



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108753802 B

(45) 授权公告日 2021.07.16

(21) 申请号 201810492054.2

CN 105296509 A,2016.02.03

(22) 申请日 2018.05.22

CN 105838724 A,2016.08.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108753802 A

梁丽亚等.“过量表达苹果酸脱氢酶对大肠杆菌NZN111产丁二酸的影响”.《生物工程学报》.2011,第27卷(第7期),

(43) 申请公布日 2018.11.06

Sharma,Rahul.等.“nad-malate dehydrogenase [Phaffia rhodozyma]”.《Genbank Database》.2015,

(73) 专利权人 昆明理工大学
地址 650093 云南省昆明市五华区学府路253号

汪新颖等.“苹果酸脱氢酶的结构及功能”.《生物学杂志》.2009,第26卷(第4期),

(72) 发明人 张琦 胡丽 季秀玲 魏云林
林连兵

Yang,R.Y.等.“Trichosporon asahii var. asahii CBS 2479 L-malate dehydrogenase partial mRNA”.《Genbank Database》.2015,

(51) Int.Cl.
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

CHRISTOPHER R. GOWARD等.“Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis”.《Protein Science》.1994,

(56) 对比文件

- CN 105886517 A,2016.08.24
- CN 104673809 A,2015.06.03
- CN 104673810 A,2015.06.03
- CN 103492551 A,2014.01.01
- CN 103003298 A,2013.03.27
- CN 107109347 A,2017.08.29
- US 2017335352 A1,2017.11.23
- EP 3257934 A1,2017.12.20
- JP 2015130808 A,2015.07.23

Erman Munir等.“New role for glyoxylate cycle enzymes in wood-rotting basidiomycetes in relation to biosynthesis of oxalic acid”.《J Wood Sci》.2001,(第47期),

审查员 杨兴艳

权利要求书1页 说明书5页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一个苹果酸脱氢酶基因C1MDH1及其重组表达载体

(57) 摘要

本发明公开了一种苹果酸脱氢酶基因C1MDH1,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,该基因编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,通过构建重组载体并在大肠杆菌中表达,表达产物具有苹果酸脱氢酶功能,能催化苹果酸转化成草酰乙酸。

CN 108753802 B

1. 一种苹果酸脱氢酶基因*CIMDH1*,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 一种含有权利要求1所述苹果酸脱氢酶基因*CIMDH1*的重组表达载体。

一个苹果酸脱氢酶基因C1MDH1及其重组表达载体

技术领域

[0001] 本发明涉及一种苹果酸脱氢酶基因C1MDH1及其重组表达载体,具体涉及以担子菌 *Cystofilobasidium infirmominiatum* 菌株YM25058总RNA反转录的cDNA为模板,扩增得到编码苹果酸脱氢酶(MDH)的基因,将其克隆到大肠杆菌表达载体后诱导表达,亲和层析法纯化后得到纯酶,并对该酶进行了酶活测定,属于基因工程和酶工程领域。

背景技术

[0002] 苹果酸脱氢酶(MDH)广泛分布于生物体内,是一种活性非常强的酶,它催化草酰乙酸盐和苹果酸盐的相互转化反应,与二核苷酸辅酶的氧化还原相关。草酰乙酸盐在许多代谢途径中都有重要作用,包括三羧酸循环、乙醛酸旁路、氨基酸合成、糖原异生等,并维持氧化还原平衡,还能促进胞质和亚细胞器代谢物的交换。依生物体的功能不同、组织差异、细胞内定位的不同其表达种类不同,MDH具有多种同工酶形式。胞质苹果酸脱氢酶(cMDH)存在于细胞胞质内,担负着将NADH转入线粒体的重任,并且还调控三羧酸循环有作用,同时cMDH还是核酸通路(NACH)复合体的一个组成部分。

[0003] 苹果酸脱氢酶(MDH)广泛分布在动物组织、微生物和植物中。它是一种活性最强的酶,根据亚细胞定位,苹果酸脱氢酶可分为5种类型,存在于乙醛酸体、线粒体、过氧化物体、叶绿体、细胞浆以及锥虫甘油体内。MDH为多聚体酶,是由相同或相似亚基组成的二聚体或四聚体,亚基的分子量为30-35kDa,MDH在医学方面也引起越来越多的关注如利用基因工程疫苗预防人体带绦虫病已是备受关注的研究方向,通过牛带绦虫亚洲亚种MDH基因的生物信息学分析,预测到胞浆型MDH是一个潜在的诊断抗原,这为带绦虫在诊断、药物及疫苗研究中的应用前景提供了重要的线索,在临床诊断中用于多酶分析及疾病的早期诊断,例如用于诊断DIC(弥散性血管内凝血),心肌梗塞,急慢性肝炎等。在食品领域,苹果酸脱氢酶用于有机酸含量的测定,如L-苹果酸、醋酸、柠檬酸等物质的测定,应用前景广泛。利用MDH底物专一性,还可将其用于拆分D,L-苹果酸酶。总之,MDHs作为生物体中枢代谢途径的关键酶,国内外对其已进行了较为广泛的研究,MDHs同工酶正应用于生物分类、物种分化、遗传变异、物种杂交和个体发育等研究。因此深入了解MDHs的生理生化特性、结构及功能、催化机制,对于酶重组蛋白的表达、纯化及免疫特性分析,探讨生物体中MDHs的代谢作用以及一些疾病的分子致病机制有着重要的意义;同时MDH的应用研究也将会推动MDHs转基因植物及手性药物的进一步发展。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种从担子菌 *Cystofilobasidium infirmominiatum* YM25058中分离的苹果酸脱氢酶基因C1MDH1,该基因核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示或该核苷酸序列的片段,或与SEQ ID NO:1互补的核苷酸序列,该基因序列长为1020bp(碱基),该基因编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的多肽或其片段。

[0005] 本发明另一目的是提供一种含有苹果酸脱氢酶基因C1MDH1的重组表达载体,是将

SEQ ID NO:1所示基因直接与不同表达载体(质粒、病毒或运载体)连接所构建的重组载体。

[0006] 本发明另一目的是提供一种含有该苹果酸脱氢酶基因*CIMDH1*或上述重组表达载体的宿主细胞大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株BL21。

[0007] 用本发明所述的核苷酸序列或含有核苷酸序列的重组载体转化宿主细胞可用本领域的技术人员熟知的方法进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时,用CaCl₂、电穿孔等方法进行。当宿主是真核生物,可选用DNA转染法、显微注射、电穿孔、脂质体包装等方法。

[0008] 本发明提供的核苷酸序列是一种高效、特异性的苹果酸脱氢酶基因,可以将其与载体连接后转化至微生物细胞体内生产苹果酸脱氢酶,具有产物特异性高、生产周期短、生产不受场地、气候、季节的影响及利用不同的菌种和培养基适合开发商业化苹果酸脱氢酶等优点;本发明应用基因工程技术构建特异性生产苹果酸脱氢酶的转基因大肠杆菌生产苹果酸脱氢酶,具有操作简单、成本低、可行性高等优点,为苹果酸脱氢酶基因工程化生产奠定基础。

附图说明

[0009] 图1为利用本发明的担子菌*Cystofilobasidium infirmominiatum* YM25058总RNA反转录成cDNA进行PCR扩增获得的苹果酸脱氢酶基因*CIMDH1*电泳图,其中:1为DNA Marker;2阴性对照;3为*CIMDH1*基因的扩增条带;

[0010] 图2为利用本发明的担子菌*Cystofilobasidium infirmominiatum* YM25058苹果酸脱氢酶基因*CIMDH1*构建的大肠杆菌重组表达质粒pET32a*CIMDH1*质粒图谱;

[0011] 图3为本发明所构建重组表达质粒pET32a*CIMDH1*的限制性酶切分析图;其中:1为DNA Marker;2为pET32a(+)双酶切后条带;3为pET32a*CIMDH1*双酶切后条带;

[0012] 图4为本发明的苹果酸脱氢酶基因*CIMDH1*诱导表达并纯化后的SDS-PAGE分析图;其中:1为蛋白电泳Marker;2为转化了pET32a(+)并经IPTG诱导的大肠杆菌BL21总蛋白;3为转化了pET32a*CIMDH1*并经IPTG诱导的大肠杆菌BL21总蛋白;4为纯化的目的蛋白条带。

具体实施方式

[0013] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明,但本发明保护范围不局限于所述内容,实施例中使用的试剂和方法,如无特殊说明,均采用常规试剂和使用常规方法。

[0014] 实施例1:担子菌*Cystofilobasidium infirmominiatum*苹果酸脱氢酶基因*CIMDH1*的克隆

[0015] 采用OMEGA试剂盒E.Z.N.A Fungal RNA Kit从*Cystofilobasidium infirmominiatum* 菌株YM25058中提取总RNA,用反转录试剂盒Thermo Scientific Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit合成cDNA,取1μl为模板进行聚合酶链式反应;设计引物(引物*CIMDH1*F1和引物*CIMDH1*R1)进行PCR 扩增,反应所用引物、组分和扩增条件如下:

[0016] *CIMDH1*F1: 5`-TCGGATCCATGGTCAAGGCCGTCGTCAT -3` (SEQ ID NO:3)

[0017] *CIMDH1*R1: 5`-GTCTCGAGGAGCTTGGAGTCGGCGTC-3` (SEQ ID NO:4);

[0018] PCR扩增体系(50μL)组成如下:

[0019] 5×Trans PFU Buffer 10μL

[0020]	dNTP (2.5 μmol/L)	5 μL
[0021]	cDNA	1 μL
[0022]	CIMDF1 (10 μmol/L)	2 μL
[0023]	CIMDHR1 (10 μmol/L)	2 μL
[0024]	Fast Pfu DNA polymerase (5U/μL)	2 μL
[0025]	无菌ddH ₂ O	补足至50 μL;

[0026] 扩增条件:94℃变性4min,再用94℃ 45s、56℃ 45s、72℃ 90s进行30个循环,最后72℃ 10min,反应完后取产物1 μL,然后在浓度为1%的琼脂糖凝胶中,进行电泳分析,分析结果如图1所示。经凝胶成像系统成像确认片段大小正确后,用百泰克生物技术有限公司多动能DNA纯化回收试剂盒回收目的片段,然后将PCR扩增得到的目的基因连接到pMD18-T上,连接产物转化大肠杆菌DH5α,用含有氨苄青霉素(Amp⁺)的LB固体平板进行筛选,挑取平板上的转化子进行菌落PCR筛选阳性克隆,然后送去上海生工测序。测序结果显示,获得一段1020bp长的序列,命名为*CIMDH1*,序列组成如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。

[0027] 实施例2:重组表达质粒pET32a*CIMDH1*的构建

[0028] 采用实施例1中经测序分析的含*CIMDH1*序列的pMD18-T (pMD18-*CIMDH1*)为模板进行PCR 扩增,反应所用引物组合、反应组分和扩增条件如下:

[0029] *CIMDH1*F1: 5`-TCGGATCCATGGTCAAGGCCGTCGTCAT -3` (SEQ ID NO:3)

[0030] *CIMDH1*R1: 5`-GTCTCGAGGAGCTTGGAGTCGGCGTC-3` (SEQ ID NO:4)

[0031] PCR扩增体系(50 μL)组成如下:

[0032]	5×Fast Pfu Buffer	10 μL
[0033]	dNTP (2.5 μmol/L)	5 μL
[0034]	pMD18- <i>CIMDH1</i>	0.5 μL
[0035]	<i>CIMDF1</i> (10 μmol/L)	1 μL
[0036]	<i>CIMDHR1</i> (10 μmol/L)	1 μL
[0037]	Fast Pfu DNA polymerase (5U/μL)	1 μL
[0038]	无菌ddH ₂ O	补足至50 μL;

[0039] 扩增条件:94℃变性4min,再用94℃ 45s、59℃ 45s、72℃ 2min进行30个循环,最后72℃ 10min;取纯化的PCR产物和质粒pET-32a分别用*Bam*H I和*Eco*R I酶切过夜,50 μl PCR产物反应体系:PCR产物25 μL,10×Tango Buffer 10 μl,*Bam*H I和*Eco*R I各1.5 μL,用灭菌的双蒸水补齐,37℃酶切过夜。50 μl质粒pET-32a反应体系:质粒pET-32a 15 μl,10×Tango Buffer 10 μl,*Bam*H I和*Eco*R I各1.5 μL,用灭菌的双蒸水补齐,37℃酶切过夜。电泳检验酶切产物,并用凝胶回收试剂盒对酶切产物进行纯化和回收。连接体系(10 μL):纯化的PCR产物和表达载体pET-32a 按5:1加样,T4DNA连接酶0.5 μL,T4 Buffer 1 μL,16℃连接过夜。取连接产物转入大肠杆菌DH5α中。37℃振荡培养1.5h后,培养液涂布含氨苄的LB培养基平板,37℃培养箱中培养12h,挑取平板上的转化子进行菌落PCR,筛选阳性克隆,构建获得重组表达质粒命名为pET32a*CIMDH1*,该质粒图谱如图2所示。

[0040] 进一步进行双酶切分析鉴定,如图3第3泳道所示,用*Bam*H I和*Eco*R I双酶切,重组质粒产生两条带,小分子条带与之前的PCR产物大小一致,大分子条带与泳道2中用相同两个限制性内切酶酶切pET32a (+)产生的条带大小一致,表明所构建的重组表达质粒正确,进

一步测序分析也证明这一点。此外,通过核苷酸序列所编码的氨基酸相似性搜索表明,该基因编码的蛋白与真菌来源的苹果酸脱氢酶相似,但不完全相同。

[0041] 实施例3:苹果酸脱氢酶基因*CIMDH1*在大肠杆菌BL21中的诱导表达

[0042] 1、苹果酸脱氢酶蛋白*CIMDH1*的诱导表达及纯化

[0043] 为了验证该基因编码蛋白的活性,将1 μ g重组质粒pET32a*CIMDH1*加入50 μ L大肠杆菌BL21感受态细胞中,将整个体系冰浴30min之后于42 $^{\circ}$ C热击90s,再次冰浴2min,然后将连接体系吸取并加入至950 μ L LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、100rpm振荡孵育1h。孵育结束后于5000rpm离心10 min,留下约80 μ L 上清液悬浮沉淀后涂布于含有氨苄青霉素(Amp⁺)的LB固体平板,37 $^{\circ}$ C倒置培养10h。

[0044] 挑取阳性转化子于100 mL LB(含100 μ g/mL氨苄霉素)培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜,将富集的菌液按1%比例接种到1L LB液体培养基中,于37 $^{\circ}$ C,160rpm培养至OD₆₀₀值约为0.8。取5mL菌液作为空白对照,其余加入IPTG至终浓度为1mmol/L,于15 $^{\circ}$ C恒温摇床80rpm诱导培养8小时,12000 rpm离心15min收集菌体。SDS-PAGE分析显示,pET32a*CIMDH1*转化的大肠杆菌BL21中表达出一条分子量约为50kD的蛋白(见图4泳道3),但在空载体pET32a(+)
转化的大肠杆菌BL21中没有(见图4泳道2)。

[0045] 进一步用该菌体悬浮于适量(使菌悬液的OD₆₀₀ \approx 20) 30 mM的咪唑缓冲液中,冰上超声破碎细胞,4 $^{\circ}$ C、14000 rpm离心15 min。将离心后的上清液用0.2 μ m的微型滤膜过滤,滤液上样于已用30mM咪唑缓冲液平衡好的His Trap HP柱(1 mL,GE Healthcare),用150mM咪唑缓冲液进行洗脱,洗脱液用离心管按顺序收集,洗脱样品用SDS-PAGE电泳检测,获得一纯蛋白条带(见图4泳道4)。

[0046] 2、苹果酸脱氢酶*CIMDH1*的酶活测定

[0047] 苹果酸脱氢酶是调控苹果酸代谢的关键酶,可以催化苹果酸进行脱氢氧化,伴随着产生草酰乙酸和NADH。由于MDH的酶活在一定的反应时间内与反应产物NADH的浓度变化呈线性关系,所以MDH的活性可通过检测NADH的浓度变化来测定;以苹果酸和NAD(+)为底物加入苹果酸脱氢酶进行反应,用紫外分光光度计在340nm处测定酶活;MDH酶活的的计算:

[0048] 单位定义:一个酶活力单位是指25 $^{\circ}$ C时每分钟生成1 μ mol NADH所需的酶量。

[0049] 苹果酸脱氢酶酶活计算公式:

$$E = [(\Delta e / \Delta t) \times V_t \times df] / (\epsilon \times D \times V_s \times C)$$

$$= [(0.315 - 0.236) \times 1.9 \times 95] / (6.42 \times 1 \times 0.02 \times 0.3482)$$

$$= 318.93 \text{ U/mg}$$

[0053] V_t -----反应溶液总体积(mL)

[0054] ϵ -----340nm处测定的NADH的吸光度为6.42

[0055] D -----光路长(1cm)(比色皿直径)

[0056] V_s -----酶液体积(mL)

[0057] C -----蛋白质浓度(mg/mL)

[0058] $\Delta e / \Delta t$ ----1min内340nm处吸光度的变化

[0059] df ----稀释因子;

[0060] 结果显示,所纯化的苹果酸脱氢酶*CIMDH1*的酶活为253.28 U/mg,表明基因重组载体在大肠杆菌BL21中诱导表达出来的苹果酸脱氢酶*CIMDH1*具有苹果酸脱氢酶的活性,能催

化苹果酸转化成草酰乙酸。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 昆明理工大学
- [0003] <120> 一种苹果酸脱氢酶基因CIMDH1及其重组表达载体
- [0004] <160> 4
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 1020
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 担子菌YM25058 (*Cystofilobasidium infirmominiatum* YM25058)
- [0010] <400> 1
- [0011] atggtcaagg ccgtcgtcat cggagccgct ggaggtatcg gccagcccct cgcgctgctc 60
- [0012] atgaagacca acccgtcgt gtccgagctc gccctgtacg acgtcgtcaa cgccccgggt 120
- [0013] gtcgcgaccg acctgtcga catcgacacg ccggcccagg tgacgggcta cctgccccgc 180
- [0014] gacggcgggc tcgagaaggc cctcaagggc gccaaagattg tcgtcatccc cgccggtgtc 240
- [0015] ccccgaagc ctggcatgac ccgcgacgac ctcttcaaga tcaacgccgg catctgccgc 300
- [0016] gacctcgaa agggcatcgc cgcccactgc cccgacgcct tcacgctcgt catctcgaa 360
- [0017] cccgtcaact cgaccgtgcc cgtctttgca gaggtettca aggccgccgg cgtgtacgac 420
- [0018] gccaaagaagc tctttggtgt gacgacgctc gacgtcgtcc gtcgctcgac gttcgtcgcc 480
- [0019] gccatcagcg gccagcccga gaaggcgacc gactacacga tcccggatcat cggcggccac 540
- [0020] tctggcgtga cgatcgtccc cctgctctcg cagtccgtcc cggccctgcc cgaggctgtc 600
- [0021] ctcaacgaca aggctaagct ggccgagctc gtcaagcga tccagttcgg cggcgacgag 660
- [0022] gtcgtcaagg ccaaggacgg cgcgggttct gcgacgtct cgatggccta cgccggcgcc 720
- [0023] aagtttgca cgctcgtcct gcgcgccgctc gtcggcggcg agacggggct cgtctcgccc 780
- [0024] tcttacgtct cgctctcgcc cgacgccgag ggccgcaagg ccgtcgccgg cgaggctggc 840
- [0025] aaggacctcg agttcttctc ggtcaaggtc gagctcggcg ccgccggcat caccaagatc 900
- [0026] ctgcccacg ggtcgtctc ggccgaggag aaggacctgc tcgccgctg cgtccccgag 960
- [0027] ctgagggca gcatcgcaa gggcgtctct tcatcaagg acgccgactc caagctctag 1020
- [0028] <210> 2
- [0029] <211> 339
- [0030] <212> PRT
- [0031] <213> 担子菌YM25058 (*Cystofilobasidium infirmominiatum* YM25058)
- [0032] <400> 2
- [0033] Met Val Lys Ala Val Val Ile Gly Ala Ala Gly Gly Ile Gly Gln Pro
- [0034] 1 5 10 15
- [0035] Leu Ala Leu Leu Met Lys Thr Asn Pro Leu Val Ser Glu Leu Ala Leu
- [0036] 20 25 30
- [0037] Tyr Asp Val Val Asn Ala Pro Gly Val Ala Thr Asp Leu Ser His Ile
- [0038] 35 40 45
- [0039] Asp Thr Pro Ala Gln Val Thr Gly Tyr Leu Pro Ala Asp Gly Gly Leu
- [0040] 50 55 60
- [0041] Glu Lys Ala Leu Lys Gly Ala Lys Ile Val Val Ile Pro Ala Gly Val

[0042]	65	70	75	80
[0043]	Pro Arg Lys Pro Gly Met Thr Arg Asp Asp Leu Phe Lys Ile Asn Ala			
[0044]		85	90	95
[0045]	Gly Ile Cys Arg Asp Leu Ala Lys Gly Ile Ala Ala His Cys Pro Asp			
[0046]		100	105	110
[0047]	Ala Phe Thr Leu Val Ile Ser Asn Pro Val Asn Ser Thr Val Pro Val			
[0048]		115	120	125
[0049]	Phe Ala Glu Val Phe Lys Ala Ala Gly Val Tyr Asp Ala Lys Lys Leu			
[0050]		130	135	140
[0051]	Phe Gly Val Thr Thr Leu Asp Val Val Arg Ser Ser Thr Phe Val Ala			
[0052]		145	150	155
[0053]	Ala Ile Ser Gly Gln Pro Glu Lys Ala Thr Glu Tyr Thr Ile Pro Val			
[0054]		165	170	175
[0055]	Ile Gly Gly His Ser Gly Val Thr Ile Val Pro Leu Leu Ser Gln Ser			
[0056]		180	185	190
[0057]	Val Pro Ala Leu Pro Glu Ala Val Leu Asn Asp Lys Ala Lys Leu Ala			
[0058]		195	200	205
[0059]	Glu Leu Val Lys Arg Ile Gln Phe Gly Gly Asp Glu Val Val Lys Ala			
[0060]		210	215	220
[0061]	Lys Asp Gly Ala Gly Ser Ala Thr Leu Ser Met Ala Tyr Ala Gly Ala			
[0062]		225	230	235
[0063]	Lys Phe Ala Thr Leu Val Leu Arg Ala Val Val Gly Gly Glu Thr Gly			
[0064]		245	250	255
[0065]	Leu Val Ser Pro Ser Tyr Val Ser Leu Ser Ala Asp Ala Glu Gly Gly			
[0066]		260	265	270
[0067]	Lys Ala Val Ala Gly Glu Val Gly Lys Asp Leu Glu Phe Phe Ser Val			
[0068]		275	280	285
[0069]	Lys Val Glu Leu Gly Ala Ala Gly Ile Thr Lys Ile Leu Pro Ile Gly			
[0070]		290	295	300
[0071]	Ser Leu Ser Ala Glu Glu Lys Asp Leu Leu Ala Ala Cys Val Pro Glu			
[0072]		305	310	315
[0073]	Leu Glu Gly Ser Ile Ala Lys Gly Val Ser Phe Ile Lys Asp Ala Asp			
[0074]		325	330	335
[0075]	Ser Lys Leu			
[0076]	<210> 3			
[0077]	<211> 28			
[0078]	<212> DNA			
[0079]	<213> 人工序列(Artificial)			
[0080]	<400> 3			
[0081]	tcggatccat ggtcaaggcc gtcgtcat 28			
[0082]	<210> 4			
[0083]	<211> 26			

-
- [0084] <212> DNA
[0085] <213> 人工序列(Artificial)
[0086] <400> 4
[0087] gtctcgagga gcttgagtc ggcgtc 26

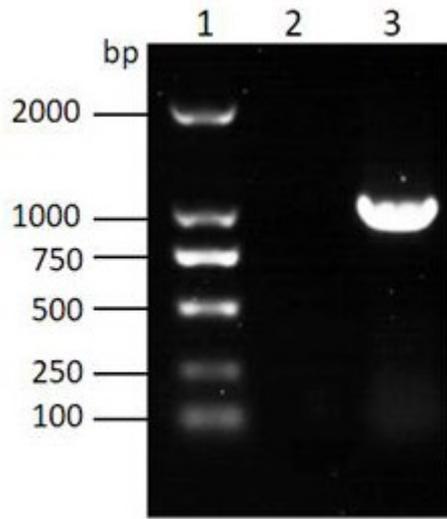


图 1

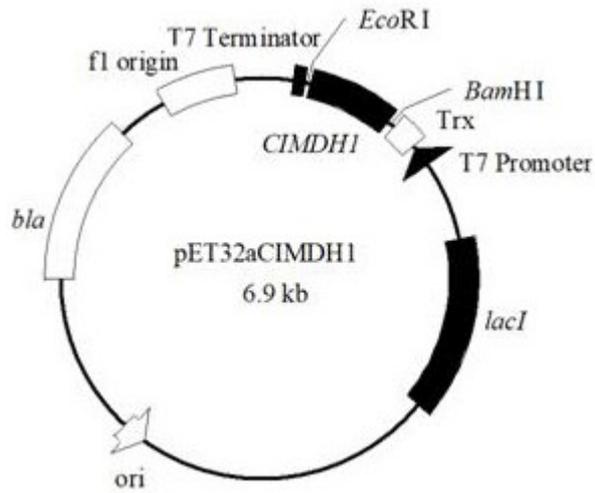


图 2

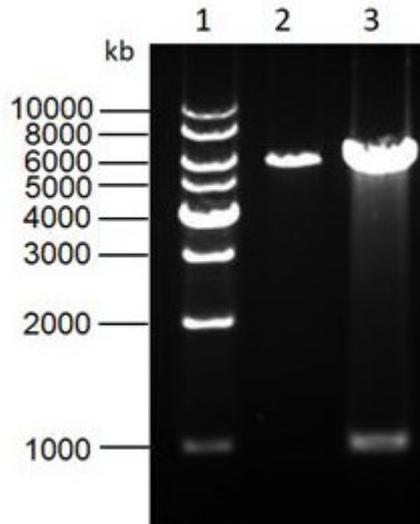


图 3

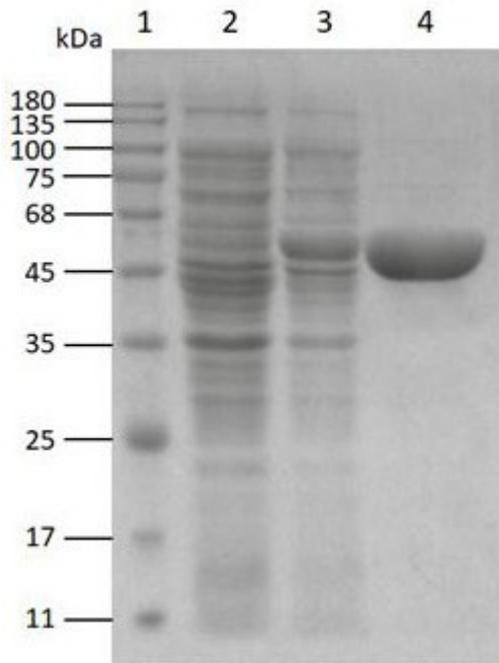


图 4