

[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 200910090070. X

[51] Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

[43] 公开日 2009年12月30日

[11] 公开号 CN 101613716A

[22] 申请日 2009.7.27

[21] 申请号 200910090070. X

[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 1 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称

重组鼠骨髓瘤细胞及其应用

[57] 摘要

本发明公开了一种重组鼠骨髓瘤细胞及其应用。该重组鼠骨髓瘤细胞是 NSO - GS1，其保藏号为 CGMCC No. 2128。本发明的能在无谷氨酰胺培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO，在无谷氨酰胺培养基中的培养效率高，细胞密度可达 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 12 - 18pg/cell/24h。用本发明的能在无谷氨酰胺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，又可减轻谷氨酰胺的分解给细胞带来的伤害，进而提高生物制品成品率和利润率。同时本发明的细胞制备方法，又节省了成本。这种能在无谷氨酰胺培养基中生长的鼠骨髓瘤细胞 NSO 及其制备方法在生物制药领域将会有广阔的应用前景。

- 1、谷氨酰胺合成酶编码基因的表达盒，由上游至下游依次为序列表中序列 1 所示的 CMV 启动子序列、谷氨酰胺合成酶的编码基因序列、序列表中序列 2 所示的 SV40 增强子序列。
- 2、根据权利要求 1 所述的表达盒，其特征在于：所述谷氨酰胺合成酶的编码基因的核苷酸序列如序列表中序列 3 所示。
- 3、一种重组鼠骨髓瘤细胞，是将权利要求 1 或 2 所述的表达盒导入鼠骨髓瘤细胞中得到的。
- 4、根据权利要求 3 所述的重组鼠骨髓瘤细胞，其特征在于：所述鼠骨髓瘤细胞为鼠骨髓瘤细胞 NS0。
- 5、根据权利要求 4 所述的重组鼠骨髓瘤细胞，其特征在于：所述重组鼠骨髓瘤细胞为鼠骨髓瘤细胞 NS0 NS0-GS1，其保藏号为 CGMCC No. 2128。
- 6、一种培养权利要求 3-5 中任一所述重组鼠骨髓瘤细胞的方法，是将所述重组鼠骨髓瘤细胞接种于含 8-10%（体积百分含量）血清、pH 值为 7.4-7.6 无谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基，在 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 条件下培养。
- 7、权利要求 3-5 中任一所述重组鼠骨髓瘤细胞在生产外源蛋白中的应用。

重组鼠骨髓瘤细胞及其应用

技术领域

本发明涉及一种重组鼠骨髓瘤细胞及其应用。

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关键的技术。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、NS0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、NS0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Erbix)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”。目前研发主要集中在CHO细胞上，而关于NS0细胞的研究很少。NS0细胞是小鼠浆细胞瘤细胞，与CHO细胞最大的区别在于NS0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。NS0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NS0细胞的研究，从而实现用NS0细胞株大规模生产药物产品，将会对生物技术药物产业化产生重要意义。

在细胞培养过程中，L-谷氨酰胺是很重要的，脱掉氨基后，可作为培养细胞的能量来源，参与蛋白质的合成与核酸代谢。由于NS0细胞中谷氨酰胺合成酶的活性低，所以需要在培养基中提供外源谷氨酰胺才能生长。但L-谷氨酰胺在溶液中不稳定，在高温下会分解成吡咯烷酮和羧酸，使得培养基的pH值难以控制，而培养基酸碱度的微小变化都将引起细胞存活率的下降；另外还有一些毒降解产物如 NH_4^+ 会不可逆转地损坏细胞壁。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种谷氨酰胺合成酶编码基因的表达盒。

本发明所提供的谷氨酰胺合成酶编码基因的表达盒，由上游至下游依次为序列表中序列 1 所示的 CMV 启动子序列、谷氨酰胺合成酶的编码基因序列、序列表中序列 2 所示的 SV40 增强子序列。

上述表达盒中，所述谷氨酰胺合成酶的编码基因的核苷酸序列具体可如序列表中序列 3 所示。

本发明的另一个目的是提供一种能在无谷氨酰胺培养基中生长的重组鼠骨髓瘤细胞。

本发明所提供的重组鼠骨髓瘤细胞，是将上述任一所述表达盒导入鼠骨髓瘤细胞中得到的。

所述鼠骨髓瘤细胞具体可为鼠骨髓瘤细胞 NS0。

所述重组鼠骨髓瘤细胞具体可为鼠骨髓瘤细胞 NS0 NS0-GS1，其保藏号为 CGMCC No. 2128。该细胞株已于 2007 年 08 月 06 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. 2128。

本发明的另一个目的是提供一种培养上述能在无谷氨酰胺培养基中生长的重组鼠骨髓瘤细胞的方法。

本发明所提供的培养能在无谷氨酰胺培养基中生长的重组鼠骨髓瘤细胞的方法，是将所述重组鼠骨髓瘤细胞接种于含 8-10%（体积百分含量）血清、pH 值为 7.4-7.6 的、无谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基，在 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 条件下培养。

能在无谷氨酰胺培养基中生长的重组鼠骨髓瘤细胞在生产外源蛋白中的应用也属于本发明的保护范围。

本发明的能在无谷氨酰胺培养基中生长的重组鼠骨髓瘤细胞，在无谷氨酰胺培养基中的培养效率高，细胞密度可达 10^6 个/ml，培养得到的 NS0 细胞能表达目的外源蛋白，且表达能力强，可达 12-18pg/cell/24h。用本发明的能在无谷氨酰胺培养基中生长的重组鼠骨髓瘤细胞表达外源蛋白，既能保证细胞培养效率和表达效率，又可减轻谷氨酰胺的分解给细胞带来的伤害，进而提高生物制品成品率和利润率。同时本发明的细胞制备方法，又节省了成本。这种能在无谷氨酰胺培养基中生长的重组鼠骨髓瘤细胞及其制备方法在生物制药领域将会有广阔的应用前景。

附图说明

图 1 为载体 PCI-CSP 的图谱。

图 2 为载体 PCI-GS-CSP 的图谱。

图 3 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、制备可在无谷氨酰胺培养基中生长的重组鼠骨髓瘤细胞

一、构建谷氨酰胺表达载体 PCI-GS-CSP：

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 1 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 2 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。

从离体的人外周血中分离外周血单个核细胞 (PBMC)，提取总 RNA，反转录，以反转录的 cDNA 为模板，PCR 扩增人谷氨酰胺合成酶基因 (GS)，扩增引物为：PCI-glu-U：5AGATCTGCTAGCATGACCACCTCAGCAAGTTCCCA3

PCI-glu-L：5TCATGTCTGCTCGAGTCAATTTTTGTACTGGAAGGGCTCAT3

将该谷氨酰胺合成酶基因片段以 XbaI/XhoI 酶切，纯化后克隆进 PCI-CSP 质粒的 XbaI/XhoI 酶切位点，得到重组质粒表达载体 PCI-GS-CSP。物理图谱见图 2。重组质

粒 PCI-GS-CSP 中含有人谷氨酰胺合成酶基因，其核苷酸序列如序列表中序列 3 所示。

二、电转 NSO 细胞

大量提取质粒，用 BglIII、HindIII 双酶切重组质粒 PCI-GS-CSP，然后再用 BamHI 继续酶切，得到 3.1kb、2.0kb、0.5kb 片段，乙醇沉淀，将 3.1kb 的含谷氨酰胺合成酶基因的片段电转入鼠骨髓瘤细胞 NSO 细胞 (The European Collection of Animal Cell Culture, ECACC)。

电转条件为：将 10^7 个细胞置于 0.4cm 电转杯，3uFD，1500 瓦电压。

三、电转后 NSO 细胞的培养及保存

电转后细胞重悬于 20ml pH7.4、含终浓度 10% (体积百分含量) 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 (表 1)，然后将细胞悬液种入两块 96 孔板，在 37°C，培养 24 小时后，吸出培养基，加入 pH7.4、含终浓度 10% 胎牛血清的无谷氨酰胺 RPMI1640 培养基，200ul/孔，培养 4 周后，挑选 5 株在该无谷氨酰胺培养液中生长快的克隆，移至 24 孔板，继续用该无谷氨酰胺培养液培养。当细胞培养于五个 10cm 培养皿，扩增达 5×10^7 个细胞时，将其中的一株 (名称为 NSO-GS1) 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. 2128，保藏日期是 2007 年 8 月 6 日。

将鼠骨髓瘤细胞 NSO-GS1 CGMCC No. 2128 置于含终浓度 10% 胎牛血清无谷氨酰胺 RPMI1640 培养基 (pH 为 7.4) 中培养，培养条件为：37°C，5% CO₂，每 72 小时传代培养一次。三次重复实验的结果表明，培养细胞密度高达 $(1 \pm 0.2) \times 10^6$ 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

实施例 2、用鼠骨髓瘤细胞 NS0-GS1 CGMCC No. 2128 表达人 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 4 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 XbaI 和 XhoI 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-GS1 (CGMCC No. 2128) 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含终浓度 10% (体积百分含量) 胎牛血清的、pH 值为 7.4 的无谷氨酰胺 RPMI1640 培养基中培养三天, 用 ELISA 鉴定 TNFR-Fc 的分泌, ELISA 板上包被 goat anti huIgG(H+L) (KPL 公司, 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 公司, 货号 074-1002)。

三次重复实验的结果表明细胞密度可达 $(1 \pm 0.2) \times 10^6$ 个/ml, 目的外源蛋白的表达量可达 12-18pg/cell/24h。

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 5 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。

序列表

<110>中国科学院生物物理研究所

<120>重组鼠骨髓瘤细胞及其应用

<160>5

<210>1

<211>750

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

tcaatattgg	ccattagcca	tattattcat	tggttatata	gcataaatca	atattggcta	60
ttggccattg	catacgttgt	atctatatca	taatatgtac	atztatattg	gctcatgtcc	120
aatatgaccg	ccatgttggc	attgattatt	gactagttat	taatagtaat	caattacggg	180
gtcattagtt	catagcccat	atatggagtt	ccgcgttaca	taacttacgg	taaatggccc	240
gcctggctga	cgcccaacg	acccccgcc	attgacgtca	ataatgacgt	atgttcccat	300
agtaacgcc	atagggactt	tccattgacg	tcaatgggtg	gagtatttac	ggtaaactgc	360
ccacttggca	gtacatcaag	tgtatcatat	gccaagtccg	ccccctattg	acgtcaatga	420
cggtaaattg	cccgcctggc	attatgccca	gtacatgacc	ttacgggact	ttcctacttg	480
gcagtacatc	tacgtattag	tcatcgctat	taccatgggtg	atgcggtttt	ggcagtacac	540
caatgggctg	ggatagcggg	ttgactcacg	gggatttcca	agtctccacc	ccattgacgt	600
caatgggagt	ttgttttggc	acaaaaatca	acgggacttt	ccaaaatgtc	gtaacaactg	660
cgatcgcccc	ccccgttgac	gcaaatgggc	ggtaggcgtg	tacggtggga	ggtctatata	720
agcagagctc	gttttagtgaa	ccgtcagatc				750

<210>2

<211>1252

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

cagacatgat	aagatacatt	gatgagtttg	gacaaaccac	aactagaatg	cagtgaaaaa	60
aatgctttat	ttgtgaaatt	tgtgatgcta	ttgctttatt	tgtaaccatt	ataagctgca	120
ataaacaagt	taacaacaac	aattgcattc	atztatgttt	tcaggttcag	ggggagatgt	180
gggagggtttt	ttaaagcaag	taaaacctct	acaaatgtgg	taaaatccga	taaggatcga	240

tccgggctgg	cgtaatagcg	aagaggcccg	caccgatcgc	ccttcccaac	agttgcgcag	300
cctgaatggc	gaatggacgc	gccctgtagc	ggcgcattaa	gcgcggcggg	tgtggtggtt	360
acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	cgctttcttc	420
ccttcctttc	tcgccacggt	cgccggcttt	ccccgcaag	ctctaaatcg	ggggctcctt	480
ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgacccca	aaaaacttga	ttagggtgat	540
ggttcacgta	gtgggccatc	gccctgatag	acggtttttc	gccctttgac	gttggagtcc	600
acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	caactcaacc	tatctcggtc	660
tattcttttg	atattataag	gattttgccg	atctcggcct	attggttaaa	aaatgagctg	720
atttaacaaa	aatttaacgc	gaattttaac	aaaatattaa	cgcttacaat	ttcctgatgc	780
ggtattttct	ccttacgcat	ctgtgccgta	ttcacacccg	catacgcgga	tctgcgcagc	840
accatggcct	gaaataacct	ctgaaagagg	aacttggtta	ggtaccttct	gaggcggaaa	900
gaaccagctg	tggaatgtgt	gtcagttagg	gtgtggaaaag	tccccaggct	ccccagcagg	960
cagaagtatg	caaagcatgc	atctcaatta	gtcagcaacc	aggtgtggaa	agtccccagg	1020
ctccccagca	ggcagaagta	tgcaaagcat	gcatctcaat	tagtcagcaa	ccatagtccc	1080
gccccact	ccgcccctcc	cgcccctaac	tccgcccagt	tccgcccatt	ctccgcccc	1140
tggctgacta	atTTTTTTTt	tttatgcaga	ggccgaggcc	gcctcggcct	ctgagctatt	1200
ccagaagtag	tgaggaggct	TTTTTggagg	cctaggcctt	tgcaaaaagc	tt	1252

<210>3

<211>1122

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>3

atgaccacct	cagcaagttc	ccacttaaat	aaaggcatca	agcaggtgta	catgtccctg	60
cctcagggtg	agaaagtcca	ggccatgtat	atctggatcg	atggactgg	agaaggactg	120
cgctgcaaga	cccggaccct	ggacagtgag	ccaagtgtg	tggaagagtt	gcctgagtgg	180
aatttcgatg	gctctagtag	tttacagtct	gagggttcca	acagtgacat	gtatctcgtg	240
cctgctgcca	tgtttcggga	ccccttccgt	aaggacccta	acaagctggt	gttatgtgaa	300
gttttcaagt	acaatcgaag	gcctgcagag	accaatttga	ggcacacctg	taaacggata	360
atggacatgg	tgagcaacca	gcacccctgg	tttggcatgg	agcaggagta	taccctcatg	420
gggacagatg	ggcacccctt	tggttggcct	tccaacggct	tcccagggcc	ccagggcca	480
tattactgtg	gtgtgggagc	agacagagcc	tatggcaggg	acatcgtgga	ggcccattac	540
cgggcctgct	tgtatgctgg	agtcaagatt	gcggggacta	atgccgaggt	catgcctgcc	600
cagtgggaat	ttcagattgg	accttgtgaa	ggaatcagca	tgggagatca	tctctgggtg	660
gcccgtttca	tcttgcatcg	tgtgtgtgaa	gactttggag	tgatagcaac	ctttgatcct	720
aagcccattc	ctgggaactg	gaatggtgca	ggctgccata	ccaactcag	caccaaggcc	780
atgcgggag	agaatggtct	gaagtacatc	gaggaggcca	ttgagaaact	aagcaagcgg	840
caccagtacc	acatccgtgc	ctatgatccc	aaggggaggcc	tggacaatgc	ccgacgtcta	900
actggattcc	atgaaacctc	caacatcaac	gacttttctg	ctggtgtagc	caatcgtagc	960
gccagcatac	gcattccccg	gactgttggc	caggagaaga	agggttactt	tgaagatcgt	1020
cgcccctctg	ccaactgcga	ccccttttctg	gtgacagaag	ccctcatccg	cacgtgtctt	1080
ctcaatgaaa	ccggcgatga	gcccttccag	tacaaaaatt	ga		1122

<210>4

<211>1488

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>4

atggcgcccc	tcgccgtctg	ggccgcgctg	gccgtcggac	tggagctctg	ggctgcggcg	60
cacgccttgc	ccgcccaggt	ggcatttaca	ccctacgccc	cggagcccgg	gagcacatgc	120
cggtctagag	aatactatga	ccagacagct	cagatgtgct	gcagcaaatg	ctcgccgggc	180
caacatgcaa	aagtcttctg	taccaagacc	tcggacaccg	tgtgtgactc	ctgtgaggac	240
agcacataca	cccagctctg	gaactgggtt	cccagatgct	tgagctgtgg	ctccccctgt	300
agctctgacc	aggtggaac	tcaagcctgc	actcgggaac	agaaccgcat	ctgcacctgc	360
aggcccggct	ggtactgccc	gctgagcaag	caggaggggt	gccggctgtg	cgcgccctg	420
cgcaagtgcc	gcccgggctt	cgccgtggcc	agaccaggaa	ctgaaacatc	agacgtgggt	480
tgcaagccct	gtgccccggg	gacgttctcc	aacacgactt	catccacgga	tatttgagg	540
ccccaccaga	tctgtaacgt	ggtggccatc	cctgggaatg	caagcatgga	tgagctctgc	600
acgtccacgt	ccccaccgg	gagtatggcc	ccaggggag	tacacttacc	ccagccagt	660
tccacacgat	cccaacacac	gcagccaact	ccagaaccga	gcaactgctc	aagcacctcc	720
ttctctctcc	caatgggccc	cagcccccca	gctgaagggg	gcaactggcg	cttcgctctt	780
ccagttggag	agcccaaatc	ttgtgacaaa	actcacacat	gcccaccgtg	cccagcacct	840
gaactccttg	ggggaccgtc	agtcttctct	ttcccccaaa	aaccaagga	cacctcatg	900
atctcccgg	ccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtcgacg	tgagccacga	agaccctgag	960
gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaagac	aaagccggc	1020
gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtctc	gcaccaggac	1080
tggtgcaatg	gcaaggagta	caagtgcagg	gtctccaaca	aagccctccc	agccccatc	1140
gagaaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	ccccgagaac	cacaggtgta	cacctgccc	1200
ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	gtcagcctga	cctgctctgt	caaaggcttc	1260
tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	1320
accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttcc	tctacagcaa	gctcaccgtg	1380
gacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgct	ttctcatgct	ccgtgatgca	tgagggtctg	1440
cacaaccact	acacgcagaa	gagcctctcc	ctgtctccgg	gtaaatga		1488

<210>5

<211>459

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>5

atgagcgaaa	aatacatcgt	cacctgggac	atgttcgaga	tccatgcacg	taaactcgca	60
agccgactga	tgcttctga	acaatggaaa	ggcattattg	ccgtaagccg	tgccggctctg	120
gtaccgggtg	cgttactggc	gcgtgaactg	ggattctgct	atgtcgatac	cgtttgatt	180
tccagctacg	atcacgacaa	ccagcgcgag	cttaaagtgc	tgaaacgcgc	agaaggcgat	240
ggcgaaggct	tcacgtttat	tgatgacctg	gtggataccg	gtggtactgc	ggttgcgatt	300
cgtgaaatgt	atccaaaagc	gcactttgtc	accatcttcc	caaaaccggc	tggtcgtccg	360
ctggttgatg	actatggtgt	tgatatcccc	caagatacct	ggattgaaca	gccgtgggat	420
atgggcgctg	tattcgtccc	gccaatctcc	ggtcgcataa			459

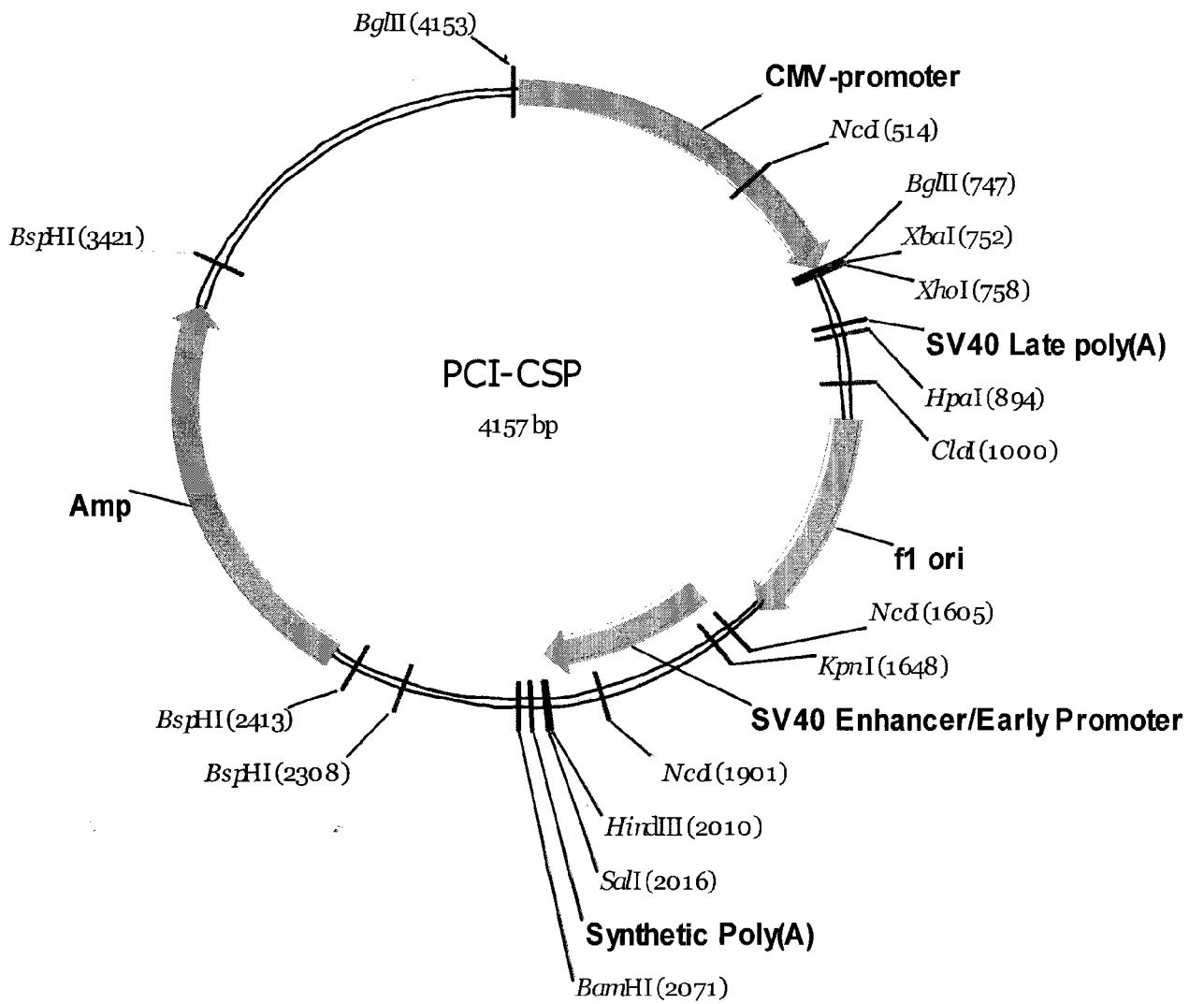


图 1

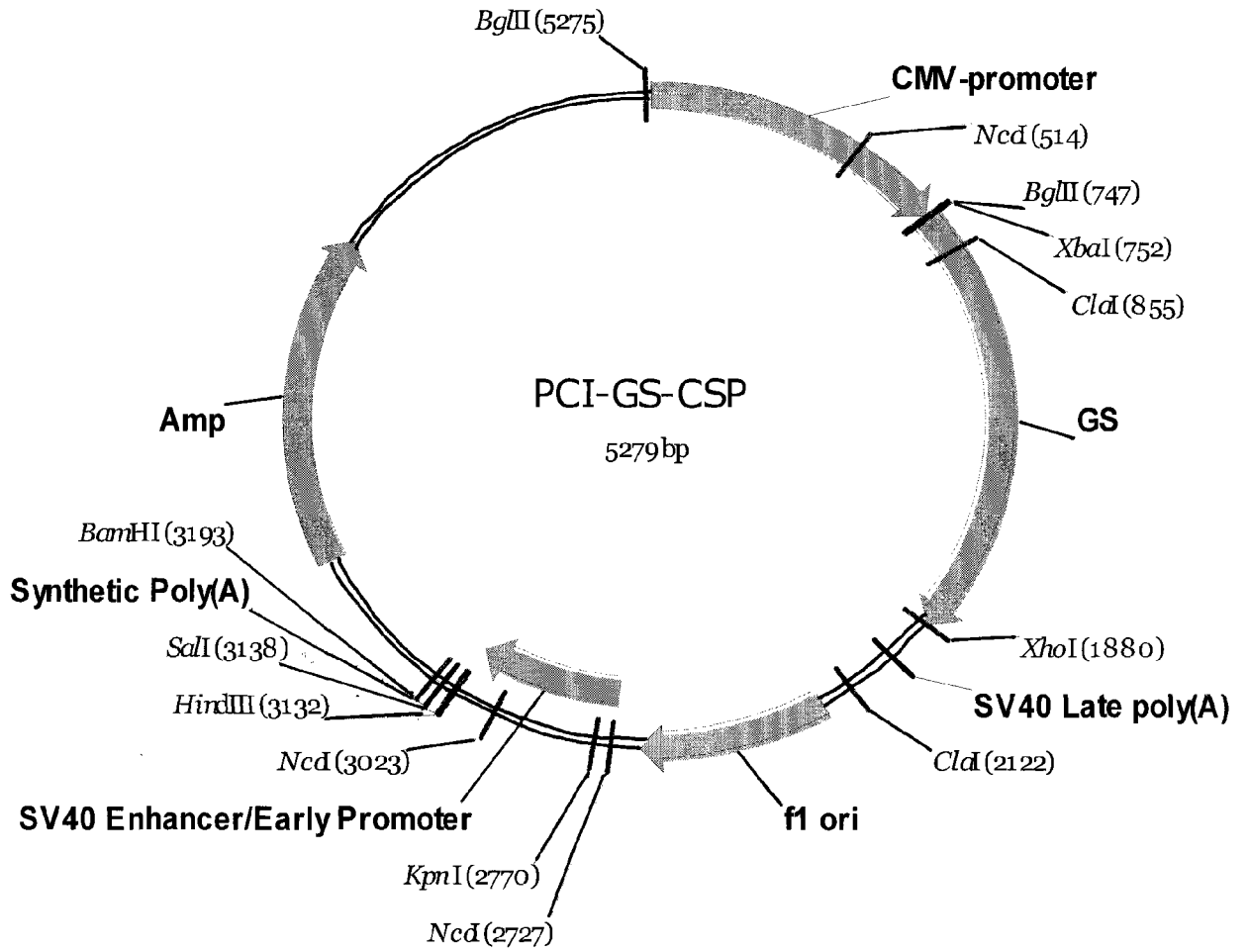


图 2

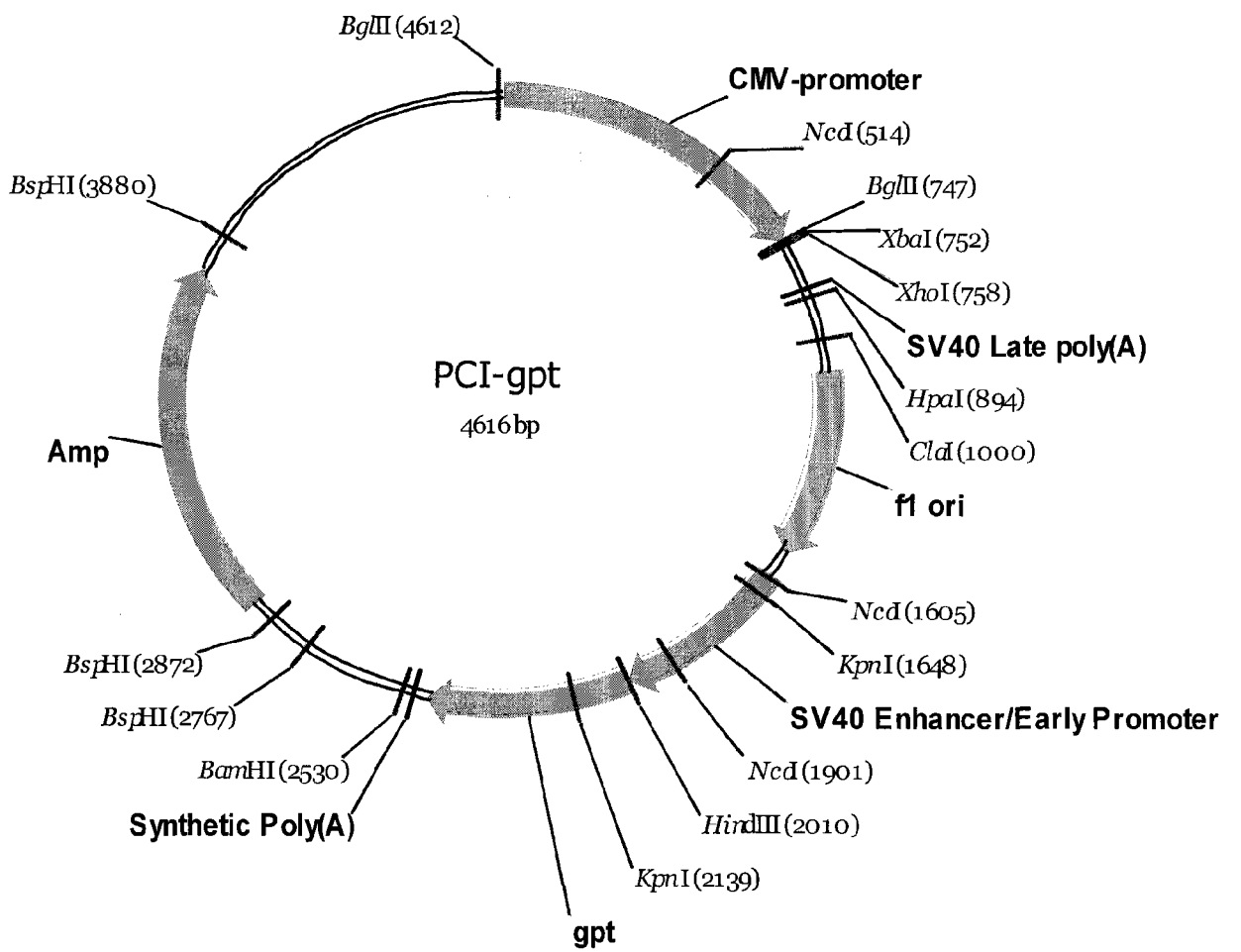


图 3