

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910090069.7

[51] Int. Cl.

C12N 5/06 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月30日

[11] 公开号 CN 101613676A

[22] 申请日 2009.7.27

[21] 申请号 200910090069.7

[71] 申请人 中国科学院生物物理研究所

地址 100081 北京市朝阳区大屯路中国科学院生物物理研究所

[72] 发明人 朱卫彬 唐捷 贾俊英 李娜

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅 任凤华

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

[54] 发明名称

一种鼠骨髓瘤细胞 NSO 及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了一种鼠骨髓瘤细胞 NSO 及其制备方法与应用。该鼠骨髓瘤细胞 NSO 是一种能在无血清、无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO，其中一株(NSO - Ch1)保藏号为 CGMCC No. 2127。用本发明的能在无血清、无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 表达外源蛋白，既能保证细胞培养效率和表达效率，又可避免带来其它动物来源成分及不安全因素，进而可以有效降低纯化成本和损失，提高生物制品成品率和利润率。

1、一种在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO，是按照包括如下步骤的方法得到的：

(1) 将鼠骨髓瘤细胞 NSO 接种于含血清的细胞培养基中进行原代培养；

(2) 将步骤 (1) 得到的鼠骨髓瘤细胞 NSO 进行传代培养，传代培养过程中每代所用的细胞培养基中血清浓度均在前一代培养中所用细胞培养基中血清浓度的基础上进行稀释；

(3) 当传代培养至所用的培养基中血清浓度为 0.2-0.3%（体积百分含量）时，用 5-氮胞苷处理传代培养后的鼠骨髓瘤细胞 NSO；

(4) 将步骤 (3) 处理后的鼠骨髓瘤细胞 NSO 接种至无血清、含有牛血清白蛋白的细胞培养基中培养；

(5) 将步骤 (4) 获得的细胞接种至无血清且不含牛血清白蛋白的细胞培养基中培养；得到在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO。

2、根据权利要求 1 所述的细胞，其特征在于：所述步骤 (2) 中，所述稀释的倍数为 2 倍。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的细胞，其特征在于：所述步骤 (2) 中，所述传代培养过程中所用的培养基是按照如下方法得到的：将含 1-2%（体积百分含量）牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基与等体积的前一代培养所用的培养基进行混匀；

所述步骤 (4) 中所用的无血清、含有牛血清白蛋白的细胞培养基为无血清、含 1-2%（体积百分含量）牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基；

所述步骤 (5) 中的无血清且不含牛血清白蛋白的细胞培养基为无血清、无牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基。

4、根据权利要求 1-3 中任一所述的细胞，其特征在于：所述步骤 (3) 中用 5-氮胞苷处理的方法为用 4.5-5.5 μ M 5-氮胞苷将细胞处理 48-50 小时。

5、根据权利要求 1-4 中任一所述的细胞，其特征在于：所述脂类为胆固醇和/或低密度脂蛋白和/或大豆磷脂和/或亚油酸和/或油酸。

6、根据权利要求 1-4 中任一所述的细胞，其特征在于：所述细胞为鼠骨髓瘤细胞 NSO NSO-Ch1，其保藏号为 CGMCC No. 2127。

7、一种制备在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 的方法，包括如下步骤：

(1) 将鼠骨髓瘤细胞 NSO 接种于含血清的细胞培养基中进行原代培养；

(2) 将步骤(1)得到的鼠骨髓瘤细胞 NS0 进行传代培养, 传代培养过程中每代所用的细胞培养基中血清浓度均在前一代培养中所用细胞培养基中血清浓度的基础上进行稀释;

(3) 当传代培养至所用的培养基中血清浓度为 0.2-0.3% (体积百分含量) 时, 用 5-氮胞苷处理传代培养后的鼠骨髓瘤细胞 NS0;

(4) 将步骤(3)处理后的鼠骨髓瘤细胞 NS0 接种至无血清、含有牛血清白蛋白的细胞培养基中培养;

(5) 将步骤(4)获得的细胞接种至无血清且不含牛血清白蛋白的细胞培养基中培养; 得到在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NS0。

8、根据权利要求 7 所述的方法, 其特征在于: 所述步骤(2)中, 所述稀释的倍数为 2 倍。

9、一种培养权利要求 1 中所述在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NS0 的方法, 是将所述在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NS0 接种于 pH 为 7.4-7.6、无胎牛血清、无牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基中, 在 36.5-37.5°C 条件下培养。

10、权利要求 1 至 6 中任一所述在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NS0 在生产外源蛋白中的应用。

一种鼠骨髓瘤细胞 NSO 及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及一种鼠骨髓瘤细胞 NSO 及其制备方法与应用。

背景技术

哺乳动物细胞大规模发酵是确保抗体药物能够批量生产供应临床使用的基础，也是现代生物制药领域中最为核心的技术。美国食品药品监督管理局在 2000 年 1 月-2004 年 12 月批准上市的 31 种生物技术药物中，约 70% 为哺乳动物细胞表达的重组蛋白。目前国际上主要用 CHO、SP2/0、NSO 等三种细胞系生产重组蛋白治疗药物。例如治疗淋巴瘤的 Rituximab，治疗类风湿性关节炎的 Infliximab，和预防急性器官排斥的 Daclizumab 分别是用 CHO，NSO 和 SP2/0 表达的。

目前我国批准上市的由哺乳动物细胞表达得到的药物产品很少，只有促红细胞生成素（EPO）、CHO 基因工程乙肝疫苗、以及最近批准上市的治疗性抗体药物益赛普（有效成分相当于美国食品药品监督管理局批准的 Enbrel）和泰欣生（有效成分相当于美国食品药品监督管理局批准的 Erbitux）等少数几种生物技术药物。主要是由于哺乳动物细胞表达的技术复杂和控制要求高，而这已成为我国生物技术药物产业化最难跨越的“门槛”。

NSO 细胞是小鼠浆细胞瘤细胞，与 CHO 细胞最大的区别在于 NSO 细胞不需要基因扩增的过程就可以得到高表达细胞株。这一特点不但可以节约 6 个月的工程细胞株开发时间，而且可以大大简化药物申报时对细胞株稳定性的鉴定工作。而且 NSO 细胞是悬浮培养的细胞，不需要从贴壁到悬浮的驯化过程，这也是其相对于 CHO 细胞的优势之一。因此，加强对 NSO 细胞的研究，从而实现用 NSO 细胞株大规模生产药物产品，将会对我国的生物技术药物产业化产生重要意义。

目前，在细胞培养过程中普遍使用含有牛血清的细胞培养液，但是牛血清的使用能带来其它动物来源成份、杂蛋白及一些不安全因素，这些成份越多，纯化就越复杂、纯化成本也越高，生物制品原液损失越大，而且牛血清的成本远远高于培养液中其它成份的成本，所以使用牛血清会大大提高生物制品的成本。因此采用低血清、无血清培养液培养细胞不但可以有效降低纯化成本和产品损失，而且还可以降低细胞培养液的总成本，进而能提高生物制品成品率和利润率。采用无血清无动物来源成分培养基进行细胞培养制药是 21 世纪生物制药发展趋势，美国 FDA 和美国农业部已经严格控制细胞培养中胎牛血清的使用。

细胞膜脂类的构成和膜流动性可影响细胞的功能。膜流动性也受到脂肪酸、磷脂和胆固醇的影响。多数细胞系需要脂类维持在无血清培养基中生存，脂类难溶于水，常与白蛋白一起加入或制成微乳，才能起到较好的效果。常见的添加脂类为胆固醇、低密度脂蛋白、大豆磷脂和亚油酸或油酸。但脂类的添加会引入动物来源成分，增加感染几率和纯化难度，同样会增加纯化成本。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO。

本发明所提供的在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO，是按照包括如下步骤的方法得到的：

(1) 将鼠骨髓瘤细胞 NSO 接种于含血清的细胞培养基中进行原代培养；

(2) 将步骤 (1) 得到的鼠骨髓瘤细胞 NSO 进行传代培养，传代培养过程中每代所用的细胞培养基中血清浓度均在前一代培养中所用细胞培养基中血清浓度的基础上进行稀释；

(3) 当传代培养至所用的培养基中血清浓度为 0.2-0.3% (体积百分含量) 时，用 5-氮胞苷处理传代培养后的鼠骨髓瘤细胞 NSO；

(4) 将步骤 (3) 处理后的鼠骨髓瘤细胞 NSO 接种至无血清、含有牛血清白蛋白的细胞培养基中培养；

(5) 将步骤 (4) 获得的细胞接种至无血清且不含牛血清白蛋白的细胞培养基中培养；得到在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO。

步骤 (2) 中，所述稀释的倍数优选为 2 倍。

步骤 (2) 中，所述传代培养过程中所用的培养基是按照如下方法得到的：将含 1-2% (体积百分含量) 牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基与等体积的前一代培养所用的培养基进行混匀。

步骤 (4) 中，所用的无血清、含有牛血清白蛋白的细胞培养基为无血清、含 1-2% (体积百分含量) 牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基；

步骤 (5) 中，所用的无血清且不含牛血清白蛋白的细胞培养基为无血清、无牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基；

步骤 (1) 中，所述含血清的细胞培养基为在 RPMI1640 培养基中添加血清至终浓度为 8-10% 得到的培养基。

步骤 (3) 中，用 5-氮胞苷处理的方法为用 4.5-5.5 μ M 5-氮胞苷 (5-azacytidine) 将细胞处理 48-50 小时。

所述杂交瘤无血清培养基可以从市面上的生物试剂公司购买得到,如 Invitrogen 公司 (Catalog Number:12045)。

所述脂类为胆固醇和/或低密度脂蛋白和/或大豆磷脂和/或亚油酸和/或油酸。

上述在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 具体可为鼠骨髓瘤细胞 NSO NSO-Ch1, 该细胞株已于 2007 年 8 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC, 地址: 北京市朝阳区大屯路, 中国科学院微生物研究所, 邮编 100101), 保藏号为 CGMCC No. 2127。

本发明的另一个目的是提供一种制备在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 的方法。

本发明所提供的制备在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 的方法, 包括如下步骤:

(1) 将鼠骨髓瘤细胞 NSO 接种于含血清的细胞培养基中进行原代培养;

(2) 将步骤 (1) 得到的鼠骨髓瘤细胞 NSO 进行传代培养, 传代培养过程中每代所用的细胞培养基中血清浓度均在前一代培养中所用细胞培养基中血清浓度的基础上进行稀释;

(3) 当传代培养至所用的培养基中血清浓度为 0.2-0.3% (体积百分含量) 时, 用 5-氮胞苷处理传代培养后的鼠骨髓瘤细胞 NSO 细胞;

(4) 将步骤 (3) 处理后的鼠骨髓瘤细胞 NSO 细胞接种至无血清、含有牛血清白蛋白的细胞培养基中培养;

(5) 将步骤 (4) 获得的细胞接种至无血清且不含牛血清白蛋白的细胞培养基中培养; 得到在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO。

其中, 步骤 (2) 中, 所述稀释的倍数优选为 2 倍。

步骤 (2) 中, 所述传代培养过程中所用的培养基是按照如下方法得到的: 将含 1-2% (体积百分含量) 牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基与等体积的前一代培养所用的培养基进行混匀。

步骤 (4) 中, 所用的无血清、含有牛血清白蛋白的细胞培养基为无血清、含 1-2% (体积百分含量) 牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基;

步骤 (5) 中, 所用的无血清且不含牛血清白蛋白的细胞培养基为无血清、无牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基;

步骤 (1) 中, 所述含血清的细胞培养基为在 RPMI1640 培养基中添加血清至终浓度为 8-10% 得到的培养基。

步骤 (3) 中, 用 5-氮胞苷处理的方法为用 4.5-5.5uM 5-氮胞苷 (5-azacytidine) 将细胞处理 48-50 小时。

所述杂交瘤无血清培养基可以从市面上的生物试剂公司购买得到,如 Invitrogen 公司 (Catalog Number:12045)。

所述脂类为胆固醇和/或低密度脂蛋白和/或大豆磷脂和/或亚油酸和/或油酸。

本发明的另一个目的是提供一种培养所述在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 的方法。

本发明所提供的培养方法为将所述在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 接种于 pH 为 7.4-7.6、无胎牛血清、无牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基中,在 36.5-37.5℃ 条件下培养。

上述任一所述在无血清无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 在生产外源蛋白中的应用也属于本发明的保护范围。

本发明的能在无血清、无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO, 在无血清、无脂类培养基中的培养效率高, 细胞密度可达 $(1-2) \times 10^6$ 个/ml, 培养得到的 NSO 细胞能表达目的外源蛋白, 且表达能力强, 可达 $(8-12)$ pg/cell/24h。用本发明的能在无血清、无脂类培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 表达外源蛋白, 既能保证细胞培养效率和表达效率, 又可避免带来其它动物来源成分及不安全因素, 进而可以有效降低纯化成本和损失, 提高生物制品成品率和利润率, 还能降低培养成本。

附图说明

图 1 为载体 PCI-CSP 的图谱。

图 2 为载体 PCI-gpt 的图谱。

具体实施方式

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。

下述实施例中所使用的试剂如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

实施例 1、制备能在无血清、无脂类的培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO

一、制备

鼠骨髓瘤细胞 NSO 细胞购自 ECACC (The European Collection of Animal Cell Culture)。

(1) 将细胞置于细胞培养基 I 中, 在 37℃ 条件培养 3 天; 细胞培养基 I 的组成为: 含 10% (体积百分含量) 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 (表 1), pH 值为 7.4。

(2) 进行一次细胞传代培养: 将细胞置于细胞培养基 II 中, 在 37℃ 条件培养 3 天; 细胞培养基 II 的组成为: 在原含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中 (即细胞培养基 I), 加入等体积的 pH 为 7.4、含 1% (体积百分含量) 牛血清白蛋白 (BSA) 的杂交瘤无血清培养基 (Invitrogen 公司 Catalog Number:11279-023), 使细胞培养基

II 中胎牛血清终浓度降至 5%。

(3) 进行二次细胞传代培养：将细胞置于细胞培养基III中，在 37℃ 条件培养 3 天；细胞培养基III的组成：向细胞培养基 II 中加入等体积的含 1% BSA 的杂交瘤无血清培养基，使细胞培养基III中胎牛血清终浓度降至 2.5%。

按照 (3) 中所述方法进行传代，每代所用的培养基的组成：是向前一代培养所用的培养基中，加入等体积的含 1% BSA 的杂交瘤无血清培养基。

(4) 如步骤 (3) 中所述方法进行传代，至培养基中胎牛血清浓度降至 0.2% 时，以 5 μ M 5-氮胞苷 (5-azacytidine) 将细胞处理 48 小时，然后将细胞移至无胎牛血清、含 1% BSA 的杂交瘤无血清培养基中 37℃ 培养 7-10 天后，细胞恢复对数增长。

(5) 将步骤 (4) 得到的细胞在无胎牛血清、无牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基 (pH 为 7.4) 中，37℃ 培养 7-10 天，细胞恢复对数增长。

共获得 5 株可在该无胎牛血清、无牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NS0。将其中的一株 (名称为 NS0-Ch1) 于 2007 年 8 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，其保藏编号为 CGMCC No. 2127。

二、培养

将鼠骨髓瘤细胞 NS0-Ch1 CGMCC No. 2127 置于上述无胎牛血清、无牛血清白蛋白的杂交瘤无血清培养基 (pH 为 7.4) 中，培养条件为：37℃, 5% CO₂，每 3-5 天传代一次，三次重复实验的结果表明细胞密度高达 (1-2) $\times 10^6$ 个/ml。

表 1 RPMI1640 培养基的组成

序号	化合物名称	含量 (mg/L)	序号	化合物名称	含量 (mg/L)
1	L-精氨酸盐酸盐	240.00	21	硝酸钙	69.50
2	L-天门冬酰胺-水物	56.80	22	硫酸镁	48.80
3	L-天门冬氨酸	20.00	23	磷酸二氢钠	677.00
4	L-半胱氨酸盐酸盐-水物	72.90	24	氯化钾	400.00
5	L-谷氨酸	20.00	25	氯化钠	6000.00
6	甘氨酸	10.00	26	葡萄糖	2000.00
7	L-组氨酸盐酸盐-水物	20.30	27	谷胱甘肽	1.00
8	L-羟脯氨酸	20.00	28	酚红	5.00
9	L-异白氨酸	50.00	29	丁二酸钠 6 水物	164.00
10	L-白氨酸	50.00	30	丁二酸	46.00
11	L-赖氨酸盐酸盐	40.00	31	生物素	0.20
12	L-甲硫氨酸	15.00	32	泛酸钙	0.25

13	L-苯丙氨酸	15.00	33	叶酸	1.00
14	L-脯氨酸	20.00	34	肌醇	35.00
15	L-丝氨酸	30.00	35	烟酰胺	1.00
16	L-苏氨酸	20.00	36	氯化胆碱	3.00
17	L-色氨酸	5.00	37	盐酸吡哆醇	1.00
18	L-酪氨酸	20.00	38	核黄素	0.20
19	L-缬氨酸	20.00	39	盐酸硫胺素	1.00
20	P-对氨基苯甲酸	1.00	40	维生素 B 12	0.005

杂交瘤无血清培养基购自 invitrogen, 货号: 12045。

实施例 2、用鼠骨髓瘤细胞 NS0-Ch1 CGMCC No. 2127 生产人 TNF- α 可溶性受体
将编码人 TNF- α 二型受体胞外段的 cDNA 序列与编码人免疫球蛋白 IgG1 Fc 段的 cDNA 序列通过 PCR 构建成重组基因 (TNFR-Fc) (序列表中序列 1 所示); 将 TNFR-Fc 插入到有选择性标记 (鸟嘌呤磷酸核糖转移酶, gpt) 和基因表达调控区 (CMV 启动子, 终止子) 的表达载体 pCI-gpt 的 Xba1 和 Xho1 位点, 得到该重组蛋白表达载体 pCI-gpt-TNFR-Fc。用限制性内切酶 FspI 将 pCI-gpt-TNFR-Fc 线性化, 用电转染的方法将其导入到 NS0-Ch1 (CGMCC No. 2127) 细胞中。用霉酚酸酯 (Mycophenolate) 在含黄嘌呤 (Xanthine) 的培养基中筛选转染细胞, 获得稳定转染的细胞株。

将转染成功的细胞在无胎牛血清、无脂类的杂交瘤无血清培养基 (pH 为 7.4) 中培养三天, 用 ELISA 鉴定 TNFR-Fc 的分泌, ELISA 板上包被 goat anti huIgG(H+L) (KPL, 货号: 01-10-06) 一抗为转染后的细胞上清, 二抗为 HRP-goat anti-HuIgG(r) (KPL # 074-1002)。

三次重复实验的结果表明细胞密度可达 $(1-2) \times 10^6$ 个/ml, 目的外源蛋白的表达量可达 8-12 pg/cell/24h。

pCI-gpt 的构建步骤:

1、PCI-CSP 质粒的构建:

所述 PCI-CSP 是在 pCI-neo (Promega Cat. # E1841) 基础上构建的。具体步骤如下:
以 pCI-neo 为模板, PCR 扩增 CMV Enhancer/promoter 序列, 5' 和 3' 端分别带有 BglIII 和 XbaI-XhoI 位点 (F1) (引物序列为:
GGCTCGACAGATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCA、
CTCGAGTCTAGAGATCTGACGGTTCCTAAACGAGCTCT), 扩增得到的 CMV Enhancer/promoter 序列如序列表中序列 3 所示; 以 pCI-neo 为模板, PCR 扩增 SV40 late polyA 至 SV40

enhancer/early promoter 序列, 5' 和 3' 端分别带有 XbaI-XhoI 和 HindIII-SalI 位点(F2) (引物序列为 CAGATCTCTAGACTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGG、GTCGACAAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCT), 扩增得到的 SV40 late polyA 至 SV40 enhancer/early promoter 序列如序列表中序列 4 所示; 利用以上 F1 和 F2 片段为模板进行 PCR 扩增, 将两个片段连接成一个片段(F3) (引物序列为 GGCTCGACAGATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCA、GATATTTTATTGTCGACAAGCTTTTTGCAAAAGCCTAGGCCT)。随后利用两条互补引物退火方法合成 synthetic poly(A) 序列, 5' 和 3' 端分别带有 HindIII-SalI 和 BamHI 位点(F4); 两条互补引物为:

AAGCTTGTGACAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGGGATCC, GGATCCCACACAAAAACCAACACACAGATGTAATGAAAATAAAGATATTTTATTGTCGACAAGCTT, 等量混和后, 煮沸 5 分钟, 自然降温至室温。以 F3 和 F4 片段为模板进行 PCR 扩增 (引物序列为 GGCTCGACAGATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCA, GGATCCCACACAAAAACCAACACACAGATG), 将两个片段连接成一个片段(F5)。用 BglIII 和 BamHI 酶切 F5 片段, 连接到 BglIII 和 BamHI 酶切后的 pCI-neo 载体上, 完成 PCI-CSP 构建。物理图谱见图 1。

2) pCI-gpt 的构建步骤: 用限制性内切酶 HindIII 和 XhoI 酶切序列表中序列 2 所示的 gpt DNA 片段, 连接到 HindIII 和 SalI 酶切后的 pCI-CSP 载体上, 得到重组载体 PCI-gpt。重组载体 PCI-gpt 的物理图谱见图 2。

序列表

<110>中国科学院生物物理研究所

<120>一种鼠骨髓瘤细胞 NS0 及其制备方法与应用

<160>4

<210>1

<211>1488

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

atggcgcccg	tcgccgtctg	ggccgcgctg	gccgtcggac	tgagctctg	ggctgcggcg	60
cacgccttgc	ccgeccaggt	ggcatttaca	ccctacgcc	cggagcccgg	gagcacatgc	120
cggtcagag	aatactatga	ccagacagct	cagatgtgct	gcagcaaatg	ctcgccgggc	180
caacatgcaa	aagtcttctg	taccaagacc	tcggacaccg	tgtgtgactc	ctgtgaggac	240
agcacataca	cccagctctg	gaactgggtt	cccagatgct	tgagctgtgg	ctcccgtgt	300
agctctgacc	aggtggaaac	tcaagcctgc	actcgggaac	agaaccgcat	ctgcacctgc	360
aggcccggct	ggtactgcgc	gctgagcaag	caggaggggt	gccggctgtg	cgcgccgctg	420
cgcaagtgcc	gcccgggctt	cggcgtggcc	agaccaggaa	ctgaaacatc	agacgtggtg	480
tgcaagccct	gtgccccggg	gacgttctcc	aacacgactt	catccacgga	tatttgcagg	540
cccaccaga	tctgtaacgt	ggtggccatc	cctgggaatg	caagcatgga	tgagctctgc	600
acgtccacgt	ccccaccgcg	gagtatggcc	ccaggggcag	tacacttacc	ccagccagtg	660
tccacacgat	ccaacacac	gcagccaact	ccagaacceca	gcactgctcc	aagcacctcc	720
ttctgctcc	caatgggccc	cagcccccca	gctgaaggga	gcactggcga	cttcgctctt	780
ccagttggag	agcccaaate	ttgtgacaaa	actcacacat	gccaccgtg	cccagcacct	840
gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttctcc	ttcccccaaa	aaccaagga	caccctcatg	900
atctcccgga	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtcgacg	tgagccacga	agaccctgag	960
gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaaagac	aaagccgcgg	1020
gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	1080
tggtgaaatg	gcaaggagta	caagtgcaag	gtctccaaca	aagccctccc	agccccatc	1140
gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgccc	1200
ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	gtcagcctga	cctgcctggt	caaaggcttc	1260
tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	1320
accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	gctcaccgtg	1380
gacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgtc	ttctcatgct	ccgtgatgca	tgagggtctg	1440

cacaaccact acacgcagaa ggcctctcc ctgtctccgg gtaaata 1488

<210>2

<211>459

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

atgagcga	aaatacat	cgtcac	ctgggac	atgttgc	agatacc	atgcacg	taaac	tcgca	60
agccgact	gagctct	gacaaca	atggaaa	ggcatt	attgcc	taagccg	tggcg	gtctg	120
gtaccggg	tgccttg	gcgtgaa	ctggat	tcgctc	atgctga	tacgttt	gtatt	180	
tccagcta	ctacgac	aaacag	cgcgag	cttaaag	tgtacgc	gaaag	gcgat	240	
ggcgaagg	ctcatcg	tattgat	gacctg	gtggata	ccgtgga	ctgctg	gatt	300	
cgtgaaat	gtatcaa	aagcgc	actttgt	accatct	tcgcaaa	accggc	tggct	360	
ctggttga	tactatg	tgtatc	cccgca	agatact	ggattga	acagcc	gtgat	420	
atgggcgt	ctctatt	ctccgca	aatctcc	gtctgct	aa			459	

<210>3

<211>750

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

tcaatatt	ggccatt	agccat	tattatt	catctg	tattata	gcataaa	tcaat	atattg	gcta	60
ttggcc	attgc	atacgt	tgtat	atata	tcaata	atgtac	atttat	attg	gctcat	120
aatatg	accgcat	gtttgg	ctgatt	attg	actagt	tataat	caattac	ggg		180
gtcatt	agttcat	agccat	atattg	gagtt	ccgcgt	taca	taactta	cggt	taa	240
gcctgg	ctgac	cgccca	accgccc	attgac	gtca	ataatg	acgt	atgtt	cccat	300
agtaac	gccaat	ataggg	acttcc	attgac	gtgag	tatttt	acgt	aaact	gc	360
ccactt	ggcgt	gtacat	caagt	tgtat	catat	gccaagt	ccctatt	g	acgtca	420
cggtaa	atgg	cccgc	ctggc	attat	gcca	gtacat	gacc	ttac	gggact	480
gcagta	catc	tacgt	attag	ctatc	gtat	taccat	ggtg	atgc	ggtttt	540
caatgg	gcgt	ggatag	cggt	ttgact	ca	gggatt	tcca	agtct	ccacc	600

caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg	660
cgatcgcccc ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata	720
agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc	750

<210>4

<211>1252

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>4

cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaa	60
aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca	120
ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt tcaggttcag ggggagatgt	180
gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg taaaatccga taaggatcga	240
tccgggctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag	300
cctgaatggc gaatggacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtgggtggtt	360
acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc cgctccttt cgctttcttc	420
ccttccttc tcgccacgtt cgccggttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctcct	480
ttagggttcc gatttagtgc tttacggcac ctcgaccca aaaaacttga ttagggatgat	540
ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc	600
acgttcctta atagtggact ctgtgtccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc	660
tattcttttg atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaa aaatgagctg	720
atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttctgatgc	780
ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggtt tttcacaccg catacgcgga tctgcgcagc	840
accatggcct gaaataacct ctgaaagagg aacttggta ggtaccttct gaggcggaaa	900
gaaccagctg tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tcccaggct cccagcagg	960
cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtcccagg	1020
ctcccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtecc	1080
gcccctaact ccgccatcc cgcccctaac tccgccagc tccgccatt ctccgccc	1140
tggetgacta atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt	1200
ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc tt	1252

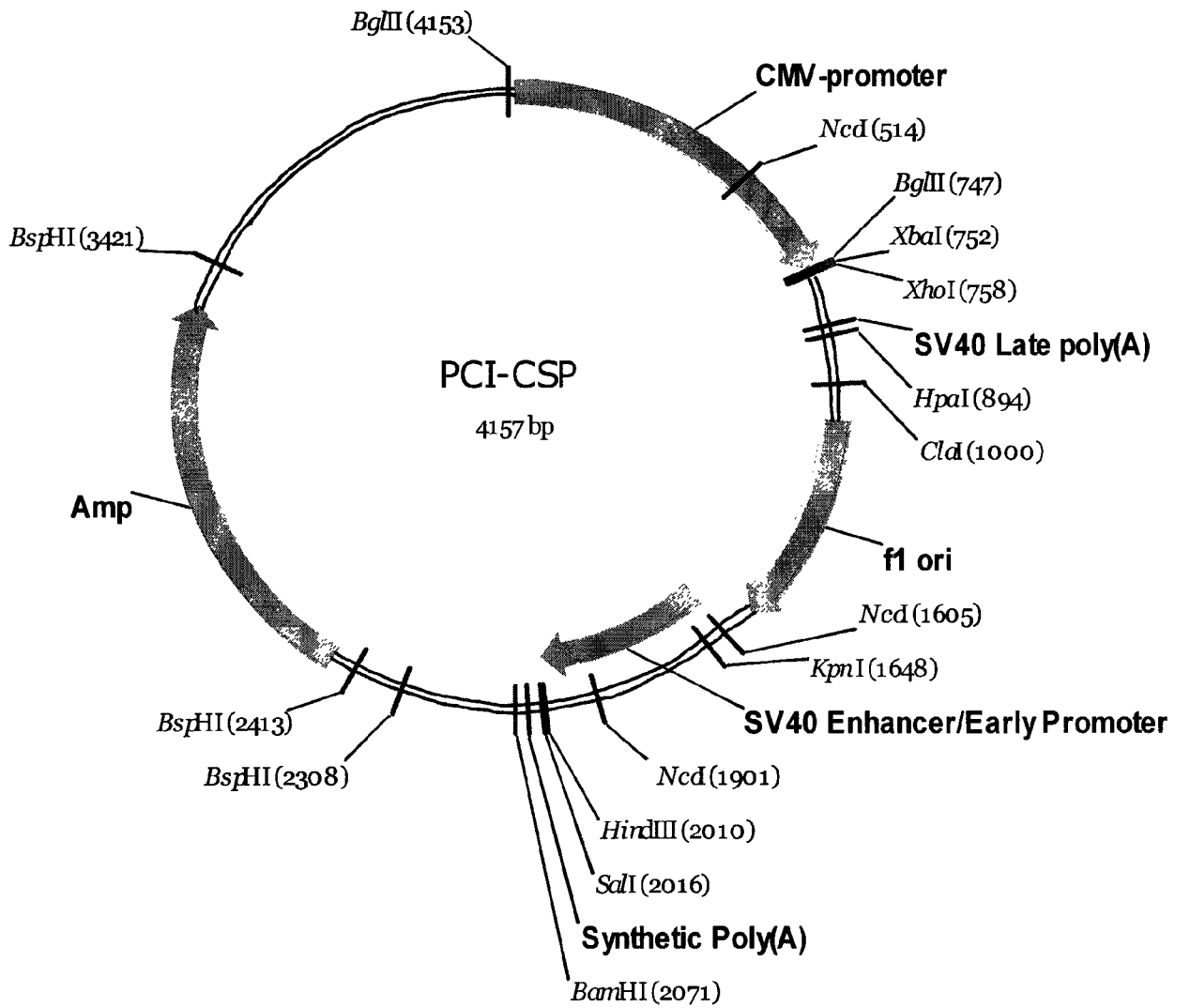


图 1

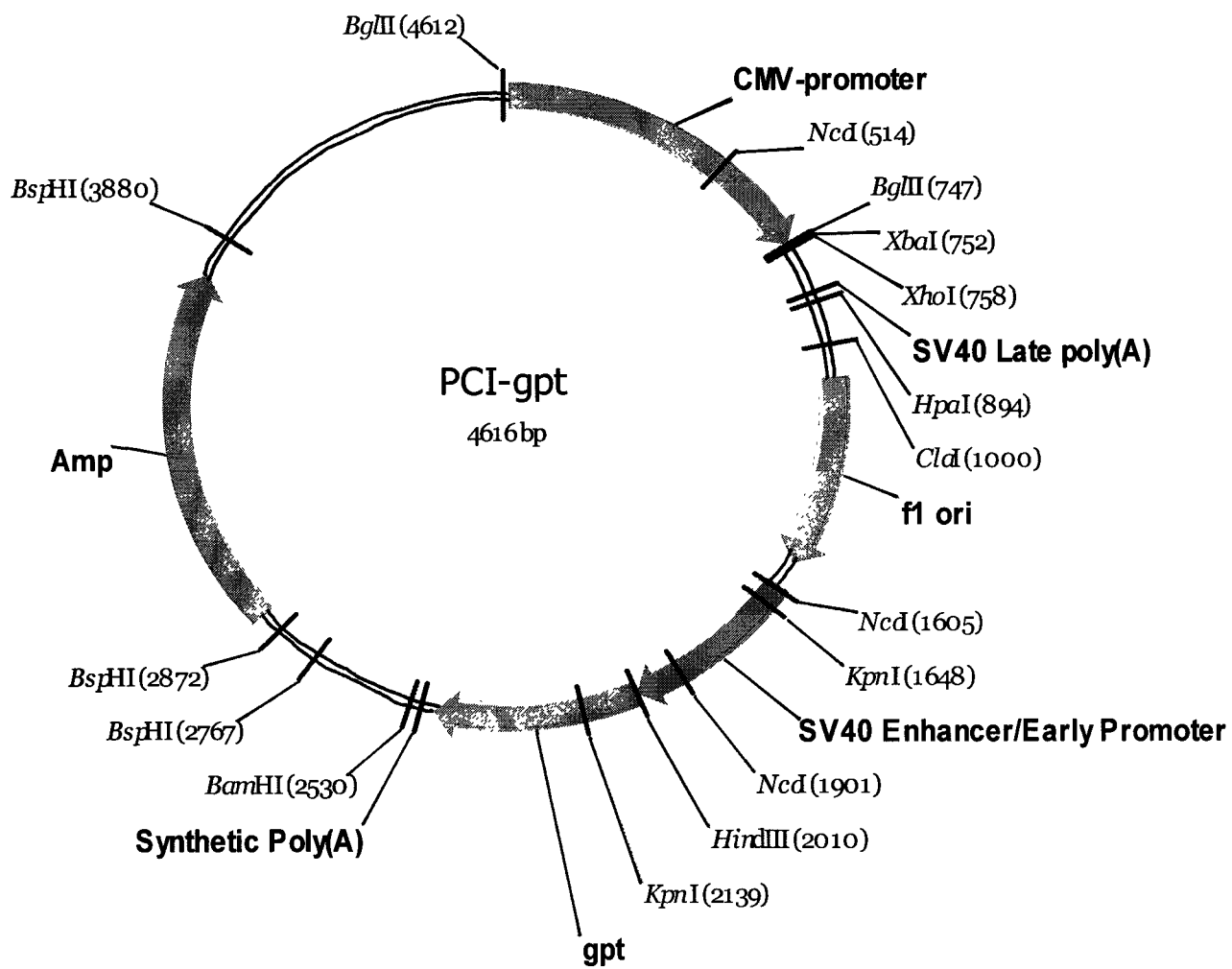


图 2