



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108486060 A

(43)申请公布日 2018.09.04

(21)申请号 201810200387.3

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2018.03.12

(71)申请人 上海宇玫博生物科技有限公司

地址 201313 上海市浦东新区万祥镇宏祥北路83弄1-42号20幢F区1029室

(72)发明人 高博 高翔 李亚楠 宣之胜
张海明 孙多灿

(74)专利代理机构 上海智晟知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 31313

代理人 蔡继清

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/867(2006.01)

A61K 35/17(2015.01)

A61K 47/26(2006.01)

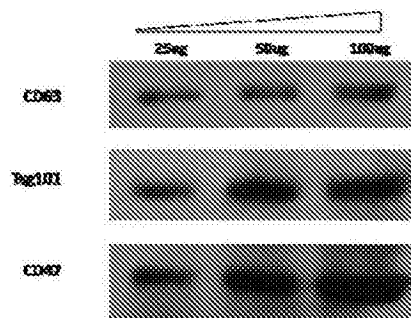
权利要求书1页 说明书14页
序列表10页 附图7页

(54)发明名称

一种用于治疗肿瘤的外泌体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于治疗肿瘤的外泌体及其制备方法和应用。具体地,本发明提供了一种能够显著抑制脑胶质瘤细胞株的生长、和成瘤能力的外泌体及其制备方法。本发明的外泌体能够显著抑制脑胶质瘤细胞株的生长、和成瘤能力。因此,可以用于脑胶质瘤的治疗。



1. 一种用于治疗肿瘤的外泌体,其特征在于,所述外泌体的外泌体膜上含有CD47分子。
2. 如权利要求1所述的外泌体,其特征在于,所述外泌体包裹有siRNA分子或其前体。
3. 如权利要求1所述的外泌体,其特征在于,所述siRNA分子为肿瘤特异性的siRNA分子或其前体。
4. 如权利要求1所述的外泌体,其特征在于,所述siRNA分子靶向BPTF基因。
5. 一种制备外泌体的方法,其特征在于,所述方法包括步骤:
 - (1) 构建慢病毒表达载体其中,所述慢病毒表达载体包含编码CD47的多核苷酸序列;
 - (2) 慢病毒包装将步骤(1)构建的所述慢病毒表达载体包装为病毒颗粒;
 - (3) 构建细胞株实用步骤(2)中获得病毒颗粒感染宿主细胞,从而构建稳定表达CD47的细胞株;
 - (4) 制备外泌体培养步骤(3)中构建的细胞株,收取细胞上清液提取外泌体,从而获得所述外泌体。
6. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述方法还包括步骤:
 - (5) 制备外泌体-siRNA复合物。
7. 如权利要求5所述的方法,其特征在于,所述步骤(5)中,采用电转导的方式,将所述siRNA分子包裹入所述外泌体,从而制得所述外泌体-siRNA复合物。
8. 一种药物组合物,其特征在于,包括药学上可接受的载体和有效量的活性成分,其中所述的活性成分为权利要求1所述的外泌体。
9. 权利要求1所述的外泌体的用途,其特征在于,用于预防或治疗肿瘤。
10. 一种体外非治疗性抑制肿瘤细胞的方法,其特征在于,包括步骤:在权利要求1所述的用于治疗肿瘤的外泌体存在的条件下,培养肿瘤细胞,从而抑制肿瘤细胞。

一种用于治疗肿瘤的外泌体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学和生物医药领域,具体地,本发明涉及一种用于治疗肿瘤的外泌体及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 肿瘤组织由肿瘤细胞及间质构成,肿瘤细胞是由正常细胞转化来的异常增生细胞。肿瘤可发生在人体的许多器官和组织。根据肿瘤对人体危害的大小及其生长特性而分为良性肿瘤和恶性肿瘤两类。

[0003] 良性肿瘤生长缓慢,呈膨胀性生长,表面常有完整包膜,除局部症状外较少全身症状,不向周围组织浸润也不向全身转移,手术切除后不易复发,对机体危害较小,如脂肪瘤、血管瘤、腺瘤、囊肿等。

[0004] 恶性肿瘤生长迅速,生长时常向周围组织浸润,表面几无包膜,常有全身转移,病理检查可见不典型核分裂,除局部症状外,全身症状明显,晚期病人多出现恶病质,手术切除后复发率高,对机体危害大,如骨癌、食管癌、肝癌、肺癌、白血病、骨肉瘤、脑胶质瘤等等。

[0005] 恶性肿瘤是当前严重威胁人类健康和生命的一类疾病,在致癌因素影响下有分裂潜能的细胞,发生恶性转化和克隆增生所形成的新生物。肿瘤的发生往往是机体遗传和环境致癌因素以先后或协同的方式,引起遗传物质DNA的损伤、突变,同时伴随有多个癌基因激活和肿瘤抑制基因的失活,使正常细胞不断增生,转化最终癌变。

[0006] 脑胶质瘤是神经外科中最常见的神经肿瘤,由于肿瘤的恶性增殖能力和侵袭性强而导致目前所有治疗手段(比如手术、放化疗、基因治疗、免疫治疗或其组合的综合措施)均不能根治脑胶质瘤和降低该疾病的高复发率,因此成为神经外科临床治疗的难题和热点研究课题。脑胶质瘤的生物特性取决于内在的基因改变,寻找可靠的肿瘤标记性基因和对脑胶质瘤增殖性、侵袭性、分化等特性做出判断,是脑胶质瘤诊断、预后评定及确定有效治疗措施的重要前提。

[0007] 鉴于肿瘤对人们身体健康具有严重的影响,本领域技术人员致力于开发新的更加有效的肿瘤治疗技术。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种用于治疗肿瘤的外泌体及其制备方法和应用。

[0009] 本发明的第一方面,提供了一种用于治疗肿瘤的外泌体,其中,所述外泌体的外泌体膜上含有CD47分子。

[0010] 在另一优选例中,所述外泌体包裹有siRNA分子或其前体。

[0011] 在另一优选例中,所述siRNA分子为肿瘤特异性的siRNA分子或其前体。

[0012] 在另一优选例中,所述siRNA分子靶向BPTF基因。

[0013] 在另一优选例中,所述siRNA分子靶向BPTF基因中如SEQ ID NO.:3所示的序列。

[0014] 在另一优选例中,所述的肿瘤为脑胶质瘤。

- [0015] 本发明的第二方面,提供了一种制备外泌体的方法,所述方法包括步骤:
- [0016] (1) 构建慢病毒表达载体
- [0017] 其中,所述慢病毒表达载体包含编码CD47的多核苷酸序列;
- [0018] (2) 慢病毒包装
- [0019] 将步骤(1)构建的所述慢病毒表达载体包装为病毒颗粒;
- [0020] (3) 构建细胞株
- [0021] 实用步骤(2)中获得病毒颗粒感染宿主细胞,从而构建稳定表达CD47的细胞株;
- [0022] (4) 制备外泌体
- [0023] 培养步骤(3)中构建的细胞株,收取细胞上清液提取外泌体,从而获得所述外泌体。
- [0024] 在另一优选例中,所述方法还包括步骤:
- [0025] (5) 制备外泌体-siRNA复合物。
- [0026] 在另一优选例中,所述siRNA分子为肿瘤特异性的siRNA分子。
- [0027] 在另一优选例中,所述siRNA分子靶向BPTF基因。
- [0028] 在另一优选例中,所述siRNA分子靶向BPTF基因中如SEQ ID NO.:3所示的序列。
- [0029] 在另一优选例中,所述的肿瘤为脑胶质瘤。
- [0030] 在另一优选例中,所述步骤(5)中,采用电转导的方式,将所述siRNA分子包裹入所述外泌体,从而制得所述外泌体-siRNA复合物。
- [0031] 在另一优选例中,所述步骤(5)中,电转导过程中外泌体颗粒和siRNA用量比为 $10^8 \sim 10^{10}$ 个外泌体颗粒:0.1~10ug siRNA;优选地为 $10^8 \sim 10^{10}$ 个外泌体颗粒:1ug siRNA;最优选地为 10^9 个外泌体颗粒:1ug siRNA。
- [0032] 在另一优选例中,所述步骤(1)中,所述表达载体以FUGW病毒载体为骨架。
- [0033] 在另一优选例中,所述步骤(2)中,慢病毒包装过程中使用的辅助质粒为 pCMV-dR8.2dvpr载体和pCMV-VSV-G载体。
- [0034] 在另一优选例中,所述步骤(2)中,包装细胞为293T细胞。
- [0035] 在另一优选例中,所述步骤(3)中,宿主细胞为HEK293细胞。
- [0036] 在另一优选例中,本发明第一方面所述的用于治疗肿瘤的外泌体通过本发明第二方面所述的方法制备而得。
- [0037] 在本发明的第三方面,提供了一种药物组合物,包括药学上可接受的载体和有效量的活性成分,其中所述的活性成分为本发明第一方面所述的外泌体。
- [0038] 在另一优选例中,所述的药物组合物用于预防或治疗肿瘤。
- [0039] 在另一优选例中,所述肿瘤为脑胶质瘤。
- [0040] 本发明的第四方面,提供了本发明第一方面所述的外泌体的用途,用于预防或治疗肿瘤。
- [0041] 在另一优选例中,所述肿瘤为脑胶质瘤。
- [0042] 在本发明的第五方面,提供了一种体外非治疗性抑制肿瘤细胞的方法,包括步骤:在本发明第一方面所述的用于治疗肿瘤的外泌体存在的条件下,培养肿瘤细胞,从而抑制抑制肿瘤细胞。
- [0043] 在另一优选例中,所述的肿瘤为脑胶质瘤;优选地,所述肿瘤细胞为脑胶质瘤细胞

系(如U-87细胞系和U-251细胞系)。

[0044] 在另一优选例中,所述的抑制肿瘤细胞为抑制肿瘤细胞的生长或抑制肿瘤细胞成瘤。

[0045] 在另一优选例中,与对照肿瘤细胞相比,所述肿瘤细胞中BPTF基因编码蛋白的活性降低10%以上,较佳地降低20%以上,更佳地降低30%以上,更佳地降低40%以上,更佳地降低50%以上,更佳地降低60%以上,更佳地降低70%以上,更佳地降低80%以上,更佳地降低90%以上,最佳地完全没有BPTF基因编码蛋白的活性。

[0046] 在另一优选例中,与对照肿瘤细胞相比,所述肿瘤细胞中BPTF基因的表达降低10%以上,较佳地降低20%以上,更佳地降低30%以上,更佳地降低40%以上,更佳地降低50%以上,更佳地降低60%以上,更佳地降低70%以上,更佳地降低80%以上,更佳地降低90%以上,最佳地完全没有BPTF基因的表达。

[0047] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0048] 下列附图用于说明本发明的具体实施方案,而不用用于限定由权利要求书所界定的本发明范围。

[0049] 图1A显示了针对ATM基因不同靶位的siRNA的敲减效率。

[0050] 图1B显示了针对BPTF基因不同靶位的siRNA的敲减效率。

[0051] 图1C显示了分别敲除BTPF和ATM基因的细胞的增殖水平。

[0052] 图2A显示了免疫荧光鉴定CD47-HEK293细胞。

[0053] 图2B显示了电镜检测的CD47-siRNA-Exosome。

[0054] 图3显示了CD47-siRNA-Exosome的粒径检测结果。

[0055] 图4为Western blot检测CD47-siRNA-Exosome标志性蛋白。

[0056] 图5为外泌体与胶质瘤细胞共孵育荧光显微镜检测结果。

[0057] 图6为外泌体与胶质瘤细胞共孵育MTT检测结果。

[0058] 图7显示了外泌体与胶质瘤细胞共孵育克隆形成检测的结果。

[0059] 图8显示了外泌体与胶质瘤细胞共孵育侵袭能力检测结果。

[0060] 图9显示了外泌体注射成瘤裸鼠实验结果。

具体实施方式

[0061] 本发明人经过广泛而深入的研究,首次发现BPTF基因抑制剂能够显著抑制脑胶质瘤细胞株的生长、和成瘤能力。因此BPTF基因在脑胶质瘤中起到非常重要的作用,是一个新型的脑胶质瘤治疗靶点。在此基础上完成了本发明。

[0062] 术语

[0063] 外泌体

[0064] 外泌体(exosome)是一种广泛存在并分布于各种体液中可由多种细胞分泌的膜性小囊泡,具有脂质双层膜结构,直径一般介于30~120nm之间,包含有细胞特异的蛋白、脂质

和核酸,其能够携带和传递重要的信号分子,形成一种全新的细胞间信息传递系统从而改变其他细胞的功能外,并且在很多生理病理上起着重要的作用。

[0065] BPTF基因及其编码蛋白

[0066] BPTF基因 (NCBI序列号Gene ID:2186) 位于17q24染色体上,是染色体重塑复合体NURF中分子量最大的亚基,可以招募NURF复合体其它亚基到基因的启动子或增强子区,通过调控核小体滑动,促进基因转录。现有的研究发现,BPTF在斑马鱼神经后部化过程中发挥着非常重要的作用。BPTF在功能上和结构上与 Smad2相互作用。BPTF与Smad2协同调节所结合的Wnt8a启动子区的核小体滑动来调控靶基因表达,从而在神经系统发育发挥作用。

[0067] 本发明对脑转移瘤相关的非小细胞肺癌样本进行了基因芯片检测,经过大规模筛选,意外发现BPTF在脑转移瘤中异常表达,说明该基因与脑转移瘤的发病率有关;通过RNAi技术沉默肺胚胎纤维细胞中的BPTF基因后,细胞的克隆形成能力被显著抑制;在肝癌样本中发现BPTF的基因存在突变;在膀胱癌中也发现BPTF存在突变型,针对3株膀胱癌细胞系敲除BPTF后可以显著性的降低细胞的克隆形成能力。

[0068] 在本发明优选地实施方式中,所述BPTF基因的序列如SEQ ID NO.:1所示。

[0069] 在本发明优选地实施方式中,所述BPTF基因编码蛋白的序列如SEQ ID NO.:2 所示。

[0070] 本发明的BPTF基因编码蛋白可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽。

[0071] 如本文所用,术语“RNAi”(RNA interference, RNA干扰)是指在进化过程中高度保守的、由双链RNA (dsRNA) 诱发的、高效特异性降解具有互补配对序列的RNA 的现象。由于使用RNAi技术可以特异性关闭特定基因的表达,所以该技术已被广泛用于探索基因功能和传染性疾 病及肿瘤的基因治疗等领域。dsRNA介导的RNAi 现象在真菌、果蝇、拟南芥、锥虫、水螅、涡虫、斑马鱼等多种真核生物中均有发现,而且在植物中的转录后基因沉默 (posttranscriptional gene silencing, PTGS)、共抑制 (cosuppression) 及RNA介导的病毒抗性、真菌的抑制 (quelling) 现象也均属于 RNAi在不同物种的表现形式。

[0072] 如本文所用,术语“siRNA”(Small interfering RNA, siRNA) 是指一种小RNA分子 (约21-25个核苷酸),可由Dicer (RNA酶III家族中对双链RNA具有特异性的酶) 从其前体 (比如dsRNA、shRNA等) 加工而成,也可由化学方法合成或由其它蛋白加工产生。siRNA是siRISC的主要成员,激发与之序列互补的目标RNA被迅速切割降解,导致目标基因的沉默,因此成为RNAi中的关键功能分子。在给出特定的基因靶位序列的情况下,本领域技术人员可以通过常规的方法设计并获得针对该靶位序列的siRNA。

[0073] 如本文所用,术语“siRNA前体”是指可以在哺乳动物细胞中被加工产生siRNA 的RNA分子,具体地说,是由Dicer或其它类似蛋白选择性加工从而产生成熟的siRNA,进而实施RNAi。

[0074] 如本文所用,术语“构建物”是包含本发明shRNA的构建物。

[0075] 如本文所用,术语“表达盒”是指包含本发明shRNA的编码序列以及与所述编码序列操作性相连的启动子和终止信号的表达盒,所述表达盒在转录后产生本发明的shRNA。

[0076] 如本文所用,术语“miRNA”(microRNA) 是一类由内源基因编码的长度约20-24 个核苷酸的非编码单链RNA分子,在动植物中参与对大量基因的表达调控。到目前为止,在动植物以及病毒中已经发现四千多种miRNA分子。大多数miRNA基因以单拷贝、多拷贝或基因

簇(cluster)的形式存在于基因组中。每种miRNA可以调控多个靶基因,而几种miRNA也可以共同参与调节同一基因,组成复杂的调节网络。据推测,miRNA调节着人类一半以上基因的表达。miRNA存在多种形式,最原始的是pri-miRNA;pri-miRNA经过Drosha加工后,成为pre-miRNA,即miRNA前体,长度大约为50-90个核苷酸;pre-miRNA再经过Dicer酶酶切后,成为长约20-24个核苷酸的成熟miRNA。miRNA主要通过抑制翻译和加速mRNA的脱腺苷酸化抑制靶基因表达,其机制有别于siRNA介导的mRNA降解。

[0077] 在活体中产生“小干扰RNA”(siRNA)的一种办法是,将siRNA序列作为“短发夹”的一部分克隆进质粒载体中。当送入动物体内时,该发夹序列被表达出来,形成一个带有顶端环结构的“双链RNA”(shRNA),被细胞内的Dicer蛋白所识别和加工,产生有功能的siRNA。

[0078] 如本文所用,术语“shRNA”、“shRNA”可互换使用,是以人miR-26b的前体作为骨架构建的一种特殊的shRNA。所述shRNA从5'端到3'端依次为:(a)5'端旁侧序列区;(b)5'端配对siRNA区域;(c)顶端环区域;(d)3'端配对siRNA区域,并且所述5'端配对siRNA区域与3'端配对siRNA区域形成双链区域;(e)3'端旁侧序列区;所述shRNA产生siRNA,且所述siRNA的核苷酸序列对应于所述3'端配对siRNA区域或5'端配对siRNA区域。

[0079] 广义的shRNA是short hairpin RNA的缩写,即,“短发夹RNA”。shRNA包括两个短反向互补序列,中间由一顶端环(loop)序列分隔的,组成发夹结构,通常由细胞内源的RNA聚合酶III(RNAPolymeraseIII)启动子控制转录,shRNA序列的末端连接5-6个T作为RNA聚合酶III的转录终止子。shRNA也可以由其它RNA聚合酶的启动子转录产生。

[0080] 药物组合物

[0081] 本发明提供了一种药物组合物,包括药学上可接受的载体和有效量的以下活性成分:本发明第一方面所述的外泌体。

[0082] 如本文所用,术语“有效量”或“有效剂量”是指可对人和/或动物产生功能或活性的且可被人和/或动物所接受的量。

[0083] 如本文所用,“药学上可接受的”的成分是适用于人和/或哺乳动物而无过度不良反应(如毒性、刺激和变态反应)的,即具有合理的效益/风险比的物质。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给药的载体,包括各种赋形剂和稀释剂。

[0084] 本发明的药物组合物含有安全有效量的本发明的活性成分以及药学上可接受的载体。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。通常药物制剂应与给药方式相匹配,本发明的药物组合物的剂型为注射剂、口服制剂(片剂、胶囊、口服液)、透皮剂、缓释剂。例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。所述的药物组合物宜在无菌条件下制造。

[0085] 本发明所述的活性成分的有效量可随给药的模式和待治疗的疾病的严重程度等而变化。优选的有效量的选择可以由本领域普通技术人员根据各种因素来确定(例如通过临床试验)。所述的因素包括但不限于:所述的活性成分的药代动力学参数例如生物利用率、代谢、半衰期等;患者所要治疗的疾病的严重程度、患者的体重、患者的免疫状况、给药的途径等。通常,当本发明的活性成分每天以约0.00001mg-50mg/kg动物体重(较佳的0.0001mg-10mg/kg动物体重)的剂量给予,能得到令人满意的效果。例如,由治疗状况的迫切要求,可每天给予若干次分开的剂量,或将剂量按比例地减少。

[0086] 本发明所述的药学上可接受的载体包括(但并不限于):水、盐水、脂质体、脂质、蛋

白、蛋白-抗体缀合物、肽类物质、纤维素、纳米凝胶、或其组合。载体的选择应与给药方式相匹配,这些都是本领域的普通技术人员所熟知的。

[0087] 应用

[0088] 本发明提供了一种体外非治疗性的抑制肿瘤细胞的方法,包括步骤:在本发明第一方面所述的外泌体存在的条件下,培养肿瘤细胞,从而抑制肿瘤细胞,所述的肿瘤细胞为脑胶质瘤细胞。

[0089] 在本发明的一个优选例中,所述的抑制肿瘤细胞为抑制肿瘤细胞的生长或抑制肿瘤成瘤。

[0090] 优选地,与对照肿瘤细胞相比,所述肿瘤细胞中BPTF基因编码蛋白的活性降低10%以上,较佳地降低20%以上,更佳地降低30%以上,更佳地降低40%以上,更佳地降低50%以上,更佳地降低60%以上,更佳地降低70%以上,更佳地降低80%以上,更佳地降低90%以上,最佳地完全没有BPTF基因编码蛋白的活性。

[0091] 或优选地,与对照肿瘤细胞相比,所述肿瘤细胞中BPTF基因的表达水平降低10%以上,较佳地降低20%以上,更佳地降低30%以上,更佳地降低40%以上,更佳地降低50%以上,更佳地降低60%以上,更佳地降低70%以上,更佳地降低80%以上,更佳地降低90%以上,最佳地完全没有BPTF基因的表达。

[0092] 本发明的主要优点在于:

[0093] (1)首次提供了一种能够显著抑制脑胶质瘤细胞株的生长、和成瘤能力的外泌体及其制备方法。

[0094] (2)提供了一种高效制备外泌体的方法。

[0095] (3)本发明的外泌体能够显著抑制脑胶质瘤细胞株的生长、和成瘤能力,因此,可以用于脑胶质瘤的治疗。

[0096] 下面结合具体实施例,进一步详陈本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则份数和百分比按重量计。

[0097] 实施例1 基因芯片筛选检测

[0098] 脑胶质瘤和对照组织总RNA样品通过agilent 2100分析后,采用GeneChip 3' IVT Express Kit制备aRNA(amplified RNA)。即通过一链合成得到cDNA,进一步经过二链合成得到双链DNA模板,然后通过体外反转获得带生物素标记的 aRNA(amplified RNA)。将aRNA进行纯化,然后将其片段化后与芯片探针杂交。杂交完成后,对芯片进行洗染,最后扫描得到图片和原始数据,原始数据在进行深度分析,获得最终报告,具体结果见表1。

[0099] 表1

[0100]

基因信息				
基因	描述	变化比率	P 值	
ATM	毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白 (ataxia telangiectasia mutated)	↑ 73%	0.001	***
CDKL3	细胞周期蛋白依赖性激酶 3 (cyclin-dependent kinase-like 3)	↑ 32%	0.002	**
CELF1	CUGBP, Elav 家族成员 1 (Elav-like family member 1)	↑ 49%	0.001	***
CLTC	网格蛋白 (clathrin), 重链(Hc)	↑ 38%	0.012	*
DGKZ	二酰甘油激酶 (diacylglycerol kinase) zeta	↑ 65%	0.002	**
DUSP3	双特异性磷酸酶 3 (dual specificity phosphatase 3)	↑ 43%	0.001	***
EIF3B	真核细胞翻译起始因子 3 亚基 B (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit B)	↑ 31%	0.028	*
EIF3C	真核细胞翻译起始因子 3 亚基 C (eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C)	↑ 64%	0.003	**
ID2	DNA 结合蛋白 2 抑制剂, 显性负螺旋环螺旋蛋白(inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein)	↑ 27%	0.082	
PAK6	p21 蛋白 (Cdc42/Rac) 激活的蛋白激酶 6 (p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6)	↑ 36%	0.091	
BPTF	指转录因子 PHD 布罗莫结构域 (bromodomain PHD finger transcription factor)	↑ 75%	0.001	***
PIN1	肽酰脯氨酰顺/反异构酶, NIMA 结合 1 (peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1)	↑ 21%	0.038	*
PLEKHO1	含有普列克底物蛋白同源结构域, O 家族成员 1 (pleckstrin homology domain containing, family O member 1)	↑ 22%	0.045	*
RBL1	视网膜母细胞瘤样 1 (p107) (retinoblastoma-like 1 (p107))	↑ 68%	0.001	***
SIRT6	长寿因子 6 (sirtuin 6)	↑ 30%	0.032	*
STUB1	STIP1 同源和含 U 盒蛋白 1, E3 泛素蛋白连接酶 (STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase)	↑ 3%	0.778	
TIA1	TIA1 细胞毒性颗粒相关 RNA 结合蛋白 (TIA1 cytotoxicgranule-associated RNA binding protein)	↑ 24%	0.052	
TUBB	微管蛋白 (tubulin, beta class I)	↑ 60%	0.002	**
UHRF2	具有 PHD 泛素样和指环结构域 2, E3 泛素蛋白连接酶 (ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2, E3 ubiquitin protein ligase)	↑ 71%	0.007	**
URG4	细胞增殖正向调节子 (upregulator of cell proliferation)	↑ 50%	0.001	***

[0101] 通过芯片检测病理组样本和正常组样本中的基因表达差异,挑选处理表达差异显著的基因信息,例如肿瘤密切相关的ATM在本次检测中也同样是高表达的,此外,我们还发现BPTF在胶质瘤样品中的表达与ATM的表达情况相似,也是异常的高表达,是一个潜在的靶标基因。

[0102] 针对ATM基因(基因编号:NM_000051)和BPTF基因,本发明人分别设计了多个siRNA进行验证。

[0103] 典型的针对ATM基因的siRNA的靶位信息如下:

[0104] ATM siRNA 1#:GCGATTGGCTTATACGCGC(SEQ ID NO.:5)

[0105] ATM siRNA 2#:GCGCCTGATTCGAGATCCT(SEQ ID NO.:6)

[0106] ATM siRNA 3#:TTACAGTAATTGGAGCATT (SEQ ID NO.:7)

[0107] 通过化学合成针对不同靶位的siRNA,然后转染至U-87胶质瘤细胞系中,通过qPCR检测目的基因ATM的表达丰度,从而筛选出最有效的靶位。

[0108] 筛选结果如图1A所示,结果表明,特异性靶向ATM基因中靶位2(ATM siRNA 2#,KD2)序列的siRNA最有效,敲减效率可以达到60%左右。

[0109] 典型的针对BPTF基因的siRNA的靶位信息如下:

[0110] BPTF siRNA 1#:CAGGAGAGTTCTCAAGTAGAT (SEQ ID NO.:3)

[0111] BPTF siRNA 2#:CAGCACAGAGAAGACCATGAT (SEQ ID NO.:8)

[0112] BPTF siRNA 3#:GAGACTGAGAATGACTCTAAA (SEQ ID NO.:9)

[0113] 通过化学合成针对靶基因的不同siRNA,然后转染至U-87胶质瘤细胞系中,通过qPCR检测目的基因BTPF的表达丰度,从而筛选出最有效的靶点。

[0114] 筛选结果如图1B所示,结果表明,特异性靶向BTPF基因中靶位1(BPTF siRNA 1#,KD1)序列的siRNA最有效,敲减效率可以达到80%左右。

[0115] 进一步地,本申请人使用优选地siRNA分别敲除BTPF和ATM基因,比较了两个基因敲除后对U87胶质瘤细胞的增殖水平。具体的,先通过针对不同基因的siRNA转入胶质瘤细胞系,再通过MTT实验检测不同siRNA靶点对细胞的增殖水平的影响作用。

[0116] 实验结果如图1C所示,通过MTT实验的比较分析,从实验结果中可以看出,针对BPTF敲除后,细胞的增殖水平明显下降,同时也显著优于ATM基因敲减的效果。

[0117] 实施例2 CD47慢病毒载体的构建:

[0118] (1) 以通过CD47cDNA克隆为模板,通过扩增引物进行PCR反应,扩增获得大小~1Kb左右的PCR产物。

[0119] (2) 对PCR产物和FUGW病毒载体(购自Addgene公司)进行BamHI和AgeI的双酶切。

[0120] (3) 过T4DNA连接酶(购自Takara公司)连接后进行转化反应。

[0121] (4) 通过对转化子的鉴定,挑选阳性克隆送测,以测序序列和预期序列一致的作为正确克隆。

[0122] CD47cDNA基因序列如SEQ ID NO.:4所示。

[0123] 实施例3 CD47慢病毒载体的包装:

[0124] (1) 制备慢病毒包装系统中3种质粒的DNA溶液(CD47慢病毒载体20 μ g, pCMV-dR8.2dvpr载体(购自Addgene公司)15 μ g, pCMV-VSV-G载体(购自Addgene公司)10 μ g,与相应体积的Opti-MEM混合均匀稀释,调整总体积为2.5ml,在室温下温育5分钟。

[0125] (2) 取100 μ l Lipofectamine2000(购自invitrogen)试剂在另一管中与2.4ml Opti-MEM(购自invitrogen)混合稀释,在室温下温育5分钟。

[0126] (3) 把(1)中所述稀释后的DNA与(2)中所述稀释后的Lipofectamine2000进行混合,5分钟内轻轻地颠倒混匀。室温下温育20min。

[0127] (4) 将DNA与Lipofectamine 2000混合液转移至293T细胞(购自ATCC)的培养液中,混匀,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱中培养。培养8h后倒去含有转染混和物的培养基,每瓶细胞加入20ml的PBS液,轻轻左右晃动一下培养瓶以洗涤残余的转染混和物,然后倒去。

[0128] (5) 每瓶细胞中加入含10%血清的细胞培养基25ml,于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱内继续培养48小时。

[0129] (6) 收集转染48小时后的293T细胞上清液。于4℃,4000g离心10min,除去细胞碎片。以0.45μm滤器过滤上清液于40ml超速离心管中。把病毒粗提液样品加入到过滤杯中并盖上盖子,将过滤杯插到滤过液收集管中。组合好后,做好平衡,放在转头上。在4000g离心约10-15分钟。离心结束后,取出离心装置,将过滤杯和下面的滤过液收集杯分开。样品收集杯中的即为病毒浓缩液。

[0130] (7) 将病毒浓缩液移出,分装后保存在病毒管中,-80℃长期保存。命名为 LV-CD47。

[0131] 实施例4 稳定株构建

[0132] 稳定细胞株构建,实验步骤如下:

[0133] (1) 在感染前12-18小时,把HEK293细胞(购自ATCC)接种于6孔板中,细胞感染时融合率约为30%-50%。

[0134] (2) 从-80℃冰箱取出病毒,放于冰上融化。

[0135] (3) 按照MOI值100,加入CD47-GFP-LV慢病毒量。

[0136] (4) 混合均匀后放回37℃、5%CO₂培养箱培养72h。

[0137] (5) 感染72小时后筛选单克隆化细胞株。

[0138] (6) 通过GFP筛选完成后冻存细胞株,命名为CD47-HEK293稳定细胞株。

[0139] (7) 通过免疫荧光法检测CD47的表达。

[0140] 图2A显示了免疫荧光鉴定CD47-HEK293细胞的鉴定结果,结果表明本实施例构建的细胞株可以稳定表达目的蛋白。

[0141] 实施例5 外泌体制备和提取

[0142] 更换无血清培养基,持续培养CD47-HEK293稳定细胞株2天以上,收取细胞上清液进行外泌体提取,实验步骤如下:(参考上海宇玫博生物科技有限公司,外泌体提取试剂盒说明书方法操作)

[0143] (1) 去除细胞:稳定细胞株培养上清液4℃/300g离心10分钟,取上清;

[0144] (2) 去除死细胞:去除细胞的上清液4℃/2000g离心10分钟,取上清;

[0145] (3) 去除细胞碎片:去除死细胞的上清液4℃/10000g离心30分钟,取上清;

[0146] (4) 上清液预处理:在去除杂质的离心上清液中加入Exosome Concentration Solution (ECS试剂),每20mL上清液中加入5mL的ECS试剂;

[0147] (5) 沉淀外泌体:重悬液4℃/10000g离心70分钟,沉淀即为外泌体,用适量PBS重悬,分装保存于-80℃冰箱。

[0148] (6) 溶液混合:加入ECS试剂后将离心管盖紧,通过涡旋振荡器混匀1min,再放置于2℃至8℃静置2h;

[0149] (7) 沉淀外泌体:取出装有混合液的离心管于4℃以10000g离心60min,弃上清,沉淀中富含外泌体颗粒;(注:尽可能吸净上清液)

[0150] (8) 外泌体重悬:取100μL 1×PBS均匀吹打离心沉淀物,待其均匀悬浮在PBS中后,将重悬液转移至新的1.5mL离心管中;

[0151] (9) 收获外泌体颗粒:将含有重悬液的1.5mL离心管于4℃以12000g离心2min,保留上清液,该上清液中富含外泌体颗粒。

[0152] (10) 纯化外泌体:将收获的外泌体颗粒粗品转入Exosome Purification Filter

(EPF柱)上室中,于4℃以3000g离心10min,离心后收集EPF柱管底的液体,此液体即为纯化后的外泌体颗粒;

[0153] (11)外泌体的保存:纯化后的外泌体以保存于-80℃低温冰箱中,以备后继实验使用。

[0154] 实施例6 外泌体鉴定

[0155] (1)透射电镜检测

[0156] 将筛选过的外泌体样品按如下处理:

[0157] 固定:2.5%戊二醛固定,2小时;用0.1M磷酸漂洗液漂洗,三次;

[0158] 1%锇酸固定液固定,2小时;用0.1M磷酸漂洗液漂洗,三次;

[0159] 脱水:50%乙醇,20分钟;70%乙醇,20分钟;90%乙醇,20分钟;90%乙醇:90%丙酮(1:1),20分钟;90%丙酮,20分钟;以上在4度冰箱内进行,100%丙酮室温,20分钟;

[0160] 包埋:纯丙酮+包埋液(2:1),室温3小时;纯丙酮+包埋液(1:2),室温过夜;纯包埋液,37℃2小时;

[0161] 固化:37度烘箱内,过夜;45度烘箱内,12小时;60度烘箱内,24小时;

[0162] 切片(超薄切片机切片50-60nm):装上样品,选择刀口,使刀口与样品要平行;检查各夹具锁紧装置,打开锁定开关,通过粗细微调的调节,用手动使样品与刀面接触;加蒸馏水通过水的折光,掌握水面与刀面要平行;转换自动切片操作,拨拢水面上的切片,用氯仿熏;然后用铜网捞起切片;

[0163] 染色:3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色。

[0164] 检测:透射电镜观察照相,拍片。

[0165] (2)纳米激光粒度仪检测

[0166] 将筛选过的外泌体样品按如下处理:(以美国Zetaview粒径仪为例)

[0167] 打开计算机和仪器电源,预热仪器10分钟,然后启动操作软件,设定粒径模式和参数,将筛选过的外泌体样品放入样品池,放置于仪器的嵌入式样品检测装置,合上滑盖,设置检测时间与次数,然后开始检测样品,观察面板前数值,数值在300HZ左右为佳;过低或过高需停止检测,对样品进行适当稀释后,再进行测定。检测完毕后,保存资料。

[0168] (3)Western Blot检测

[0169] 将筛选过的外泌体样品按如下处理:

[0170] 抽提蛋白:向筛选过的外泌体中加入裂解液,4℃裂解15分钟,然后4℃ /12000g离心5分钟,放入100℃水浴20分钟,然后继续4℃下12000g离心2分钟,-20℃保存备用。

[0171] 配置SDS-PAGE:把玻璃板冲洗干净,晾干。把晾干后的玻璃板按要求放入制具,根据蛋白的大小配制SDS-PAGE胶,先配分离胶,玻璃板中加入7ml分离胶,再加2ml无水乙醇,30min后等分离胶充分凝固后再配浓缩胶,弃去玻璃板中的无水乙醇,用滤纸把残留的无水乙醇吸干,加入2ml浓缩胶,然后插入梳齿。

[0172] 上样电泳:等胶凝固后,将其放入电泳槽中,加足够的电泳液后开始准备上样。用双手抓住梳子的两端轻轻用力向上拔去梳子,用1ml的移液器吸入电泳缓冲液轻轻吹洗上样孔,将准备好的样品上样,每个样品取相同总蛋白量,用20ul的移液器垂直于上样孔把样品缓慢加入上样孔内。在电泳槽下部加入适量的电泳液

[0173] 电泳:恒流30mA 2小时

[0174] 免疫印迹:电泳结束后,使用转移电泳装置,在4℃,400mA恒流条件下电转 120分钟,将蛋白转移到PVDF膜上:在医用托盘中倒入500-800ml的电转移缓冲液,把玻璃板从电泳装置中取出来,用胶铲在玻璃板的上端轻轻地把两块玻璃板撬开,把胶的最底端用胶铲轻轻切除,然后用胶铲把胶轻轻托起来放在滤纸上,放置顺序从负极到正极依次放置:滤纸—胶—PVDF膜—滤纸,把治具放入转移电泳装置中,加入1L的电转移缓冲液进行转膜。

[0175] 免疫显色:

[0176] 封闭:在培养皿中倒入40-50ml的封闭液把已经转好的PVDF膜正面向上放入培养皿中,以防止蛋白脱落,PVDF膜要完全浸没在封闭液中,室温封闭1小时。

[0177] 一抗孵育:用PE手套把已封闭好的PVDF膜包起来,加入封闭液稀释的抗体,放在混合器上4度孵育12h。

[0178] 洗膜:把PVDF膜从PE手套中取出来,放入培养皿中,加入40-50ml TBST溶液,放在脱色摇床上轻摇,洗膜3次,每次10分钟。

[0179] 二抗孵育:用封闭液稀释相应的二抗,室温下孵育PVDF膜2小时。

[0180] 显色:采用Amersham公司ECL+plus™ Western blotting system试剂盒进行显色X光显影:在暗房中进行获得显示条带的胶片。

[0181] 加ECL、曝光、显影、定影的具体步骤如下:

[0182] 将PVDF膜置于平铺好的保鲜膜上,以1:40的比例混合A液和B液,配成总体积为1ml,将混合液均匀滴加在PVDF膜上,避光反应5分钟。

[0183] 将膜取出,沥掉多余的ECL底物反应液,不要让PVDF干掉,保持PVDF没有明显的反应液滴,就可以放入暗盒,铺上保鲜膜,关上暗盒,根据ECL的发光程度,选择曝光时间的长短在保鲜膜上做出相应的标记。取出X光片,放入显影液中,约1min后取出,在清水中漂洗几秒钟,后放入定影液中2分钟。

[0184] 戴手套用镊子把X光片从定影液中取出放入65度烘箱烘干,分析。把晾干后的X光片,放入暗盒里,根据之前所做标记用记号笔把蛋白预染marker位置和样品名称标注在X光片上,然后对结果进行分析。

[0185] 图2B显示了电镜检测的CD47-siRNA-Exosome(外泌体)。

[0186] 图3显示了CD47-siRNA-Exosome的粒径检测结果。

[0187] 图4显示了Western blot检测CD47-siRNA-Exosome标志性蛋白的检测结果。

[0188] 实施例7外泌体-siRNA复合物制备

[0189] 1.将适量siRNA加到1.5ml离心管中,再加入外泌体悬液,轻轻混匀。所用比例如下,10⁹外泌体颗粒:1ug siRNA:400uL电转缓冲液)。

[0190] 2.将装有3ml电解缓冲液E的Neon™管插入移液器架中。

[0191] 3.在仪器上设置脉冲电压、脉冲宽度、脉冲数。

[0192] 4.将枪头插入Neon™移液器中,用10μl的枪头吸外泌体混合液,枪头中必须无气泡。将带有样品的Neon™移液器垂直插入Neon™管中。

[0193] 5.选择电穿孔方案,并按下触摸屏上的Start(开始)键。

[0194] 6.电脉冲释放后,触摸屏上会显示完成,提示电穿孔完成。

[0195] 7.将脉冲好的样品立即转移至准备好的装有预热培养基的培养板中。将培养板放到培养箱培养。

- [0196] 8.实验结束后,倒掉移液器中E液,关闭电转仪。
- [0197] 经过实验验证,优选地BTFP siRNA序列如下:
- [0198] CAGGAGAGTTCTCAAGTAGAT (SEQ ID NO.:3)。
- [0199] 实施例8 外泌体-细胞共孵育实验
- [0200] 培养生长状态良好的目的细胞(U-87-GFP稳定株和U-251-GFP稳定株,购自中科院细胞库),前一天将目的细胞分入6-well培养板培养,共孵育当天按实验设计的组别加入外泌体颗粒进行目的细胞的共孵育实验。孵育后荧光显微镜下观察 GFP表达情况。
- [0201] (1) 细胞增殖检测
- [0202] U-87-GFP稳定株和U-251-GFP稳定株是带有绿色荧光,通过Cellomics仪器可以读取带荧光的细胞并拍照,然后通过软件分析处理计算出孔板中不同组别含有的细胞数目。连续检测3-5天后,绘制出细胞生长曲线图,从而呈现出细胞生长状况。
- [0203] a) 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化后,完全培养基重悬成细胞悬液;
- [0204] b) 用血球计数板对细胞计数;
- [0205] c) 根据细胞生长快慢决定铺板细胞密度(多数为2000cell/well)。每组3-5复孔,每孔100 μ l,铺板过程中要确保每孔加入细胞数目的一致;
- [0206] d) 铺好板后,置37 $^{\circ}$ C 5% CO₂培养箱培养;
- [0207] e) 从铺板后第二天开始,每天CELLOMICS检测读板一次,连续检测读板3-5天;
- [0208] f) 通过调整cellomics arrayscan的输入参数,准确地计算出每次扫描孔板中的带绿色荧光的细胞的数量;
- [0209] g) 对数据进行统计绘图,绘出5天的细胞增殖曲线。
- [0210] 图5显示了外泌体与胶质瘤细胞共孵育荧光显微镜检测结果。
- [0211] 图6显示了外泌体与胶质瘤细胞共孵育MTT检测结果。检测结果表明,采用特异性靶向BPTF基因的RNAi,可以显著抑制肿瘤细胞的增殖。
- [0212] (2) 细胞克隆形成检测
- [0213] 通过感染后细胞在细胞培养板上的克隆形成能力来提示慢病毒感染后细胞的成瘤能力。
- [0214] a) 将处于对数生长期的各实验组细胞胰酶消化,完全培养基重悬,制成细胞悬液;
- [0215] b) 血球计数板对细胞悬液进行细胞计数;
- [0216] c) 细胞接种:于6孔板培养板中各实验组接种800个细胞/孔,每个实验组设3个复孔;
- [0217] d) 将接种好的细胞于培养箱中继续培养到14天或绝大多数单个克隆中细胞数大于50为止,中途每隔3day进行换液并观察细胞状态;
- [0218] e) 实验终止前荧光显微镜下对细胞克隆进行拍照;
- [0219] f) 实验终止时PBS洗涤细胞1次;
- [0220] g) 每孔加入1ml多聚甲醛,固定细胞30~60min;
- [0221] h) PBS洗涤细胞1次;
- [0222] i) 每孔加入洁净、无杂质GIEMSA染液500 μ L,染细胞20min;
- [0223] j) ddH₂O洗细胞数次,直至洗净板上背景,晾干;
- [0224] k) 显微镜下拍照单克隆;

- [0225] 1) 数码相机拍照整张板;
- [0226] m) 克隆计数。
- [0227] 图7显示了外泌体与胶质瘤细胞共孵育克隆形成检测的结果。检测结果表明携带有siRNA的外泌体与细胞共孵育后,被细胞进行内吞后,可以有效的抑制细胞的增殖。
- [0228] (3) 细胞侵袭能力检测
- [0229] 从细胞外基质入侵是肿瘤转移的一个重要步骤,肿瘤细胞通过黏附到血管壁并沿着血管壁伸展而开始入侵,蛋白水解酶如MMP胶原酶溶解血管基底膜而允许癌细胞入侵。BD Biocoat™ Matrigel™ Invasion Chamber为检测肿瘤细胞穿过基底膜模型提供一个有效的系统。
- [0230] a) 从冰箱-20℃中取出试剂盒,用70%乙醇消毒镊子取出所需数目的小室到新的24孔板中,放置室温一段时间使其恢复到室温;
- [0231] b) 在小室和下室中各加500μl温育(37℃温育)无血清培养基,37℃培养箱中放置2h使Matrigel基质层再水化;
- [0232] c) 准备细胞悬液:胰酶消化处于对数生长期的各组细胞,用无血清培养基重悬,制成细胞悬液;
- [0233] d) 血球计数板对细胞悬液进行细胞计数;
- [0234] e) 在步骤3再水化后,将小室转移至另一小孔,并小心将小室中培养基去除;
- [0235] f) 加750μl 30%FBS培养基到下室中;
- [0236] g) 加500μl步骤4准备好的细胞悬液(细胞密度根据细胞种类不同加以调整,一般为含5-10*10⁴cell)到每个小室中;
- [0237] h) 在37℃培养箱培养24-48h(根据细胞种类不同加以调整);
- [0238] i) 倒扣小室于吸水纸上以去除培养基,用棉拭子轻轻移去非侵袭细胞
- [0239] j) 加500μl染色液到板的空孔中;
- [0240] k) 将小室浸泡在Gimesa染色液中30min,在膜的下表面染色侵入细胞;
- [0241] l) 准备一个装四分之三体积水的大烧杯中,用小镊子夹取小室来回冲洗,空气中晾干小室;
- [0242] m) 用相机给小室整体拍照,拍照时聚焦很重要;
- [0243] n) 显微镜拍照膜,100X、400X各拍数张(≥5);
- [0244] o) 于96孔板空中加入200uL 10%醋酸,用剪刀和镊子揭下底膜,于180uL 10%醋酸溶解,完全溶解后(用200uL枪头吸吹搅匀),吸取100u1于另一孔中,OD570 检测。
- [0245] 图8显示了外泌体与胶质瘤细胞共孵育侵袭能力检测结果。检测结果表明携带有siRNA的外泌体与细胞共孵育后,被细胞进行内吞后,可以有效的抑制细胞的侵袭能力。
- [0246] 实施例9 外泌体注射成瘤裸鼠实验
- [0247] 肿瘤研究中,最常规的动物实验就是裸鼠成瘤实验,由于大部分肿瘤研究使用的是人类细胞,所以存在异种排除的存在,需要使用免疫缺陷型小鼠作为移植模型的载体,通过对该小鼠的注射肿瘤细胞,使其成瘤,然后再注射外泌体颗粒,观察瘤体的生长来判断其生物学变化。
- [0248] a) 将处于对数生长期的各实验组成瘤细胞胰酶消化后,完全培养基重悬成细胞悬液;

[0249] b) 用血球计数板对细胞进行计数,并最终用一定体积的PBS重悬,使细胞悬液的浓度为 $1\sim 2\times 10^7$ 个细胞/ml;

[0250] c) 用一次性注射器将一定量的细胞悬液注射到裸鼠右侧腋窝,注射的细胞量一般为 2×10^6 个细胞;

[0251] d) 注射后饲养裸鼠至肉眼可见瘤体;(时间为2周左右)

[0252] e) 每天注射外泌体PBS溶液(100ug/ml, 100ul/只)继续饲养4周后,实验结束,收集数据;

[0253] f) 拍照(包括处死后裸鼠荷瘤的照片和瘤体照片);

[0254] g) 对数据进行统计绘图。

[0255] 图9显示了外泌体注射成瘤裸鼠实验结果。检测结果表明携带有本发明的 siRNA 的外泌体注射裸鼠模型后,通过血液循环,可以有效的抑制肿瘤的增殖。

[0256] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

序列表

- <110> 上海宇致博生物科技有限公司
- <120> 一种用于治疗肿瘤的外泌体及其制备方法和应用
- <130> 000000
- <160> 9
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 10914
- <212> DNA
- <213> 智人 (Homo sapiens)
- <400> 1

[0001]

```

egcccccect  ggecececcc  ctcccccttc  gctllccttc  tccccccegc  leggetccga      60
catgaggggc  cggcggggca  ggcgcgccaa  gcagcccgcg  gctcccgcctg  cggagcgcctg   120
egccccggcc  ccgcgcgcc  egcgcgcgcc  gcccacgtcc  ggaccacatcg  gggggctccg    180
ctcgcgcgac  cgcgcgcagc  gccggggcag  gtgggcgcgc  gccccaggctg  aggtggcgc    240
caagacgcgg  ctgagctcgc  ccaggggggg  cagcagtagc  cggaggaagc  cgcgcgcgcc    300
gcgcgcgcgc  cccccagca  ccagcgcgcc  gggcgggggg  ggcgcaggag  gcgggggcgg    360
caggacgggg  ggcggggggc  gcggcggcca  cctggcccgg  accaccgcgg  cccggagggc    420
cgtcaacaaa  gtgggtgtag  atgaccacga  gagcggagg  gaggaggaag  aggaggacat    480
ggtctccgag  gaggaggagg  aggaggacgg  cgacgcgcag  gagaccagg  attctgagga    540
cgacgaggag  gatgagatgg  aagaggacga  cgatgactcc  gattatccgg  aggagatgga    600
agacgacgac  gacgacgcca  gtactgcac  ggaaagcagc  tcaggagcc  atagtaccta    660
cagcagcact  ccaggtaggc  gaaaaccaag  agtacatcgg  cctcgttctc  ctatattgga    720
agaaaaagac  atcccgcgcc  ttgaattcc  caagtcctct  gaggatttaa  tgggtccctaa   780
tgagcatata  atgaatgta  ttgccattta  cgaggtaact  cggaaactttg  gcaactgttt    840
gagattatct  ccttttcgct  ttgaggactt  ttgtgcagct  ctggtgagcc  aagagcagtg    900
cacactcatg  gcagagatgc  atgtttgtct  tttgaaagca  gttctcgcgtg  aagaagcac     960
ttccaatact  acctttggac  ctgctgatct  gaaagatagc  gttaatteca  cactgtatt    1020
catagatggg  atgaagtgcc  cagaggctgc  ggggtgtac  tgtgagagtg  ataaggagta   1080
ccatcacggt  ctctcttacc  aagaggcaga  ggactacca  tatggaccag  tagagaacaa   1140
gatecaaagt  ctacagtttc  tagtegatca  gtttcttaca  acaaatattg  ctgagagga   1200
attgatgtct  gaaggggtga  tacagtatga  tgaccattgt  agggtttgtc  acaaacttgg   1260
ggatttgett  tgcgtgtaga  catgctcagc  agtataccat  ttggaatgtg  tgaagccacc   1320
tcttgaggag  gtgccagagg  acgagtggca  gtgtgaagtc  tgttagcac  acaaggtgcc   1380
tgggtgtagc  gactgtgttg  ctgaaatcca  aaaaaataaa  ccatatattc  gacatgaacc   1440
tattggatat  gatagaagtc  ggagaaata  ctggttcttg  aaccgaagac  tcataataga   1500
agaagataca  gaaaatgaa  atgaaaagaa  aatttggat  tacagacaa  aggtccaact   1560
tgcagaatta  attgactgtc  tagacaaga  ttattgggaa  geagaactct  gcaaaattct   1620
agaagaatg  cgtgaagaaa  tccaccgaca  catggacata  actgaagacc  tgaccaataa   1680
ggctcgggce  agtaacaaat  cctttctgce  ggcagctaat  gaagaattt  tggaatccat   1740
aagagccana  aagggagaca  ttgataatgt  taaaagccca  gaagaaacag  aaaaagcnaa   1800
gaatgagact  gagaatgact  ctaaagatgc  tgagaaaaac  agagaagaat  ttgaagacca   1860
gtcccttgaa  aaagacagtg  acgacaaaa  accagatgat  gaccctgagc  aaggaaaate   1920
tgaggtaggt  gatttcaaat  cggagaagtc  caacggggag  ctaagtgaat  ctctggagc    1980
tggaaaagga  gcatctgget  caactcgaat  catcaccaga  ttgcggaatc  cagatagcaa   2040
acttagtca  ctgaagagcc  agcaggtgce  agccgctgca  catgaagcaa  ataaattatt   2100
taaggagggc  aaagaggtag  tggtagttaa  ctctcaagga  gaaatttcac  ggttgagcac   2160
caaaaaggaa  gtgatcatga  aaggaaatat  caacaattat  tttaaattgg  gtcaagaagg   2220
gaagtategc  gctaccaca  atcaatactc  caacaattca  ttgcttga  ataagcaca    2280
gcacagagaa  gaccatgata  agagaaggca  tcttgcacat  aagttctgtc  tgactccagc   2340
aggagagtic  aaatggaacg  gttctgtcca  tgggtccaaa  gttcttacca  latctactct   2400
gagactgact  ataccccaat  tagaaaacaa  catccttca  tctttcttc  atcccaactg   2460
ggcatcacat  agggcaaat  ggatcaagcc  agttcagatg  ttagcaaac  ccagagaatt   2520
tgcattgget  ttagecattt  tggagtgtgc  agttaaacca  gttgtgatgc  taccaatatg   2580
gcgagaatct  ttaggacata  ccaggttaca  ccgatgaca  tcaattgaaa  gagaagaaaa   2640
ggagaaagtc  aaaaaaaaa  agaagaaca  ggaagaagaa  gaacgatgc  agcaagcgac   2700
atgggtaaaa  tacacatttc  cagttaaagc  tcaggtttgg  aaacaaaaag  gtagagagta   2760
cagagtgaca  ggataatggt  gttggagctg  gattagtaaa  actcatgttt  ataggtttgt   2820
tctaaaatlg  ccaggcaata  ctaalgtaa  ttacagaaag  tctttagaag  gaaccaaaaa   2880
taatatggat  gaaaatatgg  atgagtcaga  taaaagaaaa  tgttcacgaa  gtccaaaaaa   2940
aataaaaaata  gaccctgatt  ctgaaaaaga  tgagtaaaa  gtttcagatg  ctgcaaaagg   3000
agcagaccaa  aatgaaatgg  atatctcaaa  gattactgag  aagaaggacc  aagatgtgaa   3060

```

[0002]

ggagctotta	gattotgaca	gigataaacc	ctgcaaggaa	gaaccaatgg	aagtagacga	3120
tgacatgaaa	acagagtcac	atgtaaattg	tcaggagagt	tetcaagtag	atgtggctca	3180
tgtagtgag	ggttttcac	taaggactag	ttacaaaaag	aaaacaaaat	catccaaact	3240
agatggactt	cttgaanagga	gaattaaaca	gittacactg	gaagaaaaac	agcgactcga	3300
aaaaatcaag	tiggagggtg	gaattaaggg	tataggaaa	acttetacaa	attcttcaaa	3360
aaatctctct	gaatcaccag	taataacgaa	agcaaaaagaa	gggtgtcaga	gtgactcgat	3420
gagacaagaa	cagagcccaa	atgcaataa	tgatcaacct	gaggacttga	ttcagggatg	3480
ttcagaagt	gattctcag	ttcttagaant	gagigatect	agtcatacca	caaacaaact	3540
ttatccaaaa	gacagagtgt	tagatgatgt	ctccattcgg	agcccagaaa	caaaatgtcc	3600
gaacaaaaat	tccattgaaa	atgacataga	agaaaaagtc	tctgaccttg	ccagtagagg	3660
ccaggaaacc	agtaagagta	aaacaaaagg	aaatgatttt	ttcatcgtg	actctaaact	3720
agccagtgea	gatgatattg	gtactttgat	ctglaagAAC	aaaaaacccg	tcatacagga	3780
ggaagtgac	accattgttt	cttcttccaa	gagtgcttta	catcctcag	tgcctaaaag	3840
taccaatgac	agagatgcea	cacctctgtc	aagagcaatg	gactttgaag	gaaaactggg	3900
atgtgactct	gaatctaaata	gcactttgga	aaatagttct	gataccgtgf	ctatctcagga	3960
ttagcagtga	gaagatattg	ttgttcagaa	tagcaatgaa	agcatttctg	aaacagttcag	4020
aactcgagaa	caagatgttg	aagctctgga	gcccgttaaag	tgtgagttgg	tttctgggtga	4080
gtccactgga	aaactgtgag	acaggtgcc	ggtcaagggg	actgaagcaa	atggtaaaaa	4140
accaagtfcag	cagaaagaaat	tagaggagag	accagttaat	aaatgtagtg	atcaaataaa	4200
gctaaaaaat	accactgaca	aaaagaataa	tgaaaaatcga	gagctgaaa	agaaggaca	4260
gagaaccaagt	acatttcaaa	taaatggaaa	agataataaa	cccaaaatat	atttgaagg	4320
tgaatgettg	aaagaaattt	ctgagagttag	agtagtaagt	ggtaatgttg	aaccaaaggt	4380
taataatata	aataaataa	tccctgagaa	tgatattaaa	tcattgactg	ttaaagaatc	4440
tgetataagg	ccattcatta	atggatgatg	catcatggaa	gattttaatg	aaagaaacag	4500
ctccgaaca	aaatgcatt	tgetgagttc	ttcagatgct	gaaggtaact	accgagatag	4560
ctttgagacc	ctgccateaa	ccaaagagtc	tgacagtaca	cagacacca	cacctcagc	4620
atcttgtcca	gaaagcaatt	cagttaatca	ggtagaagat	atggaaatag	aaacctcaga	4680
agttaagaaa	gttacttcat	cacctattac	ttctgaagag	gaatctaatc	tcagtaatga	4740
ctttattgat	gaaaatggtc	tgccatecaa	caaaaatgaa	aatgteaatg	gagaatctaa	4800
aaagaaaacc	gtcatcacag	aagtcaccac	gatgacctcc	acagtgggcc	cagaatcaaa	4860
aaetgtgatc	aaggttagaaa	aaggegataa	gcaaaactgtg	gtttcttcca	cagaaaaattg	4920
tgcaaaatcc	actgtcacia	ccaccactac	aacagtgacc	aagctttcca	cacctccac	4980
agcgccagtg	gtggacatca	tctctgtaaa	ggagccagagc	aaaaccgtgg	tcaccacgac	5040
agtgaacagc	tccctgacca	ccaccgggag	caactgggt	acatctatga	ctgtgagcaa	5100
agagatctcc	acacagagaca	aagtgaact	gatgaaattt	tcaagacca	agaagactcg	5160
ttcaggtaca	getctgccat	ccatagaaaa	atttgttacc	aagagcagea	agaagagcat	5220
tttgttttg	ccaaatgatg	actlaaaaaa	gttggcccga	aaaggaggaa	tcagagaggt	5280
ccctatttt	aattacaatg	caaaactgc	tttgatata	tgccatate	cttctcctag	5340
accgaccttt	ggcatcaett	ggaggtatag	acttcagaca	gtaaagctct	tagctggagt	5400
gagctgatg	ttacggttac	tgtgggcaag	tttgagatg	gatgatatg	cgcccaagcg	5460
tctccagga	ggagggacta	caeggacaga	aaatctcgaa	actgaaatec	caacaacaga	5520
aaataatag	aggagagatg	ttggtctta	tggeattcga	tctgaatatt	gtatcaggaa	5580
aatcatttgt	cccattggag	tccagaaaac	accaaaaagaa	acgectacac	ctcagaggaa	5640
aggecttcca	tcaagtgcac	tgcggccaaa	gagaccagaa	acgcccagc	aaactggccc	5700
tgtaattatl	gaaacctggg	tagcagaaga	agaactggaa	ttgtgggaga	tcagggcatt	5760
tgtctagaga	gtggagaaag	aaaaggcaca	agcagttgag	caacaggeta	agaaacgact	5820
ggagcagcag	aagccgacag	tgattgcac	ttccactact	tcccaacaa	gcagtacaac	5880
cagcaccatc	tctccagcac	agaaggttat	ggtggcccc	ataagtgget	cagttacaac	5940
tgaaccaaa	alggtaacta	ctaclaaagt	tggatctcca	gtacagtaa	catctcaaca	6000
aaacaagaac	tttcatcaaa	cttttctac	atgggttaag	caaggccagt	caaatcagg	6060
cgttgttcaa	gtacagcaga	nagtcctggg	tatcattcca	tcaagtacag	gtaccagtca	6120
geaaaccttt	acttcattcc	ageccaggac	ageaacagtc	acaattagcc	ccaatactct	6180
aggetctgga	ggaaccacaa	gcaattcaca	agtaateaca	gggctcaga	ttcgcctgg	6240
tatgaccgtg	attagaacac	cactccaaca	gteaacacta	ggaaaggcaa	ttatctgaac	6300
acctgtgatg	gtacagccag	gtgetctca	gcaagtgatg	actcaaatca	tcaggggcca	6360
gctgtctec	actgcagtet	cgcccctaa	caaggtttcc	tcaacacctg	ggcagaaaag	6420
cttaacttca	gcaacgtcca	cttcaaatat	acagcttcca	gcctcaaac	cccctgccc	6480
ccacaagga	caagtgaagc	tcaccatggc	tcaacttact	cagttaacac	agggccacgg	6540
tgcaatcaa	ggtttgacag	tagtaattca	aggacaaggt	caaacactg	gacagttgca	6600
gttgataact	caagggtga	ctgactccc	aggeccagcg	cagcagctaa	tgcaagetgc	6660
aatgccaaat	ggtactgttc	agcgattctc	ctttacecca	ttggcaacaa	cagccaccac	6720
agccagcacc	accaccacca	ctgtttccac	gacagcagca	ggtacaggtg	aaacaaggca	6780
gagttaaactg	tcaccccaga	tgacagtaaa	tcaagacaaa	accctgccac	cagctcagtc	6840
atcaagtggtg	ggtccagcag	aagcccagcc	acagactgct	cagcctcag	ctcagcccca	6900
gecccaaac	cagcccagct	cccagctca	gctgaagtt	cagactcagc	ctgaagttca	6960
gaeccaaaac	actgtttcat	cccattgtccc	ttctgaagca	caaccaccac	acgcacagtc	7020
atccaagccc	caagttgcag	caacgtctca	gctcaaaagt	aatgtccaag	gacagctctc	7080
tgttcgtgct	caaagttccat	caacagctcg	aatacgtcca	tcaactccat	cccactgtc	7140

[0003]

tectggacaa	caateccagg	ttcagactac	aacctcaaaa	cogattccaa	tteaaccaca	7200
tacatcfctt	cagatacctt	cccaggcca	gccacagtc	caaccccagg	tacagtcttc	7260
aaetcaaaact	ctttcatcag	gacnaacttt	aaatcaagtt	actgtttcat	ccccatccc	7320
teetcagcta	caaatacagc	agccacagcc	ccaagtcatt	getgtgcctc	agctgcaaca	7380
acaagtcag	gttctctctc	agatccagtc	acaggtttgt	getcagatac	aggetcagea	7440
aagtgggtgtg	ccccagcaaa	tcaaacctca	gttaacctate	caaatlcage	aaagcagltgc	7500
tgtgcagact	caccagattc	agaatgtggt	tacagtgeag	gcagccagtg	tgcagagca	7560
gttgcaaaagg	gttcagcaac	tcagggatca	gcagcaaaaag	aaagaaacagc	aacagataga	7620
aattaaagcgt	gaacacacec	tcvaagcttc	taatcaaaagt	gaaatcatlc	agaaacaggt	7680
ggtgatgaag	cataatgctg	taatagaaca	tttaaaacag	aaaaagagca	tgactccagc	7740
tgaagagaa	gagaatcaaa	gaatgattgt	ctgtaaceag	gtgatgaagt	atattttggg	7800
taagatagat	aaagaagaaa	aacaggcagc	aaaaaaaaegg	aagcgtgaag	agagtgtgga	7860
gcagaaacgl	agcaagcaga	atgccactaa	getgtcagct	ctgctcttca	agcaaaaaga	7920
gcagctcaga	gcccagatcc	tgaagaagag	agcactectg	gacaaggate	tgeaaattga	7980
agtgcaggaa	gagctgaaga	gagacctgaa	aattaagaaa	gaaaaagacc	tgatgcagtt	8040
ggctcaggec	acagcagtag	ctgcacctg	ccccccagtg	acaccagete	ctecageccc	8100
tecagcccct	ccaccttcac	ctccccctcc	acctgctgtg	caacacacag	gccttctgtc	8160
cacgcccacc	ttacctgctg	cttcccagaa	gaggaaagcg	gaagaggaaa	aagactccag	8220
ctcaaaagtc	aagaaaaaga	aaatgatctc	taetacctca	aaggaaacta	agaaggacac	8280
aaagctttac	tgtatctgta	aaagcctta	tgatgaatct	aaattitata	ttgctgtga	8340
tcgggttcag	aattggtagc	atgggcctg	cgttggeate	ttgcaaatgt	aggcagagct	8400
cattgatfag	fatgtctgtc	caacgtgcca	gteaacagag	gatgccatga	cagtgetcac	8460
gccaactaaca	gagaaggatt	atgagggttt	gaagagggtg	ctccgttcc	tacaggccca	8520
taagatgccc	tgccccttcc	ttgaaccagt	agacctaat	gatgcaccag	attatlatgg	8580
gttatttaag	gaacctatgg	acctggccc	catggaagaa	agagtacaaa	gacgatatta	8640
tgaanaagctg	acggaatttg	tggcagatat	gaccaaaaat	ttgataact	gtcgttacta	8700
caatccaagt	gactccccat	ttaccagtg	tgcagaagtt	ctcgaatcat	tctttgtaca	8760
gaaattgaaa	ggcttcaaaag	ctagcaggtc	tcataacaac	aaactgcagt	ctacagcttc	8820
ttaaagttca	gcgtgttaac	ctaacataaa	acacageaag	aatctggttg	tctgaactat	8880
ttfaaattaa	ggagccagat	gtttttagtc	aggetatctc	gacangactt	gacctaaact	8940
tcgtttttat	tggtcataac	agtecaatta	tattcttggc	caattttgct	caacggacaa	9000
gaaaaaagca	aagtcaacga	caccattatc	ttgtcaagat	cagatggttt	tactattgtg	9060
gcagaaagca	gaaaactttg	ttatttga	aaaaaagaaa	aagaaagcaa	gaaaaaaaga	9120
tactatgggg	tcaangttaa	ctccatggaa	atgccaegtc	tgtctctcag	tgaagaagct	9180
ggtttagagt	ctcacagaaa	acttttgact	gtalltatt	atgltgca	aaaagacgt	9240
tttttattgc	tgcctcatt	tgtcagctaa	ttatttttct	ttataaaatc	agccccgggt	9300
tacatataaf	catctgtatc	ttatctgat	tcctgtaggt	aaaagtacaa	gacgacctct	9360
agatgtcttt	tctttctatg	aaaggagctg	ctatgtacac	atgtgcacac	acacacaact	9420
gggaatcaac	aatgagttta	ttgttcatgg	tagattaaaa	ttaaagctgc	ataaagltg	9480
ggctaaagtc	tcttgagcta	cagactctgt	tgccttgaat	ataacagtac	aatttgtcaa	9540
ttactctgca	ccagctaaa	atgagtaaaa	tctatttgaa	ggtatcttgt	ttgtaaacat	9600
ttgtcagatt	ctaatttttt	tcttttctat	taaaattcaa	ctatggatgt	atatgaaaca	9660
aaataaatgg	agataaattt	tctcccacag	acagaggtgt	ctttgaaatg	gcgctaatga	9720
ttatctgtaa	gcctttgttg	ggaggagagc	ctgcaaggtc	atgaaaggea	gaagagctca	9780
atfctgectg	gattctctca	ggacagcagt	ggcccctctg	ttatcattc	ecagteactt	9840
gtcatcactg	cagagaaaaa	tcttcagggg	tgcataactc	gttgcactag	ttgatcaca	9900
taacgagaac	ggtaatgcca	caagatacac	attgccttca	tctgtacatt	ctgtgatacc	9960
aggcaaafta	ccaattacac	acagctactt	atattttatg	aagggcattt	tttagatgac	10020
ctcatctctt	gtgttatttg	ttgattgggt	ttgtttctg	ttgttgggt	tgittgttct	10080
ttccagttaa	ggaaaagtag	tgtaaaacagt	agcgagaaaa	tggaaaccac	agaggaagat	10140
gtattttgca	tgttttctct	ttcagtgctc	ttacacgttg	tatcactgca	ttgtggtaat	10200
agcttctata	aaactgcca	tagttggatt	atgcagcttt	gcaaaaattt	ttactagatt	10260
ttgcaactaac	tcataatgagc	ttgtctctac	caacttctgg	aatttatcta	attattgttt	10320
ttcaaaagttt	ctttctcttt	aatgtttccc	tgcatagcaa	aaacttctcc	agacctcagt	10380
ttcttaaaag	aaagatggtg	ctacagttcc	cgattcttct	ttattacagg	ctcaggtgta	10440
caggttatct	tgggttaatt	ttatctaatg	aagccattc	ctttttgtac	ataaagatgt	10500
cacttaaaact	tatgcttaca	aactaaagac	taategetca	atatgaaaac	atgaaaaaat	10560
ttttgcttaa	agtattaaga	tgaagtagt	taaatatggg	ttattttgct	cttttacttt	10620
tttaaaaaat	gttacatatt	gtagcactg	tgtgatgca	agaattctac	attttaatga	10680
gttataaaat	tattctgcatt	ctcatcagct	cacagtattt	ctgtactatt	tattctatata	10740
tataaaatata	tatggctta	atcatttaaa	atttggctgca	gcaagaactt	tctacctgt	10800
aggcaataga	tgtctatgtt	tttaacaaat	tgtggcaaat	tctaaacagc	aattcttttg	10860
tacgtaafag	gacatttcat	cctagaaaaa	taaagtaatg	tttttgacat	tgga	10914

- <210> 2
- <211> 2920
- <212> PRT
- <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2
 Met Arg Gly Arg Arg Gly Arg Pro Pro Lys Gln Pro Ala Ala Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Glu Arg Cys Ala Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Thr
 20 25 30
 Ser Gly Pro Ile Gly Gly Leu Arg Ser Arg His Arg Gly Ser Ser Arg
 35 40 45
 Gly Arg Trp Ala Ala Ala Gln Ala Glu Val Ala Pro Lys Thr Arg Leu
 50 55 60
 Ser Ser Pro Arg Gly Gly Ser Ser Ser Arg Arg Lys Pro Pro Pro Pro
 65 70 75 80
 Pro Pro Ala Pro Pro Ser Thr Ser Ala Pro Gly Arg Gly Gly Arg Gly
 85 90 95
 Gly Gly Gly Gly Arg Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly His Leu Ala
 100 105 110
 Arg Thr Thr Ala Ala Arg Arg Ala Val Asn Lys Val Val Tyr Asp Asp
 115 120 125
 His Glu Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Met Val Ser Glu Glu
 130 135 140
 Glu Glu Glu Glu Asp Gly Asp Ala Glu Glu Thr Gln Asp Ser Glu Asp
 145 150 155 160
 Asp Glu Glu Asp Glu Met Glu Glu Asp Asp Asp Ser Asp Tyr Pro
 165 170 175
 Glu Glu Met Glu Asp Asp Asp Asp Ala Ser Tyr Cys Thr Glu Ser
 180 185 190
 Ser Phe Arg Ser His Ser Thr Tyr Ser Ser Thr Pro Gly Arg Arg Lys
 195 200 205
 Pro Arg Val His Arg Pro Arg Ser Pro Ile Leu Glu Glu Lys Asp Ile
 210 215 220
 Pro Pro Leu Glu Phe Pro Lys Ser Ser Glu Asp Leu Met Val Pro Asn
 225 230 235 240
 Glu His Ile Met Asn Val Ile Ala Ile Tyr Glu Val Leu Arg Asn Phe
 245 250 255
 Gly Thr Val Leu Arg Leu Ser Pro Phe Arg Phe Glu Asp Phe Cys Ala
 260 265 270
 Ala Leu Val Ser Gln Glu Gln Cys Thr Leu Met Ala Glu Met His Val
 275 280 285
 Val Leu Leu Lys Ala Val Leu Arg Glu Glu Asp Thr Ser Asn Thr Thr
 290 295 300
 Phe Gly Pro Ala Asp Leu Lys Asp Ser Val Asn Ser Thr Leu Tyr Phe
 305 310 315 320
 Ile Asp Gly Met Thr Trp Pro Glu Val Leu Arg Val Tyr Cys Glu Ser
 325 330 335
 Asp Lys Glu Tyr His His Val Leu Pro Tyr Gln Glu Ala Glu Asp Tyr
 340 345 350
 Pro Tyr Gly Pro Val Glu Asn Lys Ile Lys Val Leu Gln Phe Leu Val
 355 360 365
 Asp Gln Phe Leu Thr Thr Asn Ile Ala Arg Glu Glu Leu Met Ser Glu
 370 375 380
 Gly Val Ile Gln Tyr Asp Asp His Cys Arg Val Cys His Lys Leu Gly
 385 390 395 400
 Asp Leu Leu Cys Cys Glu Thr Cys Ser Ala Val Tyr His Leu Glu Cys
 405 410 415
 Val Lys Pro Pro Leu Glu Glu Val Pro Glu Asp Glu Trp Gln Cys Glu
 420 425 430
 Val Cys Val Ala His Lys Val Pro Gly Val Thr Asp Cys Val Ala Glu
 435 440 445
 Ile Gln Lys Asn Lys Pro Tyr Ile Arg His Glu Pro Ile Gly Tyr Asp
 450 455 460
 Arg Ser Arg Arg Lys Tyr Trp Phe Leu Asn Arg Arg Leu Ile Ile Glu
 465 470 475 480
 Glu Asp Thr Glu Asn Glu Asn Glu Lys Lys Ile Trp Tyr Tyr Ser Thr
 485 490 495
 Lys Val Gln Leu Ala Glu Leu Ile Asp Cys Leu Asp Lys Asp Tyr Trp
 500 505 510
 Glu Ala Glu Leu Cys Lys Ile Leu Glu Glu Met Arg Glu Glu Ile His
 515 520 525
 Arg His Met Asp Ile Thr Glu Asp Leu Thr Asn Lys Ala Arg Gly Ser

[0004]

530
 Asn Lys Ser Phe Leu Ala Ala Ala Asn Glu Glu Ile Leu Glu Ser Ile
 545
 Arg Ala Lys Lys Gly Asp Ile Asp Asn Val Lys Ser Pro Glu Glu Thr
 550
 Glu Lys Asp Lys Asn Glu Thr Glu Asn Asp Ser Lys Asp Ala Glu Lys
 565
 Asn Arg Glu Glu Phe Glu Asp Gln Ser Leu Glu Lys Asp Ser Asp Asp
 580
 Lys Thr Pro Asp Asp Asp Pro Glu Gln Gly Lys Ser Glu Val Gly Asp
 595
 Phe Lys Ser Glu Lys Ser Asn Gly Glu Leu Ser Glu Ser Pro Gly Ala
 610
 Gly Lys Gly Ala Ser Gly Ser Thr Arg Ile Ile Thr Arg Leu Arg Asn
 625
 Pro Asp Ser Lys Leu Ser Gln Leu Lys Ser Gln Gln Val Ala Ala Ala
 630
 Ala His Glu Ala Asn Lys Leu Phe Lys Glu Gly Lys Glu Val Leu Val
 645
 Val Asn Ser Gln Gly Glu Ile Ser Arg Leu Ser Thr Lys Lys Glu Val
 660
 Ile Met Lys Gly Asn Ile Asn Asn Tyr Phe Lys Leu Gly Gln Glu Gly
 675
 Lys Tyr Arg Val Tyr His Asn Gln Tyr Ser Thr Asn Ser Phe Ala Leu
 680
 Asn Lys His Gln His Arg Glu Asp His Asp Lys Arg Arg His Leu Ala
 695
 His Lys Phe Cys Leu Thr Pro Ala Gly Glu Phe Lys Trp Asn Gly Ser
 705
 Val His Gly Ser Lys Val Leu Thr Ile Ser Thr Leu Arg Leu Thr Ile
 710
 Thr Gln Leu Glu Asn Asn Ile Pro Ser Ser Phe Leu His Pro Asn Trp
 715
 Ala Ser His Arg Ala Asn Trp Ile Lys Ala Val Gln Met Cys Ser Lys
 725
 Pro Arg Glu Phe Ala Leu Ala Leu Ala Ile Leu Glu Cys Ala Val Lys
 730
 Pro Val Val Met Leu Pro Ile Trp Arg Glu Ser Leu Gly His Thr Arg
 735
 Leu His Arg Met Thr Ser Ile Glu Arg Glu Glu Lys Glu Lys Val Lys
 740
 Lys Lys Glu Lys Lys Gln Glu Glu Glu Glu Thr Met Gln Gln Ala Thr
 745
 Trp Val Lys Tyr Thr Phe Pro Val Lys His Gln Val Trp Lys Gln Lys
 750
 Gly Glu Glu Tyr Arg Val Thr Gly Tyr Gly Gly Trp Ser Trp Ile Ser
 755
 Lys Thr His Val Tyr Arg Phe Val Pro Lys Leu Pro Gly Asn Thr Asn
 760
 Val Asn Tyr Arg Lys Ser Leu Glu Gly Thr Lys Asn Asn Met Asp Glu
 765
 Asn Met Asp Glu Ser Asp Lys Arg Lys Cys Ser Arg Ser Pro Lys Lys
 770
 Ile Lys Ile Glu Pro Asp Ser Glu Lys Asp Glu Val Lys Gly Ser Asp
 775
 Ala Ala Lys Gly Ala Asp Gln Asn Glu Met Asp Ile Ser Lys Ile Thr
 780
 Glu Lys Lys Asp Gln Asp Val Lys Glu Leu Leu Asp Ser Asp Ser Asp
 785
 Lys Pro Cys Lys Glu Glu Pro Met Glu Val Asp Asp Asp Met Lys
 790
 Thr Glu Ser His Val Asn Cys Gln Glu Ser Ser Gln Val Asp Val
 795
 Val Asn Val Ser Glu Gly Phe His Leu Arg Thr Ser Tyr Lys Lys
 800
 Lys Thr Lys Ser Ser Lys Leu Asp Gly Leu Leu Glu Arg Arg Ile
 805
 Lys Gln Phe Thr Leu Glu Glu Lys Gln Arg Leu Glu Lys Ile Lys
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995
 1000
 1005
 1010
 1015
 1020
 1025
 1030
 1035
 1040
 1045
 1050
 1055
 1060
 1065

[0005]

	1070		1075		1080
	Leu Glu Gly Gly Ile Lys Gly Ile Gly Lys Thr Ser Thr Asn Ser				
	1085		1090		1095
	Ser Lys Asn Leu Ser Glu Ser Pro Val Ile Thr Lys Ala Lys Glu				
	1100		1105		1110
	Gly Cys Gln Ser Asp Ser Met Arg Gln Glu Gln Ser Pro Asn Ala				
	1115		1120		1125
	Asn Asn Asp Gln Pro Glu Asp Leu Ile Gln Gly Cys Ser Glu Ser				
	1130		1135		1140
	Asp Ser Ser Val Leu Arg Met Ser Asp Pro Ser His Thr Thr Asn				
	1145		1150		1155
	Lys Leu Tyr Pro Lys Asp Arg Val Leu Asp Asp Val Ser Ile Arg				
	1160		1165		1170
	Ser Pro Glu Thr Lys Cys Pro Lys Gln Asn Ser Ile Glu Asn Asp				
	1175		1180		1185
	Ile Glu Glu Lys Val Ser Asp Leu Ala Ser Arg Gly Gln Glu Pro				
	1190		1195		1200
	Ser Lys Ser Lys Thr Lys Gly Asn Asp Phe Phe Ile Asp Asp Ser				
	1205		1210		1215
	Lys Leu Ala Ser Ala Asp Asp Ile Gly Thr Leu Ile Cys Lys Asn				
	1220		1225		1230
	Lys Lys Pro Leu Ile Gln Glu Glu Ser Asp Thr Ile Val Ser Ser				
	1235		1240		1245
	Ser Lys Ser Ala Leu His Ser Ser Val Pro Lys Ser Thr Asn Asp				
	1250		1255		1260
	Arg Asp Ala Thr Pro Leu Ser Arg Ala Met Asp Phe Glu Gly Lys				
	1265		1270		1275
	Leu Gly Cys Asp Ser Glu Ser Asn Ser Thr Leu Glu Asn Ser Ser				
	1280		1285		1290
	Asp Thr Val Ser Ile Gln Asp Ser Ser Glu Glu Asp Met Ile Val				
	1295		1300		1305
	Gln Asn Ser Asn Glu Ser Ile Ser Glu Gln Phe Arg Thr Arg Glu				
	1310		1315		1320
[0006]	Gln Asp Val Glu Val Leu Glu Pro Leu Lys Cys Glu Leu Val Ser				
	1325		1330		1335
	Gly Glu Ser Thr Gly Asn Cys Glu Asp Arg Leu Pro Val Lys Gly				
	1340		1345		1350
	Thr Glu Ala Asn Gly Lys Lys Pro Ser Gln Gln Lys Lys Leu Glu				
	1355		1360		1365
	Glu Arg Pro Val Asn Lys Cys Ser Asp Gln Ile Lys Leu Lys Asn				
	1370		1375		1380
	Thr Thr Asp Lys Lys Asn Asn Glu Asn Arg Glu Ser Glu Lys Lys				
	1385		1390		1395
	Gly Gln Arg Thr Ser Thr Phe Gln Ile Asn Gly Lys Asp Asn Lys				
	1400		1405		1410
	Pro Lys Ile Tyr Leu Lys Gly Glu Cys Leu Lys Glu Ile Ser Glu				
	1415		1420		1425
	Ser Arg Val Val Ser Gly Asn Val Glu Pro Lys Val Asn Asn Ile				
	1430		1435		1440
	Asn Lys Ile Ile Pro Glu Asn Asp Ile Lys Ser Leu Thr Val Lys				
	1445		1450		1455
	Glu Ser Ala Ile Arg Pro Phe Ile Asn Gly Asp Val Ile Met Glu				
	1460		1465		1470
	Asp Phe Asn Glu Arg Asn Ser Ser Glu Thr Lys Ser His Leu Leu				
	1475		1480		1485
	Ser Ser Ser Asp Ala Glu Gly Asn Tyr Arg Asp Ser Leu Glu Thr				
	1490		1495		1500
	Leu Pro Ser Thr Lys Glu Ser Asp Ser Thr Gln Thr Thr Thr Pro				
	1505		1510		1515
	Ser Ala Ser Cys Pro Glu Ser Asn Ser Val Asn Gln Val Glu Asp				
	1520		1525		1530
	Met Glu Ile Glu Thr Ser Glu Val Lys Lys Val Thr Ser Ser Pro				
	1535		1540		1545
	Ile Thr Ser Glu Glu Glu Ser Asn Leu Ser Asn Asp Phe Ile Asp				
	1550		1555		1560
	Glu Asn Gly Leu Pro Ile Asn Lys Asn Glu Asn Val Asn Gly Glu				
	1565		1570		1575
	Ser Lys Arg Lys Thr Val Ile Thr Glu Val Thr Thr Met Thr Ser				

	1580		1585		1590
	Thr Val Ala Thr Glu Ser	Lys Thr Val Ile Lys	Val Glu Lys Gly		
	1595		1600		1605
	Asp Lys Gln Thr Val Val	Ser Ser Thr Glu Asn Cys	Ala Lys Ser		
	1610		1615		1620
	Thr Val Thr Thr Thr Thr	Thr Thr Val Thr Lys	Leu Ser Thr Pro		
	1625		1630		1635
	Ser Thr Gly Gly Ser Val	Asp Ile Ile Ser Val	Lys Glu Gln Ser		
	1640		1645		1650
	Lys Thr Val Val Thr Thr	Thr Val Thr Asp Ser	Leu Thr Thr Thr		
	1655		1660		1665
	Gly Gly Thr Leu Val Thr	Ser Met Thr Val Ser	Lys Glu Tyr Ser		
	1670		1675		1680
	Thr Arg Asp Lys Val Lys	Leu Met Lys Phe Ser	Arg Pro Lys Lys		
	1685		1690		1695
	Thr Arg Ser Gly Thr Ala	Leu Pro Ser Tyr Arg	Lys Phe Val Thr		
	1700		1705		1710
	Lys Ser Ser Lys Lys Ser	Ile Phe Val Leu Pro	Asn Asp Asp Leu		
	1715		1720		1725
	Lys Lys Leu Ala Arg Lys	Gly Gly Ile Arg Glu	Val Pro Tyr Phe		
	1730		1735		1740
	Asn Tyr Asn Ala Lys Pro	Ala Leu Asp Ile Trp	Pro Tyr Pro Ser		
	1745		1750		1755
	Pro Arg Pro Thr Phe Gly	Ile Thr Trp Arg Tyr	Arg Leu Gln Thr		
	1760		1765		1770
	Val Lys Ser Leu Ala Gly	Val Ser Leu Met Leu	Arg Leu Leu Trp		
	1775		1780		1785
	Ala Ser Leu Arg Trp Asp	Asp Met Ala Ala Lys	Ala Pro Pro Gly		
	1790		1795		1800
	Gly Gly Thr Thr Arg Thr	Glu Thr Ser Glu Thr	Glu Ile Thr Thr		
	1805		1810		1815
	Thr Glu Ile Ile Lys Arg	Arg Asp Val Gly Pro	Tyr Gly Ile Arg		
	1820		1825		1830
[0007]	Ser Glu Tyr Cys Ile Arg	Lys Ile Ile Cys Pro	Ile Gly Val Pro		
	1835		1840		1845
	Glu Thr Pro Lys Glu Thr	Pro Thr Pro Gln Arg	Lys Gly Leu Arg		
	1850		1855		1860
	Ser Ser Ala Leu Arg Pro	Lys Arg Pro Glu Thr	Pro Lys Gln Thr		
	1865		1870		1875
	Gly Pro Val Ile Ile Glu	Thr Trp Val Ala Glu	Glu Glu Leu Glu		
	1880		1885		1890
	Leu Trp Glu Ile Arg Ala	Phe Ala Glu Arg Val	Glu Lys Glu Lys		
	1895		1900		1905
	Ala Gln Ala Val Glu Gln	Gln Ala Lys Lys Arg	Leu Glu Gln Gln		
	1910		1915		1920
	Lys Pro Thr Val Ile Ala	Thr Ser Thr Thr Ser	Pro Thr Ser Ser		
	1925		1930		1935
	Thr Thr Ser Thr Ile Ser	Pro Ala Gln Lys Val	Met Val Ala Pro		
	1940		1945		1950
	Ile Ser Gly Ser Val Thr	Thr Gly Thr Lys Met	Val Leu Thr Thr		
	1955		1960		1965
	Lys Val Gly Ser Pro Ala	Thr Val Thr Phe Gln	Gln Asn Lys Asn		
	1970		1975		1980
	Phe His Gln Thr Phe Ala	Thr Trp Val Lys Gln	Gly Gln Ser Asn		
	1985		1990		1995
	Ser Gly Val Val Gln Val	Gln Gln Lys Val Leu	Gly Ile Ile Pro		
	2000		2005		2010
	Ser Ser Thr Gly Thr Ser	Gln Gln Thr Phe Thr	Ser Phe Gln Pro		
	2015		2020		2025
	Arg Thr Ala Thr Val Thr	Ile Arg Pro Asn Thr	Ser Gly Ser Gly		
	2030		2035		2040
	Gly Thr Thr Ser Asn Ser	Gln Val Ile Thr Gly	Pro Gln Ile Arg		
	2045		2050		2055
	Pro Gly Met Thr Val Ile	Arg Thr Pro Leu Gln	Gln Ser Thr Leu		
	2060		2065		2070
	Gly Lys Ala Ile Ile Arg	Thr Pro Val Met Val	Gln Pro Gly Ala		
	2075		2080		2085
	Pro Gln Gln Val Met Thr	Gln Ile Ile Arg Gly	Gln Pro Val Ser		

	2090		2095		2100
	Thr Ala Val Ser Ala Pro Asn Thr Val Ser Ser Thr Pro Gly Gln				
	2105		2110		2115
	Lys Ser Leu Thr Ser Ala Thr Ser Thr Ser Asn Ile Gln Ser Ser				
	2120		2125		2130
	Ala Ser Gln Pro Pro Arg Pro Gln Gln Gly Gln Val Lys Leu Thr				
	2135		2140		2145
	Met Ala Gln Leu Thr Gln Leu Thr Gln Gly His Gly Gly Asn Gln				
	2150		2155		2160
	Gly Leu Thr Val Val Ile Gln Gly Glu Gly Gln Thr Thr Gly Gln				
	2165		2170		2175
	Leu Gln Leu Ile Pro Gln Gly Val Thr Val Leu Pro Gly Pro Gly				
	2180		2185		2190
	Gln Gln Leu Met Gln Ala Ala Met Pro Asn Gly Thr Val Gln Arg				
	2195		2200		2205
	Phe Leu Phe Thr Pro Leu Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Ser Thr				
	2210		2215		2220
	Thr Thr Thr Thr Val Ser Thr Thr Ala Ala Gly Thr Gly Glu Gln				
	2225		2230		2235
	Arg Gln Ser Lys Leu Ser Pro Gln Met Gln Val His Gln Asp Lys				
	2240		2245		2250
	Thr Leu Pro Pro Ala Gln Ser Ser Ser Val Gly Pro Ala Glu Ala				
	2255		2260		2265
	Gln Pro Gln Thr Ala Gln Pro Ser Ala Gln Pro Gln Pro Gln Thr				
	2270		2275		2280
	Gln Pro Gln Ser Pro Ala Gln Pro Glu Val Gln Thr Gln Pro Glu				
	2285		2290		2295
	Val Gln Thr Gln Thr Thr Val Ser Ser His Val Pro Ser Glu Ala				
	2300		2305		2310
	Gln Pro Thr His Ala Gln Ser Ser Lys Pro Gln Val Ala Ala Gln				
	2315		2320		2325
	Ser Gln Pro Gln Ser Asn Val Gln Gly Gln Ser Pro Val Arg Val				
	2330		2335		2340
[0008]	Gln Ser Pro Ser Gln Thr Arg Ile Arg Pro Ser Thr Pro Ser Gln				
	2345		2350		2355
	Leu Ser Pro Gly Gln Gln Ser Gln Val Gln Thr Thr Thr Ser Gln				
	2360		2365		2370
	Pro Ile Pro Ile Gln Pro His Thr Ser Leu Gln Ile Pro Ser Gln				
	2375		2380		2385
	Gly Gln Pro Gln Ser Gln Pro Gln Val Gln Ser Thr Thr Gln Thr				
	2390		2395		2400
	Leu Ser Ser Gly Gln Thr Leu Asn Gln Val Thr Val Ser Ser Pro				
	2405		2410		2415
	Ser Arg Pro Gln Leu Gln Ile Gln Gln Pro Gln Pro Gln Val Ile				
	2420		2425		2430
	Ala Val Pro Gln Leu Gln Gln Gln Val Gln Val Leu Ser Gln Ile				
	2435		2440		2445
	Gln Ser Gln Val Val Ala Gln Ile Gln Ala Gln Gln Ser Gly Val				
	2450		2455		2460
	Pro Gln Gln Ile Lys Leu Gln Leu Pro Ile Gln Ile Gln Gln Ser				
	2465		2470		2475
	Ser Ala Val Gln Thr His Gln Ile Gln Asn Val Val Thr Val Gln				
	2480		2485		2490
	Ala Ala Ser Val Gln Glu Gln Leu Gln Arg Val Gln Gln Leu Arg				
	2495		2500		2505
	Asp Gln Gln Gln Lys Lys Lys Gln Gln Gln Ile Glu Ile Lys Arg				
	2510		2515		2520
	Glu His Thr Leu Gln Ala Ser Asn Gln Ser Glu Ile Ile Gln Lys				
	2525		2530		2535
	Gln Val Val Met Lys His Asn Ala Val Ile Glu His Leu Lys Gln				
	2540		2545		2550
	Lys Lys Ser Met Thr Pro Ala Glu Arg Glu Glu Asn Gln Arg Met				
	2555		2560		2565
	Ile Val Cys Asn Gln Val Met Lys Tyr Ile Leu Asp Lys Ile Asp				
	2570		2575		2580
	Lys Glu Glu Lys Gln Ala Ala Lys Lys Arg Lys Arg Glu Glu Ser				
	2585		2590		2595
	Val Glu Gln Lys Arg Ser Lys Gln Asn Ala Thr Lys Leu Ser Ala				

2600 Leu Leu Phe Lys His Lys Glu Gln Leu Arg Ala Glu Ile Leu Lys
 2615 2620 2625
 Lys Arg Ala Leu Leu Asp Lys Asp Leu Gln Ile Glu Val Gln Glu
 2630 2635 2640
 Glu Leu Lys Arg Asp Leu Lys Ile Lys Lys Glu Lys Asp Leu Met
 2645 2650 2655
 Gln Leu Ala Gln Ala Thr Ala Val Ala Ala Pro Cys Pro Pro Val
 2660 2665 2670
 Thr Pro Ala Pro Pro Ala Pro Pro Ala Pro Pro Ser Pro Pro
 2675 2680 2685
 Pro Pro Pro Ala Val Gln His Thr Gly Leu Leu Ser Thr Pro Thr
 2690 2695 2700
 Leu Pro Ala Ala Ser Gln Lys Arg Lys Arg Glu Glu Glu Lys Asp
 2705 2710 2715
 Ser Ser Ser Lys Ser Lys Lys Lys Met Ile Ser Thr Thr Ser
 2720 2725 2730
 Lys Glu Thr Lys Lys Asp Thr Lys Leu Tyr Cys Ile Cys Lys Thr
 2735 2740 2745
 Pro Tyr Asp Glu Ser Lys Phe Tyr Ile Gly Cys Asp Arg Cys Gln
 2750 2755 2760
 Asn Trp Tyr His Gly Arg Cys Val Gly Ile Leu Gln Ser Glu Ala
 2765 2770 2775
 Glu Leu Ile Asp Glu Tyr Val Cys Pro Gln Cys Gln Ser Thr Glu
 2780 2785 2790
 Asp Ala Met Thr Val Leu Thr Pro Leu Thr Glu Lys Asp Tyr Glu
 2795 2800 2805
 Gly Leu Lys Arg Val Leu Arg Ser Leu Gln Ala His Lys Met Ala
 2810 2815 2820
 Trp Pro Phe Leu Glu Pro Val Asp Pro Asn Asp Ala Pro Asp Tyr
 2825 2830 2835
 Tyr Gly Val Ile Lys Glu Pro Met Asp Leu Ala Thr Met Glu Glu
 2840 2845 2850
 Arg Val Gln Arg Arg Tyr Tyr Glu Lys Leu Thr Glu Phe Val Ala
 2855 2860 2865
 Asp Met Thr Lys Ile Phe Asp Asn Cys Arg Tyr Tyr Asn Pro Ser
 2870 2875 2880
 Asp Ser Pro Phe Tyr Gln Cys Ala Glu Val Leu Glu Ser Phe Phe
 2885 2890 2895
 Val Gln Lys Leu Lys Gly Phe Lys Ala Ser Arg Ser His Asn Asn
 2900 2905 2910
 Lys Leu Gln Ser Thr Ala Ser
 2915 2920

[0009]

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 3
 caggagagtt ctcaagtaga t

21

<210> 4
 <211> 972
 <212> DNA
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 4

atgiggcccc tggtagcgge gctggtgctg ggcleggcgt getgeggatc agctcagcta 60
 ctatttaata aaacaaaatc tgtagaattc acgittttgta atgacactgt cgtcattcca 120
 tgetttgtta ctaatatgga ggcacaaaac actaetgaag tatacgtaaa gtggaaattt 180
 aaaggaagag atatttacac cttgatgga gctctaaaca agtccactgt ccccactgac 240
 tttagtagtg caaaaattga agtctcacia ttactaaaag gagatgcctc ttigaagatg 300
 gataagagtg atgetgtctc acacacagga aactacactt gtgaagtaac agaattaacc 360
 agagaagggt aaacgatecat cgagctaaaa tategtgttg ttcatgggtt ttctccaaat 420
 gaaaatatte ttatigtat ttcccatt tttgetatac tectgtctg gggacagitt 480
 ggtattaaaa cacltaaata tagatcggf ggtatggat agaaaacaat tgccttactt 540
 gttgctggac tagtgateac tgcattgtc attgtggag ccattcttt cgtcccaggt 600
 gaatattcat taaagaatgc tactggcctt ggttaattg tgactctac agggatatta 660
 atattacttc actactatgt gtttagtaca gogattggat taacctctt cgtcattgcc 720

	atattggtta ttcaggtgat agcctatate ctcgctgtgg ttggactgag tctctgtatt	780
	geggcgtgta taccaatgca tggeectett ctgatttcag gtttgagtat cttagcteta	840
	gcacaattac ttggactagt ttatatgaaa ttgtggett ccaatcagaa gactatacaa	900
	cctcetagga aagetgtaga ggaaccett aatgcattca aagaatcaaa aggaatgatg	960
	aatgatgaat aa	972
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 5	
	gcgattgget tatacgcgc	19
	<210> 6	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 6	
	gcgctgatt cgagatcct	19
[0010]	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 7	
	ttacagtaat tggagcatt	19
	<210> 8	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 8	
	cagcacagag aagaccatga t	21
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (Homo sapiens)	
	<400> 9	
	gagactgaga atgactctaa a	21

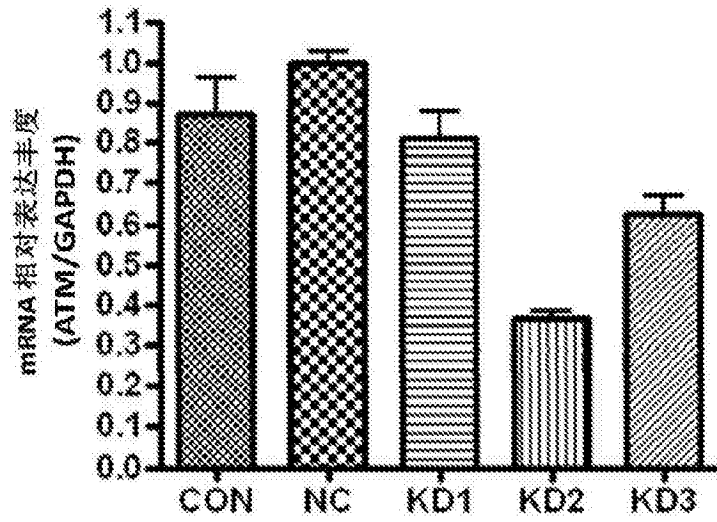


图1A

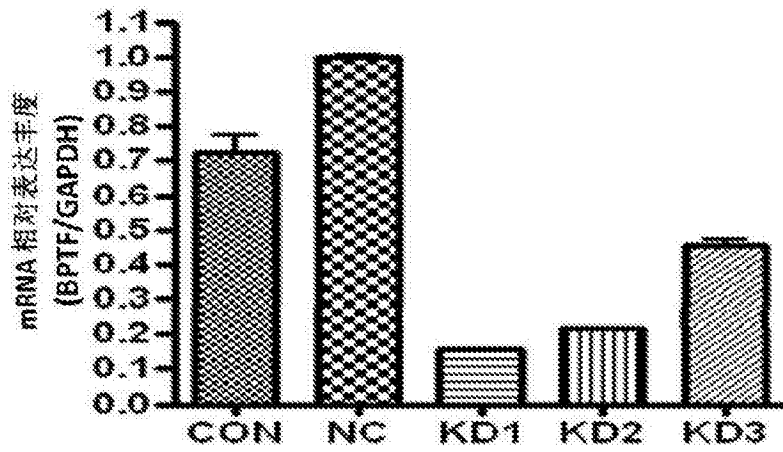


图1B

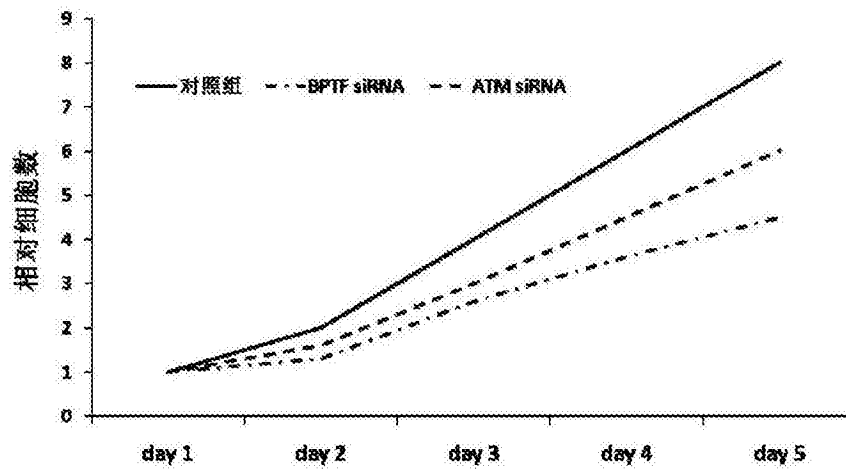


图1C

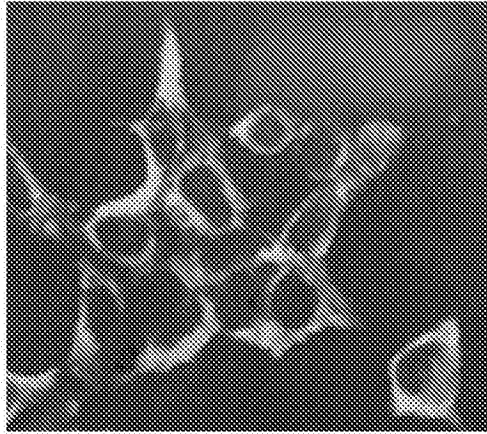


图2A

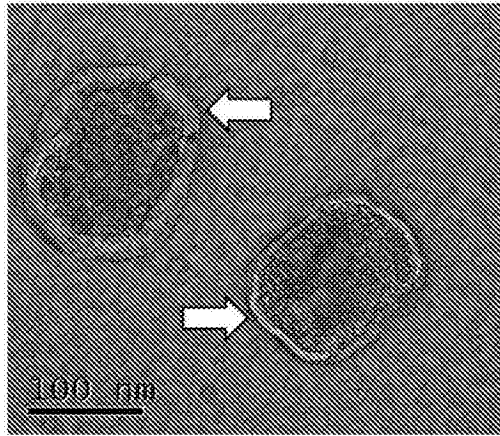


图2B

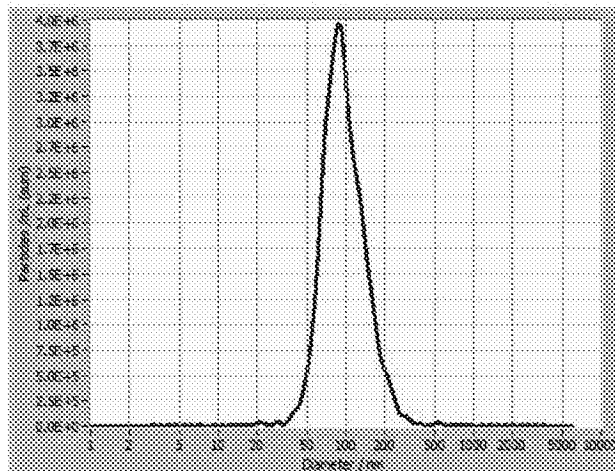


图3

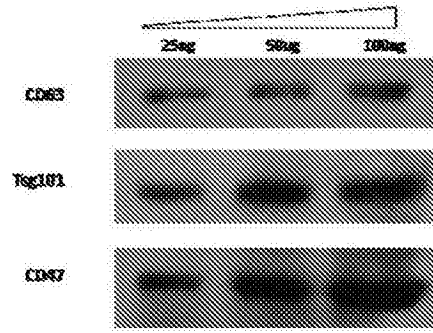


图4

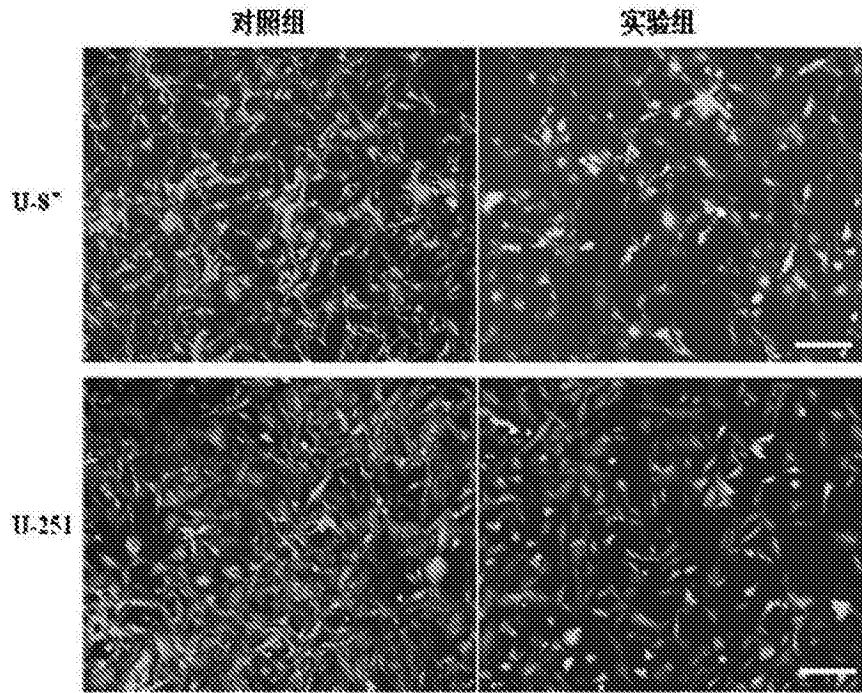


图5

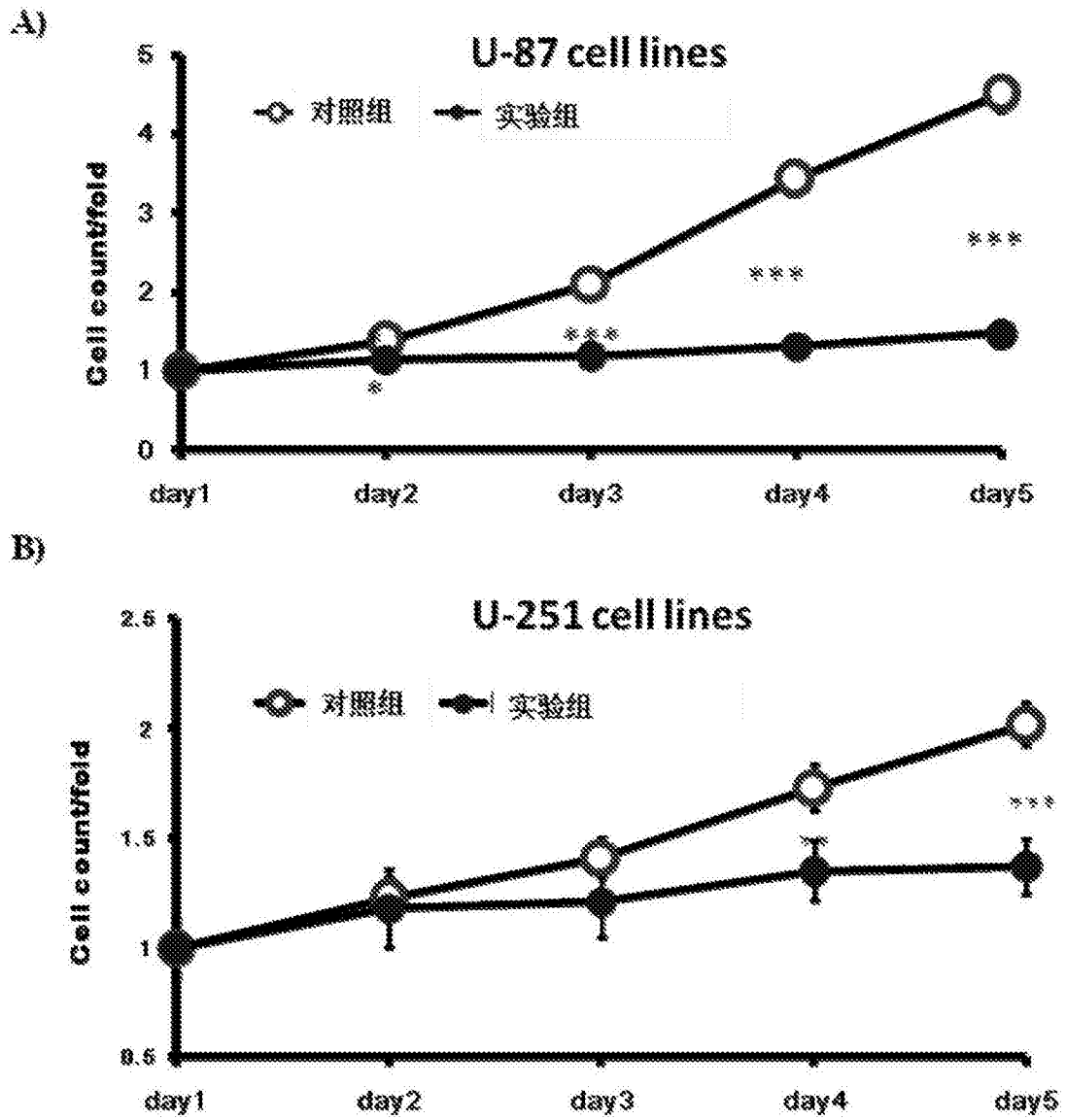


图6

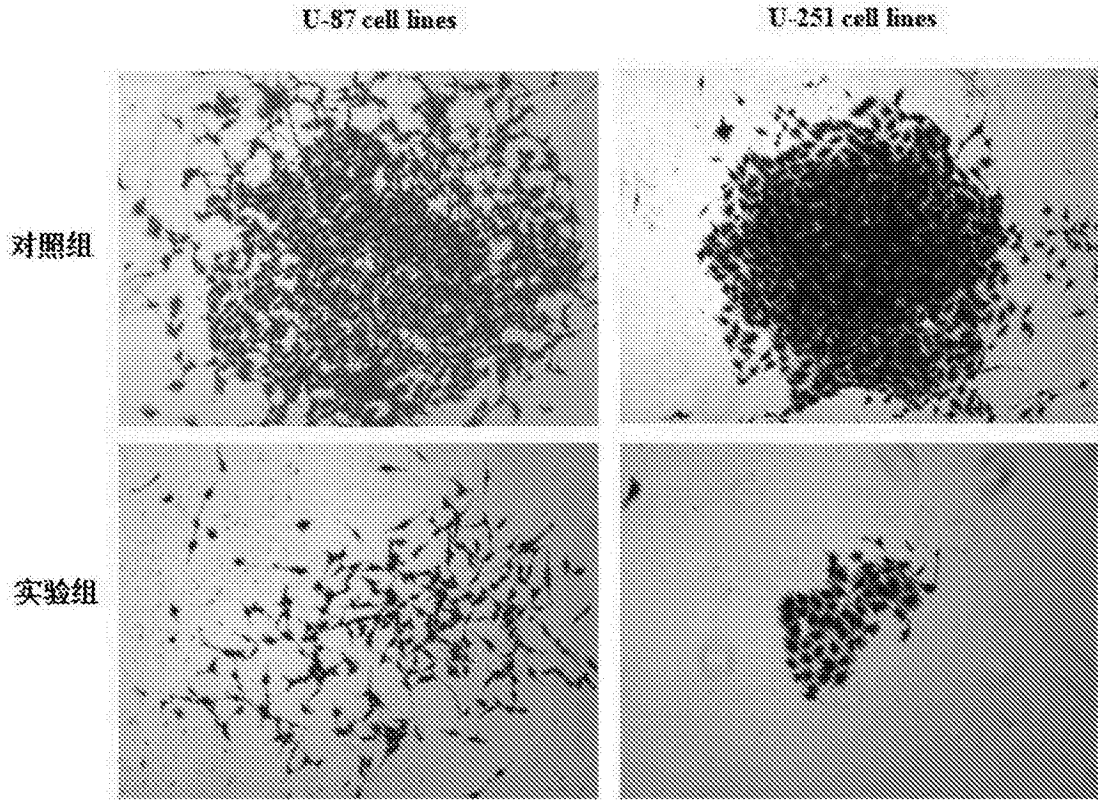


图7

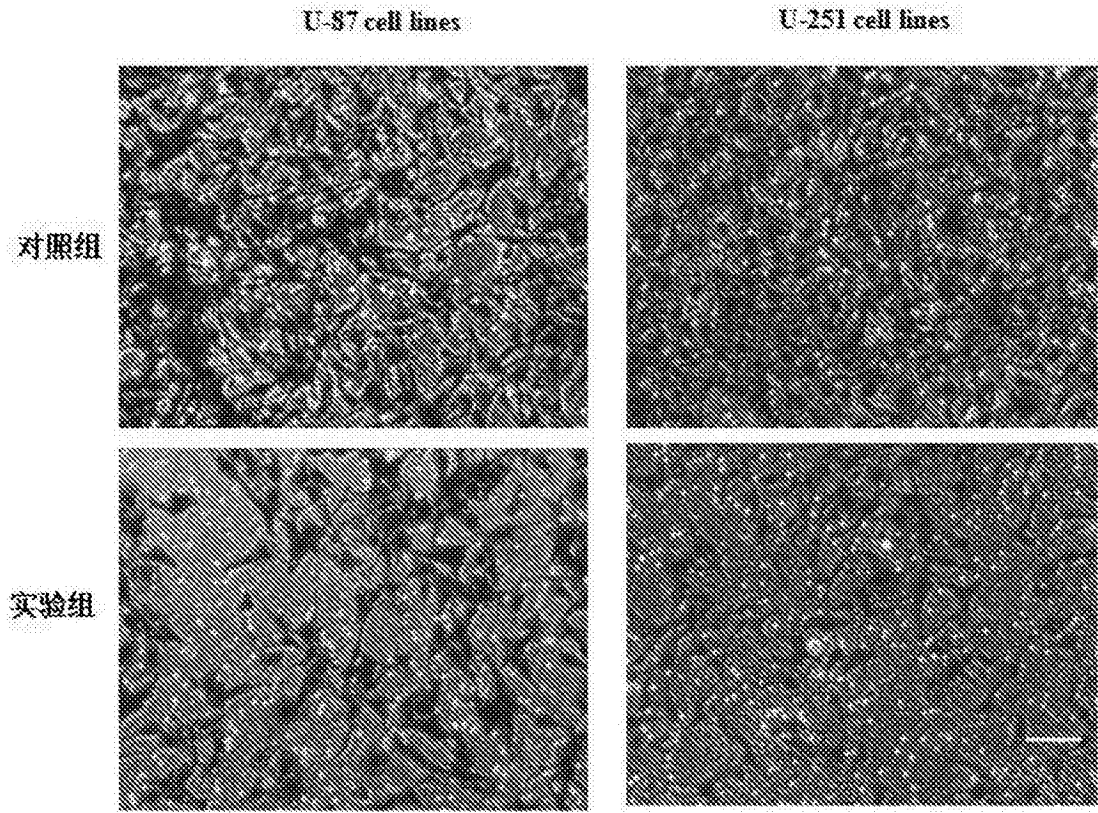
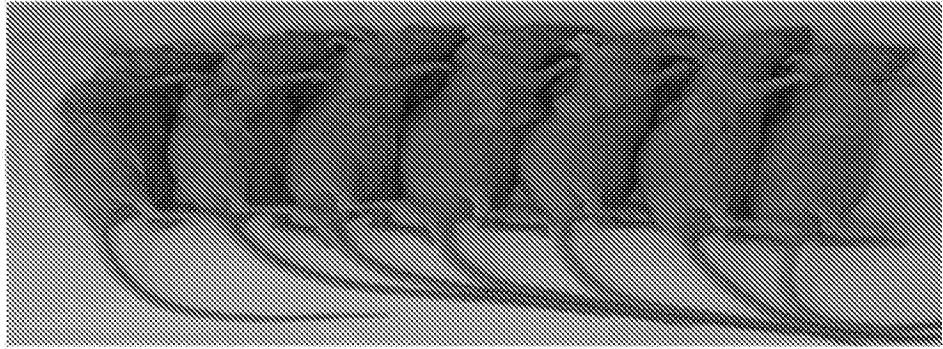


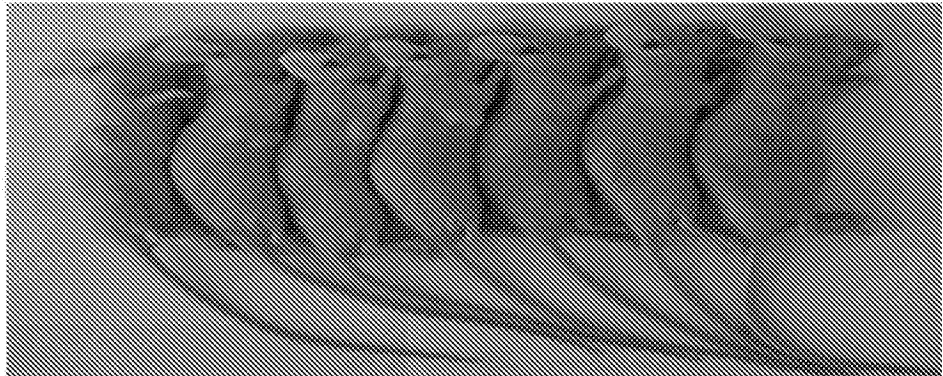
图8

A)

对照组



实验组



B)

对照组



实验组



图9