

(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 103609526 A

(43) 申请公布日 2014.03.05

(21) 申请号 201310485227.5

(22) 申请日 2013.10.16

(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 高岩岩

(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.

*A01K 67/027* (2006.01)

*C12Q 1/68* (2006.01)

*C12N 15/85* (2006.01)

*A61D 19/04* (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页  
序列表27页 附图9页

(54) 发明名称

线粒体蛋白质翻译因子 Guf1 在雄性不育研究中的应用

(57) 摘要

本发明提供敲除 Guf1 基因的模式生物小鼠在研究雄性不育机理中的用途,更具体地,本发明提供针对 Guf1 基因敲除的小鼠模型在研究人类雄性生殖、精子发生过程和雄性不育机理和治疗中的用途,将有可能成为诊断雄性不育的一种诊断方法。

1. 一种获得雄性不育哺乳动物的方法,所述方法包括培育 Guf1 基因被敲除的所述哺乳动物的雄性。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述哺乳动物是人或小鼠。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述哺乳动物是小鼠,所述 Guf1 基因的序列如 SEQ ID NO :1 所示。
4. 一种致使雄性哺乳动物不育的方法,所述方法包括使所述雄性哺乳动物的 Guf1 基因表达异常。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中所述哺乳动物是小鼠,所述 Guf1 基因的序列如 SEQ ID NO :1 所示。
6. Guf1 基因作为致使雄性哺乳动物不育的靶点的用途。
7. 根据权利要求 6 所述的用途,其中所述哺乳动物是小鼠,所述 Guf1 基因的序列如 SEQ ID NO :1 所示。
8. 用于检测哺乳动物的 Guf1 基因表达异常的试剂在制备用于检测所述哺乳动物的雄性不育的诊断剂中的用途。
9. 一种用于诊断雄性哺乳动物不育的试剂盒,所述试剂盒包含用于检测所述哺乳动物的 Guf1 基因异常的试剂。

## 线粒体蛋白质翻译因子 Guf1 在雄性不育研究中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及线粒体蛋白质翻译因子 Guf1 在雄性生殖研究中的应用。具体地,本发明提供敲除 Guf1 基因的模式生物小鼠在研究雄性不育过程中的用途,更具体地,本发明提供针对 Guf1 基因敲除的小鼠模型在研究人类雄性生殖、精子发生过程和雄性不育机理和治疗中的用途。

### 背景技术

[0002] 目前,全球约有 15% 已婚夫妇受到不孕不育的困扰,而在男性不育中弱精子症占 19%,已成为影响男性生育力的常见病因。精子运动所需能量主要来自线粒体呼吸链的氧化磷酸化。如果氧化磷酸化功能异常,酶活性或表达量改变及线粒体 DNA 的变异等均可能导致线粒体能量合成障碍,降低精子活力。1955 年,Hoffman-Berling 最早证明 ATP 是精子尾部运动的能量来源,所以线粒体的结构和功能状态是评价精子质量的重要指标之一。近年来线粒体结构和功能异常与精子活力低下的相关性已引起关注。

[0003] 线粒体是细胞进行有氧氧化的主要细胞器,细胞的各项生命活动几乎都是由线粒体氧化磷酸化提供能量,而精子的运动需要大量的能量供应,因此精子线粒体呼吸链的氧化磷酸化功能对维持精子正常活力具有至关重要的作用,若其功能异常可能直接影响能量的产生与传递,导致精子运动障碍。目前,国内外对线粒体呼吸功能和呼吸链能量代谢的研究主要集中在一些高耗氧、能量需求大的组织器官,如肝脏组织、脑组织、心肌组织等,这些高耗氧组织线粒体能量代谢障碍会引起膜电位下降,ATP 生成大大减少,影响组织器官的功能。而维持精子正常运动需要大量的能量供给,因此对精子线粒体呼吸功能和呼吸链能量代谢的研究就具有重要的意义。

[0004] LepA 作为原核细胞蛋白质翻译延伸因子可以与核糖体结合引发 tRNA 的反向转运,在体外能够增加蛋白质翻译的保真性。lepA 的真核细胞同源蛋白 Guf1 蛋白是非常保守的定位于线粒体基质的蛋白,有研究说明 Guf1 蛋白突变的酵母细胞在低温条件下线粒体蛋白质合成速率减慢,温度升高线粒体细胞色素 c 氧化酶活性降低,从而表明 Guf1 蛋白是线粒体蛋白质合成过程中重要的保真因子。因此 Guf1 蛋白在高等动物体内的功能研究尤其重要。

### 发明内容

[0005] 我们的研究发现 Guf1 蛋白对于小鼠精子生成有重要意义。Guf1 蛋白敲除导致小鼠精子发生过程出现障碍,精子数目显著减少,精子运动能力下降,进一步的研究发现这与睾丸的线粒体氧化磷酸化功能缺陷有关。Guf1 蛋白引起线粒体蛋白质翻译加速但是翻译产物保真性差导致其降解加速有可能是线粒体氧化磷酸化功能障碍的一个重要原因。

[0006] 我们首次发现在模式生物小鼠中 Guf1 蛋白对雄性生殖线粒体功能具有重要的调控作用。Guf1 蛋白编码基因的敲除可以使得小鼠生精障碍,严重影响小鼠的精子发生和成熟,为研究雄性生殖的机理和治疗提供了重要的靶点。

[0007] 更具体地,本发明提供以下各项:

[0008] 1. 一种获得雄性不育哺乳动物的方法,所述方法包括培育 Guf1 基因被敲除的所述哺乳动物的雄性。

[0009] 2. 根据 1 所述的方法,其中所述哺乳动物是人或小鼠。

[0010] 3. 根据 2 所述的方法,其中所述哺乳动物是小鼠,所述 Guf1 基因的序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0011] 4. 一种致使雄性哺乳动物不育的方法,所述方法包括使所述雄性哺乳动物的 Guf1 基因表达异常。

[0012] 5. 根据 4 所述的方法,其中所述哺乳动物是小鼠,所述 Guf1 基因的序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0013] 6. Guf1 基因作为致使雄性哺乳动物不育的靶点的用途。

[0014] 7. 根据 6 所述的用途,其中所述哺乳动物是小鼠,所述 Guf1 基因的序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0015] 8. 用于检测哺乳动物的 Guf1 基因表达异常的试剂在制备用于检测所述哺乳动物的雄性不育的诊断剂中的用途。

[0016] 9. 一种用于诊断雄性哺乳动物不育的试剂盒,所述试剂盒包含用于检测所述哺乳动物的 Guf1 基因异常的试剂。

#### 附图说明

[0017] 图 1:Guf1 基因敲除的策略及 PCR、蛋白免疫印迹检测;

[0018] 图 2:Guf1 敲除的引起的雄性不育病理学分析;

[0019] 图 3:Guf1 敲除增加精细胞凋亡,影响精子发生过程;

[0020] 图 4:Guf1 敲除小鼠的睾丸和精子线粒体的透射电镜观察;

[0021] 图 5:Guf1 蛋白对线粒体呼吸链复合物功能的影响;

[0022] 图 6:Guf1 敲除对线粒体呼吸链复合物亚基蛋白的影响;

[0023] 图 7:Guf1 敲除引起胞质翻译降低和 mTOR 信号通路降低;

[0024] 图 8:Guf1 蛋白敲除对线粒体拷贝,转录和翻译的影响。

[0025] 图 9:人精子的保存及其基因组 DNA 的提取。

#### 具体实施方式

[0026] 实施例 1、Guf1 基因敲除的策略及 PCR、蛋白免疫印迹检测。

[0027] 为了研究 Guf1 蛋白在高等生物中的功能及其突变会对机体产生哪些影响。我们选择小鼠这种模式生物,运用基因打靶技术将 Guf1 蛋白进行敲除,并运用 PCR 和蛋白免疫印迹的方法对敲除的效率进行评价。图 1 为 Guf1 蛋白敲除的策略以及 PCR 和蛋白免疫印迹检测敲除效率。图 1A 表明 Guf1 的敲除策略图 1B 代表 PCR 鉴定的 Guf1 基因敲除小鼠基因型。图 1B 代表 western blot 检测 Guf1 在小鼠组织中的敲除效率。结果表明 Guf1 蛋白量在睾丸中显著减少,进一步证明该蛋白在小鼠中被剔除掉。

[0028] 具体方法:

[0029] Guf1 基因敲除小鼠的获得:

[0030] Guf1 打靶载体的构建:从含有鼠 Guf1 基因 (Guf1 基因的核酸序列如 SEQ. ID. NO. 1 所示) 的 129BAC (bMQ-420K22) 克隆 (购自 Welcome Trust Sanger Institute) 中获得 Guf1 基因,如图 1A 所示。在该基因第二个至第八个外显子两侧加入 loxp 位点 (其序列为 GAATTCCTGCAGCCCAATTCCGATC),同时在外显子 8 和外显子 9 之间加入新霉素抗性基因 (neo 基因,序列如 SEQ ID NO. 2 所示) 进行下一步的筛选。打靶载体的序列如 SEQ ID NO. 3 所示。

[0031] 胚胎干细胞阶段:打靶载体构建完成后,中体打靶质粒(约需准备 100ug) 电转入同源的胚胎干细胞鼠 129 细胞 (购自南京生物医药研究院) 中,使打靶载体上的 Guf1 基因与胚胎干细胞基因组发生同源重组,即打靶载体上 Guf1 外显子 1 和外显子 8 与胚胎干细胞 Guf1 基因组上的相同序列进行交换,进而将 Guf1 的外显子 2 至外显子 8 敲除。通过 G418 和丙氧鸟苷正负筛选获得重组胚胎干细胞克隆,并进行 PCR 和 southern blot 鉴定。

[0032] 囊胚注射阶段:扩增正确中靶的 ES cell 克隆,显微注射到 C57BL/6 小鼠(南京生物医药研究院) 的囊胚中,并将此囊胚移植到代孕母鼠 C57BL/6 (南京生物医药研究院) 子宫内,产出 8 只雄性和 2 只雌性嵌合鼠。7 只雄性嵌合鼠与 C57BL6 小鼠杂交,生出 20 只杂合子小鼠 (Guf1<sup>flox/+</sup>)。杂合子小鼠 Guf1<sup>flox/+</sup> 雌雄合笼,产生后代,PCR 鉴定获得 Guf1<sup>flox/fox</sup> 小鼠,与 EIIa-cre 小鼠(军事医学科学院) 进行交配,获得 Guf1 敲除型和杂合小鼠。

[0033] 剪取和消化鼠尾:将 Guf1 基因杂合小鼠合笼,新生野生,杂合和敲除型小鼠出生至 18 天左右时,离乳,分笼,准备好灭菌的剪刀、镊子、EP 管,酒精棉球。从新生小鼠尾部末梢减去 0.5cm 左右的一段,放入 EP 管中。配制鼠尾消化液 (20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 0.4M 氯化钠, 1%SDS, 400 μg/ml 蛋白酶 K), 取 400 μl 加入到 EP 管中,55 度消化过夜。

[0034] 提取小鼠基因组:将小鼠消化液 11000rpm 离心 5 分钟,将上清倒入到一新的 EP 管中,加入 200 μl 饱和氯化钠,上下晃动 200 次,冰上放置 10 分钟,14000rpm 离心 10 分钟。将上清倒入至一新 EP 管中,加入 800 μl 无水乙醇,14000rpm 离心 5 分钟,弃上清,沉淀 DNA 室温晾干后,加入 50 μl 双蒸水。

[0035] PCR 鉴定:合成 PCR 鉴定引物 (上海生工合成),引物序列如下:

[0036] Loxpt F2 :5' TTTGTCCTAAATGCGTGGTG 3'

[0037] Loxpt R2 :5' CCCGCTCCCTAATAAAGATG 3'

[0038] Frtt R2 :5' CGATCCCTGTACTCAAGACC 3'

[0039] 反应体系如下:

[0040] 2x Taq mix :10 μl

[0041] Loxpt F2 :0.5 μl

[0042] Loxpt R2 (Frtt R2) :0.5 μl

[0043] 基因组 DNA:1.5 μl

[0044] RT-PCR 扩增条件:变性 -95 度,5 分钟;退火 -60 度,45 秒;延伸 -72 度,1 分钟;循环次数:30 次;最后延伸条件 -72 度,10 分钟。PCR 样品进行琼脂糖胶电泳 (胶浓度:1%)。

[0045] 蛋白免疫印迹:将交配合笼 PCR 鉴定获得的 6-8 周龄野生型和 Guf1 基因敲除小鼠断颈处死,取出心脏和睾丸组织,PBS 漂洗。加入 RIPA 裂解液 1ml,放入组织研磨器研磨,匀浆液冰上放置 30 分钟,12000rpm 离心 30 分钟,上清用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

[0046] 配制 15% SDS-PAGE 胶,将已经测好蛋白浓度的样品,加上一定体积的上样缓冲

液, 95 度加热 15 分钟, 取 50  $\mu$ g 蛋白加入到 15% SDS-PAGE 胶中, 100v 恒压, 跑 3 小时左右。

[0047] 将胶上的蛋白样品转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 小时, 然后加入 1:1000 稀释的抗 Guf1 抗体 (sigma), 孵育过夜。TBST 洗膜 5 次, 每次 5 分钟。加入 1:3000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔二抗 (Jackson ImmunoResearch), 孵育 1.5 小时。TBST (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.4, Tween-20 0.05%) 洗膜三次后加入超敏 ECL 化学发光试剂 (碧云天公司), 放入暗盒中曝光。

[0048] 实施例 2、Guf1 基因敲除引起的雄性不育病理学分析。

[0049] 为了进一步研究 Guf1 的缺失会引起那些功能障碍, 我们着重对 Guf1 基因敲除小鼠的生殖进行病理学研究, 包括后代数目, 精子运动能力, 以及睾丸的病理切片和透射电镜分析。图 2A 代表后代数目分析, 表明雄性敲除型小鼠和正常雌鼠合笼后, 有交配行为但不产生后代。图 2B 统计野生型和 Guf1 敲除小鼠的精子数目, 表明 Guf1 敲除小鼠精子数目显著减少。图 2C 是睾丸形态观察, 发现 Guf1 敲除小鼠的睾丸形态变小。图 2D 是共聚焦荧光显微镜观察精子形态, 发现敲除型精子线粒体鞘有缺失, 弯折现象, 线粒体异常。

[0050] 具体方法:

[0051] 雄性生殖能力分析: 分别取 6-8 周龄的 20 只野生型和 Guf1 敲除型小鼠, 每只小鼠与两只 6-7 周龄的 CD1 雌鼠合笼, 每天早晨验栓, 将有阴栓的小鼠取出单独饲养, 统计其后代数目, 结果发现与野生型小鼠交配的 40 只雌鼠, 都见栓, 只有两只没有后代, 其余生出 4-12 只幼鼠。而与敲除型小鼠交配的 40 只 CD1 雌鼠, 见栓但没有后代。

[0052] 精子数目统计: 取 6-8 周龄野生和敲除型小鼠 ( $n>3$ ), 断颈处死, 用剪刀取出附睾, 放入装有磷酸盐缓冲液 (PBS) 的平皿中, 用注射器将附睾扎碎, 血球计数板计数。

[0053] 共聚焦荧光显微镜观察精子形态: 取 6-8 周龄野生和敲除型小鼠 ( $n>3$ ), 断颈处死, 用剪刀取出附睾, 注射器将附睾扎碎, Hoechst 和 Mitotracker (invitrogen) 用 PBS 1:10000 稀释, 共聚焦荧光显微镜观察精子。

[0054] 实施例 3、Guf1 敲除增加精细胞凋亡, 影响精子发生过程。

[0055] 为了研究 Guf1 对于小鼠精子发生过程的影响, 我们对野生型和 Guf1 敲除雄鼠的生殖器官包括睾丸和附睾进行切片染色, 以及精子运动能力分析。图 3A、C 是敲除型附睾和睾丸的 H&E 染色, 该结果表明敲除型小鼠附睾中存在大量的未成熟精细胞。图 3B 是 TUNEL 检测睾丸和附睾中的凋亡现象, 表明 Guf1 敲除后会产生明显的凋亡现象。图 3D、E 是计算机辅助精子分析 (computer assisted sperm analyzer, CASA) 对精子运动能力的分析, 结果表明敲除小鼠精子运动能力明显降低。通过以上对 Guf1 敲除的病理学分析, 发现 Guf1 敲除会引起精子发生障碍, 导致雄性不育。

[0056] 具体方法:

[0057] 附睾和睾丸的 H&E 染色:

[0058] 石蜡切片: 取下野生型和 Guf1 基因敲除小鼠睾丸和附睾组织, 放入 4% 的过氟烷基化物 (Polyfluoroalkoxy, PFA) 中固定, 以防止细胞死后的自溶或细菌的分解, 从而保持细胞本来的形态结构。

[0059] 脱水透明: 用由低浓度到高浓度的乙醇作脱水剂, 逐渐脱去组织中的水分。然后放于透明剂二甲苯中透明。

[0060] 浸蜡包埋:将小盒中倒入已融化的石蜡,组织放于其中,冷却凝固。

[0061] 切片与贴片:将包埋好的蜡块放于切片机中,切成薄片,5-8  $\mu\text{m}$ ,薄片放到 42 度的热水中展片,贴到载玻片上,放于恒温箱中烘干。

[0062] 脱蜡染色:染色前,将烘干的石蜡切片放于二甲苯中脱去石蜡,再经由高浓度到低浓度乙醇,最后加入到蒸馏水。片子放于苏木精水溶液中染色几分钟,流水冲洗 1 小时后加入蒸馏水片刻,入 70% 和 90% 酒精中脱水各 10 分钟。加入伊红染色液染色 2-3 分钟。

[0063] 脱水透明:染色后切片经不同浓度的乙醇脱水,再经二甲苯使切片透明。

[0064] 封固:将透明好的切片滴上树胶,盖上盖玻片封固。

[0065] TUNEL 细胞凋亡检测:

[0066] 制作睾丸和附睾的石蜡切片,切片用二甲苯浸洗 2 次,每次 5 分钟。将透明好的片子放于梯度乙醇 (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) 各浸洗 1 次,每次 3 分钟。片子 PBS 洗涤 2 次。用蛋白酶 K 工作液处理组织 20 分钟。之后 PBS 洗涤 2 次。制备 TUNEL 反应混合液,50  $\mu\text{l}$  TdT+450  $\mu\text{l}$  荧光素标记的 dUTP 液混匀。片子干后加入 50  $\mu\text{l}$  TUNEL 反应混合液,在暗湿盒中 37 度反应 1 小时。PBS 漂洗 3 次。拍照。

[0067] 计算机辅助精子分析 (CASA) 评价精子各项运动参数:取 6-8 周龄野生型和敲除型小鼠各 4 只,将其附睾取出,精子置于 37 度水浴,计数池放分析仪恒温板上预温,精子标本液化后取混匀样本精液 1 滴滴在样品池中间,然后进行分析。采用中科计算机辅助精液分析软件 (中科院动物所),对精液主要参数即精子活动力、及精子平均曲线运动速度 (VCL)、平均直线运动速度 (VSL)、平均路径运动速度 (VAP)、平均鞭打频率 (BCF) 等进行分析。

[0068] 实施例 4、Guf1 敲除小鼠的睾丸和精子线粒体的透射电镜观察。

[0069] 以前研究表明, Guf1 是定位于线粒体的蛋白。为了研究 Guf1 蛋白对线粒体功能的影响,我们对 Guf1 敲除小鼠的生殖器官的线粒体结构和功能进行研究。图 4 为 Guf1 敲除对小鼠睾丸和精子线粒体形态的影响。图 4A、C 分别代表 Guf1 蛋白敲除的精原细胞和精母细胞透射电镜,结果表明 Guf1 敲除小鼠发育到精母细胞线粒体形态发生变化。图 4B、D 代表 Guf1 敲除小鼠的精子线粒体鞘,结果显示 Guf1 缺失会引起精子线粒体形态发生明显改变,体现在精子线粒体鞘线粒体摆列不整齐,内脊有缺损。

[0070] 具体方法:

[0071] 睾丸和附睾组织透射电镜:睾丸和附睾从野生和敲除型小鼠活体取下来,放入四氧化锇中固定 1-2 小时。固定完毕,用缓冲液漂洗 20 分钟后进行脱水。脱水梯度依次为:30% 丙酮,50% 丙酮,70% 丙酮,80% 丙酮,90% 丙酮,每级作用 30 分钟。纯丙酮作用 3 次,每次 30 分钟。样品进行渗透后做超薄切片,最后染色,先柠檬酸铅染色 10 分钟,去二氧化碳的双蒸水清洗 3 次,再用醋酸铀染色 30 分钟,双蒸水清洗 3 次。等超薄切片干燥后,即可上透射电子显微镜 Tecnai Spirit(120KV) 观察。

[0072] 实施例 5、Guf1 蛋白对线粒体呼吸链复合物功能的影响。

[0073] 为了进一步研究 Guf1 对于线粒体功能的影响,我们对线粒体氧化磷酸化系统进行研究,同时以正常组织心脏作为对照。图 3A 代表野生型和敲除型睾丸和附睾的 ATP 水平,结果显示在 Guf1 敲除的情况下睾丸和附睾 ATP 水平下降。图 3B 代表线粒体细胞色素 c 氧化酶的活性,结果表明 Guf1 敲除的睾丸和附睾中细胞色素 c 氧化酶的活性降低。图 3C 代表 Blue native PAGE 分析线粒体呼吸链各复合物,结果表明细胞色素 c 氧化酶的量在敲除

型睾丸和附睾中明显减少。图 3D 代表细胞色素 c 氧化酶的 BNG 染色,结果表明细胞色素 c 氧化酶的活性明显降低。图 3E 代表线粒复合物 I,复合物 II 和复合物 V 的活性染色,结果表明复合物 I、V、II 的活性没有明显变化。

[0074] 具体方法:

[0075] ATP 水平测定:取 6-8 周龄野生型和敲除型小鼠的睾丸、附睾,PBS 洗三次。睾丸去白膜,灭菌刀片将睾丸,附睾切碎,0.25% 的胰酶消化,每次 5 分钟,共 15 分钟。得到单细胞,细胞裂解后,13000rpm 离心 10 分钟,上清用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 5  $\mu$ l 样品加入 50  $\mu$ l ATP 检测 buffer,化学发光酶标仪 (Perkin Elmer, USA) 检测仪检测。

[0076] Blue Native PAGE:按照线粒体分离试剂盒 (Abcam) 分离小鼠心脏和睾丸线粒体,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 400  $\mu$ g 线粒体 12000rpm 离心 5 分钟,加入 40  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l 甘油和 6  $\mu$ l 考马斯亮蓝。取 20  $\mu$ 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 等, nature 2006)。

[0077] 复合物 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。

[0078] 复合物 II 活性:将 Blue-native PAGE 分离胶孵育在 50mM Tris-HCl, pH 7.4 缓冲液中 (0.2mM PMS (Methylphenaziniummethylsulfate, 吩嗪甲基硫酸盐),84mM 琥珀酸,50mM NBT),室温作用 1 小时。

[0079] 复合物 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 个单位 /ml 过氧化氢酶,0.1% 细胞色素 c),37 度作用 3-6 小时。

[0080] 复合物 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。

[0081] 实施例 6、Guf1 敲除对线粒体呼吸链复合物亚基蛋白的影响。

[0082] 以上研究表明 Guf1 敲除会引起小鼠睾丸和附睾的电子传递链细胞色素 c 氧化酶活性明显下降,所以我们对线粒体电子传递链各复合物亚基的量进行研究,同时以正常组织心脏作为对照。图 A 表示心脏和睾丸以及附睾中复合物 I-V 各亚蛋白的 western blot 结果,结果显示敲除型小鼠的睾丸和附睾中复合物 IV 中 Cox IV (核基因编码),Cox1、Cox2 (线粒体基因组编码) 的量显著减少。复合物 I 中 ND2 量降低,而 NDUFA9 量没有任何变化。复合物 III 中细胞色素 b (CYTB) 的量在敲除型睾丸中减少,而核编码的 Core2 量不变。复合物 II 中 70kd Fp 的量没有变化。复合物 V 中 ATP5A 量也没有变化。图 B 是 Blue native western blot 的结果进一步表明线粒体复合物 IV 的量减少。图 C 是 Blue-native 2D 结果说明复合物 IV 各亚蛋白的量比起其它复合物各亚蛋白量减少得更为显著。

[0083] 具体方法:

[0084] 蛋白免疫印迹 (western blot):取 6-8 周龄的野生型和 Guf1 敲除型小鼠断颈处死,取出小鼠心脏,睾丸和附睾组织,PBS 漂洗。加入 RIPA 裂解液 1ml,同时加入蛋白酶抑



制剂 cocktail (Roche), 放入组织研磨器中研磨, 匀浆液冰上放置 30 分钟, 12000rpm 离心 30 分钟, 上清用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

[0085] 配制 15% SDS-PAGE 胶, 将已经测好蛋白浓度的样品, 加上一定体积的蛋白上样缓冲液, 95 度加热 15 分钟, 取一定量蛋白加入到 15% SDS-PAGE 胶中, 100v 恒压, 电泳 3 小时左右。

[0086] 将胶上的蛋白样品转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 小时, 然后不同一抗 (Abcam) 按照说明书稀释, 孵育过夜。TBST (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.4, Tween-20.05%) 洗膜 5 次, 每次 5 分钟。二抗 1:3000 稀释, 孵育 1.5 小时。TBST 洗膜三次后加入超敏 ECL 化学发光试剂 (碧云天公司), 放入暗盒中曝光。

[0087] Blue-native 2D: 首先按照以上的实验方法进行 Blue native PAGE 电泳, 然后将胶置于固定液中固定 1 小时, 考马斯亮蓝染色 2 小时以上。将胶切下, 放于 1% 巯基乙醇 (痕量溴酚蓝) 放置 1 小时。配制 10% Tricine-SDS-PAGE, 将胶置于 Tricine-SDS-PAGE 的积层胶中, 恒流 20mA, 电泳完毕后考马斯亮蓝染色, 脱色。

[0088] 实施例 7、Guf1 敲除引起胞质翻译降低和 mTOR 信号通路降低。

[0089] 为了在真核细胞中研究 Guf1 基因的功能, 我们研究 Guf1 引起的信号通路变化和胞质翻译水平以此揭示 Guf1 在生物体内的意义。图 4A 为睾丸的磷酸化芯片结果, 结果显示 Guf1 主要与癌症相关, 同时 mTOR 信号通路相关蛋白表达降低。图 4B 为 western blot 验证 mTOR 信号通路相关蛋白的表达情况, 结果表明 mTOR 下游的底物 4E-BP 的 Thr37/46 磷酸化水平下降, 与芯片结果一致。图 4C 为胞质核糖体展示技术观察胞质翻译水平, 结果发现敲除型小鼠胞质翻译降低。

[0090] 具体方法:

[0091] 蛋白免疫印迹 (western blot): 取 6-8 周龄野生型和 Guf1 敲除型小鼠断颈处死, 取出小鼠心脏和睾丸组织, PBS 漂洗。加入 RIPA 裂解液 1ml, 加入蛋白酶抑制剂 cocktail (Roche) 和磷酸酶抑制剂 (Roche), 放入组织研磨器研磨, 匀浆液冰上放置 30 分钟, 12000rpm 离心 30 分钟, 上清用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。

[0092] 配制 15% SDS-PAGE 胶, 将已经测好蛋白浓度的样品, 加上一定体积的蛋白上样缓冲液, 95 度加热 15 分钟, 取一定量蛋白加入到 15% SDS-PAGE 胶中, 100v 恒压, 电泳 3 小时左右。

[0093] 将胶上的蛋白样品转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 小时, 然后不同一抗 (Cell signal technology) 按照说明书稀释, 孵育过夜。TBST (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH7.4, Tween-20.05%) 洗膜 5 次后, 二抗 (辣根过氧化物酶标记) 1:3000 稀释, 孵育 1.5 小时。TBST 洗膜 5 次后加入超敏 ECL 化学发光试剂 (碧云天公司), 放入暗盒中曝光。

[0094] 胞质核糖体展示技术:

[0095] 配制 TMK 裂解缓冲液:

[0096] 10mM Tris-Cl, pH 7.4 : 1ml 的 1M Tris-Cl

[0097] 10mM 氯化镁 : 0.5ml 的 1M 氯化镁

[0098] 100mM 氯化钾 : 10ml 的 1M 氯化钾

[0099] 1%(v/v) Triton X-100 : 1ml

- [0100] 0.5%(w/v) 脱氧胆酸钠 :0.5g
- [0101] 1U/ml RNA 酶抑制剂 :2.5  $\mu$  l 40U/ $\mu$  l
- [0102] 2mM DTT :200  $\mu$  l 的 1M DTT
- [0103] 放线菌酮 :0.1mg/ml
- [0104] 加入 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 100ml。
- [0105] 配制 10%-50% 蔗糖 :在 4 度用 DEPC 水配制。
- [0106] 10%(w/v) 蔗糖溶液的配制 (200ml) :
- [0107] 蔗糖 :20g
- [0108] 100mM 氯化钾 :20ml 的 1M 氯化钾
- [0109] 5mM 氯化镁 :1ml 的氯化镁
- [0110] 2mM DTT :400  $\mu$  l 的 1M DTT
- [0111] 20mM HEPES, pH 7.4 :4ml 的 1M HEPES
- [0112] 50%(w/v) 蔗糖溶液的配制 (200ml) :
- [0113] 蔗糖 :100g
- [0114] 100mM 氯化钾 :20ml 的 1M 氯化钾
- [0115] 5mM 氯化镁 :1ml of 氯化镁
- [0116] 2mM DTT :400  $\mu$  l 的 1M DTT
- [0117] 20mM HEPES, pH 7.4 :4ml 的 1M HEPES
- [0118] 在用之前加入 2  $\mu$  l (40U/ $\mu$  l) RNA 酶抑制剂和 50  $\mu$  l 放线菌酮 (100  $\mu$  g/ $\mu$  l) 于 50ml 蔗糖中。放于梯度混合仪配制梯度。
- [0119] 野生型和 Guf1 敲除型小鼠断颈处死, 立即取出心脏和睾丸放于液氮中速冻, 无 RNA 酶的研钵研磨成粉末, 倒入到 EP 管中, 加入 TMK 裂解液, 冰上裂解 5 分钟。13000g 离心 20 分钟。上清铺于 10%-50% 的蔗糖梯度中。26000rpm 离心 4 小时。核酸检测仪 A260 检测。
- [0120] 实施例 8、Guf1 蛋白敲除对线粒体拷贝, 转录和翻译的影响。
- [0121] 在酵母中的研究表明, Guf1 是重要的线粒体蛋白质翻译因子。为了进一步研究 Guf1 在真核细胞中对线粒体蛋白质合成的影响。我们做了如下研究, 图 A 是测定野生型和 Guf1 敲除型小鼠的心脏、睾丸以及附睾中线粒体 DNA 的拷贝数, 结果表明线粒体 DNA 的拷贝数有所增加。图 C, E 是表示线粒体各复合物蛋白的 mRNA 水平, 其中 C 是睾丸的结果, E 图是心脏结果, 结果表明线粒体各复合物蛋白的 mRNA 水平在野生型和敲除型心脏和睾丸中没有明显变化, Guf1 敲除不影响线粒体 DNA 的转录。图 B 是线粒体核糖体大亚基 L11 和核糖体小亚基 S18 的量变化, 结果显示敲除型睾丸中 L11 和 S18 的量稍有增加。图 D 是线粒体蛋白质体外翻译, 结果表明在 Guf1 敲除的睾丸中, 线粒体蛋白质体外翻译的量增加。
- [0122] 具体方法 :
- [0123] 线粒体 DNA 拷贝数的测定 :
- [0124] 提取野生型和 Guf1 敲除型小鼠的心脏和睾丸的 DNA, 合成线粒体 DNA (mtDNA) 编码的 *cox1* 基因引物和细胞核 DNA (nDNA) 编码的 *ndufv1* 基因的引物。以心脏和睾丸的基因组 DNA 为模板, qPCR 扩增 *cox1* 和 *ndufv* 基因。*cox1* 和 *ndufv* 的比值代表 mtDNA/nDNA。
- [0125] 线粒体各复合物蛋白 qPCR :Trizol 试剂提取野生型和 Guf1 敲除型小鼠心脏和睾丸的总 RNA, 以 2  $\mu$  g 总 RNA 为模板, 用莫洛尼小鼠白血病病毒逆转录酶 (Molony

murine leukemia virus reverse transcriptase, MoMuLV RT) 为模板,以多聚胸腺嘧啶 (oligo(dT)) 为引物合成 cDNA. 参照文献合成 16S rRNA, 12S rRNA, ND1, ND6, NDUFS3, NDUFS7, NDUFB6, NDUFA9 (NADH 脱氢酶亚基), Cox1, Cox2 (细胞色素氧化酶亚基), CytB (细胞色素还原酶亚基, 细胞色素 b), ATP6 (ATP 合成酶亚基), EF-Tu (延伸因子 TU) 引物。用 SYBR Green Master Mix (Takara, Japan) 试剂在 ABI StepOne plus 定量 PCR 仪进行 RT-PCR 反应。

[0126] 线粒体蛋白质体外翻译: 用线粒体分离试剂盒 (Abcam) 提取野生型和 Guf1 敲除型小鼠的心脏和睾丸线粒体, BCA 试剂盒测定线粒体蛋白浓度。100  $\mu$ g 线粒体 12000g 离心, 沉淀用反应缓冲液 37 度反应 1 小时。反应缓冲液成分如下: 25mM 蔗糖, 75mM 山梨醇, 1mM 氯化镁, 0.05mM EDTA, 10mM Tris-HCl, 10mM 磷酸氢二钾, 10mM 谷氨酸盐, 2.5mM 苹果酸, 1mM ADP, 1mg/ml 脱脂牛血清白蛋白, 100  $\mu$ g/ml 吐根素, 100  $\mu$ g/ml 放线菌酮, 0.2mM 氨基酸混合物, 1 个单位的 RNA 酶抑制剂。

[0127] 反应完成后, 样品 12000g 离心 5 分钟, 用冷缓冲液 (320mM 蔗糖; 1mM EDTA; 10mM Tris-HCl, pH7.4) 洗涤 3 次, 沉淀加入 1x 蛋白上样缓冲液 25  $\mu$ l, 95 度加热 10 分钟, 进行 15%-20% SDS-PAGE 电泳。制干胶, 压磷屏。

[0128] 实施例 9、人精子的保存及其基因组 DNA 的提取

[0129] 取 400 微升不育病人的精子 (天津市总医院) 提取基因组, 然后进行测序, 图 9A 表示提取的编号为 1、2、3 的病人基因组, 结果显示提取成功。将上述 DNA 进行测序, 图 9B 表示测序结果, 结果显示在生殖异常的人 guf1 基因的 5' 未翻译端有两个碱基 (TC) 的缺失。我们采用的这个实验方案可以成功的得到精子外显子 DNA 序列, 通过比对分析突变的位点, 因此可以成为一个制作试剂盒的基础。

[0130] 具体方法:

[0131] 取样: 室温水溶液化 (或 37°C 水浴液化)

[0132] 冻存:

[0133]

冻存缓冲液的制备	1 L
47.88 mM Tris (氨基丁三醇)	5.8 g
105.1 mM TES (三羟甲基甲胺基乙磺酸)	26.4 g
5.55 mM 果糖	0.999 g
160.68 mM 乳糖	57.6 g
16% 蛋黄	160 ml
8% 乙二醇	80 ml
6% 甘油	120 ml (甘油 50%)

[0134] 将液化的精子与冻存液按 1:1 混合逐滴慢慢加入, 边加入边混匀; 4°C 冷冻 30 分钟, 液氮 15 分钟冻存。

[0135] 精子 DNA 提取:

[0136] 1. 取 200  $\mu$ l 精子 + 200  $\mu$ l Buffer X2 于 1.5ml 离心管, 55°C 水浴至少 1 小时 (1.5 小时), 每隔 10 分钟颠倒混匀;

[0137]	<b>Buffer X2 :</b>	<b>20 mM Tris·Cl (pH 8.0)</b>
		20 mM EDTA
		200 mM NaCl
		80 mM DTT
		4% SDS
		250 µg/ml 蛋白酶 K

[0138] 2. 加入 400 µl 的 Buffer AL (QIAGEN DNA 提取试剂盒中成分) (可能会产生沉淀, 70°C 能溶解) 漩涡振荡 15 秒, 70°C 孵育 10 分钟, 简单离心, 将盖子上水滴离下来;

[0139] 3. 加入 400 µl 的乙醇 (95%–100%), 漩涡振荡混匀 15 秒, 简单离心盖子上水滴 (可能会产生沉淀, 沉淀对结果无影响);

[0140] 4. 将第 3 步混合物加入反应柱中, 8000rpm 离心 1 分钟, 换柱于一新的 2ml 收集管中 (若离不干净, 再次离心);

[0141] 5. 加入 500 µl AW1 (QIAGEN DNA 提取试剂盒中成分), 8000rpm 离心 1 分钟, 换柱于一新的收集管中;

[0142] 6. 加入 500 µl AW2 (QIAGEN DNA 提取试剂盒中成分), 14000rpm 离心 3 分钟;

[0143] 7. 换新收集管, 14000rpm 空柱离心 1 分钟;

[0144] 8. 换一新的 1.5ml 离心管, 加入 100 µl Buffer AE (QIAGEN DNA 提取试剂盒中成分) 或蒸馏水, 室温放置 1 分钟, 8000rpm, 离心 1 分钟 (此处 AE 应分多次加入, 确保柱子上 DNA 的洗脱充分)。

[0145] 表 1: 人 *guf1* 基因外显子测序的引物表

[0146]

引物标号	引物序列	测序外显子
1F	ACTGACAGTACACACACCACAG	第 1 个外显子
1R	AAGTTAGTGACTTGCCCAAGG	第 1 个外显子
2F	CTGATTGGCCCTAAAAATTG	第 2 到第 4 个外显子
2R	ACTAGTCAATTCAGAGAATGC	第 2 到第 4 个外显子
3F	TGACCCCAAAGACATAAGTTG	第 5 个外显子
3R	GTGAGTTTCAGTTGCACTTCTG	第 5 个外显子
4F	TATTGTAGAGGGGTCAGTTAGG	第 6 个外显子
4R	AGTGATAAAACCTTTGAGCCTC	第 6 个外显子
5F	TACCCAGATTTGAACTATTCC	第 7 到第 8 个外显子

5R	TCAACTGACGTTTCTATTGTCC	第 7 到第 8 个外显子
6F	TAAGACCTGGTGTGTTTCATTG	第 9 个外显子
6R	AACACATCCTAAATGATCTCCC	第 9 个外显子
7F	TTGGAGTGCAAATCTAGTTG	第 10 和 11 个外显子
7R_1	AATCCGCAACGTGAAACAG	第 10 个外显子
7R_2	GTTCTTCATCATTAGCCATAGG	第 11 个外显子
8F	CATGTAAGTGGAATCTGTTC	第 12 个外显子
8R	CTTTCCTTTGGGCTAACATATC	第 12 个外显子
9F	TTTGGTAGCAAGCCTAATGC	第 13 个外显子
9R	TGTTCCAAGTCATTCTAACC	第 13 个外显子
10F	GATGAAACATATCTCTTTGGG	第 14 个外显子
10R	GGTGAAGGGAAACATTTCTATG	第 14 个外显子
11F	TCCATTTGAACCTCCTTAAGAG	第 15 个外显子
11R	AAACTGGAGAGCACCATCATAAC	第 15 个外显子
12F	CAAGCCTTGACCATTTTTTC	第 16 个外显子
12R	CATGGTCAAGCTGAAATTTACC	第 16 个外显子
13F	CTCCATCCAGATTAAATCCTG	第 17 个外显子
13R	CATGGCTTCAAAATCTAAGCTC	第 17 个外显子

[0147]

[0148] 参考文献：

[0149] 1. Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M. L., Perez-Martos, A., and Enriquez, J. A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.

[0150] 2. Ashley, T., Gaeth, A. P., Creemers, L. B., Hack, A. M., and de Rooij, D. G. (2004). Correlation of meiotic events in testis sections and microspreads of mouse spermatocytes relative to the mid-pachytene checkpoint. *Chromosoma* 113, 126-136.

[0151] 3. Azia, A., Unger, R., and Horovitz, A. (2012). What distinguishes GroEL

- substrates from other *Escherichia coli* proteins? *The FEBS journal* 279,543–550.
- [0152] 4. Barrientos, A., Barros, M. H., Valnot, I., Rotig, A., Rustin, P., and Tzagoloff, A. (2002). Cytochrome oxidase in health and disease. *Gene* 286,53–63.
- [0153] 5. Bauerschmitt, H., Funes, S., and Herrmann, J. M. (2008). The membrane-bound GTPase Guf1 promotes mitochondrial protein synthesis under suboptimal conditions. *The Journal of biological chemistry* 283,17139–17146.
- [0154] 6. Bruno, C., Martinuzzi, A., Tang, Y., Andreu, A. L., Pallotti, F., Bonilla, E., Shanske, S., Fu, J., Sue, C. M., Angelini, C., et al. (1999). A stop-codon mutation in the human mtDNA cytochrome c oxidase I gene disrupts the functional structure of complex IV. *American journal of human genetics* 65,611–620.
- [0155] 7. Caldas, T., Laalami, S., and Richarme, G. (2000). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *The Journal of biological chemistry* 275,855–860.
- [0156] 8. Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *The EMBO journal* 21,1616–1627.
- [0157] 9. De Martino, C., Floridi, A., Marcante, M. L., Malorni, W., Scorza Barcellona, P., Bellocchi, M., and Silvestrini, B. (1979). Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. *Cell and tissue research* 196,1–22.
- [0158] 10. Enders, G. C., and May, J. J., 2nd (1994). Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Developmental biology* 163,331–340.
- [0159] 11. Folgero, T., Bertheussen, K., Lindal, S., Torbergsen, T., and Oian, P. (1993). Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Human reproduction* 8,1863–1868.
- [0160] 12. Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2006). Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process. *American journal of physiology Cell physiology* 291, C1129–1147.
- [0161] 13. Iadevaia, V., Huo, Y., Zhang, Z., Foster, L. J., and Proud, C. G. (2012). Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis. *Biochemical Society transactions* 40,168–172.
- [0162] 14. Kao, S., Chao, H. T., and Wei, Y. H. (1995). Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biology of reproduction* 52,729–736.
- [0163] 15. Koppen, M., and Langer, T. (2007). Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 42,221–242.
- [0164] 16. Lee, I., and Suzuki, C. K. (2008). Functional mechanics of the

ATP-dependent Lon protease—lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochimica et biophysica acta* 1784,727–735.

[0165] 17. Li, Y. C. , Hu, X. Q. , Zhang, K. Y. , Guo, J. , Hu, Z. Y. , Tao, S. X. , Xiao, L. J. , Wang, Q. Z. , Han, C. S. , and Liu, Y. X. (2006). Afaf, a novel vesicle membrane protein, is related to acrosome formation in murine testis. *FEBS Lett* 580,4266–4273.

[0166] 18. Luce, K. , Weil, A. C. , and Osiewacz, H. D. (2010). Mitochondrial protein quality control systems in aging and disease. *Advances in experimental medicine and biology* 694,108–125.

[0167] 19. Meinhardt, A. , McFarlane, J. R. , Seitz, J. , and de Kretser, D. M. (2000). Activin maintains the condensed type of mitochondria in germ cells. *Molecular and cellular endocrinology* 168,111–117.

[0168] 20. Metodiev, M. D. , Lesko, N. , Park, C. B. , Camara, Y. , Shi, Y. , Wibom, R. , Hultenby, K. , Gustafsson, C. M. , and Larsson, N. G. (2009). Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Cell metabolism* 9,386–397.

[0169] 21. Mundy, A. J. , Ryder, T. A. , and Edmonds, D. K. (1995). Asthenozoospermia and the human sperm mid-piece. *Human reproduction* 10,116–119.

[0170] 22. Nakada, K. , Sato, A. , Yoshida, K. , Morita, T. , Tanaka, H. , Inoue, S. , Yonekawa, H. , and Hayashi, J. (2006). Mitochondria-related male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103,15148–15153.

[0171] 23. Pan, Y. , and Shadel, G. S. (2009). Extension of chronological life span by reduced TOR signaling requires down-regulation of Sch9p and involves increased mitochondrial OXPHOS complex density. *Aging* 1,131–145.

[0172] 24. Piomboni, P. , Focarelli, R. , Stendardi, A. , Ferramosca, A. , and Zara, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl* 35,109–124.

[0173] 25. Qin, Y. , Polacek, N. , Vesper, O. , Staub, E. , Einfeldt, E. , Wilson, D. N. , and Nierhaus, K. H. (2006). The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome. *Cell* 127,721–733.

[0174] 26. Rajender, S. , Rahul, P. , and Mahdi, A. A. (2010). Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion* 10,419–428.

[0175] 27. Ramalho-Santos, J. , Varum, S. , Amaral, S. , Mota, P. C. , Sousa, A. P. , and Amaral, A. (2009). Mitochondrial functionality in reproduction :from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 15,553–572.

[0176] 28. Reyes, J. G. , Farias, J. G. , Henriquez-Olavarrieta, S. , Madrid, E. , Parraga, M. , Zepeda, A. B. , and Moreno, R. D. (2012). The hypoxic testicle :physiology and pathophysiology. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012,929285.

[0177] 29. Ruiz-Pesini, E. , Diez, C. , Lapena, A. C. , Perez-Martos, A. , Montoya, J. ,

Alvarez, E., Arenas, J., and Lopez-Perez, M. J. (1998). Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical chemistry* 44, 1616–1620.

[0178] 30. Savel'ev, A. S., Novikova, L. A., Kovaleva, I. E., Luzikov, V. N., Neupert, W., and Langer, T. (1998). ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *The Journal of biological chemistry* 273, 20596–20602.

[0179] 31. Schieke, S. M., Phillips, D., McCoy, J. P., Jr., Aponte, A. M., Shen, R. F., Balaban, R. S., and Finkel, T. (2006). The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *The Journal of biological chemistry* 281, 27643–27652.

[0180] 32. Shoji, S., Janssen, B. D., Hayes, C. S., and 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.

[0181] 33. Smits, P., Smeitink, J., and van den Heuvel, L. (2010). Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 737385.

[0182] 34. Spiropoulos, J., Turnbull, D. M., and Chinnery, P. F. (2002). Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Molecular human reproduction* 8, 719–721.

[0183] 35. St John, J. C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., and Salah, R. (2010). Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update* 16, 488–509.

[0184] 36. Stiburek, L., and Zeman, J. (2010). Assembly factors and ATP-dependent proteases in cytochrome c oxidase biogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1797, 1149–1158.

[0185] 37. Suzuki, H., Ueda, T., Taguchi, H., and Takeuchi, N. (2007). Chaperone properties of mammalian mitochondrial translation elongation factor Tu. *The Journal of biological chemistry* 282, 4076–4084.

[0186] 38. Tatsuta, T. (2009). Protein quality control in mitochondria. *J Biochem* 146, 455–461.

[0187] 39. Thorrez, L., Van Deun, K., Tranchevent, L. C., Van Lommel, L., Engelen, K., Marchal, K., Moreau, Y., Van Mechelen, I., and Schuit, F. (2008). Using ribosomal protein genes as reference: a tale of caution. *PloS one* 3, e1854.

[0188] 40. Tiranti, V., Corona, P., Greco, M., Taanman, J. W., Carrara, F., Lamantea, E., Nijtmans, L., Uziel, G., and Zeviani, M. (2000). A novel frameshift mutation of the mtDNA COIII gene leads to impaired assembly of cytochrome c oxidase in a patient affected by Leigh-like syndrome. *Human molecular genetics* 9, 2733–2742.



- [0189] 41. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the h<sub>3</sub>-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272, 1136-1144.
- [0190] 42. Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.
- [0191] 43. Wang, X., and Proud, C. G. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* 21, 362-369.
- [0192] 44. Wilson, K. S., and Prochaska, L. J. (1990). Phospholipid vesicles containing bovine heart mitochondrial cytochrome c oxidase and subunit III-deficient enzyme: analysis of respiratory control and proton translocating activities. *Archives of biochemistry and biophysics* 282, 413-420.

[0001]

## 序列表

<110> 中国科学院生物物理研究所  
 <120> 线粒体蛋白质翻译因子 Guf1 在雄性不育研究中的应用  
 <130> IB130964  
 <160> 3  
 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
 <211> 16689  
 <212> DNA  
 <213> 小鼠

<400> 1  
 aggeggegeg ttigetge gteaggcctg ggtctcgggtg tcagctcagg ceggagegeg 60  
 acctggcgtt tgtggtctcc gtggcgggtt gggccctgag ccgcgcgcca ggcatgtggg 120  
 cgetegtggg ggggctctc gcgcctggg ccgcgggggc cggcaacggc gctgcctegg 180  
 agcccagggc cgcctgcagg ctcttcagcg eggcagagct caaggtgacc atcacccggg 240  
 gaaggtgcag gcttcagca catgcacggt gggecagcat cctcgctgc tcgcggcgc 300  
 ggctgtggct gccttcacc cgcacagaa gcgtgccgc tagctctctg gcttagggct 360  
 ggtgtagctc acgagcgggt gctatttcta aaaacctccg agaagctgct cctttgtage 420  
 atcgattcc ctgaagtttt agttatcgtt tcttgagtaa ctgcttgac ttgeatcca 480  
 tctgcagct tctttgctc gttgggatag ttatcaaatt tcaaagattg gaggatgcaa 540  
 aggcgtggag tattttagtc ccatgcaagg gacttgtggt tagaaaaatg gacttgtatt 600  
 cgtcacggtt cagggttttt gaaagtgcg cgggtttgcg aaagtcgtgc gggtttgcatt 660  
 cactttgtcc taaatgcgtg gtgggggact acaatgcagc ttttacattt tgtttgaata 720  
 attttccat acccttacct gccttacact aagtaagaaa tagaaagcta aaacaaatgt 780  
 tatagtcatt acagtttcat caactgaata tgcctagggc gcgcgcgcgc gcacacacac 840  
 acatacacac tcacacecca gactgttttg ctccagacacc catttccagg agtatgtggt 900  
 gigtctaaga gattttgctt gataaggcat tcttgactc ctgaggactt atatatggct 960  
 ttacactctcc atgaaagtaa atttgcattt agctcaatat gtgaggaagt attacttaag 1020  
 gattttatat ttagctttgt ttatggaact gatattttg tcaagtattt tgtaatttgt 1080

[0002]

tctttgtagt taggettagt catacatett fattagggag cggggagcett acaaaaactgc	1140
aatacgtgaa gttgccate gatggaaaga cttttctttg aattttgact ttgttttatg	1200
gaaaatttat acccittaact gtgataitcc etteccettet taggagaaaac etgacatgtc	1260
tagatttceet gttgaagaca ttagaaaattt cagtatcatt gcacatgtgg atcatggcaa	1320
aagcacttta gctgacagge tectggagct aacaggfatt ttatcttctc tgetcttggf	1380
tagttagett taecgeaata tcttaccttt aggeattcat cttaaatatt ttctgttaat	1440
tgtttttaat gcttttttgt tttaaagccc agagaaatta gtaaattgett ctatttctag	1500
gaacaattga taagacgaag aaaaacaagc aggttcttga taaattacaa gtagaacgag	1560
aaagaggaat caetgtgaag gcgcagacag cctctctgtt ttacagcttt ggagggaaac	1620
agtacctttt aaacctcate gacacaccag taagtticat ctgtctcttt caaagattgc	1680
ttgtaaccg tgttagtatt gcaatcaaaa ttctttcatt tagggctaaa ttttgcaaaa	1740
ctgctattga tttcttttta gttttgtttt tatgctagaa taatttgttt ccattgtttt	1800
cacaaaaate acattttatt attatttttt togtcatate agtagactag cagtcccttt	1860
taaataigta getgatactt aaaggtaacc atatttgcatt tttagggeca cgttgatttt	1920
agttatgaag tgtccaggtc actgtctgca tgccaagggt ttttactggg agtggatgca	1980
aatgaggtaa gagccctcgt tatatatgat aagacatgcc cacttggttg ttccataaag	2040
ttctgaaaat gcattttgga aatgcaaatt ttacattga ataacagatc tattgtatta	2100
cttactctaa atcaaaactt ttaatatgtt taaaatgaag tgctgactca ctctgcttag	2160
tttgactett tctttactag tggtaatggt ggttttgaac cetaaaactt aatgggtaca	2220
gaaacgtagg aagtggtagt attcagattt ctgtaactac atagtgaaat acccgtaaag	2280
gcaagtttct ttgctcaca gttttgaagg ttgtagtcca cgactcattg actcattgcc	2340
tttgccgtgc agcaaggcag cacaaatag tcttaagcc tgaagatggg getggggagc	2400
caaaactctc actgcccagg aagcacagtg agtagggcgg aggtctcaca gtctctgcca	2460
ggcaggtaca tgacatatgg tgcatttta ttagcatgat ccaaaatctc agtacgatga	2520
atatatatgg gatgtatgga attagtaagt ttgtggtaca ttagtgccaa accagtcacc	2580
ttgcgctctc ttatcttget gtttccaggg tattcaagct caaactgtgg ccaacttctt	2640

[0003]

cettgetttt	gaagcacage	tgteagtaat	tccagttate	aataaggtaa	tcaaocgaga	2700
caccaatggt	attacttatt	ttacettetg	tgtagtgttt	agttgtaaaa	tatagggttt	2760
ttctcttctt	ttttcttctc	tttctttttt	ttaaaatga	gggacctgta	gttactgttc	2820
attcagatta	tcagtaggat	ttctctctga	atatcatgcg	atagaattgc	aggccaata	2880
ttccttgcat	agagttgaaa	aagtttgtct	ggactgcattg	ggetgagaat	aggccatttc	2940
tggaggaaaa	gggtgcaagg	cagacaaaaga	gggtccagtc	atactgctct	ggagaagagg	3000
ggctgagage	taagaetcag	tgaagtcct	gaaacaggte	aaagtaactc	ttaacacaca	3060
taagctctgc	cagtagtgta	aagttaagat	cttagtttaa	aattcaaaact	acattaagtt	3120
gcatttcttg	atatactgc	cacatataaa	gtaaggctaa	atagcttgat	atctgacctt	3180
aattttaaaa	gtctgactca	tggecttagt	tggtatactc	tgttctgctt	acatatTTTT	3240
tgtctgtttt	gttgctcgta	tttctttttt	ttttgtactc	atgcttggtta	aaattatggt	3300
gataattgct	ttttggcett	ttggetaaga	tcaagtgtaa	tcatattgat	atatagatta	3360
tttfaaatat	ttttgaaaaa	agtcattgaag	ggtcagttag	gttaaatcac	agaagactat	3420
tgacctccaa	atattgttac	aatggactaa	tttcattttt	gctctgctca	ctaagtaatt	3480
ttgttcattg	atagatctga	agaatgctga	ccctgaaagg	gtgggaaagc	agattgaaaa	3540
agtatttgat	atccctagtg	aggagtgtat	taaggtaagt	tctttttctt	aaagtattgt	3600
cttagttggt	ctattgctct	gatgaaacac	catggctcaga	gcaacctggg	gaggaattgg	3660
tttatttgge	ttatacttcc	attaagccat	cactgaagga	agttagggca	ggaacctaga	3720
ggcaggagct	ggagtggagg	ccatgaaggt	gctgcatact	gggttggecc	taatggetca	3780
ttcagcctga	tttcttatag	agtcggggac	caccagecca	ggcctggcac	cacctccaat	3840
gggcagggtc	ctcaccctac	aaacactaat	taagaaaatg	ctatacaactc	atgtctgcag	3900
cctgatcttt	tggaggcatt	ttctcagctg	aggttaccat	ctcaaatgce	agcagaacta	3960
ttgattatct	tttgaaaaat	ctcaggagat	tgacctaaact	gaaatttcat	ggtgtttggt	4020
cccttgcact	cttaaacactt	ttttagtttt	cgagtgetta	ttattatttc	attagattca	4080
ggtgagaaaa	ctccccttat	attgtgagaa	tatacagaat	cattattaca	gaggecccag	4140

[0004]

gaaggaagag tgtagectta aatcacaatg etttggtttc tacacacttt cagatttcgt	4200
cgaaaacttgg gacaaacgtt gacagtgtgc ttcaggcagt cattgaacga atacctccgt	4260
aagcatttig ctattacact attcaiccat gtttaatagt agagttaa attttacaga	4320
catttaaaat gtactagttt agattaatag accaccaact tgatatgtca atttaaacta	4380
gtgaatatgg caagcagtct tgcagtaggt igggataaag ttttgcattt aataatataa	4440
aggagtcaag ttgaatataa gaagactgga aagggcaagg gtggcggtgc tgtccagtgg	4500
acatggtaig gggctgaagt acactggcat ttgtttgcgt cataatgagt atacatcttt	4560
taatttcaa atglaaaact gaiggctgaa tttatataag ttatagaag tttttgttt	4620
ggcttttgag taatttcttt tacaaaatta aacatacttc ttagattgaa aataggcatt	4680
ttcttataig tacttaattt ettttataat agtccaaaag tccatcgtga aaacctactg	4740
aaagctttgg tatttgactc caccttgac cagtacagag ggggtgatgc caatatagca	4800
ctgtttgatg gagtggtttc caagggagat aaaattgtat ctgcacatac taaaaaagca	4860
tatgaagtc atgaagtagg catttgaat cctaataaac agccaactca taaattgtaa	4920
gtaatttgtt taatatgigt aataaatttt cataigtctc tetcaatgtg ttcagaatga	4980
tcataatagg aaacctgatg atctatgaaa atatacatcc agataactaa aaggatcttg	5040
tatgtgaatg gtaggtagtt ttatgaatat aaaaatgatc aagttttatt aattagtaga	5100
aataacttag tgatctagta taggettggt cctgttaaat gtatttgaca gaacaataaa	5160
atactagtta gggctcctca actactatcc agtgaacttt tttcttttt acatttaatt	5220
tcatcacaac taaatttttg caatataagg tgttataagc tgttaaaaa ccattcttt	5280
cttcaactgt gaatttcagt tgaacctaga ttaattaaaa tttattttaa ttaatattta	5340
atttaaatat taaaaccata tctgagttag ttgtgaaacg gctgctgagt ggcctctgat	5400
gctgagaaga cctgaactca ggcaactgagt ttatgcttct caggttctct ctgaaagta	5460
aggtgtcagg tcttgagtac agggatcgat cacatagcag tgcctgctg tgcctagaga	5520
gccgcgtgtg agtcaccaca tgtttcagtt agtgcagtct tctaaattaa gtccctgtat	5580
tgtaatatat gcattgtatg atatacatgt ttatttaata tgtatagttt atgcatacac	5640
acacatatat cacagtacag gtattgaaca ttaattactg catcttcatt gaaggttctc	5700

[0005]

ctcgcaacct	acatgcaaat	gagtttgta	ctatgtaggt	ctctctcttt	tttttaatta	5760
agetaaaact	gaattattgg	aatctgeccc	tttcatgtga	aagtgatatg	cgtaatagac	5820
ttgttacata	tttctggttt	tctgtttggt	taaacaatta	tcttttcccc	ttgttaatga	5880
gcctatatca	cataataata	gacatgacag	tctcttgaat	ttttctccga	tggtaccggg	5940
tttacaggag	ctgggtgta	gtttgcagaa	gttgggcaca	gacaggttta	ggctctgtga	6000
gaaactgagc	ttagaggttg	acgattggca	tggggccctt	acttgtttga	gaagttatga	6060
gtttcctagg	gaggtagaac	tgtgagtggt	cacttaacaa	cagaaaagca	gtaaattatt	6120
gcatafacta	attttattta	gatatgcagg	acaggtgggc	tttctgattg	ctgggatgaa	6180
agatgtcact	gaagcacaaa	taggagacac	attatattta	cataatcctc	cagtggaaac	6240
cttgccctggg	tttaaatcag	cgaaaccaat	ggtgtttgca	ggtgaggagc	tcceaaattg	6300
aagacaaggg	gccaaaatat	ttttaattaa	aaatctgttt	ctgtggtgaa	agcaaaggta	6360
gtagaagata	atatgcattc	ttatagatat	gtttgtaaca	tatatatgta	tatgtatgta	6420
tgtatgtgta	tatatattat	caatatacat	atatatgaca	tttcattgct	tatatggtat	6480
gtctatata	tgagagacca	tttaggatte	cttaagaatg	aagtgattat	ataagagatg	6540
ttagtaatat	gaattttctt	atttttctga	gaagttaatt	gaatatattt	gaattttttt	6600
tctctagtta	ggatgittag	atgacagttc	tcagtagaat	taatgaattc	cctcctcttg	6660
gtcgttttct	ttagttacgc	ttgttctctc	tgaatgaagt	agaactgcat	gcagccttta	6720
ccaacatgta	acatgaggtc	ctgtattgct	ttgagcattg	cacatattta	tatagtgagg	6780
actgattgag	ggtctctcgc	ttactgtatc	ccaactaggt	tagctcgcct	cgctttctcc	6840
tcagtctctc	ctcagcagag	gtcaccgact	ttatgaetgc	tgtgcttcac	aageagtcac	6900
ttggagctca	ggagggttgt	aaagtataag	cittataagc	agaagagaaa	gacaatgggc	6960
gtaaccagca	gtagctccca	taggttggtt	tgttttgttt	tgttttttta	agatttcttt	7020
gttgttatgt	gtgagtacac	tatagctgtc	ttaggacaca	ccagaggagg	gcatgtccca	7080
ttacagatgg	ttgtgaggea	ccaggtgggt	gctgggaatt	gaactcagga	cctttggaag	7140
agcagttagt	gctcttgtec	accgagccat	ttctccagcc	cccgtccca	tagttttaag	7200

[0006]

cagfaagttt ctaaaagcca gattgacatt tactttagca attggtctgg aaactaagtc	7260
cagtgtcgtt ttcatttctg gtgetatttc ccactgacag ttttacttac agtagtggtat	7320
tagtttgtac ttttgtattt taaaataaat gtactttgce taattattag taaacttatt	7380
tectttgggt ctttacattt tttctttttt tttgtatttg tctgaaagca taaaatcaact	7440
gtttatagtg tgacaacaat tgtatateat taatgctaat agaactaag ataacctgce	7500
aaccaattac agaaaaatta tatgaatgcc acatggttaa ttttgaactt gaccatacta	7560
tctattatgt ttgtateccc aggagtgtao cctatagacc aatctgagta caataacctg	7620
aagagtgcia tagaaaaact gaccttaaat gactcaagtg taacagigca tctggatagt	7680
agtctggecc tgggtgctgg ctggaggtag gggacaactca tatcttagag tcaactttca	7740
taagaaaata ccttetaatt ggatgtgttg ctcataaaca tttctgaaaa tcagactaag	7800
ctttttaaat atttttggg gtagggatgg aaggttgaca caaggtctca ctatatagcc	7860
ctgctgtct tggaaactagc tgtgtaggtc aggtctgcct ccaactcaca gtgactttagc	7920
tgtttctaca aataccttt tgtacaaatg taggtatggg tgtgcacact atgtgtgcat	7980
gctcatagge ctgaggteaa tccgggtctc catttgagtt tttacgcagt gcctctcaact	8040
gactctggag gttgccctgg caccttctg tctctctccg cactgggaac gcagttgcat	8100
tctgcagcgt ctggcttttt catttaggtc ctggggatcc agaactgggg tcttatgct	8160
tccactgtga gcacaagacc cactcagcca tttacacagg ccctatagat ccatttctat	8220
gagtaagata aataagtctc gtataaataa gtctgcttat gtctcaigtg cattcatgtt	8280
tggtaggtag tttacaatac attcacagga gatttgggtc ttattttata aagttataca	8340
agaaatgcaa attgatggaa tgattcttga tatctcttt tcttacaag tagcaatgtg	8400
ttcacaactg ccagcagccc cacggaacat agatatttag aggagtittg ctgtttttt	8460
ttttttttt ttgtctctt gtctccaggt tgggtttct tggacttita cataatggagg	8520
tttcaacca gcgattagag caagaatata acgcttctgt cattttgaca accccaactg	8580
ttccatacaa agctgttctt tctctgcaa aattaataa ggtaactgct catcacttct	8640
atthtgtgc agcctgaaag ggaaaattta ataaagatgt gtacatgtat atactaaata	8700
caagagaaat gttttctttg tttgtaagta agtcaactatt aaggatgatt tatttttgag	8760

[0007]

taaaagttaa	taaaaatfff	tattacette	ttaaaactaa	ttcatgtfff	acgtfftetta	8820
getcaatete	tttattaaca	aaattactgg	tagtgatagt	aaaaagaatt	cgtaataaga	8880
aggocattat	aatttagcac	aggattfgaa	agataatgff	tgteatgaat	aattgaagff	8940
ataaaaagta	aaacattcat	tettatagga	aattfftaag	ttagtgatag	aagcagtact	9000
giatffcatt	taagtggcaa	ttaataatff	atfcatttaa	acactgctac	cttgagcata	9060
aataacctga	ttttatatta	ctaattatat	tgetgtaaaa	tgtagtattf	gtcatactff	9120
agatggffca	tggtatgfff	tataaatfff	agtaaaccce	aatactgtaa	ttcatttagt	9180
attatcatta	ctgacaaaa	taaaagatag	taattggaag	tetttgattg	ttgtfftetta	9240
aaagaaacgt	attaggfgac	agtetgatet	tcaggfgtet	tteetgffac	tactgetact	9300
ttgttatctg	cagtgaatgc	agtetgffet	aatgtacta	tetgtgaaaa	gcaagcetgt	9360
aagaaagaga	actgtgggag	tgfftgffct	taactactgt	tcctctccc	cgffffcagg	9420
aatataaaga	gaaggagatc	acaatcatca	acctgcaca	gtccctgag	aagtcccag	9480
taacagaata	tttggaaect	gttgtfffg	gcactgffat	tacacogact	gagtacaetg	9540
gaaaaataat	ggcgctffgt	caggtaggac	acaaagffgg	atfcagffct	ctggagcaac	9600
gcttatcage	ttcattfca	taggagffct	tetgctggga	agfffcctff	tactggctff	9660
aagfffgatt	gtcacfatta	getgaatagt	tagtcaaagg	aatgaaaaaa	attacatatt	9720
taaaaggatc	ttttattatg	atffagffta	ttfgtgtact	tgaaagtga	tataatffgg	9780
gggtggffgg	cacacacctf	taateccage	actffgggag	cagaggcagg	cggtatffctg	9840
agffctaggc	cagcctgatc	tacaaagtga	atfcaggac	agccagggct	atacagagaa	9900
acctfgfete	gaaaaaaaa	caaaaaccaa	aaaaaaaaaa	aagaaagtga	atataatgtg	9960
atfftaaaaa	tagagattac	aagctfftagt	ttaaaatgaa	tatagtgaaa	tacaaaatag	10020
tgffatffct	tececaaaac	tettgettat	agatctffgg	tagaccatta	aataatacte	10080
ttcagffctg	ttactfffat	ttffgtaatt	atactffgga	aatfaacacc	ttfaatffat	10140
tcacatcaat	atffgtffgga	ttatcatcaa	agfftatctet	ctfftaggcac	gaagagecaat	10200
tcagaaaaat	atgactffta	ttgatgaaaa	tagagfftatg	ctfaaatatc	tettccctff	10260

[0008]



gaatgaaatf gtggtagatt tttatgaactc ttggaagtct ctctctcttg gatatgcaag 10320  
 gtaaggaaat gatggtgate acgaacatct caaaggtttg aaaatgctga ttgtaatgac 10380  
 taalacttct gctcttttac taatttcagc tcttgaagac agttcagaat cataaggeta 10440  
 ggaagcttgg ggcattacag atattaaata gaacctgaca tccttctagg agaaaaagga 10500  
 cttacggttt ttcagactgt tactctctga aaaagaagca cctctcag taagaggeta 10560  
 tagccctgtg gcttaagagt tggaaatctc tggactaaa taacatttaa atatatata 10620  
 taattgatcc atggggcatg tacttttatt tgaaaaattg atataaataf tgagtatgaa 10680  
 gaatgetaaa tatgttctgc acttaacaat attgtagtca agaacaggtc ctcccagaaa 10740  
 tatgtctcc atccaataaa aatctgtgta tcttaaggga atccatgaaa cctagccaaa 10800  
 taaaaatag agttgagtgt taatggcaag aagcctttta tactgccttt gctacagtg 10860  
 gctttatgag ttaaacgttt gagtagcact gtttaacttgg accacctgg tgatagcagc 10920  
 taacatgagt gcttgtttgt ctttgatgaa gcttggetgt aactactcag cgtgtactag 10980  
 attcacatgt gctacatgcc tttcggctct gacaaaact agtgttcaaa ctgcagaggt 11040  
 gtgcaggaaa gccagtgcc ctctctctct gctgttctca gtgcactage tacatgggtt 11100  
 gtcactggca acagaaaact cacagcgacc ttfaaactag agctagtggg caccaccgog 11160  
 gctggcagtg tgagaaaggg gctcgtttgg ttttggatgat ggatttctct aatgcctctc 11220  
 agcccagcgg gttcogcttc ctctctctgg gacttagagt cctggactc agcgccttag 11280  
 catttggttc tttactgtgg gcataacat cctttatag aaactcgtg tgtggtcata 11340  
 atttatcaa gtttcttcat gggagagcgg ggaatggagg ttgtaaggaa aaaggagttt 11400  
 gctgagtgta atctgacagt atcaogcttg tccatgttct ctgtccttg ttagttttga 11460  
 ttatgaagat gccggttacc agactgcaga actcgtttaa atggatattc tctgtaattg 11520  
 aaatatggtg gaagagcttg taactgtggt ccataggtaa gccaaaggaag agatgaccag 11580  
 ctgtgaacac aggcgcttgg tgcctttctg tagtctagt cctcactta gtgcagcaga 11640  
 tacactttgt aaaacttcta aagcttggaa agataattaa aatggacttt agtctactca 11700  
 tcttctctct gctttacat cagaagaatt tgacttttat tgatgaaaaf agagttatgc 11760  
 ttaaatactc ctctcttttg gatgaaattt tggtagattt ttatgactct gaatcagctc 11820

[0009]

gtctcttgga tatgcaaggt gaggaaatta tgatcatcac aaacatctct attactaaat 11880  
 ataaaaataga gaattatagc caaaggaata gtctcaagga aatcatitct ctttactgtg 11940  
 ttgttgtttt ttttaattta tgattgaggt ttatactgag aaaagatttt catattcctg 12000  
 aaaaatcatt agtgataatg aaaaagtcaa gtatatgtgt tcacaacctg gcaaactgat 12060  
 atatactgta gccatggaat tntaggtcac aatatagata ttatactgta gccatggaat 12120  
 tntaggtcct aatatagact aatgcatagt tacaatgcc aattaagtac aaaatgttga 12180  
 gttctatttg aacctetiaa aattcacctt actgttaatt actgcaatgg acaatgaaga 12240  
 taatctaaat agttatattt aggatagctg tattttttct gtctcagaga gaaagcctac 12300  
 actgttggca aaagcattatg tgaacgcctg aaggagtctc ttccagaca actgtatgag 12360  
 atagcaattc aagctgctgt tggagcaaa gttattgcaa gagaaactg agttgaaatt 12420  
 cattttctgt ttgagctgg ctttagaac aatgtacca gataaacaac actaaacttt 12480  
 taattiaatca tggcatatgc tttattcat gtaaatcatg agatgataaa tgccttttta 12540  
 ctttgatta cttatattaa gtagatgatac ttacagttgt atcaactagg aaagtgtgag 12600  
 gaatttctgc tcatttcaa tgaatttcta ggtaaggaa tttctgtaag gttccattca 12660  
 gtggattata ttatgttcag atagattgtg atgagaacag aacctaaaag ttatgctaca 12720  
 ttgtttttac taaagiacta catcagaaaa gttataaat atcatgctag gctttgtttt 12780  
 ctaggttata tccctcatgt ggttatagt gggtatagaa aatagggaaa tttttgaaga 12840  
 aagctagcat tgttgaaaaat caggtcctg tagcagcaag tatagtctct ggtagcactt 12900  
 ccctgacca gccattagga gttatgacce tggatagtct gtctctcag ttatgacaaa 12960  
 tigggaattg ctacttagtt attgcttaac ctaagcetta tgcacccgta ctagttaaat 13020  
 accacatata tgtatatatg tatctatata caatatatat atgtatatat atatatatac 13080  
 ataaatataa aataaatatg tgtaataaat aatatattaa atgtatgctt attatgggaa 13140  
 taatttcate ttatacagta tcttgtttcc gttaccaggt gcccaagaaa atacataaat 13200  
 taagaagaac tccaaagaac atcctagaaa gtagaaaagt tagcaccatgg tcatttttac 13260  
 ataaattata ttggaagtag attaagaaaa acaaatagat ttttaaaaaa attattaaaa 13320

[0010]

gaatocetta aaaaagagat accttcaaaa gttaatgate aggaaatgcc aaaataatat 13380  
 agtagtataa ttgatggttg tatacattaa caggagttag tcttgagaat ggttttataa 13440  
 aatcetaaat tcagtagtag tcactaceta tttatggica ggtagaata tgaatgcta 13500  
 actttttaa atactgtatt caaagtattt ctaggttgaa ctggaacaa tgaatgtat 13560  
 ttttttaaat taaactcatg aatgateata tttctoceta tgcattcete aagcaatgac 13620  
 gttcttact aaaggatatg aggacattaa cattaattc ttgtgtgtcg tacaactaag 13680  
 tatatgaaa caaataacaa acattigaac tagttacata aggcaattg atctgaatga 13740  
 caetatcaet aaaatatctt atcaaaagta aatctttgta tagaaattat gottttaaac 13800  
 tgtatttctt cttttacaga gtgaaagcct acagaaaaaa tgttttgcca aatgtgtat 13860  
 gtatcttct acittactat atigaatgce tttaagacea aagggtcat aaattggtt 13920  
 ctagtttagt tttttttt ttttttgggt tttttgagac agggtttctc tgtatagecc 13980  
 tggetgtcet gggactcaet ttgtagtcca ggotggcete gaactcagaa atocacetge 14040  
 ctctgectce tgagtgetgg gattaaagge atgegcceace atgeceggct tetagtttag 14100  
 tttttattha ccatgcattt catctcggit tcattttaaa cgggcaaatt tetgtttaac 14160  
 catattagtc ttcattttta ctacaatgta tataacatgc ttttcatttt ctctcttota 14220  
 ataaaatacc atctaaaagg gatttttatg ttgtccataa tttatacat aataaaacag 14280  
 catatgtata gtgactgttt cttacagttg ggagagaaatg ggaattgaaa tctacctgce 14340  
 tacattgaat ttggaaaage ctatttgtgt ttgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 14400  
 gtgtatgaaa acaatcttth ttttetaage atctggtagt gtctctggcc aggtgtgcat 14460  
 ctgaaagtct gtattaggct gtegtatac agtatgtcta tcttaaatga aaaaaactga 14520  
 ttgttgagga gggatcaagt gagggcctac aggtcataat gatatgitta tggetgtggt 14580  
 gttttctcgg tgtaattatg tagtcatttc ctctgacceca atttgtattt cttatttite 14640  
 agtatggtgg tgatattacc cggaaaatga aacttctgaa gagacagtec gaagggaaaa 14700  
 agaagctgag gaagattgce aacattgaga ttcaaaaaga cgtttcata aaagtcctga 14760  
 aaaccacgce taataaatga ctcaaggcca gcagggttce tetgttctct ctcatttata 14820  
 gtgacagcag aatgaaaagt ctgagatgca tattacttce aggttcttca actatgacct 14880

[0011]

gcttcagtgg ttctcaacct tcccaatgat gccacccttt aatatagttc ctcattgtgt 14940  
ggtgacccca gacatagaat tatittttgt tgetacttca taacgtiaat tttgctaact 15000  
ttatggatca tgatgtaata tactaatgta aatgagtat gtotgatatg ogacctctgt 15060  
gaaagggttg ttggacccta gttgagaagt gctggcttgt tggtagagaa gaggttaaat 15120  
glatgctaca ttgcttgttc tctctcatgt tctacgactc actagtaatc tccacagaac 15180  
tccttaecta agactgagat tgtgttacta caccgcctca caggtaactt tggaaattaa 15240  
aggaggttaa tacattttca atattcatga ggggcaggca gagtatgta tacatttaac 15300  
cacagtgaat tttaaacttc ccttacactt ttigtttttt gtttttagtg tcttgagaca 15360  
gagtcttccc atgtagcatg gctagccag tgtcttcagt aggggttgac accagtgatt 15420  
gcagcgactc ttaggaagga aagcctttat ttctctgggg ctgcttatt gttttaaagg 15480  
gttatagtcc attattgtca gagtgagaag cattattgca ggtagacatg gtctggaga 15540  
agtggctggg agtttgaca ggcagcagca ggagactgc acaccaagcc tagcttgage 15600  
ataggagacc tcaaagcttg attctatagg gacacagtgc cattccccct gatagtacca 15660  
ttccctgtgg gccaaagcatt cacacatgag tctttgggga ccatttctgc tcaaaccacc 15720  
acatacctca agcttgtgac cacttttcca cctcagcctt ctcattgttg ggattttaca 15780  
gccatttget actgtcttca acttgggtgc ggctttctta cagatgctaa aaggagccct 15840  
aattgcactc agtagcaact ttctggaatc acctgtatt acagttttta gctcaaatgc 15900  
ttgatctgat atgacttget ttttaagata tagactcaat gtcttactag acatttgttg 15960  
ttttttatg cctatacatt gaatcaagca tttctgtatc ttgtttttta tgagtacatt 16020  
cctgcaaaat gccataattt gatattagca gcagctgtta ataaattaga agetattaac 16080  
taacatacc taaatgacac agctaataaa tggattagtt tcatgttcat aacaaactga 16140  
aaaatacatt actcaagaa aaagtcttga tactggattt tattttctgc cgtctgtctt 16200  
gagcatgaca taaatctggg aggaaaaaag gttacagatg agcttagca ttttgggtgg 16260  
attttaagt gaggatttat aagttaggta gccttagttt gtctattac ataaaccatc 16320  
tcacttctcc cagcttgatt tgctaggtat aaaataagtt cccactgcag tatcttttta 16380

[0012]

aaatggcaat atatTTgaaa ctaagacaat gcaatttita aaatgTtTgtt cttatattat 16440  
 TggtAaggga aagTtaaaaa actggtgtaa tctetaccgt gtagtgcttg agctaettta 16500  
 gatatggget attctTTaac ccataattct ttaggaattA acgTtTtagt aacaggagaa 16560  
 aacattTgct aggetgaatt tTgagTtata taactTgagc ttattccttc gggTtctaga 16620  
 atcacaattt gtatagtcgt atgacaaaaa aataattgcc acttaataaa tTtggTatgg 16680  
 gTtgcagT 16689

<210> 2  
 <211> 1760  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<400> 2  
 aggtctgaag aggagTttac gtccagccaa gctagctTgg ctgcaggTcg tcgaaattct 60  
 accgggtagg ggaggegett tteccaagge agtetggagc atgcgcttta gcagecccg 120  
 TgggcactTg gcctacaca agTggcctct ggcctcgcac acattccaca tccaccggtA 180  
 ggcgccaacc ggetccgTtc tTtggTggcc ccttegegcc accttctact cctcccctag 240  
 tcaggaagTt ccccccgcc ccgcagctcg cgtcgtgcag gacgtgacaa atggaagtag 300  
 cacgtctcac tagtctctg cagatggaca gcaccgctga gcaatggaag cgggtaggcc 360  
 tTtggggcag cggccaatag cagctTtTget ccttegetTt ctgggctcag aggetgggaa 420  
 ggggtgggTc cgggggcggg ctcaggggcg ggetcagggg cggggcgggc gccogaagTt 480  
 cctccggagg ccggcattc tgcaagcttc aaaagcgcac gtctgcgcg ctgttctct 540  
 cttctcactc tccgggectt tcgacctgca gcctgtTgac aattaatcat cggcatagta 600  
 tatcggcata gtataatacg acaaggtgag gaactaaacc atgggactcg ccattgaaca 660  
 agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc tTgggtggag aggetattcg gctatgactg 720  
 ggcacaacag acaatcgget gctctgatgc cgcctgtTtc cggctgtcag cgcaggggcg 780  
 cccgTtctt tTtgtcaaga ccgacctgTc cggTgcctcg aatgaactgc aggaacagge 840  
 agcgcggcta tegtggctgg ccacgaocgg cTtTctTgc gcagctgtgc tcgaogTtgt 900  
 cactgaagcg ggaagggact ggctctatt gggegaagTg cggggcagg atctctgtc 960

[0013]

atetcacett gctcctgccg agaaaagtatc cateatggct gatgcaatgc ggcggetgca	1020
tacgettgat ccggetacot gccatttcca ccaccaagcg aaacategca tcgagcgagc	1080
aegtaetogg atggaagcog gtcttgttga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg	1140
gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgaag gcgatgatct	1200
ogtcgtgacc catggcgatg cctgettgcg gaatatcatg gtggaaaatg gccgettttc	1260
tggatttcat gactgtggcc ggctgggtgt ggccgaccgc tateaggaca tagcgttggc	1320
taccctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct gaccgcttcc tcgtcttita	1380
cggtatcgcc getcccatt cgcagcgcat cgccttctat cgccttcttg acgagttctt	1440
ctgaggggat caattcteta gagetogctg atcagcctcg actgtgcctt ctagtgtcca	1500
gccatctgtt gtttgcacct cccccgtgcc ttcttggacc ctggaagggt ccaetccac	1560
tgtectttcc taataaaatg aggaaattgc atcgcaattgt ctgagtaggt gtcattctat	1620
tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca	1680
tgetggggat geggtgggct ctatggettc tgaggcggaa agaaccagct ggggetcgac	1740
tagagcttgc ggaacccttc	1760

<210> 3  
 <211> 21296  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<400> 3	
ctctcaagga tcttaccgt gttgagatec agttgatgt aaccattcg tgcacccaac	60
ttgatcttca gcatcttita cttaacacag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca	120
aatgcgcga aaaaaggga taaggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttct	180
tttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga	240
atgtatttag aaaaataaac aaatagggt tccgcgcaca ttccccgaa aagtccacc	300
tgacgcgcc tgtagcggcg cattaagcgc ggccgggtgt gtggttacgc gcagcgtgac	360
cgtacactt gccagcgccc tagcggccc tcctttcgct ttcttccctt cctttctcgc	420
caegtgcgc ggtttccccc gtcaagctct aaatcggggg ctccccttag ggttcgatt	480

[0014]

tagtgettia	eggcaectcg	accecaaaaa	acttgattag	ggtgatggtt	cacgtatigg	540
gccatcgecc	tgatagacgg	tttttcgccc	ttfgacgttg	gagtccacgt	tctttaatag	600
tggactctig	ttccaaactg	gaacaacact	caacctate	toggtctatt	ctttigatti	660
ataagggatt	ttgcogattt	oggectattg	gttaaaaaat	gagctgattt	aacaaaaatt	720
taacgcgaaf	tttaacaaaa	tattaacgct	tacaatttcc	attecatt	caggetgcgc	780
aactgttggg	aagggcgatc	ggtgcgggccc	tcttcgetat	tacgccagct	ggcgaaaggg	840
ggtatgtctg	caaggcgatt	aagttgggta	acgccagggt	tttcccagtc	acgacgttgt	900
aaaacgcagg	ccagtgaatt	gtaatacgac	tcactatagg	gcgaattgga	gtcccaccgc	960
ggtggcggcc	gccattacca	gacagtaaac	tgttttccaa	agcacaacaa	gaaactgatt	1020
actaccttaa	gccaaagttc	tttttctccc	ctttatttat	ttattcacct	tacattctga	1080
tcaccacccc	aaactcactt	tatgtaaaact	ccagagetta	atccctcttt	ggaacatact	1140
ttagttgaaf	aacctctgt	cactatigt	ggaagatata	ccactgtct	gtgtaaagtt	1200
tgtagtaaat	tcattgggtt	gagatcgagt	gcttccttct	ctggattccc	agttgacctc	1260
atctcagat	tgtttagcac	attctcata	gatatttct	ggcctctgat	ttgggacca	1320
caccaagaac	aagcatctat	taatattcat	tattaaatcg	cttattattt	tatgetcttt	1380
ctctctctct	gtgtgtgtgt	gtgtgtgcta	gggcacacat	ttagatgtag	tgaaggtatt	1440
atgatatect	catcattcta	ttcattactg	gtcacaacgt	tgaaatgtga	atgtacagta	1500
cctcagaatg	taactctatc	tgaagatgca	agggtctctgt	ctgtctgtct	ctgtctctgt	1560
ctctctctct	ctttctgtct	ctctctgtct	ctctgtctgt	ctctgtctct	gtctgtgtgt	1620
gtgtgagaga	gagagactgt	taatatittat	agtcaagttg	cttgggtttg	gaatgacctc	1680
gatagctcat	gectgtgcat	atttatgagg	atgtttacaa	aacaataatt	tgaatgagac	1740
tggaggatag	actctgaatc	cctgaaatgg	ggfcccagaa	taaaacaaaa	ggcataaaaa	1800
caggaagaca	gttgagtatc	aggatccatt	cttgatttgt	catggctctg	gacaaaatat	1860
gttcaattgt	atctctctcc	ctttttaatg	atttatttat	ttatgtgcat	taatgttttg	1920
ectgcattat	gccttgtgag	ggcgtaaaat	cacttgtage	tgaagtacag	acattgtgaa	1980
ctgccatag	gaagagcagc	cagtctctca	aactttgag	cacttaact	taaacttaag	2040

[0015]

ccattatctg gegtctctga tgtatccgtt aaagccacag tgataaaagt aactaataca	2100
agaatttggg aacaaaagat ggattgctct tgcataaac atgaccacat ggctttaag	2160
cttttagaac tggttttcta aaaggaanaa aaaaatttgg gcaaaacca gagaaggcct	2220
ggaatcagat cctaacagge cattctaagt aggggggtgga aagetagaat ttgacagaa	2280
agaaagacaa taaaggctgt gttcacaag ttccagaaca gtatagagac acttgtactt	2340
gaagctgaat ctaaagttaa tggattaage tggatggctg aagaaaattt aagatagcat	2400
aatgtccaac tgcacatgg taiccaagtt aggggttcta ttctatgat aaagaactat	2460
gagtaaaagc aagatgggga ggaatggatc tatttggta cacttctaca ctgtagttca	2520
tcattaagga agtgatggca ggaactccaa aagggcaggg acatggaggc aggaactgat	2580
acagtcgcca gggagaagtg ctgcttattg gtttgcctag cctgtttttt ttttttttt	2640
ttttttttt ttttttcta gaactgtaa cactagccc aggggtgcca ttaccagga	2700
tggtctgggc ctccccat caateactaa ttaagaaat tcctacagg atgettacag	2760
caagatetta tgggggeatt ttctcaactt aggatccttc ttcagatgcc acaaaactaac	2820
ttgtgtcaag tagacctaaa acgtccagc acaaacagtg ttacttactg tgetttagtt	2880
gattatgaga aactaaagat gtatggaaga tgtaacttgt tgaggaaagt ggtaagtaa	2940
gccattttat gttgagaaag taactgtgct tgtaagaga ttagtaacct gaaagtgaaa	3000
catcttactc tctaggagga caaaggaaca gcagcctgag ggcaacactc ttctcaacaa	3060
aatctccaaa ttgaaaatg aaagttcaaa gatacagtgg tggttogaat atgettggcc	3120
caaggggtg gtgctgttgg gagatgtggt ctactggag aaaaagtgtt aatgtggggg	3180
tgggctttga gacctcctt ctaactgctt gcaagacagt cttttgtttg cctttgggac	3240
aagaigtaga actctcagct cctccagcac tataccttc tggacactgc tattctttct	3300
ccatgatga taacagtctg acctctgac actgtaagct agaccactt aatatttgc	3360
tttataagtg ttttagcat ggtgtctctt catageaatg gaaacctaa ctaggatgga	3420
agagaactta aactatgaat tctcagaga ggggttctca tctggccatt agattttact	3480
attaacttga caagcctag tgcacctga gaagagagtc tcattggagt gataaggcag	3540

[0016]



gtcagattgg cctgtgggtg tgtctgagga gtttgtettg attgttaatt gatgtaggag	3600
ggctctggtc actgtgggca gcaccattcc ctgggtagat agtcagaggc tgtgggaagc	3660
agatgaagtc cttagtgaat atagatigtg aacatgaaca tgateacctc acaactgtca	3720
atgottcaga cccatggcaa tgccaaggtc ctacaaggat gtagacagtg tatgtaaaga	3780
agttatcaac tacagettct tectctgag tgactacaac ctagagtget gcacttcaga	3840
gacaccacaa tcaagattag etaacctgcc tectecttta gcctatgtaa gccttcttat	3900
tttccagget actagtgtgt catcagaaca cacagcccaa cccaatccta gcttttctgt	3960
acaigtgtct gttgtttctt caiteccacc tgecccagtc aagacaatcc caaagttgtg	4020
caggtcacag caagtogtac ctgaaccagg gtccttgact acaagaaagt tgaattggtt	4080
agttagacaa gggaacagtc ctgagagagg catgccaata aatgttaggg acaatcagag	4140
tctagagatg ggcagttata tgttagtatt ttgaaggagg tttttgagaa actgcagaag	4200
ttaaaaaatg ttacagccac ctcaatigtg tagaccatgt tcaggaaaca tgtcttgget	4260
ttctagaaga tgggatagtg aatttggcta tttagaaaaa ggtggtagaa aactaaggga	4320
tacgccttaa aggacagaga ggiateccatc ctgtgaactag aagataatgc tagacttaat	4380
atcctgacac acagatttaa acctatigaa tactattaag tctagticta agctgtgttg	4440
taacaatgtt ttatcaatgt acitgaaaaa tacttttcc tatgacittg ttgtttgtg	4500
tgttgtgtca ctacaaaaag ttcatgaaa aatagaatta tgggttatcc taacctggga	4560
aacatgggia tgtttgcctc cagaataaat tctcttacct attttaaggt gagaattget	4620
tttgtatgga caaagagaag ccagcatcct tctccttga tgcattttgt ttttattaat	4680
aaatctatac ttcatattgg ctaagcatga aataatttc ttcgtagaag ccatgaactg	4740
ttttttgttt tgttttgttt ttigttttcc ctgcaagtct cttaaaagaa ctccccagcc	4800
attgatggcc ccagagtaga gggacttcca actgtttccc catctgggtg agcacacaca	4860
ctttagagat tccacatctg aggctgctgc tgcacacaca tacacacaca cacacacaca	4920
cacacacaca cacacacaag ggcgtctcct gtccattgta ttcctggag tgagegcaga	4980
gagtgatgeg acaccgact ccgctgctct agactgtggt tttctcaagg ctgtcacacc	5040
aggacacgcg cttgaccggc agtatacccc ggggtcctg tagctctccc atccctgacc	5100

[0017]

titegacccc egcgtagacg egtegacgte ataageggeg cgacctgcag ggggcgegt	5160
tgettegegt caggceitggg tcteggtgte agctcaggce ggagegegac cctggcittg	5220
tggtctccgt ggcggttgg gcctgagcc gcgccegagg catgtggggc etcgtggggc	5280
ggctctctgc gcegtgggce gccggggccc ggcacgcggc tgccteggag cccagggcgc	5340
cttcagget cttcagcgeg gccgagctca aggtgaccat caccgggga aggtgcaggg	5400
cttcagcaca tgcacggtgg gcgagcatcc tcggctctc gccggcggc cgtgggctgc	5460
gcttcacccg catcagaagc gtgccegeta gctctcggc ttagggctgg tgtagctcac	5520
gagcgggtgc tattctaaa aacctcgag aagetctcc tttgtagcat cgatttccct	5580
gaagttttag ttatcgttcc ttgagtaact ggettgaact gcacccgatc ctgcagcttc	5640
tttctcgtc tgggatagtt atcaaatctc aaagattgga ggatgcaaag gcgtggagta	5700
ttttagtccc atgcaaggga cttgtgggta gaaaaatgga cttgtattcg tcaccgttca	5760
gggtttttga aagtcgagcg gggttgcgaa agtcgtcggc gtttgcata ctttgccta	5820
aatgcgtggt gggggaactac aatgcagett ttacattttg tttgaataat tttccatac	5880
ccttacctgc cttacactaa gtaagaaata gaaagctaaa acaaatgta tagtcatgac	5940
agtttcatca actgaatatg cctagggagc gcgcgcgcgc acacacacac atacacactc	6000
acaccccaga ctgttttgc cagacacca ttccaggag taigtggtgt gtctaagaga	6060
ttttgtcac aaaagtaact ttgaattcct gcagcccaat tccgatctag gtcctcgag	6120
gggatccact agttctagag cgcattcttg gactcctgag gaattatata tggettccac	6180
tctccatgaa agtaaattg caattagctc aatatgtgag gaagtattac ttaaggattt	6240
tatatttagc tttgttatg gaactgatat atttgtcaag tattttgtaa tttgttctt	6300
gtagttagc ttagtcatac atctttatta gggagcgggg agcttcaaaa actgcaatac	6360
gtgaagttgt ccatcgatgg aaagactttt ctttgaattt gtaacttggc ttatggaaaa	6420
tttataccct taactgtgat attccctcc cttcttagga gaaacctgac atgtctagat	6480
ttcctgttga agacattaga aatttcagta tcattgcaca tgiggatcat ggcaaaaagca	6540
ctttagctga caggctcctg gagctaacag gtattttatc ttctctctc ttggttagtt	6600

[0018]

agctttaccg caatatetta ccttttagcca ttcatttita atattttctg ttaattgttt	6660
ttaatgcttt tttgttttaa agceccagaga aattagtaaa tgettctatt tctaggaaca	6720
attgataaga cgaagaaaaa caagecaggtt ctigataaat tacaagtaga acgagaaaaga	6780
ggaatcactg tgaaggcgca gacagcctct ctgttttaca gctttggagg gaaacagtac	6840
cttttaaace tcatogacac accagtaagt ttcattctgt ctcttcaaag attgcttgtt	6900
aaccgfgtta gtattgeaat caaaattctt tcatttaggg ctaaattttg cacaactgtc	6960
attgatttct ttttagtttt gttttatgc tagaataatt tgtttcoatt gttttcacia	7020
aaatcacatt ttattattat tttttctgc atatcagtag actagcagtt ctttttaaat	7080
atgtagctga tacttaaagg taccatatt tgcattttag ggccacgttg attttagtta	7140
tgaagtgtcc aggtcactgt ctgcctgcca aggtgtttta ctggtagtgg atgcaaatga	7200
ggtaagagcc ctctttatat atgataagac atgeccactt ggttgtttca taaagttctg	7260
aaaatgcatt ttggaatgc aaattttaca ttggaataac agatctattg tattacttac	7320
tctaaatcaa atactttaat attgttaaaa tgaagtctg actcactctg cttagtttga	7380
ctctttctt actagtggta atgttggttt tgaaccctaa aacttaaatg gtacagaaac	7440
gtaggaagtg gtatgattca gattctgta actacatagt gaaatacccg taaaggcaag	7500
ttcttttgc tcacagtttt gaaggttga gtccacgact cattgactca ttgcctttgc	7560
cgtgcagcaa ggcagcacia tatagtotta aagcctgaag atggggctgg ggagccaaac	7620
tcctcactgc ccaggaagca cagtgagtag ggccggaggc tcacagctc tgcaggcag	7680
gtacatgaca tatggtgtca ttttattagc atgatcaaaa atctcagtac gatgaatata	7740
tatgggatgt atggaattag taagttgtg gtacattagt gccaaaccag tcaccttgcg	7800
ctctcttate ttctgtttc caggttattc aagctcaaac tgtggccaac ttcttcttg	7860
cttttgaagc acagctgtca gtaattccag ttatcaataa ggtaatcaaa cgagacacca	7920
atgttattac ttattttacc ttctgtgtag tgttttagttg taaaatatag ggttttctc	7980
ttctttttt ctttcttct tttttttaa tafgagggac ctgtagttac tgttcttca	8040
gattatcagt aggatttctc tctgaatate atgcataga attgcaggtc aaatattct	8100
tgcataagat tgaaaaagtt tgtctggact gcatggctg agaatagccc atttctggag	8160

[0019]

gaaaaggggtg caaggcagac aaagaggtgc cagtcatact gctetggaga agaggggctg	8220
agagctaaga ctcagtgaag tccatgaaac aggtcaaagt aactcttaac acacataagt	8280
ctgtccagta gtgtaaagtt aagatccttag tttaaaatc aaactacatt aagttgcatt	8340
tcttgatafc actgccacat ataaagtaag gctaaatage ttgatactg accttaattt	8400
taaaagtctg actcatgccc ttagttggta tactctgttc tgettacata tttttgtct	8460
gttttgttgc tcgtatttc ttttttttg tactcatget tgtaaaatt atgttgataa	8520
ttgctttttg gccttttggc taagatcaag tgtaatcata ttgatatata gattatttta	8580
aatatttttg aaaaaagtca tgaagggtca gttaggtaa atcacagaag actattgacc	8640
tccaaatatt gttacaaigg actaattca tttttgeict gctcactaag taattttgtt	8700
catagataga tctgaagaat gctgacctg aaaggggtgg aaagcagatt gaaaaagtat	8760
ttgatatccc tagtgaggag tgiattaagg taagttcttt ttcttaaagt attgtcttag	8820
ttgttctatt gctctgatga aacaccatgg tcagagcaac gtggggagga attggtttat	8880
ttggettata cttccattaa gccatcactg aaggaagtta gggcaggaac ctagaggeag	8940
gagctggagt ggaggccatg aaggtgctgc atactgggtt ggcctaatg gctcattcag	9000
cctgatttct tatagagtc gggaccacca gccaggcct ggcaccacct ccaatgggca	9060
gggtcctcac ccatcaaca ctaattaaga aaatgtata cactcatgtc tgcagcctga	9120
tcttttgag gcattttctc agctgaggtt accatctcaa atgccagcag aactattgat	9180
tattctttgg aaaatctcag gagattgacc taactgaaat ttcattggtgt ttgttccctt	9240
gcactcttaa cacttttta gttttcaggt gcttattatt atttcattag attcaggtga	9300
gaaaactccc cttatattgt gagaatatac agaatcatta ttacagaggc cccaggaagg	9360
aaagtgtag ccttaaactt caatgctttg gtttctacac acttcagat ttctgagaaa	9420
cttgggacaa acgttgacag tgtgcttcag gcagtcattg aacgaatacc tccgtaagea	9480
tttgetatt acactattca ctcattgta atagtagagt ttaataattt acagacattt	9540
aaaatgtact agtttagatt aatagaccac caacttgata tgcaattta aactagttaa	9600
tatggcaagc agtcttcag taggttggga taaagtttg catttaataa tataaaggag	9660

[0020]

tcaagtigaa tataagaaga ctggaaaggg caagggtgge ggtgctgtcc agtggacatg 9720  
 gtatggggct gaagtacact ggcatttggt tgcgtcataa tgagtataca tcttttaatt 9780  
 tcaaaaatgta aaactgatgg ctgaatttaa tatagtttat agaagtggtt gttttggett 9840  
 ttgagtaatt tcttttacia aattaaacat acttettaga ttgaaaatag gcattttctt 9900  
 atatgtactt aatttctttt ataatagtcc aaaagtccat cgtgaaaacc cactgaaagc 9960  
 tttggtattt gactccacct ttgaccagta cagaggggtg atageccaata tagcactggt 10020  
 tgaatggagt gtttccaagg gagataaaat tgtatctgca cataactaaa aagcataiga 10080  
 agtcaatgaa gtaggcattt tgaactctaa tgaacageca actcataaat tgtaagtaat 10140  
 ttgtttaata tgtgtaataa attttcatat gtttctctca atgtgttcag aatgatcata 10200  
 ataggaaacc tgaatgata tgaanaata catccagata cttaaaagga tcttgtatgt 10260  
 gaatggtagg tagttttatg aataaaaaaa tgatcaagtt ttattaatta gtagaaataa 10320  
 cttagtgate tagtatagge ttggtctgt taaatgtatt tgacagaaca ataaaaact 10380  
 agttaggctt cctcaactac tatccagtga acttttttct tttttacatt tgaacggtat 10440  
 cgataagctt gatataaat tccgaagttc ctattctcta gaaagtatag gaacttcagg 10500  
 tctgaagagg agtttacgtc cagcaagctt agcttggctg caggctctcg aaattctacc 10560  
 gggtagggga ggcgcttttc ccaaggcagt ctggagcatg cgttttagca gccccgctgg 10620  
 gcaattggcg ctacacaagt ggcctctgge ctgcacaca ttccacatcc accggtagge 10680  
 gccaacggc tccgttcttt ggtagccctc tgcgcccace ttctactctt cccctagtca 10740  
 ggaagttccc ccccgccccg cagctcgcgt cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac 10800  
 gtctcactag tctcgtcag atggacagca ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt 10860  
 ggggcagcgg ccaatagcag ctttctctct tgcctttctg ggtcagagg ctgggaaggg 10920  
 gtgggtccgg gggcgggctc aggggcgggc tcaggggcgg ggcgggcgcc cgaaggtcct 10980  
 ccggaggccc ggcattctgc acgcttcaaa agcgcacgtc tgcgcgctg ttctctcttt 11040  
 cctcatctcc gggectttcg acctgcagcc tgttgacaat taatcatcgg catagtatat 11100  
 cgcatagta taatacgaca aggtgaggaa ctaaaccatg ggateggcca ttgaacaaga 11160  
 tggattgcac gcaggttctc cgccccttg ggtggagagg ctattcgctt atgactgggc 11220

[0021]

acaacagaca atcggetget etgatgccgc egtgttcogg etgteagcgc agggggcgecc 11280  
 ggttcttttt gtcaagaccg acctgtcogg tgccttgaat gaaatgcagg acgaggecagc 11340  
 gggctatcg tggetggcca cgaeggogt tcottgocca getgtgetcg acgttgcac 11400  
 tgaagcggga agggactggc tgetattggg cgaagtcccg gggeaggatc tcctgtcacc 11460  
 tcaccttget cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 11520  
 gettgatccg getacctgcc cattcgacca ccaagcgaac catcgcacg agcgagcagc 11580  
 tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 11640  
 cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggccgcgatg cccgacggcg atgatctcgt 11700  
 cgtgacctat ggcatgcct gcttgcgaa taccatggtg gaaaatggcc gctttctgg 11760  
 attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgatc caggacatag cgttggctac 11820  
 ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgettcctcg tgctttacgg 11880  
 taccgccgct cccgatcgc agcgcacgc ctctatcgc ctctctgac agttctctg 11940  
 aggggatcaa ttctctagag ctgcctgac agcctcact gtgccttcta gttgccagcc 12000  
 atctgtttt tgcctctccc ccgtgcctc ctgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt 12060  
 ccttctctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc attctattct 12120  
 ggggggtggg gtggggcagg acagcaagg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc 12180  
 tgggatgagc gtgggctcta tgcttctga ggccgaaaga accagctggg gctcgaactg 12240  
 agcttgggga acccttcgaa gttctcttc tctagaaagt ataggaactt catcagtcag 12300  
 gtacataata taacttcgta taatgtatgc taccgaagt tattaggtgg atccactagt 12360  
 tetagagctc cccgcgggga catgcatgg catggcaata taaggtgta taagctgta 12420  
 aaaaaccatt ctttcttca ctgtggaatt tcagttgac ctagattaat taaaatttat 12480  
 ttttaattaat atttaattta aatattaaaa ccatactga gtgagttgtg aaaeggetge 12540  
 tgagtggctc ctgatctga gaagacctga cgtcaggcac tgagtttatg cttctcaggt 12600  
 tgtctctgaa agtgaaggtg tcaggtcttg agtacaggga tcgatcacat agcagtgta 12660  
 tgtgtgtct agagagccgc gtgtgagta ccacatgttt cagttagtgc agtcttctaa 12720

[0022]

attaagtccc tgtattgtaa tatatgcatt gtatgatata catgtttatt taatatgtat 12780  
 atgttatgca tacacacaca tatatcacag tacaggtatt gaacattaat tactgcatct 12840  
 tcattgaagg ttcctctcgc aacctacatg caaatgagtt tgtiactatg taggtctctc 12900  
 tctttttttt aattaageta aaactgaatt attggaatct gccccttca tgtgaaagt 12960  
 ataigcgtaa tagacttggt acataattct ggittctctgt ttggttaac atttatcttt 13020  
 tccccctgtt aatgagceta taccacataa taatagacat gacagtctcc tgaatttttc 13080  
 tccgatggta ceggttttac aggagctggg gtgtagtttg cagaagttgg gcacagacag 13140  
 gtttaggtct ggtiagaaac tgagctiaga ggttgaagat ttgcatgggg ccttacttg 13200  
 tttgagaagt tatgagtttc ctagggaggt agaactgtga gtgtgcaett aacaacagaa 13260  
 aagcagtaaa tatttgcata tactaatttt atttagatat gcaggacagg tgggcttct 13320  
 gattgctggg atgaaagatg tcactgaagc acaaatagga gacacattat attacataa 13380  
 tcatccagtg gaaccttgc ctgggtttaa atcagcgaaa ccaatggtgt ttgcaggtga 13440  
 ggagctccca aattgaagac aaggggceaa aatattttta attaaaaatc tgttctgtg 13500  
 gtgaaageca aggtagtaga agataataig cattcttata gatatgittg taacatata 13560  
 atgtatatgt atgtatgtat gtgtatatat attatcaata tacatatata tgacatttca 13620  
 ttgcttata ggtatgtgct atatatgaga gaccatttag gattccttaa gaatgaagtg 13680  
 attatataag agatgttagt aatatgaatt ttcttatttt ctgagaagt taattgaata 13740  
 tatttgaatt tttttctct agttaggatg tttagatgac agttctcagt agaattaatg 13800  
 aattccctcc tcttggtctt tttctttagt tacgcttctg tectctgaat gaagtagaet 13860  
 gccatgcage ctttaccac atgtaacatg aggtctctgta ttgctttgag cattgcacat 13920  
 atttatatag tgaggactga ttgagggtcc tccgcttact gtatcccacc taggttagct 13980  
 cgcctcgcct tctctcagct ctctctcag cagaggctcac ggactttatg actgetgtgc 14040  
 ttcaacaagca gtcatttga gctcaggagg gttgtaaagt ataagctta taagcagaag 14100  
 agaaagacaa tgggcgtaac cagcagtagc tcccataggt tgttttgttt tgttttgttt 14160  
 tttaaagatt tctttgttgt tatgtgtgag tacactatag ctgtcttagg acacaccaga 14220  
 ggagggcctg tcccattaca gatggttgtg aggcaccagg tggttgctgg gaattgaact 14280

[0023]

caggaccttt ggaagagcag ttagtgcctc tgtecacoga gccatttctc cagccccccg 14340  
tcccatagtt ttaagcagta agtttctaaa agccagattg acatttactt tagcaattgg 14400  
tetggaaact aagtcacgtg tcgttttcat ttctggctgt atttcccact gacagtttta 14460  
cttacagtag tggattagtt tgtacttttg tattttaaaa taaatgtaet ttgectaatt 14520  
attagtaaac ttatttcctt tggttcttta cattttttct tttttttgtt atttgcctga 14580  
aagcataaaa tcaactgtta tagtgtgaca acaattgtat atcattaatg ctaatagaat 14640  
ctaagataac cttgcaacca attacagaaa aattatatga atgccacatg gtttaatttg 14700  
aacttgacca tactatctat tatgtttgta tccccaggag tgtacctat agaccaatct 14760  
gagtacaata acctgaagag tgetatagaa aaactgacct taaatgactc aagtgtaaac 14820  
gtgcatcggg atagtagctc ggccctgggt gctggctgga ggtaggggac actcatatct 14880  
tagagtcact tttcataaga aaataccttc taattggatg tgttgcctat gaacatttct 14940  
gaaaatcaga ctaagctttt taaatatttt ttggggtagg gatggaaggt tgacacaagg 15000  
tctcactata tagccctgge tgiottggaa ctagctgtgt aggtcaggct ggccctcaac 15060  
tcacagtga cttagctgtt ctacaaatat ccttttctac aatgttaggt atgggtgtgc 15120  
acactatgtg tgeatgetca taggcctgag gteaatccgg gtctccattt gattttttac 15180  
gcagtgcctc tcaactgactc tggaggttgc cctggcacct tgetgtctcc tcccgcactg 15240  
ggaaocagct tgcattctgc agcgtctgge tttttcattt aggtcctggg gatccagaat 15300  
cggggctcct atgcttccac tgtgagcaca agacceactc agccatttac acaggeccta 15360  
tagatccatt tctatgagta agataaataa gtctcgtata aataagtctg cttatgtctc 15420  
atgtgcattc atgtttgggt ggtagtttac aatacattca caggagattt gggctcttatt 15480  
ttataaagtt atacaagaaa tgcaaattga tggaaatgatt cttgatatec tcttttctca 15540  
caaagtagca atgtgttccac aactgccage agccccacgg aacatagata tttagaggag 15600  
ttttctgttt tttttttttt tttttttgtc cctttgtctc caggttgggg tttcttggac 15660  
ttttacatat ggaggttttc aaccagcgat tagagcaaga atataacgct tctgtcattt 15720  
tgacaacccc aactgttcca tacaagctg ttctttctctc tgcaaaatta ataaaggtac 15780

[0024]



tgcfccatec attcfatfff gtgfcagcct gaaagggaaa atttaataaa gatgtgtaca 15840  
 tgtatatact aaatacaaga gaaatgtfff ctttgtttgt aagtaagtca ctattaagga 15900  
 tgatttattt ttgagtaaaa gtttaataaaa atttttatta cettetttaaa actaattcat 15960  
 gttttacggt tcttagctca atctctttat taacaaaatt actggttagtg atagtaaaaa 16020  
 gaattcgtaa taagaaggcc attataatff agcacaggat ttgaaagata atgtttgtca 16080  
 tgaataattg aagtataaaa aagtaaaaca ttcattetta taggaaatff ttaagttagt 16140  
 gatagaagca gtactgtatt tcatttaagt ggcaattaat aattttatca tttaaacact 16200  
 gctaccttga gcaaaataa ccigatttta tattactaat tataattgctg taaaatgtag 16260  
 tatttgcctc acttttagatg gtccatggta tgttttataa attttagtaa acccaaatac 16320  
 tgaattcat ttagtattat cattaactgac aaaattaaaa gatagtaatt ggaagtcttt 16380  
 gattgtttgt tcttaaaaga aacgtattag gtgacagtct gatcttcagg tgtcttctct 16440  
 gttactactg ctactttgtt atctgcagtg aatgcagtct gttctaaatg tactatctgt 16500  
 gaaaagcaag cctgtaagaa agagaactgt gggagtgfff gttcttaact actgttccct 16560  
 ctcccctfff tcaggaatat aaagagaagg agatcacaaat catcaacctc gcacagtctc 16620  
 ctgagaagtc ccaagtaaca gaatatttgg aacctgttgt tttgggcact gttattcac 16680  
 cgactgagta cactggaaaa ataatggcgc tttgtcaggt aggacacaaa gtgggattca 16740  
 gtcctctgga gcaacgetta tcagcttcca tttcatagga gtcctctgc tgggaagttt 16800  
 ccttttactg gctttaagtt tgattgtcac tattagctga atagttagtc aaaggaatga 16860  
 aaaaaattac atatttaaaa ggatctttta ttatgattta gtttatttgt gtacttgaaa 16920  
 gtgaatataa tttgggggat cctctagagt cgagcagtgt ggttttcaag aggaagcaaa 16980  
 aagcctctcc acccagcctt ggaatgtttc cacccaatgt cgagcagtgt ggttttgcaa 17040  
 gaggaagcaa aaagcctctc caccagcctc tggaaatgttt ccaccaatg tcgagcaaac 17100  
 cccgccagc gtcttgcctc ttggcaatc gaacacgcag atgcagtctg ggcggcgcgg 17160  
 tcccagctcc acttgcata ttaaggtagc gcgtgtggcc tcgaacaccg agcagacctg 17220  
 cagcgacctg cttaacagcg tcaacagcgt gccgcagatc ttggtggcgt gaaactcccg 17280  
 cacctctctg gccagcctt tgtagaagcg cgtatggctt cgtacctcgg ccatcagcac 17340

[0025]

gegtetgctg tegaccagge tgcgegtctt egcgccata gcaaccgaag tacggcgttg 17400  
 cgcctctgce ggcagcaaga agccacggaa gtcgcccgg agcagaaaat gcccacgcta 17460  
 ctgogggttt atatagaagg tccccaggg atggggaaaa ccaccaccac gcaactgctg 17520  
 gtggcctggt gttcgcgca cgatategtc tacgtaccgg agccgatgac ttaetggcgg 17580  
 gtgctggggg cttecgagac aatcgcgaac atctacacca cacaacaccg ccttgaccag 17640  
 ggtgagatat cggccgggga cgcggcgggt gtaatgaaa gcgccagat aacaatgggc 17700  
 atgccttatg ccgtgaccga cgcggttctg gctctcata tcggggggga ggctgggagc 17760  
 tcacatgccc cgcceccggc cctcaccctc atcttcgacc gccatccat cgcgcctc 17820  
 ctgtgtacc cggcgcgcg ataccttatg ggcagcatga cccccaggc cgtgctggcg 17880  
 ttgtggccc tcatcccgc gacctgccc ggcacaaaa tcgtgtggg ggcccttcg 17940  
 gaggacagac acatcgaccg ctggccaaa cgcagcgc cggcgagcg gcttgacctg 18000  
 gctatgctgg ccgcgattcg ccgcgtttac gggtgcttg ccaatacggg cgggtatctg 18060  
 caggcggcg ggtcgtggcg ggaggattgg ggacagctt cggggacggc cgtgcgcgcc 18120  
 cagggtgccc agccccagag caacgcgggc ccacgacccc atacgggga cacgttattt 18180  
 accctgttcc gggccccga gttgctggcc cccaacggcg acctgtaaa cgtgtttgcc 18240  
 tggccttgg acgtcttggc caaacgcctc cgtcccatgc acgtcttat cctggattac 18300  
 gaccaatgce ccgcggctg ccgggacgcc ctgctgcaac ttacctcgg gatgatccag 18360  
 acccagctca ccaccccagg ctccataccg acgatctgcg acctggcgcg cacgtttgcc 18420  
 cgggagatgg gggaggctaa ctgaaacacg gaaggagaca ataccggaag gaaccgcgc 18480  
 tatgacggca ataaaaagac agaataaaac gcaegggtgt tgggtcgttt gttcataaac 18540  
 gcgggttctg gtcccagggc tggcactctg tcgatacccc accgagacc cttggggcc 18600  
 aatagccecg egtttctcc tttccccac cccaccccc aagttegggt gaaggeccag 18660  
 ggctcgcagc caacgtcggg gcggcaggcc ctgccatagc cacgggcccc gtgggttagg 18720  
 gacgggtccc cccatgggga atggtttatg gttcgtgggg gttattattt tgggcgttgc 18780  
 gtgggtcag tccacgactg gactgagcag acagaccat ggtttttgga tggcctgggc 18840

[0026]

atggaccgea tgtactggcg cgacacgaac accggggegte tgtggctgec aaacacccce 18900  
gacccccaaa aaccaccgcg cggatttctg gcgccgccgg acgaactaaa cctgactacg 18960  
gcatctctge ceettetteg etggtacgag gagegetttt gttttgtatt ggtaaccaag 19020  
gcccagtttc cgegggacce oggecagatc aagctagett ategataacc togacctega 19080  
gggggggccc ggtaccagct tttgtccct itagtgaggg ttaatttega gcttggecta 19140  
atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcacaattc cacacaacat 19200  
acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagtgagct aactcacatt 19260  
aatlgegtig egctcaactgc ccgtttcca gtccgggaaac ctgtctgccc agctgcatta 19320  
atgaatcgge caacgcgccc ggagaggccc tttgcgtatt gggegetett ccgtttccct 19380  
gctcaactgac tctctgctct eggtcttccg gctgcggcga ggggtatcag ctcactcaaa 19440  
ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa 19500  
aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcccgttg ctggcgtttt tccatagget 19560  
ccgccccctf gacgagcacc acaaaaatcg acctcaagt cagaggtggc gaaacccgac 19620  
aggactataa agataaccag cgtttccccc tggaaacctc cctctgctct ctcctgttcc 19680  
gacctgccc cttaccggat acctgtcccg cttttccctc tgggaagcg tggecttctc 19740  
tcatagctca cgtgttaggt atctcagttc ggtgttagtc gttcctcca agctgggctg 19800  
tgtcacgaa cccccctt agcccagccg ctgcgcctta tccgtaact atcgtcttga 19860  
gtccaacccc gtaagacacg acttatcccg actggcagca gccactggta acaggattag 19920  
cagagcaggg tatgtagcgg gtgtctacaga gttcttgaag tgggtgccta actacggcta 19980  
cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgtgaag ccagttacct tggaaaaag 20040  
agttggtagc tcttgatccc gcaaacaaa caccctgggt agcgggtggt tttttgttg 20100  
caagcagcag attaccgcca gaaaaaagg atctcaagaa gatccttga tctttctac 20160  
ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg attttggtca tgagattate 20220  
aaaaaggate ttcacctaga tctttttaa ttaaaaatga agttttaaaf caatctaaag 20280  
tatatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgetta atcagtgagg cacctatctc 20340  
agcgatctgt ctattctgtt catccatagt tgcctgactc cccgtcgtgt agataactac 20400

[0027]

gatacgggag ggettaccat ctggeccag tgetgcaatg ataccgag acccacgctc 20460  
accggetcca gatttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg 20520  
tctgcaact ttatccgctt ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag 20580  
tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgcatt getacagga cegtgggtgc 20640  
acgetcgtc tttggatgg ctccattcag ctccggtcc caacgateaa ggcaggttac 20700  
atgatcccc atgttgtgca aaaaageggt tagctcttc ggctctcca tcgttgtcag 20760  
aagtaagtig gccgcagtgt taccactcat ggttatggca gcaatgcata attotottac 20820  
tgtcatgcca tcgtaagat gctttctgt gactggtag tactcaacca agtcattctg 20880  
agaatagtgt atggcgagc cgagttgctc ttgcccggc tcaatacggg ataataccgc 20940  
gccacatagc agaactttaa aagtgcctat cattggaaaa cgttcttgg ggcgaaaact 21000  
ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttgatgtaa ccaactcgtg caaccaactg 21060  
atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa 21120  
tgccgcaaaa aaggaataa gggcgacaag gaaatggtga ataactaac tcttctttt 21180  
tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg ageggataca tatttgaatg 21240  
tatttagaaa aataaacaat taggggttcc ggcacattt cccgaaaag tgccac 21296

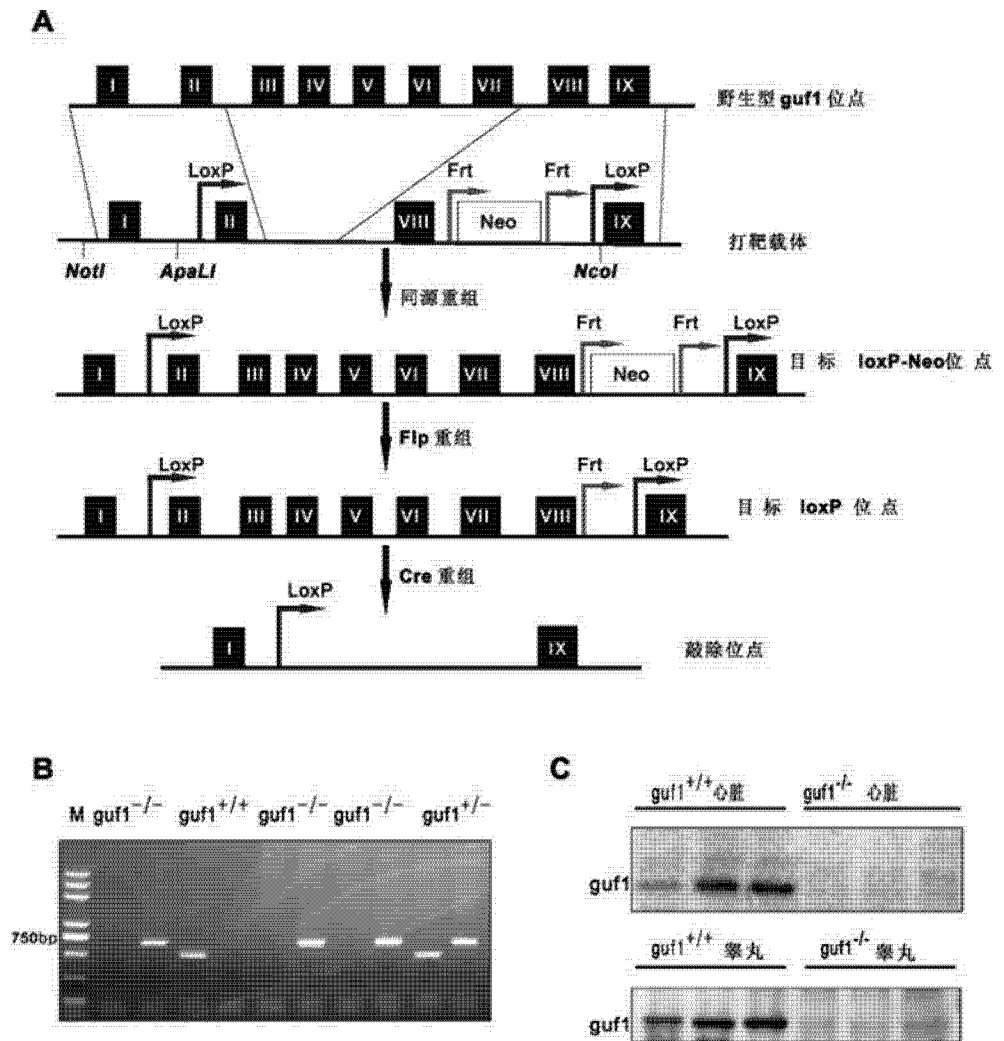


图 1

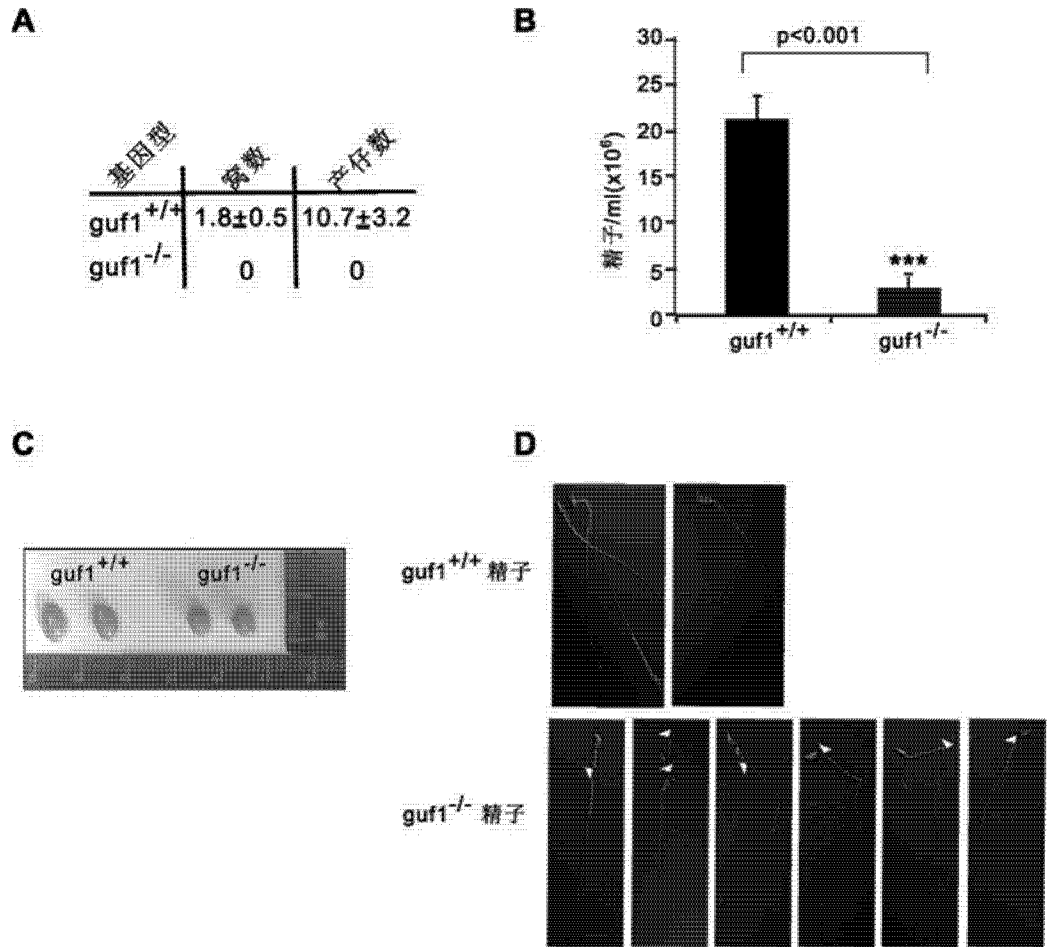


图 2

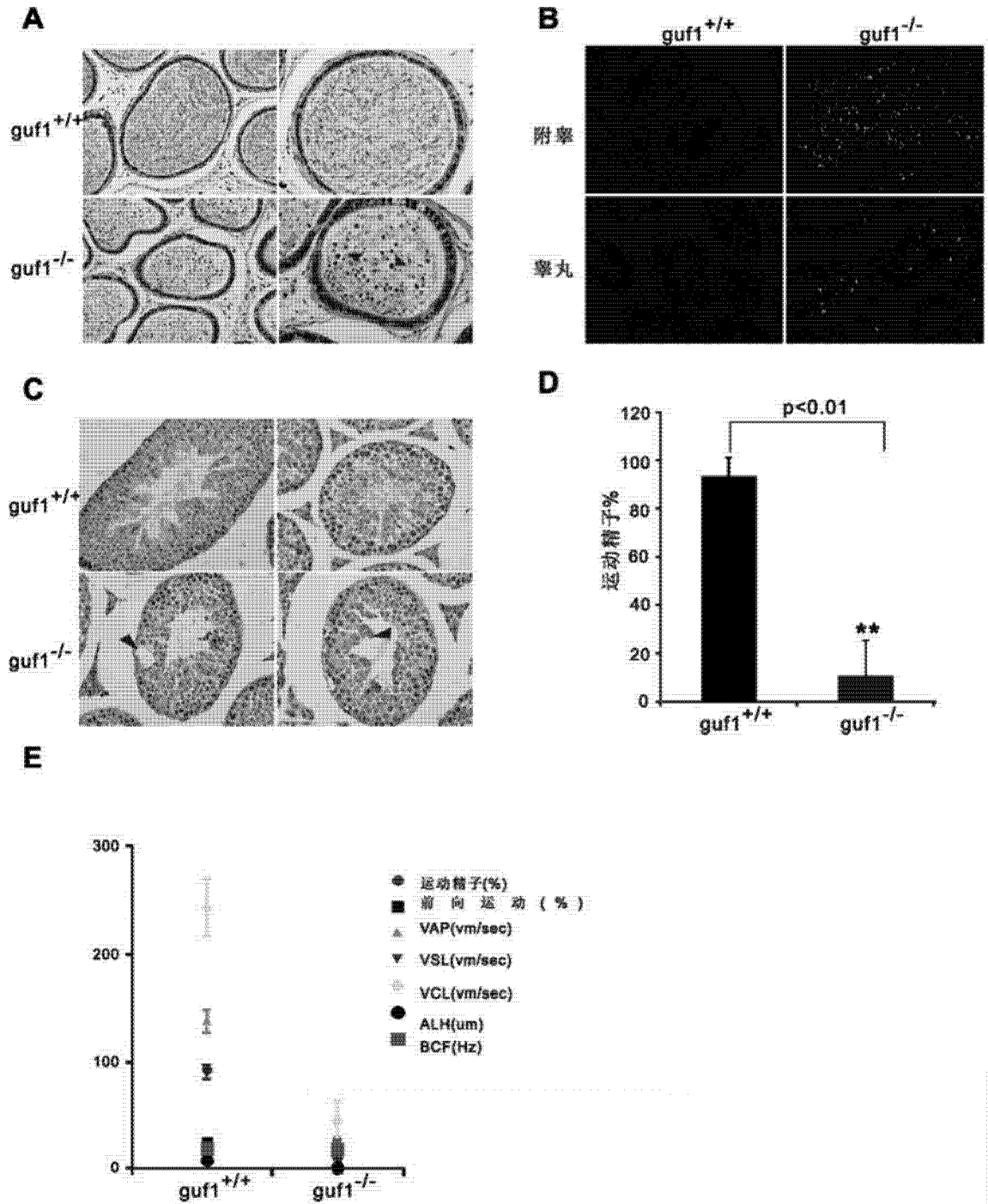


图 3

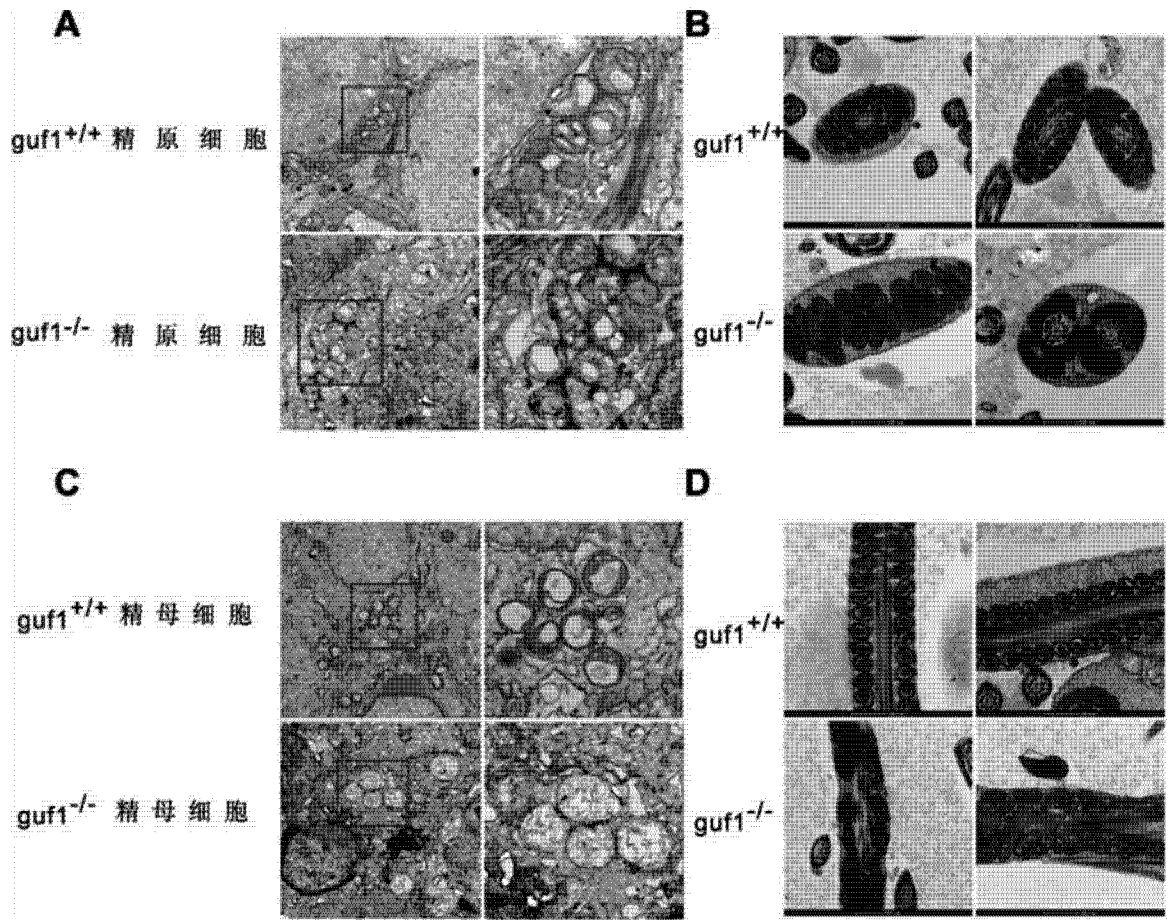


图 4



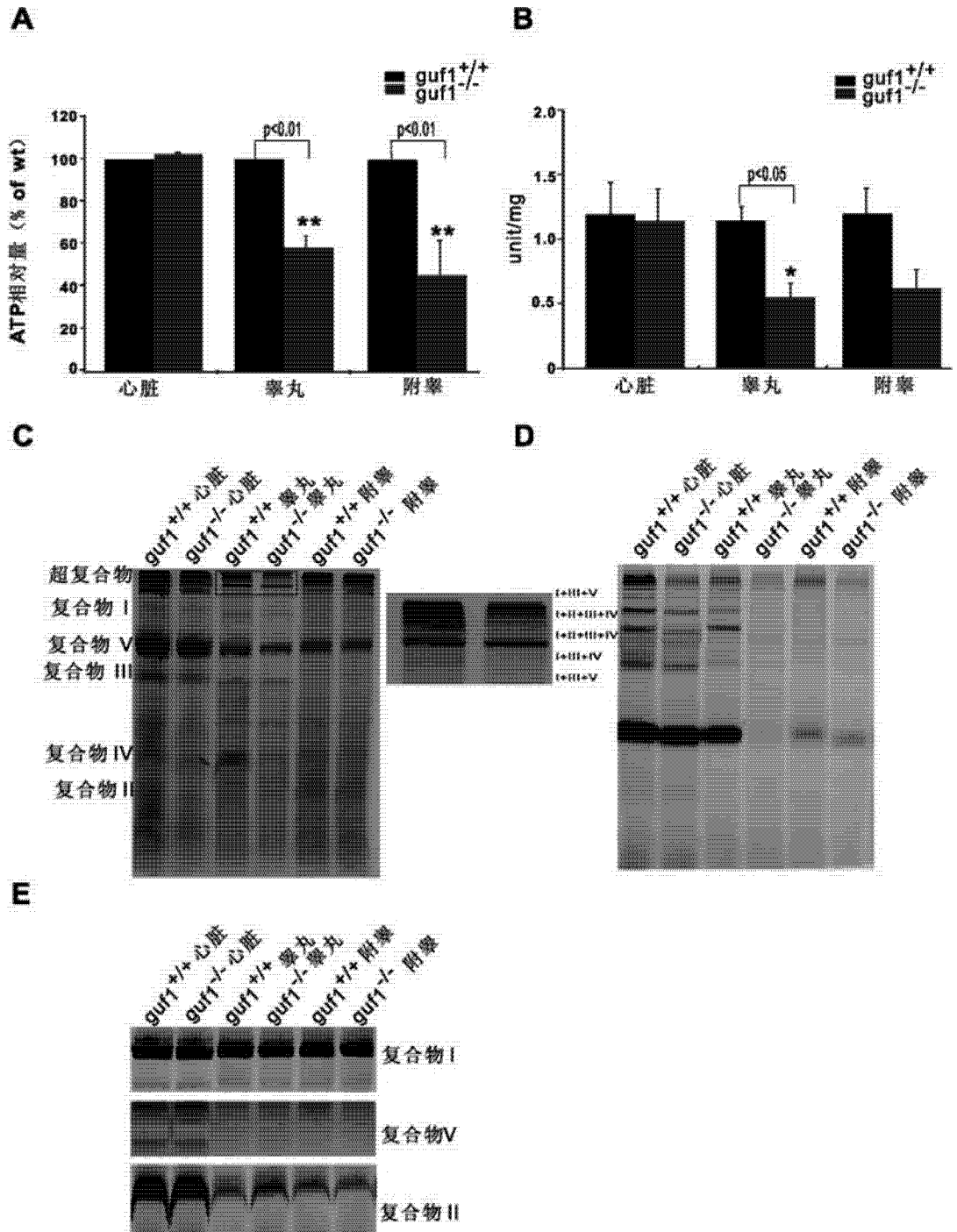


图 5

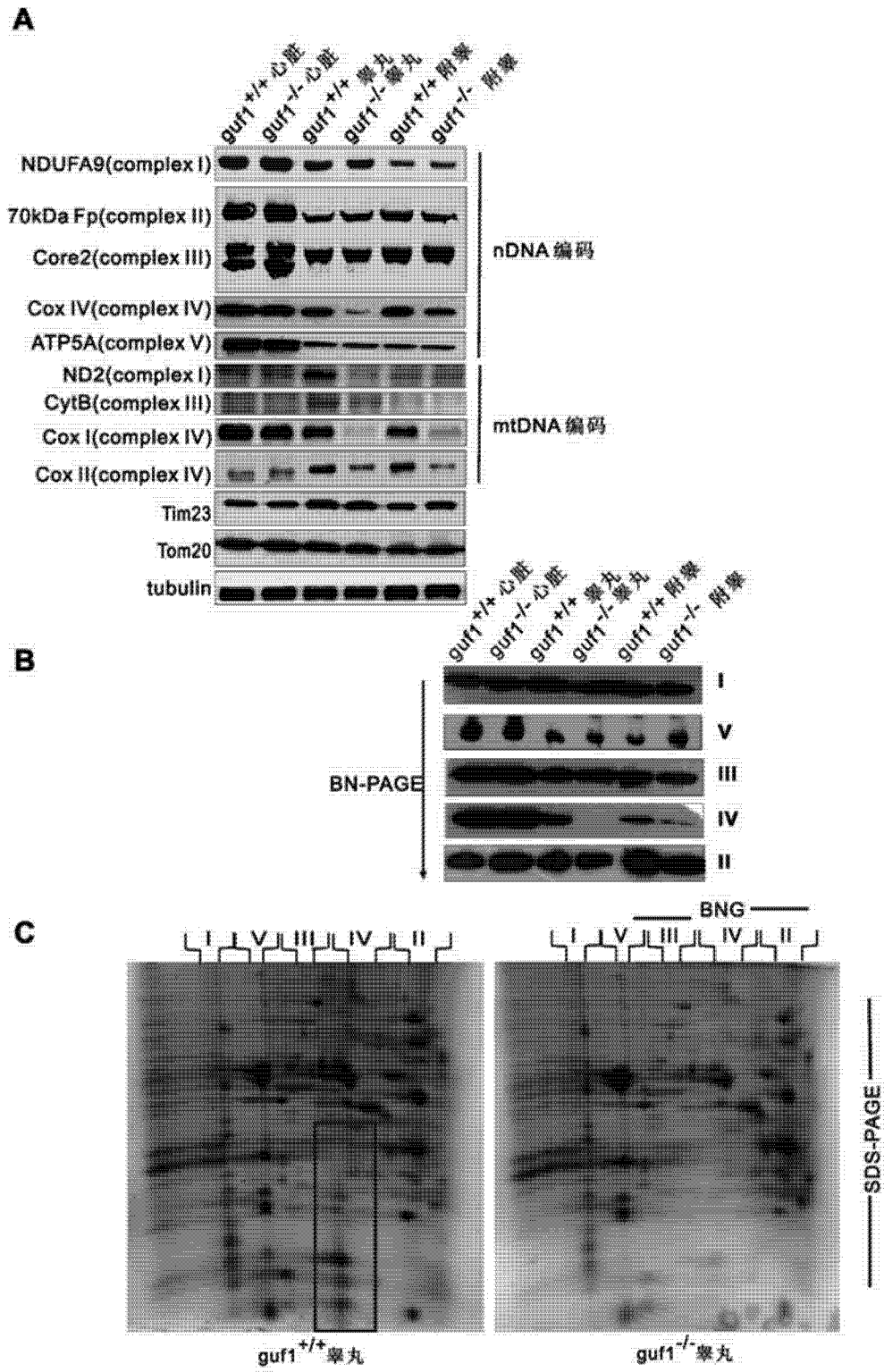


图 6

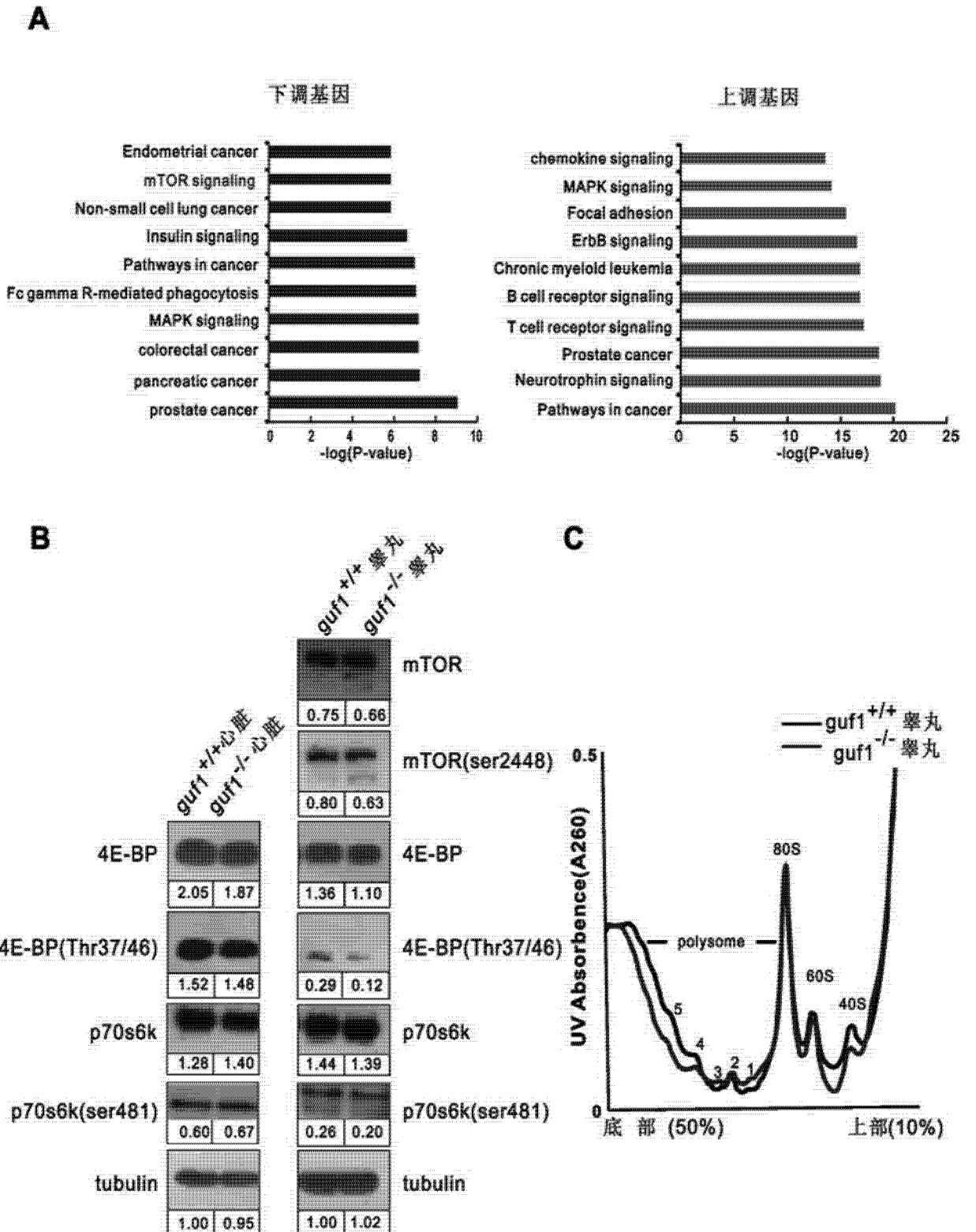


图 7

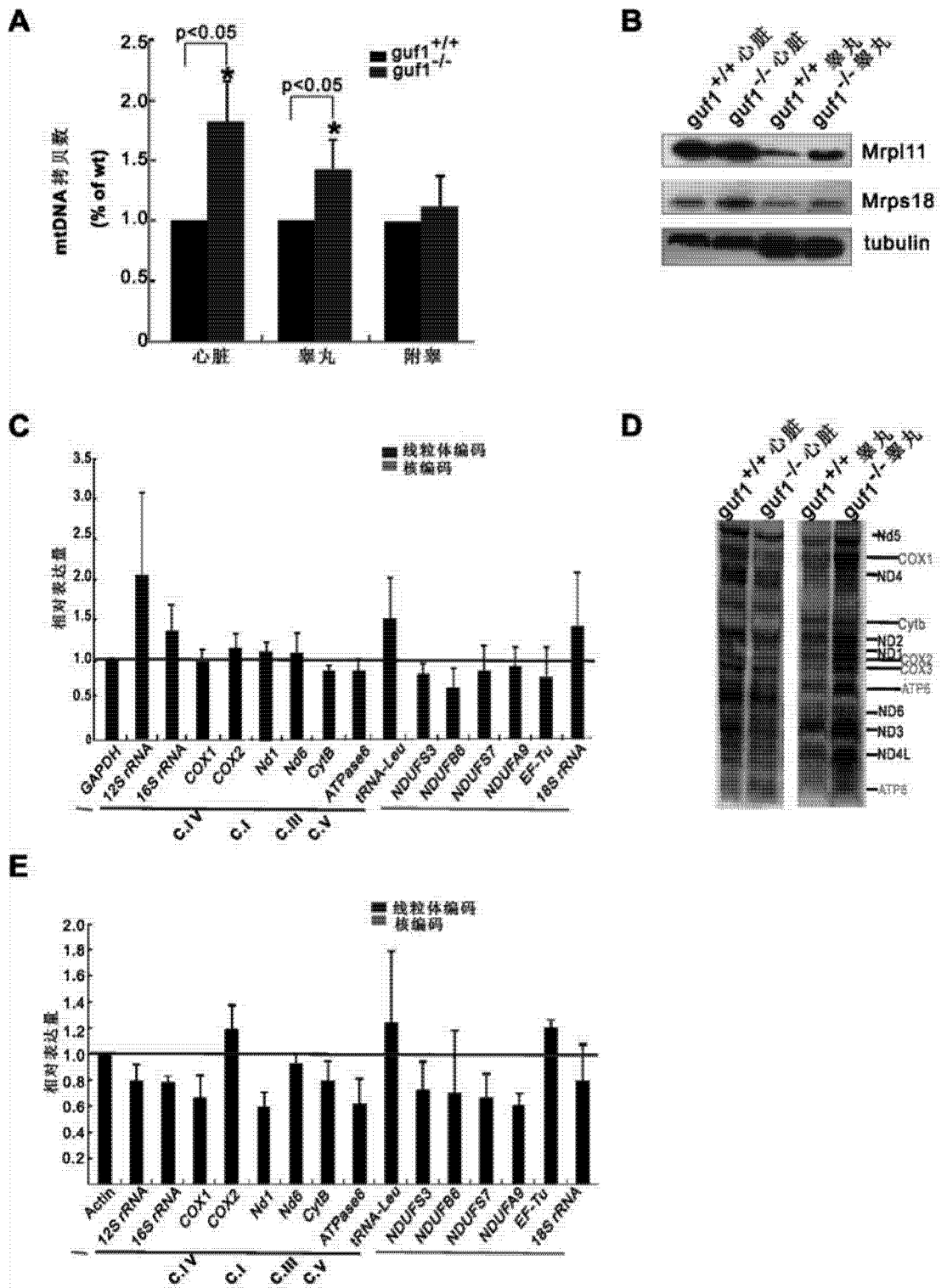


图 8

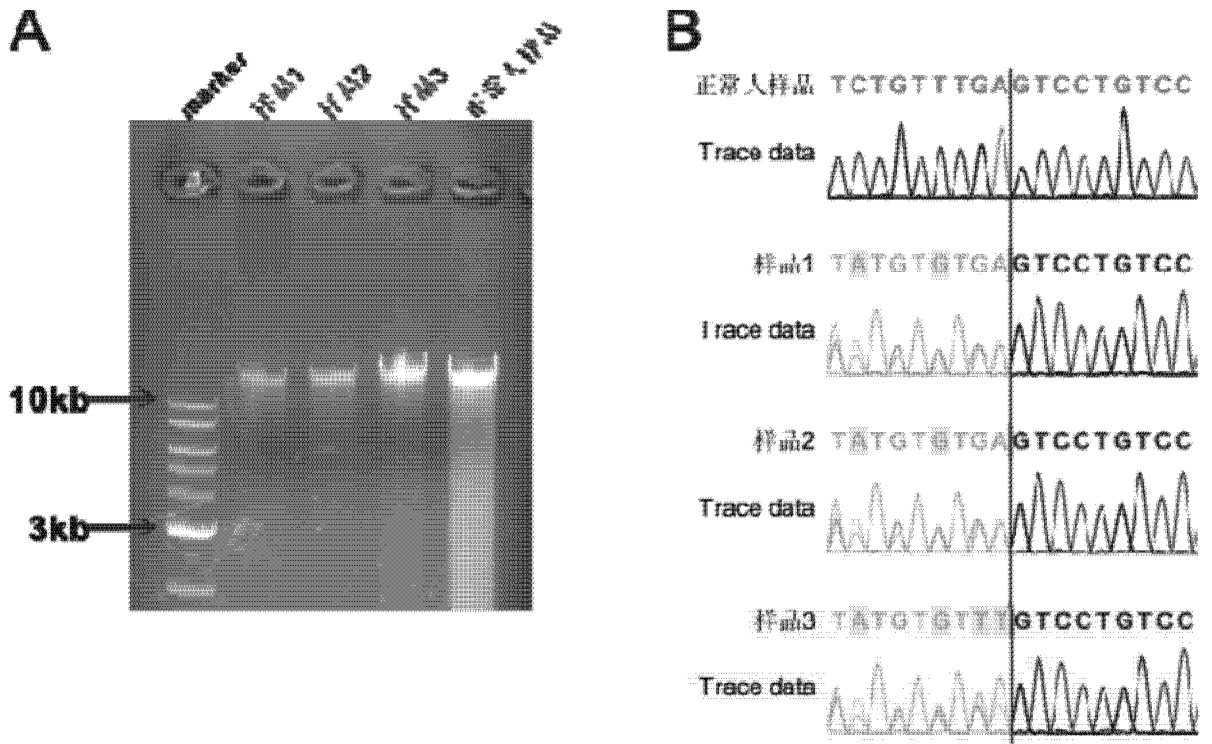


图 9