



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114214321 B

(45) 授权公告日 2023. 11. 21

(21) 申请号 202111358607.3

C12N 15/90 (2006.01)

(22) 申请日 2021.11.16

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114214321 A

(56) 对比文件

CN 107502611 A, 2017.12.22

CN 111575288 A, 2020.08.25

(43) 申请公布日 2022.03.22

(73) 专利权人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

审查员 李阳

(72) 发明人 陈世豪 赵睿涵 吴挺 潘诗雨

崔恒宓

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

专利代理师 孙斌

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

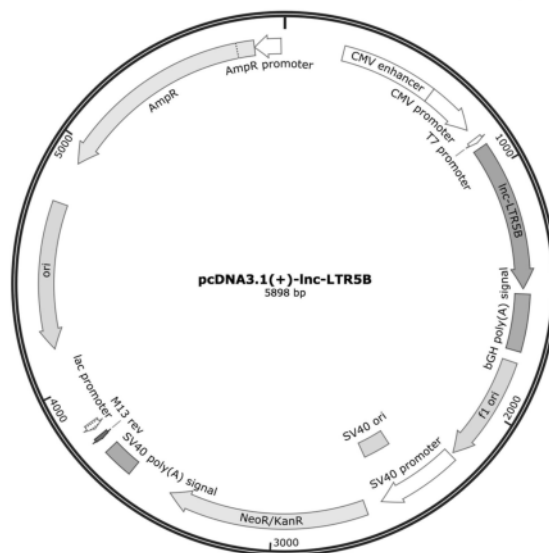
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

抑制J亚型禽白血病病毒的长链非编码RNA及其载体和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种抑制J亚型禽白血病病毒的长链非编码RNA及其载体和应用,所述长链非编码RNA命名为lnc-LTR5B,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明提供的长链非编码RNA高表达后,可以有效抑制ALV-J病毒感染和复制能力,可以用于制备预防或治疗J亚型禽白血病疫苗或药物,为研究抗ALV-J病毒药物提供新的靶点,进一步的相关研究也可以作为新的防治策略与手段。



1. 一种抑制ALV-J病毒的长链非编码RNA,其特征在于,所述长链非编码RNA命名为lnc-LTR5B,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 一种含有权利要求1所述的抑制ALV-J病毒的长链非编码RNA的表达载体。

3. 一种权利要求2所述的表达载体的构建方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 从鸡胚成纤维细胞CEF提取总RNA,将其逆转录成cDNA;

(2) 以步骤(1)所获得的cDNA产物为模板,设计引物,扩增带同源臂的lnc-LTR5B全长序列,

(3) 对PCR扩增产物切胶回收产物与pcDNA3.1线性质粒载体进行无缝连接,然后连接产物直接转化大肠杆菌感受态细胞,经阳性克隆筛选,DNA测序鉴定,测序结果正确的质粒,命名为pcDNA3.1-lnc-LTR5B。

4. 根据权利要求3所述的构建方法,其特征在于,步骤(2)中用于扩增带同源臂lnc-LTR5B全长序列所用引物RT-lnc-LTR5B-F和RT-lnc-LTR5B-R的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.8-9所示。

5. 一种权利要求1所述的长链非编码RNA或者权利要求2所述的表达载体在制备抗ALV-J病毒药物中的应用。

抑制J亚型禽白血病病毒的长链非编码RNA及其载体和应用

技术领域

[0001] 本发明属于畜禽医药研究领域,具体涉及抑制J亚型禽白血病病毒的长链非编码RNA及其载体和应用。

背景技术

[0002] 禽白血病是严重危害我国养禽业的重要疫病,其致病病毒可分为ALV-A、B、C、D、E、J和K等亚群。其中J亚群禽白血病病毒对家禽养殖业仍是一个重大威胁。ALV-J病毒感染可引起鸡造血细胞恶性增生以及免疫抑制,导致蛋鸡产蛋量下降,肉鸡生长缓慢,死淘率增加。ALV-J爆发会给养禽业带来了巨大的损失。现有技术中对ALV-J的致病机理知之甚少,且尚无可利用的疫苗和有效抗病毒药物,对ALV-J的防控主要采取严格的净化和控制程序。因此,针对ALV-J防治,需要发现新的抗病毒免疫或治疗策略,以解决目前ALV-J防控中存在的困难。

[0003] 长非编码RNA(Long noncoding RNA,lncRNAs)是一类长度大于200nt的非编码RNA。研究发现,lncRNA作为一种新型的调控因子,通过影响基因转录,蛋白质稳定性、细胞定位和其他过程来影响细胞的生理功能。近年来,研究发现lncRNA在调控病毒复制和抗病毒免疫方面也起着关键作用,某些lncRNA已被作为病毒防治的靶点或抗病毒治疗的载体来重点研究。有鉴于此,对ALV-J感染相关的lncRNA的鉴定和功能研究,将有可能发现防治ALV-J的新靶点或抗病毒药物,相关的发明研究或可以作为其新的防治策略与手段。

发明内容

[0004] 发明目的:针对现有技术中存在的不足,本发明提供一种全新的抑制J亚型禽白血病病毒的长链非编码RNA,通过高表达该长链非编码RNA,可以有效抑制ALV-J病毒感染和复制能力,从而达到防治J亚型禽白血病的目的。

[0005] 本发明还提供所述的抑制J亚型禽白血病病毒的长链非编码RNA表达载体和应用。

[0006] 技术方案:为了实现上述目的,本发明所述一种抑制ALV-J病毒的长链非编码RNA,所述长链非编码RNA命名为lnc-LTR5B,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0007] 其中,检测所述lnc-LTR5B表达水平的引物对为q-lnc-LTR5B-F和q-lnc-LTR5B-R,其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.2-3所示。

[0008] 其中,用于扩增所述抑制ALV-J病毒的长链非编码RNA的5'-末端和3'-末端基因特异性引物的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.4-5所示。

[0009] 其中,用于扩增所述抑制ALV-J病毒的长链非编码RNA的全长序列的引物对lnc-LTR5B-F和lnc-LTR5B-R,其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.6-7所示。

[0010] 含有本发明所述的抑制ALV-J病毒的长链非编码RNA的表达载体。

[0011] 本发明所述的表达载体的构建方法,包括如下步骤:

[0012] (1) 从鸡胚成纤维细胞CEF提取总RNA,将其逆转录成cDNA;

[0013] (2) 以步骤(1)所获得的cDNA产物为模板,设计引物,扩增带同源臂的lnc-LTR5B全

长序列；

[0014] (3)对PCR扩增产物切胶回收产物与pcDNA3.1线性质粒载体进行无缝连接,然后连接产物直接转化大肠杆菌感受态细胞,经阳性克隆筛选,DNA测序鉴定,测序结果正确的质粒,命名为pcDNA3.1-lnc-LTR5B。

[0015] 其中,步骤(2)中用于扩增带同源臂lnc-LTR5B全长序列所用引物RT-lnc-LTR5B-F和RT-lnc-LTR5B-R的核苷酸序列分别如SEQ ID NO.8-9所示。步骤(2)的引物中设计了与载体一致的同源臂,通过同源重组法将lncRNA全长和载体连接在一起。

[0016] 本发明所述的长链非编码RNA或者所述的表达载体在抑制ALV-J病毒中的应用。

[0017] 本发明所述的长链非编码RNA或者所述的表达载体在制备抗ALV-J病毒药物中的应用。

[0018] 其中,所述的长链非编码RNA或者表达载体通过抑制ALV-J病毒感染和复制能力在制备抗ALV-J病毒基因药物中的应用。

[0019] 本发明在DF-1细胞过表达长链非编码lncRNA-LTR5B时,lnc-LTR5B可以显著降低ALV-J病毒的感染及胞内复制能力,可以用于制备预防或治疗J亚型禽白血病药物。

[0020] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0021] 本发明首次克隆到一种全新序列的长链非编码RNA,该长链非编码RNA(lnc-LTR5B)可以有效抑制ALV-J病毒复制,与对照组相比抑制效率可达50%以上,可以用于制备预防或治疗J亚型禽白血病药物。

[0022] 本发明通过高表达lnc-LTR5B,可以有效抑制ALV-J病毒感染和复制能力,为研究抗ALV-J病毒复制的药物提供新的靶点,进一步的相关研究也可以作为禽白血病新的防治策略与手段。

附图说明

[0023] 图1为ALV-J感染导致lnc-LTR5B转录水平下降。A:qRT-PCR分析ALV-J感染对CEF细胞中lnc-LTR5B表达的影响;B:qRT-PCR分析ALV-J感染对DF-1细胞中lnc-LTR5B表达的影响。

[0024] 图2为本发明中利用RACE技术鉴定lnc-LTR5B全长序列电泳结果。

[0025] 图3为本发明中过表达lnc-LTR5B对ALV-J病毒复制的影响。A为qRT-PCR检测过表达lnc-LTR5B的表达情况,以GAPDH基因作为内参;B为qRT-PCR检测ALV-J病毒RNA的相对表达水平,以GAPDH基因作为内参。B:Western Blotting检测ALV-J病毒囊膜蛋白Env的表达情况,和经GAPDH内参校正后的相对表达量。

[0026] 图4为本发明中pcDNA3.1-lnc-LTR5B质粒图谱。

具体实施方式

[0027] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0028] 鸡原代成纤维细胞(CEF细胞)来源:由江苏立华牧业有限公司提供的受精蛋在孵化箱中孵育至11日龄,无菌条件下取出鸡胚,放入灭菌1xPBS中漂洗血污,去除四肢和头部后,取躯干部份再次漂洗血污,用剪刀将躯干部分组织剪碎成约1mm²大小的碎块,静置后弃去上清,沉淀用0.25%胰酶消化5min,待组织呈粘稠絮状时,加入3倍体积的含10%FBS完全

培养基终止消化,室温800rpm离心10min,弃上清,再用含10%FBS完全培养基重悬细胞沉淀,悬液经四层灭菌纱布过滤后,将滤液转移至细胞培养瓶中,37℃,5%CO₂培养,12h后贴壁细胞即为CEF细胞。

[0029] DF-1细胞源于美国ATCC(CRL-12203),由本实验室传代保种。

[0030] ALV-J病毒(JS09GY3株)由扬州大学提供。

[0031] 实施例1

[0032] ALV-J感染对lnc-LTR5B表达水平的影响

[0033] ALV-J感染CEF和DF-1细胞,使用荧光定量PCR测定不同感染时间点lnc-LTR5B表达量的变化。具体步骤如下:

[0034] 将CEF和DF-1细胞分别铺于12孔板中,待细胞融合度达到70%时,将培养基换为无血清DMEM,加入MOI 0.1ALV-J病毒(JS09GY3株)MOI 0.1孵育,并设置未感染对照组。感染2h后换为含2%胎牛血清的维持培养基(含1%的青/链霉素)。

[0035] 在分别感染12、24、36和48h后,提取CEF细胞和DF-1细胞总RNA,逆转录为cDNA后通过荧光定量PCR检测lnc-LTR5B表达水平,引物序列如下:

[0036] 上游引物q-lnc-LTR5B-F:

[0037] 5'-AATCCCTCCTCTTCCTTCTT-3'(SEQ ID NO.2)

[0038] 下游引物q-lnc-LTR5B-R:

[0039] 5'-GATAACTTGGCTGCTGGTA-3'(SEQ ID NO.3)

[0040] 结果如图1所示,ALV-J病毒分别感染CEF和DF-1细胞后,lnc-LTR5B的表达量均显著下调,表明lnc-LTR5B表达与ALV-J的复制相关。

[0041] 实施例2

[0042] 利用RACE方法扩增lnc-LTR5B全长核苷酸序列

[0043] (1)RACE技术鉴定lnc-LTR5B的5'和3'末端序列

[0044] 由SMARTer®RACE 5' /3' Kit试剂盒(Takara,#634859)来完成。首先,用TRIzol® Reagent提取鸡胚成纤维细胞CEF总RNA,然后用RNase-free DNase I去除基因组。在SMART ScribeReverse Transcriptase(由RACE试剂盒提供)的作用下分别将1μg去除基因组的RNA逆转录成5'-或3'-RACE产物。

[0045] 然后,按照SMARTer®RACE 5' /3' Kit试剂盒的操作说明,利用通用引物UPM分别与5'-末端或3'-末端基因特异性引物(gene-specific primer,GSP)进行PCR扩增(RACE琼脂糖凝胶电泳图见图2),克隆测序获得lnc-LTR5B的5'末端和3'末端序列,用于后期鉴定lnc-LTR5B的末端序列。其中,所用5'-末端或3'-末端基因特异性引物的核苷酸序列如下:

[0046] 5'-RACE引物:

[0047] 5'-CCAGTGGCAGGGAGGCAGAAAATGACCT-3'(SEQ ID NO.4),

[0048] 3'-RACE引物:

[0049] 5'-TGGTTGGGATCAAGCAGCAAGTCTATCC-3'(SEQ ID NO.5)。

[0050] (2)PCR扩增lnc-LTR5B全长。其中,所用引物核苷酸序列如下:

[0051] lnc-LTR5B-F:

[0052] 5'-CTCTTGCTGGCTGCACAG-3'(SEQ ID NO.6)

[0053] lnc-LTR5B-R:

[0054] 5'-TTTCTTTGAGTTGCAGGTTA-3' (SEQ ID NO.7)

[0055] 其反应体系包括:100ng鸡胚成纤维细胞cDNA产物作为模板,1 μ L (10 μ M) 上游引物 lnc-LTR5B-F与1 μ L (10 μ M) lnc-LTR5B-R分别作为扩增引物,1 μ L DNA Polymerase,10 μ L 5x SF Buffer,1 μ L (10 μ M) dNTP Mix和32 μ L ddH₂O。设置反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3min;95 $^{\circ}$ C 15s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min,35x循环;72 $^{\circ}$ C 10min;4 $^{\circ}$ C 维持。

[0056] (3) 以步骤(2)中PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,然后切胶回收产物,TA克隆并测序,获得lnc-LTR5B的全长cDNA序列。测序结果表明,lnc-LTR5B全长为590nt,具体核苷酸全长序列如SEQ ID NO.1。

[0057] 实施例3

[0058] lnc-LTR5B过表达载体构建

[0059] 本实施例中,使用从实施例2中所获得的lnc-LTR5B全长序列,设计全长扩增引物,构建lnc-LTR5B过表达质粒。具体包括如下步骤:

[0060] (1) 使用TRIzol法从鸡胚成纤维细胞CEF提取总RNA,用RNase-free DNase I去除基因组后,使用PrimeScript RT reagent Kit试剂盒(Takara,#RR047A)将其逆转录成cDNA。

[0061] (2) 以步骤(1)所获得的cDNA产物为模板,使用高保真酶扩增带同源臂的lnc-LTR5B全长序列,其中,所用引物RT-lnc-LTR5B-F和RT-lnc-LTR5B-R的核苷酸序列如下:

[0062] RT-lnc-LTR5B-F:

[0063] 5'-ACCCAAGCTGGCTAGCGTTTCTCTTGCTGGCTGCACAG-3' (SEQ ID NO.8)

[0064] RT-lnc-LTR5B-R:

[0065] 5'-GGCTGATCAGCGGGTTTTTCTTTGAGTTGCAGGTTA-3' (SEQ ID NO.9)

[0066] 其反应体系包括:100ng步骤(1)所获得的cDNA产物作为模板,1 μ L (10 μ M) 上游引物 RT-lnc-LTR5B-F与1 μ L (10 μ M) RT-lnc-LTR5B-R分别作为扩增引物,1 μ L DNA Polymerase,10 μ L 5x SF Buffer,1 μ L (10 μ M) dNTP Mix和32 μ L ddH₂O。

[0067] 其反应条件为:95 $^{\circ}$ C 3min;95 $^{\circ}$ C 15s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min,35x循环;72 $^{\circ}$ C 10min;4 $^{\circ}$ C 维持。

[0068] (3) 以步骤(2)中PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,然后切胶回收产物与pcDNA3.1线性质粒载体(淼灵生物,P0157)进行无缝连接。无缝连接按照MultiF Seamless Assembly Mix (ABclonal) 试剂盒说明书进行,然后连接产物直接转化大肠杆菌感受态细胞,经阳性克隆筛选,提取质粒,DNA测序鉴定等步骤,测序结果正确的质粒,命名为pcDNA3.1-lnc-LTR5B,质粒图谱如图4,质粒全长序列如SEQ ID NO.10。

[0069] 实施例4

[0070] lnc-LTR5B对ALV-J病毒复制的影响

[0071] 本实施例中,使用从实施例3中所获得的过表达质粒pcDNA3.1-lnc-LTR5B转染DF-1细胞,再感染ALV-J病毒,通过荧光定量PCR和Western-blot方法评估了lnc-LTR5B表达对J亚群禽白血病病毒复制水平的影响。具体包括如下步骤:

[0072] (1) 待DF-1细胞融合度为50%-60%时,使用QuickShuttle-basic转染试剂(博奥龙,KX0110041)分别转染0.5 μ g和1.0 μ g pcDNA3.1-lnc-LTR5B质粒,将相应体积的质粒加入到100 μ L opti-MEM培养基中,再按质粒:转染试剂=1:2的比例加入转染试剂,同时转染

pcDNA3.1空质粒作为对照。18h后换为无血清DMEM,再用MOI为0.1的ALV-J病毒接种细胞,2h后换为含2%FBS的培养基,持续感染48h后收集细胞。

[0073] (2) 提取步骤(1)中细胞总RNA,逆转录为cDNA后通过荧光定量PCR方法检测病毒Env基因RNA表达水平。Env基因荧光定量PCR上下游引物为:

[0074] 上游引物q-JY03-F:TTGGTTCGGTGTGCTATG

[0075] 下游引物q-JY03-R:GTCTCGTTGCTGGTGAAT

[0076] (3) 提取步骤(2)中细胞总蛋白,进行SDS-PAGE凝胶电泳,结束后使用湿转法转印至NC膜上,5%脱脂乳封闭后,4℃过夜孵育ALV-J Env蛋白抗体(JE9 mAb),并以GAPDH为内参蛋白;然后再用HRP标记的山羊抗鼠IgG室温孵育1h,于蛋白成像仪中观察结果。

[0077] 实验结果如图3所示,与对照组相比,当DF-1细胞过表达lnc-LTR5B时(图3A),ALV-J病毒RNA显著受到抑制(图3B),且病毒蛋白Env的相对表达水平也显著受到抑制,抑制率可达到50%以上(图3C)。由此表明,lnc-LTR5B可以显著降低ALV-J病毒的感染及胞内复制能力。因此,本发明克隆的长链非编码RNA lnc-LTR5B能作为防治J亚型禽白血病的潜在核酸药物。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 扬州大学
- [0003] <120> 抑制J亚型禽白血病病毒的长链非编码RNA及其载体和应用
- [0004] <160> 10
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 590
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <400> 1
- [0011] ctcttgctgg ctgcacagtg tgagaagctg aaaaactgca acgtctttgg ctctgtacag 60
- [0012] tgctgctcag caaaaaacta aaacatcagt ttgttcttag caatgttttt ctcttaggc 120
- [0013] aaaagcatag cgtcatacca ggcactatga agaaaatcgt ctctgtttca gctgtaacca 180
- [0014] ggaaagagga acagctgggtt gggatcaagc agcaagtcta tccagccttg tctgaatccc 240
- [0015] tcctcttctt tcttcagatg gtttgagcaa agaacacatc aaagatgttg acgtgtctct 300
- [0016] catcaactaa ataccagcag ccaagttatc taaggtcatt ttctgcctcc ctgccactgg 360
- [0017] gaagaaagtg cttcagggg ttctcattgt gtaccccaga agtacacagc ataacaactc 420
- [0018] ctgagtaaac acaggcacag tcagcatccc ccctcctcgc ctctgaaaca gtttgatttc 480
- [0019] acaataaaac ccctgctttg atctcttgcc aagaataaca cagacagtct attcaaacat 540
- [0020] ctttaataac atgatataat taaaaatc taacctgcaa ctcaaagaaa 590
- [0021] <210> 2
- [0022] <211> 20
- [0023] <212> DNA
- [0024] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0025] <400> 2
- [0026] aatccctcct cttccttctt 20
- [0027] <210> 3
- [0028] <211> 19
- [0029] <212> DNA
- [0030] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0031] <400> 3
- [0032] gataacttgg ctgctgta 19
- [0033] <210> 4
- [0034] <211> 28
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0037] <400> 4
- [0038] ccagtggcag ggaggcagaa aatgacct 28
- [0039] <210> 5
- [0040] <211> 28
- [0041] <212> DNA

- [0042] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0043] <400> 5
[0044] tggttgggat caagcagcaa gtctatcc 28
[0045] <210> 6
[0046] <211> 18
[0047] <212> DNA
[0048] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0049] <400> 6
[0050] ctcttgctgg ctgcacag 18
[0051] <210> 7
[0052] <211> 20
[0053] <212> DNA
[0054] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0055] <400> 7
[0056] tttctttgag ttgcaggtta 20
[0057] <210> 8
[0058] <211> 38
[0059] <212> DNA
[0060] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0061] <400> 8
[0062] acccaagctg gctagcgttt ctcttgctgg ctgcacag 38
[0063] <210> 9
[0064] <211> 37
[0065] <212> DNA
[0066] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0067] <400> 9
[0068] ggctgatcag cgggtttttt ctttgagttg caggtta 37
[0069] <210> 10
[0070] <211> 5898
[0071] <212> DNA
[0072] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0073] <400> 10
[0074] gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg 60
[0075] ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcget gtagtagtgcg 120
[0076] cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
[0077] ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
[0078] gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
[0079] tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
[0080] cccgccatt gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
[0081] attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
[0082] atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
[0083] atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggea gtacatctac gtattagtca 600

[0084]	tcgctattac	catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	660
[0085]	actcacgggg	atttccaagt	ctccaccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	720
[0086]	aaaatcaacg	ggactttcca	aatgtcgtg	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggag	780
[0087]	gtaggcgtgt	acgggtggag	gtctatataa	gcagagctct	ctggctaact	agagaacca	840
[0088]	ctgcttactg	gcttatcgaa	attaatacga	ctcactatag	ggagacccaa	gctggctagc	900
[0089]	gtttctcttg	ctggctgcac	agtgtgagaa	gctgaaaaac	tgcaacgtct	ttggctctgt	960
[0090]	acagtgtctg	tcagcaaaaa	actaaaacat	cagtttgttc	ttagcaatgt	ttttctcctt	1020
[0091]	aggcaaaagc	atagcgtcat	accaggcact	atgaagaaaa	tcgtctctgt	ttcagctgta	1080
[0092]	accaggaaag	aggaacagct	ggttgggatc	aagcagcaag	tctatccagg	cttgtctgaa	1140
[0093]	tcctctctct	tccttcttca	gatggtttga	gcaaagaaca	catcaaagat	gttgacgtgt	1200
[0094]	ctctcatcaa	ctaaatacca	gcagccaagt	tatctaaggt	cattttctgc	ctccctgcca	1260
[0095]	ctgggaagaa	agtgccttca	gggtttctca	ttgtgtacc	cagaagtaca	cagcataaca	1320
[0096]	actcctgagt	aaacacaggc	acagtcagca	tccccatcc	tcgctctga	aacagtttgt	1380
[0097]	attcacaata	aaaccctgc	tttgatctct	tgccaagaat	aacacagaca	gtctattcaa	1440
[0098]	acatctttaa	taacatgata	taattaaaaa	tatctaacct	gcaactcaaa	gaaaaaacc	1500
[0099]	gctgatcagc	ctgactgtg	ccttctagtt	gccagccatc	tgttgtttgc	ccctcccccg	1560
[0100]	tgcttctctt	gaccctggaa	ggtgccactc	ccactgtcct	ttcctaataa	aatgaggaaa	1620
[0101]	ttgcatcgca	ttgtctgagt	aggtgtcatt	ctattctggg	gggtggggtg	gggcaggaca	1680
[0102]	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca	ggcatgctgg	ggatgcggtg	ggctctatgg	1740
[0103]	cttctgaggc	ggaaagaacc	agctggggct	ctaggggta	tccccacgcg	ccctgtagcg	1800
[0104]	gcgcattaag	cgcgccgggt	gtggtggtta	cgcgcagcgt	gaccgctaca	cttgccagcg	1860
[0105]	ccctagcgcc	cgctcctttc	gctttcttcc	cttcctttct	cgccacgttc	gccggctttc	1920
[0106]	cccgtcaagc	tctaaatcgg	gggctccctt	tagggttccg	athtagtgc	ttacggcacc	1980
[0107]	tcgaccccaa	aaaacttgat	tagggtgatg	gttcacgtag	tgggccatcg	ccctgataga	2040
[0108]	cggtttttcg	ccctttgacg	ttggagtcca	cgttctttaa	tagtggactc	ttgttccaaa	2100
[0109]	ctggaacaac	actcaacct	atctcggctc	attcttttga	tttataaggg	atthttgccga	2160
[0110]	tttcggccta	ttggttaaaa	aatgagctga	tttaacaaaa	atthaacgcg	aattaattct	2220
[0111]	gtggaatgtg	tgctcagttg	ggtgtggaaa	gtccccaggc	tccccagcag	gcagaagtat	2280
[0112]	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	caggtgtgga	aagtccccag	gctccccage	2340
[0113]	aggcagaagt	atgcaaagca	tgcatctcaa	ttagtcagca	accatagtcc	cgcccctaac	2400
[0114]	tccgccatc	ccgccctaa	ctccgccag	ttccgccat	tctccgccc	atggctgact	2460
[0115]	aatthttttt	atthtatgcag	aggccgagc	cgctctgcc	tctgagctat	tccagaagta	2520
[0116]	gtgaggagc	ttttttggag	gcctagctt	ttgcaaaaag	ctccccggag	cttgtatata	2580
[0117]	cattttcgga	tctgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt	cgcatgattg	aacaagatgg	2640
[0118]	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	ggagaggcta	ttcggctatg	actgggcaca	2700
[0119]	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgccgt	gttccggctg	tcagcgcagg	ggcgccccgt	2760
[0120]	tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccggtgc	cctgaatgaa	ctgcaggacg	aggcagcgcg	2820
[0121]	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcgttcc	ttgcgcagct	gtgctcgacg	ttgtcactga	2880
[0122]	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgccgggg	caggatctcc	tgctcatctca	2940
[0123]	ccttgctcct	gccgagaaag	tatccatcat	ggctgatgca	atgcggcggc	tgcatacgct	3000
[0124]	tgatccggct	acctgccc	atcgaccacca	agcgaacat	cgcatcgacg	gagcacgtac	3060
[0125]	tcggatggaa	gccggtcttg	tcgatcagga	tgatctggac	gaagagcctc	aggggctcgc	3120

[0126] gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcatgccc gacggcgagg atctcgtcgt 3180
 [0127] gaccatggc gatgctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct tttctggatt 3240
 [0128] catcgactgt ggccgctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt tggctacccg 3300
 [0129] tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttctcgtgc tttacggtat 3360
 [0130] cgccgctccc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt tcttctgagc 3420
 [0131] gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc acgagatttc 3480
 [0132] gattccaccg ccgccttcta tgaaaggtg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgcccgc 3540
 [0133] tggatgatcc tccagcggg ggatctcatg ctggagtctc tcgcccacc caacttgttt 3600
 [0134] attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca 3660
 [0135] tttttttcac tgcatctag ttgtggttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgct 3720
 [0136] tgtataccgt cgacctag ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttctgtg 3780
 [0137] tgaaattggt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa 3840
 [0138] gcctgggtg cctaagagt gagctaactc acattaattg cgttgccgctc actgcccgct 3900
 [0139] ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga 3960
 [0140] ggcggttgc gtattggcg ctcttcgct tctcgtcctc ctgactcgtc gcgctcggct 4020
 [0141] gttcgctgc ggcgagcgg atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa 4080
 [0142] tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 4140
 [0143] aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcaciaa 4200
 [0144] aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt 4260
 [0145] cccctggaa gctccctcgt gcgctcctt gttccgacc tgcgcttac cggatacctg 4320
 [0146] tccgcttcc tccctcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 4380
 [0147] agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 4440
 [0148] gaccgtcgc cttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccgtaag acacgactta 4500
 [0149] tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 4560
 [0150] acagagttct tgaagtggg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc 4620
 [0151] tgcgctcgc tgaagccagt tacctcggg aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 4680
 [0152] caaaccaccg ctggtagcgg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaa 4740
 [0153] ggatctcaag aagatcctt gatctttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac 4800
 [0154] tcacgttaag ggattttgt catgagatta tcaaaaagga tcttcaceta gatcctttta 4860
 [0155] aattaaaaat gaagtttaa atcaatctaa agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt 4920
 [0156] taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgtct gtctatttcg ttcattcata 4980
 [0157] gttgctgac tccccgctg ttagataact acgatacggg agggcttacc atctggcccc 5040
 [0158] agtctgcaa tgataccgag agaccacgc tcaccgctc cagatttacc agcaataaac 5100
 [0159] cagccagccg gaaggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag 5160
 [0160] tctattaatt gttgccgga agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac 5220
 [0161] gttgttcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc 5280
 [0162] agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg 5340
 [0163] gttagctcct tcggtcctc gatcgttgc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc 5400
 [0164] atggttatgg cagcactgca taattctct actgtcatgc catccgtaag atgcttttct 5460
 [0165] gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc 5520
 [0166] tcttccccg cgtaatacag ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc 5580
 [0167] atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc 5640

[0168] agttcgatgt aaccactcg tgcaccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc 5700
[0169] gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaaggaat aaggcgaca 5760
[0170] cggaaatggt gaatactcat actcttcctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt 5820
[0171] tattgtctca tgagcggata catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aatagggtt 5880
[0172] ccgcgacat ttccccga 5898

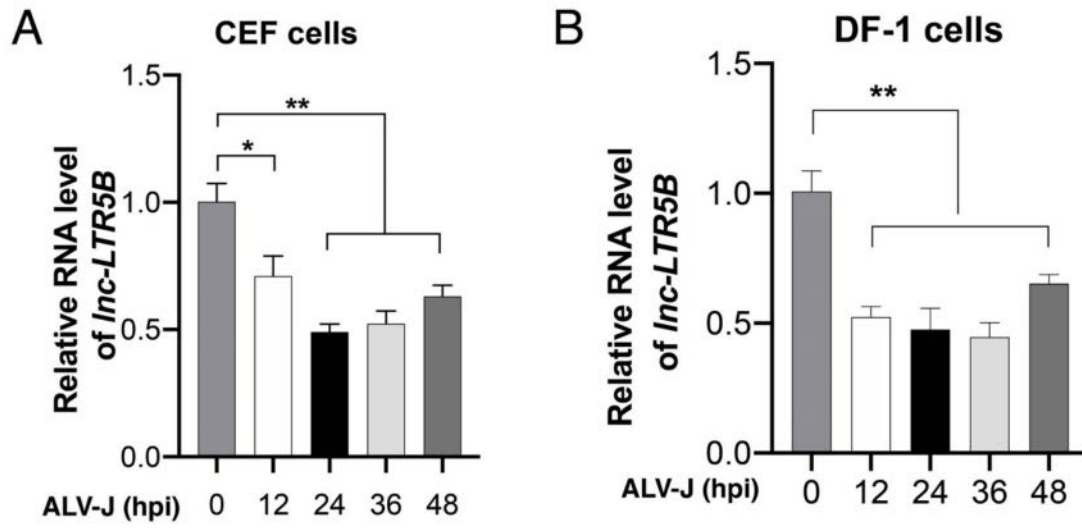


图1

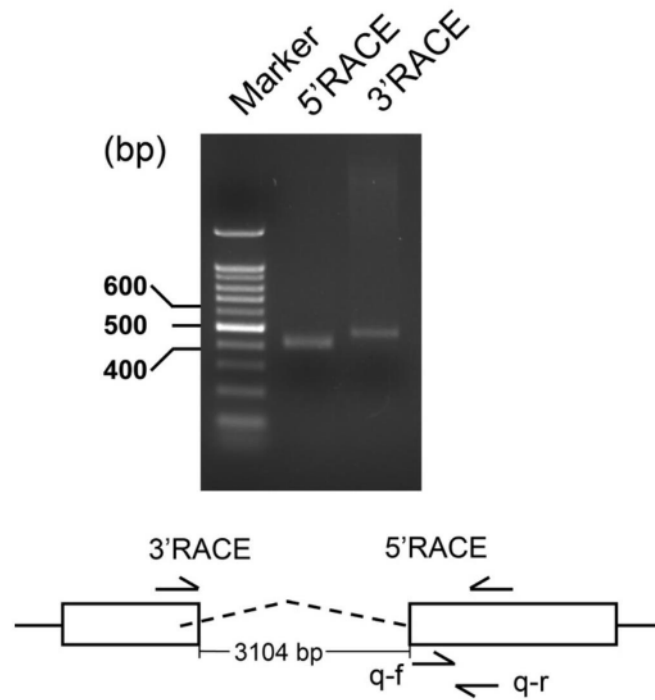


图2

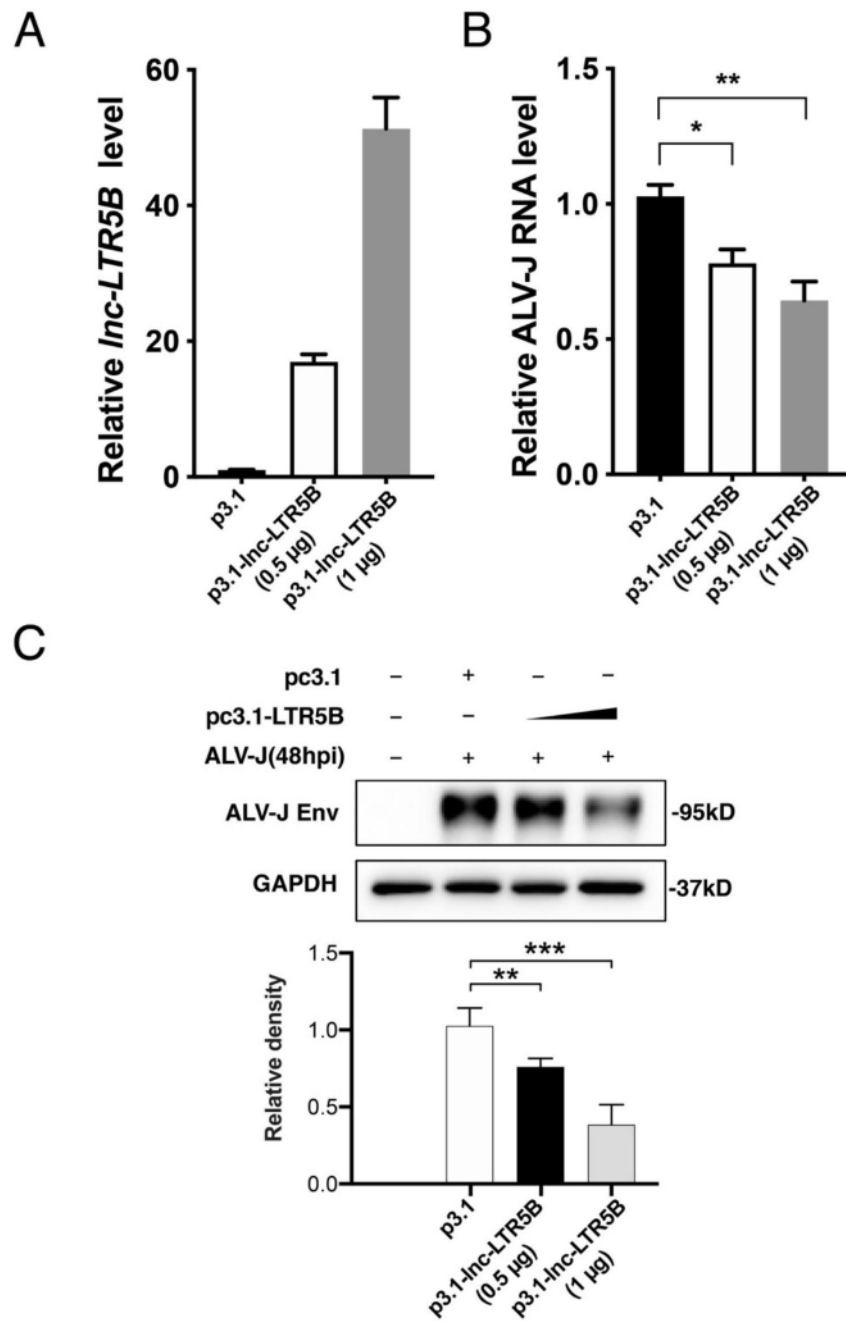


图3

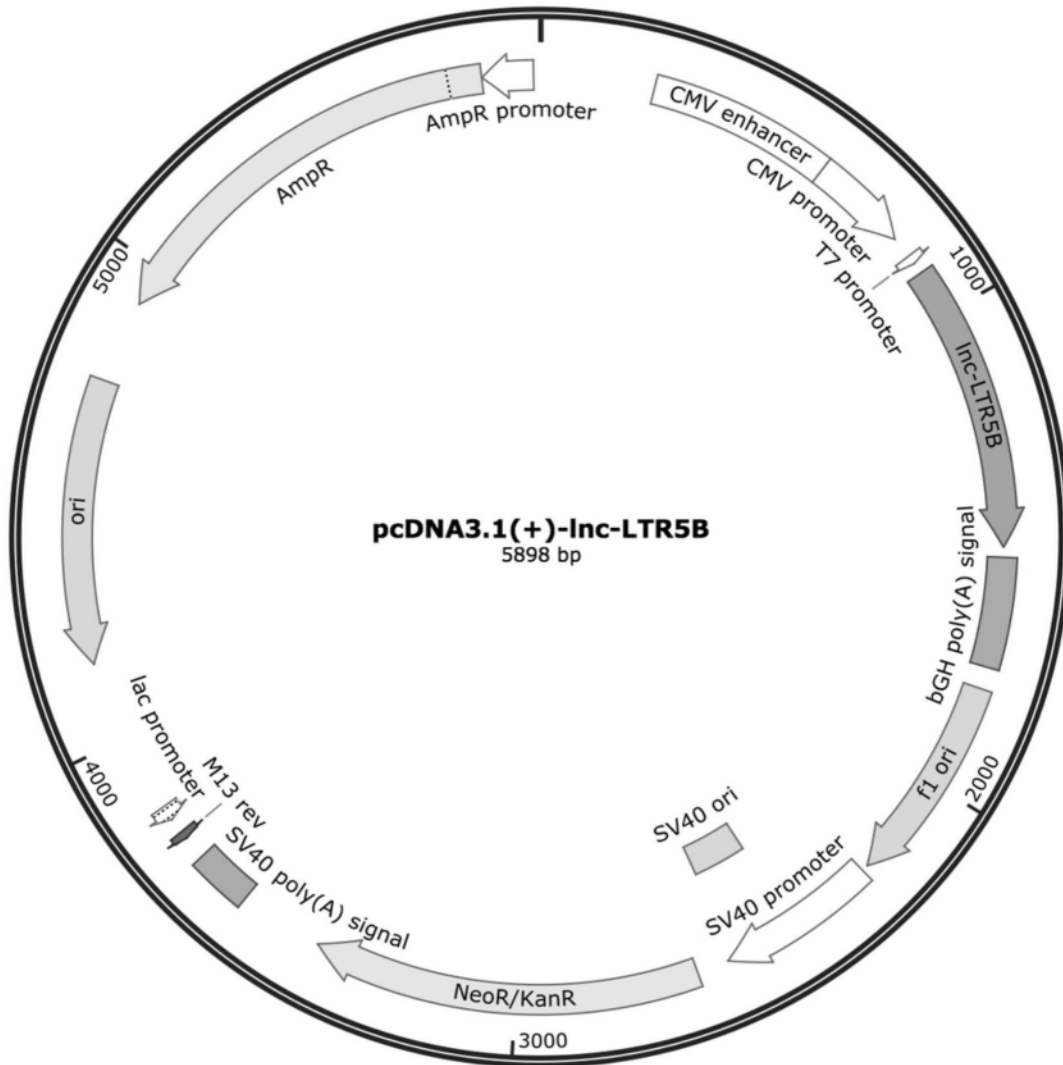


图4