat gagatccca aaaagthaca ggtgcccaac tgtgatgaga tctctatgc	15240
tggcacagc aatctctgc ttcgagatgc ggactctate acactctttg acgtacagca	15300
gaagcggact ctggcatctg tgaagatttc taaagigaaa tacgttatct ggtcagcaga	15360
catgtcacat gtgcactac tagccaaaca cgaacactca tgccctttgc ctcttacagc	15420
cattgtgatc tgtaaccgca aactggatgc tttatgtaac attcatgaga acattcgtgt	15480

caagagtggg	gcttgggatg	agagtggsgt	atttatetat	accacaagca	accacatcaa	15540
atatgctgtc	accactgggg	accacgggat	catttegaact	ctggatttac	ccatctatgt	15600
cacacgggtg	aagggcaaca	atgtatactg	cctagacacg	gagtgtcgtc	cccgggtaet	15660
caccattgat	ccactgagt	tcaaatfcaa	gctggccctg	atcaacagaa	aatatgatga	15720
ggtaetgac	atggtgagga	atgccaaact	agtiggccag	tctaitatig	cittatetcea	15780
gaagaagggc	tatcctgaag	tggcaactga	ttttgtcaag	gatgagaaaa	ctcgccttag	15840
tctggcactg	gagtgtggaa	acattgagat	tgccttgaa	gcagccaaag	cactggatga	15900
caagaactgc	tgggaaaagc	tgggagaagt	ggccctgctg	caggggaacc	accagattgt	15960
ggaaatgtgc	tatcagegta	ccaaaaactt	tgacaaaact	tccttctgt	atcttatcac	16020
tggcaactta	gaaaaacttc	gcaagatgat	gaagattgct	gagatcagaa	aggacatgag	16080
tggccactat	cagaatgccc	tatacctggg	tgatgtgtca	gagcgtgtgc	ggatcctgaa	16140
gaactgtgga	cagaagtccc	tggcctatct	cacagctget	acceatggct	tagatgaaga	16200
agctgagagc	ctaaaggaga	catttgacc	agagaaggag	acaatcccag	acattgacc	16260
taatgccaa	ctgctccagc	cacctgcacc	tatcatgcca	ttggatacca	attggccttt	16320
attgactgta	tccaaaggat	tttttgaagg	caccattgcc	agcaaaggga	agggaggagc	16380
actggctgct	gacattgaca	ttgacactgt	tggtaacagag	ggctggggag	aggatgcaga	16440
gctgcagttg	gatgaagatg	ggtttgtgga	ggctacagaa	ggtttggggg	atgatgctct	16500
tggcaaggga	caggaagaag	gaggtggctg	ggatglagaa	gaagatctgg	agctccctcc	16560
tgagctggat	atatcccctg	gggcagctgg	tggggctgaa	gatggtttct	ttgtgcccc	16620
aaccaaggga	acaagtccaa	ctcagatctg	gtgtaataac	tctcagcttc	cagttgatca	16680
catcctggca	ggtctttctg	aaacagccat	gcggtcctt	catgaccaag	taggggtaat	16740
ccagtttggc	ccctacaagc	aactgttctt	acagacatac	gcccgaggcc	gcacaaccta	16800
[0014] tcagctctg	ccctgectac	cctccatgta	tggctatcct	aatcgcaact	ggaaggatgc	16860
agggtgaag	aatgggtgac	cagctgtggg	cctgaagctt	aatgacctca	tccaacggtt	16920
gcagctgtgc	taccagctca	ccacagtgg	caaattgag	gaggctgtgg	aaaaattccg	16980
ttccatcctt	ctcagtgigc	cacttcttgt	tgtggacaat	aaacaagaga	ttgcagaggc	17040
ccagcagctc	atcaccattt	gcogtgagta	cattgtgggt	ttgtcctgg	agacagaaa	17100
gaagaagctg	cccaaagaga	ctctagaaca	gcagaagcgc	atctgtgaga	tggcagccta	17160
ttcacccac	tcaaacctgc	agcctgtgca	catgatctg	gtgctgctga	cagccctcaa	17220
tctgttcttc	aagctcaaga	acttcaagac	agetgccacc	tttgcctggc	gcctactaga	17280
actcgggccc	aagcctgagg	tggcccaaca	gaccgaaaa	atcctgtctg	cctgtgagaa	17340
gaatcccaca	gatgectacc	agetcaatta	tgacatgcac	aaccctttg	acatttgtgc	17400
tgeatcatat	eggcccatct	accgtggaaa	gccagtagaa	aagtgtccac	tcagtggggc	17460
ctgctattcc	cctgagttca	aaggtcaaat	ctgcagggtc	accacagtga	cagagattgg	17520
caaagatgtg	attggtttaa	ggatcagtec	tctgcagtti	cgcgaaaacc	tgtaactcca	17580
gtcagagcag	aaactcatct	cagaagagga	tctgatgcct	ctgcgacttg	atatcaaaag	17640
aaagctaact	gctagatctg	atcgagttaa	gagtgtggat	ctgcatecta	cagagccatg	17700
gatgttggca	agtctttaca	atggcagttg	gtgtgtttgg	aatcatgaaa	cacagacact	17760
ggtgaagaca	tttgaagtat	gtgatcttcc	tgttcagact	gcaaagtttg	ttgeaaggaa	17820
gaattgggtt	gtgacaggag	cggatgacat	gcagattaga	gtgttcaatt	acaatactct	17880
ggagagagtt	catatgtttg	aagcacactc	agactacatt	cgctgtattg	ctgttccatc	17940
aaccagcctt	ttcattctaa	ctagcagtg	tgacatgctt	attaagctct	gggactggga	18000
taaaaaatgg	tcttgctcac	aagtgtttga	aggacacacc	cattatgtta	tgcagattgt	18060
gatcaacccc	aaagataaca	atcagtttgc	cagtgcctct	ttggacagga	ctatcaaggt	18120
gtggcagttg	ggtcttctgt	caccaaactt	cactttggaa	ggacatgaga	aaggcgtgaa	18180

	ttgcattgat tactacagtg gtggggacaa gccatacctc atttcagggtg cagatgaccg	18240
	tcctgtttaa alalgggatl atcagaataa aacatgtgtg cagacacitgg aaggacatgc	18300
	ccaaaatgtg tcttgtgcca gctttcatcc tgagttgcca atcattatca caggttcaga	18360
	agatggaaca gtacgtatctt ggcattcaag cacctaccgg cttgagagca cactgaatta	18420
	tggaatggag agggataggt gcgtggccag tctaagaggg tcaaacaatg tcgctttggg	18480
	ctatgatgaa gggagcatca ttgttaagct tggctgggag gaacctgcca tgtccatgga	18540
	tgccaatgga aagataatctt gggccaagea ttcagaagtc cagcaggcca acctaaaage	18600
	aatgggagat gctgaaatta aagatgggta aagattgcca ctggcagtaa aggaratggg	18660
	cagttgtgaa atataccctc agactatcca gcacaatcct aatgggcggg ttgtgtgtgt	18720
	gtgtgtgtgat ggggagtata tcatctacac agcaatggca ttgagaaaca agagctttgg	18780
	atctgctcag gagtttgcct gggcccacga ttcttcagag tatgcaataa gagagagcaa	18840
	cagcattgta aagatatta agaactltaa ggaaaaaaaa tcailltaac cagatillgg	18900
	agcagaaagt atctacggcg gcttcttatt gggagtcaga tctgtaaattg gcttagcctt	18960
	ctatgactgg gacaatacag aactcfaag aagaattgaa attcagccca aacatatttt	19020
	ctggctgac tctggagagc tagtctgtat tgctactgag gaateatttt ttatccttaa	19080
	gtatctgtca gaaaaagtct tggctgcaca ggaaacacat gagggagtta ctgaagatgg	19140
	cattgaagat gccittgagg ttctttggta gattcaggaa attgtgaaaa cagggctttg	19200
	ggtaggcgat tgetteattt acacaagttc tgtgaacaga ttaaattatt atgttggagg	19260
	agaaatagtc accallgccc actlggacag gacgalgat cctcfaggct acatlcctaa	19320
	agacaacagg ctttatctgg gggataaaga attgaacatc attagetatt ccttctggt	19380
	ttcagctctg gaataccaga cagctgtcat gcggagggac tttagcatgg ctgataaggt	19440
	ccttctacc attccaaaag aacagaggac cagagttgca cactttttgg aaaagcaggg	19500
[0015]	cttcaagcag caagetetta cagtatccac agatcctgag catcgttttg agcttgetct	19560
	tcagcttga gagttaaaaa ttgcatacca gttagcagtg gaagcagagt cagaacagaa	19620
	gtggaacaa cttgctgaac ttgccattag taaatgtcag tttggcctag cccaggagtg	19680
	cttcatcat gcacaggatt atgggggctt gctgctlltg gccactgctt ctggaaatgc	19740
	taatatggtg aacaagetag cagagggtgc ggagagagat ggcaaaaata atgtggcatt	19800
	catgagctac tttttacagg gcaaggttga tgccctgcta gagctcttaa ttagaactgg	19860
	acggctgcca gaagetgctt tcttggcccg aacttactta cccagtcagg tttcaagggt	19920
	agtgaacctc tggagagaga atctctcaaa agtcaatcag aaagcagcag aatcccttgc	19980
	tgaccaaca gagtatgaaa acctgttccc tggattaaaa gaagcctttg ttgttgaaga	20040
	atgggtgaag gaaacacatg ctgatctgtg gccagccaaa caataccac ttgtcaegcc	20100
	aatgaagag agaaatgta tgggaagagg aaaagaactt cagccctcaa gatctacagc	20160
	teaacaggaa cttgatggga aacctgttcc tctactccg gttattgttg cctccacac	20220
	agccaacaaa gaagaaaaga gtttactoga actagaagta gattttgata atttggaatt	20280
	agaagatall gacacaacag atalcaatct ggalgaagat attttggatg atgaaaatlt	20340
	gtattttcaa agcgattaca aagacgatga cgacaagatg gcgcctccgg cccccggccc	20400
	ggcctccggc gctcctgggg aggtagacga gctgttcgac gtaangaacg ccttcfacat	20460
	cggcagctac cagcagtgca taaacaggcc gcagcgggtg aagctatcaa gccagagag	20520
	agacgtggag agggacgtct tctgttatag agcgtacctg gcgcagagga agttcgggtg	20580
	ggtcctggat gagatcaagc cctcctcgcc cctttagctc caggccgtgc gcatgtttgc	20640
	tgactacctc gcccaagaga gtggaggga eagcatctgt gccagctgg accgagagat	20700
	gagcaggagc gtggacgtga ccaacaccac ctlcttgcct atggcgcctt ccatctatct	20760
	ccacgaccag aaccggatg ccgccttgcg tgccttgcac cagggggaca gcctggagtg	20820
	cacagccatg acagtgcaga tcttctgtaa gctggaccgc ctggacctcg cccggaagga	20880

	gctgaagaga atgcaggacc tggacgagga tgccaccctc acccagctcg ccactgcctg	20940
	ggtcagcctg gccacgggtg gtgagaagct gcaggatgcc tactacatct tccaggagat	21000
	ggctgacaag tgctcgccca ccttgetgct gctcaatggg caggcggcct gccacatgce	21060
	ccagggccgc tgggaggccg ctgaggcct gctgcaggag gcgctagaca aggatagtgg	21120
	ctaccagag acgctggtea acctcatgt cctgtcccag cacctgggca agccccctga	21180
	ggtgacaaaac cgatacctgt cccagetgaa ggatgcccaac aggteccatc ccttcatcaa	21240
	ggagtaccag gccaaaggaga acgactttga caggetgggtg ctacagtaag ctcccagcgc	21300
	cgagaacttg tactttcaga gtatgggtgag caagggcgag gagctgttca ccgggggtggt	21360
	gcccacctctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga	21420
	gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcatctgea ccaccggcaa	21480
	gctgcccgtg ccttggccca cctcgtgac cacctgacc taeggcgtgc agtgcttcag	21540
	cegtacccc gaccacatga agcageacga etttctcaag tcegccatgc ccgaaggcta	21600
	cgtdccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgcccagggt	21660
	gaagttcgag ggcgacacce tggatgaaccg catcgagctg aagggcacgc acttcaagga	21720
[0016]	ggacggcaac atcctgggge acaagetgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat	21780
	catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgac acaacatcga	21840
	ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc	21900
	cgtgctgctg cccgacaace actacetgag caccagctcc gccctgagca aagaccccaa	21960
	cgagaagegc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgcccggga tcaactctcg	22020
	catggacgag ctgtacaagt aactgactaa aagcttctcg agaagtacta gaggatcata	22080
	atcagccata ccacatttgt agaggtttta cttgctttaa aaaacctccc acacctccc	22140
	ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttgta acttgtttat tgcagcttat	22200
	aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttactg	22260
	cattctagtt gtggtttgtc caaactcate aatgtatctt atcatgtctg gatctgatca	22320
	ctgcttgagc ctaggagatc cgaaccagat aagtgaatc tagttccaaa ctattttgc	22380
	aittttaatt ttctgattag cttacgacgc tacaccagct tcccatctat ttigtactc	22440
	ttccctaaat aatccttaa aactceattt ccacctccc cagttcccaa ctattttgc	22500
	cgcccacagc gggcatttt tcttctgtt atgtttttaa tcaaacatcc tgccaactcc	22560
	atgtgacaaa ccgtcatctt cggtacttt	22590

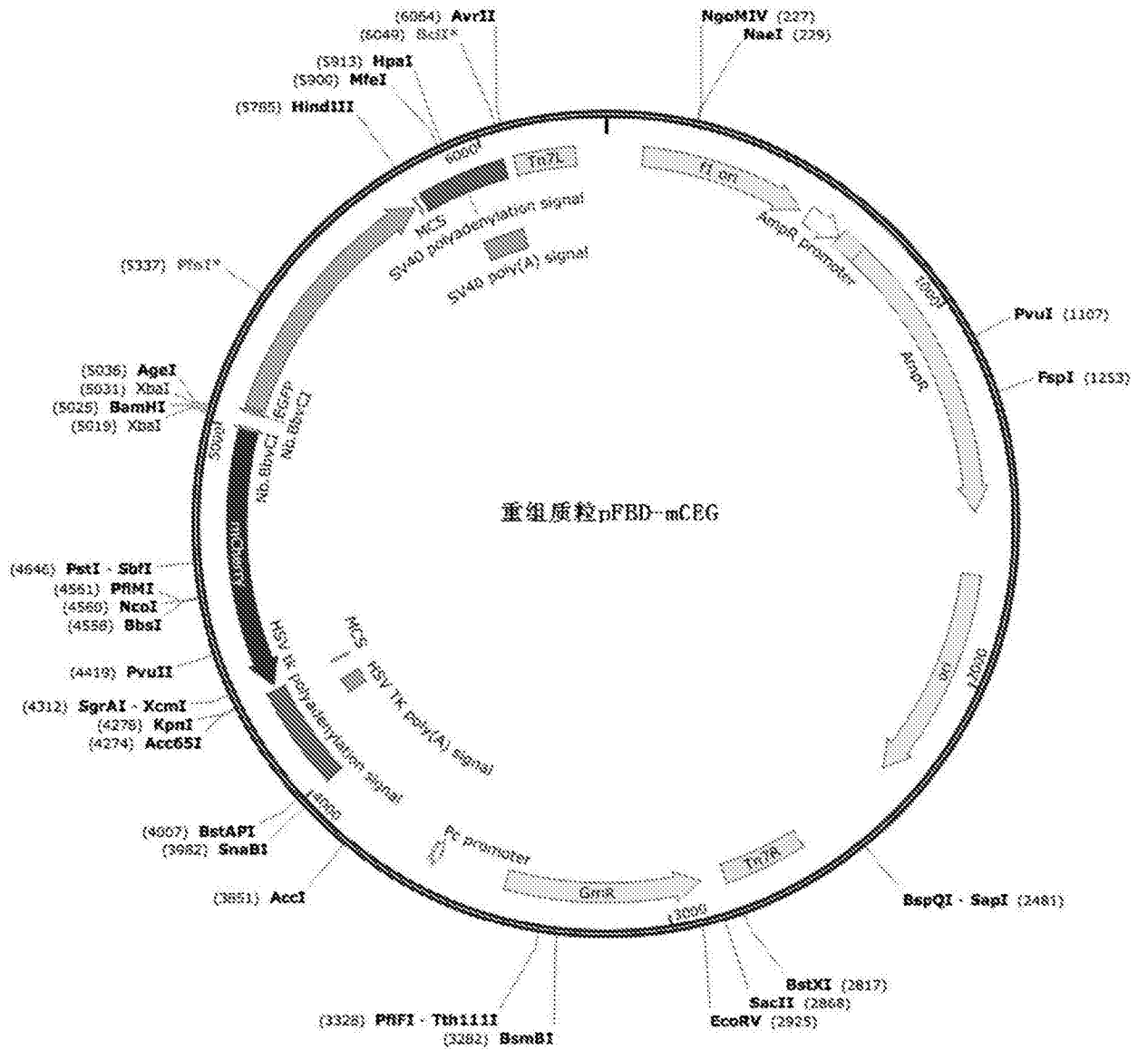


图1

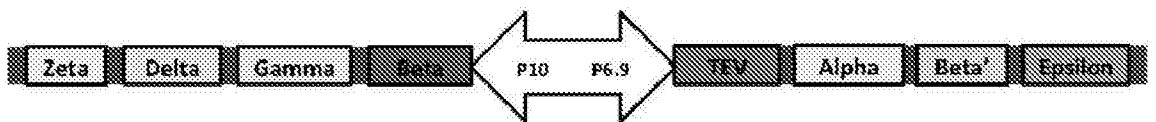


图2

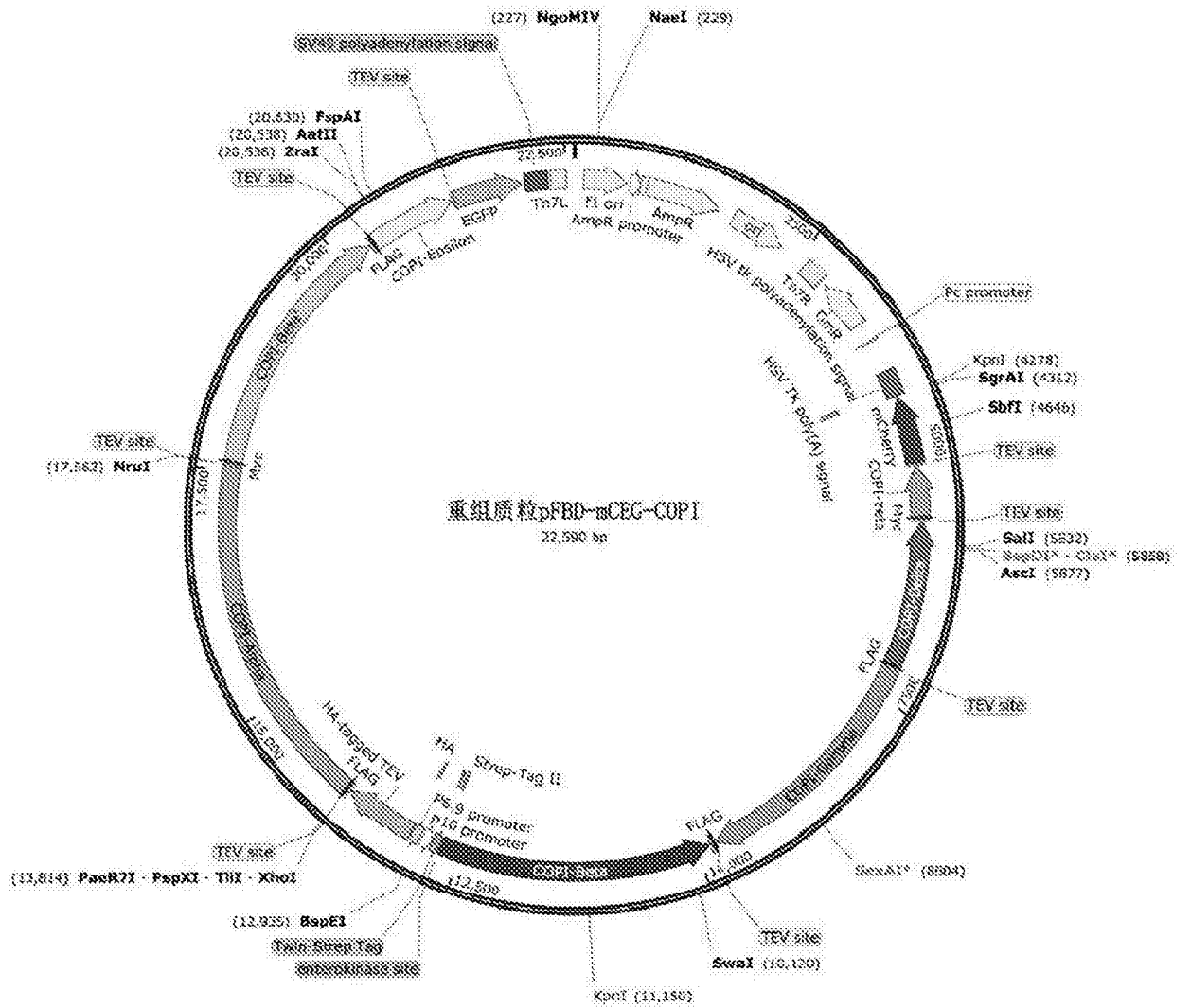


图3

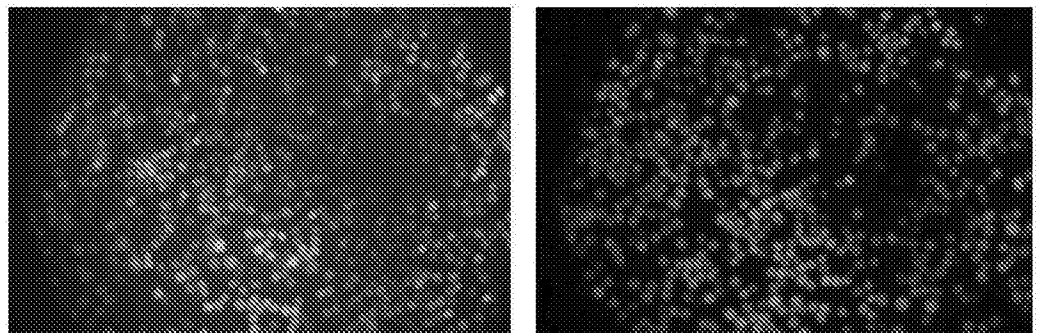


图4

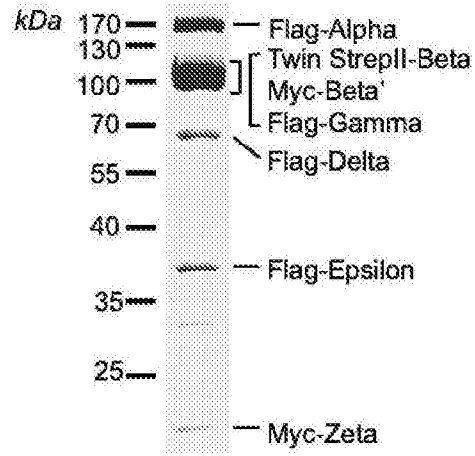


图5

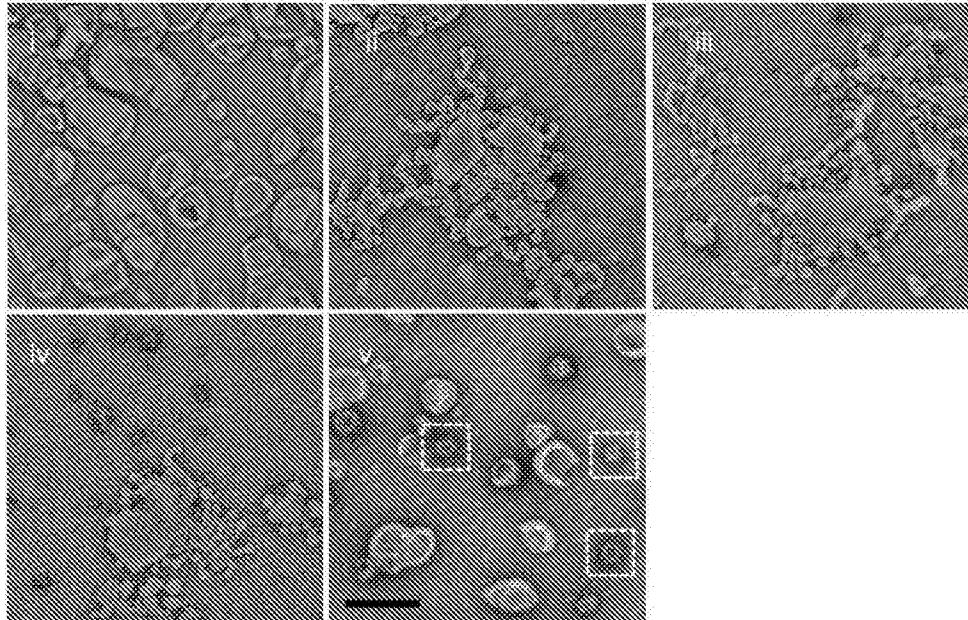


图6