

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103877594 A

(43) 申请公布日 2014.06.25

(21) 申请号 201210566942.7

(22) 申请日 2012.12.24

(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 秦燕 郝佳 朱萍

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表15页 附图4页

(54) 发明名称

EF4 蛋白编码基因沉默在癌症治疗方面的应用

(57) 摘要

本发明提供使人癌细胞中的 EF4 蛋白编码基因沉默的试剂在制备用于抑制所述癌细胞生长的药物中的用途,更具体地,本发明提供针对人 EF4 蛋白编码基因的 siRNA 干扰片段在制备用于抑制人癌细胞生长的药物中的用途。

1. 使人细胞中的 EF4 蛋白编码基因沉默的试剂在制备用于抑制所述细胞生长的药物中的用途。
2. 权利要求 1 所述的用途,其中所述 EF4 蛋白编码基因的序列如 SEQID No. 1 所示。
3. 权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述使人细胞中的 EF4 蛋白编码基因沉默的试剂包含针对所述 EF4 蛋白编码基因的 siRNA 干扰片段。
4. 权利要求 3 所述的用途,其中所述 siRNA 干扰片段是混合物,所述混合物包含序列分别如 SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4 所示的三种 siRNA 干扰片段。
5. 权利要求 4 所述的用途,其中所述三种 siRNA 干扰片段的混合比例为 1 : 1 : 1。
6. 权利要求 1 或 2 所述的用途,其中所述人细胞是人癌症细胞。
7. 权利要求 6 所述的用途,其中所述人癌症细胞是人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞或人肺癌细胞系 H1299 细胞。

EF4 蛋白编码基因沉默在癌症治疗方面的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因沉默在癌症治疗中的应用。具体地,本发明提供使人癌细胞中的 EF4 蛋白编码基因沉默的试剂在制备用于抑制所述癌细胞生长的药物中的用途,更具体地,本发明提供针对人 EF4 蛋白编码基因的 siRNA 干扰片段在制备用于抑制人癌细胞生长的药物中的用途。

背景技术

[0002] 线粒体是由古生菌进化而来的,拥有自己的 DNA、RNA 和蛋白合成系统。线粒体 DNA 可以编码 2 种 rRNA、22 种 tRNA、8-13 种呼吸链复合物亚基蛋白。在人类的线粒体中,线粒体 DNA 编码 13 种线粒体蛋白,7 种 (ND1-4、ND4L、ND5 和 ND6) 蛋白是呼吸链复合物 I 上的亚基;一种 (细胞色素 b) 是复合物 III 上的亚基;3 种 (CoxI, CoxII, CoxIII) 是复合物 IV 上的亚基;两种 (ATP6 和 ATP8) 是复合物 V 上的亚基。

[0003] 呼吸链复合物 I、III、IV、V 的组装要求细胞核 DNA (nDNA) 和线粒体 DNA (mtDNA) 的协同表达。每一个呼吸链复合物上大部分亚基均由 nDNA 编码,蛋白经过翻译后修饰,成熟,转位过程进入线粒体。线粒体翻译机器 55S 系统和原核生物翻译系统 70S 类似,但是它具有自己的特点:(1) 翻译调节机制相对简单,合成速率是细胞质的 10-20 倍;(2) 翻译出错率较高。55S 核糖体翻译的产物边翻译边组装,导致复合物亚基具有更低的翻译保真性。于是我们便提出了这样的疑问:55S 翻译机器如何维持足够高的翻译保真性从而与细胞质 80S 系统相匹配?

[0004] 线粒体呼吸链复合物 I、III、IV 可以进一步组装成超级复合物 (RCS), RCS 的结构有利于电子的跨膜传递,提高 ATP 合成效率。在人类细胞中,RCS 的组装是保证正常呼吸的一个必要的步骤。RCS 组装缺陷可能导致呼吸障碍。但是 RCS 组装的分子机制目前研究的并不是太透彻。

[0005] EF4 蛋白是所有已知的基因组中最保守的蛋白,在原核生物中,它可以与正在进行蛋白延伸过程中的核糖体结合引发 tRNA 的反向转位。同时,研究发现 EF4 还具有 GTP 水解酶活性和分子伴侣活性,降低了蛋白翻译的出错率。在酵母中的研究发现 EF4 在应激条件下能够影响线粒体的蛋白合成,但是在人源化细胞中对 EF4 功能的研究还未见报道。

[0006] 由上可知,EF4 蛋白在人类细胞中具有高度保守的同源物,其亚细胞定位应该在细胞的能量工厂——线粒体中,对人类正常细胞和癌症细胞的代谢具有重要作用,为人类的癌症、代谢疾病的诊断和治疗提供了潜在的生物标记物和靶位点,并为相关药物的设计提供了线索。

发明内容

[0007] 我们首次发现在人类癌症细胞中 EF4 蛋白对线粒体功能具有重要的调控作用。EF4 蛋白编码基因的沉默可以有效地抑制人癌症细胞的生长。

[0008] 更具体地,本发明提供以下各项:

- [0009] 1. 使人细胞中的 EF4 蛋白编码基因沉默的试剂在制备用于抑制所述细胞生长的药物中的用途。
- [0010] 2. 根据 1 所述的用途,其中所述 EF4 蛋白编码基因的序列如 SEQ IDNo. 1 所示。
- [0011] 3. 根据 1 或 2 所述的用途,其中所述使人细胞中的 EF4 蛋白编码基因沉默的试剂包含针对所述 EF4 蛋白编码基因的 siRNA 干扰片段。
- [0012] 4. 根据 3 所述的用途,其中所述 siRNA 干扰片段是混合物,所述混合物包含序列分别如 SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 3 和 SEQ ID No. 4 所示的三种 siRNA 干扰片段。
- [0013] 5. 根据 4 所述的用途,其中所述三种 siRNA 干扰片段的混合比例为 1 : 1 : 1。
- [0014] 6. 根据 1 或 2 所述的用途,其中所述人细胞是人癌症细胞。
- [0015] 7. 根据 6 所述的用途,其中所述人癌症细胞是人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞或人肺癌细胞系 H1299 细胞。
- [0016] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明。

附图说明

- [0017] 图 1 :人源化细胞中 EF4 蛋白体外功能的检测 ;
- [0018] 图 2 :真核细胞 EF4(旧称 Guf1)mRNA 水平表达检测 ;
- [0019] 图 3 :EF4(旧称 Guf1) 蛋白在真核细胞中的亚细胞定位 ;
- [0020] 图 4 :真核细胞中 EF4(Guf1) 基因的干扰效率检测 ;
- [0021] 图 5 :人源化 EF4 蛋白的表达对细胞表型的影响 ;
- [0022] 图 6 :人源化的 EF4(旧称 Guf1) 蛋白对线粒体呼吸链复合物功能的影响。

具体实施方式

[0023] 实施例 1、人源化细胞中 EF4 蛋白体外功能的检测

[0024] 为了研究人源化细胞中 EF4 蛋白与原核生物中 EF4 蛋白的功能是否具有相似性,我们纯化了人源化细胞中的 EF4 和原核生物中的 EF4 蛋白,核糖体 70S,进行了一系列的体外实验。图 1 为人源化细胞中 EF4(旧称 Guf1,GTPase of unknown function 1) 蛋白体外功能的检测。图 1A 代表人源化 EF4(旧称 Guf1) 蛋白与核糖体 70S 的结合实验,结果表明人源化的 EF4 能与核糖体 70S 相结合 ;图 1B 代表大肠杆菌 EF4 和人源化细胞中的 EF4(旧称 Guf1) 结合常数的对比,发现两者结合常数类似 ;图 1C 代表 footprinting 实验,检测人源化 EF4 蛋白是否能够与核糖体 23rRNA 结合 (G 和 T :序列带,C :没有 DMS 修饰,N.F :没有加入因子),箭头代表 23S rRNA 的 A1607 和 A2660 位点受到了保护,结果表明人源化的 EF4 能够与 23S rRNA 相结合 ;图 1D 代表大肠杆菌 EF4 和人源化细胞中的 EF4(旧称 Guf1)GTP 水解速度的对比,GTP 水解速度 :每个核糖体在 5 分钟内水解 GTP 的数量,结果表明两者具有相似的 GTP 水解能力 ;图 1E 代表 pyromycin 实验,检测 EF4 是否具有介导 tRNA 反向转位的功能 (红色标记的 tRNA 和柱状图 :AC^[3H]Phe-tRNA,蓝色标记的 tRNA 和柱状图 :^[32P]tRNA^{Met}),结果表明人源化的 EF4 具有催化 tRNA 反向转位的能力 ;图 1F 代表体外蛋白合成实验,反应混合物分成两部分 :SDS-PAGE (上层泳道,总 GFP) ;还原胶 (中间泳道,具有活性的 GFP)。在没有因子存在的条件下 (N.F) 总的 GFP 合成量定义成 100%,根据这个计算总的,具有活性的 GFP 和活性片段的相对量 (N.P. :没有编码 GFP 质粒的反应液),结果显示人

源化 EF4 蛋白的加入能够促进更多具有活性的 GFP 片段的产生,表明人源化的 EF4 蛋白具有维持蛋白翻译保真性的作用。

[0025] 具体方法:

[0026] 分离纯化 EF4(旧称 Guf1) 蛋白:转化有 EF4(旧称 Guf1) 质粒的 BL21 菌株 1%接种 2L LB 培养基中,37 度培养至对数生长期(OD₆₀₀ 约 0.6),冷却到 16 度后加 0.3mM 异丙基硫代半乳糖苷,诱导 20 小时,4 度离心收集。超声破菌后 4 度、15000rpm 离心 30 分钟,上清过镍柱,100mM 咪唑洗脱需要的蛋白(保存在 20mM Tris-HCl pH7.5、500mM 氯化钠中),最后用 GE 公司 HiLoad16/60 Superdex 75 进一步纯化 EF4(旧称 Guf1) 蛋白。

[0027] 分离纯化重构核糖体:按 1%的比例将过夜培养的 MRE600 菌株接种到 4L LB 培养基中,37 度培养至对数生长期(OD₆₀₀ 约 0.6),4 度 4000rpm 离心 30 分钟收菌。用 4 倍体积的 Tico 缓冲液(20mM Hepes-KpH7.6,6mM 醋酸镁,30mM 醋酸铵,4mM β 巯基乙醇)重悬,1000Bar 压力条件下破碎两次。破碎菌液 30000g 离心 90 分钟,上清倒入另一离心管中 45000g 离心 24 小时,沉淀为粗提的核糖体。Tico 缓冲液重悬核糖体,大约 6000A₂₆₀ 粗提核糖体通过蔗糖密度梯度离心(0-40%蔗糖, Tico 缓冲液)。区带离心(16 小时 22000rpm, Ti15 转子)后收集 70S 核糖体(24 小时 24000rpm, Ti45 转子)。沉淀用 10ml 解离缓冲液(20mM Hepes-KpH7.6,1mM 醋酸镁,200mM 醋酸铵,4mM β 巯基乙醇)重悬,然后区带离心(0-40%蔗糖,解离缓冲液)分离 30S 和 50S 核糖体亚基(Ti15 转子 4 度 22000rpm,离心 17 小时),分别收集 30S 与 50S 核糖体亚基。将 30S 与 50S 亚基各 1500A₂₆₀ 混合在重聚缓冲液中(20mM Hepes-KpH7.6,20mM 醋酸镁,30mM 醋酸铵,4mM β 巯基乙醇),40 度温浴 1 小时后 4 度孵育 10 分钟。孵育后核糖体蔗糖密度梯度离心分离(10% -40%蔗糖,18000rpm 17 小时)30S 亚基与 70S 核糖体。收集的 70S 核糖体用 45Ti 转子在 4 度 24000 转离心 24 小时,重聚缓冲液重悬的 70S 核糖体在 40 度孵育 20 分钟,分装后液氮速冻,保存在 -80 度冰箱中。

[0028] 核糖体结合实验:60pmol 的 70S 核糖体与 28pmol 的 EF-G 及 25 μM GMPPNP 37 度共孵育 15 分钟,缓冲体系为结合缓冲液(20mMHepes-KOH, pH7.5, 4.5mM 醋酸镁,150mM 醋酸铵,4mM β 巯基乙醇,2mM 亚精胺 and 0.05mM 精胺)。120 μl 样品加到 75 μl 蔗糖垫上,蔗糖 1.1M 溶于缓冲液中:20mM Hepes-KOH, pH 7.5, 4.5mM 醋酸镁,150mM 醋酸铵,4mM β 巯基乙醇,2mM 亚精胺,0.05mM 亚精胺和 25 μM GMPPNP,用 TLA100 转头(Beckman)78000rpm 4 度离心 30 分钟。上清吸出,沉淀用 20 μl Tico 缓冲液(20mM Hepes-KOH, pH 7.5,6mM 醋酸镁,30mM 醋酸铵,4mM β 巯基乙醇)重悬。测 A₂₆₀,核糖体 5pmol 进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。

[0029] Footprinting 实验:实验可分成有 2 步,一是功能性复合物的制备及化学试剂修饰;二是引物延伸。

[0030] 为研究 EF-G 对 23S rRNA sarcin-ricin loop(SRL) 上 A2660 位点的保护方式,以及 23S rRNA GTPase-associated center(GAC) 上 A1067 的保护方式,按文献方法(Savelsbergh, Matassova 等 2000) 制备核糖体·EF-G·GTP·FA 复合物。20pmol 核糖体与 EF-G 野生型或突变体(20pmol) 及 1mM GTP 和 2mM FA 37 度共孵育 10 分钟,反应体系为:80mM Hepes-KOH pH 7.8,100mM 氯化铵,20mM 氯化镁,然后加入二甲基鞘氨醇(DMS)再孵育 8 分钟进行化学修饰。

[0031] 为检测 EF-G 突变体能否与野生型一样稳定核糖体的 hybrid state, 制备了核糖体功能复合物 (100 μ l): 反应液 (80mM Hepes-KOH pH 7.8, 100mM 氯化铵, 20mM 氯化镁) 中加入 70S 核糖体 (20pmol), MF-mRNA (80pmol) 和 Ac-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (40pmol), 37 度水浴 20 分钟; 然后加入 1mM 的嘌呤霉素, 37 度水浴 20 分钟, 使 P 位点 Ac-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} 脱酰化。此时的核糖体复合物再加入 EF-G • GDPNP, 37 度水浴 20 分钟后, 加二甲基鞘氨醇 37 度水浴 8 分钟进行修饰。

[0032] 分析 EF-G 转位活性还有一种方法, 通过检测 tRNA 在核糖体上的结合位点来确定 PRE 或 POST 状态。核糖体功能复合物 (100 μ l) PRE 的制备: 在反应缓冲液 (80mM Hepes-KOH pH 7.8, 100mM NH₄Cl, 20mM MgCl₂) 中加入 70S 核糖体 (20pmol), MF-mRNA (80pmol) 和 tRNA^{fMet} (40pmol), 37 度水浴 15 分钟; 然后加入 Ac-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} (40pmol), 混匀后 37 度水浴 30 分钟。在 PRE 复合物中加入 GTP (1000pmol) 和 EF-G (4pmol) 37 度水浴 10 分钟, 使 tRNA-mRNA 发生移位。然后加入二甲基鞘氨醇 37 度水浴 8 分钟进行化学修饰。

[0033] 引物延伸反应, 修饰的 rRNA 经酚 / 氯仿抽提后, [³²P] 标记的引物与修饰的 rRNA 90 度水浴 5 分钟进行退火, 然后加入反转录酶进行反转录。降解 rRNA 后, 8% 变性胶分离。引物延伸终止位点通过双脱氧测序反应确定, 反转录的模板是未修饰的 rRNA。每一个反应至少做 2 次独立的实验。压磷屏检测反应条带的强度。

[0034] GTP 水解实验: 所用缓冲液: H-mix: 80mM Hepes-K pH7.6, 9mM 氯化镁, 1320mM 氯化铵, 16mM β 巯基乙醇, 0.5mM 精胺, 20mM 亚精胺; Tico 缓冲液: 20mM Hepes-K pH7.6, 6mM 氯化镁, 30mM 氯化铵, 4mM β 巯基乙醇; 终止反应液: 100 μ l 水饱和 2-丁醇, 40 μ l 0.5M 硫酸 + 1.5mM 磷酸二氢钠, 10 μ l 200mM 钼酸钠。

[0035] 整个反应体系由三部分组成: 10% H-mix, 60% Tico 和溶解 GTP 的 30% H₂O。最终的反应条件是: 20mM Hepes-K pH7.6, 4.5mM 氯化镁, 150mM 氯化铵, 4mM β 巯基乙醇, 0.05mM 精胺, 2mM 亚精胺。核糖体和 GTP 酶溶解在 1*Tico 缓冲液中。10 μ l 的体系中, 核糖体在反应体系中的浓度是 0.2 μ M, GTPase 酶的终浓度是 0.02-0.2 μ M, [³²P] γ -GTP 50 μ M (50-1000dpm/pmol)。加入 [³²P] γ -GTP 后启动反应, 在 37 度水浴中反应, 据反应要求加入终止液终止反应。

[0036] 反应终止后, 震荡 1 分钟, 室温 13000rpm 离心 10 分钟, 2-butanol 可以萃取游离 γ -Pi, 取 80 μ l 2-丁醇液相到 2ml 闪烁液中, 摇匀后同位素计数。

[0037] 嘌呤霉素实验: 首先制备 PRE 复合物, 12.5 μ l 的反应体系含 5pmol 70S 核糖体, 20pmol MF-mRNA 及 10pmol tRNA^{fMet}, 上面反应体系在 37 度反应 15 分钟使 tRNA 进入 P 位点; 然后与 10pmol of Ac-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} 再在 37°C 孵育 30 分钟, 此时反应体系总体积为 25 μ l, Ac-[¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} 进入 A 位点, PRE 复合物形成。PRE 状态的复合物与 EF-G (0.1mM GTP) 一起在 37 度孵育 10 分钟, 此时反应体系总体积为 35 μ l。然后加入 2.5 μ l 嘌呤霉素, 37 度孵育 5 分钟, 检测同位素含量确定 POST 状态核糖体的量。

[0038] 蛋白体外合成实验: 以 Poly (U) 为模板, [¹⁴C]Phe-tRNA^{Phe} 为底物合成 poly ([¹⁴C]Phe) 多肽链。反应在优化的离子条件下完成 (20mM Hepes-K pH7.6, 4.5mM 氯化镁, 150mM 氯化铵, 4mM β 巯基乙醇, 0.05mM 精胺, 2mM 亚精胺)。结合混合液的制备, 7.5 μ l 反应体系, 1pmol 的 70S 核糖体与 10 μ g poly (U)-mRNA 先 37 度孵育 15 分钟。然后, 5 μ l 上述结合混合液与 10 μ l 预热 (2 分钟, 37 度) 的 charging mix 一起 37 度孵育 5 分钟。制备 charging

mix, 将 15.5pmol [¹⁴C]Phe-tRNA^{phe} (specific activity 1000dpm/pmol), 5nmolGTP, 3pmol EF-G, 30pmol EF-Ts 和 30pmol EF-Tu 混匀。合成的 poly ([¹⁴C]Phe) 产物, 加入冰冷的 TCA 沉淀后, 液体闪烁计数器检测合成的肽链中同位素的含量。

[0039] 实施例 2、研究体内 EF4 蛋白功能体系的选择

[0040] 为了方便研究 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白在体内的功能, 我们需要选择 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白表达丰富的细胞体系作为研究对象, 我们选用了几种体外培养的细胞系 (包括癌细胞和正常细胞), 通过 PCR 方法检测 EF4 (旧称 Guf1) 在 mRNA 水平上的表达情况。图 2 代表 PCR 结果, 其中 1299 (H1299): 肺癌细胞 (购自于 ATCC, 保藏号: CRL-5803); HeLa: 宫颈癌细胞 (购自于 ATCC, 保藏号: CCL-2); BR, A2: 肺癌细胞; SY5Y: 神经瘤细胞; 3T3: 小鼠成纤维细胞; 293: 人胚肾细胞。PCR 结果显示在癌症细胞 H1299 细胞和 HeLa 细胞中 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白 mRNA 水平表达较高, 在非癌症细胞如 3T3 细胞和 HEK293 细胞中用此方法没有检测到 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白在 mRNA 水平上的表达, 说明在非癌症细胞中此蛋白表达水平不高, 因此我们选用 EF4 (旧称 Guf1) 表达丰富的癌症细胞 HeLa 细胞和 H1299 细胞作为研究体系。

[0041] 具体方法:

[0042] RT-PCR 实验: 使用 Trizol 试剂分离 HeLa 细胞总的 RNA。以 oligo(dT)15 作为引物, 将 2 μg 总 RNA 在反转录酶的作用下反转录成单链 cDNA。合成特异性的 Guf1 引物 (Invitrogen 合成):

[0043] guf1-s: 5-CAAGCCCAAACACTGTAGCAAA-3;

[0044] guf1-a: 5-CCAGCAATCAGATAGCCAC-3;

[0045] RT-PCR 扩增条件: 变性 -94 度, 30 秒; 退火 -55 度, 30s; 延伸 -72 度, 30 秒; 循环次数: 30 次; 最后延伸条件 -72 度, 10 分钟。同等体积的各 PCR 样品进行琼脂糖胶电泳 (胶浓度: 1%)。

[0046] 实施例 3、人源化 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白亚细胞定位的研究

[0047] 为了研究 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白在真核细胞中的亚细胞定位, 我们采取了 Western blot 和免疫荧光两种方法。图 3 为人源化 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白的亚细胞定位分析。图 3A 代表 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白细胞定位的 western blot 结果, COXIV: 线粒体组分的标志分子, Actin: 内参对照, western blot 结果显示 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白与线粒体的标志分子 COXIV 同时在线粒体组分出现。表明 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白定位在线粒体。图 3B 代表免疫荧光结果 (GFP: 表达 GFP 的对照载体, GFP-Guf1: Guf1N 端标记 GFP, Guf1-GFP: Guf1C 端标记 GFP, Mito Tracker 是线粒体标记物), 结果显示 N 端标记 GFP 的 Guf1 没有与线粒体共定位, C 端标记 GFP 的 Guf1 与线粒体的标记物 MitoTracker 共定位, 说明 EF4 (Guf1) 的 N 端序列影响了它的线粒体定位。

[0048] 具体方法:

[0049] 分离细胞各组分: 将铺满 100mm 平皿的一盘 HeLa 细胞 (购自 ATCC, 保藏号: CCL-2) 弃去废液, 用磷酸缓冲液清洗 2 次, 加入 1ml 线粒体提取缓冲液 (购自于北京普利莱有限公司), 细胞刮将细胞收集, 利用组织研磨器将细胞裂解, 800g, 4 度离心 5 分钟, 取上清, 13000g, 4 度再次离心, 沉淀即为线粒体, 上清为细胞质成分。BCA 蛋白定量 (购自于 Thermo), 各取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 各自加入 COXIV 抗体、

Actin 抗体、EF4(Guf1) 抗体 (购自于 CST) 进行检测。

[0050] 免疫荧光实验:带有人源化 EF4(旧称 Guf1) 基因的质粒载体由 K. H. Nierhaus 教授 (Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Berlin) 赠予。编码人源化 EF4(旧称 Guf1) DNA 片段由上述质粒通过 PCR 反应扩增。引物序列为:

[0051] guf1-gfp-n2-s :5-CGCCTC GAGCATGTGGACCCTCGT-3 ;

[0052] guf1-gfp-n2-a :5-CCCAGGTACCATTTAGAAGATTGTGTT-3。Kpn I 和 Xho I 位点加到引物的末端, PCR 产物与 pEGFP-N2 质粒连接。引物序列: guf1-gfp-c3-s :5-CGGCTCGAGTGGACCCTCGT-3 ;

[0053] guf1-gfp-c3-a :5-TCCGGTACCTTATTTAGAAGATTGTGTT-3。EcoRI 和 Xho I 位点加到引物的末端, PCR 产物与 pEGFP-C3 质粒连接。2 μ g 构建质粒利用脂质体 2000 (购自于 Invitrogen 公司) 瞬时转入 HeLa 细胞中。转染 24 小时后, 在细胞培养液中加入终浓度为 5 μ M 的 MitoTracker, 避光反应 15 分钟, 在激光共聚焦显微镜下 (Olympus Fluoview FV500) 观察荧光的分布。

[0054] 实施例 4、真核细胞中 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默效率检测

[0055] 为了在真核细胞中研究 EF4(旧称 Guf1) 基因的功能, 我们利用 siRNA 干扰的方式沉默 EF4(旧称 Guf1) 的表达, 观察细胞表型的变化, 以此揭示进行 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默的效果。合成三段沉默 EF4(旧称 Guf1) 基因的 siRNA 片段 (购自于上海吉玛制药技术有限公司), 将三段 siRNA 的混合物 (混合比例为: 1 : 1 : 1) 转染进入 HeLa 细胞 (NC: 对照 siRNA, Si : siRNA-EF4, 1 组和 2 组代表在 HeLa 细胞中的两个平行样本) 和 H1299 细胞, western 检测结果显示 HeLa 细胞和 H1299 细胞转染干扰 EF4(Guf1) 小 RNA 后, EF4(Guf1) 蛋白的表达量明显降低 (图 4)。上述结果表明干扰效果良好, 将上述干扰条件应用于下面的功能研究中。

[0056] 具体方法:

[0057] EF4(旧称 Guf1) 基因表达沉默:

[0058] 3 个 EF4(旧称 Guf1) 基因的干扰 RNA (siRNA) 如下:

[0059] 5-GGUUCUUGAUAAAUGCAATT-3 ;

[0060] 5-GAAGAGCAGUUCAGAAGAATT-3 ;

[0061] 5-GUUGUUGUUGUGAAGAUUATT-3 ;

[0062] 以上干扰片段和对照 siRNA 均购自于上海吉玛公司。将大约 4×10^5 个 H1299 细胞或 HeLa 细胞接种到 35mm 细胞培养皿中, 过夜培养。将终浓度为 100 μ M 的 EF4-siRNA (三个片段的混合物) 和 NC-siRNA (对照) 分别利用脂质体转染试剂 2000 (购自于 Invitrogen 公司) 转染进入 H1299 细胞或 HeLa 细胞, 转染 72 小时后, 利用 Western blot 方法在蛋白水平上检测 EF4 表达的干扰效率。

[0063] 实施例 5、人源化 EF4(旧称 Guf1) 蛋白对细胞表型影响的研究

[0064] 图 5 为人源化 EF4(旧称 Guf1) 蛋白的表达对细胞表型的影响。图 5A 和 5B 表示在 H1299 细胞和 HeLa 细胞中采用 MTT 方法检测细胞的生长速度。将细胞接种在新的培养基中, 分别测定 1, 2, 3, 4, 5 天后细胞酶活强度 (Si : EF4(旧称 Guf1) 的干扰 siRNA, NC : 对照 siRNA), 结果显示在两种细胞中 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默的细胞株生长速度明显慢于正常组细胞, 表明 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默抑制了细胞的生长; 图 5C 利用流式细胞仪对细胞

周期进行测定,将各时期细胞数进行统计,结果显示 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默后停滞在 G1 期的细胞数明显增多,表明 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默抑制了细胞分裂;图 5D 利用激光共聚焦显微镜观察线粒体的形态(Hochest:细胞核着色,MitoTracker:线粒体着色),图片显示与对照组相比,EF4(旧称 Guf1) 基因沉默组的线粒体明显弥散,表明 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默干扰了线粒体形态的维持;图 5E 是利用氧电极进行的细胞氧气消耗速率的检测,统计结果显示 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默后细胞氧耗的速率明显下降,表明 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默抑制了线粒体呼吸;图 5F 利用流式细胞仪进行的细胞内活性氧产量的检测(红色标记的线和柱状图:干扰 EF4(旧称 Guf1) 表达后,黑色标记的线和柱状图:对照),结果显示 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默后,体内 ROS 含量明显上升,表明 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默有利于 ROS 的产生;图 5G 表示利用显微镜观察 etoposide(依托泊苷,一种抗肿瘤药物)诱导细胞凋亡后细胞核的皱缩情况(箭头代表发生皱缩细胞核),结果显示 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默后细胞核出现了凋亡样的皱缩状态,表明 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默加速了细胞凋亡的进程;图 5H 使用 western blot 检测 Caspase-3 介导的凋亡信号通路。Caspase-3 及其下游分子 PARP 蛋白出现剪切条带代表凋亡途径的激活。细胞色素 C 在细胞质中释放量越多,代表细胞凋亡的程度越严重,结果显示 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默后, Caspase-3 及其下游凋亡分子 PARP 的剪切程度加重,细胞色素 C 从线粒体中的释放量增加,同样也表明 EF4(旧称 Guf1) 基因沉默加速了细胞凋亡的进程。

[0065] 具体方法:

[0066] 细胞生长速度检测:细胞增殖使用 MTT(噻唑兰)分析方法测定:1) 将 4×10^3 个 H1299 细胞或 HeLa 细胞接种到 96 孔板中,37 度培养;2) 细胞接种 1 天,2 天,3 天,4 天,5 天后,小心吸去培养基,用磷酸缓冲液轻轻洗涤;3) 每孔加入 $180 \mu\text{l}$ 新鲜培养液,再加入 $20 \mu\text{l}$ MTT 溶液(5mg/ml,即 0.5% MTT, DMSO(二甲基亚砷)),继续培养 4 小时;4) 终止培养,小心吸去孔内培养液,每孔加入 $150 \mu\text{l}$ 二甲基亚砷,置摇床上(TS-8)低速振荡 10 分钟,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490nm 处测量各孔的吸光值;5) 同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砷),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砷),每组设定 3 复孔。

[0067] 线粒体形态观察:将 EF4(旧称 Guf1) 干扰组和对照组细胞在含有终浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$ 的 Hochest33258(购自于 Sigma) 细胞培养液中进行细胞核染色,作用时间 20 分钟,再加入终浓度为 $5 \mu\text{M}$ 的 MitoTracker 进行线粒体染色 30 分钟,激光共聚焦显微镜下观察线粒体形态的变化。

[0068] 细胞周期检测:为了分析细胞的周期,前一天将 10^6 个细胞接种在 35mm 的细胞培养皿中。第二天收集细胞,将细胞在 70%乙醇中 -20 度过夜固定。磷酸缓冲液清洗细胞 2 次,加入染色液(20g/ml 碘化丙啶,50g/ml RNA 酶)在 37 度培养箱中孵育 30 分钟。细胞中 DNA 数量通过流式细胞仪检测。

[0069] 氧气消耗速度:胰酶消化细胞,将细胞悬液的浓度调整到 1.5×10^7 个/ml,1.5ml 细胞悬液作为一个反应体系。细胞耗氧量的测定通过一个氧电极来调控反应槽中溶解氧的浓度。1.5ml 不含有细胞的细胞培养基中氧气的下降速率作为对照。

[0070] ROS 测定:细胞内过氧化氢浓度的测定是通过对氧化还原敏感的荧光探针 DCFH-DA(购自于碧云天公司)来实现的。收集 3×10^5 个细胞,使用无血清的细胞培养基清

洗并重悬,加入 DCFH-DA 染料使其终浓度为 $5\ \mu\text{M}$,细胞在 37度 细胞培养箱中孵育 30分钟 。DCF 荧光通过荧光激发的细胞分选流式细胞仪 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) 来测定,激发波长 : 488nm ;发射波长 : 535nm 。

[0071] 细胞色素 C 释放 : $2\ \mu\text{M}$ etoposide (购自于 Sigma) 处理细胞 24小时 ,促进细胞的凋亡过程。处理组和未处理组细胞用磷酸缓冲液清洗 2次 ,胰酶消化细胞,将细胞重悬在 $50\ \mu\text{l}$ 细胞裂解液中 (50mM 氯化钾 ; 250mM 葡萄糖, 0.02% digitonin) 冰上放置 5分钟 ,然后 4度 10000g 离心 10分钟 。上清包含细胞质成分,沉淀包含线粒体,将上述沉淀使用 RIPA 裂解液裂解 (购自于 Thermo)。BCA 法检测蛋白浓度, $50\ \mu\text{g}$ 蛋白进行 SDS-PAGE,利用细胞色素 C 抗体检测其在细胞质和线粒体中含量。

[0072] 实施例 6、人源化 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白对线粒体呼吸链复合物功能的影响

[0073] EF4 (旧称 Guf1) 能够调控细胞代谢,而线粒体是细胞代谢的一个重要场所,因此检测了 EF4 (旧称 Guf1) 蛋白对线粒体呼吸链复合物的影响。图 6A 表示在 H1299 细胞中进行的 ATP 水平的检测实验,结果显示 EF4 (旧称 Guf1) 基因表达沉默后 ATP 水平明显下降;图 6B 表示在 HeLa 细胞中进行的 ATP 水平的检测实验,结果显示 EF4 (旧称 Guf1) 基因沉默后 ATP 水平明显下降;图 6C 表示利用 HeLa 细胞线粒体进行 Blue-native 胶然后再进行 SDS-PAGE 胶检测的呼吸链复合物量的变化 (I、II、III、IV、V 分别代表线粒体呼吸链复合物 I、II、III、IV、V、NC :对照 siRNA, Si :siRNA-EF4),结果显示 EF4 (旧称 Guf1) 基因沉默并没有影响线粒体呼吸链复合物的量;图 6D 是利用 western blot 通过抗体检测线粒体呼吸链复合物亚基的表达量 (FP :复合物 II 亚基,UQCRC2 :复合物 III 亚基,COXIV :复合物 IV 亚基,ATP5a :复合物 V 亚基,Tim23 :线粒体外膜蛋白,作为阴性对照,Tim20 :线粒体内膜蛋白,作为阴性对照, β -Actin :内参),结果显示 EF4 (旧称 Guf1) 基因沉默并没有影响线粒体复合物呼吸链亚基的表达;图 6E 表示利用酶-底物显色反应检测线粒体呼吸链各复合物活性 (RCS :呼吸链超级复合物,箭头代表复合物相对应条带),结果显示 EF4 (旧称 Guf1) 基因沉默并没有影响线粒体呼吸链复合物的活性,但是超级复合物的组装受到了抑制。

[0074] 分离线粒体呼吸链复合物 :收集 $400\ \mu\text{g}$ HeLa 细胞线粒体,加入 $40\ \mu\text{l}$ 缓冲液 A (50mM 氯化钠, 50mM 咪唑 / 盐酸, 1mM EDTA, pH 7.0) 重悬。每管加入 $12\ \mu\text{l}$ digitonin,混匀冰上作用 10分钟 。 100000g , 4度 离心 30分钟 ,取上清,加入 $5\ \mu\text{l}$ 甘油和 $6\ \mu\text{l}$ 考马斯亮蓝。取 $40\ \mu\text{l}$ 样品进行 Blue-native PAGE 分离线粒体复合物,方法见参考文献 (Ilka Wittig, et al., nature 2006)。

[0075] 线粒体呼吸链复合物活性检测 :

[0076] Complex I 活性 :将 Blue-native PAGE 分离胶孵育在 50mM Tris-HCl, pH 7.4 缓冲液中 (含有 0.5mM NBT (Nitroblue tetrazolium chloride, 氯化硝基四氮唑), 5mM NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)),室温作用 1小时 。

[0077] Complex II 活性 :将 Blue-native PAGE 分离胶孵育在 50mM Tris-HCl, pH 7.4 缓冲液中 (含有 4.5mM EDTA, 10mM KCN (氰化钾), 0.2mM PMS (Methylphenaziniummethylsulfate, 吩嗪甲基硫酸盐), 84mM 琥珀酸, 50mM NBT),室温作用 1小时 。

[0078] Complex IV 活性 :将 Blue-native PAGE 分离胶孵育在 50mM Tris-HCl, pH 7.4 缓冲液中 (含有 0.1% 二氨基联苯胺, $24\text{个单位}/\text{ml}$ 过氧化氢酶, 0.1% 细胞色素 C), 37度 作用 $3-6\text{小时}$ 。

[0079] Complex V 活性:将 Blue-native PAGE 分离胶用清水漂洗 10 分钟,放入 0.1M 的甘氨酸缓冲液中 (pH 8.6) 作用 1 小时。再将分离胶放入含有下列成分的缓冲液中:35mM Tris 碱,270mM 甘氨酸,14mM 硫酸镁,5mM ATP,0.2% 硝酸银,37 度作用 3-6 小时。

[0080] 参考文献

[0081] 1. Wallace DC (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39:359-407.

[0082] 2. Wallace DC (2007) Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem* 76:781-821.

[0083] 3. DiMauro S, Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668.

[0084] 4. Calvo SE, Mootha VK (2010) The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11:25-44.

[0085] 5. Borst P (1977) Structure and function of mitochondrial DNA. *Trends Biochem Sci* 2:31-34.

[0086] 6. Christian BE, Spremulli LL (2011) Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 10.1016/j.bbr.2011.11.009.

[0087] 7. Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76:723-749.

[0088] 8. Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138:628-644.

[0089] 9. Boardman NK, Francki RI, Wildman SG (1966) Protein synthesis by cell-free extracts of tobacco leaves. 3. Comparison of the physical properties and protein synthesizing activities of 70s chloroplast and 80s cytoplasmic ribosomes. *J Mol Biol* 17:470-487.

[0090] 10. Frazier AE, et al. (2006) Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery. *J Cell Biol* 172:553-564.

[0091] 11. Bonnefoy N, Fiumera HL, Dujardin G, Fox TD (2009) Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochim Biophys Acta* 1793:60-70.

[0092] 12. Ott M, Herrmann JM (2010) Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochim Biophys Acta* 1803:767-775.

[0093] 13. Schagger H (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1555:154-159.

[0094] 14. D' Aurelio M, Gajewski CD, Lenaz G, Manfredi G (2006) Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum Mol Genet* 15:2157-2169.

- [0095] 15. Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32 :529-539.
- [0096] 16. Althoff T, Mills DJ, Popot JL, Kuhlbrandt W (2011) Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I(1) III(2) IV(1). *EMBO J* 30 :4652-4664.
- [0097] 17. Qin Y, et al. (2006) The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome. *Cell* 127 :721-733.
- [0098] 18. Margus T, Remm M, Tenson T (2007) Phylogenetic distribution of translational GTPases in bacteria. *BMC Genomics* 8 :15.
- [0099] 19. Han B, Qin Y (2012) Bioinformatics analysis reveals that LepA C-terminal domain is highly conserved in domain architectures and phylogenetic distribution. *Scientia Sinica Chimica* 42 :24-31.
- [0100] 20. Connell SR, et al. (2008) A new tRNA intermediate revealed on the ribosome during EF4-mediated back-translocation. *Nat Struct Mol Biol* 15 :910-915.
- [0101] 21. Liu H, Pan D, Pech M, Cooperman BS (2010) Interrupted catalysis: the EF4 (LepA) effect on back-translocation. *J Mol Biol* 396 :1043-1052.
- [0102] 22. Liu H, et al. (2011) The conserved protein EF4 (LepA) modulates the elongation cycle of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 :16223-16228.
- [0103] 23. Pech M, et al. (2011) Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg²⁺ concentrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 :3199-3203.
- [0104] 24. Mitchell P, Moyle J (1969) Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 7 :471-484.
- [0105] 25. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 :517-529.
- [0106] 26. Szaflarski W, et al. (2008) New features of the ribosome and ribosomal inhibitors: non-enzymatic recycling, misreading and back-translocation. *J Mol Biol* 380 :193-205.
- [0107] 27. Karim Z (2009) The importance of the ribosomal elongation factor 4 (LepA). *Dr. rer. nat. (Freie Universität Berlin, Berlin)*.
- [0108] 28. Tatsuta T, Langer T (2008) Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* 27 :306-314.
- [0109] 29. Diaz F, Kotarsky H, Fellman V, Moraes CT (2011) Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. *Semin Fetal Neonatal Med* 16 :197-204.
- [0110] 30. Rugarli EI, Langer T (2012) Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J* 31 :1336-1349.
- [0111] 31. Shoji S, Janssen BD, Hayes CS, Fredrick K (2010) Translation factor LepA

contributes to tellurite resistance in *Escherichia coli* but plays no apparent role in the fidelity of protein synthesis. *Biochimie* 92 :157-163.

[0112] 32. Bijlsma JJ, Lie ALM, Nootenboom IC, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG (2000) Identification of loci essential for the growth of *Helicobacter pylori* under acidic conditions. *J Infect Dis* 182 :1566-1569.

[0113] 33. Wang L, et al. (2012) A conserved proline switch on the ribosome facilitates the recruitment and binding of trGTPases. *Nat Struct Mol Biol* 19 :403-410.

[0114] 34. Pfeiffer K, et al. (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278 :52873-52880.

[0115] 35. Kiser GL, Weinert TA (1995) GUF1, a gene encoding a novel evolutionarily conserved GTPase in budding yeast. *Yeast* 11 :1311-1316.

[0116] 36. Bauerschmitt H, Funes S, Herrmann JM (2008) The membrane-bound GTPase Guf1 promotes mitochondrial protein synthesis under suboptimal conditions. *J Biol Chem* 283 :17139-17146.

[0117] 37. Schieke SM, et al. (2006) The mammalian target of rapamycin pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J Biol Chem* 281 :27643-27652.

[0118] 38. Heinemeyer J, Braun HP, Boekema EJ, Kouril R (2007) A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J Biol Chem* 282 :12240-12248.

[0119] 39. Dudkina NV, Kouril R, Peters K, Braun HP, Boekema EJ (2010) Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim Biophys Acta* 1797 :664-670.

[0120] 40. Wallace DC (2011) Bioenergetic Origins of Complexity and Disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 10.1101/sqb.2011.76.010462

[0121] 41. Wallace DC (2010) Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen* 51 :440-450.

[0122] 42. Wallace DC (2009) Mitochondria, bioenergetics, and the epigenome in eukaryotic and human evolution. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 74 :383-393.

[0001]

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> EF4 蛋白编码基因沉默在癌症治疗方面的应用
 <130> IB127582
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 23700
 <212> DNA
 <213> 人
 <400> 1

ggtaacttga tgacgatgga aacattgggg gtccagcatg gaacttttcc ccacctttac 60
 ttcttgccaa aaccttctcg gattcagtat tgcaatcaat gttatggccc gtttctttc 120
 agatgcactt caagattage tetgtcactg acaacatggg gaatacattt cgacctccag 180
 attttaaaag tgccattatt attttgcct taggtagaag gctaagtctc aacgttgtc 240
 taataatage atctttaagt ccttggacta agacctcgcc tcttggttcg ggaatcagac 300
 tgcctgggeg gcactccagg ctccacagct ccccactgt gagctcctgg gcaagtcact 360
 cggctcggat ttccagaggt agtttggggg aactgacagt acacacacca cagggcagta 420
 gtaagaaaga gacaatgcaa aggaattggc acagcactca gcagacaata taagctaata 480
 tgtactctgt ctacacctg cgttttaggg agtcaatga aagcctccac tcactgacc 540
 actccaactac ceggcgcca gacgcgctga tgtcacgaca gcgtgcggcg tgcagacgtc 600
 ggcaagetgc gccgcgctt cgggttgcct ccgatctgg tacttgggca gagctcctcg 660
 gggttcattg tcttcgcttc acaggatctg tttgagctct gtccaccgga tctacgggg 720
 ggtaccttcg aaaaaaacg ggctatgctg ctgttgcgtg tgggtaccct ctctgacgc 780
 ctccgcgcc cgggtcatgt ggacctcgt gggtcggggc tgggggtgeg cacgcgctct 840
 cgcgccacga gccactgggg ccgcgctct ggtgccccg gggccccgt ccgcgcgcac 900

[0002]

cctggggct gctccagagt cctgggctac cgacaggctc tacagctccg cagaattcaa	960
ggtgactgcc cectggaate tgatttagcc aagtttcaa acgttggagt gcccacatgcg	1020
atcttgaca tgatagggc ttctgggac tagctctgaa cectgcttgc aacttggtag	1080
agggaggcag agcggagagt gtgagcactg ctcaggctcc cgaccctcca ctctcacta	1140
gtgtgacctt gggcaagtca ctaactttgt aggtttctc atttcaatg tcaaatgttg	1200
atftgttac gcgagccact ggtcgaagtg ctttgcgttt atcatctat ttaattctaa	1260
aaagcctact aagcaagtg ctagtaaata tfaatataac gtccatttc ctgcaaatta	1320
agtagctatg tggcctgggc aagtactac attgtcactc tctacttca tttgttgaat	1380
gcagaactga tcaaacatcc agtggctaata ttgtgagatt tgtgtgatgt gagaagtga	1440
ctttttaga ctaataccta gaatgcagga agttctcggc ctgtctttgt agttttattt	1500
cattctacct cagccagagc aaacctgtgt aattttgact ctggtgggag aggggtgggag	1560
gttcaacaac tctgataatt gtgaatgat acattttagt cagaaaagt aagtactga	1620
aggcaagcta taagtaggca gaaagacaaa acctaaatt aatcaacttt ggcctaata	1680
tgctgtgtt tttaaaatg gatttatatt gcaattcgaa gtataaagat ggtgcaatte	1740
tctatacctt ttgaactgaa gggaaagaaa atctacaggc caaacatcag aattagtttt	1800
tttccggcag acttccagct ataattgtgc ttttattac tgtctttatg gggctattaa	1860
aaaacaaagc tcacgtgaat ttatatttc attgtaattt catggttttg ctgatttga	1920
aatatgcagt tgattggaaa aaaatagagt acaaaaaact ggtatatttt gcttgataac	1980
aatttctagc aatttggat gtgttccagt aaaacgttaa agaagatgtg tacacgaaaa	2040
accaggagtt ccattttaa atattttaa gtttaagtg ataagcttt ttgttgatgt	2100
catcttttt tcttctcac cagagaagct gcaaagtgc aaaattgtat taaaataaa	2160
atfttgagge tccattagag acacagattt taaataaat ctgattcctg attaaatgtg	2220
tgataggagc agaaaattta tcttcttca gctttctgt agctccattg cctcaaaagt	2280
ttactagac aaggtattct caggccttga gaagtctag gtgtctcatg ttctccattc	2340
acgataataa atcagttcc tgattgccc taaaattgt gtagaatgt taagggatta	2400
tgatttagct gtatagttac ctttgctat taaactgat ttcctttaa tatgaactta	2460
gccatacatg tcttttctt agaataataa tataacaat ataaatgcta gaaatgatat	2520
tgtcaacga ttaaagaat attctttaa ttggtact tgtttgatag tatgccaat	2580
ttatactctt aaatgtgta ttccccctt ctaggaaaaa cttgacatgt ctaggtttcc	2640
tgtgaaaat attagaaatt tcagtattgt tgcacacgtg gatcatggca aaagtacttt	2700

[0003]

agctgacagg ctctagaac ttacaggtat ttcattfatg ttacatactt aactgatggc	2760
tgcgagttat tgggaattac tttactctt aaatttaat tttafaagta atattctctt	2820
tttttttaa agcccagaga aafatcaafa agtgtttctg tttataggga caattgataa	2880
aacaaagaat aataagcagg ttcttgataa atgcaagtg gaacgagaaa gaggaatcac	2940
tgftaaagca cagacagcat ctctcttta caatttgaa ggaaagcagt accttttaa	3000
tctcattgat acaccggtaa gttfaatatt aattttgcat gtattgttaa agtcaacatt	3060
gtgtcagtag tgcaaacaga tcttgttta attttgaac tgagtattaa acatctgect	3120
ttgcttttg tttctcagt gttctatgt tagtgcagt tgttcaaaa gtgcaggcta	3180
caaaaaagaa acgaatattt aacagctttt atcaagtaaa gteaataaat ttgccataat	3240
gctcttctt aaaaaattaa ctacattta caggtatcaa tattttgtt tctcagggcc	3300
atgttgattt tagttatgaa gtatccaggt cactttctgc ttgccagggt gttttactg	3360
tggttgatgc aatgaggta ggtattttc attttgatg atgtgatg acatgactat	3420
ttggtgttt caagagttt tctttaaata gtgtttgga aatagaattt ttgtgttga	3480
aaaatagatt taactgtta ctactgaaa atcatatgtt ttcactctgt taactgaaa	3540
tattattaca ataaagcatt ctctggaatt gactagttt taaattggaa ttgtcaaaa	3600
gattgtgta ttttttgaa gtgtgacac atattgcaa tgcacttac caaaaaace	3660
ccaccaactt tagcagttct taactgagg ttctatate catttttagc agatettaag	3720
aataatecat tagttttag atcattttg gtgatttaa ggcaataatt tggagattt	3780
aggttttaa aaaatcagta acattactaa gctctttgt tgtgtaagcc gtaaagacac	3840
tcagcagatg accatgtaag agctgtgaat ataaactttt gttacatgtt tctcaaaaac	3900
tcttcattca aaaccaact ttttttagt ggtggtggtg accgtgtgt gttagccgt	3960
taagccfttc ctgateccat caaggaaagt caatctctac ctatgtagg cagtactggc	4020
ctttataaac tacttgatg actgtgtct ctaataaget ttgaggtect tgagagteca	4080
tgttacatct tttgttctc caatgcctga ttagtttct ggacagaaa aggccctcca	4140
ataaatgctt tctgaactga aaggaattat tacagaggat gattcagatg catggaaaaa	4200
taggtatcat agttgagctg ccgtgtacct ttccttaaag gcttctate tcaagcttag	4260
tagactgtct gttggtcac tctactgat gtgattattg cttaccate agegatttc	4320
atattgacc caaagacata agttggagag aaaagcatga aggtagcta catggcattt	4380
tgttaattt tattattagc ataacgcaa atctcttgat gaagatgat agaatggtct	4440
taaattaca gttttgat atataataga atggtcatct cagtatctg tatcttgata	4500

[0004]

tttcaggga attcaagccc aaactgtagc aaactcttt ctgacctcg aagcacaget	4560
atcggttaatt ccagttataa ataaggtaat facaatgaga caacagtgtt getatttcaac	4620
tttctaaaag tacaattaat gttfaaatgt cagttgtact attcattata tgagggatca	4680
ccagctattt attaaatata ttggtgggat ttatctcttt gaattgtata taacagaagt	4740
gcaactgaaa ctacccttg cacagaattg agaaggtagt tectctgaat taactgtgg	4800
tagctgaggg ccatttctgt agggaaggga agcagggcag atgaaacatg ttgtcagat	4860
taaaccatac ataggaaaag aagagaagtt tataatctag gaagaaacaa facaacacat	4920
gaagcatgac aatttagtgc taaactgagc tetgtctata aacttccatt teatatttta	4980
aaattaattt agaactctaa ttttaaaatc tgcattgctt taattatatt tcttgataat	5040
ggagttaagt ttaaaagaag gccataggta agacagcttg ttgtcagact taatgttga	5100
tttaacttaa cctttaaact cagttcacat gctgcttaat tgataaatta ctactgatct	5160
cttctgctgc cctgggtagc taactgetta agttttttt gcaagctctg ctacttaact	5220
tctcttttc aatcatggtt attaaattat actgctaata tatagattat ttactgctt	5280
ttgaaaaaat attgtagagg ggtagtag gttaaagtgg gtaagctttt aattacctcc	5340
gaactactggt aafacataat acatcttacc tttattatac ttacataat ggatttttt	5400
tttaaaagat agatctgaag aatgctgac ctgaaagggt tgaaaaccaa atgagaaaag	5460
tgtttgatat tccaagtgat gaatgtatta aggtaaaata cgttctaaa aagattatac	5520
tttgaaaaaa gctcaagta attgggctaa gtgaaatttc atggtatttg ataacctgge	5580
attatagct gtttttata gttttacaaa cttcttttac tattatttcc ttgactctt	5640
atcaaaaagcc cttttatata tgttaggaca tacagaaatt attgcgatgc tgtagttaa	5700
ggaactgagg ctcaaagggt ttatcacttt cctaagatca caggtttagt tagccaatgt	5760
gccaggacta aaacacagge cttctgaaac tccctgcagt atttctgtg tgcagtttg	5820
cccagtggaa ataactgtctt tgaagagcag gttcaaaacta atttcagggc tttgtatgt	5880
atcattcttg gaactgacaa aaacctattt tataaaaagc tagttgtagt gctaggaaac	5940
aatagatttt attfatacca aagttgctac cattftaaat ttgaattttt attfaccftt	6000
gaaatgatga tctgcttgtt aaacagccac agccaaactg ctatactaca tggtagtgta	6060
aagtatgta gcacagcaat gtaatgtttt tcttcaagc taattfaatt tcaaaagag	6120
caagttatat atggttttat atttggatt atgttatatt aaaatacaat taactattct	6180
gattttaatc ttaataaaat tcaatcagat tcttatttgg tatatgccag ctaagagtat	6240
ggcagtgaat aagacagaca agacccttc cttctgcag acagtcaata aataagtaa	6300

[0005]

caaagaagta agcataggaa ttattgacta ggatagagat tgtcaaggaa attcattcga	6360
caaattgta ttattctagg tgaatacca tcattaacag tgaaaagtet tttttctag	6420
agagacgta tgacatggaa taacttagca aaagcgtctc tgataaactg aaacgtggag	6480
gaatgaataa ttttcagaaa aacattccag gaagagaaaa gagcatgtgt aaaggactta	6540
aattaggaaa agatttgca tgtttactga tcagaaaggt tgattggatg agaaggcttt	6600
gtaggggtat gcaggaatea agtcatgctg ggactcgtgc tgtgetgaag agcttgaaaa	6660
ttattctaag acaatggaag gattftaaag caagagaaac aaattaacca gtcattcagg	6720
tagccttaca gagaatggat caagaggta taagaagaga tacagggaat ccagctatta	6780
atggtagccc agatgtgaaa ttactatggc tcagtattaa ctatccatat gaaaaggaga	6840
ttatgateca ggaggaaaca atatacataa aacataacag ttcattgcta aactgagcac	6900
tgtctacaaa cctccattc atactftaaa aftaataaag aaccttaatt taaaatctg	6960
cattgcatta aatgatgttt ettgatttg agataagtat ataagaagca cagetgccc	7020
taggcaagat agcttgtgt cagatacaag aaacgaacca gaccattat ttgattctt	7080
tttccagta atgtaaget gtctgtata tggcataga aaaaacacat aattggatgc	7140
agtcaaggtt gaggtttgt cagctgcctc taataagaag agaacagaaa gtggtgaac	7200
cagagtgaat gtaaatgatg gatcttggag tccatctgg gaaaagatag aaacagagtg	7260
gaggtgaag ctgatggaca gcataagta gtatattcaa tagttacaag ttaaggacta	7320
ttgtaaagaa agtactacag tctagagcag tagttgtcag tgggtgggtgg tttgcccct	7380
gggcaaatat ttggagatat ttttggttt cacatcttg gagggatgct accagcatct	7440
tgtgggtaaa tgagggtccc tggttgctgc tgaacatcct gtaatgcaca ggacagcctc	7500
ccaaaacaaa gaattatctg gccc aaatg tcagtagggc tgaaactgag aatcctagt	7560
ctagagtga tglgaagagt aagaagttg aagtcaggat ttcagagata gtccattat	7620
taccagtgat aaaggtcagt cataccatgt ggettgagt ttggettgt tttctggtgt	7680
gagaacacta aagtagtagt aagatgcctt atggtttat gccatccaca tacattgttt	7740
atccacacaa caacctgag atttagcag aatatgaata atcacitcat ttttagatg	7800
atgaaattta tgcacaaaga gatagatact ggtgaaatac atggattcaa tgcaagaca	7860
tgattgttac ccagatttg aactattcct cttcaatac cataattagg actctctgt	7920
aattccattc tagaactgta gaactacgta actataatag aaaaagtatt tgcataata	7980
ctgtttgctt tgttctttc cttttggtgt atttctcaaa ttgataacta ttggaatttt	8040
ttttcttc tgatcataag tcacaggtca tcaagataga aaagtatagt ctaacttta	8100

[0006]

aatgcttata ttttccacat gtatctttt agatttetgc taaacttga acaaatgttg	8160
agagtgttct tcaggcaatt attgaaagaa tccccccgtg agtatttggg gatttttga	8220
ctagttgtct ctatttaata gttcaaaaac tgtccatgtt taatagtcca aagactgcca	8280
gcttgaactg ttattttagc ttaatggatg tggcaaatat tcttgcaggc agcgagaata	8340
aatttatttg cttttagtaa tacatagaag gcaagtacag taaagtaaaa gaaaaagtaa	8400
agatgattga tagaggtctt tcatgacaa tcattataaa atatacctca gtacattggc	8460
agttatttc ctttgcttfa agctgaacaa atatattcat aaataatttg taaaactag	8520
aggftattaa atctaataa tttfataaaa aggtctttt atttaggetg ttgtgtatca	8580
aactttctca agaactcaag tacaatatct aagftgaaaa taagaatttt attaagattt	8640
taatttagtg tatatatatt tactttttac ttatatttac tagtectaata gtgcacgca	8700
aaaatectct gagagctttg gtatttgact ccaccttga ccagtataga ggtgtgatag	8760
ccaatgtagc attatttgac ggagtggftt ccaaaggaga taaaattgta tctgcacata	8820
ctcaaaagac atacgaagt aatgaagtag gactctttaa tctaataag cagccaactc	8880
ataaattgta agtaactgc attagtaaaa taaaatgca tttgtatgtg gttctattc	8940
tgcattttc tcaacttggf atgettagaa tgactctcat ttggtaactt aaaaaaact	9000
atttaatgca actatacagt aaatgctctg tcaaggaatc tcatgggaag gacaatagaa	9060
aegtcagttg atacttttt tattctaaat gaactagttat aactagattt atgatcaagg	9120
gtagattgga tcttatatcg atgtatttga tgagacaatg aaagagttag ttcctccac	9180
ccatatccat attaggtatc attttgaca tttctcata actagatttt ccaatgtaaa	9240
ggtggtataa tagaaacctt aataaatctt tagtgtggaa tcatggtaa aaccttgatt	9300
aaaattcttg gggagtagga tttagcaagg tagtgtgcat tagaaaaaca tctgaattga	9360
cttgtaaaag aactatttat tgagtgccta ctccgtatca ggtactgatg aggeatgacc	9420
ttgggtacat aatttgagct ttgtaagtc ctgttccttg tctgtagaaa ttattgaacc	9480
agatgactgt cagatcacat ttgagtgtt agtgttatat gtctaaaaac agcactatat	9540
tgagtcagaa agtctatttt tattttactg aaatatttta acatctattt atattctgcc	9600
atatatacca aacattatca catcttcatt taaggttctt aaagctcatt ctaagtgtaa	9660
atcattttag tttttaggg atttttttt ttaactaage ttaaactgaa ctcataggat	9720
ttgcttttt getacaggag gaatacaag tgtccagttt gttgagagtt cacattttc	9780
ttggataaaa atttacctt ttttctttg ttaaagaaca ttttcaaac aattcattaa	9840
taaaagacat cacaagtgta cttattataa tgcctttgta cttactagtt tcaactgtatt	9900

[0007]

tacatatatt ttgaaactg ctgttfaaat tgcaaagggt ggcagaatca tgaaaaagge 9960
 attaggftta taagtagaga ggtctaattgg attgtaagac ctggtgtgft catttgetga 10020
 caagctcag agtttgataa ttgatatgta gcacttattf tcaaagtgta tggaaagttt 10080
 ggaaaagtga tgatagtffc ctgggaagggt agaactaatt gtgagttatg tgcttgaaac 10140
 attaaagcag taaatatttg catataataa tttatttag atatgcagga caggfgggct 10200
 atctgattgc tgggatgaaa gatgtcactg aagcgcaaat aggagataca ttatgtttac 10260
 ataagcaacc agtggagccc ttgcctgggt ttaaatecagc gaaaccaatg gtatttgcag 10320
 gtgaggagft cacaaattca aaggttgagg gccatgatat tttaaacta aaagtetgtc 10380
 tcagtggfta aggaaaaaat acacattctg gttattttaa ataaccacta attccagcat 10440
 attgtttcac tttgtctgt ttatcagttt ataattacat atgtgtgatg aaattatag 10500
 tgggatca ttaggatgt gtaagaaat aagttcttga ggaagaagct gtgatata 10560
 ggatacagta atataaattt cttcttatt tttctagga gttcattatt atattgaaa 10620
 cattttcta attaggatgt tcttattag aattateagt agacactgac tgagtgcctt 10680
 catcttcgat agactttctt taatattgta ctgtactaat gtagatatga cagaatgggtg 10740
 ttgectcaag tacgtataat ttcagaatct tttacttcat ttactttgga aaaaggaaga 10800
 cctgattgaa ggtcatcagg ttactctgtg ctgagtatct agcccttaatt tttgccccta 10860
 cagtctctct cactgggaat taggaacttt gttaccct accttaggc aaagtcagtc 10920
 atgtggattt tagaggactt cagaggtgct agatgaaaga gaatcagtag tgattcccat 10980
 agtttttgc agtaaatace aaaaagcaaa atttaactat ggttttaagt agataatctg 11040
 ccttagagaa ttgagagtgc agtatagttt tcatgtctac ttctattttt atccaataat 11100
 aaagtttcat ttgggttggt gaatgtcttg tgcttttgtt ttgaaatta cactgtgttt 11160
 tcttaatagg cctaattccc atgtttttt tttcttttc cctgtatttt ttcaaaaaca 11220
 ttaaaaacat tatttggagt gcaaatctag ttgtatatc tttcagacta atgacttgta 11280
 agatactttg aaaccaata atcattcatt tttagcaaac caatattttg gtcaataaaa 11340
 tacaagaaag taatttaaaa ggtaaatgac taatttggaa ctggcagca ctacacatgt 11400
 ggtttgatag gtctgtaggc agcttatcac gtgataatta gaaatcattg fatccccagg 11460
 aatgtatcct ctagaccaat ctgaatataa caatctgaag agtgctatag aaaaactgac 11520
 tttaaatgat tccagtgta ccggtcatcg ggalagtage ctgtctctgg gtgctggctg 11580
 gaggtaagat tcaatcacat gtgtttata ggaaaggag gtgtaaatgg tgtatttta 11640
 aaatatttt ataggaaagg gaggtttta aaaaatact ttataagtaa gggaggtata 11700

[0008]

aaatggtgca ttgtctgga acatttactg aaaataagtt tatattagtg taaagtgaac 11760
 gaaaacaatt tttatctgcc tgtttcacgt tgeggattga cattttatgg gtaagtttta 11820
 tagtgattta aaatagattc ccaatggaag attttaatct tattaataa aattatgcta 11880
 gcatttaatt atatttgtaa ttgtttgaat gacttaattc cateectccc ttaaagtaac 11940
 aatatgttca ttaaaaaaaaa aaaaaatgaa gcccattggga cataaacatt ttggagtttg 12000
 tctttcctc ccccaggcta ggatttcttg gacttttga catggaagt ttcaaccagc 12060
 gactggagca agaataaat gcttctgta ttttaacaac ccctactgtt ccatataaag 12120
 ctgtaactgc atcatcaaaa ttgataaagg tacttggat tttagtactgg tatttagtac 12180
 tgttttgcatt tagtctcttg gaaaaataa atgtgtgat atacaatgca ggagaagctt 12240
 tttactatac caatagctga ttaagtatta aacaaaatat ttattgatta gtagtaataa 12300
 acattgaatt accctatggc taatgatgaa gaacttttt gaaaactaat ttatgcaata 12360
 tttttctaa cctgatgtaa tctccagatt atcaaaaacta gtctattgct gatagtaaaa 12420
 ggtaaaaatta gtagtgaaaa taatgftctg attctagcac aaagatgaaa aatgtaattt 12480
 tggtcataag taatttatct cgtaaaaagt gaagcattca ttctggtgac tgggaaattt 12540
 taaatttea atcagtgatg aagacagtat tgtattccat gtaagtggca atetgtteat 12600
 tttaaacaaa tactaatttt ggcaatctaa atatttcca acaaaaattaa cttattagac 12660
 tataatgttt tataagtgtc aggttaaagt gtattcttt gtcatacttc ttetaaatgg 12720
 tccatgaaat atgttttagta aatatcaata attggaatat attgtttact aatactgtt 12780
 attaatatta aatgattaca gctggaggga ttttaaaata taaggcaaac aagaaaaatg 12840
 ataateatta tattaagatt ttaagtattg ctgatttttc taatttttag gaacatagag 12900
 aaaaagaaat tacaattatc aatcctgeac aatteecega taaatcaaaa gtaacagaat 12960
 atttgagacc agttgttttg ggcactatta tcacaccaga tgaatacact ggaaaaataa 13020
 tgatgctttg cgaggtataa ctataataca attaataca aaattaggtt ttagtctct 13080
 gaaatagtga ttccaactc aggttttaaa agattcttt ctgetgagca tactgaattt 13140
 aatgagattt tcatatata atctgtctat atctatacac atagatatgt atacitttta 13200
 aattattttg attttaaata aaaatattc tgataattg tgaatttac tgattgata 13260
 tgttagceca aaggaaagaa atttgataat tagctaaatg tataatttcg cctttttgag 13320
 tagtttgaaa gataattata gtacttcagg gaccataaat ttgaaggtag tccattttg 13380
 ctttagttct caccacattg taataaatga tttaatccac aaatggtatg taattatatt 13440
 ccttaaaaat acctatgtga aatactctga tacatattgg aaagtgtgtc aaatggtgac 13500

[0009]

tgagctttga ttaggttaaa aactagattg taactttggt cttactttt aatttctctg 13560
 gaccttaatta ttgtaaaac aagaaattag gacttttgac tttatatgta gttacatttg 13620
 atttactggt aatgaaata gtgttcattt taaaagataa aattgttaga taaagattaa 13680
 aagctttggt agcaagccta atgcaattga aatataaaat gtttctctct ggattataaa 13740
 tactgectat aagtttttac tagaccttfa gagaaataca tcattcctca gtatttgagt 13800
 aggttatcat taaaccattt ttctctctc ctttttagg ctggaagagc agttcagaag 13860
 aatgatgat ttattgatea aatagagtt atgcttaaat atctcttcc ttggaatgaa 13920
 attgtgtag attttatga ctcttgaaa tcctatctt ctggatatgc taggtaaaaa 13980
 aataatgaga acctaatg cctgaccaac tttttgaaa tattgatgag caagggtata 14040
 ctaattctt atttattag taattcagc ttcttgaag atagtgaga atcactctt 14100
 aaggftagaa tgacttgaa caacttata ggtgttacag actactgtg attgcttat 14160
 aggagaaaag tttctttga ttattatct aactttatt tctctttaa caaaaaagt 14220
 tagtcccc ttcatgaaga gtgtattcc ttgtctgta agaattagac ctaatttea 14280
 aaattacca taacctcagt ggcacttta aatgtatat ttatgtatg caatctcaag 14340
 agcatctatt tacattgaa aaataaaagt gcatattcag tctgtaaaaa atgtagatg 14400
 tgcegeteca ttagtgaaca cttaataac ttagtcttt gaggaacagg ttgtcctcat 14460
 cacgaaaacc ttgtgtatc tcataggagt acatggagaa aagccagata aaagtgaaag 14520
 gagagttact attaaataac aaataagaaa ctcagggcat agcattctga gaggctgttt 14580
 tttgtgttg ttgtgtgtg tggggcatat aactctagat acctcacta tgccctaaaa 14640
 tcttatgta cgggatagta tatatagaaa acagatgiga aacatgggga agcaggaggg 14700
 gaaaaatgaa cattgacate tataaaacte ccacacagtg catgaatgtt aatgttaaca 14760
 tgcagagaca aattccagtg ttaacaaac atgctacagt gacttgaag ttaacttta 14820
 ttaateatc ttgcagtga agagagftag catatataat tcttctacc aaggaatctt 14880
 catgttctt tgtattgaga attttctct actttgtcac ccagttttt cttctctat 14940
 gtctcttc agacaagacc ttgagcaagt aagtggcaat ggaatttaa gtaaatgaa 15000
 ttgaggggca tattaaaatt actagagttg aaaggaagat tagtaggttt aatgtttata 15060
 aatatttta acagaagtct gtcaatttta gttgcaatt gggtactact ttctgaatta 15120
 taagtgtct taaaagcct tgcgtttg aaacttaaat acatttgaa ttaatgaga 15180
 gaacatgatt tattttgaa ctacataaaa ataaaatatt ccagctcca gattaaggt 15240
 aattatgtc aagatggatg tttaacatag gcagtcaatt ccacactaa cagaaagtea 15300

[0010]

tcatagacta tgaattaaga tcaggaaaaa acttatttca taccaggagg caagaatcaa 15360
 cagcaactag tagcttttg gaattacaaa tfgtfttct gcattetaag gaaacactag 15420
 aatacctatg tttcaatag aggttaggta tcaattggac tgcttgaaa caaaaacaca 15480
 attttataa tgatttctt tgaaaaatg agttaagaaa ttttaagat ttftaatatt 15540
 ttggaccaca acatagctgg agctgtaaca acttcaaagt taaggaccat gtctgtttta 15600
 ttctctattt gcttfgtatt ctgtatgata cttaacatgg tatcttcat acagtaaagt 15660
 tataagtgat gcttctgaa gaaagaaagg attttaacag tacttctgaa aataatctgt 15720
 taatagagtg tattattgtc actttatgac cttctctctg aaaatcttfa gaaaccaaat 15780
 ataattttgc aagtcagge accaattgtt ttaaattaa gacaatagga gtatacatat 15840
 tcttctctgt gattgggaca actgtaage ctaattgaaa tttctttag acttcagttt 15900
 tataagtgaa acattfaaat gtctgtttg actaacatta caagcttga ccacattgtt 15960
 aaaagtaata gctgaaacta agtgctgtg tfgtctaage taggctctgt taaacactt 16020
 attatgtact aggcattgct ctaattggtt tacatgtatt aactcattfa atcctcacia 16080
 aagccctgtg aagggagatg caagctgaag agccaaatag gaaatccaaa ggtctcattt 16140
 ataatggca ttttatgagt gcatagcat ttatttaaac atagagttgt cattggaat 16200
 agaaagttaa acagaaacce aactcatgaa tctgaaaatg atccattaat aatatatagt 16260
 attgtccgaa gcctcccagc tgctgggaac attgggaagg catgatattt gtctcaata 16320
 aaccatttc tttgtcaggt tcaccagctt atttctctt ccctataaa catatccccc 16380
 ttgcttttgc ccttgattta ataaacataa aaagataaca tttagatcca ttcacaagaa 16440
 actgtatatg taatattttg atggaaacat atctctttgg ggagtgtaat gcggtlagaaa 16500
 gtagacattt agtaaagagt aaagagtaat aaaggtaate tctcaggaag tgtaatattt 16560
 atcacttgga ctttttctt tttagtttg attacgaaga tgcaggetac cagactgcag 16620
 aacttgtaa aatggatatt ctactgaatg gaaactgt agaggagcta gtaactgttg 16680
 tacacaagta agttcaatag aaactaatca tggaaatgta aaatacttt galatgtttt 16740
 tcatttattt ttgttgagc agctgcattt aaaaaactt taaggtaatt aaaatagagt 16800
 tcaccctact aactttgctt tcttttttt ttcacactt ctctctagac tgctaaaaat 16860
 agaacagage tataatagtc aaaaagaaca gtgcataga aatgttccc ttcaccat 16920
 taaaaaaagt ttaaactt ttataatgat ggatttagaa ttgggaacaa gttttttgt 16980
 tttgtttgt tttttttta gatgggagtc tcattctgtt gccaggetgg agtgcagtgg 17040
 cgcaatttct gctcactgca acctccgctf cccgggttca agcaattctc ctgcctcage 17100

[0011]

ctcctgagta gctgggaacta caagcgcgatg ctaccatgcc cggctaattt ttgtattttt 17160
agtagagatg gggfttcace atattggcca ggatggctc gatctettga ectctgatct 17220
gcccgcctcg gcctcccaaa gtgctggatt tacaggegta agccacegcg ccttttata 17280
tttgtaaaaa aattataaaa aggaaaacc ccacgtgtc aagaaacagc agattggfta 17340
aatgaatta caaagcacc atattgttat ttccagccat faaaacttgt ggagtaatat 17400
ftagtgcacat aaaaatgtct gftaaatata aagagggtag aatatactg aaacactgat 17460
catacaaaaa aatgcaaaaa agtgattaga aagataactg ttfaaaataa tcattccaaa 17520
atgtttaacc gtttcagcg ggtaaggaaa gagaatcaag aacagttct attgtetaat 17580
gttgatttc taaatattct gtaatcatac attactttt taaatcagag aagttgtca 17640
tgattcagag agtaagagag attataagt aagttccatt tgaacctct taagagatca 17700
cctttacact gattatgcaa ctggcctaga aaaatactg aatattctt atttaggata 17760
tataaacagt tgtattttc tgtctcagag acaaagctca tcaattggc aaageccat 17820
gtgaacggct gaaggattct ctcttaggc aactgtttga gatagcaatt caagctgeta 17880
ttggaagfta aatcattgca agagaaactg gagftgaaat tcattttgg tcttgagcca 17940
gtttcagaaa tgatatact aaaaagtga agaatttga acatttaat ttaacattgg 18000
cctaagctt ctacttga gaaacagtat gatggctc tccagtttc tgatttaagt 18060
aatgactgtt acttgaatt acttatata cagcactggg tgatgtgac tgcagftagt 18120
ataactgata cgagttgag gaactgttt aattccact calatcaatg tctatactga 18180
atttctggg taaggaattt ctttatggt ttatccct taggtagatt atagattaat 18240
agaaactgaa actaaaaggt ttgtcttcc aatgacaaa attacaattt tttttaacc 18300
caaagcattt aatattgctt cccacttcc gcagagctag ggaggtata aatcaaggaa 18360
tgccaatacc atgttaggat ttgcatteta gattagggac ctacatgaa ttatagtaga 18420
tatggaagac aggctaattt gtgtcggaca ctagtcttc atgaaatgta atacataat 18480
cagaacactg gctgggtgtg gtggtcaca ttctgtgac ccaactactt gggaggctgg 18540
ggcaggagta ttgctgtgag actagtctgg gaaacatagt aagaccact ttttaacaa 18600
aaacccaaaa ataacaatga agaactgata ataagctgct ctgcttga cagcaggtgc 18660
aggatgtgtc ttgtagcact tccatttcc ttctttaat gactcaaga ctctaggaa 18720
ataggaagta tctctcagt tatgaaaagc tggaaattgc tattaaatc gacctaac 18780
caaactaat gaggaaatac aacctcatg ttaatataga ctgaggfta attftagcc 18840
cactgttga aatacattc atttctaac actgtttgc ttggttagt tattctgtgt 18900

[0012]

tttgtaaata ctgagatcag gcagagtaga aatgataact agggaacatc ctggaaagtg 18960
caatttaaga cagttagcaa ttgetcattc taaaataagt gtgttgagat aataccttaa 19020
aaaattgggt ttctgtctt aaggaataca taaagatgga gctatttca aaattagagt 19080
gatctagaaa ttctcaaac attgtagaaa tagattagt tataactgct ggggtggata 19140
tatcaagctt cctagccact ccatccacat teagtagagg cagtaataag ataataaaca 19200
tattttgttt ttctgaagta gtagtgtaa fttttagatt ggtaatttt agattagta 19260
aaaaataacc taatgtatft cttgtaatca aggtcacatc atgettgaat ttggcctaat 19320
caagcctacc acaagcctg accattttt ctaaatgtgt gttgataaac atgttgaatt 19380
tatttgtct ttataccaa gtacatgaaa ataaatacaa gagcattga agtatctaat 19440
taatagctt atggcaattt tacatagga atgatactat caftaaaatt ttctagtaa 19500
ggggagattg ttttggtaa ggaagtctt taaacagta taatggaatt atgtactaa 19560
acgaatttt ctctttaca gtgtgaaagc ctataggaaa aacgttttg caaaatgtgt 19620
atgtatctag ttgtattat tetactttat aactttatg ggctttaa at caaaggggc 19680
ataaacttat tgattccat tgttggttt tatacattct ttgttccaa gtcccttt 19740
tgaatagga aattcagct tgaccatgge aacctgtca tttgcccc atctttaaag 19800
tatttttca tcttattat aaaaattac aaaaatatt attaaaattg ttcttatag 19860
taactactaag gaagatttt acaacagta ttctatgat ctgggtaaca tgtttcttg 19920
atctaacata taatgaaaga tttgaaaac aatggettta tcttacagt gaagtctacc 19980
tctctgaca ttgtttgccc agtttgetgt tttcagctg ttaaaaaatt attctgcac 20040
cagcteggtg getcacaact gtaatcccag cacctggga ggccaagatg ggcagatcac 20100
ttgaggctag gagtccgag accagcctgg ccaacatggt gaaaccgag ctftactgaa 20160
aatacaaaaa ttagccagge gtggtggtgc atgctgtga tctcagttac tgggagggt 20220
gcagcatgag aattgettga gctcaggagg cggaggttac agtgagcaga gatctgcca 20280
ttgtactcca gcctgggtga gagggaaact ctatctcaaa aaaagaaaa ttattctaa 20340
atategtgag agttgaatga tcaattctt ctccaaagge acatttattc ctatgtgatt 20400
aagagtacc tatattagac tgtgcttfc tagtcaaat tccaagccta gaatcagtaa 20460
ggagattgat aattcttct tgacatgcat attattatc taggttctct tgggaattct 20520
cactccate cagattaaat cctgtatcat tcttgagaa gacagtaaaa ttgatctgc 20580
taggaagatt agagagatgt ctgccttatg gataataatt tggatggtt gtaagggtg 20640
tactgatccc gctgtaatca tatgattgt tetctttaga gtgaactaga ctccaatgt 20700

[0013]

tttaaaat tttcagat ggtggtgata ttaccgaaa aatgaagctt ttgaagagac 20760
 aagcagaagg gaaaaaaaaag ctgaggaaaa ttggcaactg tgaagtcca aaagatgctt 20820
 ttataaagt tetgaaaaca caatettcta aataattggt gggaaaaca agaatttca 20880
 ttgcaattg taatatgctg acaacagaaa gaaaattata aaatttgett gttacttca 20940
 gggattcag gttcaataa cctactagtc ttctgtgaa agggagtag tagtgggtag 21000
 gcaagagctt agatttgaa gccatgttgc ctgttctca atatctgtc caaccactca 21060
 ctagtaagg gaccgtggc agattaacct ttgttctc ttcagtaaa tcgagattat 21120
 actactacct acataagtg ttgttgtaa gattaaatga ggtaatacgt taaatatca 21180
 gagtgcaag acacatagta agcactcaat tgtaactaca gtaagtctt taaatgccat 21240
 cgaaaggctc ttgaaactg actttaagca aatgacacg tagcacaatg ttcttgaatg 21300
 atgcatctc cttaatggt ttgtaacac gatgaggaaa aaaaattggt ttatgcgca 21360
 tttcattta ttttattta tttttgaga cagagtctg cctgtgccc cagctggag 21420
 tgcaatggca caatctgac tcaactgcaac ctctgcctcc tgggtcaag agattctct 21480
 gcctcagct ccattacagg cgtgcaccac catgctgccc taatttttg tatctttagt 21540
 agagtcgggg ttcaccatg ttggccaggc tggcttgaa ctctgacct cgtgatccac 21600
 ccaccgtgccc ctccaaagt gctgattaca ggtgtgagcc accatgccc gccatgcat 21660
 ttcatttaa gtcacaattt ccatgaatc caacaagtga ggacctgcta tttttgtg 21720
 catgcagttt tctttacgg aactaaaag gcccatact taagattca tctacttaa 21780
 gtttaagga tttcagaat caccttaagt gtcaaattg ttgagcaggat taattgatat 21840
 gaattcactt attaaacagt aaactcaat aacatagaca tcaaataaca gacatctgt 21900
 ctagttaatg ataaaatgtt tatagattt atcaggtggt tagttgaaa ctaaatggtt 21960
 tacatetaa ttaagggcag gagetgtctt teagacattc aaaacgcatt tgtgtaaat 22020
 gacaggtgtt tggtaffacc aggaactcat aatgacattt taataattat tgtctaaatt 22080
 tcataatcga agcgattta gagtagtaa cttgagattt cacagccagt aaatggctgt 22140
 attctccag agctctcag tccatgttt atcagccaa cgaacaaacc agactgcaga 22200
 ctgtattaga gcaagacaac atcaatgagc caatgattt taactctac ctgaaatgaa 22260
 ttgaatgaag aaaatgtctt ttagggataa aactatcaa ggatgaattt tatactaagg 22320
 ttatatgaa gaaaaatctc aaaaccacta agccaaaggg aagcaagct gggaactgat 22380
 tgaggcaaac ctgctccca ttttattctt aaataagaca gccacaaaga taaaatttgc 22440
 tcacaaggga attcctatg gacaaagaac tcaaatctt cacatgaaac aatgcataa 22500

[0014]

atgattgett tctctgttcc atgtttcaet aagccagatt aaggtataac tgactattec 22560
 tctactetcc tctcacatgt aaattgtata ttcagtgaag ggctaatcag aaactcaaaa 22620
 aaatgcaacc cttctctct taectgccta tgettgaage ccccgccct cttcaagttg 22680
 tectgcttt caagaccaat gtacacctta cacatactga ttgatgtctc atgtctctct 22740
 aaaatgtgta aaaccaaget gtgccccaac caccttgggc acatgtggtg aggacctctc 22800
 gaggtgtgt catgggcaca ccttaacctt gggaaaataa actttctaaa ctgacttgag 22860
 agetgtctca gatatttga gcttacagtt attgtgaaat cattttaatt ataaattaag 22920
 tggagattta cttaaaatca tgtgtagaag tagcctgtga tatagtctca gatacatata 22980
 ttatcatctt atgtatcttc cctccctctt ccaggtctg ataaaaacag atgaaatctg 23040
 aaagaccatg acagtagtat tttgaaaatg acagtattg aaattaataa attgtaaaag 23100
 tgtctgttc tactactgcc aaaggataag ttacaaattg gttcttggaa cgtaatatgt 23160
 actatgtgct tgetatttaa taattacca gtcttagtct ttttattca gactaatttt 23220
 acctttttt aacctatgac tcttagtta tagtagtaca aaaaagtagt ttagttata 23280
 gtttagttg tagtacaata aagcatttc tgaagetta attcttcc cctcccct 23340
 ttcccagta gatgacttta gtgatttga gttgtgtgct ttataagtgc attcctcaga 23400
 ggaactaata ttactaagat tttagcaaac actgaaatat gtttaaacac ttttatcaat 23460
 atfaaaalag caccgtttat tgacttfaat atgtgacaac cactgtgctg agctatgat 23520
 gcttccctta tcaatctat gtaaaaattt tggggaagta gctgagactt ttttattcc 23580
 ctgacagage tgggattcag tggttggtt ctgaaaaag ctagggtctt tgcctaacag 23640
 cagcttagct cctcaattta gggaatgaaa gcaggaatga aaatggccag agtttctct 23700

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gguucuugau aaauugcaat t

21

<210> 3

[0015]

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
gaagagcagu ucagaagaat t		21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
guuguuguug ugaagauuat t		21

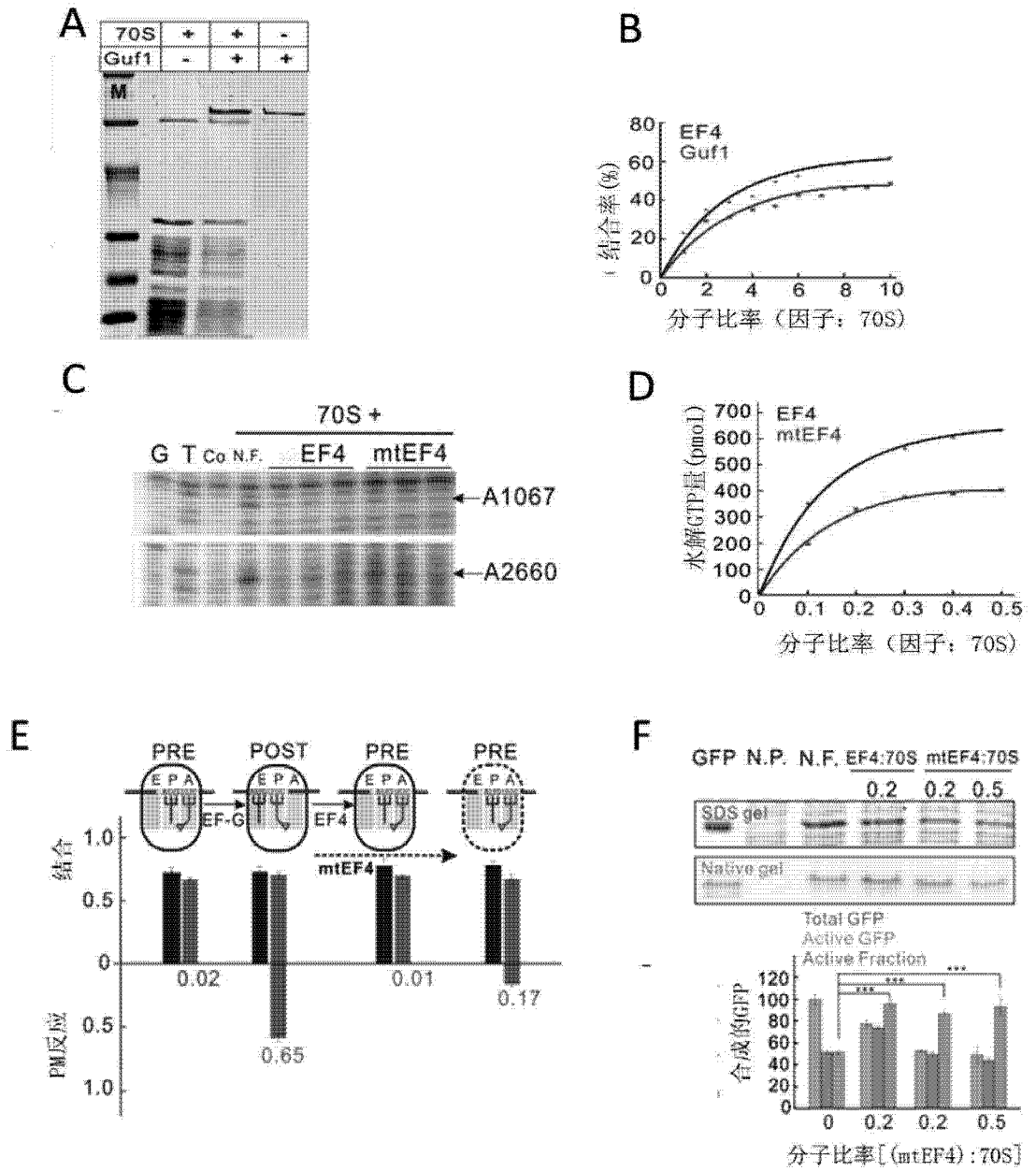


图 1

1299 Br A2 Hela SY5Y 3T3 293

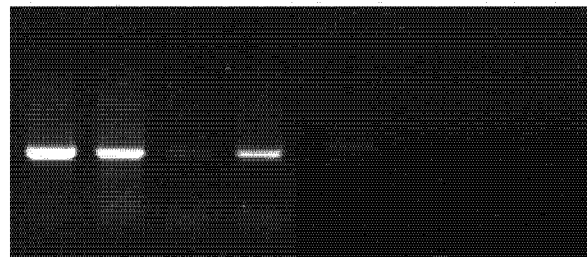


图 2

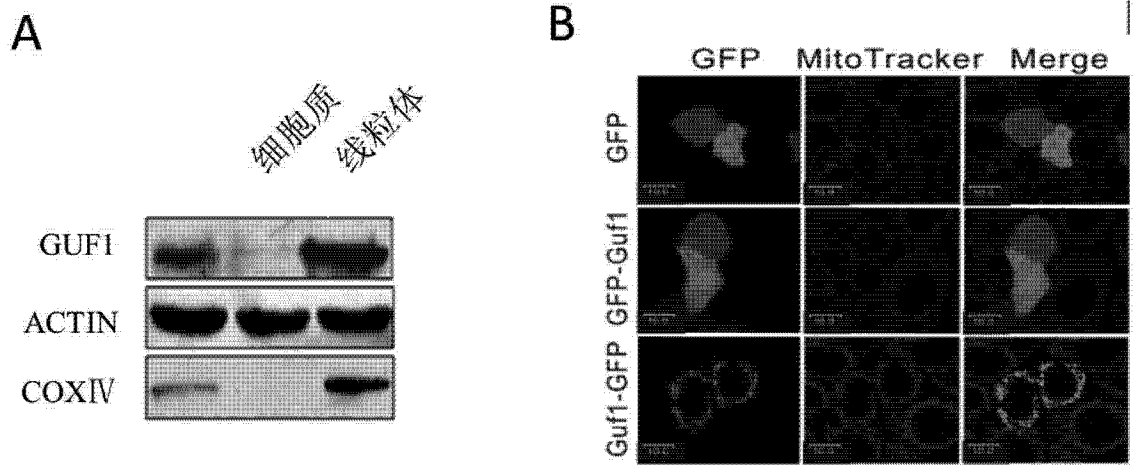


图 3

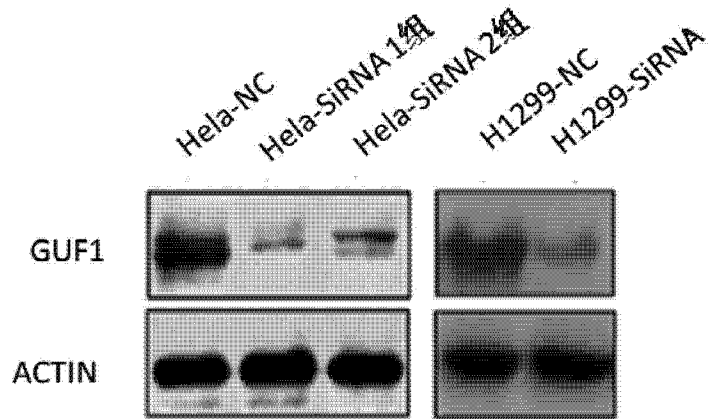


图 4

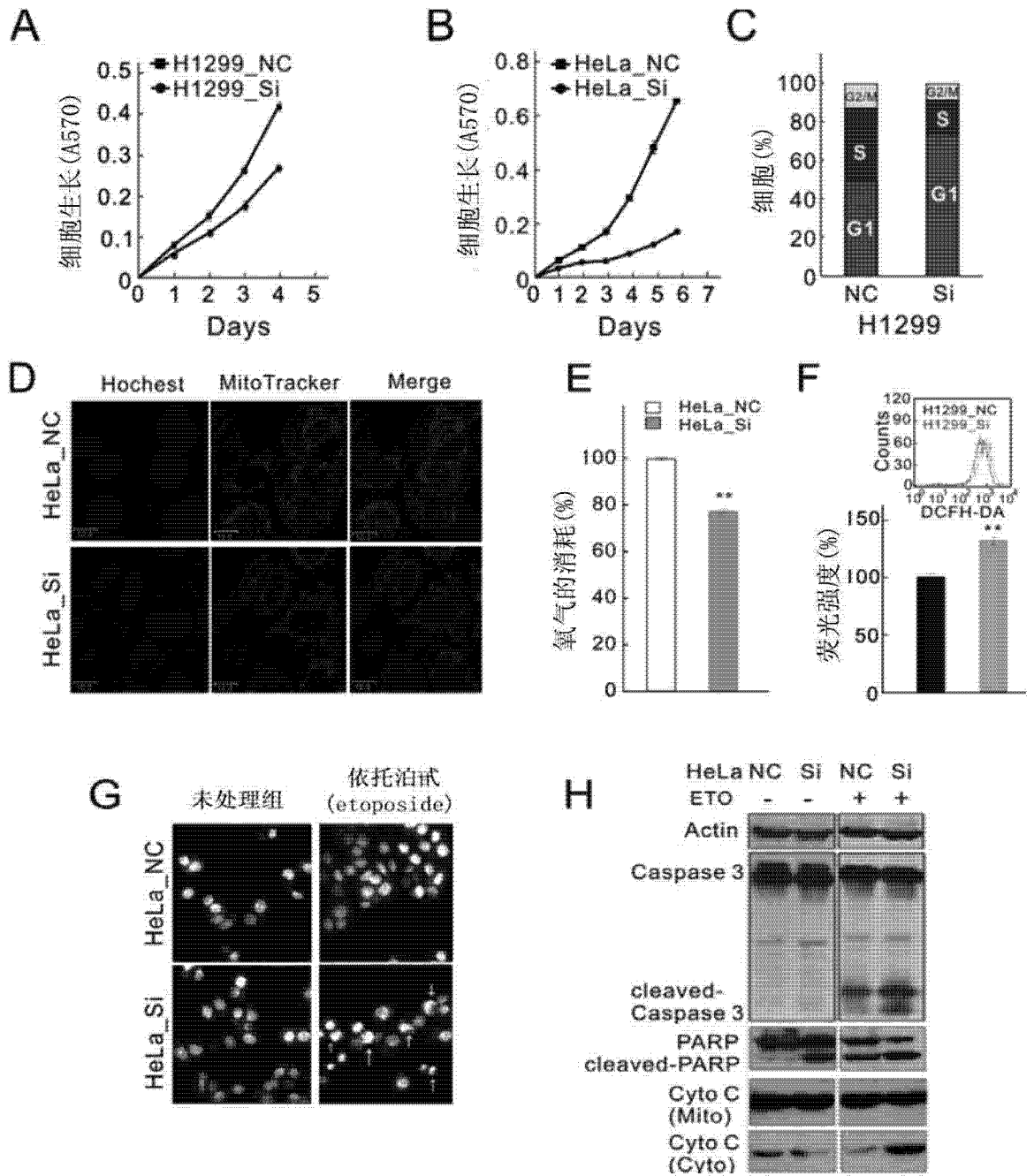


图 5

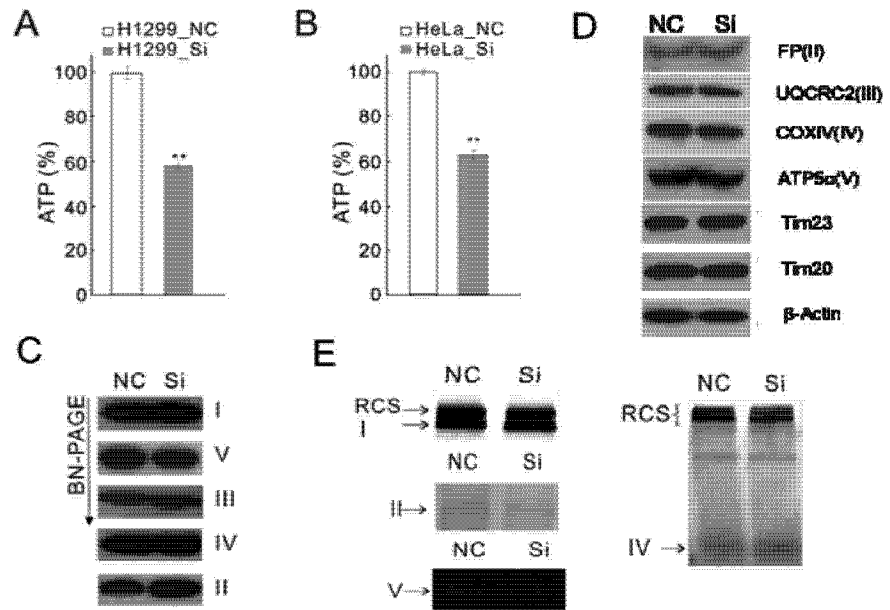


图 6