



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104726496 A

(43) 申请公布日 2015.06.24

(21) 申请号 201510137846.4

(22) 申请日 2015.03.27

(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

(72) 发明人 刘光慧 张维琦 曲静 任若通
汤富酬 铃木敬一郎
胡安·卡洛斯·伊斯毕华·贝尔蒙特

(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

(51) Int. Cl.

C12N 15/861(2006.01)

C12N 15/55(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12Q 1/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页
序列表16页 附图2页

(54) 发明名称

携带人类成年早衰症基因突变的多能干细胞及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种携带人类成年早衰症基因突变的多能干细胞、间充质干细胞及制备方法。该方法包括:(1) 取体外培养的人多能干细胞,突变所述人多能干细胞中的人类成年早衰症基因 WRN,使所述 WRN 丧失功能,得到所述 WRN 功能丧失的人多能干细胞;(2) 对所述 WRN 功能丧失的人多能干细胞进行定向诱导分化,获得所述 WRN 功能丧失的间充质干细胞。本发明所提供的多能干细胞衍生的间充质干细胞能够用于建立筛选 WS 治疗药物的药物筛选平台,同时也为延缓自然衰老的过程提供了更多的线索。

1. 一种间充质干细胞的制备方法,包括:

(1) 取体外培养的人多能干细胞,突变所述人多能干细胞中的人类成年早衰症基因 WRN,使所述 WRN 丧失功能,得到所述 WRN 功能丧失的人多能干细胞;

(2) 对所述 WRN 功能丧失的人多能干细胞进行定向诱导分化,获得所述 WRN 功能丧失的间充质干细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,突变所述人多能干细胞中的人类成年早衰症基因 WRN 为缺失所述人多能干细胞中的所述 WRN 的第 15 外显子和第 16 外显子。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于:步骤(1)中,缺失所述人多能干细胞中的所述 WRN 的第 15 外显子和第 16 外显子,是按照包括如下步骤的方法实现的:

(a1) 将序列表中序列 1 的第 11308-12850 位所示 DNA 片段构建到辅助腺病毒载体上,获得重组载体;

(a2) 用所述重组载体转染腺病毒包装细胞,将所得细胞记为重组细胞 1;用辅助腺病毒感染所述重组细胞 1,将所得细胞记为重组细胞 2;

(a3) 培养所述重组细胞 2,从培养上清中获得重组腺病毒;

(a4) 用所述重组腺病毒感染所述人多能干细胞,从而获得所述 WRN 的第 15 外显子和第 16 外显子缺失的人多能干细胞。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于:所述辅助腺病毒载体为 pCIHDAAdGT8-4 载体;或

所述辅助腺病毒为 AdHPBGF35 病毒;或

所述腺病毒包装细胞为人胚胎肾细胞 293 系的衍生细胞系 116 细胞。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的方法,其特征在于:步骤(2)中,对所述 WRN 功能丧失的人多能干细胞进行定向诱导分化,获得所述 WRN 功能丧失的间充质干细胞,是按照包括如下步骤的方法实现的:

(b1) 将所述 WRN 功能丧失的人多能干细胞进行拟胚体分化,获得拟胚体;

(b2) 将所述拟胚体接种于基质胶包被的培养板中进行培养,培养至纤维状细胞出现;再经过一次传代后,分选其中 CD73、CD90、CD105 均为阳性的细胞类群,即为所述 WRN 功能丧失的间充质干细胞。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的方法,其特征在于:所述人多能干细胞为人胚胎干细胞或人诱导多能干细胞;

所述人胚胎干细胞具体为人胚胎干细胞 H9 细胞系。

7. 利用权利要求 1-6 中任一所述方法制备获得的间充质干细胞。

8. 权利要求 7 所述的间充质干细胞在作为人类成年早衰症细胞模型中的应用。

9. 权利要求 7 所述的间充质干细胞在作为药物筛选模型中的应用;所述药物为治疗人类成年早衰症的药物。

10. 利用权利要求 7 所述的间充质干细胞筛选治疗人类成年早衰症的方法,包括:

(c1) 将权利要求 7 所述间充质干细胞在含有待筛选药物的培养液中培养;

(c2) 按照如下确定所述待筛选药物是否为治疗人类成年早衰症的药物:若所述间充

质干细胞的衰老表型被逆转,则所述待筛选药物为或候选为治疗人类成年早衰症的药物;若所述间充质干细胞的衰老表型未被逆转,则所述待筛选药物不为或候选不为治疗人类成年早衰症的药物。

携带人类成年早衰症基因突变的多能干细胞及制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种携带人类成年早衰症基因突变的多能干细胞及制备方法。

背景技术

[0002] 人口老龄化是世界尤其是中国面临的日益严峻的社会问题。毋庸置疑,衰老及其相关疾病已成为国内外科研领域急需突破的热点问题。模式生物的限制性使其无法在理论和实践层面上应用于人类衰老的基础研究及临床转化,因此新的人类衰老研究模型亟待产生。人类“早衰症”的发现使在实验室内研究人类衰老成为了可能。作为一种极端罕见的先天性遗传疾病,早衰症主要表现为机体的过早过快衰老,同时伴随发生老年群体所患的多种疾病,是人类群体中存在的具备加速老化特征的天然“突变体”。对早衰症疾病进程、并发症及分子机理的研究是揭示人类正常衰老过程及机制的重要途径和突破口。根据发病年龄,早衰症可分为儿童早衰症和成年早衰症。成年早衰症以 Werner 综合症 (Werner Syndrome, WS) 为代表,其致病原因是编码 DNA 损伤修复相关蛋白 (Werner syndrome protein, WRN) 的基因发生突变。与儿童早衰症相比,WS 能够表现出更多的与人类自然衰老近似的表型和症状,因此作为更接近于人类自然衰老的早衰症模型而倍受关注。WS 累及全身几乎所有组织与器官,而伴随人类自然衰老进程发生的特征都会在 WS 个体中加速体现。WS 患者在青春期后就会提前出现一系列明显的机体衰老特征,包括:①身材矮小、面容皱缩、头发变白脱落、皮肤萎缩硬化和色素沉积;②心力衰竭、心肌梗塞等心脏疾病;③动脉粥样硬化与高血压;④胰岛素抵抗的高血糖、高血脂和高尿酸血症;⑤智力衰退与脑萎缩;⑥早发眼部退变;⑦免疫系统异常,易引发类风湿疾病等自身免疫病;⑧骨质疏松、关节畸形和运动受限。非常值得注意的是,WS 患者易发生各类肿瘤,尤其是中胚层来源的肿瘤、黑色素瘤和星形胶质细胞瘤等,这与老龄化和肿瘤发病率正相关的事实非常相符。WS 患者的平均寿命为 50 岁,大多死于血管疾病与肿瘤。由于 WS 的临床表征同自然衰老过程非常类似,且表现出大多数生理性衰老相关的疾病类型,因此被认为是研究人类生理性衰老的最合适模型。通过对 WS 发病机理的研究将有利于认识正常衰老过程,揭示延缓衰老或治疗衰老相关疾病的重要靶点,为衰老从基础研究向临床转化提供重要的理论基础。

[0003] 有趣的是,最近研究表明人体组织的 WRN 蛋白表达随着年龄增高而出现逐渐降低的趋势,提示 WRN 的下调可能是正常衰老的重要作用。因此,研究 WRN 同人类衰老之间的关系,揭示人类成年早衰症的致病机理,将对于我们理解认识正常衰老过程及其揭示衰老相关疾病的病因具有重要的启示作用。WRN 蛋白包含 4 个结构域,分别为 3' → 5' 核酸外切酶结构域、RecQ DNA 解旋酶结构域、RQC 结构域及 HRDC 结构域。人类 WS 相关的 WRN 突变包括多种形式,多为错义突变、剪接突变和移码框突变。目前所知的所有疾病相关的 58 种 WS 突变均可导致一个共同的结果,即引起 WRN 蛋白表达的下调或缺失。最近的生物化学及细胞生物学研究表明 WRN 在 DNA 复制、DNA 损伤修复以及端粒和染色体的稳定性维持等方面均起着重要的作用。

[0004] 近年来,诱导多能干细胞 (Induced Pluripotent Stem Cell, iPSC) 技术的出现和发展为血液疾病的基因治疗和细胞治疗提供了广阔前景。iPSC 是通过将特定转录因子 (如 OCT4, SOX2, KLF4, cMYC 等) 导入体细胞,使其转变成为的具备胚胎干细胞特性的细胞。iPSC 并非源于胚胎组织,不会受到伦理问题的限制;其次现有的基因打靶技术允许针对患者自体来源的 iPSC 进行基因突变的基因组原位矫正,从而在基因水平清除内源性致病因素;此外患者自体来源的 iPSC,避免了配型和排斥反应的困扰,以上三点均体现了 iPSC 在个性化治疗和转化医学中巨大的应用前景。

[0005] 然而与其他遗传性疾病相比,WS 患者的体细胞重编程研究具有更大的困难和挑战性。已有研究表明,WS 患者皮肤成纤维体细胞经体外培养后提前发生老化并伴随严重的染色体异常,而重编程过程中又会进一步引发活性氧 (ROS) 增加、DNA 断裂和细胞死亡 (Senescence) 等细胞事件严重阻碍体细胞重编程的过程,因此针对 WS 患者携带致病突变细胞的体细胞重编程研究困难重重,国内外未见成功实施的案例。

[0006] 近年来人胚胎干细胞 (hESC) 基因打靶技术的发展为在实验室内模拟和研究人类衰老和疾病带来了新的曙光。对于已明确遗传背景的人类疾病,生物学家可以通过基因打靶技术向人 hESC 基因组的特定位置靶向引入相应的遗传突变,从而在实验室中创造出“疾病特异 hESC”,进而通过定向分化技术,可研究疾病特异基因突变对特定组织细胞类型的影响。

[0007] 由此可见,现有报道均未产生 WS 的多能干细胞,并利用产生的 WS-PSC 有效模拟疾病表型,建立药物筛选平台,因而未能开展高效的药物筛选工作。综上所述,目前急需一种体外产生 WS-PSC 的安全高效技术,以及利用该 WS-ESC 及其衍生细胞产生高效高通量的药物筛选平台。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的是提供一种间充质干细胞的制备方法。

[0009] 本发明所提供的间充质干细胞的制备方法,可包括:

[0010] (1) 取体外培养的人多能干细胞,突变所述人多能干细胞中的人类成年早衰症基因 WRN (基因组序列为 GenBank :NC_000008.11 的第 31033262-31173761 位, updated on 21-Mar-2015 ;cDNA 序列为 GenBank :NM000553.4, updated on PRI 15-MAR-2015),使所述 WRN 丧失功能,得到所述 WRN 功能丧失的人多能干细胞;

[0011] (2) 对所述 WRN 功能丧失的人多能干细胞进行定向诱导分化,获得所述 WRN 功能丧失的间充质干细胞。

[0012] 步骤 (1) 中,突变所述人多能干细胞中的人类成年早衰症基因 WRN 为缺失所述人多能干细胞中的所述 WRN 的第 15 外显子和第 16 外显子。

[0013] 步骤 (1) 中,缺失所述人多能干细胞中的所述 WRN 的第 15 外显子 (GenBank :NM_000553.4 的第 2509-2617 位, updated on PRI 15-MAR-2015) 和第 16 外显子 (GenBank :NM_000553.4 的第 2618-2686 位, updated on PRI 15-MAR-2015),具体是按照包括如下步骤的方法实现的:

[0014] (a1) 将序列表中序列 1 所示 DNA 片段 (失活突变的 WRN 基因片段) 的第 11308-12850 位构建到辅助腺病毒载体上,获得重组载体;

[0015] 在本发明中,序列 1 的第 1-21236 位通过与所述辅助腺病毒载体同源重组的方式构建得到所述重组载体。序列表中序列 1 共由 21236 个核苷酸组成,第 1-11307 位为上游同源臂;第 11308-12850 位为插入替换所述 WRN 第 15 外显子和第 16 外显子的 Neo 抗性基因表达框;第 12851-21236 位为下游同源臂。

[0016] (a2) 用所述重组载体转染腺病毒包装细胞,将所得细胞记为重组细胞 1;用辅助腺病毒感染所述重组细胞 1,将所得细胞记为重组细胞 2;

[0017] (a3) 培养所述重组细胞 2,从培养上清中获得重组腺病毒;

[0018] (a4) 用所述重组腺病毒感染所述人多能干细胞,从而获得所述 WRN 的第 15 外显子和第 16 外显子缺失的多能干细胞。

[0019] 其中,用所述重组腺病毒感染所述人多能干细胞后,还包括用 G418 和 Ganciclovir 进行克隆筛选的步骤;在克隆筛选之后还包括对挑选的克隆用基因组 PCR 的方法对其同源重组的情况进行确认的步骤。

[0020] 在本发明中,所述辅助腺病毒载体具体为 pCIHDA_{GT8-4} 载体;相应的,步骤 (a1) 中,所述重组载体为将序列 1 所示 DNA 片段与 pCIHDA_{GT8-4} 载体发生同源重组后获得的重组质粒;步骤 (a2) 中,所述重组载体转染腺病毒包装细胞,具体为:用 PI-SceI 酶切所述重组载体,使其线性化,然后转染所述腺病毒包装细胞。

[0021] 所述辅助腺病毒为 AdHPBG_{F35} 病毒。所述腺病毒包装细胞为人胚胎肾细胞 293 系的衍生细胞系 116 细胞。

[0022] 步骤 (2) 中,对所述 WRN 功能丧失的多能干细胞进行定向诱导分化,获得所述 WRN 功能丧失的间充质干细胞,具体可按照包括如下步骤的方法实现:

[0023] (b1) 将所述 WRN 功能丧失的多能干细胞进行拟胚体分化(如分化 14 天),获得拟胚体;

[0024] (b2) 将所述拟胚体接种于基质胶(matrigel)包被的培养板中进行培养,培养至纤维状细胞出现(培养时间如 2 周);再经过一次传代后,利用流式细胞术分选其中 CD73、CD90、CD105 均为阳性的细胞类群,即为所述 WRN 功能丧失的间充质干细胞。

[0025] 在所述方法中,所述人多能干细胞既可为人胚胎干细胞,也可为人诱导多能干细胞。

[0026] 在本发明的一个实施例中,所述人多能干细胞为人胚胎干细胞,具体为人胚胎干细胞 H9 细胞系(WiCell 公司产品)。

[0027] 利用所述方法制备获得的间充质干细胞也属于本发明的保护范围。

[0028] 所述间充质干细胞在作为人类成年早衰症细胞模型中的应用也属于本发明的保护范围。

[0029] 所述间充质干细胞在作为药物筛选模型中的应用也属于本发明的保护范围;其中,所述药物为治疗人类成年早衰症的药物。

[0030] 本发明的另一个目的是提供一种利用所述间充质干细胞筛选治疗人类成年早衰症的方法。

[0031] 本发明所提供的利用所述间充质干细胞筛选治疗人类成年早衰症的方法,具体可包括:

[0032] (c1) 将所述间充质干细胞在含有待筛选药物的培养液中培养;

[0033] 其中,将所述间充质干细胞在含有待筛选药物的培养液中培养,具体为:将所述间充质干细胞以 5×10^4 个每孔铺于六孔板中,细胞贴壁的第二天开始,加入含 50M 的维生素 C 的培养基继续培养至细胞长满(大约一周)。

[0034] (c2) 按照如下确定所述待筛选药物是否为治疗人类成年早衰症的药物:若所述间充质干细胞的衰老表型被逆转,则所述待筛选药物为或候选为治疗人类成年早衰症的药物;若所述间充质干细胞的衰老表型未被逆转,则所述待筛选药物不为或候选不为治疗人类成年早衰症的药物。

[0035] 其中,所述衰老表型被逆转,可体现为如下:Beta-gal 阳性细胞比例减少,以及细胞增殖能力提高(等)。

[0036] 在本发明中,所述人类成年早衰症为 Werner 综合症。

[0037] 本发明将利用 HDAdV 介导的基因组靶向修饰技术体外创建携带 WS 相关突变(包括点突变和敲除突变)的 hESC,后者经过定向分化诱导产生受 WS 累及的间充质干细胞,从而在培养皿中建立首个人类成年早衰症研究模型。“疾病”hESC 和“野生型”hESC 除了敲入的基因突变外,遗传背景完全相同,因此可提供同基因型(isogenic)的严格实验对照组。进而,可利用细胞生物学、分子生物学和生物信息学等多种技术手段,从关键基因、信号通路、蛋白相互作用网络、细胞器到全基因组范围的表观遗传学与基因表达调控等多个视角,研究导致人类细胞衰老的分子网络与遗传机制。HDAdV 载体移除了病毒复制和基因组整合元件,无法整合到宿主基因组中,从而可以容纳大片段同源重组序列,在提供同源重组效率的同时,与其他基因打靶技术(如锌指核酶等)相比,无脱靶(Off-Target)和诱变效应。通过对 WRN 基因的第 15 和 16 号外显子的特异敲除,破坏 WRN 的解旋酶活性区域,从而破坏了 WRN 蛋白的稳定性,与 WS 病人细胞内的情况相同,在基因敲出后的 ESC 及其衍生物细胞中,WRN 的蛋白表达都缺失。

[0038] 本发明产生的 WS-ESC,可以体外定向分化为携带致病基因突变的间充质细胞等衍生细胞,能够完全模拟各种疾病相关表型,因此本发明利用上述 WS-ESC 及其衍生细胞建立高效高通量的个性化药物筛选平台。

[0039] 综上所述,本发明所含技术能够用于建立筛选 WS 治疗药物的药物筛选平台,同时也为延缓自然衰老的过程提供了更多的线索。

附图说明

[0040] 图 1 为本发明的人胚胎干细胞打靶技术方案。A 和 B 为人胚胎干细胞打靶技术方案示意图;C 和 D 为 WRN 相关打靶鉴定的基因组 PCR 检测结果。

[0041] 图 2 为本发明产生了 WRN 蛋白缺失的 WRN^{-/-}ESC。其中, A 为免疫荧光检测结果; B 为 Western blot 结果。

[0042] 图 3 为本发明涉及的 WRN^{-/-}ESC 衍生的 MSC 具有衰老的表型。其中, A 为细胞生长抑制结果; B 为 SA-beta-Gal 染色结果; C 为衰老相关基因表达情况的检测结果。

[0043] 图 4 为维生素 C(vitamin C) 可以逆转 WRN^{-/-}MSC 的衰老表型。其中, A 为 SA-beta-Gal 染色结果; B 为免疫荧光检测结果。图中,“对照”表示未添加维生素 C。

具体实施方式

- [0044] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0045] 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。
- [0046] 下述实施例中的细胞培养条件如无特殊说明,均为 37 摄氏度,5% CO₂。
- [0047] 1、用于流式细胞术分选 MSC 的荧光标记抗体如下:
- [0048] 荧光素 FITC 标记的抗人细胞表面识别分子 CD90 抗体 (555595),BD Biosciences。
- [0049] 荧光素 PE 标记的抗人细胞表面识别分子 CD73 抗体 (550257),BD Biosciences。
- [0050] 荧光素 APC 标记的抗人细胞表面识别分子 CD105 抗体 (17-1057-42),BDBiosciences。
- [0051] 荧光素 APC 标记同型对照抗体 (555751),BD Biosciences。
- [0052] 荧光素 PE 标记同型对照抗体 (555749),BD Biosciences。
- [0053] 荧光素 FITC 标记同型对照抗体 (555742),BD Biosciences。
- [0054] 2、用于免疫荧光的抗体如下:
- [0055] 抗人 OCT4 抗体 (sc-5279),Santa Cruz Biotechnology。
- [0056] 抗人 SOX2 抗体 (sc-17320),Santa Cruz Biotechnology。
- [0057] 抗人 NANOG 抗体 (ab21624),Abcam。
- [0058] 抗人 Ki67 抗体 (ab16667),Abcam。
- [0059] 3、细胞系如下:
- [0060] 人胚胎干细胞 H9 细胞系,WiCell 公司产品(货号:WA09(H9)-DL-7)。
- [0061] 4、重组腺病毒包装所用生物材料如下:
- [0062] 辅助腺病毒载体 pCIHDAdGT8-4 载体:详见“An HSV amplicon-based helper system for helper-dependent adenoviral vectors. Shuji Kubo, et al. BBRC. 2003. 307(4):826-830”一文,公众可从原文作者或中国科学院生物物理研究所获得。
- [0063] 转染人胚胎肾细胞 293 系的衍生细胞系 116 细胞:详见“Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. Palmer D. and Ng P. Molecular Therapy. 2003. 8(5):846-52.”一文,公众可从原文作者或中国科学院生物物理研究所获得。
- [0064] 辅助腺病毒 AdHPBGF35:详见“Genome Size and Structure Determine Efficiency of Postinternalization Steps and Gene Transfer of Capsid-Modified Adenovirus Vectors in a Cell-Type-Specific Manner. Dmitry M. Shayakhmetov, et al., Journal of Virology. 2004. 78(18):10009-10022.”一文,公众可从原文作者或中国科学院生物物理研究所获得。
- [0065] 5、人胚胎干细胞 H9 细胞系培养方法如下:
- [0066] a. 将 H9 细胞接种至预先培养了经过丝裂霉素(美国 Sigma 公司产品,货号:M0503)灭活的小鼠胚胎成纤维细胞(美国 Invitrogen 公司产品,货号:S1520-100)的培养板中,使用人类胚胎干细胞培养基(CDF12 培养基)与小鼠胚胎成纤维细胞共同培养;
- [0067] b. 将 H9 细胞接种至预先用细胞外基质(qualified-Matrigel,美国 BD Biosciences 产品,货号:354277)包被的培养板中,使用 mTeSR 培养基(美国 StemCell Technologies 产品)培养。

[0068] 6、细胞培养基配方如下：

[0069] (1)CDF12 培养基配方：

[0070] DMEM/F12 培养基 (Invitrogen,11320-033)；

[0071] 0.1mM 非必需氨基酸 (Invitrogen,11140-050)；

[0072] 1mM GlutaMAX™ 二肽 (Invitrogen,35050-061)；

[0073] 20% (体积百分含量) Knockout 血清替代物 (Invitrogen, N10828-028)；

[0074] 1% (1g/100ml) 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen,15070-063)；

[0075] 55 μM β-巯基乙醇 (Invitrogen,21985-023)；

[0076] 10ng/ml 人 FGF2 (Joint Protein Central)。

[0077] (2) 间充质干细胞 (MSC) 培养基配方：

[0078] MEM 培养基 (Invitrogen,12571071)；

[0079] 10% (体积百分含量) 胎牛血清 (Invitrogen,10091148)；

[0080] 1% (1g/100ml) 青霉素 / 链霉素 (Invitrogen,15070-063)；

[0081] 10ng/ml 重组人成纤维细胞生长因子 (JPC, bFGF)；

[0082] 5ng/ml TGF β (Humanzyme, HZ1131)。

[0083] 实施例 1、WS 多能干细胞系的建立及其鉴定

[0084] 本发明涉及在人类胚胎干细胞 (hESCs) 中靶向失活人类成年早衰症基因——WRN 基因 (基因组序列为 GenBank:NC_000008.11 的第 31033262-31173761 位, updated on 21-Mar-2015; cDNA 序列为 GenBank:NM_000553.4, updated on PRI 15-MAR-2015)。本发明首先设计并通过分子克隆方法获得跨人类基因组中 WRN 基因第 15 和 16 号外显子的基因片段,其中包含设计的突变位点和用于阳性克隆筛选的 Neo 抗性基因 (图 1 中的 A 和 B),然后将其构建成为非整合型腺病毒载体 (HDAV 载体) 并感染 hESCs,利用同源重组原理将突变的 WRN 基因片段导入 hESCs 中并替换野生型基因片段,从而实现 WRN 基因的原位失活。后续经过 Neo 抗性筛选,并通过基因组 PCR 确认,最终获得 WRN 基因失活的 hESCs,即 WRN^{-/-}-hESCs (图 2)。具体方法如下：

[0085] 1、重组腺病毒的制备

[0086] 利用分子克隆方法将 WRN 突变位点和 Neo 抗性基因导入来自 BAC 文库中的人 WRN locus 克隆 (RP11-54H19, Invitrogen) 的野生型 WRN 基因中,获得携带失活突变的 WRN 基因片段,其核苷酸序列如序列表中序列 1 所示。其中,序列 1 的第 1-11307 位为上游同源臂;第 11308-12850 位为插入替换 WRN 第 15 外显子和第 16 外显子的 Neo 抗性基因表达框;第 12851-21236 位为下游同源臂。

[0087] 将序列 1 所示 DNA 片段与辅助腺病毒载体——pCIHDAVGT8-4 载体进行同源重组,所得重组质粒命名为 WRN(mt)-HDAV 质粒。WRN(mt)-HDAV 质粒的结构描述为:在所述 pCIHDAVGT8-4 载体的上下游同源臂之间插入了序列 1 的第 11308-12850 位所示 DNA 片段的重组质粒。

[0088] 用 PI-SceI (NEB) 酶切所述 WRN(mt)-HDAV 质粒并纯化,转染人胚胎肾细胞 293 系的衍生细胞系 116 细胞,得到重组细胞 1;再用辅助病毒 AdHPBGF35 感染所述重组细胞 1,以便包装非基因组整合的重组腺病毒。培养经过如上转染和感染处理的细胞,收集培养上清,并通过超高速离心纯化病毒颗粒。

[0089] 2、重组腺病毒感染人胚胎干细胞

[0090] 利用步骤 1 获得的重组腺病毒感染 hESCs 细胞 (H9) (1×10^7 个细胞, 病毒用量为 15bgal-transducing units(btu), 病毒用量单位可参见文献“Palmer, D. J. &Ng, P. Physical and infectious titers of helper-dependent adenoviral vectors: a method of direct comparison to the adenovirus reference material. Mol Ther 10, 792 -798 (2004).”和“Suzuki, K. et al. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 13781 -13786 (2008).”), 感染后第 2-4 天, 加入 G418 (25 ~ 400g/ml, invitrogen 公司产品) 进行阳性的筛选, 感染后第 10-13 天, 加入 $4 \mu\text{M}$ Ganciclovir (GANC, invitrogen 公司产品) 进行阴性的筛选。

[0091] 本发明需要两轮 HDAdV 感染介导的同源重组才能获得 WRN 缺失的人胚胎干细胞系, 第一轮同源重组后, 经 G418 和 GANC 筛选后, 存活下来的细胞即为 WRN⁺/neo; 第二轮同源重组后, 经 G418 和 GANC 筛选后, 存活下来的细胞即为 WRN^{neo}/-; 最后再利用 Puromycin (25 ~ 400g/ml, invitrogen 公司产品) 筛选获得移除了筛选标记 neo 的 WRN⁻/- 细胞。G418 筛选后存活的细胞即为发生了同源重组, 在基因组目的区域 (WRN 基因) 插入了筛选标记 neo 的细胞, 而 GANC 筛选后将剔除在同源重组过程中插入了 HDAdV 载体片段的细胞, 从而保证所有获得的细胞都是非基因组整合的无安全隐患的细胞。

[0092] 将所得的各种细胞克隆挑入 96 孔板中传代。一方面, 通过 PCR 方法进行基因组的鉴定; 另一方面, 通过 Western blot 检测 WRN 蛋白的表达情况, 通过免疫荧光检测经过改造的人胚胎干细胞的干细胞特性。

[0093] (1) PCR 鉴定基因组

[0094] 引物序列如下:

[0095] P1 :5' -AAGGCCTCCTGGGACTCAGCAGAAAGCTC-3' ;

[0096] P2 :5' -CCCCAAAGGCCTACCCGCTTCCATTGCTCA-3' ;

[0097] P3 :5' -CTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATC-3' ;

[0098] P4 :5' -AGGTACGCCATCCCCAGCTACCCTGA-3' ;

[0099] P5 :5' -AGATAATGTTGCTGTCATGG-3' ;

[0100] P6 :5' -TTAAGCTGTAGCACTTGGTC-3' ;

[0101] P7 :5' -CCAACATCCCAGCTTGCTT-3' ;

[0102] P8 :5' -GAGCAGGCCCATGTTACCTGA-3' ;

[0103] P9 :5' -AGTTCAGTGGAAAGTGATTC-3' ;

[0104] P10 :5' -AATATCAGCCTCAAGTTGCT-3' ;

[0105] 采用引物对 P1+P2, 以及引物对 P3+P4 分别对 WRN^{+/+} (野生型)、WRN^{+/neo} 和 WRN^{neo}/- 的三种细胞进行 PCR 鉴定基因组。采用引物对 P5+P6、引物对 P7+P8, 以及引物对 P9+P10 分别对 WRN^{+/+} 和 WRN⁻/- 两种细胞进行 PCR 鉴定基因组, 同时以 GAPDH 为内参, 其扩增引物序列如下:

[0106] GAPDH-F :5' -GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' ;

[0107] GAPDH-R :5' -GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3' 。

[0108] 理论上, 采用引物对 P1+P2 进行 PCR 扩增, WRN^{+/neo} 和 WRN^{neo}/- 这两种细胞会扩

增得到大小约为 12.6kb 的含 neo 片段的的目的条带,而 WRN^{+/+} 这种细胞不能扩增获得该目的条带。采用引物对 P3+P4 进行 PCR 扩增,WRN^{+/+}neo 和 WRN^{neo/-} 这两种细胞会扩增得到大小约为 9.6kb 的含 neo 抗性基因片段的的目的条带,而 WRN^{+/+} 这种细胞不能扩增获得该目的条带。采用引物对 P5+P6 进行 PCR 扩增,WRN^{+/+} 这种细胞能扩增得到大小约为 135bp 的含第 15 外显子片段的的目的条带,而 WRN^{-/-} 这种细胞不能扩增获得该目的条带。采用引物对 P7+P8 进行 PCR 扩增,WRN^{+/+} 这种细胞能扩增得到大小约为 125bp 的含第 16 外显子片段的的目的条带,而 WRN^{-/-} 这种细胞不能扩增获得该目的条带。采用引物对 P9+P10 进行 PCR 扩增,WRN^{+/+} 这种细胞能扩增得到大小约为 328bp 的目的条带(不能获得 150bp 的目的条带),而 WRN^{-/-} 这种细胞由于缺失第 15 和 16 外显子片段只能扩增获得大小约为 150bp 的目的条带(不能获得 328bp 的目的条带)。

[0109] PCR 鉴定结果如图 1 中 C 和 D 所示,结果显示与理论结果完全一致。

[0110] (2)Western blot 鉴定 WRN 蛋白

[0111] 以 WRN^{+/+} 和 WRN^{-/-} 这两种细胞作为供试细胞,使用 RIPA 裂解液对其进行裂解,提取总蛋白后以 BCA 蛋白浓度测定方法定量蛋白浓度。在收集的蛋白样品中加入适量浓缩的 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,100℃或沸水浴加热 3-5 分钟,以充分变性蛋白。冷却到室温后,把蛋白样品直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内。用 Bio-Rad 的标准电泳装置进行电泳,预计目的蛋白已经被适当分离后停止电泳。使用 Bio-Rad 的标准湿式转膜装置进行转膜。转膜完毕后,立即把蛋白膜放置到预先准备好的脱脂奶粉封闭液中,在摇床上缓慢摇动,室温封闭 60 分钟,按照适当比例稀释一抗(anti-WRN,兔源,抗 WRN 蛋白 N 端的抗体来源 abcam 公司(ab200),抗 WRN 蛋白 C 端的抗体来源 santa cruz 公司(sc-5629)),4℃缓慢摇动孵育过夜。再加入洗涤液洗涤 5-10 分钟。共洗涤 3 次。按照适当比例用二抗(HRP 标记的羊抗兔抗体,Santa cruz 公司(货号为 sc-2004),再用洗涤液(0.01M TBST)洗涤 5-10 分钟,共洗涤 3 次。最后使用显色剂(购自 Millipore,货号为 407207-1KITCN)显色。实验以 β -actin 为内参,一抗为鼠源抗 β -actin 抗体(购自 Santa cruz 公司,货号为 sc-8432),二抗为 HRP 标记的羊抗鼠抗体,Santa cruz 公司(货号为 sc-2005)。

[0112] Western blot 检测 WRN 蛋白结果如图 2 中 B 所示,WRN^{-/-} 细胞用 WRN 的 N 端抗体和 C 端抗体都无法检测到 WRN 蛋白的表达;而 WRN^{+/+} 细胞用 WRN 的 N 端抗体和 C 端抗体均可检测到 WRN 蛋白的表达(约 150KD)。

[0113] (3) 免疫荧光检测经过改造的人胚胎干细胞的干细胞特性

[0114] 以 WRN^{+/+} 和 WRN^{-/-} 这两种细胞作为供试细胞,采用免疫荧光技术对人胚胎干细胞的干性维持情况相关的分子标记物 Oct4, Sox2 和 Nanog 进行检测。具体如下:

[0115] 将培养于盖玻片上的供试细胞用 4% 的多聚甲醛室温固定 30 分钟,PBS 漂洗(3 次,5 分钟/次)后,使用含有 0.4% (体积百分含量) Triton X-100 的 PBS 室温孵育 30 分钟,继而换用 10% (体积百分含量) 驴血清(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. 货号:017-000-121) 室温封闭 1 小时。之后换用添加一抗的封闭液于 4 摄氏度孵育过夜。PBS 漂洗(3 次,5 分钟/次)后,然后加入对应二抗,室温孵育 1 小时。PBS 漂洗(3 次,5 分钟/次)后,用工作浓度为 2 μ g/ml 的 Hoechst 33258(Invitrogen, 货号:H3569) 室温孵育 15 分钟,最后封片和观察。

[0116] 结果如图 2 中 A 所示,与 WRN^{+/+} 细胞相似,WRN^{-/-} 细胞能够表达 Oct4(红色荧

光), Sox2(黄色荧光)和 Nanog(绿色荧光)三种分子标记物。

[0117] 综合以上(1)-(3)的结果,可见在 WRN^{-/-}表型的重组人胚胎干细胞(记为 WRN^{-/-}-ESC)中,WRN 基因失活,且不影响干细胞干性基因的表达。

[0118] 实施例 2、WRN 缺失(WRN^{-/-})的 ESC 经体外定向分化产生 WRN^{-/-}的 MSC

[0119] 本发明将实施例 1 中获得的 WRN^{-/-}-ESC,进一步体外定向分化为间充质干细胞(WRN^{-/-}-MSC),发现 WRN^{-/-}-MSC 能够表现出典型的成年早衰症 WS 的症状。具体方法如下:

[0120] 1、间充质干细胞的定向诱导分化

[0121] 将 WRN^{-/-}-ESC 进行拟胚体(EB)分化,分化 14 天,将 EB 接种于基质胶(matrigel)包被的 6 孔板中进行培养,继续培养 2 周至纤维状细胞出现。再经过一次传代后,利用流式细胞术分选其中的 CD73、CD90 和 CD105 均为阳性的细胞类群,即为 WRN 缺失(WRN^{-/-})的间充质干细胞(记为 WRN^{-/-}-MSC)。实验同时设置以野生型 hESC(H9)替代 WRN^{-/-}-ESC 的对照,所得间充质干细胞记为 WRN^{+/+}-MSC。

[0122] 2、WRN^{-/-}-MSC 的衰老表型鉴定

[0123] (1) 生长抑制测定

[0124] 利用细胞计数统计连续传代的 WRN^{-/-}-MSC 细胞和 WRN^{+/+}-MSC 细胞的生长能力,结果显示,与 WRN^{+/+}-MSC 细胞相比,WRN^{-/-}-MSC 表现出明显的生长抑制(图 3 中 A)。

[0125] (2) SA-beta-Gal 染色

[0126] 细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色是一种基于衰老时 SA-beta-Gal(senescence-associated beta-galactosidase)活性水平上调而对衰老细胞或组织进行染色检测的方法。

[0127] 分别以 WRN^{-/-}-MSC 细胞和 WRN^{+/+}-MSC 细胞为供试细胞(第 1 代和第 5 代),吸去 6 孔板中培养的供试细胞的细胞培养液,用 PBS 洗涤 1 次,再加入染色固定液(4%多聚甲醛),室温固定 15 分钟。弃去固定液,用 PBS 洗涤 1 次,每孔加入 1ml 染色工作液。以 X-Gal 为底物,在衰老特异性的 β -半乳糖苷酶催化下会生成深蓝色产物。在普通的光学显微镜下就可以观测到细胞或组织的衰老情况,并进一步对两组细胞中的 SA-beta-Gal 染色阳性细胞比率进行定量统计分析。

[0128] 结果如图 3 中 B 所示,从图中可以看出,WRN^{-/-}-MSC 细胞有明显的蓝色,而 WRN^{+/+}-MSC 细胞基本上没有蓝色。进一步的定量分析结果显示,WRN^{-/-}-MSC 组的 SA-beta-Gal 染色阳性细胞比率极显著高于 WRN^{+/+}-MSC 组($P < 0.01$)。可见,WRN^{-/-}-MSC 细胞表现出严重衰老的症状。

[0129] (3) 相关基因表达检测

[0130] 分别以 WRN^{-/-}-MSC 细胞和 WRN^{+/+}-MSC 细胞为供试细胞(第 1 代和第 5 代)。从供试细胞中提取总 RNA,并将其反转录为 cDNA,通过定量 RT-PCR 的方法检测衰老相关基因(p16 和 p21)的表达水平的变化。使用的引物如下:

[0131] p16-F :5' -ATGGAGCCTTCGGCTGACT-3' ;

[0132] p16-R :5' -GTAAGTATTCGGTGCCTTGGG-3' 。

[0133] p21-F :5' -CGATGGAAGTTCGACTTTGTCA-3' ;

[0134] p21-R :5' -GCACAAGGGTACAAGACAGTG-3' 。

[0135] 然后,用热图的形式将相应的基因表达情况进行展示,模块颜色越红(颜色越深)表示基因表达水平越高。

[0136] 结果如图 3 中 C 所示,从图中可以看出,WRN^{-/-}MSC 细胞中高表达衰老相关的基因 p16 和 p21。

[0137] 实施例 3、利用 WRN^{-/-}MSC 筛选抗衰老表型的小分子化合物

[0138] 本发明在培养前述源于 WRN^{-/-}ESC 的 WRN^{-/-}MSC 的过程,建立了针对抗衰老表型的小分子化合物的筛选方法,发现维生素 C(Vitamin C, Vc) 可以逆转 WRN^{-/-}MSC 的衰老表型。具体如下:

[0139] 将 WRN 缺失的 MSC 细胞 (WRN^{-/-}MSC) 以 5×10^4 每孔铺于六孔板中,细胞贴壁的第二天开始,在实验组加入含 50M 的维生素 C 的培养基继续培养,37°C 的二氧化碳培养中培养大约一周后细胞可以长满,进行分析或传代。

[0140] (1) SA-beta-Gal 染色

[0141] 具体方法参照前文进行。

[0142] (2) 免疫荧光检测

[0143] 具体方法参照前文进行,采用抗体为抗人 Ki67 抗体 (ab16667),Abcam。Ki67 染色信号越强,说明细胞增殖能力越强,因此其两组细胞的 Ki67 染色 (绿色荧光) 如果有强弱之分,就可以判断染色信号强的细胞增殖能力强,信号弱的细胞增殖能力差。

[0144] 实验同时设置两个对照组:1. WRN^{+/+}MSC;2. WRN^{-/-}MSC 且不添加维生素 C。

[0145] 结果显示,对于 WRN^{-/-}MSC 而言,相比不加维生素 C 的对照组,添加了维生素 C 的实验组的 SA-beta-Gal 阳性细胞比例减少,细胞增殖能力提高 (图 4)。说明 WRN^{-/-}ESC 衍生的 WRN^{-/-}MSC 等分化产物可以治疗 WS 提供理想的药物筛选平台。

[0001]

<110> 中国科学院生物物理研究所

<120> 携带人类成年早衰症基因突变的多能干细胞及制备方法

<130> GNCLN150555

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21236

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

aacaaaatcg ctaatgaaag agtaaaacat gtcctgcct atcatactcc cttcacttte	60
actgatttct gettttatga agtactttaa taagctctac aacaaataaa caagacattg	120
tgccatcattt tacactettag cagtggtttt ccattccaac taactagatt gggtttataa	180
tatagtcatt taaacttact tagttaaata gttatacatt agcaactgca attaaggagc	240
taagaaatte agctcgtatt tatttatatg catcttatcc atagtttctc acttgttata	300
tttgccact gatggcaaat tgatttttcc tgttccaaaa atgtagtggt ttgagatttt	360
tggagatgca aaacagcacc atttccaat tagatecaaa acaatcttac ttgttgcagt	420
tgagactagt aattgatcag tgaggtgaaa aaattaggca aaacggtatc atcaaaattt	480
tctttctttt tttttttgaa acagagtatt gctctttgtcg cccaggctgg agtgcaatgg	540
cacgatctca gctcagctca ctggggeccc tacctacggg attcaaggga ttctctgccc	600

[0002]

teagcctcct gagtagctga gattacagge geatgceace aagcccaget aatTTTTgta	660
TTTTtagtag agacagggtt ttgccatggt ggccaggctg gtctggaact teagacctca	720
agtgattcac ctgcctcage ctcccaaagt gctgggatta caggeatgaa ccaccgtgcc	780
cgccccaaat tttcttttaa cttaaagtgt taatgtttgt ttgttcccaa ttttttata	840
tatgtcaagg cttttcatt atatacagge cagctctttg gagttctgca tagtgtttct	900
tgtttaaace acacctataa tgtaccatct acaatttcca attctttaag acagagtgaa	960
aaattaagac acctgaagca atctgagtgc ggagtectag gcattatgat tttccttgac	1020
acttttaggg ttcttttate acagtttate aaacaccttt ttttttttaa caaaaaaca	1080
atttacaana tctttccatg tattcaactt agaatttaat gaaatagggt ttttttttt	1140
ttgggtggtca tgiatcatea actttcttta catttaatta aattaatcaa caaaaaacat	1200
atagttgaca taaacaaatt tgggaccaag cactactgac tcttagtaaa catacaagtc	1260
aactgttgggt gcagaagtgc cttagtgcta gagagtagcc tgcaagctgt aattatatat	1320
gggcattagg gaatgaagaa cagccttaat actattgata ttttaagtga aggtcagctt	1380
agaaagcttt tacttgttaa aaagcttcac agtttgtcct tgtagttaat gcaattgaag	1440
ttgaattaat cttcttaat ttttttttta gggtttctat cttaactaaag gatatttcag	1500
aaaatetata ttactgagg aggatgataa ttgggtctac taacattgag actgaactga	1560
ggcccagcaa taatttaaac ttattatcct ttgaagatte aactactggg ggagtacaac	1620
agaaacaaat tagagaacat gaagttttaa ttcaagttga agatgaaaca tgggaeccaa	1680
cacttgatca tttagctaaa catgatggag aagatgtact tggaaataaa gtggaacgaa	1740
aagaagatgg atttgaagat ggagtagaag acaacaaatt gaaagagaat atggaaagag	1800
cttgtttgat gtcgtagat attacagaac atgaactcca aattttggaa cagcagctct	1860
aggaagaata tcttagtgat attgcttata aatctactga ggtactaaat aaagaggaag	1920
cacattttta gttattagta gttctggca gactttatct cegtaaagag acagatagta	1980

[0003]

aatatTTTTag gctttgtggg acatacagtc tctgttgcag taactcagtt ctgttattgt	2040
agtgtgaaag cagccacaga caaatgtaaa caaatgtgcc tgtctttcaa taaaacttta	2100
tctacaaata cagatagtgg gccacatttg gcttgcgagc tgtagtttgc tgttcctgac	2160
ttagtatgat atgcagcatt gtgtagtgga aagatTTTTat agtatcaaca gacatttgta	2220
ggagtttget atTTTataat ttcgtatgct tttttcataa tagatgtctc tgetttttgt	2280
ggattctett catatctact agtgTTtaet ctctctgactt tgatTTTTgg gggTgtattt	2340
tatttcttta tacagaattt tttctTTTT tctttctTTTT tttgagacaa ggttttgetg	2400
tgTcacccea gctggagtgc agtggtggga tcttggcccc ctgcggTctt caactcctgg	2460
gettaagcga tctgtcacc tcagcctccc tagtagctgg gaccacagge ctgcaccact	2520
acactcagct aatTTTTgta tttttgtag agatggggTt tegetctgTt gcccagactg	2580
gtctccaact cctggactea agtgatccac ctgccttTgce ctcccaaagt gttggaatta	2640
taggtgtgag tcactgtgcc Tggcccagaa tttctttact Tgctcatgtg agagagTtTc	2700
taataaaactc ctgatgcttt Tgcttgacac tatagTTTTa ctgtcatctc agagTcagat	2760
TTTTtctta atttctcat taaattgatt tcttaatttc TcattTgttt Tgcattagtt	2820
tacaaaatta cttaagatgc ctatattctc Tgaaatttta tattttattt cacgataaat	2880
aagTtTaaaa aattagattt gaccattTaa ttagagTtat Ttccccatca tttttctaat	2940
ggcaacaata atTTtagcat ttgagcaatt ctctgtattt TggTaaactat tagTaatcac	3000
TTTTatcagt ataaacatgc atttcatTTT aaaatggTtt Tcaaaatatt ctcataccaa	3060
ccattcataa aagatgtTcc ctTctggga aatatcagtt Tttgctaaca Tctgcatttc	3120
ccTTtgattt Tctaggaatt Tcttattagg tatacacttt aagtgatatg Tttcatataa	3180
tattatagga ttatcaggat Ttcatgattt tttttttTg agatggaate tatctctgTc	3240
gccccagctg gagTgccgtg ggcagTctt ggctcactae aacctctgcc TccccggTtc	3300
aagTgattct cctacctcag ctccccagT cactgggatt acaggtgccc gccaccacac	3360

[0004]

ceggctaatt tttgtatfff tagtagagaa agtgctggga ttacagggtg gagccactgc	3420
acctggcctt ggatttegtg atttgactga catcttttac accaattatt gccattffff	3480
tattgggtac taattattag tattgctttc tttattcgtt aaataagaag taaaagaact	3540
tttaaaaaat aaaataaect tttttcctag tacaaagett attttcaatt ttttttattg	3600
cttaaatfff gcaggttaat taaggctgta cttctttttc ctacttcctg tttaaatatt	3660
tggcattfff tgagggtfff ctttctatgg atttttgtgg gggatcccat etcgttggac	3720
acttggttcc tggagattgc caaattattg aaaagtttcc tcatacccaa acattggcaa	3780
tagactgaat aaataacate tetgacatta tttttcaatt atatagagaa tgetttttgt	3840
aaaatactga tttatttaaa gatattacaa tcatagtagt tttttgcaat cttttttaa	3900
tcagtggatg tcaaggaaca actattgttc tttgtacgge atttttcaac attgtgaaga	3960
gttcttatac tcaaaaagtt tgggagacac agtgtgacat tgtttaacct gaggttgaact	4020
tgtcattttg tattcttgtt tagagcaggg attttatfff gtctctttat ctaactttgt	4080
attcetaact atttcttct tctcttttgg ttctttgttt ctttgttcat tctctctct	4140
ctccctfff tctctatcat ataaatatgt aaatatatat tatatatcca ttaggaaga	4200
ggaagttgtc taaagatate tagtatatag gagctttgtt ctgcagaaaa gaggatatga	4260
agtcaattat attggaaatt aatgcttaat acttttttta aagcatttat ctcccaatga	4320
taatgaaaac gatacgtcct atgtaattga gagtgatgaa gatttagaaa tggagatget	4380
taaggatgt ttacaattat aaaaatatta cttcaagttc ttcccaaagg acatttaatt	4440
aagtaaaata ttaactaatt ctaactagg ttctaccaca atgaaattgc tactaattat	4500
gtaacattag atttcacatt ttccaattca tgtttctttc atgtagteta taaataatgg	4560
gtagaggta atttactaat tttaaattgt ctttcttgt teettettat tttttatfff	4620
gaagacaggg tctcacteta tcaccagge tggagtgcag ttgetccate tggctcact	4680
gcaaccttca cctctgggc tcaagtgate ctctgcata agcctccga gtagctggga	4740

[0005]

ttatgggcgt gcaccacat gcccgctaa tttttatagt tttagtagag acagggtctc	4800
accatgttgt ccttgettgt ctcgaactct ttacctcaag taateccacc gccttggcct	4860
cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc accacacctg gccttggatt tcatgattg	4920
actgacatct ttacacaaa ttattgccat ttttttattg ggtaccaatt attagtattg	4980
ttttctttat tcgttaaata agaagtaaaa taactttttt ttaaaaaaag aacttttttc	5040
ctagtaaaaa gettatttte aattttttta ttgcttaaata tttgcagggt aattaagget	5100
gtgettcctt ttectacttt ctgtttaaat gtttggcatt ttttgagggt tttcttteta	5160
tggatttttg tgggggatcc catcttggtg gacacttggg tectggagat tgccaaatta	5220
ttgaaaagtt tctcatacc caaacattgg cagtagactg aataaataac atctctgaca	5280
ctatttttca attatataga gaatgetatt tgtaaaatac tgatttattt aaagatatta	5340
cagtcagtag ttttttgeaa tctttttaaa atcagtggat gtcaaaaaaca gctattgttc	5400
tttgtacagc atttttcaac attgtgaaga gttcttatac tcaaaaagtt tgggagacac	5460
agtttgatat tgtttaacct gagttgaact tgtcattttg tattcttggt tagagcaggg	5520
attttatttt gtctctttat ctaactttgt attcctattt ctttctttct ctttggttct	5580
ttgtttcttt gttcattctt ctctctctcc cttttttate tateatataa atatgtaaat	5640
atatattata tatecattag ggaagaggaa gctgtctaaa gatattctagt atataggagc	5700
tttgttctgc agaaaagagg atatgaagtc aattatattg gaaattaatg ctttaatactt	5760
ttttttaaag catttatctc ccaatgataa tgaaaacgat acgtcctatg taattgagag	5820
tgatgaagat ttagaaatgg agatgcttaa ggtatgttta caattataaa aacattactt	5880
caagttcttt ccaaaggaca tttaattaag taaaatatta actaatteta aaccaggttc	5940
caccacaatg aaattgetac taattatgta acattagatt teacatttte caattcatgt	6000
ttcttttatg tagtctatga ataatgggtt agaggtaata tactaatttt aattgtgett	6060
tctttgttcc ttcttttttt tttttttatt ttgagacagg gtctcactct gtcaccagg	6120

[0006]

ctgggggtgta gtggtgceat cttggetcac tgcaacccttc aectccaggg ctgaagtgat	6180
tetctctgeat gagcctectg agtagctggg attacaggeg tgtgccacca tacceggett	6240
atTTTTgtat tTTTTgtaga gatggggttt caccatgttg cccaggatgg tcttaaactc	6300
ctgggctcaa gtgatctact ggcctcagcc tcccagecgtg ctggggattg cagggtgtgag	6360
ccgccgcac cagcctgtg ttcttcttg tgttactttc ttgtaatTTT ttcttggaaT	6420
atgggtagtg atttgetct ccagtattga aattgagttt ctttcttcc aattcatgtg	6480
tatccatTTT tatttgaag ttttgTTTT atacattcaa taatcatett tactttctt	6540
ggtattattt actatggata ttttatatta tataatTTTc aaatggatta aatggttcag	6600
ttttactctt attattgaga ttgaaaatac tagtttataa tttatatatt ttctattcct	6660
ttacctetaa ttctttgtc aggtgttact aaccaaagat gtataataag aaaagccaat	6720
gtagctaaat taagtaaaaa atgaagaaaa acacagaagt tccccattat gcattTTTT	6780
attcctaac tttaggttga tgagatTTTT ttatTTTTat gaaatgagat taatttattg	6840
actTTTTtag ttttagggcc aagtaatgag tagtgagtaa gaatgtatat tctagggcca	6900
ggcatggtgg ctctctcatg taatctcagc actttgggag gccgaggcag gaggatcact	6960
tcattccagg agtttgagac caacctgggc aacatggcaa aacctctct ctccagaaaa	7020
atacaagaat tggetgggtg tggtgcatg tgcctttagt cccagctact tgggaggctg	7080
aggtgggagg atcacctggg gagcctgggg aggttgagge tgcagttagc catgacctg	7140
ccactgcact cttagcctggg tgacagagtg agacctgtc tcaattaaaa aattaaaaaa	7200
aaaaaagtag attgtgaatt cagatgtagg ttigtatccc agcttttcca gttagtatct	7260
gtgtgacttt ggggaagttt cttagcatct ttgatacteg gttaacagtt gtaattatta	7320
tttaaggtat tgettgagaa gagcttagta tagagcctga catttagtaa gtgtttaata	7380
catattagct aacagtaaaa ctagaacata aatactgaat tgtatTTTgt tattaattat	7440
ccatttctct gagaagtact gttccaatag tacatttata ggaaacttgt ggacgtctac	7500

[0007]

aaacgtatac attaaatetc ttagaaggca acctggatgc ceatattaga gaactctatt	7560
ttaaacaatgc attctaagta tgtttgtgga cttgaataaa ataaaaacaaa cagaaacact	7620
tctttcttct gccttcaggc ttgaaatgaa catacttttt tttaaaaaaa aaccttcaaa	7680
atgaaaaatat taaataaaaag atttaataaa aagagaaagt aaaaactgta gttaataaaa	7740
gtcttcctgt ctcttcatag ttaaaaaatg ttatagatga aacaattttg aaatattctt	7800
gaaatagata atctttatctt aggggagaat gtcagatact gtcagccaa aataaaaaaca	7860
aataacttta tttcatgttt gtaaaattcc ttttetaaaa tgatttgaat cttttgttgt	7920
tttgacaatt ccaaaacaca tttattgttt gctcatagtt tcagccttat tcagaaagaa	7980
tgcgactgac acatgatata gagaaacttg ttccaaaaat aacattaaaa tccacgttta	8040
ctacttgaga atcgaaaata ttgaggtgca ataaagaata aaatgtttta aattatccaa	8100
atttaaaaatt tatgatagct ttccccaggg gcagtttatt atatgctatt aatgagcctt	8160
gtttatgctg gaaatgttec atctttggcc ttgcgcctta gaaaccattc atgagcacat	8220
atttaaaccg gagcacacat gttcttttgt agtatggctt gcacatctgc cagctttcga	8280
caaaattgta ggccctgta ataatagtec ttttgtgttt ggtgaaaaag atacgacact	8340
gtcagtggtt ttgcttttaa gatttctttt aaactttcag tctttagaaa acctcaatag	8400
tggcacggta gaaccaactc attctaaatg cttaaaaatg gaaagaaatc tgggtcttec	8460
tactaaagaa gaagaagaag atgatgaaaa tgaagctaata gaagggaag aagatgatga	8520
taagggtaag cactgaagta tgtttgaat gactcacctg tgatacctac cactgacttt	8580
aacttaggat ccagttttgg atggtttgga ggtcaggac tttgtggcat atagttaatt	8640
attggatcct tataagcttt tgtctctta gtgcttttgt ctccataaag cacaatctta	8700
ctacttagaa aaatagagta atagcattat gatgataaaa atatctttcc ctttgttttt	8760
ttgtatttct ccaaatcatt atagctctca tttagaatta ttaaagctga gaactetaac	8820
aatgaacttt tattgtttag tggtaatta tcttgattct ttgttttggc ctttcttggc	8880

[0008]

cactcaggaa tctttcaagc tcaactgtgga cagggaaagt gacttgggta gagctaacat	8940
aacttcattg tgetgtgcag ttagaatfff gaccaaagat ggggtaact aacttttctt	9000
aactaaatga catttaggta actaaactaa acgagatfff cgtaactaaa ttttgggtga	9060
actacattta gcttaggta actaaaacga agatfffatt ttatctgtgg atttttttag	9120
tgcgggacta atgtaatttc tgattaccat taattgaagg ttggttatat tataacattt	9180
ggattgggat attgettgc atggtttgtt ctaaagtta gcttttagaa gtattcctga	9240
ttetaaaaca tcagttfff ttaatagtcc tggcaaagtg tgaatcaca caaaattcta	9300
atacttaaaa gtaatccaag tgtcacagat ggtaccaga agaccagttt gtattggaat	9360
taaaaaatag aaaacattaa cccatggtag ctgtcactgt attctttcaa agaagccaat	9420
gaaataaact gttttctccc tctatgtggt gtttttctac ttgaacataa atgcacattt	9480
tattttatff ccagactfff tgtggccagc acccaatgaa gagcaagtta cttgcctcaa	9540
gatgtactff ggceattcca gttttaaacc gtgagtataa tctcatttaa tcaaatcaca	9600
tatttagtat tctctttaaa acaagggaaa aggcaaataa cctgtctgct taacageaac	9660
agcacaactt cactatagtt atacatgcea cactgtatff tctgtgtgac tacaaaatta	9720
tttcaaagtg atatttatat aaaattcatt tctgcaaatt gtttttataa gtgaggaaaa	9780
atggttttcc tttaactgag cagttctgag tagaaactag tttaaagata cttataaata	9840
aatgttaatt taatactgac ttgtttttca ttaaacagat gtctatgtgc ctgttttgtg	9900
tatattacc cagaactgca gatgtactag aagttcttaa tacaacaatt tgaggaatag	9960
tgataatctt atctatttta atgtactcaa aatttgttta catctaacag gcacattfff	10020
gtgaggatta aatgagatga ataagaatga gatgaacaag taaatgtgaa taaaactaat	10080
aagcctgtga aaactagac tggatfffct ctattctgag aatttaaaat ataateact	10140
gaagtatttc ttctctfff tcttttgate ttaaacattt ttattttatg tcttacatac	10200
agaaaagtc acatgttgta gagatcaatg aattgtcata aactgggcac cctgtggcca	10260

[0009]

gcacttagtt aagaataggt cagtaacage atgccagaag accacctctc caattgattt	10320
ttcccatgat attttattaa gaaaattttc taagatgtag taaagttgaa agaacttttt	10380
tctgtgcatg tctgtattcc caccacctaa attcaactat cattactata cttgctttat	10440
cacatatcca tccattcata tgtctctatc catceattca ttcatccag ttttaaaatg	10500
catctcaggg tcaategagg acaccattac acttccacct aagtatttca gcatgtaa	10560
tattaacgag ttaaataatt acttaacagt tttttctttg gigtaaaatt tgcaagtaag	10620
gaaatataaa actttaagtg tacatttgca aattttaaat atacatgtgc atacceatgt	10680
aacccaaatt cttatcaaga gatattatta tcatcaccac acagagttcc ettatttccc	10740
ttttcagtea gtccttgtec ctgagcattt ctcttattat tttaaagtat tgattctttt	10800
ggatatctag tatgaagett agaattctgt ttttacttta gatgtatgta gtgaaattta	10860
atatatatac caaatggtag ttgttagtta gcttgaatgg gacattgggc aaatggcatt	10920
gtttgtttta aagttccagg ttgtgcatc tatgtatgaa gtttgaaaat aaattctatg	10980
agaggaaaatg aaaaattgaa tggattttta tttgtacctt gggtttctta ttaataaaac	11040
aaaatagctt ttgtctttc acctcaaga gttcagtgga aagtgattca ttcagtatta	11100
gaagaaagaa gagataatgt tgctgtcatg gcaactggta agttgtactt aagcaaaacc	11160
taatccttta aaaaaataaa acataaagag ttgaaatgc ttaatcttcc attaaactet	11220
caaaatacaa atgcaactac aatgatgta aactatagaa gagagtgaac aaagaacaga	11280
tgctcagatt tatgtatcaa ttagcttgaa gttcctattc tctagaaagt ataggaactt	11340
cggcccctgc aggtcaatte taccgggtag gggaggecct tttcccaagg cagtctggag	11400
catgcgcttt agcagecccc ctgggcactt ggcgctacac aagtggcctc tgccctcgca	11460
cacattecac atccaccggt aggcgccaac eggctccggt etttgggtgge ccttegcgc	11520
cacettctac tcttccccta gtcaggaagt tccccccge cccgcagctc gcgtctgca	11580
ggacgtgaca aatggaagta gcacgtctca ctagtctcgt gcagatggac agcaccgctg	11640

[0010]

agcaatggaa gcggttaggc ctttggggca gcggcccaata gcagctttgc tccttegett	11700
tetgggctca gaggetggga aggggtgggt ccgggggcgg getcaggggc gggctcagg	11760
gcggggcggg cgcccgaagg tcctccggag gcccggcatt ctgcacgctt caaaagcgca	11820
egtctgccgc gctgttctc tettectcat ctccgggeet ttegacctgc agcctgttga	11880
caattaatca tcggeatagt atatcggcac agtataatac gacaaggatga ggaactaaac	11940
catgggateg gccattgaa aagatggatt gcacgcaggt tetccggccg ettgggtgga	12000
gaggetattc ggctatgact gggcacaaca gacaatcgge tgctctgatg ccgccgtgtt	12060
ccggctgtca gcgcagggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct	12120
gaatgaactg caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttcctg	12180
cgcagctgtg ctgcagctt tcaactgaag ggggaaggac tggetgctat tgggcgaagt	12240
gccggggcag gatctctgt catctcacct tgctctgccc gagaaagtat ccatcatggc	12300
tgatgcaatg cggcgctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc	12360
gaaacatcgc atcgagcgag cacgtactcg gatggaagcc ggtcttctcg atcaggatga	12420
tetggacgaa gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggc tcaaggcgcg	12480
catgcccgac ggcgaggatc tcgtcgtgac ccatggcgat gectgcttgc cgaatatcat	12540
ggtggaaaat ggccgcttt ctggattcat cgactgtgge ccgctgggtg tggcggaccg	12600
ctatcaggac atagegttgg ctaccctgga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc	12660
tgaccgctc ctctgtctt acggtatcgc cgtctccgat tcgcagcgca tcgcctteta	12720
tcgcttctt gacgagttct tetgagggga tcggcaataa aaagacagaa taaaacgcac	12780
gggtgttggg tcgtttgtc ggatcgaagt tcctattctc tagaaagtat aggaactcc	12840
ctctgaagg tacgtgggtg aattacatgt tgctgaggaa gttgtgagta atttatgtea	12900
tttetaatca tgtggtcaga tgtctgtggt atatgagaga attttgtata caaacaatt	12960
ttactaaatg catgaaaaa aaagtccatg attttaaat gcactttctt ttgtacctt	13020

[0011]

gcaggactgt tactttttaa atccttcaaa ctigaagaaa tetgttattc tcggttcttg	13080
ggctataaga ttagcattgt actcatagaa ttataaaaat tttggttttg gaagagaagt	13140
tggagaatat aaagatttgt ctcatTTTTat agatgagaaa actgaggctc agagacaagt	13200
aatttgccca aatcacaca atgactggct gaggcaggac tggattctag gtctcttgec	13260
caaccaattc tatcatgatg taattcctaa ggagaatgtc atctcagata cacatacaca	13320
cacecatttt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt atatgtacac acacacacaa acatatgtac	13380
acttatatat acatacacac acatatatta atatatatgc atatatatgc atgttctaata	13440
tcagaacatt ttcateacte ccaaaagaac acccctgccc attaagcagt tgetttcttt	13500
acgtatatat tagtatatac atacacacga gatacacata tatttactga gttttgataa	13560
atgcatacaa agatgtaaac caaacctcta acaagataca gaataactact gacactctag	13620
aaagtttctt catgteecte cccagtctgt ccttccatcc tccatcctag gcaagcact	13680
getccgattt tctetacat agtttggtag aatgcatat aaatgcagtc acacaatatt	13740
aactcttttg tgtaagactt ctttcatttg ctgtaatgtt tetgagattc tttcatgetg	13800
ttgcatgtat cagtagtttt ttgttttggt ttgttttggt tttgtttttt cagagtcagg	13860
gtctccttct gtcaccagg ctagagtaca gtggcgcaat catagcttac tgcagcctct	13920
aactactggg etcaagctat cctcctgect ctcaagtagg ctaggctgca ggtatgttec	13980
accatgacctg getaattatt aaattttttg tagagacagg atettgcttg gttgcccagg	14040
ctggtcttga actcctggcg tcaggattgt ttccagtttt ggattattac aaataaaget	14100
gagacacata taagtctttg tatggacata tggtttcatt ttattgatac atgtcaagga	14160
gtgggatgac tggatcgtgt ggtggatata tgtttaactt tctttttct gagataaaat	14220
tagaaggcga tcctcctgce ttggetttcc aaagtgccegg gattacagge gtgaaccacc	14280
gcacctgatg cagttgttgt tgttgttgtt gttttaatat ctgattatta ttttattgta	14340
tttcattgaa tatagcacag tttgttttta cttttctta ttgatagaca cctaggctat	14400

[0012]

ttttctggtt ttggactggt actaataaag ctgctataca catecttata aaaatctttt	14460
ttgtgaacat gttttctttt tttctaagca ttttaaatca cttttattga ggtgtaattg	14520
acttacaata aattttatat gctgagaatg tataatttga taagttttga cacaggtatg	14580
cactcatgaa accatcatca caatccagat aatgaacata ttcattcacc acaaagtta	14640
cctttttggtt ttaaceccag tcaccgggta actgctgagc tccttcctgt tactgtagac	14700
tagtttgeat tttetaaact tatatacatg gagteattca tattttatgt getctttttt	14760
gtctgattta aataatgcag tataattatt ttgagattca ttcattggtat tacagtgatt	14820
aatagttcat tcctcttatt gtttaagtga ttacatttta tggatateca acaagttggt	14880
tatccattca cctgatagac atttggatcg tttccagttt tgggttatta caaataaaac	14940
tgctatgaac attcgtatgt aagtctttgt atggacatat gttttcattt tattatatat	15000
gacggagcgg aatgaactgga acatgtgatg catatatggt taactttctt ttttetaatt	15060
gagataaaat tcacagaaca taacttttac cattttaate attactaaag tccagtggtt	15120
tttggatatag taataatata taaccatcat aattaattcc agaacatttt cetaactccc	15180
aaaagaaatt ccatacccat taaggagtea ttccctattt tcccttttct tttctttctt	15240
tttttttttt ttgagtcag ggtctccctc tgtctcccgg getggagtgc acttgcata	15300
tettggttca ctgcatcctt gatttcttgg getcaattga tcctcccacc tcagtctct	15360
gagtagctgg gactgtagge atatgttacc atacctgget aatttgtttt attttgagt	15420
gagatgagat ttgctatgt tgcccagggt gctctcaaac tcctgggctc aagtaattgt	15480
ccacctcag ccttccaaa tgctgggatt acaggegtga gccactctgc cggcctatt	15540
atctctgttc tgcccacttc caaccactaa tctactttct gtctctatga tttgcctatt	15600
ctggatgttt ctataaatta acttatacat tatatggcct tttgtgtctg gcacttcca	15660
cttagcatag tgatacagt acttcattcg gtcttttttt atgaactgaat aatattccat	15720
agtatgggca tacacatttt aaaattcat tcatcagtga tggacatttg ggttgtttcc	15780

[0013]

tttttggctg ttatgaataa tgatgetgtg aacatttgtg taceaatttt tttatgaaca	15840
tacattttca acgcttttgc atatatgcct aagagtggaa ttgctgggct atatgcta	15900
tttttaagaa actatgaagc ttttgagagt gattgtatca tgggatattc ccaccagcag	15960
tgtatgagag gtccagttcc tcccatect tgctatcaact tagtetggct gatetttaac	16020
ttaagccatt ctaatagtat ctcattgtat ttttagtttg cttttcccta atgaactaatt	16080
atattgagea ttttccatac acttattgge catctgtata tcttctttga gggagtatct	16140
gttcaaatct ttgcectatt tttcttagt gagttttgat agtcatttct atattctgaa	16200
tataaattat ttatttgata tatgctttgc aaacatttcc tectagttta tggcttttca	16260
tactttccac acagttcttt tgaagagcag cagtttttca ttttgataaa gtccagttg	16320
togatteggt cttttaggga ttttgetttt agtgttttga cccaaggcca caaagattg	16380
cttttatggt ttctcctaaa agttttatag ttttaagttt tacattttaga tttacgatc	16440
atttttagta aatgttgtct attgtatgag gtattgatta cagtttatgt atttttcaca	16500
tattgttcca gtccatttt ttaaaaagac tatgetttta cactgaattg actttgtacc	16560
tttgtaaaaa ataaattgac tacatatacg tgggtctatt gctgcactct ctattctgtg	16620
ttctgtggat ctatttgtct gtcttgattg gtgtcttgat tactgtagct ttataataaa	16680
cctggaaatc aggtagcgea aggcctcttg ctttgctctt ttctttcaaa gttgttctgg	16740
ctattctatg tctttgtat ttctgtgagc atgtcagcat caccctttca acctatg	16800
ctgctgggat ttgaaatgag tttaccttga atctagatat cgaacaatt agctgtcttg	16860
atagttattg tcaccgtttt ataccgaaga aactaggcat actaaagtaa cttggctaac	16920
atcaattacc ttgtaagaag tagaactggg ctgtttgaca tcagagetta ttctttatac	16980
catttccat gtttaattaga atacaatatt aatttcataa aggtaaagge atatctgttt	17040
tgttccatatt tgattccttg tgaaagcaca atgcctagcg cacaatagac acttaaaact	17100
atctgttgaa tggacaggtg aatgctttta aagtctttcc atatagaaaa ttaagtttca	17160

[0014]

ttacatttga	cttgatctag	gttttcattt	catagaatgg	agagcagact	ctgtaaatat	17220
tttgcctcag	acctagettt	attacaaaca	ttgtettaat	taggattctg	tctaccaga	17280
atagaaatta	actcaagcta	gcatgagtgt	atattgaaat	ttatattaag	gataaaggaa	17340
tgtctcatag	atcccactca	aaagaaatta	gccagccctt	aggaagagac	tggaattggg	17400
tttggaaaat	acaataggte	tttcttttta	tctgtagtct	ttagtgagtc	ttcctcattt	17460
ttctctctga	agagataage	attctctgca	tatatatage	attcttttag	attttctgta	17520
cataaagtat	tatttaaact	ttcataaggt	atcttgattt	taagttgtaa	ttccttgaga	17580
tgattgtttt	ctttattggt	aatatgttct	ccttctctgt	tttttttttt	tcttttttct	17640
tttgtttggt	tttacagagg	taaataccgg	attgtatacg	taactccaga	atactgttca	17700
ggtaacatgg	gcttctcca	gcaacttgag	gctgatattg	gtaagtgata	aagaaagatc	17760
tctgtaaata	cttactgagt	taatatttaa	agttaaacct	atggatggac	actggatttc	17820
acttctgtta	aagtttattt	caaacattac	ttcctccagg	aaatctctga	ctctctaaact	17880
tgtcttttca	cctatcttat	cccatgatac	tctataatct	cttttctctat	agaaattagg	17940
ctctgttctc	ataattacct	gtttatatat	ctgttttctt	ctgctaggct	ataaaccttt	18000
caagggaaaa	atatcacttt	ttaaaattta	tgttttccca	gtgcagtgtc	tggcatatag	18060
gcacttaaac	atattgttga	atgaatgttg	aatcctaggt	tctgtgaaat	tttaatttac	18120
ttgtttttca	tgttctgtat	ctaaattaag	tcagtgtagt	ggttttgtac	cctctttggt	18180
cataagaatc	acttttcaaa	ctttaaaaaa	aatgtaggta	accaacaccc	aactctgaaa	18240
attctgattt	aacaggectg	ggttggcacc	tggcattggg	ggtttctcac	aggtgattct	18300
gatatatage	ccgggttggg	aaccacagta	cctttgatta	gttggcacta	gtgagtatga	18360
tttattacaa	aaacaaaaaa	cttagataag	tcacagttta	tttcttagaa	egtgtaaata	18420
tagaattagt	caaaagctga	tagcactttt	tttgtactta	aaaatatttt	aagcctcagt	18480
atagtgagac	ctcatctcta	caataatttt	tttaaaaaat	tggccgagcc	tgggtggtgca	18540

[0015]

tgcccatagt ccaagctact tgggaggctg aggtaggagg attgtttgag cctgggagat	18600
gaaggctgcg gtgagccaag atcatgctac tgcactccat cctgggcaac agagcgagac	18660
catgcctcaa aaaaaatitt tttttcttct tgggtggttag gcttaactat ccaagaattg	18720
caatcatggc tctattgca aatgccccta tttcecaect tcagttggcc taaccaaatt	18780
taatitttca atatecatatg atctttttgt ataattatgt attcaaataa ttccagatag	18840
gttaggtttt egaattgcaa cgtctcattt aatggttact ttcataatac tgtaggaaag	18900
catttgataa tttttccaac aatgtaatga aaacaaactt gtatcttttt tattatgtgt	18960
taaaaccaac aaaagaatga gggcagcaat taacatttca ttaaataat tagcaatgag	19020
tacatttatg agctcttaaa ctcccttatt gacatactgt attttttggc tttaatggac	19080
aatgaatttg atatgtttcc taataggttg tatgaagtta ttgtgaatat ttcactttgg	19140
attaagaata actacectat atataaattt catggttgta ttgcaaaaagc tggggctctat	19200
gtccatagtg gtttgggtac gtttttacta tttgctttgt ttctgtgata gtgttaaattg	19260
aataataage ttaagtattt aagcaaatac ttaatacttc tgacaagtag ttagaactct	19320
ctatittttgt ttttttgtaa tggatgagtt atggacactg caattattag agcagcgtac	19380
tttgcttatg atggatgaaa atgttctctg gttgactcag tgttgaataa aaagggatac	19440
atgaaaataaa aattatittt gaaatatttt cctttgcctt ttgttgcggg aaattgtaca	19500
atgcttgcaa aatgaatat acgcaggata ttatttgtac agcagtctga catttagcta	19560
atcagattcc tcatttttag gtaaattgta aattaactta gtagtctgga tttttaacag	19620
aaacagcaaa catagtittt tagggaggct ccttaccaac cagactttta acttaagtga	19680
atgttggcaa aagcttgtct aaactgattt ccagggataa ggtttagctc cattaaaagc	19740
tagtttgtea aacctgtaac taaagctttt taaaaaatga aagtttttaa agagaccatc	19800
attctgtttt aacctattta atttaaaate tgggetgaag taggagtatt gcttgaacce	19860
aggagttega gaccagectg ggcaacacag tgagacccca tctctgaaaa aaaaaaatga	19920

[0016]

gctgagcatg gtacctgtta cagtgetagt tatgaaagaa agaaagagag agagagagaa	19980
ggaaggaagg gagaaaggaa ggaaggggct gggagtgggt gctcacacct gtaatcccag	20040
cactttggga ggccgaggcg ggtggatcat gaggtcagga gatcgagacc atcctggcga	20100
acatggtgaa accctgtctc tactaaaaat acaaaaagaa aaaattagcc gggcatgggt	20160
gtgggtgcct gtagtcccag ctactgggga gggttaaggca ggagaatggc atgaacccgg	20220
gaggcagagc ttgcagtgag ccgagattgc gccactgcac tttagcetaa gaaaaggaag	20280
gaaggaagga aggaaggaag gaaggaaaa tcagtcactc actcaggttt agtttcaaaa	20340
gcaaaaacag tgataatatt gaatttttc cagccactca gtagtacca gagaattttg	20400
atacaaataa ctgactttga ccccatgttt agtaggtttt tttttgttt gtttgtttgt	20460
ttttttttt tgtctttctt ctccacactc tcttaggact gttgtagett gtaatgttag	20520
tgaattgtaa ttgtttattt gcatgtctgt ctctctttt agaattgtga actcctcagg	20580
tcatggattg tattttatta gtctttttat tccatagaaaa gtgtttggat aataatagat	20640
atttattaac cataatagga gtagtagcat ttttgtgtgt gtgtgccagg cccatattta	20700
gcattttatg tgaatgatat aatttaattt ttagagcatt tagaaaaatgt taggtaccat	20760
tattatecac attttacttg tgagaggact gagacttggga aagcttaagt aacttgetta	20820
aggtaataca catggcagat ggtggagcca ggttctgcat ctgggeagtc tgactttaga	20880
gctttttaat catctctctc ctagtgtecg aacattatta atgctcagag aagtatcaaa	20940
gaatgatgat actcattgag ggaaaaaatt attcttaagt atcaatttgt taattgagga	21000
caaaagcact actgttacta ctgtgaaaaa tctgaaaaca ttgtcagga tgattttaca	21060
ataacatctt tttctgacat gcattacaac aactattga ttcctttca atgtttgtgt	21120
ctggtatggg ggccgagtag agagctact acaggaagaa agaacaata acatttcttc	21180
ttactacttt gtgcateatg tgatttagct cctcccatac cattttacat tagaaa	21236

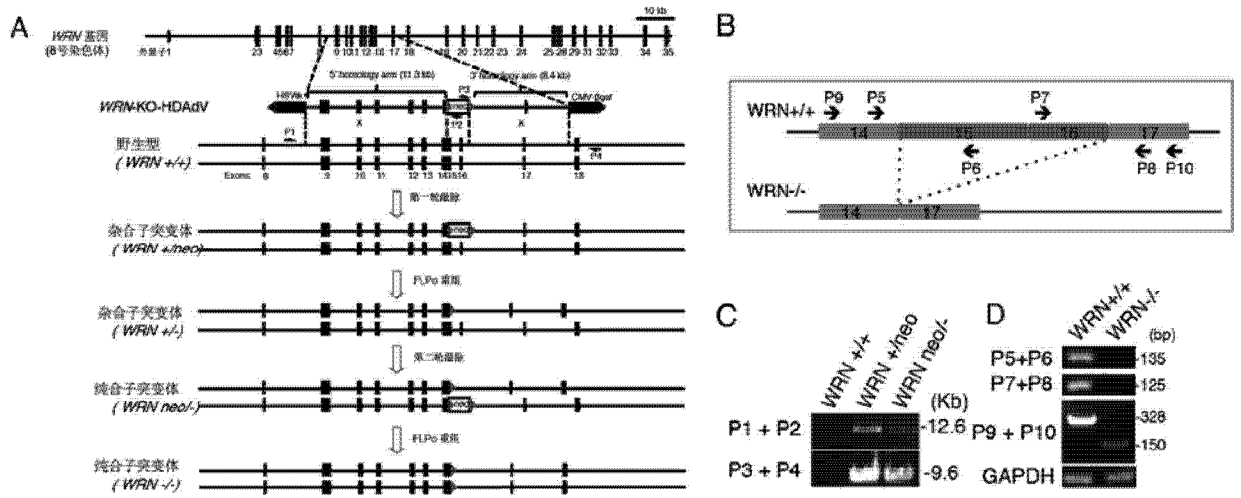


图 1

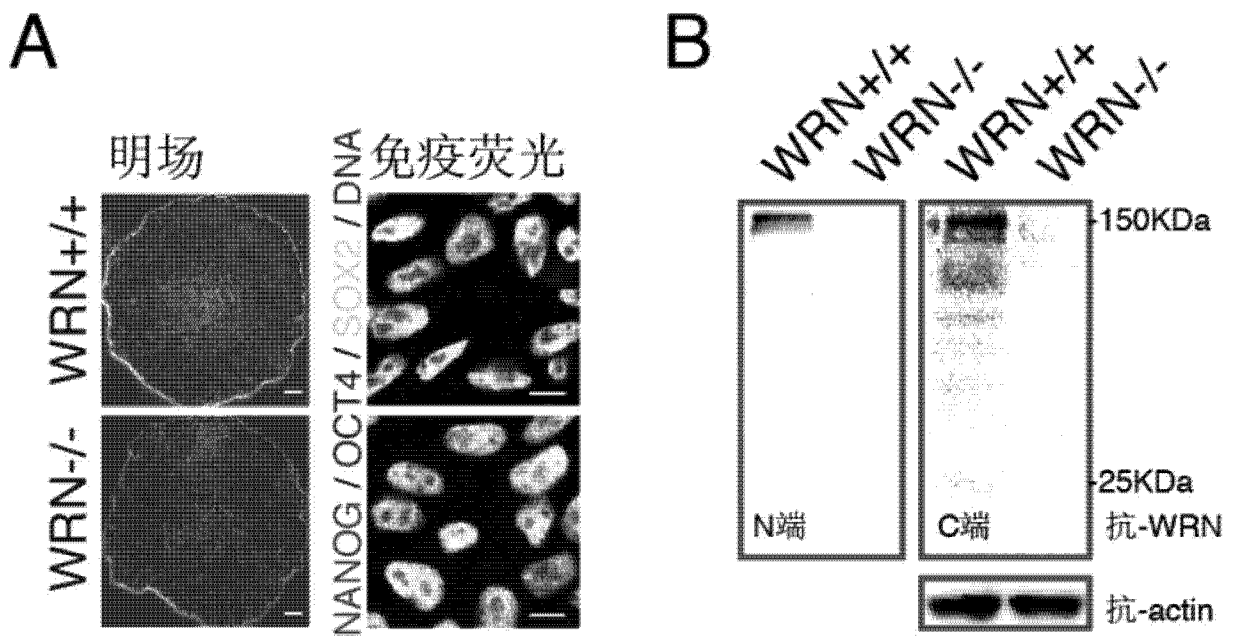


图 2

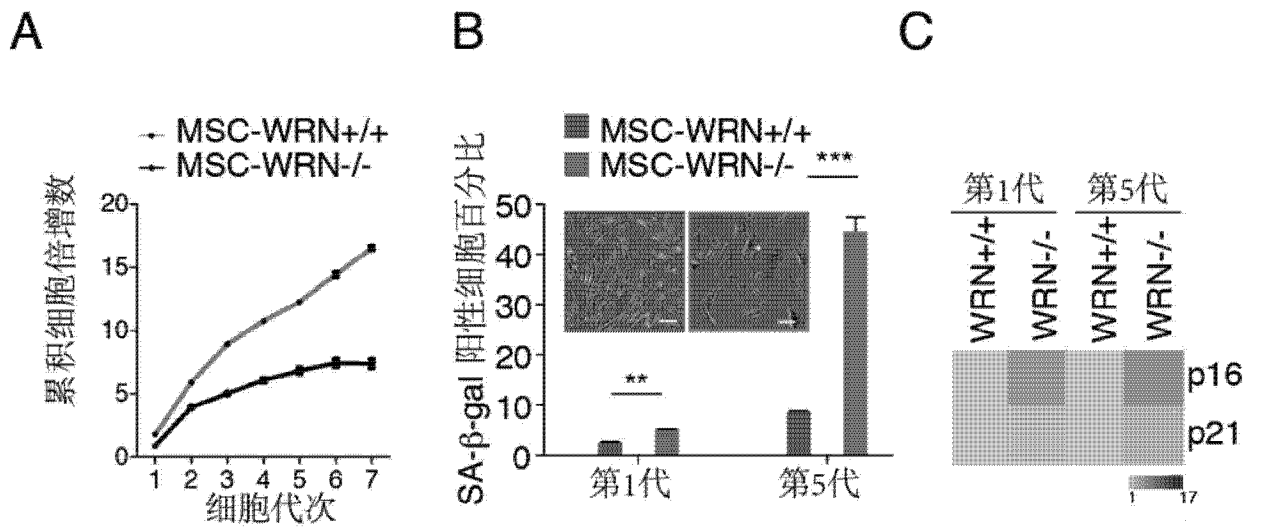


图 3

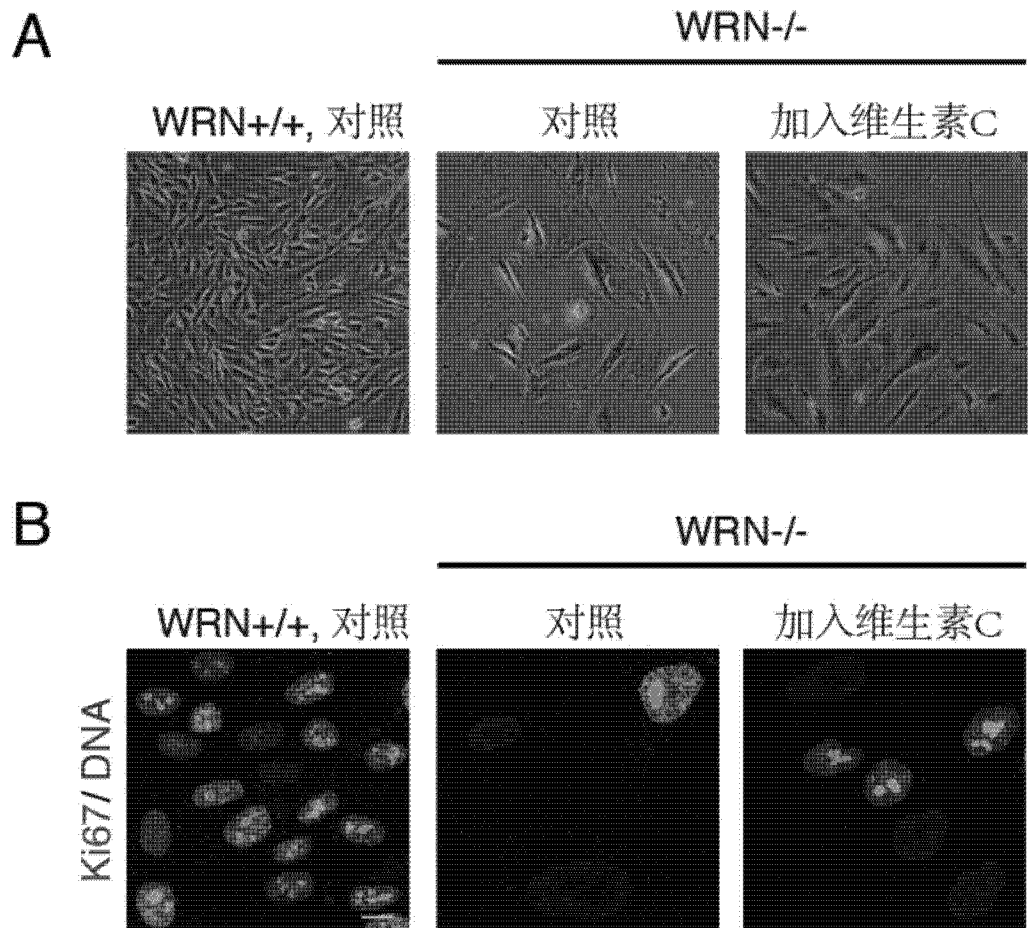


图 4