

(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 105441481 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201511008252. X

(22) 申请日 2015. 12. 29

(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 曲静 潘慧泽 管娣
任若通

(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 白艳

(51) Int. Cl.

C12N 15/85(2006. 01)

C12N 5/10(2006. 01)

C12Q 1/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书12页
序列表18页 附图2页

(54) 发明名称

一种 SIRTUIN6 基因缺失人类间充质干细胞的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种 SIRTUIN6 基因缺失人类间充质干细胞的制备方法。本发明 SIRTUIN6 基因缺失人类间充质干细胞的制备方法的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基因 SIRTUIN6,使所述 SIRTUIN6 丧失功能,得到所述 SIRTUIN6 功能丧失的人多能干细胞;(2) 对所述 SIRTUIN6 功能丧失的人多能干细胞进行定向诱导分化,获得所述 SIRTUIN6 功能丧失的间充质干细胞。本发明的方法能够用于建立筛选可调控成体干细胞氧化还原稳态维持,减缓细胞衰老的备选(天然)化合物的个性化药物筛选平台,同时也为延缓自然衰老提供了更多的线索。

1. 一种间充质干细胞的制备方法,包括如下步骤:
 - (1)取离体的人多能干干细胞,突变所述人多能干干细胞中的基因SIRTUIN6,使所述SIRTUIN6丧失功能,得到所述SIRTUIN6功能丧失的人多能干干细胞;
 - (2)对所述SIRTUIN6功能丧失的人多能干干细胞进行定向诱导分化,获得所述SIRTUIN6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,所述突变人多能干干细胞中的基因SIRTUIN6为缺失所述人多能干干细胞中的SIRTUIN6的第1外显子。
3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述缺失人多能干干细胞中的SIRTUIN6的第1外显子为将所述人多能干干细胞中的SIRTUIN6的第1外显子替换为筛选标记基因。
4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:

所述替换是通过同源重组的方式实现,

所述同源重组中的上游同源臂为序列表中序列3;

所述同源重组中的下游同源臂为序列表中序列4;

所述筛选标记基因为NEO基因。
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SIRTUIN6功能丧失的人多能干干细胞进行定向诱导分化,获得所述SIRTUIN6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SIRTUIN6功能丧失的人多能干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1-2次传代后,分选其中CD73、CD90、CD105均为阳性的细胞类群,即为所述SIRTUIN6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:所述人多能干干细胞为人胚胎干细胞或人诱导多能干干细胞;

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制备筛选和/或鉴定用于治疗 and/或维持和/或减缓动物或人衰老的临床药物和/或天然有机物和/或小分子化合物的产品中的应用。
9. 权利要求7所述的间充质干细胞在作为或制备衰老细胞模型中的应用。
10. 根据权利要求8或9所述的应用,其特征在于:所述衰老为由氧化还原稳态失衡所致。

一种SIRTUIN6基因缺失人类间充质干细胞的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种SIRTUIN6基因缺失人类间充质干细胞的制备方法。

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。成体干细胞的衰老及耗竭被认为是引发个体组织器官衰老以及衰老相关退行性疾病的重要因素。干细胞是指具有自我更新和分化能力的一类特殊细胞类型,为新的终末分化细胞提供重要来源。人类组织器官由少量成体干细胞及大量体细胞组成,成体干细胞能够对组织器官机体的损伤进行修复或再生,有效保持了组织器官及机体的稳态和健康。在衰老细胞中,干细胞出现功能性衰老或耗竭,干细胞稳态失衡,例如,随着年龄增大,造血干细胞(Hemopoietic stem cell,HSC)倾向于向髓系细胞分化,向骨髓的迁徙和归巢能力均出现缺陷,分化能力和效率受到影响,同时老年群体机体免疫力低下,多发粒系增生性疾病。在帕金森氏症(PD)患者脑内的海马区,神经干细胞在体外出现渐进性多能性消失。间充质干细胞的耗竭会导致成骨能力变差,骨折后修复困难。成黑素细胞(Melanoblast)的衰老是老年人头发变白的重要原因。成体干细胞功能衰退影响了骨骼与肌肉的功能。以上多种证据证实干细胞自我更新和分化潜能的紊乱,是组织器官丧失修复及再生能力的主要因素。

[0003] SIRTUIN是一类NAD⁺依赖性的、具有高度保守催化酶活性的蛋白家族。哺乳动物中存在七种SIRTUIN蛋白,分别为SIRTUIN 1-7,各自具有不同的细胞亚定位及功能,其中SIRTUIN 1-2广泛分布在细胞中,SIRTUIN 3-5主要存在于线粒体,SIRTUIN6-7则仅存在于细胞核中。SIRTUIN6已经被证明与哺乳动物的衰老相关。在细胞水平,SIRTUIN6缺失导致葡萄糖及脂代谢、DNA损伤修复、端粒稳定性、基因组稳定性等紊乱而影响细胞稳态,被证明与细胞衰老、代谢或肿瘤发生相关。在机体水平,SIRTUIN6缺失的小鼠表现出渐进性组织、器官及机体的过早衰老。在出生后2周内,SIRTUIN6缺失的小鼠与野生型小鼠无显著区别,在出生后2-4周内,SIRTUIN6缺失的小鼠表现出、脾脏、淋巴系统、脂肪产生、骨骼及脑等内胚层和神经外胚层的退行性衰退,且于一个月内死亡,暗示了SIRTUIN6与内胚层稳态及衰老的重要相关性。在SIRTUIN6敲除小鼠的模型中,中胚层来源的组织如:血液、脾脏、骨骼、脂肪等会出现异常表型,但目前少有SIRTUIN6在人类组织细胞,尤其是多能干细胞及其衍生细胞中功能的相关报道,同时间充质干细胞(mesenchymal stem cell,MSC)又是中胚层中一种重要的成体干细胞,不仅作为造血细胞提供骨架和营养,还能够分化为脂肪、软骨、成骨等细胞类型对以上组织的损伤进行修复。

发明内容

[0004] 本发明的一个目的是提供一种间充质干细胞的制备方法。

- [0005] 本发明提供的间充质干细胞的制备方法包括如下步骤：
- [0006] (1)取离体的人多能干细胞,突变所述人多能干细胞中的基因SIRTUIN6,使所述SIRTUIN6丧失功能,得到所述SIRTUIN6功能丧失的人多能干细胞；
- [0007] (2)对所述SIRTUIN6功能丧失的人多能干细胞进行定向诱导分化,获得所述SIRTUIN6功能丧失的间充质干细胞。
- [0008] 上述方法中,步骤(1)中,所述突变人多能干细胞中的基因SIRTUIN6为缺失所述人多能干细胞中的SIRTUIN6的第1外显子。
- [0009] 上述方法中,所述缺失人多能干细胞中的SIRTUIN6的第1外显子为将所述人多能干细胞中的SIRTUIN6的第1外显子替换为筛选标记基因。
- [0010] 上述方法中,所述替换是通过同源重组的方式实现,所述同源重组中的上游同源臂为序列表中序列3;所述同源重组中的下游同源臂为序列表中序列4；
- [0011] 所述筛选标记基因为NEO基因。
- [0012] 上述方法中,步骤(1)中,缺失所述人多能干细胞中的所述SIRTUIN6的第1外显子是按照包括如下步骤的方法实现的：
- [0013] (a1)将序列表中序列3的上游同源臂和序列4所示的下游同源臂构建到含有筛选基因的表达载体上,获得重组载体;所述筛选基因位于所述上游同源臂和所述下游同源臂之间；
- [0014] (a2)用所述重组载体、SIRTUIN6左、右TALEN表达载体共转染人多能干细胞,使所述重组载体上的筛选基因替换人多能干细胞中的所述SIRTUIN6的第1外显子,从而获得所述SIRTUIN6的第1外显子缺失的人多能干细胞。
- [0015] 上述方法中,步骤(2)中,对所述SIRTUIN6功能丧失的人多能干细胞进行定向诱导分化,获得所述SIRTUIN6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：
- [0016] (b1)将所述SIRTUIN6功能丧失的人多能干细胞进行拟胚体分化,获得拟胚体；
- [0017] (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1-2次传代后,分选其中CD73、CD90、CD105均为阳性的细胞类群,即为所述SIRTUIN6功能丧失的间充质干细胞。
- [0018] 上述方法中,所述拟胚体分化为将所述SIRTUIN6功能丧失的人多能干细胞用Tryple Express(Invitrogen公司,货号为12604021)37℃消化20-30min,待细胞形成球体后,用间充质干细胞培养基重悬,加到低粘附培养板(Corning公司,货号3471)中,37℃,5%CO₂条件培养1-3天后,即形成拟胚体；
- [0019] 所述(b2)中培养的温度为37℃,培养的时间为10-14天。
- [0020] 上述方法中,所述人多能干细胞为人胚胎干细胞或人诱导多能干细胞；
- [0021] 所述人胚胎干细胞具体为人胚胎干细胞H9细胞系。
- [0022] 本发明的另一个目的是提供一种利用上述方法制备获得的间充质干细胞。
- [0023] 本发明的还有一个目的是提供上述间充质干细胞的新用途。
- [0024] 本发明提供了上述间充质干细胞在制备筛选和/或鉴定用于治疗 and/或维持和/或减缓动物或人衰老的临床药物和/或天然有机物和/或小分子化合物的产品中的应用；
- [0025] 所述衰老为由氧化还原稳态失衡所致。
- [0026] 本发明还提供了上述间充质干细胞在作为或制备衰老细胞模型中的应用；

[0027] 所述衰老为由氧化还原稳态失衡所致。

[0028] 本发明将利用TALEN介导的基因组靶向修饰技术制备了SIRTUIN6基因缺失的人类成体干细胞及其衍生细胞,能够产生细胞氧化还原稳态失衡和加速衰老的表型,利用这些细胞研究了SIRTUIN6在人类细胞衰老的重要作用,并探索了相关的衰老干预技术,并且在培养皿中建立SIRTUIN6功能缺失引起的氧化还原稳态失衡所致的细胞衰老研究模型。本发明探索了SIRTUIN6在调控人类间充质干细胞(hMSC)及其衍生细胞衰老中的重要作用,不仅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,且本发明所含技术能够用于建立筛选可调控成体干细胞氧化还原稳态维持,减缓细胞衰老的备选(天然)化合物的个性化药物筛选平台,同时也为延缓自然衰老提供了更多的线索。

附图说明

[0029] 图1为SIRTUIN6^{-/-}ESC的构建流程和鉴定。图1A为人胚胎干细胞SIRTUIN6第一外显子基因打靶策略图;图1B为SIRTUIN6^{-/-}ESC与SIRTUIN6^{+/+}ESC(WT)的PCR检测结果,其中S6-61和S6-75为SIRTUIN6^{-/-}ESC,WT为野生型人胚胎干细胞H9细胞系;图1C为细胞免疫荧光检测SIRTUIN6^{-/-}ESC与SIRTUIN6^{+/+}ESC中多能干细胞标志基因OCT4(绿色)、SOX2(黄色)、NANOG(红色)的表达;图1D为细胞免疫荧光检测SIRTUIN6^{+/+}ESC及SIRTUIN6^{-/-}ESC中SIRTUIN6蛋白表达及细胞内定位,其中,Phase为明场观察细胞形态,标尺长度:20mm;图1E为Western blotting检测SIRTUIN6^{+/+}ESC及SIRTUIN6^{-/-}ESC中SIRTUIN6蛋白表达水平。其中,SIRTUIN6^{+/+}ESC为野生型人胚胎干细胞H9细胞系

[0030] 图2为SIRTUIN6^{-/-}ESC衍生的SIRTUIN6^{-/-}MSC具有加速衰老的表型。其中,图2A为SIRTUIN6^{+/+}ESC和SIRTUIN6^{-/-}ESC衍生的SIRTUIN6^{-/-}MSC的细胞形态(Phase为明场观察细胞形态)及阳性表面标志蛋白CD105、CD73、CD90流式细胞术鉴定;图2B为细胞免疫荧光方法鉴定SIRTUIN6^{+/+}MSC和SIRTUIN6^{-/-}MSC中SIRTUIN6蛋白的表达与细胞亚定位;图2C为Western blotting鉴定SIRTUIN6^{+/+}MSC和SIRTUIN6^{-/-}MSC中SIRTUIN6的蛋白表达量;图2D为SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC的生长能力曲线;图2E为SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC的衰老相关SA-beta-Gal染色结果,其中EP代表早代细胞,LP代表晚代细胞;图2F为SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC的体内生存能力检测结果。

[0031] 图3为SIRTUIN6^{-/-}MSC作为一种由氧化还原稳态失衡导致的成体干细胞衰老模型。图3A为不同浓度的PX-12刺激下SIRTUIN6^{+/+}MSC及SIRTUIN6^{-/-}MSC的细胞形态图;图3B为Annexin V/PI双染色鉴定不同浓度的PX-12刺激下SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC的细胞凋亡,ns,无显著差异;*p<0.05;图3C为检测SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC内被氧化的带绿色荧光的H2DCFDA,反映了细胞内的总体活性氧水平,其中,#为空白对照,*为SIRTUIN6^{+/+}MSC,&为SIRTUIN6^{-/-}MSC;图3D为检测hMSC内8-氧鸟苷酸(8-氧鸟苷酸)水平,其中,#为空白对照,*为SIRTUIN6^{+/+}MSC,&为SIRTUIN6^{-/-}MSC。

具体实施方式

[0032] 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。

[0033] 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。

- [0034] 下述实施例中的用于流式细胞术分选MSC的荧光标记抗体及出售公司如下：
- [0035] 荧光素FITC标记的抗人细胞表面识别分子CD90抗体(555595),BD Biosciences。
- [0036] 荧光素PE标记的抗人细胞表面识别分子CD73抗体(550257),BD Biosciences。
- [0037] 荧光素APC标记的抗人细胞表面识别分子CD105抗体(17-1057-42),BD Biosciences。
- [0038] 荧光素APC标记同型对照抗体(555751),BD Biosciences。
- [0039] 荧光素PE标记同型对照抗体(555749),BD Biosciences。
- [0040] 荧光素FITC标记同型对照抗体(555742),BD Biosciences。
- [0041] 下述实施例中的人胚胎干细胞H9细胞系,WiCell公司产品(货号:WA09(H9)-DL-7)。
- [0042] 下述实施例中的细胞培养基配方如下：
- [0043] (1)CDF12培养基配方：
- [0044] DMEM/F12培养基(Invitrogen,11320-033)；
- [0045] 0.1mM非必需氨基酸(Invitrogen,11140-050)；
- [0046] 1mM GlutaMAX™二肽(Invitrogen,35050-061)；
- [0047] 20%(体积百分含量)Knockout血清替代物(Invitrogen,N10828-028)；
- [0048] 1%(1g/100ml)青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063)；
- [0049] 55μMβ-巯基乙醇(Invitrogen,21985-023)；
- [0050] 10ng/ml人FGF2(Joint Protein Central)。
- [0051] (2)间充质干细胞(MSC)培养基配方：
- [0052] MEM培养基(Invitrogen,12571071)；
- [0053] 10%(体积百分含量)胎牛血清(Invitrogen,10091148)；
- [0054] 1%(1g/100ml)青霉素/链霉素(Invitrogen,15070-063)；
- [0055] 10ng/ml重组人成纤维细胞生长因子(JPC,bFGF)；
- [0056] 5ng/ml TGFβ(Humanzyme,HZ1131)。
- [0057] 下述实施例中的SA-beta-Gal染色方法：
- [0058] 1)6孔板中以合适密度种入细胞；
- [0059] 2)细胞密度达到60~80%时,PBS清洗两次细胞；
- [0060] 3)2%多聚甲醛+0.2%异戊醛固定,不超过5分钟；
- [0061] 4)PBS清洗2次；
- [0062] 5)加入染色液,37度避光过夜孵育。染色液配方如下:柠檬酸/磷酸钠缓冲液40mM、K₄[Fe(CN)₆].6H₂O 5mM、K₃[Fe(CN)₆] 5mM、NaCl 150mM、MgCl₂ 2mM、X-gal 1mg/ml。
- [0063] 6)PBS清洗2次；
- [0064] 7)Hoechst 33258(Invitrogen,货号:H3569)室温避光孵育5分钟；
- [0065] 8)PBS清洗一次；
- [0066] 9)显微镜下观察。
- [0067] 下述实施例中的pCR2.1-neo载体由美国Salk研究所Juan Carlos Izpisua Belmonte教授馈赠,并由第一发明人保存在中国科学院生物物理研究所,其核苷酸序列如序列表中序列1所示,公众可从中国科学院生物物理研究所获得。

[0068] 下述实施例中的SIRTUIN6左、右TALEN表达载体均购自Addgene公司,商品名和货号分别为TAL2454(Plasmid#36843)和TAL2455(Plasmid#36844)。

[0069] 下述实施例中的用过表达荧光素酶Luciferase的病毒载体由美国Salk研究所Juan Carlos Izpisua Belmonte教授馈赠,并由第一发明人保存在中国科学院生物物理研究所,其核苷酸序列如序列表中序列2所示,公众可从中国科学院生物物理研究所获得。

[0070] 实施例1、SIRTUIN6-/-ESC的获得及鉴定

[0071] 本发明涉及在人类胚胎干细胞(hESCs)中靶向失活人类SIRTUIN6基因(基因组序列为GenBank:NC_000019.10的第4174109-4182599位,updated on 12-Mar-2015;cDNA序列为GenBank:NM_001193285,updated on PRI 15-MAR-2015)。

[0072] 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SIRTUIN6基因第1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1A),然后将其构建进入pCR2.1-neo载体上,获得SIRTUIN6同源臂载体(其全长序列如序列表中序列5所示)。用SIRTUIN6同源臂载体和SIRTUIN6左、右TALEN表达载体共同电转化人多能干细胞,使人多能干细胞的SIRTUIN6丧失功能,获得SIRTUIN6功能丧失的多能干细胞系,即SIRTUIN6第1外显子缺失的多能干细胞。其中,用TALEN表达载体和SIRTUIN6同源臂载体电转化所述人多能干细胞后,还包括用G418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。具体方法如下:

[0073] 一、SIRTUIN6缺失hESC的获得

[0074] 1、SIRTUIN6同源臂载体的构建

[0075] SIRTUIN6同源臂载体的构建的具体流程如图1A所示,具体步骤如下:

[0076] (1)人基因组提取

[0077] 以基因组提取试剂盒(StarSpin Animal DNA Kit,GenStar公司,货号D111)提取人细胞中基因组DNA,得到人基因组DNA。具体步骤如下:

[0078] 1)获得单细胞悬液,PBS清洗一次,弃上清;

[0079] 2)先后加入200 μ l GTL、20 μ l蛋白酶K、200 μ l Buffer GL,每次均以漩涡振荡器充分混合均匀;

[0080] 3)将步骤2所得混合液加入到吸附柱中,套入收集管内;

[0081] 4)10,000转离心1分钟后,弃去收集管内废液;

[0082] 5)加500 μ l Buffer GW1清洗吸附柱,10,000转离心1分钟后,弃去收集管内废液;

[0083] 6)加500 μ l Buffer GW2清洗吸附柱,10,000转离心1分钟后,弃去收集管内废液;

[0084] 7)12,000转离心2分钟,弃去废液,室温晾干;

[0085] 8)加50-100 μ l去离子水洗脱吸附柱中基因组DNA。

[0086] (2)SIRTUIN6左、右同源重组臂的PCR

[0087] 以步骤(1)获得的人基因组DNA为模板,采用引物对SIRTUIN6Left Arm Primer F和SIRTUIN6Left Arm Primer R进行PCR扩增,得到上游同源臂;以步骤(1)获得的人基因组DNA为模板,采用引物对SIRTUIN6Right Arm Primer F和SIRTUIN6Right Arm Primer R进行PCR扩增,得到下游同源臂。引物序列如下:SIRTUIN6Left Arm Primer F:

[0088] ATAGGGCCCCGGTGCCATTCACTCACTACCTACCCTT;SIRTUIN6Left Arm Primer R: CCGCTCGAGAGTTCTCCAGTCACCTCTAAAATGCGGGACA;SIRTUIN6Right Arm Primer F:

CGCGGATCCGCCAACACGCCCAACTCTGTGGTCACCCT;SIRTUIN6Right Arm Primer R: CGGGGTACCCCTCCCACCTGCCTTGTCAAAGCCCTAGCC。

[0089] 上述PCR反应体系如下:20ng~100ng基因组DNA、0.5 μ l正向引物(10 μ M)、0.5 μ l反向引物(10 μ M)、1 μ l dNTP、10 μ l 2 \times PrimerSTAR GC buffer、0.25 μ l PrimerSTAR polymerase、0.25 μ l补齐至20 μ l。

[0090] 上述PCR反应程序:第一步:98 $^{\circ}$ C 1min,1个循环;第二步:98 $^{\circ}$ C 10s,68 $^{\circ}$ C 0.5-3min,35个循环;72 $^{\circ}$ C 7min,1个循环。

[0091] 分别将获得的上游同源臂和下游同源臂分别克隆至pEASY-Blunt载体(全式金公司,货号CB101-01)中进行测序,测序结果表明:SIRTUIN6上游同源臂的核苷酸序列如序列3所示;SIRTUIN6下游同源臂的核苷酸序列如序列4所示。

[0092] (3)SIRTUIN6同源臂载体的获得

[0093] 将步骤(2)获得的SIRTUIN6上游同源臂插入到pCR2.1-neo载体(含有neo基因)的ApaI和XhoI酶切位点间,且将步骤(2)获得的SIRTUIN6下游同源臂插入到pCR2.1-neo载体的BamHI和KpnI酶切位点间,且保持pCR2.1-neo载体的其他序列不变,得到SIRTUIN6同源臂载体。并对其进行测序。

[0094] 测序结果表明:SIRTUIN6同源臂载体的核苷酸序列为序列5,其中,SIRTUIN6上游同源臂的序列如序列5的第5847-7789核苷酸所示,neo基因如序列5的第8789-9313位核苷酸所示,SIRTUIN6下游同源臂的序列如序列5的第9497-10729位核苷酸所示。将上述测序正确的质粒进行中提,获得高质量质粒进行下述SIRTUIN6打靶。

[0095] 2、SIRTUIN6缺失hESC的获得

[0096] 基于TALEN的基因打靶技术特异性敲除hESC细胞中的SIRTUIN6,具体为敲除人基因组中转录SIRTUIN6cDNA的第一个外显子。具体步骤如下:

[0097] (1)野生型人胚胎干细胞H9细胞系的培养

[0098] a.将人胚胎干细胞H9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;

[0099] 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。

[0100] (2)准备处于对数期增殖的hESC,PBS清洗一次,Tryple Express(Invitrogen公司,货号为12604021)消化5-10分钟后,轻轻吹打成单细胞;

[0101] (3)准备 1.5×10^6 个H9 hESC单细胞,依据Cologne_CoA_cGMP Solution P3Primary Cell 4D-Nucleofector Kit(Lonza公司,货号V4XPG-3024)说明书配置hESC细胞悬液,将SIRTUIN6同源臂载体和SIRTUIN6左、右TALEN表达载体加入hESC细胞悬液中,使用4D电转仪(Lonza公司,货号4D-Nucleofector™ System)进行电转,得到电转后的hESC。

[0102] (4)将电转后的hESC加入含MEF的培养板中。24小时后换新鲜CDF12培养基。

[0103] (5)7-10天后,待培养板中长出新的克隆,依据克隆数目及大小向hESC培养体系中加入G418(遗传霉素),筛选neo阳性的hESC克隆,即为SIRTUIN6缺失hESC记作SIRTUIN6-/-ESC。选取neo阳性的hESC克隆S6-61和S6-75进行鉴定。

[0104] 二、SIRTUIN6缺失hESC的鉴定

[0105] 通过基因组PCR、western blotting、细胞免疫荧光等手段检测SIRTUIN6缺失hESC中exon是否被替换、neo片段插入基因组位置是否正确、SIRTUIN6在mRNA及蛋白水平是否缺失和干细胞特性,以鉴定SIRTUIN6缺失hESC是否被正确打靶。

[0106] 1、PCR鉴定

[0107] 提取SIRTUIN6+/+ESC(即为野生型人胚胎干细胞H9细胞系)、SIRTUIN6-/-ESC克隆S6-61和S6-75的基因组DNA,以获得的基因组DNA为模板,分别采用引物对(P1+P2)、引物对(P3+P4)、引物对(P5+P6)、引物对(P7+P7)进行PCR扩增,鉴定第一外显子是否被neo基因替换。引物对(P1+P2)检测基因组中是否存在第一个外显子(外显子扩增产物382bp)、引物对(P3+P4)检测neo是否替换第一外显子(SIRTUIN6上游同源臂、第一外显子及SIRTUIN6下游同源臂的扩增产物3649bp;SIRTUIN6上游同源臂、neo及SIRTUIN6下游同源臂的扩增产物5053bp)、引物对(P5+P6)检测SIRTUIN6上游同源臂是否插入到基因组(SIRTUIN6上游同源臂扩增产物2921bp),引物对(P7+P8)检测SIRTUIN6下游同源臂是否插入到基因组(SIRTUIN6下游同源臂扩增产物1564bp),同时以GAPDH为内参,其扩增引物序列如下:

[0108] P1:5'-AAGGCCTCCTGGGACTCAGCAGAAAGCTC-3';

[0109] P2:5'-CCCCAAAGGCTACCCGCTTCCATTGCTCA-3';

[0110] P3:5'-CTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATC-3';

[0111] P4:5'-AGGTACGCCATCCCCAGCTACCCTGA-3';

[0112] P5:5'-AGATAATGTTGCTGTCATGG-3';

[0113] P6:5'-TTAAGCTGTAGCACTTGGTC-3';

[0114] P7:5'-CCAACATCCCAGCTTGCTT-3';

[0115] P8:5'-GAGCAGGCCCATGTTACCTGA-3';

[0116] GAPDH-F:5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3';

[0117] GAPDH-R:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。

[0118] PCR鉴定结果如图1B所示,结果显示S6-61和S6-75中的SIRTUIN6第一外显子均已被neo基因替换。

[0119] 2、免疫荧光检测干细胞特性

[0120] 以SIRTUIN6+/+ESC(野生型人胚胎干细胞H9细胞系)和SIRTUIN6-/-ESC(S6-61克隆)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。具体步骤如下:

[0121] 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(Alexa555标记的驴抗兔抗体,Invitrogen公司,货号为A-31572),室温孵育1小时。PBS漂洗(3次,5分钟/次)后,用工作浓度为2g/ml的Hoechst 33258(Invitrogen,货号:H3569)室温孵育15分钟,最后封片和观察。

[0122] 结果如图1C所示,与SIRTUIN6+/+ESC相似,SIRTUIN6-/-ESC能够表达Oct4,Sox2和Nanog三种分子标记物。说明SIRTUIN6缺失不影响干细胞干性基因的表达。

[0123] 3、免疫荧光验证经过改造的人胚胎干细胞缺失SIRTUIN6

[0124] 以SIRTUIN6+/+ESC(野生型人胚胎干细胞H9细胞系)和SIRTUIN6-/-ESC作为供试细胞,采用免疫荧光技术对人胚胎干细胞中SIRTUIN6蛋白的表达进行检测。具体步骤如下:

[0125] 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(anti-SIRTUIN6,兔源,抗SIRTUIN6蛋白N端的抗体来源abcam公司(ab200))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(Alexa555标记的驴抗兔抗体,Invitrogen公司,货号为A-31572),室温孵育1小时。PBS漂洗(3次,5分钟/次)后,用工作浓度为2g/ml的Hoechst 33258(Invitrogen, 货号:H3569)室温孵育15分钟,最后封片和观察。

[0126] 结果如图1D所示,SIRTUIN6+/+ESC中,SIRTUIN6蛋白表达并定位于细胞核内,而SIRTUIN6-/-ESC不表达SIRTUIN6。以上结果表明,SIRTUIN6-/-ESC中SIRTUIN6第一外显子缺失成功。

[0127] 4、Western blot鉴定SIRTUIN6蛋白

[0128] 以SIRTUIN6+/+ESC(野生型人胚胎干细胞H9细胞系)和SIRTUIN6-/-ESC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°C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-SIRTUIN6,兔源,抗SIRTUIN6蛋白N端的抗体来源abcam公司(ab200)),4°C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)。

[0129] Western blot检测SIRTUIN6蛋白结果如图1E所示,用SIRTUIN6抗体无法检测到SIRTUIN6-/-ESC中SIRTUIN6蛋白的表达;而用SIRTUIN6抗体可检测到SIRTUIN6+/+ESC中SIRTUIN6蛋白的表达(分子量约39KD)。

[0130] 综上所述,本发明成功建立了SIRTUIN6缺失人类多能干细胞,即SIRTUIN6缺失hESC(SIRTUIN6-/-ESC),使SIRTUIN6基因第一外显子缺失,且SIRTUIN6基因第一外显子的缺失不影响干细胞干性基因的表达。SIRTUIN6缺失hESC为将hESC基因组的第4174236-4174363位所示的SIRTUIN6基因的第一外显子替换为neo基因,且保持hESC基因组的其他序列不变,得到的细胞。

[0131] 实施例2、SIRTUIN6-/-MSC的获得及其表型鉴定

[0132] 本发明将实施例1中获得的SIRTUIN6缺失hESC(SIRTUIN6-/-ESC),进一步体外定向分化为间充质干细胞(SIRTUIN6-/-MSC),并发现SIRTUIN6-/-MSC表现出典型的细胞衰老

症状。具体方法如下：

[0133] 一、SIRTUIN6^{-/-}ESC经体外定向分化产生SIRTUIN6^{-/-}MSC

[0134] 1、将实施例1获得的SIRTUIN6^{-/-}ESC(SIRTUIN6^{-/-}ESC克隆S6-61)进行拟胚体(EB)分化,具体步骤如下:准备含有300-500个细胞、大小均一的SIRTUIN6^{-/-}ESC克隆,用室温PBS清洗一次,用Tryple Express(Invitrogen公司,货号为12604021)37°C消化20-30min。待ESC克隆形成球体后,用间充质干细胞培养基重悬后,加到低粘附培养板(Corning公司,货号3471)中,37°C,5%CO₂条件培养1-3天后即形成拟胚体。

[0135] 2、将步骤1获得的拟胚体接种于基质胶(matrigel)(Invitrogen公司)包被的6孔板中进行培养,继续培养10-14天至纤维状细胞出现。再经过1-2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SIRTUIN6缺失的间充质干细胞,将其记作SIRTUIN6^{-/-}MSC。

[0136] 将上述步骤中的SIRTUIN6^{-/-}ESC替换为SIRTUIN6^{+/+}ESC,其他步骤不变,定向诱导分化得到间充质细胞记作SIRTUIN6^{+/+}MSC。

[0137] 流式细胞术鉴定结果如图2A所示:SIRTUIN6^{+/+}MSC及SIRTUIN6^{-/-}MSC均呈现90%以上阳性细胞比例。

[0138] 二、SIRTUIN6^{-/-}MSC的表型鉴定

[0139] 1、免疫荧光验证定向分化所得MSC中的SIRTUIN6的表达情况

[0140] 以步骤1获得的SIRTUIN6^{+/+}MSC和SIRTUIN6^{-/-}MSC作为供试细胞,采用免疫荧光技术对SIRTUIN6^{+/+}MSC和SIRTUIN6^{-/-}MSC中SIRTUIN6蛋白的表达情况进行检测。具体方法同上所述。

[0141] 结果如图2B所示,SIRTUIN6^{+/+}MSC中,SIRTUIN6蛋白表达并定位于细胞核内,而SIRTUIN6^{-/-}MSC不表达SIRTUIN6蛋白。

[0142] 2、Western blot检测SIRTUIN6^{-/-}MSC中的SIRTUIN6蛋白的表达情况

[0143] 以SIRTUIN6^{+/+}MSC和SIRTUIN6^{-/-}MSC作为供试细胞,利用前述方法进行检测。Western blot检测SIRTUIN6蛋白的表达情况。

[0144] 检测结果如图2C所示,SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞用SIRTUIN6蛋白抗体无法检测到SIRTUIN6蛋白的表达;而SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞用SIRTUIN6蛋白抗体可检测到SIRTUIN6蛋白的表达(分子量约39KD)。

[0145] 3、生长抑制测定

[0146] 利用细胞计数统计连续传代的SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC的生长能力。

[0147] 统计结果如图2D所示,图中的p1、p2、p3、p4、p5、p6、p7、p8、p9、p10分别代表传代数。结果表明:与SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞相比,在连续传代培养6代后,SIRTUIN6^{-/-}MSC表现出明显的生长抑制。

[0148] 4、SA-beta-Gal染色

[0149] 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。

[0150] 分别以SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC为供试细胞(分别设置早代(第1代)和晚代(第5代)实验组),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。

[0151] 结果如图2E所示,EP时SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC中阳性细胞数一致,LP时SIRTUIN6^{+/+}MSC中阳性细胞数出现微弱提升,SIRTUIN6^{-/-}MSC阳性细胞数出现大幅度提升,SIRTUIN6^{-/-}MSC有明显的蓝色,而SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞基本上没有蓝色。进一步的定量分析结果显示,SIRTUIN6^{-/-}MSC的SA-beta-Gal染色阳性细胞比率极显著高于SIRTUIN6^{+/+}MSC组(P<0.01)。可见,SIRTUIN6^{-/-}MSC表现出严重衰老的症状。

[0152] 5、SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞小鼠体内增殖和整合能力测定

[0153] 为了验证SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC的体内生存能力,首先用过表达荧光素酶Luciferase的病毒载体感染SIRTUIN6^{+/+}MSC与SIRTUIN6^{-/-}MSC,感染3天后,将两种细胞分别消化为单细胞状态,随后分别注射入小鼠左、右胫骨前肌,7-10天后通过利用小动物活体成像系统(Xenogen IVIS spectrum,PE公司)检测小鼠左、右胫骨前肌中luciferase活性,并统计4组生物学重复的荧光强度大小,来反映MSC的存活及体内整合能力。MSC细胞胫骨前肌移植以及鉴定的具体步骤如下:

[0154] 1)选取生长状态良好、细胞密度为60~80%的SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC,感染Luciferase表达病毒;

[0155] 2)感染后72小时,TrypLEExpress消化为单细胞;

[0156] 3)细胞计数,每 1×10^6 个细胞以100 μ l PBS重悬;

[0157] 4)取100 μ l细胞悬液注射入小鼠胫骨前肌;

[0158] 5)每日观察小鼠状态;

[0159] 6)7-10天后,取出小鼠,腹腔注射Luciferase底物(D-Luciferin Firefly, potassium salt,GOLDBIO公司),麻醉后以小动物活体成像系统进行分析;

[0160] 结果如图2F所示,SIRTUIN6^{-/-}MSC(右腿)在胫骨前肌中的luciferase活性仅为野生型(左腿)在胫骨前肌中的活性的10%,与SIRTUIN6^{+/+}MSC相比,SIRTUIN6^{-/-}MSC在体内移行速度更快,存活并整合的细胞数目更少。

[0161] 实施例3、SIRTUIN6^{-/-}MSC在刺激剂诱导下产生的氧化还原稳态失衡所致的细胞表型

[0162] 一、诱导剂下制备SIRTUIN6^{-/-}MSC

[0163] 本实施例在培养前述源于SIRTUIN6^{-/-}ESC产生的SIRTUIN6^{-/-}MSC过程中,添加硫氧还蛋白抑制剂PX-12(硫氧还蛋白是一种12KD大小的氧化还原酶,具有将双巯基转化为二硫键的活性,参与了活性氧水平的调控、维持细胞内氧化还原稳态),可诱导产生更为明显的氧化还原稳态失衡所致的细胞表型。具体步骤如下:

[0164] 1、分组

[0165] 在间充质干细胞培养基中分别培养SIRTUIN6^{-/-}MSC和SIRTUIN6^{+/+}MSC,按照是否添加抑制剂,分成如下四组:

[0166] 第一组:SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞在含有硫氧还蛋白抑制剂PX-12的间充质干细胞培养基培养3天,PX-12在间充质干细胞培养基中的浓度为0 μ M。

[0167] 第二组:SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞在含有硫氧还蛋白抑制剂PX-12的间充质干细胞培养基培养3天,PX-12在间充质干细胞培养基中的浓度为50 μ M。

[0168] 第三组:SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞在含有硫氧还蛋白抑制剂PX-12的间充质干细胞培养基培养3天,PX-12在间充质干细胞培养基中的浓度为0 μ M。

[0169] 第四组:SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞在含有硫氧还蛋白抑制剂PX-12的间充质干细胞培养基培养3天,PX-12在间充质干细胞培养基中的浓度为50 μ M。

[0170] 2、细胞凋亡水平检测

[0171] 培养上述步骤1中的4组间充质干细胞3天后,用Annexin V/PI凋亡检测试剂盒(购自威格拉斯公司,货号A002)分别检测步骤1中的各组细胞凋亡水平,将0 μ M PX-12刺激下SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞凋亡比率定义为1。具体实验步骤如下:

[0172] 1)吸去培养基,PBS清洗一次,Tryple Express(Invitrogen公司,货号为12604021)消化5-10分钟后,吹打成单细胞。

[0173] 2)收集 1×10^6 个细胞,用预冷的PBS清洗一次。

[0174] 3)依照试剂盒说明书,配制Annexin V染液,每个样品中加入100 μ l Annexin V染液室温染色15分钟。

[0175] 4)再加入500 μ l PI染液,室温染色5分钟。

[0176] 5)使用流式细胞仪检测FITC和PI荧光染色。

[0177] 结果如图3A和图3B所示,在PX12的浓度为0 μ M的处理条件下,SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞中凋亡细胞比率与SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞无明显差异(第一组和第三组细胞之间比较);而在PX-12的浓度为50 μ M的处理条件下,SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞凋亡比率为SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞的2-3倍,说明在PX-12刺激下SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞的凋亡水平显著高于SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞。

[0178] 3、活性氧水平检测

[0179] 培养上述4组间充质干细胞3天后,用H2DCFDA细胞周期染色试剂盒(购自Life technology公司,货号C6827)分别检测步骤1中的第二组和第四组细胞的活性氧水平,以未用H2DCFDA染液孵育的间充质干细胞为空白对照(Black)。具体实验步骤如下:

[0180] 1)吸去培养基,PBS清洗一次,Tryple Express(Invitrogen公司,货号为12604021)消化5-10分钟后,吹打成单细胞。

[0181] 2)收集 1×10^6 个细胞,用预冷的PBS清洗一次。

[0182] 3)依照试剂盒说明书,配制H2DCFDA染液,每个样品中加入500 μ l H2DCFDA染液,37度染色10-30分钟。

[0183] 4)用预冷的PBS清洗一次后,再用500 μ l PBS重悬细胞。

[0184] 5)使用流式细胞仪检测FITC荧光染色。

[0185] 结果如图3C所示:在PX-12的浓度为50 μ M的处理条件下,SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞内的活性氧(ROS)水平显著高于SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞,证明由于缺失了SIRTUIN6,使得SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞内的氧化还原平衡遭到破坏。

[0186] 4、8-氧鸟苷酸水平检测

[0187] 培养上述4组间充质干细胞3天后,用8-氧鸟苷酸抗体(购自Abcam公司,货号ab64548,小鼠源单克隆抗体)分别检测步骤1中的第二组和第四组细胞中的8-氧鸟苷酸水

平,以未用8-氧鸟苷酸抗体孵育液孵育的间充质干细胞为空白对照(Black)。具体实验步骤如下:

[0188] 1)吸去培养基,PBS清洗一次,Tryple Express(Invitrogen公司,货号为12604021)消化5-10分钟后,吹打成单细胞。

[0189] 2)收集 1×10^6 个细胞,用预冷的PBS清洗一次。

[0190] 3)配制8-氧鸟苷酸抗体孵育液(抗体按1:100用PBS稀释),每个样品中加入100 μ l 8-氧鸟苷酸抗体孵育液,室温孵育30分钟。

[0191] 4)用预冷的PBS清洗一次后,配制二抗孵育液(Alexa488标记的驴抗小鼠IgG,按1:200用PBS稀释),每个样品中加入100 μ l二抗孵育液,室温孵育15分钟。

[0192] 5)用预冷的PBS清洗一次后,再用500 μ l PBS重悬细胞。

[0193] 6)使用流式细胞仪检测FITC荧光染色。

[0194] 结果如图3D所示,在PX-12的浓度为50 μ M的处理条件下,SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞内的氧化DNA损伤标志分子8-氧鸟苷酸水平显著高于SIRTUIN6^{+/+}MSC细胞,从另一方面证明SIRTUIN6缺失导致SIRTUIN6^{-/-}MSC细胞内氧化还原失衡。

序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所
 <120> 一种 *SIRTUIN6* 基因缺失人类间充质干细胞的制备方法
 <160> 5

<210> 1
 <211> 11556bp
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 1

[0001]

```

caccatgccc ggctgectgg ctaatTTTTg catttttagt agagaggggg ttccaccatg      60
ttggccagge tggctctegaa ctctgaacct caggatgatet gcccgcctct gcctctcaaa    120
gtgctgggat tacagacgtg agccaccatg ccgagccaga tttttttttt ttttctgaga    180
eggagtctcg ctctgttgc caggctggag tgeaatggct ccatctcggc tcactgcaag    240
ctccacctcc caggttcatg cctcagcctc cegagtaget gggactacag gcgcccgcc    300
ccacgccgg ctgatttttt gtatTTTTag tagagacggg gtttcacctt gttaatgagg    360
atggctcga tctctgacc tctgaccca cccacctcgg ccttccaaag tctggtgatt    420
acagatgtga gccaccacgc ccagcctata catggatttt tgactgtgca ggagggtggg    480
ctgtaattgt tcaagggtca actatcctcg aggaattgag tccacgtggg aagaaaaatt    540
ttaggatcac tccacagtga atgaagctca cccaatgcca cattttgtag gcagttaatg    600
gaccgttttt caectcttct tctcccctg tetgtctcca cccattctct tttcaatcaa    660
tgcactcccc tcccacctc aggccaatca tgttcatagt aacgcagccc tgggggaagg    720
cttgtgtctc acttcctagc tgtgtgacct tgagcaggtg tcttaacctc tctgggcttc    780
ctccctcat ctataaaatg aagataataa aagctcctgc ctcataacac ggtggtgagg    840
attaaatgag ctgacacctg caaageacat cttatatttt ttatagtgct caaaaatcaa    900
caaaaatgaa aataaataag ccgggcacag taactgeacat ctgtagtccc agctacttgg    960
ctgaagcggg aggatctctt gagcccagga gtttgagacc agcctggaca acatagtgag   1020
accccatctc ttaaaaaaaa aaacttaggg ccgggcctgg tggtctatgc ctataatgga   1080
aaccctttgg aaggccaagg tgggtggatc acttgaagtc aggagtttga gaccagcctg   1140
gccaacatgg tgaaacccat ctctactaaa aatacaaaaa aaattgctgg gcgtggtagt   1200
gcgtgcctgt agtcccacct acttgggagg ctgcggcata agaaaagaat agcttgaatc   1260
caggaagtgg agettgcagt gagccaagat cacaacctg cactccagcc tgagcaacag   1320
agtgagactc cttcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaag aaagaaaaat taaaaaaaaat   1380
aaagtgaatc caatgatatt aaattaaaat gttttaataa aaataaaaaat gaataatgaa   1440
atgaatgggt acatgataat taataaatag tttaaaaca aaataaaatg ggccgagtgc   1500
agtggctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggetga ggccggcaca tcacctgagg   1560
tcggaagctc gagaccagcc tgaccaacat agtgaaacce tgtctctact aaaaatacaa   1620
aatatttagc cagccatagt ggcagcgccc tgtagtccca gctatttggg aggctgagge   1680

```

	aggagaattg	cttgaactca	ggaggcagag	gttgcagtga	gcagagateg	tgccactgca	1740
	ttccagcctc	agcaacagag	tgagactctg	tctcaaaaat	aatgaaatc	aatcaaatc	1800
	aatgagcccc	aaacaactga	aggaagccac	agagggggca	tgacatcccc	agagtcaccc	1860
	aggacaccag	ggacagagga	aggattigaa	ctcagagcca	cctgatticta	tcccaggctt	1920
	ggctgggcgc	agtggctcac	gctgtaatc	ccatcactct	gggtgggagt	taggaggatc	1980
	gcttgaggcc	aggagttaa	gaccagcctg	ggcaacacag	ctacacccca	tctgtacaaa	2040
	aaataaaaat	tagcccagtg	tgggtgtgca	cgctatagt	ctctgcaactt	tgggaggctg	2100
	aggcaggagg	atcgtttgag	cccaggagt	ggaggctgta	gtcggttgag	atagcaccac	2160
	tgcactccag	cctgggtgac	agaaagagac	tctgtctcaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	2220
	atggaccaag	egtgggtggt	catgcctgta	atcccagcat	tttgggaggc	caaggcgggt	2280
	ggatgacctg	aggtcaggag	ttcaagaccg	gcttggccaa	catggtgaag	tectgectct	2340
	actaaaaata	caaaattagc	tgggcatggt	ggtgcgtgcc	tgtaatecca	gctactcggg	2400
	aggctgagge	aagaaaatta	cttgaaccgc	ggaggtggag	gttgcagtga	gccgagatca	2460
	agccacggca	ctccagcctg	ggcacaaga	gggaaactcc	atctcaaaaa	taaaataaaa	2520
	taaaataaaa	aatgaaatcc	aggcttgttc	cacaggcctc	tcttttttggc	ttttcaaaaa	2580
	tggctttcaa	agatcctgag	ctcccactca	ctcgcactct	ctgctcctgc	caagagaatc	2640
	tgcctgttat	gctgtgcat	caagcagacc	tggfctcagcc	tccgaatett	taccacaca	2700
	ggctcgtgcc	ccgctcctca	cgtgcctgcc	ttaacttctc	taaatcctcc	ctattcttcc	2760
	aggctctgct	ccggtgccac	ctcctccagg	cagaactcct	gatttctcca	ggccacacca	2820
[0002]	gatggggatg	ttgtatccca	tgatacgaaa	actaaagget	ccaagteaag	cttgcaccac	2880
	caggccagge	acaaagaggt	gctcaggaag	gctgattgct	tgtccctgga	ggtgagccct	2940
	ccctttcctc	ctccccatct	gtgccctgaa	ttggccgcca	cagggacttg	agggggctga	3000
	gaagaatggg	gacaatggag	gaagaagcat	gtttttctag	gagttcatag	ccaaagacac	3060
	ggatgcaaga	gaagacagct	ggatctacct	cagggccttt	gcactggetg	ttccagccac	3120
	ttggaatgca	attcctgcaa	actctctccc	ccactcccct	tccctttttc	tttttttttt	3180
	cttttttgag	atggagtctc	actctgttgc	ccaggctgca	gtgcaatggc	acaatctcag	3240
	ctcactgcaa	cttccacctc	ccaggttcaa	gcaattctcc	tgcctcagcc	tccaagtag	3300
	ctgggattac	aggtgcccgc	caccgtgccc	agctaatttt	tgtattttta	gtagagacaa	3360
	cgtttcacca	tgtttgcccag	gctcgtcttg	aactctctgac	ctcactgat	ctgctgctct	3420
	tggcctccca	aatgctggg	attacaggtg	tgagccacca	cgcccagccc	tccccttccc	3480
	tttctaactct	ttgctttaat	accacctctc	ctgggaagcc	ttccctggcc	accctcttta	3540
	aaactgcage	caactcccct	gccctgaatg	cttcaattcc	cttttccctgc	tttgtctgtc	3600
	tttgcgacac	aaaatacaca	ttgtcactta	tttatcttgt	tctgtgttca	tctcccgtac	3660
	tcageggctg	gctccacgag	ggcaaggatt	tttgctgccc	ctattccctg	gctgattccc	3720
	ctgtgcctgg	aacagcgcct	getatataaa	tatgtgetga	gtacacacac	accaaagcaa	3780
	aagatcagga	tctctgggaa	agtgggtctc	tggaaaagca	aggggttact	gtggccgggg	3840
	agagcggaga	ttggacgggg	aggtggtact	ggggccaaat	tgtgaggaat	taggagggtc	3900
	tgattgggtg	caatgcggcg	agaaggaatt	ccatggagag	cggactaggg	cctgggtaaa	3960
	ggcctgggct	ggaaagcttg	tacggggagc	agtggggagg	tcatgacgct	agggggcagc	4020
	agagaggaaa	ggagaagagg	tgggtactgg	aatgaaaggg	tggatcttca	gccaaagccc	4080

aggagacaga	aggctgaagt	tgcaggggtg	tatcgggcat	ctagggecte	acactcacct	4140
ctgttettett	aaatcgcgcc	ctgagagtct	tcatagttgg	tgccctgtgt	ttctcctctc	4200
cacaggccac	ctgaggaggg	caaggggtgg	ggtaagggtga	gggacaccag	tcctgggtggg	4260
cggecaggte	cgttgccteg	ccctccctca	aaggaccget	tcctccctcc	tgaccagtcc	4320
tggeccctag	agcaagacac	agacctgetc	tatctectac	ctgctgtgtg	tcctttggca	4380
gittacttgc	cctctctgtt	ttacttccct	catctataca	gtgacagaaa	tgatcetttc	4440
ttgaccaact	catggtcagt	tttcagcatg	gtccctacac	agagccttgg	caaacatgag	4500
gggcttcata	aatgcatctc	actggtatct	cctgcggtcc	aaacagatca	agccttttct	4560
ggtctectaa	cttttacctg	tgcagttatt	tctgectaga	atggtttett	ttttcttctc	4620
tgaactecta	ctcatctctc	aaagcccagt	tccaaaatcc	cttgcctctt	tcagctttgc	4680
ctcttgttcc	caagcagaga	tctaactccc	caaattgggt	tcccgcctac	cctggetggg	4740
tctctgcctc	tgcctcacc	ctggctccat	gggctggaag	ggtctgggct	gattctgtcc	4800
tttcaacag	tcaggggtc	cctggggact	gaagccaggg	ctgacggctc	tcagcacaga	4860
ggcatgtttg	ctacatagtc	agaggggaacc	tccatgtgac	agcaattcac	ccatagtggg	4920
tggaggctctg	gggcaatggc	tgcattgcatg	tgtgtgacgt	tgagtgtggg	gcgtgtgcac	4980
acgtgcactt	ctgtccacct	gggctgttc	tacgttccgc	atgggcaggc	acggaggtea	5040
ggcaggceta	tcttgagggg	gtgtgttttt	tgaggggtgt	gactgtgagg	ccctatgtgt	5100
gaaagggatt	tctgtgatgg	agaatctgta	tttgcctctt	accaaggagt	aggggttggc	5160
atggccteta	cctgtccacc	tatctacteg	tgaattctcc	aagccacct	tcacgeatt	5220
faccacctat	gcactcacct	ggacatccat	cctcccacct	aagcactgta	taaccacca	5280
[0003] ctggccacca	cccacaaacc	caccaccca	attcatgttc	tcattggttt	tcataccct	5340
ttaateagat	ttaecccaea	ctaccatcca	cccacccaaa	caactacca	ctcccacct	5400
tcataccatc	actcaccac	ccataccatc	acttaccat	ccctcacc	atccacccaa	5460
ccaccatcc	atccatctgc	ccaagcacc	atccaccac	ccatctgcc	accacatcc	5520
acaccatcc	accatccac	ccaccaccc	atccactcat	ccatccact	atccatccct	5580
ccatccacc	accacaccac	caatccatcc	atccaccac	ccaccaccc	gtgcatccat	5640
ccaccaccc	accagtcct	ccatggatcc	ttccatccat	ccatccatcc	acttaccat	5700
ccctccatcc	atttgcccaa	tcaccaccc	atccatccat	ccaccatcc	atccatacat	5760
ctaccatcc	accatctac	caaaccacca	atccacctat	tcgccccca	tcataccac	5820
caccatcca	ttcatctacc	ctccactcg	agcggccgcc	agtgtgatgg	atattctcag	5880
aattcgcct	tgttacaaga	caggtttaag	gagaccaata	gaaactgggc	atgaagtcc	5940
tattctctag	aaagtatagg	aacttcggcc	cctgcaggtc	aattctaccg	ggtaggggag	6000
gccttttcc	caagcagtc	tggagcatgc	gcttttagcag	ccccgctggg	cacttggcgc	6060
tacacaagtg	gcctctgccc	tcgcacacat	tcacatcca	ccgtagggc	ccaaccggt	6120
ccgttctttg	gtggcccctt	cgcgccacct	tctactctc	ccctagtcag	gaagtcccc	6180
cccgcgccgc	agctcgcgtc	gtgcaggacg	tgacaaatgg	aagtagcacg	tctcactagt	6240
ctcgtgcaga	tggacagcac	cgtgagcaa	tggaagcggg	taggcctttg	gggcagcggc	6300
caatagcagc	tttgcctctt	cgtttcttgg	gctcagagcc	tgggaagggg	tgggtccggg	6360
ggcgggctca	ggggcgggct	caggggcggg	gcgggcgcc	gaaggtctc	cggaggccc	6420
gcattctgca	cgtttcaaaa	gcgcactct	gcgcgctgt	tctcctctc	ctcatctccg	6480

	ggcctttcga cctgcagcct gttgacaatt aatcatcggc atagtatata ggcatagtat	6540
	aatacagacaa ggtgaggaac faaacccatgg gatcggccat tgaacaagat ggattgcacg	6600
	caggttctcc ggccgcttgg gtggagagge tatteggcta tgaactgggca caacagacaa	6660
	teggetgctc tgatgcccgc gtgttccggc tgtcagcgea ggggcgcccg gttctttttg	6720
	tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga cgaggcagcg eggctatcgt	6780
	ggctggccac gacgggcggt ccttgcgcag ctgtgctega cgttgtcaet gaagcgggaa	6840
	gggactggct gctattgggc gaagtgcggg ggcaggatct cctgtcatct caccttgetc	6900
	ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg gctgcatacg cttgatccgg	6960
	ctacctgccc attcgaccac caagcgaaac atcgcatega gcgagcacgt actcggatgg	7020
	aagccggctc tgcgateag gatgatctgg acgaagagea tcaggggctc gcgccagccg	7080
	aactgttgcg caggetcaag gcgcgcacgc ccgacggcga ggatctctgc gtgaccatg	7140
	gcgatgcctg cttgccgaat atcatggctg aaaatggccg cttttctgga ttcatcgact	7200
	gtggccggct gggtgtggcg gaccgctatc aggacatagc gttggetacc cgtgatattg	7260
	ctgaagagct tggcggcgaa tggctgacc gcttctcctg gctttacggt atcgcgctc	7320
	ccgattcgcg gcgcacgcgc ttctatcgcg ttcttgacga gttcttctga ggggatcggc	7380
	aataaaaaga cagaataaaa cgcacgggtg ttgggtcgtt tgttcggatc agtactgaag	7440
	ttctattctc ctagaaagta taggaacttc gtggagacag agaagactct tgggtttctg	7500
	ataggcactg aagggcgaat tccagcacac tggcggccct tactagtgga tcccatggaa	7560
	ggttgttaga agaggagggg catgaggaca agctgccttt tccaatecat tttctcctc	7620
[0004]	caggcaagac agggcacagct cagtctgtgg ctcgtgcgtg gccttgcac ttgggggaa	7680
	tgttttgacc cctccgtctg ctctctcccc ccacagatct tcgacccccc ggaggagctg	7740
	gagcgggaag tgtgggaact ggcgaggetg gtctggcagt cttccagtgt ggtgttccac	7800
	acgggtgccc gcacagcac tgcctctggc atccccgact tcaggtctgt gattgtgcag	7860
	gggaagtcga ggcaaggcct accaggetgc cagaggettc cctgcgagcc acacacatct	7920
	gggaatgaga acacatccat ctgctttcct cctggatgtg tcttgggtac tccctttaag	7980
	atgtgtccct tggctgggca tggctggata caaggtcaag aattccagac cagcctggcc	8040
	aataatggta atccctgtct ctactaaaaa taaaaaatt agccagtigt ggtggcaac	8100
	atctgtagtc ccagctactc gggaggctga ggcaggagaa ttgcttgaac ctgggaggtg	8160
	gaggcagtga gccgagattg caccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgaggctccg	8220
	tctaaaaaca aaacaaaaag atgtgtccct tgtcacaacc agcattccac tcacctatt	8280
	ggccagaaca cggtcacctg atcacacctg gctgcaaggg ttgctgggaa atgtagtctt	8340
	tcatatttgc aagcgtagcc aggtgtggtg gcaggcacct gtaatcgcag ctacttggaa	8400
	ggccgaggtg ggagaatcgc ttgaaccggg gaggcagagg ttgcagtcag ccaggatcat	8460
	gccattgtac tccagcctgg gcaacagage cagactccat ctcaaaaaaa aaaaaaaaaa	8520
	aaaaaaaaaa aagccaagge gtgaatttct cctccttctc ctcttccata acctgctgtg	8580
	gctccccatt gccaggcagt gtagagtctt gaataccttg tgcctggaagc tgaagcctt	8640
	cctgccccag ccctgaatea cctctccaac ttcagccctc cctgctctctg ctgcagcccc	8700
	caaaacactt gcattttctc ctaaaactcat gggetcttcc cagcaccag gcctttgttt	8760
	acctctctctg tctgatcttc cctctcacc ttcaagaaac tgetttagct cctccaggaa	8820
	gcccttccac gtgccccagg gccccacct ccacgggct tccccaggcc caggtacctc	8880

	ctctgatcca	ggcttgacte	ttggggccag	aggatctgtg	tccacctgtc	tcccccaaga	8940
	tcaaggggett	ctggagggca	gggcttgggc	ccatgtgagc	atcgtcgggc	tcattgcagc	9000
	agcagtgttg	gttgaataga	ataagtcatt	tttgcctteg	igtgaattea	tctctctctc	9060
	tetgectctc	ectctctctg	tctctctcca	attctgtctc	tgacttgctt	tgtctttaac	9120
	tctttatctc	tetgtctgtg	tcttgtteta	teccctctc	ectgttcttg	caacteaccc	9180
	tctatttctg	ttctgatte	ectctctctg	tctccctgtc	tctctctgtc	tcctgatttt	9240
	ctctctctcc	aactttctct	ctataacctct	ctgattctcc	ctctgtctct	ttttctgctc	9300
	ccctctcccc	gtccatctct	cccggcctgc	caccttcagg	ggcccccaag	gagtctggac	9360
	catggaggag	cgaggtctgg	cccccaagtt	cgacaccacc	tttgagagcg	cgcgggcccac	9420
	gcagaccac	atggcgctgg	tgcagctgga	gcgcggtggc	ctctccgct	tcctggteag	9480
	ccagaacgtg	gaegggctcc	atgtgcctc	aggettcccc	aggtaacacc	ctggccccgc	9540
	ccccacaaa	gagcttgggg	ccccacaaac	cgtgtttgca	tttttagggg	gagagtcccc	9600
	tttccctggt	tctataagat	tctagccctg	agttcttggc	ccagtgtgtg	gagatctctg	9660
	agtcccatgg	ctcagagctg	tcccggctga	ggccagagge	agaatttccc	tcgagatggg	9720
	gctaagggga	ggagagctgt	cagggtctag	aagttgcagt	ttgttttttg	ttgtttgtgt	9780
	tgttttgag	accgagtttc	gttcttgttg	cccaggctgg	agtgcaatgg	ctgcatctcc	9840
	gctcagctc	ccaggttcaa	gcgattctcc	tgcctcagcc	tccttagtaa	ctgggattac	9900
	aggcatgcgc	catcacacc	agetaatttt	gtatttttag	tagagacggg	gtttctccat	9960
	gttgcccagg	ctggtcttga	actcctgacc	tcaggtgatc	tgccegcctc	agcctcccaa	10020
[0005]	agtctgggg	ttacaggtgt	gagccaccac	gcttggcctg	ttgtgttttt	aatatccate	10080
	tttattaate	tgacactaaa	cgtgtctgac	actgaagtga	acctgtgctc	tggggcagge	10140
	tgatttccca	ataaaagtgt	ggccctcccc	tgcctctctt	tgccaggtct	cacctctggg	10200
	gcaaccaatg	acagccaggt	cagttgttga	gacgaggagc	tcggcagcca	ggggtgaggg	10260
	gtgaggaaga	gatttttctc	tgttataaaa	agcaaacgag	gggcccggca	tgggtgctca	10320
	catctgtaat	cccagcactt	tgggagggcg	aggcaggcgg	atcacgaggt	caagagttcg	10380
	agaccagcct	ggccaacatg	ttgaaaaccc	atctctacta	agagtacaaa	aattagctgg	10440
	gcgtggtggc	gcatgcctgt	aatcccagct	actcgggagg	ctgagtcagg	agaatcgett	10500
	gaaccgggga	ggcagaggtt	gcagtgagcc	gagatggcgc	cactgcactc	cagcttgggt	10560
	gacagagcaa	gactctgtct	tgaaaaaaaa	aaaagcaaag	gagggtcagg	tgtggtgact	10620
	tatgcctgga	atctcagcac	tttgggaggc	caaggcgggc	ggatcatgag	gtcaggagat	10680
	cgagaccate	ccggccacat	ggtaaaaccc	cgtctctact	aaaaacagaa	aaattagget	10740
	gggtacagtg	getcacgcct	gtaatcccgg	cactttggga	ggccgaggeg	ggtggateac	10800
	aagctcagga	gategagacc	atcctggcta	acacggtgaa	accctgtctc	tactaaaaat	10860
	acaaaaaatt	ageccggcgt	ggtggcgggc	gcctgtagtc	ccagctactc	aggagctga	10920
	ggcaggagaa	tcacttgaac	cccggaggca	gaggttgtgg	tgagctgaga	ttgtgccatt	10980
	gaggttgtgg	tgagetgaga	ttgcaccatt	gcactccaac	ctgggcaaca	agagcaaaac	11040
	tctgtctcaa	aataaataaa	taaataaaat	aaagctggga	ttggatctca	tgcctcaggg	11100
	ccattcaatg	tctcggtttc	ttccattata	aactgggaat	ttgaattect	gtgcttctga	11160
	cttggtgaca	tcaagaggtt	cccatatgct	ctcggagggg	gacgggcatt	ttgtgagttg	11220
	aaagggcttc	ccgttatcta	aggtgggttc	agccttgggg	gttaatgatt	ccttgggctc	11280

agagaggttg	gtccacttgc	ccagagatgc	acagcagatg	aatggtggag	ccaggageta	11340
gaagagccag	aaagaaggag	ttgatcaatg	ttgtgggaga	ggagtccggg	aagccttccf	11400
ggaggagagg	ggettagcac	cagctccaaa	gcctgggcat	ccagggatec	tttcccacca	11460
teaagcctct	tctgtctctt	cccacaggga	caaaactggca	gagctccaag	ggaacatggt	11520
tgtggaagaa	tgtgccaagt	gtaagacgtg	agtgccc			11556

<210> 2

<211> 9970bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

	caggtggcac	ttttcgggga	aatgtgcgcg	gaacccctat	ttgtttatft	ttctaaatac	60
	attcaaatat	gtatccgctc	atgagacaat	aaccctgata	aatgcttcaa	taatattgaa	120
	aaaggaagag	tatgagtatt	caacatttcc	gtgtcgccct	tattcccttt	tttgcggcat	180
	tttgccttcc	tgfttttgc	caccagaaa	cgctggtgaa	agtaaaagat	gctgaagatc	240
	agttgggtgc	acgagtgggt	tacategaac	tggatctcaa	cagcggtaag	atccttgaga	300
	gttttgcgcc	egaagaacgt	tttccaatga	tgageacttt	taaagttctg	ctatgtggcg	360
[0006]	cggtattatc	ccgtattgac	gccgggcaag	agcaactcgg	tcgccgcata	cactattctc	420
	agaatgactt	ggttgagtac	tcaccagtca	cagaaaagea	tcttacggat	ggcatgacag	480
	taagagaatt	atgcagtget	gccataacca	tgagtgataa	cactgcggcc	aacttacttc	540
	tgacaacgat	cggaggaccg	aaggagctaa	ccgctttttt	gcacaacatg	ggggatcatg	600
	taactcgcct	tgatcgttgg	gaaccggagc	tgaatgaagc	cataccaaac	gacgagcgtg	660
	acaccacgat	gcctgtagca	atggcaacaa	cgttgcgcaa	actattaact	ggcgaactac	720
	ttactctagc	ttcccggcaa	caattaatag	actggatgga	ggcggataaa	gttgcaggac	780
	cacttctcgc	ctcggccctt	cggcttggct	ggtttattgc	tgataaatct	ggagccgggtg	840
	agcgtgggtc	tcgcggtatc	attgcagcac	tggggccaga	tgtaagecc	tcccgtateg	900
	tagttatcta	cacgacgggg	agtcaggcaa	ctatggatga	acgaaataga	cagatcgtctg	960
	agataggtgc	ctcactgatt	aagcattggt	aactgtcaga	ccaagtttac	tcatatatac	1020
	tttagattga	tttaaaactt	catttttaat	ttaaaaggat	ctaggtgaag	atcctttttg	1080
	ataatctcat	gaccaaaatc	ccttaacgtg	agttttcggt	ccactgagcg	tcagaccccg	1140
	tagaaaagat	caaaggatct	tcttgagatc	ctttttttct	gcgcgtaatc	tgetgettgc	1200
	aaacaaaaaa	accaccgcta	ccagcggtag	tttgtttgcc	ggatcaagag	ctaccaactc	1260
	tttttccgaa	ggtaactggc	ttcagcagag	cgcagatacc	aaatactgtc	cttctagtgt	1320
	agccgtagtt	aggccaceac	ttcaagaact	ctgtageacc	gcctacatac	ctcgetctgc	1380
	taatcctggt	accagtgget	getgccagtg	gcgataagtc	gtgtcttacc	gggttgact	1440
	caagacgata	gttaccggat	aaggcgcagc	ggtcgggctg	aacgggggggt	tcgtgcacac	1500
	agcccagctt	ggagcgaacg	acctacaccg	aactgagata	cctacagcgt	gagctatgag	1560
	aaagcggcac	gcttcccgaa	gggagaaagg	cggacaggtg	tccgtaagc	ggcagggtcg	1620

gaacaggaga	gcgcacgagg	gagcttccag	ggggaaacgc	ctggtatctt	tatagtectg	1680
tcgggtttcg	ccacctctga	cttgagcgtc	gattttttgtg	atgctcgtca	ggggggcgga	1740
gcctatggaa	aaacgcccagc	aacgcggcct	ttttacggtt	cctggccttt	tgettgccctt	1800
ttgetcacat	gttctttcct	gcgttatecc	ctgattctgt	ggataaccgt	attacegcct	1860
ttgagtgage	tgataccget	cgccgcagcc	gaacgaccga	gcgcagcgag	tcagtgageg	1920
aggaagcgga	agagcgceca	atacgcaaac	cgcctctccc	cgcgcttgg	ccgattcatt	1980
aatgcagctg	gcacgacagg	tttcccact	ggaaagcggg	cagtgagegc	aacgcaatta	2040
atgtgagtta	gctcactcat	taggcacccc	aggctttaca	ctttatgett	ccggctcgta	2100
tgttgtgtgg	aattgtgagc	ggataacaat	ttcacacagg	aaacagctat	gaccatgatt	2160
acgccaagcg	cgcaattaac	cctcactaaa	gggaacaaaa	gctggagctg	caagettaat	2220
gtagtcttat	geaatactct	tgtagtcttg	caacatggta	acgatgagtt	agcaacatgc	2280
cttacaagga	gagaaaaagc	accgtgatg	ccgattgggtg	gaagtaaggt	ggtacgatcg	2340
tgcttatta	ggaaggcaac	agacgggtct	gacatggatt	ggacgaacca	ctgaattgcc	2400
gcattgcaga	gatattgtat	ttaagtgcct	agctcgatac	aataaacggg	tctctctggt	2460
tagaccagat	ctgagcctgg	gagctctctg	gctaactagg	gaacccactg	cttaagectc	2520
aataaagctt	gccttgagtg	citcaagtag	tgtgtgcccg	tctgttgtgt	gactctggta	2580
actagagate	cctcagacce	ttttagtcag	tgtggaaaat	ctctagcagt	ggcgcccga	2640
cagggacctg	aaagcgaaag	ggaaaccaga	gctctctcga	cgcaggactc	ggcttgetga	2700
agcgcgcaeg	gcaagaggcg	aggggcggcg	actggtgagt	acgcaaaaa	ttttgactag	2760
[0007] cggaggctag	aaggagagag	atgggtgaga	gagcgtcagt	attaageggg	ggagaattag	2820
atcgcgatgg	gaaaaaatc	ggttaaggcc	agggggaaag	aaaaaatata	aattaaaca	2880
tatagtatgg	gcaagcaggg	agctagaacg	attcgcagtt	aatcctggcc	tgttagaaac	2940
atcagaaggc	tgtagacaaa	tactgggaca	gctacaacca	tcccttcaga	caggatcaga	3000
agaacttaga	tcattatata	atacagtagc	aaccctctat	tgtgtgcate	aaaggataga	3060
gataaaagac	accaaggaag	cttagacaa	gatagaggaa	gagcaaaaca	aaagtaagac	3120
caccgcacag	caagcggccg	ctgatcttca	gacctggagg	aggagatatg	agggacaatt	3180
ggagaagtga	attatataaa	tataaagtag	taaaaattga	accattagga	gtagcaceca	3240
ccaaggcaaa	gagaagagtg	gtgcagagag	aaaaaagagc	agtgggaata	ggagctttgt	3300
tccttgggtt	cttgggagca	gcaggaagca	ctatgggcgc	agcctcaatg	acgctgacgg	3360
tacagccag	acaattattg	tctggtatag	tgcagcagca	gaacaatttg	ctgagggeta	3420
ttgagcgca	acagcatctg	ttgcaactca	cagtctgggg	catcaagcag	ctccaggeaa	3480
gaatcctgge	tgtggaaaga	tacctaaagg	atcaacagct	cctggggatt	tggggttget	3540
ctggaaaact	catttgcacc	actgctgtgc	cttggaatgc	tagttggagt	aataaatctc	3600
tggaacagat	tggaatcaca	cgacctggat	ggagtgggac	agagaaatta	acaattacac	3660
aagcttaata	cactccttaa	ttgaagaate	gcaaaaccag	caagaaaaga	atgaacaaga	3720
attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	gtggaattgg	tttaacataa	caaattgget	3780
gtggtatata	aaattattea	taatgatagt	aggaggcttg	gtaggtttaa	gaatagtttt	3840
tgetgtactt	tctatagtga	atagagttag	gcagggatat	tcaccattat	cgtttcagac	3900
ccacctceca	accccgaggg	gacccgacag	gcccgaagga	atagaagaag	aaggtggaga	3960
gagagacaga	gacagatcca	ttcgattagt	gaacgatct	cgacggttaa	cttttaaaag	4020

aaaagggggg	attggggggt	acagtgcagg	ggaaagaata	gtagacataa	tagcaacaga	4080
catacaaaact	aaagaattac	aaaaacaaat	tacaaaaaatt	caaaatttta	tcgatggtag	4140
ctacegggta	ggggaggcgc	tittceccaag	gcagtctgga	gcatgcgctt	tagcagcccc	4200
getgggcaact	tggegetaea	caagtggcct	ctggetcgea	cacattccac	atccaceggt	4260
aggegecaac	eggctccgtt	ctttgggtgc	cccttcgcgc	caccttctac	tcctccccta	4320
gtcaggaagt	tccccccgc	cccgcagctc	gcgtcgtgca	ggacgtgaca	aatggaagta	4380
gcacgtctca	ctagtctcgt	gcagatggac	agcaccgctg	agcaatggaa	gcdggtaggc	4440
ctttggggca	gcgccaata	gcagctttgc	tccttcgctt	tctgggctca	gaggctggga	4500
aggggtgggt	ccggggcgcg	gctcaggggc	gggtcaggg	gcggggcggg	cgccccgaagt	4560
ctccggagg	cccggcattc	tgcacgcttc	aaaagcgcac	gtctccgctg	ctgttctctc	4620
cttctctc	tegggcctt	tcgacctgca	ctctagagga	tccttcgaga	tggattacaa	4680
ggatgacgac	gataaggaag	acgcaaaaa	cataaagaaa	ggccccgcgc	cattctatcc	4740
gctggaagat	ggaaccgctg	gagagcaact	gcataaggct	atgaagagat	acgccctggt	4800
tcctggaaca	attgctttta	cagatgcaca	tatcgaggtg	gacatcactt	acgctgagta	4860
cttcgaaatg	tcggttcggt	tggcagaagc	tatgaaacga	tatgggctga	atacaantea	4920
cagaatcgtc	gtatgcagtg	aaaactctct	tcaattcttt	atgccgggtg	tgggcgcggt	4980
atltategga	gttgcagtig	cgccccgcaa	cgacatttat	aatgaacgtg	aattgctcaa	5040
cagtatgggc	atttcgcagc	ctaccgtggt	gttcgtttcc	aaaaaggggt	tgcaaaaaat	5100
ttgaaacgtg	caaaaaaage	tccaateat	caaaaaaatt	attatcatgg	attctaaaac	5160
ggattaccag	ggatttcagt	cgatgtacac	gttcgtcaca	tctcatctac	ctcccggttt	5220
[0008] taatgaatac	gattttgtgc	cagagtcctt	cgatagggac	aagacaattg	cactgateat	5280
gaaectectct	ggatetaactg	gtctgcttaa	aggtgtcget	ctgctcata	gaactgctg	5340
cgtgagattc	tcgcatgcca	gagatectat	ttttggcaat	caaatcattc	eggatactgc	5400
gattttaagt	gttgttccat	tccatcaegg	ttttggaatg	ttactacac	tcggatattt	5460
gatattgtgga	tttcgagtcg	tcttaatgta	tagatttgaa	gaagagctgt	ttctgaggag	5520
cttcaggat	tacaagattc	aaagtgcgct	gctgggtcca	acctattct	ccttcttcgc	5580
caaaagcact	ctgattgaca	aatacgattt	atctaattta	cacgaaattg	cttctgggtg	5640
cgctccccctc	tetaaggaag	tcggggaagc	ggttgccaag	aggttccatc	tgccaggat	5700
caggcaagga	tatgggetca	ctgagactac	atcagctatt	ctgattacac	ccgaggggga	5760
tgataaaccg	ggcgcggtcg	gtaaagttgt	tccatttttt	gaagcgaagg	ttgtggatct	5820
ggataaccggg	aaaacgctgg	gcgttaatca	aagaggcgaa	ctgtgtgtga	gaggtcctat	5880
gattatgtcc	ggttatgtaa	acaatccgga	agcgaccaac	gccttgattg	acaaggatgg	5940
atggetacat	tctggagaca	tagcttactg	ggacgaagac	gaacacttct	tcategttga	6000
ccgctgaag	tctctgatta	agtacaaagg	ctatcaggtg	gctcccctg	aattggaatc	6060
catcttgetc	caacacceca	acatcttcca	cgcaggtgct	gcaggtcttc	ccgacgatga	6120
cgccggtgaa	cttcccgecg	ccgttgttgt	tttgagcac	ggaaagacga	tgacggaaaa	6180
agagatcgtg	gattacgtcg	ccagtcaagt	aacaaccgcg	aaaaagttgc	gcggaggagt	6240
tgtgtttgtg	gacgaagtae	cgaaaggctc	taccggaaaa	ctcgacgcaa	gaaaaatcag	6300
agagatctc	ataaaggcca	agaagggcgg	aaagatcgec	gtgtaaattg	attacaagga	6360
tgacgacgat	aaggaagacg	ccaaaaacat	aaagaaagcg	ccggcgccat	tctatccgct	6420

	ggaagatgga accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatacg ccctggttcc	6480
	tggaacaatt gcttttacag atgcacatat cgagggtggac atcacttaacg ctgagtactt	6540
	cgaaatgtcc gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggetgaata caaatcacag	6600
	aatecgtcgt tgcagtga aaactcttca attctttatg cgggtgttgg gcgcgttatt	6660
	tateggagtt gcagttgcgc ccgcgaacga cttttataat gaacgtgaat tgetcaacag	6720
	tatgggcatt tcgcagccta ccgtgggtgtt cgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt	6780
	gaacgtgcaa aaaaagctcc caatcateca aaaaattatt atcatggatt ctaaaacgga	6840
	ttaccagggga tttcagtcga tgtacacggt cgtcacatct catctacete ccggttttaa	6900
	tgaatacgat tttgtgccag agtccttcga tagggacaag acaattgcac tgatcatgaa	6960
	ctctctgga tctactggte tgcctaaagg tgtcgtctcg cctcatagaa ctgectgcgt	7020
	gagattctcg catgccagag atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg atactgcgat	7080
	tttaagtgtt gttccattcc atcacggttt tggaaatgtt actacaetec gatatttcat	7140
	atgtggattt cgagtcgtct taatgtatag atttgaagaa gagctgttcc tgaggagcct	7200
	tcaggattac aagattcaaa gtgcgctgct ggtgccaaacc ctattctcct tcttcgcaa	7260
	aagcactctg attgacaaat acgatttate taatttacac gaaattgctt ctggtggcgc	7320
	tcccctctct aaggaagtcg gggaaagcgt tgcgaagagg tccatctgc caggtatcag	7380
	gcaaggatat gggctcactg agactacate agctattctg attacaccgc aggggatgca	7440
	taaaccgggc gcggtcggta aagtgttcc atttttgaa gcgaaggttg tggatctgga	7500
	taccgggaaa acgetgggcg ttaatcaaa aggcgaactg tgtgtgagag gtctatgat	7560
	fatgtccggt tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg	7620
[0009]	getacattct ggagacatag ctactggga cgaagacgaa caettctca tcgttgaccg	7680
	ectgaagtct ctgattaagt acaaaggcta tcaggtgget cccgetgaat tggaaatccat	7740
	cttgcctcaa caccacaaca tcttcgaecg aggtgtcga ggtctcccg acgatgacgc	7800
	cgtgaactt cccgccgcg tttgttttt ggagcacgga aagacgatga cggaaaaaga	7860
	gatcgtggat taegtccca gtcaagtaac aaccgcgaaa aagttgcgcg gaggagtgt	7920
	gtttgtggac gaagtaccga aaggtcttac cggaaaactc gacgcaagaa aaatcagaga	7980
	gatctcata aaggccaaga agggcggaaa gatcgcctg taaacgcgtg tcgacaatca	8040
	acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt gactggtatt cttaactatg ttgetcttt	8100
	tacgctatgt ggatacctg cttaaatgcc tttgtatcat getattgctt cccgatggc	8160
	ttcattttc tctctctgt ataaatectg gttgctgtct cttatgagg agttgtgccc	8220
	cgtgtcagg caacgtggcg tgggtgcaac tgtgtttget gacgcaacc cactggtg	8280
	ggcattgce accacctgc agctccttcc cgggacttcc gctttcccc tccctattgc	8340
	caeggcgaa ctategcgc cctgccttgc ccgctgctg acaggggctc ggetgttggg	8400
	cactgacaat tccgtggtgt tgcggggaa getgacgtcc tttccatgce tgetgcctg	8460
	tgttgcacc tggattctgc ggggacgct cttctgetac gtcccttccg cctcaatec	8520
	agcggacctt ccttcccgc gctgctgccc ggetctgccc cctcttccc gtcttgeet	8580
	tcgccctcag acgagtcgga tctcccttgc ggccgcctcc ccgctggaa ttcgagctc	8640
	gtacctttaa gaccaatgac ttacaaggca gctgtagatc ttagccaatt tttaaaagaa	8700
	aaggggggac tggaaaggct aattcactcc caacgaagac aagatctget ttttgcctgt	8760
	actgggtctc tetggttaga ccagatctga gcttgggagc tctctggcta actagggac	8820

ccactgctta agcctcaata aagcttgect tgagtgcctc aagtagtgtg tgcccgtctg	8880
ttgtgtgact ctggtaacta gagateccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct	8940
agcagtagta gttcatgtca tcttattatt cagtatttat aacttgcaaa gaaatgaata	9000
tcagagagtg agaggaactt gtttattgea gcttataatg gttacaaata aagcaatage	9060
atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa	9120
ctcateaatg tatcttatea tgtctggctc tagctatecc gccctaaet ccgcccagtt	9180
ccgcccattc tccgcccatt ggctgactaa ttttttttat ttatgcagag gccgagggcg	9240
cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc ctaggctttt	9300
ggctcgagac gtacceaat cgccctatag tgagtcgtat tacgcgcgct cactggccgt	9360
cgttttacaa egtcgtgaet gggaaaacce tggcgttacc caacttaate gccttgceage	9420
acatcccctc ttegccagct ggcgtaatag cgaagaggcc cgcaccgatc gcccttccca	9480
acagttgcgc agcctgaatg gcgaatggcg cgacgcgcc tgtagcggcg cattaagcgc	9540
ggcgggtgtg gtggttaegc gcagcgtgac cgctacactt gccagegccc tagcgcgcc	9600
tcctttcgct ttcttccett cttttctcgc cacgttcgce ggctttcccc gtcaagctct	9660
aaatcggggg ctccctttag ggttccgatt tagtgcctta cggcacctcg accccaaaa	9720
acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatgcgcc tgatagacgg tttttgccc	9780
tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact	9840
caacctate teggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgcgattt cggcctattg	9900
gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgtt	9960
tacaatttcc	9970
[0010]	
<210> 3	
<211> 1943bp	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223>	
<400> 3	
ccggtgccc a ttcactcaet acctaccctt ttttctteta cctctgactg gaggattcaa	60
tcacacecaa agcagggggt aataagacac ccaacagagg agttcacagg ctgcttggga	120
gaagacaate cgtgggcttg ggggaggag aaacgcctgc taaatttagg aagctgcttg	180
ctggaagagg tgatggtaaa taagaagggc ctgatggccg ggtgggatgt tgagcacctg	240
ccttggagga agctaggcag ggcacaggcc ggcaagtggg aagtgcgtgg gtgaacgagt	300
gcatgtgtgt gtcagggtac ctggtagct cgcagcctg gctaggactc agcacggctt	360
ctttctccca catacaaggc ctcaggggccc tggggccata aggggatcct ccgtcctggg	420
cctctccca ctccttctc cctacctcc tgcagctcca gtccccgag ctcccggcca	480
cagtgeccac tgccggctcc ggttaccac tcccagctgg gccacgagca gctccagccg	540
ctccactctg acacctgate ggcctctgagc aggcggccc cccagggggc cggggatgag	600
ccgagggagg agacagctg gcagcggact gcctgttggc caactggctc tggcgggaag	660
acaccacga tcttccctat catcactgga ctgatttcag tttctggaag gagccatgct	720

cttcctcttt ctcagccttt gcaettgetg ttccccccac caggaacatt ctttctgtac	780
ttcatgteac eccaacgggc tetacctgac tcatgcactc tttatttatt tattttatta	840
tttttgagac ggagtttcat gettgttgcc caggetggag tgcaatggcg egatctcggg	900
ctcaccgcaa tetecgcctc ctgggttcaa gcaattctec tgcctcagcc tcccgageag	960
ctgegattac aggccaccac acccagctaa ttttgtatth ttagtagaga cggggtttct	1020
ccatgttggg caggggtggc tgaactccc aatctcaggt gatccacctg ccttggcctc	1080
ccaaagtget gggattacag gtgtgagcca ctgcgccggg ctcaactact ttttagatct	1140
ttgetgeaac atcccctctt ccaggaagcc ctcccggatg cccccagcct gggtcaggtg	1200
cctcctgtga gccccctcac tgccctgtgc cctctgcate acccattgca ccccaaccac	1260
accatgtcac cattacctgg tcaatgttt gtgtccacce gcagccacca gggcatagat	1320
ggtaccactt ttgetctcca gtgtgcccag tacaagtag gtactcaaca catgattctt	1380
aaatgagtec tccaggccac cagccctatt gaccttgagc aggacctgtc ctgcagaatg	1440
cagaacctcc agttggatga tactcagata acttggccgg acgcagtggc tcacgcctgt	1500
aatcccagca ctttgggagg ccgagggcgt cagatcacct gaggtcagga gttcgggacc	1560
agcctgacca acatggagaa accccgtctc tactaaaaaa taaaaaatt tgctgggtgt	1620
ggtggcgggc gectgtaate ccagctacta gggaggctga ggcaggagaa tcgcttgaac	1680
ccaagaggcg gaggttgcag tgaaccgaga ttgcgccact gcactccage ctgggcaaca	1740
gagcgaggct ccgtcacaca cacacacaca cacacacaca cacacacaaa tgagatattc	1800
aggtaaactt gcgtggcatt caaaacctt aggetggggg cctgtctgtc eggctctgtc	1860
[0011] cttacggaat ttactaatcc gtaaaaagggg ttgtggggac atggatagcc tgtgtcccgc	1920
atthtagagg tgactggaga act	1943

<210> 4

<211> 1233bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 4

gccaacacgc ccaactctgt ggtcaccctg tcggggctga tcggggagag aggggatgta	60
gtccaggaa gaggggacga caggcgcaaa gggaggtggg aataaacaca cctggagaac	120
gattaggcct gggaggtttc cagagccggg ccaggacggg gctcaaatgc caggctgggg	180
agttggcact ttatcctgag ggtgatgggg aagggttttg ccctggcgag gggactggac	240
agaatgtgcc agaaagatcc ctccagccac tcagagggga agtggaggga tcggtgcc	300
cctcaacgca ctgtgggaet ttggggaagt caattccctt ttgggtctcc atctccaaac	360
ttctgcaaa cgaggtgaag atggcccat tccataagge tggcccatgc attctgaete	420
atgatttaa tgagcctga tgggtgcegc ccgtccagaa gcccaactct tcaactgetgc	480
tgtagtcac ttattatta ttattattat atthttgaga tgagtttct ctgtgccca	540
ggctggagtg cagtggcggc atctcggctc actgcaacct ccgcctcta ggttcaageg	600
attctcctgc ctcagcctcc tgagtagagt agatgagact acaggcacct gccaccacgc	660

ctggctaatt	tttgtatfff	tagtagagge	ggggttfcac	catgttggcc	agtctgctct	720
tgaactcttg	atctcaagtg	atccacccac	cttggcttcc	caaagtgetg	ggattatagg	780
ctgtagccac	catacccggc	ctgttagtea	ctttattcca	ccaacattta	tagagcaett	840
actgtagctc	aggcacttfc	taggtactaa	ggccacagcc	aggagcaaca	cagattaana	900
acccctcctt	ctagtaaggg	agactgacta	ggggttgcat	ggaaaccagt	tggccaaggg	960
aggcaactct	gtcactgaag	tgacatctaa	gccacaagtt	acaggagggtg	agggaggggag	1020
ccatgtgggt	atctggggga	agagcattaa	agggtgtggc	cctgaggcgg	gactgtgect	1080
ggtgtgatag	aggaacaagg	aggagacctg	tgtggctgga	gcagagtgag	gcagggagag	1140
ggaggagaag	agggcagggg	gggggcaagg	gaggtagtgc	agggcctggg	gggccgtggg	1200
aagggetagg	gctttgacaa	ggcaggtggg	agg			1233

<210> 5

<211> 14732bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 5

[0012]	caccatgecc	ggetgectgg	ctaatttttg	catttttagt	agagaggggg	tttcaccatg	60
	ttggccaggc	tggtctcgaa	ctcctgacct	caggtgatct	gcccgcctct	gcctctcaaa	120
	gtgctgggat	tacagacgtg	agccaccatg	ccgagccaga	tttttttttt	tttttcgaga	180
	cggagtctcg	ctctgttgc	caggetggag	tgcaatggct	ccatctcggc	tcactgcaag	240
	ctccacctcc	caggttcatg	cctcagcctc	ccgagtact	gggaactacag	gcgcccgcc	300
	ccacgcccg	ctgatttttt	gtatttttag	tagagacggg	gtttcaccgt	gttaatgagg	360
	atggcctega	tctctgacc	tcgtgaccca	cccacctcgg	ccttccaaag	tgctgggatt	420
	acagatgtga	gccaccacgc	ccagcctata	catggatfff	tgactgtgca	ggagggtggg	480
	ctgtaattgt	tcaagggtca	actatcatcg	aggaattgag	tccacgtggg	aagaaaaatt	540
	ftaggatcac	tecacagtga	atgaagetca	cccaatgcca	cattttgtag	gcagttaatg	600
	gaccgttttt	caactcttfc	tctcccctg	tctgtctcca	cccattctct	tttcaatcaa	660
	tgaactcccc	teccacctcc	aggccaatca	tgttcatagt	aacgcagccc	tgggggaagg	720
	cttgtgtctc	acttctctagc	tgtgtgacct	tgagcagggtg	tcttaacctc	tctgggcttc	780
	cctcccctcat	ctataaaatg	aagataataa	aagctcctgc	ctcataaac	ggtggtgagg	840
	attaaatgag	ctgacacctg	caaagcacat	cttatatfff	ttatagtget	caaaaaatcaa	900
	caaaaaatgaa	aataaataag	ccgggcacag	taetgcacat	ctgtagtccc	agctacttgg	960
	ctgaagcggg	aggatctctt	gagcccagga	gtttgagacc	agcctggaca	acatagttag	1020
	accccatctc	ttaaaaaaaa	aaacttaggg	ccgggcatgg	tggctcatgc	ctataatggc	1080
	aaccctttgg	aaggccaagg	tgggtggatc	acttgaagtc	aggagtttga	gaccagcctg	1140
	gccaacatgg	tgaaacccat	ctctactaaa	aatacaaaaa	aaattgctgg	gcgtggtagt	1200
	gogtgctgt	agtcccacct	acttgggagg	ctgcggcata	agaaaaaat	agcttgaatc	1260
	caggaagtgg	agcttgcagt	gagccaagat	cacaacactg	cactccagcc	tgagcaacag	1320

agtgagactc	cttcaaaaa	aaaaaaaaa	aaaaagaag	aaagaaaaat	taaaaaaat	1380
aaagtgaatc	caatgatatt	aaattaaat	gttttaata	aaataaaaat	gaataatgaa	1440
atgaatgggt	acatgataat	faataaatag	tttaaaaaca	aaataaaaatg	ggcggagtg	1500
agtggctcac	gectgtaatt	ccagcacttt	gggaggctga	ggcgggcaaa	tcacctgagg	1560
tcggaagctc	gagaccagec	tgaccaacat	agtgaaacce	tgtctctact	aaaaatacaa	1620
aatatttagc	cagccatagt	ggcaggcgcc	tgtagtccca	getatttggg	aggctgagge	1680
aggagaattg	cttgaactca	ggaggcagag	gttgcagtga	gcagagatcg	tgccactgea	1740
ttccagcctc	agcaacagag	tgagactctg	tctcaaaaat	aaatgaaate	aaatcaaate	1800
aaatgagccc	aaacaactga	aggaagccac	agagggggca	tgacatcccc	agagtcaccc	1860
aggacaccag	ggacagagga	aggatttgaa	etcagagcea	cctgattcta	tcccaggctt	1920
ggetgggegc	agtggctcac	gectgtaate	ccatcactct	gggtgggagt	taggaggatc	1980
gcttgaggcc	aggagttaa	gaccagcctg	ggcaacacag	ctacacccca	tctgtacaaa	2040
aaataaaaat	tagcccagtg	tgggtgtgca	cgctatagt	ctctgcactt	tgggaggctg	2100
aggcaggagg	atcgtttgag	cccaggagtt	ggaggctgta	gtcggttgag	atagcaccac	2160
tgactccag	cctgggtgac	agaaaagagc	tctgtctcaa	aaaaaaaaa	aaaaaaaaa	2220
atggaccaag	cgtgggtgct	catgccigtg	atcccagcat	tttgggagge	caaggcgggt	2280
ggatgacctg	aggctcaggag	ttcaagaccg	gectggccaa	catggtgaag	tcttgcctct	2340
actaaaaata	caaaattagc	tggcatggt	ggtgcgtgcc	tgtaatecca	gctacteggg	2400
aggctgagge	aagaaaatta	cttgaacecg	ggaggtggag	gttcagatga	gcccagatca	2460
agccacggca	ctccagcctg	ggcgacaaga	gggaaactec	atctcaaaaa	taaaataaaa	2520
[0013] taaaataaaa	aatgaaatec	aggcttgite	cacaggcctc	tcttttttgg	ttttcaaaaa	2580
tgctttcaa	agatectgag	ctcccactca	ctcgcactct	ctgctcctge	caagagaate	2640
tgcctgitat	gcttgtgeat	caagcagacc	tggctccagc	tccgaatett	taccacacaa	2700
ggtcctgccc	ccgtctctca	cgtgcctgcc	ttcacttctc	taaatcctcc	ctattcttcc	2760
aggctctget	ccggtgccac	ctcctccagg	cagactccct	gatttctcca	ggccacacca	2820
gatggggatg	ttgtatccca	tgatacgaaa	actaaaggct	ccaagtcaag	cttggcccacc	2880
caggccagge	acaagagggt	getcaggaag	getgattgcc	gttcccctgga	ggtgagccct	2940
ccctttcact	ctccccatct	gtgccctgaa	ttggccgcca	cagggacttg	agggggctga	3000
gaagaatggg	gacaatggag	gaagaagcat	gtctttctag	gagttcatag	ccaaagacac	3060
ggatgcaaga	gaagacaget	ggatetaect	cagggccttt	gcactggctg	ttccagccac	3120
ttggaatgca	attcctgcaa	actctctccc	ccactcccct	tcccttttct	tttttttttt	3180
cttttttgag	atggagtctc	actctgttgc	ccaggctgca	gtgcaatggc	acaatctcag	3240
ctcaactgaa	ctctcacctc	ccaggttcaa	gcaattctcc	tgcctcagcc	tcccagtag	3300
ctgggattac	aggctgcccg	caccgtgcc	agetaatfff	tgtatfifta	gtagagacaa	3360
cgtttcacca	tgttggccag	getcgtcttg	aactctgac	ctcagtgat	ctgctgct	3420
tggcctccca	aaatgctggg	attacagggt	tgagccacca	cgccagccc	tccccttccc	3480
tttetaatct	ttgctttaat	accacctctc	ctgggaagcc	ttccctggcc	accctcttta	3540
aaactgcagc	cacctcccct	gcctgaaatg	cttcaattcc	cttttccctg	tttgtctgtc	3600
tttgcgacac	aaaatacaea	ttgtcactta	tttatcttgt	ttctgttca	tctcccgtac	3660
tcagcggctg	getccacgag	ggcaaggatt	tttgctgcc	ctattcccctg	gctgatcccc	3720

	ctgtgcctgg aacagcgcct gctatataaa tatgtgctga gtacacacac accaaagcaa	3780
	aagatcagga tcctcgggaa agtgggtect tggaaaagca aggggttact gtggccgggg	3840
	agagcggaga ttggacgggg aggtggtact ggggccaaat tgtgaggaat taggagggtc	3900
	tgattggtgg caatgcggcg agaaggaatt ccatggagag cggactaggg cctgggtaaa	3960
	ggcctgggct ggaaagcttg tacggggagc agtggggagg tcatgacgct agggggcagc	4020
	agagaggaaa ggagaagagg tgggtactgg aatgaaaggg tggatcttea gccaaagcccc	4080
	aggagacaga aggetgaagt tgcaggggtg tategggcat ctagggcctc acactcaect	4140
	ctgtcttctt aaatcgcgcc ctgagagtct tcatagttag tgcctgtgt ttctctctc	4200
	cacaggccac ctgaggaggg caagggtggg ggtaaggatga gggacaccag tcctgggtggg	4260
	cggcagggtc egttgcteg cctcctcaa aaggaccgct tctccttcc tgaccagtec	4320
	tgccccctag ageaagacac agacctgctc tatctctac ctgctgtgtg tcttttggca	4380
	gtttacttgc cctctctgtt ttacttccct catctataca gtgacagaaa tgatccttc	4440
	ttgaccaact catggtcagt ttcagcatg gtccctacac agagcctggc caaacatgag	4500
	gggcttcata aatgcatctc actggtatct cctgcggctc aaacagatea agcctttct	4560
	ggtctcctaa cttttacctg tgcagttatt tctgcctaga atggtttctt tttctctctc	4620
	tgaactccta ctcatcttc aaagcccagt tccaaaatcc ctgtctctta tcagctttgc	4680
	ctctgttcc caagcagaga tctaactccc caaattgggt tcccgcctac cctggetggg	4740
	tctctgctc tgcctcacc ctggctecat gggttggag ggtctgggt gattctgtcc	4800
	tttcaaacag tcaggggctc cctggggact gaagccaggg ctgacggctc tcagcacaga	4860
	ggcatgtttg ctacatagtc agagggaacc tccatgtgac agcaattcac ccatagtggg	4920
[0014]	tggaggctctg gggcaatggc tgcattgatg tgtgtgacgt tgagtgtggg gcgtgtgac	4980
	acgtgcaatt ctgtccacct gggcctgttc tacgttccgc atgggcagge acggaggtea	5040
	ggcaggccta tcttgagggg gtgtgttttt tgaggggtgt gactgtgagg cctatgtgt	5100
	gaaagggatt tetgtgatgg agaattgtta tttgcctctt accaaggagt aggggttggc	5160
	atggccteta cctgtccacc tatctacteg tgaattctcc aagccacct tccacgatt	5220
	taccacctat gcactcaect ggacatccat cctcccacct aagcactgta taaccacca	5280
	ctggccacca cccacaaaec caccaccca attcatgttc tcatggttct tcateacct	5340
	ttaatcagat ttcacccaca catccatcca cccacccaaa eacctaccaa ctcccacct	5400
	tcatecctc actcctcac ccatccatcc acttatccat ccttccatcc atccacccaa	5460
	ccacceatcc atccatctgc ccaagcatcc atccatccac ccatctgccc acccaatcac	5520
	acacceatcc acccatccac ccacceaccc atccactcat ccatccaett atccatccct	5580
	ccatccacce acccaaccac caatccatcc atccaccac ccaccaccaa gtgcatccat	5640
	ccacceaccc accagtcctt ccatggatcc ttcateccat ccatccatcc acttatecat	5700
	ccctccatcc atttgcctaa tcacceaccc attcatccat ccacceatcc atccatacat	5760
	ctacceatcc acccatctac caaaccacca atccacctat tgcceccca tccatccacc	5820
	caccatcca ttcatctacc cctccaccgg tgcctatcca ctactacct accctttttt	5880
	cttctaccte tgactggagg attcaatcac acccaaagca ggggtaata agacacccaa	5940
	cagaggagtt cacaggctgc ttgggagaag acaatccgtg ggcttggggg agggagaaac	6000
	gctgtctaaa ttttaggaage tgcctgtctg aagaggatgat ggtaataaag aaggcctga	6060
	tggccgggtg ggatgttgag cacctgcctt ggaggaagct aggcagggca caggccggca	6120

	agtgggaagt gcggtgggtga acgagtgcat gtgtgtgtca gggtacctgg gtagctecgc	6180
	agcctggeta ggactcagea eggettett ctcccacata caagggctea ggggectggg	6240
	gccataaggg gatcctccgt cctgggcctc tcccacctcc ttctcccct acctcctgea	6300
	getccagtgc cecgagctcc eggccacagt gcccactgccc ggetccggft acccactccc	6360
	agetgggcea cgagcagetc cagccgctcc actctgacac ctgatcggct ctgagcagge	6420
	ggccgccccca gggggccggg gatgagccga gggaggagac aggetggcag cggactgect	6480
	gttgccaac tggctctggc ggaagacac ccacgatctt cctatcctc actggactga	6540
	ttcagtttc tggaaggage catgctcttc ctctttctca gcctttgca tttgctgtcc	6600
	ccccaccagg aacattcttt ctgtacttca tgtcaccca accggcteta cctgactcat	6660
	gcactcttta tttatttatt ttttttttt tgagacggag ttctatgett gttgccagg	6720
	ctggagtgea atggcgcat ctccgctca ccgcaatctc egctcctgg gttcaagcaa	6780
	ttctctgcc teagctccc gagcagctgc gattacagge caccacccc agctaatttt	6840
	gtatttttag tagagacggg gttctccat gttggctagg gtggtctega actcccate	6900
	tcaggtgatc cacctgcctt ggcctcccaa agtgctggga ttacaggtgt gagccactgc	6960
	gcccggctca ctacttttt agatctttgc tgcaacatcc cctcctccag gaagccctcc	7020
	cggtgcccc cagcctgggt caggtgcctc ctgtgagccc cctcactgcc ctgtgcctc	7080
	tgcacacccc attgcacccc aaccacacca tgtcaccatt acctggteac atgttttgtt	7140
	ccaccgcag ccaccagggc atagatggta ccacctttgc tctccagtgt gccagtaca	7200
	aagtaggtac tcaacacatg attcttaaat gagtctctca gccaccagc cccattgacc	7260
[0015]	ttgagcagga cctgtcctgc agaatgcaga acctccagtt ggatgatact cagataactt	7320
	ggccggacgc agtggctcac gctgttaate ccagcacttt gggaggccga ggcggctcaga	7380
	tcacctgagg tcaggagtte gggaccagcc tgaccaacat ggagaaaacc cgtctctact	7440
	aaaaaataca aaaatttget ggggtgtgtg cggggcgcct gtaatcccag ctactagga	7500
	ggctgaggca ggagaatgc ttgaacccaa gaggcggagg ttgcagtga cagagattgc	7560
	gccactgcac tccagcctgg gcaacagagc gaggctccgt cacacacaca cacacacaca	7620
	cacacacaca cacaaatgag atattcaggt aactctgcgt gccattcaaa acccttaggc	7680
	tggggtccct gctgtccgge tetgtctta cggaatttac taatccgtaa aaggggttgt	7740
	ggggacatgg atagcctgtg tcccgcattt tagaggtgae tggagaactc tegagcgccc	7800
	gccagtgtga tggatatctg cagaattegc ccttgttaca agacaggttt aaggagacca	7860
	atagaaactg ggeatgaagt tctattctc tagaaagtat aggaactteg gccctgcag	7920
	gtcaatteta ccgggtaggg gaggcgttt tcccaggca gctctggagca tgcgctttag	7980
	cagccccgct gggcaacttg cgtacacaaa gtggcctctg gctcgcaca cattccat	8040
	ccaccggtag gcgccaaccg gctccgttct ttggtggccc ctctcgcaca ccttctactc	8100
	ctcccctagt caggaagtte cccccgccc cgcagctcgc gctctgcagg acgtgacaaa	8160
	tggaagtage acgtctcaet agtctcgtgc agatggacag caccgctgag caatggaage	8220
	gggtaggcct ttggggcage ggccaatage agctttgctc ctctgcttctc tgggctcaga	8280
	ggctgggaag ggggtgggtcc gggggcgggc tcagggcggg gctcaggggc ggggcccggc	8340
	cccgaaggtc ctccggagge ccggcattct gcacgcttea aaagcgcacg tctgcccgcg	8400
	tgtctcctc ttctctatct ccgggcttt cgaactgcag cctgttgaca attaatcctc	8460
	ggcatagtat atcggcatag tataatacga caaggtgagg aactaaacca tgggatcggc	8520

	cattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg	8580
	ctatgactgg gcacaacaga caatcggetg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc	8640
	gcaggggcegc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca	8700
	ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc caecaggggc gttccttggc cagctgtgct	8760
	cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggccgaagtgc cggggcagga	8820
	tctcctgtca tctcaccctg ctctgcccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg	8880
	gcggctgcat acgcttgatc cgctacctg cccattcagc caccaagcga aacatcgcat	8940
	cgagcgagca cgtactcggg tggaaaccgg tcttgtcgat caggatgate tggacgaaga	9000
	gcatcagggg ctccgcccag ccgaactgtt cggcaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg	9060
	cgaggatctc gtcgtgaccc atggcgatgc ctgcttgcgg aatatcatgg tggaaaatgg	9120
	ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg geggaccct atcaggacat	9180
	agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttctc	9240
	cgtgctttac ggtatcgcgg ctcccattc gcagcgcac gccttctate gccttcttga	9300
	cgagttcttc tgaggggatc ggcaataaaa agacagaata aaacgcacgg gtgttgggtc	9360
	gtttgttcgg atcagtactg aagttctat tctctagaaa gtataggaac ttcgtggaga	9420
	cagagaagac tcttgggttt ctgataggca ctgaaggcgg aattccagca cactggcggc	9480
	cgttactagt ggatccgcca acacgcccga cctctgtggtc accctgtcgg ggtgatcgg	9540
	ggagagaggg gatgtagttc caggaagagg ggacgacagg cgcaaaggga ggtgggaata	9600
	aacacacctg gagaacgatt aggctggga ggtttccaga gccgggccag gacggggctc	9660
[0016]	aatgccagg ctggggagtt ggcactttat cctgagggtg atggggaagg gttttgcctc	9720
	ggcgagggga ctggacagaa tgtgccagaa agatccctcc agccactcag aggggaagtg	9780
	gagggatcgg ctgcccctc caecgactgt gggactttgg ggaagtact tcccttttgg	9840
	gtctccatct ccaaacttc tgcaaacgag gtgaagatgg cccattcca taaggetggc	9900
	ccatgcattc tgactcatgc atttaatgag cgtgatggt gtgcgccct ccagaagccc	9960
	cactcttca tgetgctgtt agtcacttta ttattattat tattatattt ttgagatgga	10020
	gtttctctgt cggccagget ggagtgcagt ggcgcgatct cggctcactg caacctccgc	10080
	ctctaggtt caagcgattc tctgctca gcctctgag tagagtagat gagactacag	10140
	gcacctgcca ccacgctgg ctaatttttg tatttttagt agaggcgggg ttccaccatg	10200
	ttggccagtc tgetctttaa ctcttgatct caagtgate acccacttg gcttccaaa	10260
	gtgetgggat tataggcgtg agccaccata cccggcctgt tagtcactt attccacaa	10320
	catttataga gcacttactg tagctcagge actttctagg tactaaggcc acagccagga	10380
	gcaacacaga ttaaaaacc ctcttctag taaggagac tgactagggg ttgcatggaa	10440
	accagttggc caagggagge atcactgtca ctgaagtga atctaagcca caagttacag	10500
	gaggtgaggg agggagccat gtgggtatct gggggaagag cattaaaggg tgtggccctg	10560
	aggcgggact gtgcctggtg tgatagagga acaaggagga gacctgtgtg gctggagcag	10620
	agtgaggcag ggagagggag gagaagaggg cagggagggg gcaaggagg tagtgcaggg	10680
	cttgggtggc cgtgggaagg gctagggctt tgacaaggca ggtgggagge atggaaggtt	10740
	gtaggaagag gaggggcatg aggacaagct gccttttcca atccatttct ctccctcagg	10800
	caagacaggg acagctcagt ctgtggctcg tgcgtggcct tgccacttgg gggactgtt	10860
	ttgaccctc cgtctctct ctccccccac agatcttcca cccccggag gagctggagc	10920

	ggaaggtgtg ggaactggeg aggotgtgtt ggcagtcctc cagtgtggtg ttccacacgg	10980
	gtgccggcat cagcactgcc tctggcatcc ccgacttcag gtctgtgatt gtgcagggga	11040
	agtcgaggca aggctacca ggctgccaga ggettcctg cgagccacac acatctggga	11100
	atgagaacac atecatctgc tttctcctg gatgtgtcct gggtactccc tttaatgtgt	11160
	gtcccttggc tggcatggt ggatcacaag gtcaagaatt ccagaccage ctggccaata	11220
	tggatgaatc ctgtctctac taaaaataca aaaattagec agttgtggtg gcacacatct	11280
	gtagteccag ctactcggga ggctgaggca ggagaattgc ttgaacctgg gaggtggagg	11340
	cagtgagccg agattgcacc actgcactcc agcctgggcg acagagttag gctccgtcta	11400
	aaaaaaaaac aaaaagatgt gtcccttgtc acaaccagca ticcactcac ctctttggcc	11460
	agaacacggg cactgatea cactggctg caagggttgc tgggaaatgt agtcttctat	11520
	atttgaagc gtagccaggt gtggtggcag gcacctgtaa tcgacgtac ttggaagcc	11580
	gaggtgggag aatcgcttga acccgggagg cagaggttgc agtcagccag gatcatgcca	11640
	ttgtactcca gcctgggcaa cagagccaga ctccatctca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	11700
	aaaaaaaaagc caaggcgtga atttctctc cttctctct tccataacct gctgtggtct	11760
	cccattgcca ggcagtgtag agttctgaat accttgtgt ggaagctgaa gcccttctg	11820
	ccccagccct gaatcacctc tccaacttca gcccctctg ctctgtctgc agccccaaa	11880
	acacttgeat tttctctaa actcatgggc tcttccagc acccagcct ttgtttacc	11940
	cttctgtctg atcttctctc tcacccttca agaaactgt tagctctctc caggaagccc	12000
	ttcacgtgc cccagggccc ccacctcac ggggettccc cagggccagg taacctctct	12060
[0017]	gatccaggct tgactcttgg ggccagagga tctgtgtcca cctgtctccc ccaagatcaa	12120
	gggtctctgg agggcagggc ttgggccat gtgagcatcg tgggctcat tgcagcaga	12180
	gtgttgggtg aatagaataa gtcattttg ccttctgtg aattcatctc tctctctctg	12240
	ctctccctc tctctgtctc tctcaattc tctctctgac ttgtttgtc tttactctt	12300
	tatctctctg tctgtgtctt gttctatccc cctctccctg ttcttgcaac tcacctctc	12360
	ttctgtttc tgattccctc tctctgtctc cctgtctctc tctgtctctc gattttctct	12420
	ctctccaact ttctctctat acctctctga ttctccctc gtctcttttt ctgttccct	12480
	ctccccgtcc atctctccc gcctgccacc ttcaggggtc cccacggagt ctggaccatg	12540
	gaggagcgag gtctggcccc caagtgcac accaccttg agagcgcgcg gcccacgcag	12600
	accacatgg cgttggtgca gctggagcgc gtgggcctcc tccgttctc ggtcagccag	12660
	aacgtggacg ggtccatgt ggcctcagc ttcaccaggt aacacctgg ccccgcctcc	12720
	acaaaagagc ttggggcccc acaaaccgtg tttgcatitt tagggggaga gtcccccttt	12780
	cctggttcta taagattcta gccctgagtt cttggcccag tctgtggaga tctctgagtc	12840
	ccatggttca gagctgtccc ggtgagggc agaggcagaa ttccctcga gatggggcta	12900
	aggggaggag agctgtcagg gctctagaagt tgcagtttgt tttttgttgt tgttgttgtt	12960
	ttgagaccg agtttcttcc ttgttgcctc ggttgagtg caatggcgtg atctccctc	13020
	agctccctc gttcaagega tctctctgcc tcagcctccc tagtaactgg gattacagge	13080
	atgcgccate acaccagct aattttgtat ttttagtaga gacggggttt ctccatgtt	13140
	gccaggctgg tcttgaacte ctgacctcag gtgatctgcc cgcctcagcc tcccaaagt	13200
	ctgggttac aggtgtgagc caccacgctt ggctgttgt gtttttaata tccatcttta	13260
	ttaactctgac actaaacgtg tctgacctg aagtgaacct gtctctggg gcaggctgat	13320

[0018]

ttcccaataa	aagtgtggce	etccccctgcc	cctctttgcc	aggtctcacc	cctggggcaa	13380
ccaatgacag	ccaggtcagt	tgttgagacg	aggagctcgg	cagccagggg	tgaggggtga	13440
ggaagagatt	tttctctgct	tataaaagca	aacgaggggc	cgggcatggt	ggetcacatc	13500
tgtaatccca	gcactttggg	aggccgaggc	aggcggatca	cgaggtcaag	agttcgagac	13560
cagectggce	aacatgttga	aacccccatct	ctactaagag	tacaaaaatt	agetgggcgt	13620
ggtggcgcac	gcctgtaate	ccagctactc	gggaggctga	gtcaggagaa	tcgcttgaac	13680
ccgggaggca	gaggttgacg	tgagccgaga	tgccgccact	gcactccage	ttgggtgaca	13740
gagcaagact	ctgtcttgaa	aaaaaaaaaa	gcaaaggagg	gtcaggtgtg	gtgacttatg	13800
cctggaatct	cagcactttg	ggaggccaag	gcgggcggat	catgaggtca	ggagatcgag	13860
accatccccg	ccacatggta	aaaccccgtc	tctactaaaa	acagaaaaat	taggctgggt	13920
acagtggcte	acgcctgtaa	tcceggcact	ttgggaggcc	gaggcgggtg	gatcacaagc	13980
tcaggagate	gagaccatcc	tggctaacac	ggtgaaacce	tgtctctact	aaaaatacaa	14040
aaaattagcc	eggcgtggtg	gccggcgcct	gtagtcccag	ctactcagga	ggetgaggca	14100
ggagaatcac	ttgaaccccc	gaggcagagg	ttgtggtgag	ctgagattgt	gccattgagg	14160
ttgtggtgag	ctgagattgc	accattgcac	tccaacctgg	gcaacaagag	caaaaactctg	14220
tctcaaaata	aataaataaa	taaaataaag	ctgggattgg	atctcatgct	tcagggccat	14280
tcaatgtctc	ggtttcttcc	attataaaact	gggaatttga	attcctgtgc	ttctgacctg	14340
gtgacatcaa	gaggttccca	tatgctctcg	gagggggacg	ggcattttgt	gagtggaaag	14400
ggetteccgt	tatctaaggt	gggttcagcc	ttgggggtta	atgattcctt	ggctcagag	14460
aggtttggcc	acttggcccag	agatgcacag	cagatgaatg	gtggagccag	gagctagaag	14520
agccagaaaag	aaggagttga	tcaatgttgt	gggagaggag	tccgggaage	cttctggag	14580
gagaggggct	tagcaccage	tccaaagcct	gggcatccag	ggatcctttc	ccaccatcaa	14640
gcctcttctc	getcttccca	cagggacaaa	ctggcagagc	tccacgggaa	catgtttgtg	14700
gaagaatgtg	ccaagtgtaa	gacgtgagtg	cc			14732

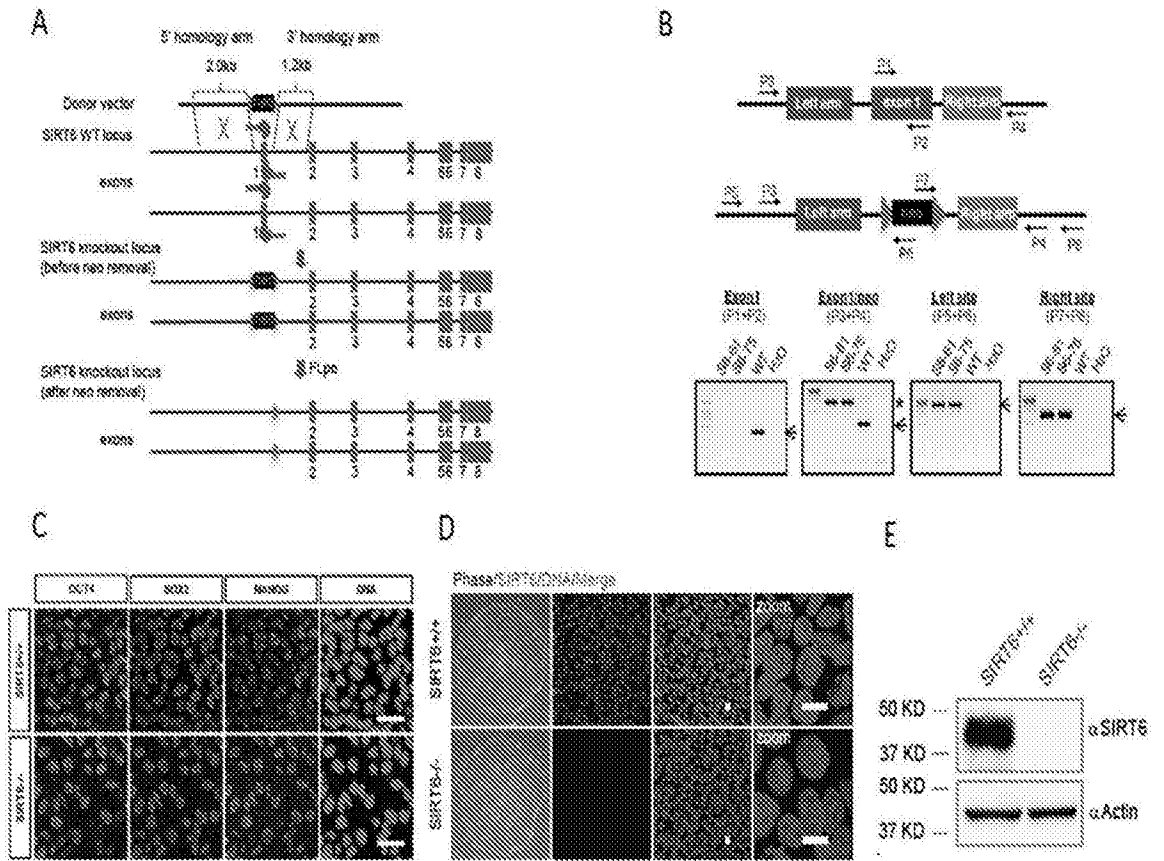


图1

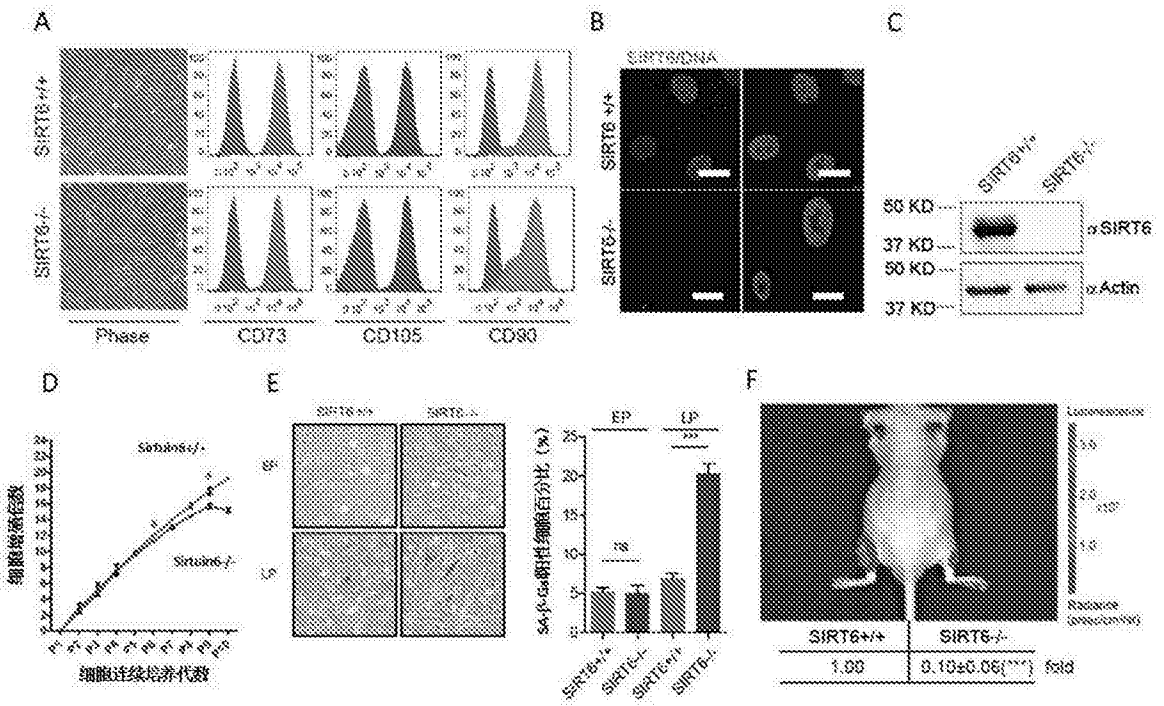


图2

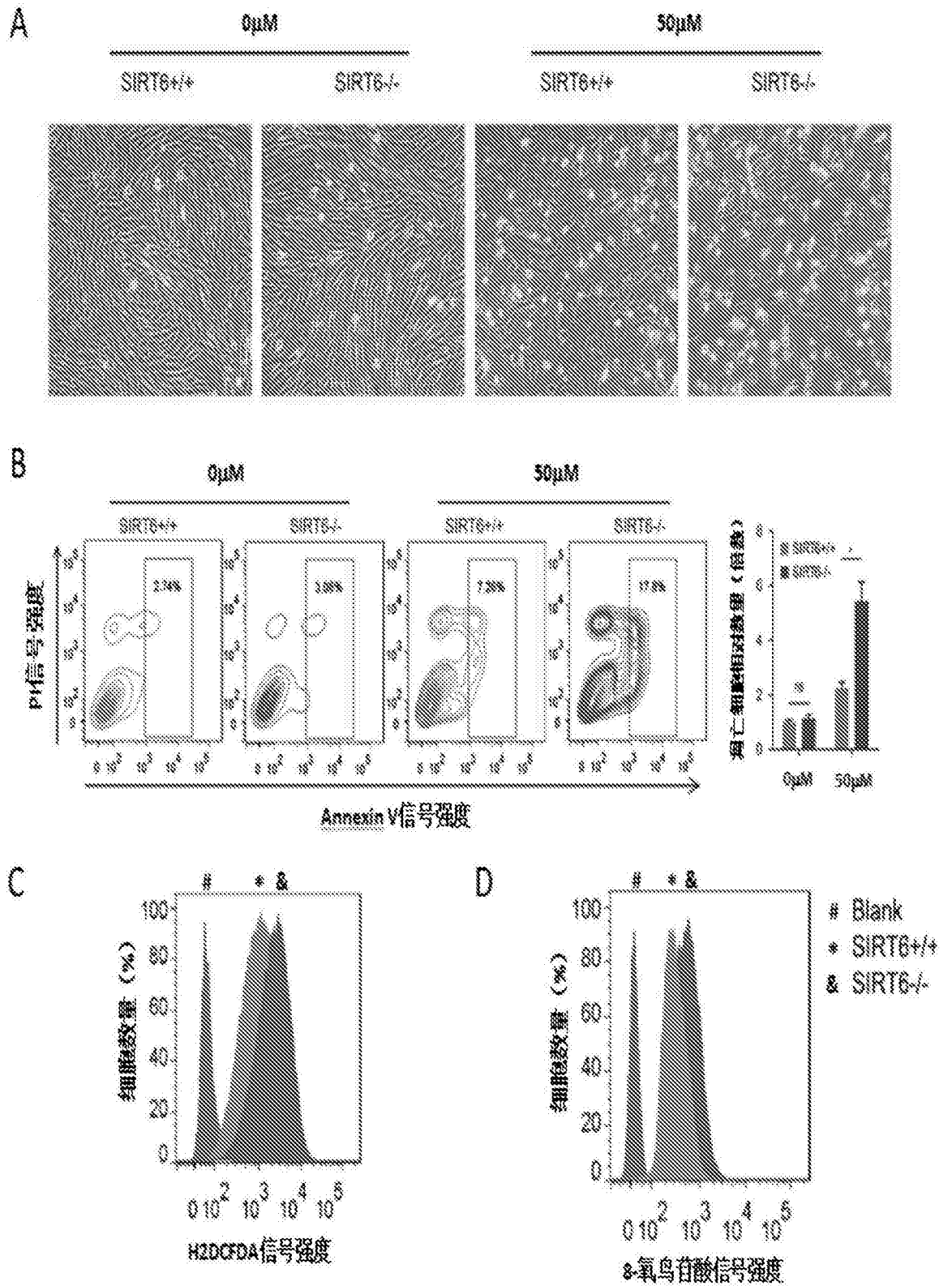


图3