



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101654679 B

(45) 授权公告日 2012.06.13

(21) 申请号 200910097652.0

WO 9946392 A, 1999.09.16, 全文.

(22) 申请日 2009.04.16

审查员 王启扬

(73) 专利权人 浙江省台州医院

地址 317000 浙江省临海市西门街 150 号台州医院

(72) 发明人 沈波

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务有限公司 33100

代理人 徐关寿

(51) Int. Cl.

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 1/00 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101200502 A, 2008.06.18, 全文.

WO 2007062844 A, 2007.06.07, 全文.

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种抗肿瘤融合基因及其表达蛋白与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种抗肿瘤融合基因及其表达蛋白与应用。本发明提供了包含人 CXCL10-EGF 融合基因重组体的构建,以及含该基因的表达型重组体的工程菌中融合蛋白 CXCL10-EGF 的诱导表达,为重组人 CXCL10-EGF 融合蛋白的大规模制备、纯化提供了技术路线。本发明还提供了其表达蛋白在抗肿瘤药物中的应用。

1. 一种抗肿瘤融合基因,其特征在于该融合基因的核苷酸序列是 SEQID NO:1。
2. 权利要求 1 所述的抗肿瘤融合基因的表达蛋白。
3. 含有权利要求 1 所述抗肿瘤融合基因的表达载体。
4. 权利要求 2 所述的抗肿瘤融合基因的表达蛋白在制备抗肿瘤药物中的应用。

一种抗肿瘤融合基因及其表达蛋白与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种抗肿瘤融合基因及其表达蛋白与应用。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是威胁人类的常见病。近年来,针对受体、基因或关键物质的靶向性治疗药物成为药物研制的重要方向。这类药物主要靶向作用于相关的肿瘤细胞上,它在提高对肿瘤细胞的杀伤力同时可减少了对正常组织细胞的不良作用,被认为是未来癌症治疗中最具前景的研究方向。

[0003] CXCL10 是指在外源性因素(脂多糖等)或内源性炎性因子(IL-1、IFN- α 、IFN- γ)等刺激下,由多种细胞分泌、表达的细胞趋化因子。CXCL10 具有显著的抗肿瘤活性,主要包括以下两方面:介导活化的免疫效应细胞(主要是T淋巴细胞及NK细胞)向CXCL10 的高浓度区进行定向运动;抑制肿瘤血管内皮细胞的增殖、分化,抑制肿瘤的增殖及转移。表皮生长因子受体(EGFR)在很多肿瘤细胞表面特异性高表达(可达正常细胞的100倍),其配体EGF含有三个保守的环状结构,其中第三环是与EGFR结合的部位,又称为EGF受体干扰序列。大量研究已经证实此干扰序列可与EGFR结合,但不具有EGF所具有的刺激肿瘤细胞增殖的活性。

[0004] 中国专利文献CN 101200502A公开了一种用于治疗人类疾病的干扰素诱导型蛋白-10(IP-10或CXCL10)趋化因子类似物的方法,它们可与以CXCR3受体或IP-10类似物作为配体的任何其他受体相结合,因此此类似物可以作为IP-10趋化因子的激动剂或拮抗剂,也可以被用于预防、治疗、或缓解疾病的症状。

发明内容

[0005] 本发明涉及CXCL10-EGF融合基因及其可溶性表达和用途,具体包括所述融合基因的PCR扩增、融合基因转入克隆载体、构建融合基因的表达重组体及工程菌、由此工程菌表达的融合蛋白(即重组人CXCL10-EGF融合蛋白)的分离纯化及此蛋白靶向性抗肿瘤的药用用途。

[0006] 根据EGF受体干扰序列,本发明构建了人CXCL10-loop3-EGF(以下简称:重组CXCL10-EGF)融合基因,并诱导其在大肠杆菌中表达。此融合基因表达的融合蛋白以EGF受体干扰序列编码蛋白作为导向蛋白,既增强此融合蛋白对肿瘤细胞的特异性亲和力,并通过竞争性抑制干扰了天然构象EGF对肿瘤细胞生长、增殖的刺激作用,又融合了CXCL10趋化肿瘤杀伤效应细胞及抑制新生血管的生成的功能,从而更大程度上地发挥了两者的抗肿瘤生物效应。

[0007] 本发明的技术方案通过下述方法和步骤实现:

[0008] 一种抗肿瘤融合基因,其特征在于该融合基因的核苷酸序列是SEQ ID NO:1。

[0009] 所述的抗肿瘤融合基因的表达蛋白属于本发明保护范围。

[0010] 所述抗肿瘤融合基因的表达载体及宿主菌也属于本发明保护范围,表达载体可是

包含该抗肿瘤基因的质粒,宿主菌可选用大肠杆菌。

[0011] 所述的抗肿瘤融合蛋白在制备抗肿瘤药物中的应用属于本发明的保护范围。

[0012] 本发明的详细描述:

[0013] 1、运用 RT-PCR 扩增人 CXCL10 基因

[0014] 从健康献血者的外周血单个核细胞(PBMC)中提取 mRNA,经过 RT-PCR 反应扩增获得 hCXCL10 基因片断。琼脂糖凝胶电泳鉴定及扩增产物割胶回收纯化。

[0015] 2、重组 CXCL10-EGF 融合基因的获得

[0016] 设计 3 条引物:FI、FII 和 FIII。采用引物搭桥法和两步 PCR 法以纯化后的 hCXCL10 为模板扩增融合基因 CXCL10-EGF,并将该融合基因与 pTG19-T 载体连接构建重组 pTG19-T-CXCL10-EGF 质粒,转化大肠杆菌 DH5 α ,经 X-gal 和 IPTG 筛选阳性菌落。

[0017] 3、构建 CXCL10-EGF 融合基因的重组表达载体

[0018] 分别设计上下游引物,菌落 PCR 扩增 CXCL10-EGF 基因,经双酶切回收产物片断后与同样经过双酶切的表达载体 pET32a(+) 体外连接。构建重组 pET32a(+)-CXCL10-EGF 质粒,转化宿主菌大肠杆菌 Origami B(DE3),筛选阳性克隆;提取重组质粒送 DNA 测序分析。

[0019] 4、重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白在工程菌中的表达

[0020] 用 IPTG 诱导重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白表达;融合蛋白以可溶的形式表达于菌体胞浆中,表达水平达 30~40%。SDS-PAGE、Western Blot 鉴定表达蛋白正确。

[0021] 5、融合蛋白 his-CXCL10-EGF 的纯化、酶切

[0022] 收集大量表达 his-CXCL10-EGF 融合蛋白的宿主菌,超声破碎、分离上清中的可溶性表达的融合蛋白,经过镍柱亲和层析纯化融合蛋白,再通过肠激酶酶切去除融合蛋白上 his 标签、再次过镍柱亲和层析获得不带标签的成熟 CXCL10-EGF 融合蛋白。

[0023] 6、通过 CXCL10-EGF 融合蛋白对活化 PBMC 的趋化活性实验及 HUVEC 血管形成抑制实验验证此蛋白的抗肿瘤功能。

[0024] 本发明提供了一种具有结合 EGF 受体、干扰 EGF 对肿瘤细胞的刺激效应,同时又具有 CXCL10 活性的双功能融合蛋白,为治疗 EGFR 高表达的肿瘤提供一种新的低毒性高效的靶向性药物。

[0025] 本发明还提供了包含人 CXCL10-EGF 融合基因重组体的构建及含该基因的表达型重组体的工程菌诱导表达的方法,为重组人 CXCL10-EGF 融合蛋白的大规模制备、纯化提供了技术路线。

附图说明

[0026] 图 1 是重组 pET32a(+)-CXCL10-EGF 质粒鉴定图。

[0027] 图 2 是重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白 SDS-PAGE 图。

[0028] 图 3 是重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白 Western Blot 图。

[0029] 图 4 是重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白纯化后 SDS-PAGE 图。

[0030] 图 5 是重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白酶切 SDS-PAGE 图。

[0031] 图 6 是酶切后重组 CXCL10-EGF 融合蛋白 Western Blot 图。

[0032] 图 7 是 HUVEC 血管形成抑制实验图。

具体实施方式

[0033] 以下结合附图对本发明的技术路线做进一步的阐述,但不仅仅局限于所述的实施例:

[0034] 实施例 1:编码重组人 CXCL10-EGF 蛋白的基因获得

[0035] (1)hCXCL10 基因的获得:

[0036] 健康体检者静脉血 5mL,等量生理盐水稀释后,用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心,收集外周血单个核细胞(PBMC),经 IFN- γ (2000U/mL) 刺激 4h;Trizol 抽提细胞总 RNA,RT-PCR 扩增人 CXCL10 基因。逆转录反应体系 20 μ L,取 1 μ g 总 RNA 作为模板,用 Olig dT 为引物,按常规方法进行扩增。根据 Genebank 上发表的 hCXCL10 cDNA 序列,利用 Primer5.0 软件设计 PCR 引物。上游引物 P1:5' -GAGCCTACAGCAGAGGAACC-3';下游引物 P2:5' -TTTGCTCCCCTCTGGTTTA-3',其扩增片段包含完整 hCXCL10 的编码区。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5min 预变性,94 $^{\circ}$ C 45s、58 $^{\circ}$ C 45s、72 $^{\circ}$ C 1min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min 延伸;反应体系为 50 μ L,各成分常规配制,使用的扩增酶是 Taq 酶。PCR 扩增产物以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并割胶纯化回收得到 346bp 左右的 DNA 片段。

[0037] (2) 重组 CXCL10-EGF 融合基因的获得:

[0038] 设计了 FI、FII 和 FIII 三条引物,均由上海捷瑞生物公司合成。

[0039] 上游引物 FI 为:5' -GTACCTCTCTCTAGAACCGTACG-3';

[0040] 下游引物 FII 为:

[0041] 5' -TACTGACATCGCTCCCCGATGTAGCCAACAACACAGTTGGAACCACCGCCACCAGGAGATCTTTT A-3';

[0042] 下游引物 FIII 为:

[0043] 5' -TTATCATTCACCACCTTCAGGTCTCGGTACTGACATCGCTCCC-3'

[0044] 采用引物搭桥法和两步 PCR 法扩增融合基因 CXCL10-EGF:首先以纯化后 CXCL10 基因为模板,以 FI、FII 为引物,按常规方法进行 PCR 扩增 284bp 基因序列;然后以该基因序列为模板,以 FI、FIII 为引物,用 Ex Taq PCR 试剂盒再次进行 PCR 扩增,得到 312bp 的 CXCL10-EGF 融合基因,并将该融合基因与 pTG19-T 载体连接构建重组 pTG19-T-CXCL10-EGF 质粒。重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α ,经 X-gal 和 IPTG 诱导蓝白筛选平板上的白色阳性菌落。挑取白色单克隆菌落转移至 5mL LB 培养液中 37 $^{\circ}$ C 摇床摇菌培养 8h。

[0045] 人 CXCL 10-EGF 融合基因的 DNA 序列为:

[0046] 1 gtacctctct ctagaactgt acgctgtacc tgcattcagca ttagtaatca acctgttaat

[0047] 61 ccaaggtctt tagaaaaact tgaattatt cctgcaagcc aattttgtcc acgtgtcag

[0048] 121 atcattgcta caatgaaaaa gaagggtgag aagagatgtc tgaatccaga atcgaaggcc

[0049] 181 atcaagaatt tactgaaagc agtttagcaag gaaaggtcta aaagatctcc tggtagcggt

[0050] 241 ggttccaact gtgttggttg ctacatcggg gagcgatgtc agtaccgaga cctgaagtgg

[0051] 301 tgggaatgat aa

[0052] 重组 CXCL10-EGF 融合基因编码的氨基酸序列为:

[0053] VPLSRTVRCISISINQPVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEIIATMKKK

[0054] GEKRLNPESKAIKNLLKAVSKERSKRSPGGGGSNCVVG YIGERC

[0055] QYRDLKWE**

[0056] 实施例 2:融合基因 CXCL10-EGF 表达型重组体 pET32a(+)-CXCL10-EGF 的构建

[0057] 分别设计上下游引物从含有重组 pTG19-T-CXCL 10-EGF 质粒的阳性菌落中 PCR 扩增 CXCL10-EGF 全长基因:p1:5'-GTGGAATTCGTACCTCTCTCTAGAACTGTACGC-3';p2:5'-TTATCATTCCCACCACTCTCGAGTCT-3',两端分别引入 EcoI I 及 XhoI I 酶切位点,经胶回收后分别以 EcoI I 及 XhoI I 双酶切,回收产物片断与同样经双酶切的 pET32a(+) 载体连接,构建重组 pET32a(+)-CXCL10-EGF 表达载体。重组 pET32a(+)-CXCL10-EGF 质粒酶切鉴定结果如图 1 所示,其中条带 1 为 DNA ladder;条带 2 为质粒 pET32a(+)-CXCL 10-EGF 经 EcoI I 及 XhoI I 双酶切的图谱。

[0058] 实施例 3:重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白在大肠杆菌中的表达与鉴定

[0059] 将 pET32a(+)-CXCL10-EGF 表达载体转化宿主菌大肠杆菌 Origami B(DE3),构建工程菌 pET32a(+)-CXCL 10-EGF/OrigamiB(DE3),将此工程菌接种于 5mL LB 培养液(含 100ug/mL 氨苄青霉素)37℃振摇培养过夜,分别取 2mL 菌液抽提质粒送测序鉴定及 10μL 重新接种入 8mL LB 培养液(含 100ug/mL 氨苄青霉素)37℃振摇培养,至菌悬液 OD₆₀₀ 达到 0.6 时,取出 2mL 放入试管 1,其余加入终浓度为 0.05mmol/L 的 IPTG 于 25℃诱导 8h,各取出 2mL 放入试管 2 及试管 3。将试管 3 的菌液 12000rpm 离心 10min 后弃上清,以 20mmol/L Tris-HCl(pH8.0)洗涤 3 次。以超声裂解缓冲液(含 1mmol/L PMSF、1mg/mL 溶菌酶、20mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH8.0)1mL 悬浮细菌反复冻融 3 次后进行超声裂菌(超声时间 5s,间隔时间 5s,功率为 400W,共 10~20 次,视菌体浓度而定),至菌体清亮为止,12000rpm×10min 分别收集上清和沉淀,沉淀加入 200uL 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)混匀。以上试管 1 取全菌、试管 3 取收集的上清(可溶性表达)和沉淀(包涵体表达)、试管 2 取全菌分别加入上样缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH6.8,100mmol/L DDT,2% SDS,0.1% 溴酚蓝,10% 甘油)混匀,100℃沸水浴保持 10min,10000rpm×3min,取上清(5μL)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。并通过考马斯亮蓝 R-250 染色后,观察分析,并照相记录重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白的表达情况(其中 his 为质粒 pET32a(+))上所携带的标签蛋白,用于蛋白纯化),其 SDS-PAGE 电泳结果见图 2,其中条带 1 为蛋白 Mark,条带 2 为经 IPTG 诱导表达的总蛋白(试管 2),条带 3 为经 IPTG 诱导呈可溶性表达的总蛋白(试管 3 上清),条带 4 为经 IPTG 诱导呈包涵体表达的总蛋白(试管 3 沉淀),条带 5 为未经 IPTG 诱导表达的总蛋白(试管 1)。

[0060] Western Blot 分析:未经 IPTG 诱导表达的总蛋白(试管 1)及经 IPTG 诱导呈可溶性表达的总蛋白(试管 3 上清)以 12% SDS-PAGE 进行电泳以 250mA×30min 条件,将蛋白转移至 PVDF 膜上,膜以封闭液(含 5% 脱脂奶粉和 0.5% Tween-20 的 PBS, pH7.5)于 4℃封闭过夜后,加入以封闭液稀释(1:1000)的小鼠抗人 CXCL10 单抗,于室温温育 2h,用封闭液洗膜 3 次后加入以封闭液稀释(1:1000)的 HRP-羊抗小鼠 IgG 于室温孵育 2h,分别用 TBST(20mmol/L Tris-HCl、500mmol/L NaCl、0.25% Tween-20, pH7.4)及 TBS(20mmol/L Tris-HCl、500mmol/L NaCl, pH7.4)洗膜 3 次后,加入 DAB 显色液避光显色 10min,其 WesternBlot 结果见图 4,其中条带 1 为蛋白 Mark,条带 2 为未经 IPTG 诱导,条带 3 为经 IPTG 诱导。

[0061] 实施例 4:工程菌的大量培养及重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白的纯化

[0062] (1) 工程菌大量培养:

[0063] 工程菌 pET32a(+)-CXCL10-EGF/Origami B(DE3) 接种入 200ml LB(含 100ug/mL 氨苄青霉素) 培养液中 37°C 摇床培养。蛋白获取条件及方法同上。

[0064] (2) 可溶性表达融合蛋白 his-CXCL10-EGF 的纯化、除盐及浓缩：

[0065] 将初步纯化的可溶性 his-CXCL10-EGF 融合蛋白经 0.45um 滤器过滤后, 开始进行镍柱亲和层析, 流速调整为每小时 10 个柱体积。样品与等体积 2× 结合缓冲液 (500mmol/L NaCl、20mmol/L Tris-HCl、20mmol/L 咪唑, pH = 7.9) 混合后, 上经洗涤缓冲液 (500mmol/L NaCl、20mmol/L Tris-HCl、20mmol/L 咪唑, pH = 7.9) 预洗涤 5 个柱体积的镍亲和层析柱。用 4 个柱体积的洗脱缓冲液 (500mmol/L NaCl、20mmol/L Tris-HCl、200mmol/L 咪唑, pH = 7.9) 洗脱结合的蛋白, 分管收集洗脱蛋白 1mL/ 管, 直至流过液 A250 < 0.01。用 6 个柱体积的结合缓冲液洗柱。对收集过柱纯化后的样品进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。将鉴定正确的样本管转入截留分子量为 5KD 的超滤管中以 5000g, 离心 15min 除盐及浓缩成 (1/20) 倍体积, 留取浓缩后蛋白进行 SDS-PAGE 电泳鉴定, 鉴定结果如图 3 所示, 其中条带 1 为蛋白 Mark, 条带 2 为纯化后的重组 his-CXCL10-EGF(29KD) 融合蛋白。

[0066] (3) 肠激酶酶切及重组 CXCL10-EGF 融合蛋白纯化、除盐及浓缩：

[0067] 浓缩后重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白经蛋白定量后加入肠激酶 (每 50ug 蛋白加入 1U 肠激酶), 16°C 酶切 16h 切下 his 标签和硫氧还原蛋白成为成熟的重组融合蛋白 CXCL10-EGF。酶切产物过镍亲和层析柱去除 his 标签, 步骤同上, 但分管收集的是穿透液。进行 SDS-PAGE 电泳鉴定; 将鉴定正确的样本转入截留分子量为 5KD 的超滤管中以 5000g 离心力离心 15min 除盐及浓缩成 (1/20) 倍体积。SDS-PAGE 电泳鉴定结果见图 5, 其中条带 1 为蛋白 Mark, 条带 2 为重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白, 条带 3 为重组 his-CXCL10-EGF 融合蛋白经肠激酶酶切 16h, 条带 4 为重组 CXCL10-EGF 融合蛋白酶切后过柱纯化产物。

[0068] (4) 透析：

[0069] 将浓缩蛋白转入透析袋 (截留蛋白分子量为 3KD) 中, 以 PB 缓冲液 (0.2mol/L NaH₂PO₄、0.2mol/L Na₂HPO₄, pH = 7.4) 透析 24h, 每 3h 更换新的 PB 缓冲液。透析后蛋白进行 Western Blot 鉴定, 结果如图 6, 其中条带 1 为蛋白 Mark, 条带 2 为重组 CXCL10-EGF 融合蛋白。

[0070] (6) Transwell 细胞趋化实验：

[0071] 采用密度梯度离心法从人淋巴细胞分离液从外周血中分离 PBMC。经 PHA(8ug/ml) 刺激 3d 后使其中淋巴细胞活化。根据 Transwell 趋化小室下层是否培养 A431 细胞将趋化实验分为 2 组：(1) A431 细胞组：该组又继续分为 4 组, 小室下层分别进行如下处理：实验组加入融合蛋白 CXCL10-EGF(100ng/ml)、阻断实验组先加入 Human EGF 标准蛋白 (100ng/ml) 4h 后换液并加入融合蛋白 CXCL10-EGF(100ng/ml)；以上两组细胞于培养 3h 后均换液以去除处理因素。阳性对照组加入 Human CXCL10 标准蛋白 (100ng/ml), 阴性对照组不加任何蛋白；每组重复 3 个孔。(2) 无 A431 细胞组：该组又分为 3 组, 小室下层分别进行如下处理：实验组加入融合蛋白 CXCL10-EGF(100ng/ml)、阳性对照组加入 Human CXCL10 标准蛋白 (100ng/ml)、阴性对照不加任何蛋白；每组 3 个孔。在小室上层底部铺 Matrigel(100 μ l/ 孔, 冰上操作), 37°C 孵育 1h 待 Matrigel 凝固后, 在其上加入预先活化的 PBMC(5×10⁵/ 孔, 200 μ L)。根据分组情况进行趋化实验。镜下观察 PBMC 是否趋化至小室下层, 趋化 12h 后, 拍照记录, 并收集下层 PBMC 细胞并计数, 计算趋化指数 (chemotatic index, CI), 统计分析

趋化效应。CI = 实验组趋化至下室的上层细胞数 / 对照组趋化至下次的上层细胞数, 当 $CI \geq 2$ 时判断为有趋化效应, 实验结果见表 1。

[0072] (7) HUVEC 血管形成 / 抑制实验:

[0073] 按 M. Lourdes Ponce 的方法进行。加入梯度稀释的重组 CXCL10-EGF 融合蛋白或 Human CXCL10 标准蛋白 (20 μ l/孔): 0ng/ml、50ng/ml、100ng/ml; 每个梯度重复 3 个孔。镜下观察 HUVEC 形成血管情况, 并拍照记录, 结果如图 7 所示, 其中 A、B、C 为 CXCL10-EGFC 融合蛋白处理组, 浓度依次为 0ng/ml、50ng/ml、100ng/ml, D、E、F 为 Human CXCL10 蛋白处理组, 浓度依次为 0ng/ml、50ng/ml、100ng/ml。

[0074] 表 1

[0075]

group	Sub-group	N	CI ($\bar{x} \pm s$)
A431	CXCL10-EGF 组	3	4.35 \pm 0.23*
	阻断实验组	3	1.03 \pm 0.06
	阳性对照组	3	5.01 \pm 0.45*
	阴性对照组	3	1.12 \pm 0.05
Without A431	CXCL10-EGF 组	3	4.63 \pm 0.33*
	阳性对照组	3	5.27 \pm 0.64*
	阴性对照组	3	0.98 \pm 0.05

[0076] 序列表

[0077] <110> 浙江省台州医院

[0078] <120> 一种抗肿瘤融合基因及其表达蛋白与应用

[0079] <130>

[0080] <160>1

[0081] <170> Patent In version 3.3

[0082] <210>1

[0083] <211>324

[0084] <212>DNA

[0085] <213> 人工序列

[0086] <400>1

[0087] gaattcgtac ctctctctag aactgtacgc tgtacctgca tcagcattag taatcaacct 60

[0088] gttaatccaa ggtctttaga aaaacttgaa attattcctg caagccaatt ttgtccacgt 120

[0089] gtcgagatca ttgctacaat gaaaaagaag ggtgagaaga gatgtctgaa tccagaatcg 180

[0090] aaggccatca agaatttact gaaagcagtt agcaaggaaa ggtctaaaag atctcctggt 240

[0091] ggcggtggtt ccaactgtgt tgttgctac atcggggagc gatgtcagta ccgagacctg 300

[0092] aagtgggtggg aatgataact cgag 324

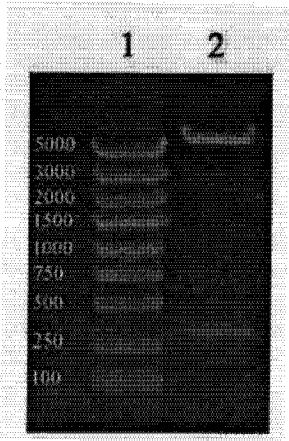


图 1

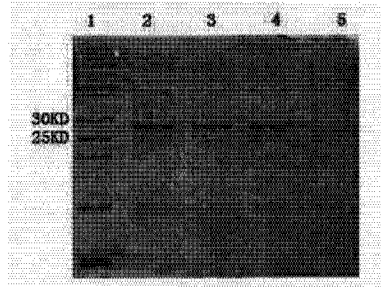


图 2

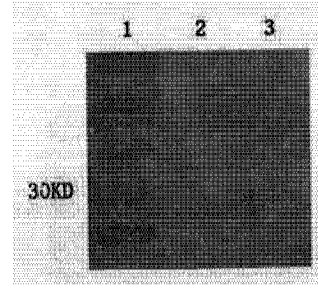


图 3

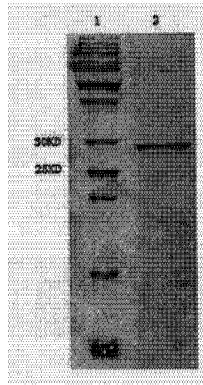


图 4

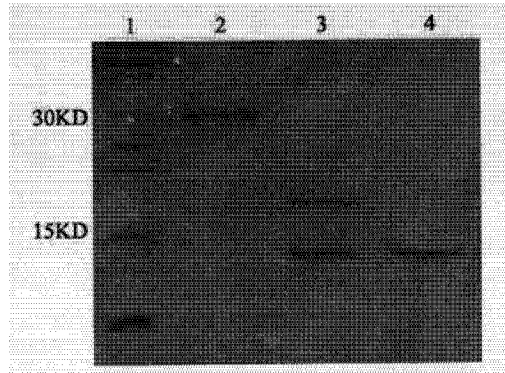


图 5

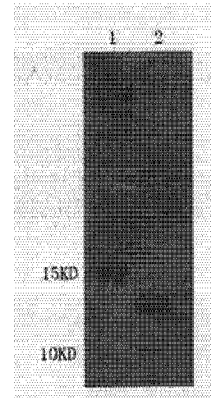


图 6

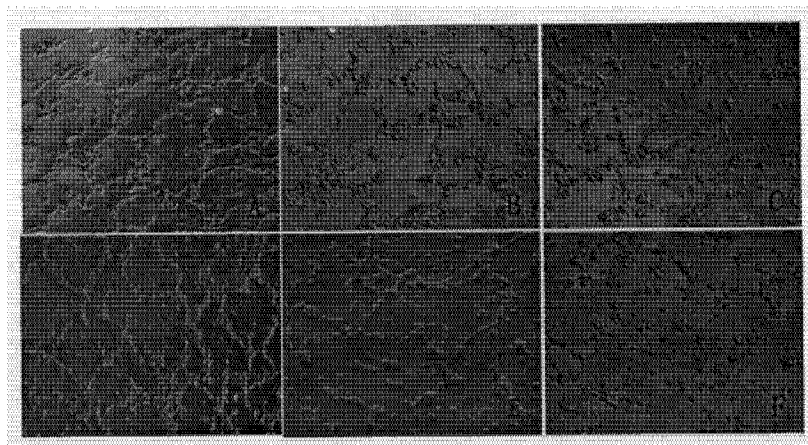


图 7