



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110468106 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910614365.6

(22)申请日 2019.07.09

(71)申请人 上海宇研生物技术有限公司

地址 200333 上海市普陀区中江路879弄4
号楼401室

申请人 江苏西迪尔生物技术有限公司

(72)发明人 施炜星 杨春霞

(74)专利代理机构 上海三方专利事务所(普通
合伙) 31127

代理人 杨懿

(51)Int.Cl.

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

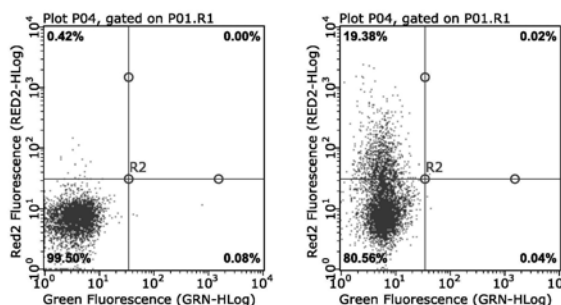
权利要求书1页 说明书4页
序列表3页 附图4页

(54)发明名称

NY-ESO-1特异的TCR及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及NY-ESO-1特异的TCR及其制备方法,用人工果蝇抗原提呈细胞负载NY-ESO-1抗原肽,激活CD8⁺T细胞产生CTL细胞,产生的细胞毒性CTL细胞经流式分选仪用HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-APC(MBL,TS-M011-2)及CD8-FITC荧光双染、进行流式检测,筛选收集双阳性的CTL细胞,将分选得到的CTL细胞进行单细胞TCR基因测序,测得TCR α 和 β 可变区基因序列,将TCR基因进行优化及设计,将TCR基因的恒定区改为鼠源,并加上信号肽,得到TCR α 和 β 链的全基因序列,基因合成TCR α 和TCR β 链,以IRES序列连接TCR α 和TCR β 链,使TCR α 和TCR β 链在一个质粒中共同表达,得到TCR基因,将TCR基因进行真核表达。



1. 一种NY-ESO-1特异的TCR的制备方法,其特征在于包括以下步骤:

用人工果蝇抗原提呈细胞负载NY-ESO-1抗原肽,激活CD8+T细胞产生具有特异性细胞毒性CTL细胞,

产生的细胞毒性CTL细胞经流式分选仪用HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-APC (MBL, TS-M011-2) 及CD8-FITC荧光双染、进行流式检测,筛选收集双阳性的CTL细胞,

将筛选得到的CTL细胞进行单细胞TCR基因测序,测得TCR α 和 β 可变区基因序列,

将TCR基因进行优化及设计,将TCR基因的恒定区改为鼠源,并加上信号肽,得到TCR α 和TCR β 链的全基因序列,

基因合成TCR α 和TCR β 链,以IRES序列连接TCR α 和TCR β 链,使TCR α 和TCR β 链在一个质粒中共同表达,得到TCR基因,

将TCR基因进行真核表达。

2. 一种NY-ESO-1特异的TCR,其特征在于采用权利要求1的制备方法制得。

3. 如权利要求2所述的NY-ESO-1特异的TCR,其特征在于TCR α 链可变区的DNA序列如SEQ ID No.1所示。

4. 如权利要求2所述的NY-ESO-1特异的TCR,其特征在于TCR β 链可变区的DNA序列如SEQ ID No.2所示。

5. 如权利要求2所述的NY-ESO-1特异的TCR,其特征在于TCR α 链DNA序列如SEQ ID No.3所示。

6. 如权利要求2所述的NY-ESO-1特异的TCR,其特征在于TCR β 链DNA序列如SEQ ID No.4所示。

7. 如权利要求2所述的NY-ESO-1特异的TCR,其特征在于TCR的DNA序列如SEQ ID No.5所示。

NY-ESO-1特异的TCR及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及NY-ESO-1特异的TCR及其制备方法。

背景技术

[0002] TCR-T是目前继CAR-T细胞治疗之后最有希望的实体瘤治疗方法,该方法主要是将肿瘤特异的T细胞受体(Tcell receptor, TCR)基因通过各种载体转入自体或异体的淋巴细胞中,使T细胞表达抗原特异性TCR,能够识别肿瘤抗原,分泌如IFN- γ 、IL-2等细胞因子,发挥细胞毒作用[1],因此TCR基因的获得是TCR-T细胞治疗的关键。传统的TCR基因获得方法主要是通过肿瘤浸润淋巴细胞(Tumor infiltrating lymphocyte, TIL),近年来,随着测序技术的发展,单细胞测序工作也更加简单,使从单细胞测序得到TCR基因成为可能。

[0003] NY-ESO-1全称New York esophageal squamous cell carcinoma 1,是肿瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigens,CTA)家族重要成员之一。NY-ESO-1具有诱导体液免疫应答的能力,也具有激活CD4⁺和CD8⁺ T淋巴细胞的能力,是到目前为止被发现的免疫原性最强大的肿瘤特异性抗原。NY-ESO-1在多种肿瘤细胞中都有表达,包括黑色素瘤、食道癌、膀胱癌。但 NY-ESO-1 在除睾丸组织以外的正常组织不表达,睾丸组织不表达 MHC I 类及 II 类分子,所以不会被 T 细胞识别杀伤。正是由于这一特征,NY-ESO-1 成为了肿瘤免疫治疗研究的热点。NY-ESO-1表位可分为CD8T细胞表位和CD4T细胞表位,目前有2个HLA-A*02:01限制性CD8T细胞表位(p157-167、p157-165)可以诱导免疫应答。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种新的NY-ESO-1特异的TCR及其制备方法。

[0005] 本发明首先包括一种NY-ESO-1特异的TCR的制备方法,包括以下步骤:

用人工果蝇抗原提呈细胞负载NY-ESO-1抗原肽,激活CD8⁺T细胞产生具有特异性细胞毒性CTL细胞,

产生的细胞毒性CTL细胞经流式分选仪用HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-APC (MBL,TS-M011-2)及CD8-FITC荧光双染、进行流式检测,筛选收集双阳性的CTL细胞,

将筛选得到的CTL细胞进行单细胞TCR基因测序,测得TCR α 和 β 可变区基因序列,

将TCR基因进行优化及设计,将TCR基因的恒定区改为鼠源,并加上信号肽,得到TCR α 和TCR β 链的全基因序列,

基因合成TCR α 和TCR β 链,以IRES序列连接TCR α 和TCR β 链,使TCR α 和TCR β 链在一个质粒中共同表达,得到TCR基因,

将TCR基因进行真核表达。

[0006] 本发明还包括采用上述的制备方法制得NY-ESO-1特异的TCR。

[0007] TCR α 链可变区的DNA序列如SEQ ID No.1所示。

[0008] TCR β 链可变区的DNA序列如SEQ ID No.2所示。

- [0009] TCR α 链DNA序列如SEQ ID No.3所示。
[0010] TCR β 链DNA序列如SEQ ID No.4所示。
[0011] TCR的DNA序列如SEQ ID No.5所示。

附图说明

- [0012] 图1.果蝇APC诱导后表型分析。
[0013] 图2.PBMC的HLA-A2分子表达及非CD8T细胞中CD14分子表达分析。
[0014] 图3. CTL培养过程中细胞扩增曲线图。
[0015] 图4. CTL在不同靶靶下对不同靶细胞(T2/T2-peptide)的杀伤分析。T2负载SLLMWITQC抗原肽为阳性靶细胞(T2-pep),T2为阴性对照靶细胞,CTL为效应细胞,两者共培养20h。离心收集上清液,ELISA检测IFN- γ 分泌量。
[0016] 图5: 特异性T细胞TCR FITC-CD8+ SLLMWITQC- Tetramer-APC双染,UR%=0.35%。
[0017] 图6: SLLMWITQC特异性CTL细胞流式分选。将SLLMWITQC刺激得到的CTL细胞进行FITC-CD8/SLLMWITQC-Tetramer-APC双染,圈定并分选双阳性细胞(P4区域),UR%=0.3-0.5%。
[0018] 图7:TCR- pcDNA3.1质粒感染293T细胞的TCR-beta-PE染色分析,R2=52.36%。
[0019] 图8:TCR- pcDNA3.1质粒感染293T细胞的全蛋白表达分析,右图为HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-APC染色,阳性率为19.38%。

具体实施方式

[0020] 以下,结合实施例和附图对于本发明作进一步说明,实施例和附图仅用于解释说明而不用限定本发明的保护范围。

[0021] 本发明基于用高效的人工果蝇抗原提呈细胞,在体外高效负载NY-ESO-1抗原肽(SLLMWITQC),激活CD8+T细胞产生细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL),产生的CTL经流式分选仪分选,得到高表达HLA-A*02:01 NY-ESO-1(SLLMWITQC) Tetramer的CTL细胞,进一步进行单细胞TCR基因测序(可变区),将TCR基因进行优化及设计,转入293T细胞检测TCR的表达情况。

[0022] 本发明涉及到一种新的TCR基因的克隆方法,即特异抗原肽刺激产生CTL,流式分选单细胞克隆,对单细胞克隆进行测序,得到TCR基因的可变区序列。

[0023] 第一部分:相对抗原刺激下的CTL细胞获得

抗原肽SLLMWITQC刺激产生特异性CTL细胞。试验过程为21天,包括CD8T细胞分离,果蝇APC刺激,nonCD8再刺激,以及最终的毒性杀伤验证,具体步骤如下:

Day 1:抽取将康人新鲜外周血,加入适量Ficoll淋巴细胞分离液于外周血底部,离心30 min吸出淋巴细胞层,后经离心洗涤得到PBMC。PBMC计数并重悬,与CD8+ T细胞磁珠共孵育,磁体下收集CD8T细胞,冻存非CD8细胞。收集诱导后的果蝇细胞 10^7 /ml重悬,与1 μ g/ml抗原肽SLLMWITQC及5 μ g/ml β 2M室温共孵育2~3h,果蝇细胞与T细胞以1:10比例混合,培养箱静置培养。

[0024] Day 5:加细胞因子IL-2和IL-7 30 U/ml。

[0025] Day 8:计数CD8细胞,调整细胞浓度 2×10^6 /ml,1/3更换培养基,计算非CD8 PBMC

所需数目为:效应细胞数 $\times$ [0.1~0.2]/非CD8 PBMC中的CD14。复苏非CD8细胞复苏洗涤,重悬 5×10^6 个/ml,10 μ g/ml丝裂霉素37℃,20min灭活细胞,加入抗原肽5 μ g/ml和 β 2M 5 μ g/ml,室温继续孵育2小时。CD8T细胞与非CD8T细胞混合,加细胞因子IL-2和IL-7 30 U/ml。

[0026] Day 10:计数细胞,调整细胞浓度 2×10^6 /ml,加入细胞因子。

[0027] Day 13:计数细胞,调整细胞浓度 2×10^6 /ml,加入细胞因子。

[0028] Day 15:计数CD8细胞,调整细胞浓度 2×10^6 /ml,更换培养基,计算非CD8 PBMC所需数目。复苏非CD8细胞复苏洗涤,重悬 5×10^6 个/ml,10 μ g/ml丝裂霉素37℃,20 min灭活细胞,加入抗原肽5 μ g/ml和 β 2M 5 μ g/ml,室温继续孵育2小时。CD8T细胞与非CD8T细胞混合,加细胞因子IL-2和IL-7 30U/ml。

[0029] Day 17:计数细胞,调整细胞浓度 2×10^6 /ml,加入细胞因子。

[0030] Day 19:计数细胞,调整细胞浓度 2×10^6 /ml,加入细胞因子。

[0031] Day 21:T2负载SLLMWITQC抗原肽为阳性靶细胞(T2-peptide),T2为阴性对照靶细胞,CTL为效应细胞,两者共培养20h。离心收集上清液,ELISA检测IFN- γ 分泌量,验证制备的CTL细胞特异性杀伤结果。

[0032] 结果:

果蝇细胞1120作为APC在实验过程中负载抗原肽参与CD8T细胞的抗原刺激,果蝇细胞负载抗原肽的有效性与其本身HLA-A2表达量有直接关系,而CD54和CD80作为共刺激分子直接参与CTL的刺激增长。图1为果蝇APC分子表型检测结果,可以看出:HLA-A2、CD54、CD80的分子表达都在50%以上,满足实验需要。

[0033] 非CD8T细胞的抗原传递功能其实由其中CD14+T细胞完成,图2中,a图为PBMC的HLA-A2检测,在整个CTL完成过程中,无论是抗原肽还是APC,其分子机制要求淋巴细胞为HLA-A2阳性参与,所以PBMC的HLA-A2阳性比例越高越好。b图为非CD8T细胞中CD14分子的表达分析。

[0034] 实验分别在细胞培养初始D1/D8/D10/D13/D15/D17/D19对细胞数目计数。图3为不同时间期细胞的扩增数据,由图可知,在实验初期,效应细胞取 5×10^6 作为初始细胞进行抗原肽刺激诱导。在第二次刺激前,细胞增长比较缓慢,后期增长比较快速,整个实验期间,细胞增长近6倍。

[0035] CTL毒性杀伤分析:

验证抗原肽刺激产生的CTL细胞是否具有特异性的杀伤毒性,为后期抗原肽特异性TCR获取提供依据。通过对效靶细胞上清液的IFN- γ 的ELISA检测,分析得出如图4。在不同效靶细胞以及不同效靶比下的杀伤过程中释放的IFN- γ 量存在着较大的差距。其中对抗原肽阳性靶细胞T2-pep.的杀伤率要远远大于阴性靶细胞T2组,之间相差近30-40倍。由此可知,在相应抗原肽刺激下产生的CTL细胞具有比较强烈的特异性细胞杀伤毒性。

[0036] 第二部分:SLLMWITQC抗原肽特异的CTL阳性细胞筛选

收集第一部分验证得到的特异性CTL细胞,用HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-APC(MBL,TS-M011-2)及CD8-FITC荧光双染、进行流式检测,结果显示双阳性细胞明显,约占0.35%左右(图5)。APC-tetramer阳性细胞均出现在CD8+T细胞群中,这在一定程度上也说明了抗原肽SLLMWITQC的CD8+免疫应答属性。

[0037] SLLMWITQC抗原肽特异性CTL阳性细胞筛选主要利用流式分选仪进行,经流式分选

仪测定,圈定且收集双阳性细胞(图6,P4区域)。取约 10^4 细胞于完全培养基中,后经离心重悬于500 μ l RNA protect cell reagent(Qiagen,76526)中,进行单细胞测序。

[0038] 第三部分:SLLMWITQC高亲和性TCR基因测序及重组载体构建

对第二部分实验中得到的阳性SLLMWITQC-CTL细胞的样品(P4区域)进行单细胞基因测序。具体方法包括:

1. 全自动流式细胞分选仪(Sony,SH800)进行96孔板单细胞装盘。

[0039] 2. Illumina测序仪(miseq reagent kit v2 Nano,MS-102-2001)进行单细胞测序。

[0040] 3. TCR分析软件VDJtool (<https://github.com/mikessh/vdjtools>)和TCR α 、 β 链配对软件iPair Analyzer™ (iRepertoire Inc. <https://www.irepertoire.com/ipair>)共同分析并配对测序得到的TCR基因。

[0041] 得到SLLMWITQC高亲和性CTL细胞的特异性TCR α 和 β 链基因后,本研究主要采用了下列TCR α 和 β 链基因序列进行后期实验。

[0042] 测序得到的TCR α 链可变区如SEQ ID NO.1所示。

[0043] 测序得到的TCR β 链可变区如SEQ ID NO.2所示。

[0044] 为了提高TCR基因的表达率,以及考虑到外源TCR的引入会引发自身TCR序列与外源TCR的错配,因此将外源TCR基因的恒定区改为鼠源的。

[0045] α 链可变区加上信号肽及鼠源恒定区得到 α 链全基因如SEQ ID NO.3所示。

[0046] β 链可变区加上信号肽及鼠源恒定区得到 β 链全基因如SEQ ID NO.4所示。

[0047] 基因合成TCR α 和 β 链,以IRES序列(连接肽)连接TCR的 α 和 β 链,使双链在一个质粒中共同表达。

[0048] TCR全基因优化序列如下,在 α 链和 β 链之间加入链接肽IRES如SEQ ID NO.5所示。

[0049] 第四部分:TCR基因的真核表达检测

将TCR基因构建至哺乳动物载体pcDNA3.1上,经酶切、测序确认无误。复苏培养293T细胞,转染前24h进行细胞铺板,重悬 $4\sim 5\times 10^6$ 细胞于10cm细胞培养皿中。转染当天更换无血清培养基,分别稀释15 μ gDNA和15 μ l Lipofectamine 2000转染试剂(invitrogen,11668027)于0.25ml opti-EME(gibco,31985070)培养基中并混匀,室温20min。均匀滴加在培养皿中于培养箱中继续培养48h后流式检测。

[0050] TCR- β 链抗体(TCR-beta-PE,invitrogen,4327729)染色结果如图7所示, β 链阳性表达率为52.36%。TCR全蛋白抗体HLA-A*02:01 NY-ESO-1 Tetramer-SLLMWITQC-APC染色结果如图8所示,阴性对照用HIV Tetramer(HLA-A*02:01 HIV gag Tetramer-SLYNTVATL-APC,MBL,TS-M027-2)染色,TCR阳性表达率为19.95%。可证明该TCR基因在真核细胞中成功表达。

序列表

<110> 上海宇研生物技术有限公司

江苏西迪尔生物技术有限公司

<120> NY-ES0-1特异的TCR及其制备方法

<160> 5

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```
atccaggtgg agcagagccc ccccgacctg atcctgcagg agggcgccaa cagcacccctg 60
agatgcaact tcagcgacag cgtgaacaac ctgcagtggg tccaccagaa cccctggggc 120
cagctgatca acctgttcta catccccagc ggcaccaagc agaacggcag actgagcgcc 180
accaccgtgg ccaccgagag atacagcctg ctgtacatca gcagcagcca gaccaccgac 240
agcggcggtg acttctgcgc cgtggacggc aacaccggca agctgatctt cggccagggc 300
accaccctgc aggtgaagcc cgac 324
```

<210> 2

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

```
ggcgtgaccc agacccccag acacctggtg atgggcatga ccaacaagaa gagcctgaag 60
tgcgagcagc acctggggcca caacgccatg tactggtaca agcagagcgc caagaagccc 120
ctggagctga tgttcgtgta caacttcaag gagcagaccg agaacaacag cgtgcccagc 180
agattcagcc ccgagtggcc caacagcagc cacctgttcc tgcacctgca caccctgcag 240
cccaggagca gcgccctgta cctgtgcgcc agcagccagg gccaggagca gtacttcggc 300
cccggcacca gactgaccgt gacc 324
```

<210> 3

<211> 798

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

```
atgaagagaa tcctgggcgc cctgctgggc ctgctgagcg cccaggtgtg ctgcgtgaga 60
ggcatccagg tggagcagag cccccccgac ctgatcctgc aggagggcgc caacagcacc 120
ctgagatgca acttcagcga cagcgtgaac aacctgcagt ggttccacca gaacccttg 180
ggccagctga tcaacctgtt ctacatcccc agcggcacca agcagaacgg cagactgagc 240
gccaccaccg tggccaccga gagatacagc ctgctgtaca tcagcagcag ccagaccacc 300
```

gacagcggcg tgtacttctg cgccgtggac ggcaacaccg gcaagctgat cttcggccag 360
ggcaccaccc tgcaggtgaa gcccgcacatc cagaaccccc agccccgccgt gtaccagctg 420
aaggacccca gaagccagga cagcaccttg tgcctgttca ccgacttcga cagccagatc 480
aacgtgcccc agaccatgga gagcggcacc ttcatcaccg acaagaccgt gctggacatg 540
aaggccatgg acagcaagag caacggcgcc atcgccctgga gcaaccagac cagcttcacc 600
tgccaggaca tcttcaagga gaccaacgcc acctacccca gcagcgacgt gccctgcgac 660
gccaccctga ccgagaagag cttcgagacc gacatgaacc tgaacttcca gaacctgagc 720
gtgatgggcc tgagaatcct gctgctgaag gtggccggct tcaacctgct gatgaccctg 780
agactgtgga gcagctga 798

<210> 4

<211> 909

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

atgggctgca gactgctgtg ctgcgccgtg ctgtgcctgc tgggcgccgt gcccatggag 60
accggcgtga cccagacccc cagacacctg gtgatgggca tgaccaacaa gaagagcctg 120
aagtgcgagc agcacctggg ccacaacgcc atgtactggt acaagcagag cgccaagaag 180
cccctggagc tgatgttcgt gtacaacttc aaggagcaga ccgagaacaa cagcgtgccc 240
agcagattca gccccgagtg cccaacagc agccacctgt tcctgcacct gcacaccctg 300
cagcccaggg acagcgccct gtacctgtgc gccagcagcc agggccagga gcagtacttc 360
ggccccggca ccagactgac cgtgaccgag gacctgagaa acgtgacccc cccaaggtg 420
agcctgttcg agcccagcaa ggccgagatc gccaacaagc agaaggccac cctggtgtgc 480
ctggccagag gcttcttccc cgaccacgtg gagctgagct ggtgggtgaa cggcaaggag 540
gtgcacagcg gcgtgagcac cgacccccag gcctacaagg agagcaacta cagctactgc 600
ctgagcagca gactgagagt gagcgccacc ttctggcaca accccagaaa ccacttcaga 660
tgccaggtgc agttccacgg cctgagcgag gaggacaagt ggcccaggag cagccccaag 720
cccgtgaccc agaacatcag cgccgaggcc tggggcgagag ccgactgcgg catcaccagc 780
gccagctacc accagggcgt gctgagcgcc accatcctgt acgagatcct gctgggcaag 840
gccaccctgt acgccgtgct ggtgagcggc ctggtgctga tggccatggt gaagaagaag 900
aacagctga 909

<210> 5

<211> 2345

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

gctagcgcca ccatgaagag aatcctgggc gcctgctggt gcctgctgag cgcccaggtg 60
tgctgcgtga gaggcattca ggtggagcag agccccccc acctgaccc gcaggagggc 120
gccaacagca ccctgagatg caacttcagc gacagcgtga acaacctgca gtggttccac 180
cagaaccctt ggggccagct gatcaacctg ttctacatcc ccagcggcac caagcagaac 240

```

ggcagactga ggcgccaccac cgtggccacc gagagataca gcctgctgta catcagcagc 300
agccagacca ccgacagcgg cgtgtacttc tgcccgctgg acggcaacac cggcaagctg 360
atcttcggcc agggcaccac cctgcaggtg aagcccgaca tccagaaccc cgagcccgcc 420
gtgtaccagc tgaaggaccc cagaagccag gacagcacc tgtgcctgtt caccgacttc 480
gacagccaga tcaacgtgcc caagaccatg gagagcggca cttcatcac cgacaagacc 540
gtgctggaca tgaaggccat ggacagcaag agcaacggcg ccatcgccctg gagcaaccag 600
accagcttca cctgccagga catcttcaag gagaccaacg ccacctacc cagcagcgac 660
gtgccctgcg acgccaccct gaccgagaag agcttcgaga ccgacatgaa cctgaacttc 720
cagaacctga gcgtgatggg cctgagaatc ctgctgctga aggtggccgg cttcaacctg 780
ctgatgacct tgagactgtg gagcagctga gaattctgta cagccgcccc tctccctccc 840
ccccccctaa cgttactggc cgaagccgct tggaataagg ccggtgtgcg tttgtctata 900
tgttattttc caccatattg ccgtcttttg gcaatgtgag ggcccggaaa cctggccctg 960
tcttcttgac gagcattcct aggggtcttt cccctctcgc caaaggaatg caaggtctgt 1020
tgaatgtcgt gaaggaagca gttcctctgg aagcttcttg aagacaaaca acgtctgtag 1080
cgaccctttg caggcagcgg aacccccccac ctggcgacag gtgcctctgc ggccaaaagc 1140
cacgtgtata agatacacct gcaaaggcgg cacaacccca gtgccacgtt gtgagttgga 1200
tagttgtgga aagagtcaaa tggtctctcct caagcgtatt caacaagggg ctgaaggatg 1260
cccagaaggc accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtacaca tgctttacat 1320
gtgttttagtc gaggttaaaa aaacgtctag gcccccgaa ccacggggac gtggttttcc 1380
tttgaaaaac acgatgataa tatggccaca agatctggat ccgccaccat gggctgcaga 1440
ctgctgtgct gcgccgtgct gtgcctgctg ggcccgctgc ccatggagac cggcgtgacc 1500
cagaccccca gacacctggt gatgggcatg accaacaaga agagcctgaa gtgcgagcag 1560
cacctgggcc acaacgccat gtactggtac aagcagagcg ccaagaagcc cctggagctg 1620
atgttcgtgt acaacttcaa ggagcagacc gagaacaaca gcgtgcccag cagattcagc 1680
cccagtgcc ccaacagcag ccacctgttc ctgcacctgc acacctgca gcccaggac 1740
agcgcctgt acctgtgcgc cagcagccag ggccaggagc agtacttcgg ccccgccacc 1800
agactgaccg tgaccgagga cctgagaaac gtgaccccc ccaaggtgag cctgttcgag 1860
cccagcaagg ccgagatcgc caacaagcag aaggccacc tggtgtgcct ggccagaggc 1920
ttcttccccg accacgtgga gctgagctgg tgggtgaacg gcaaggaggt gcacagcggc 1980
gtgagcaccg acccccaggc ctacaaggag agcaactaca gctactgcct gagcagcaga 2040
ctgagagtga gcgccacctt ctggcacaac ccagaaacc acttcagatg ccaggtgcag 2100
ttccacggcc tgagcgagga ggacaagtgg ccgagggca gcccgaagcc cgtgaccag 2160
aacatcagcg ccgaggcctg gggcagagcc gactgcggca tcaccagcgc cagctaccac 2220
cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac 2280
gccgtgctgg tgagcggcct ggtgctgatg gccatggtga agaagaaga cagctgagcg 2340
gccgc 2345

```

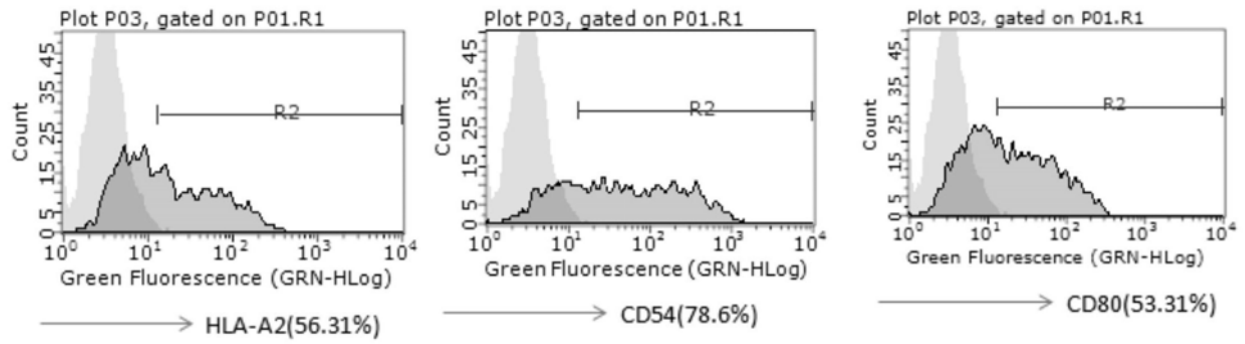


图1

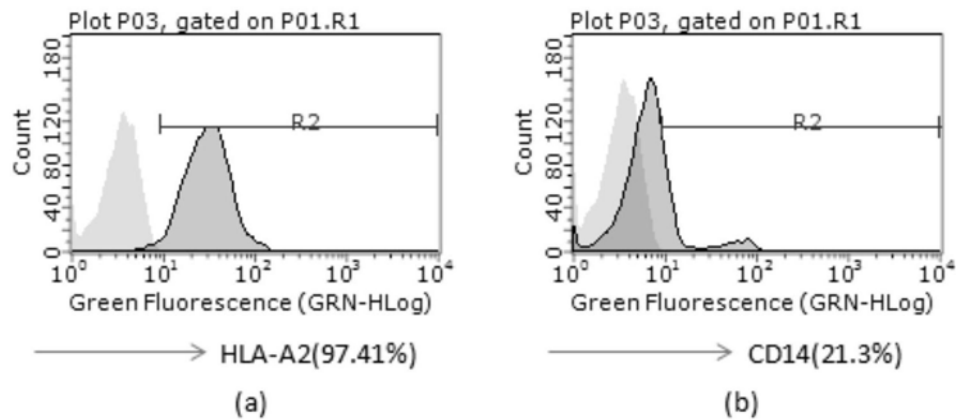


图2

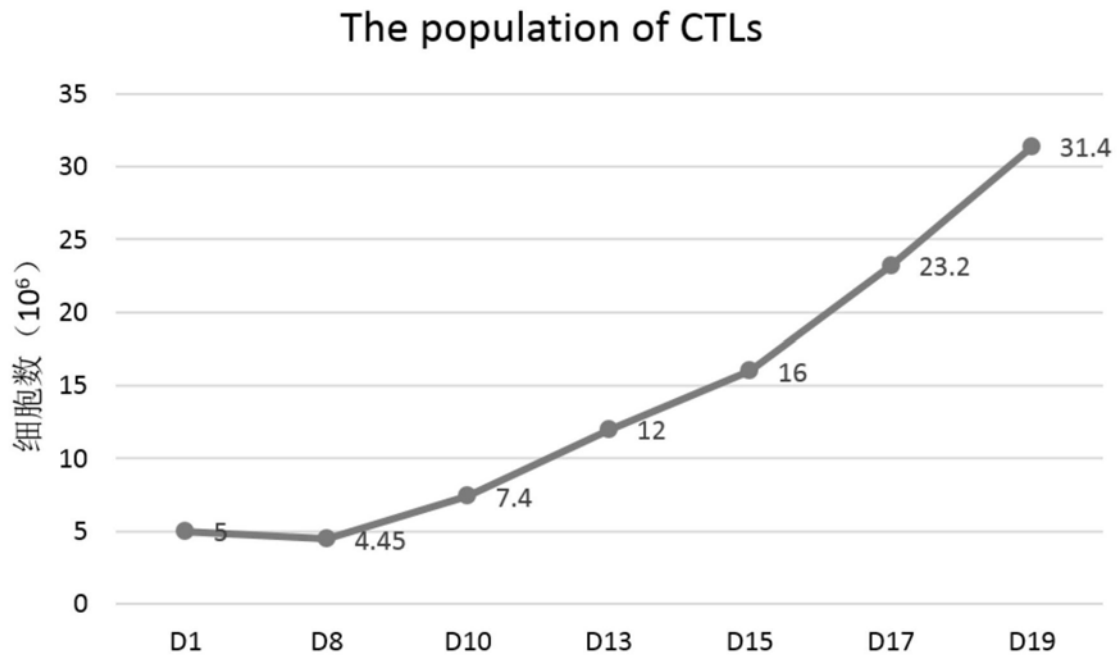


图3

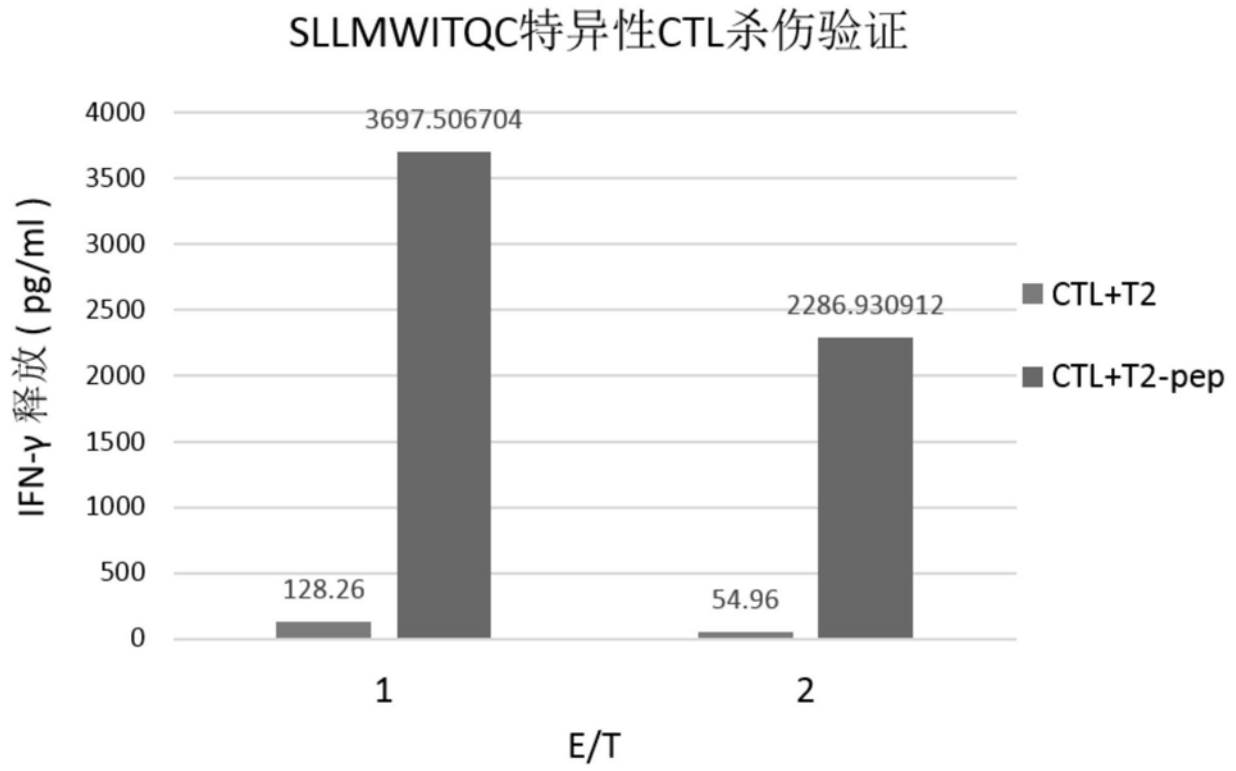


图4

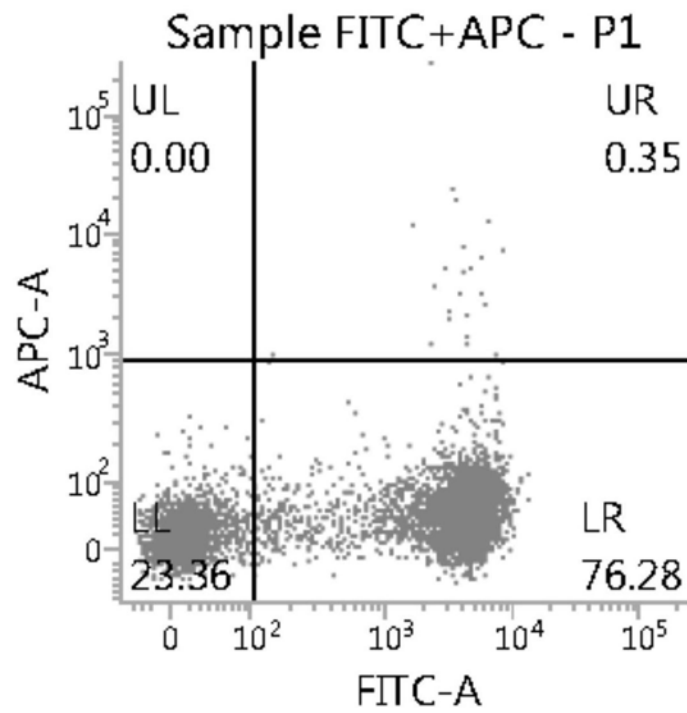


图5

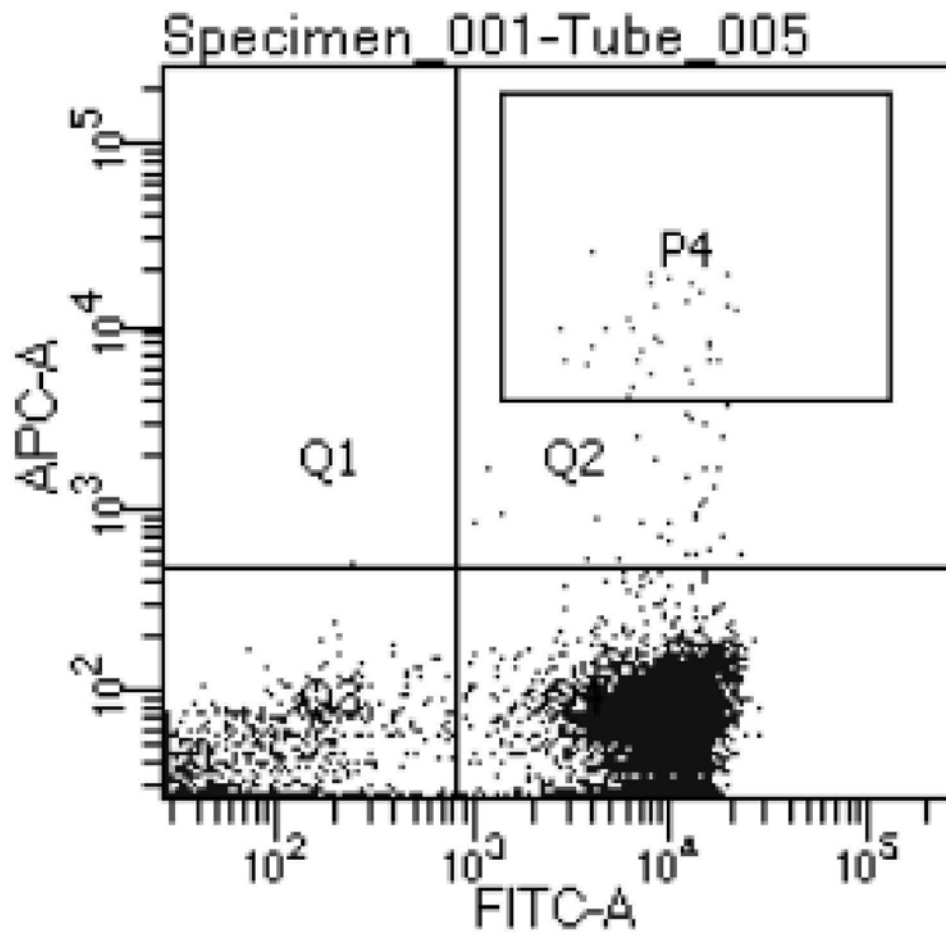


图6

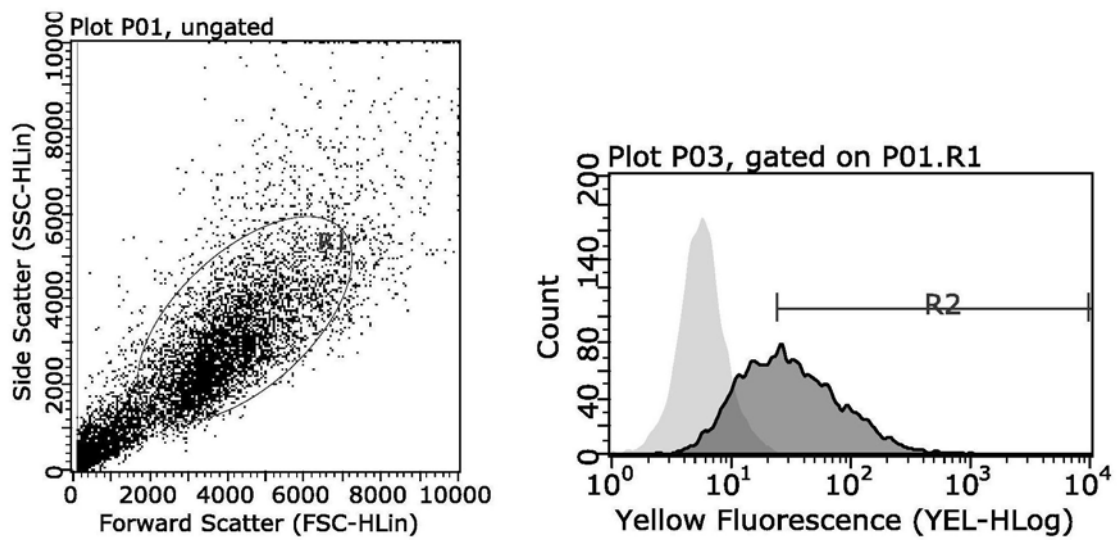


图7

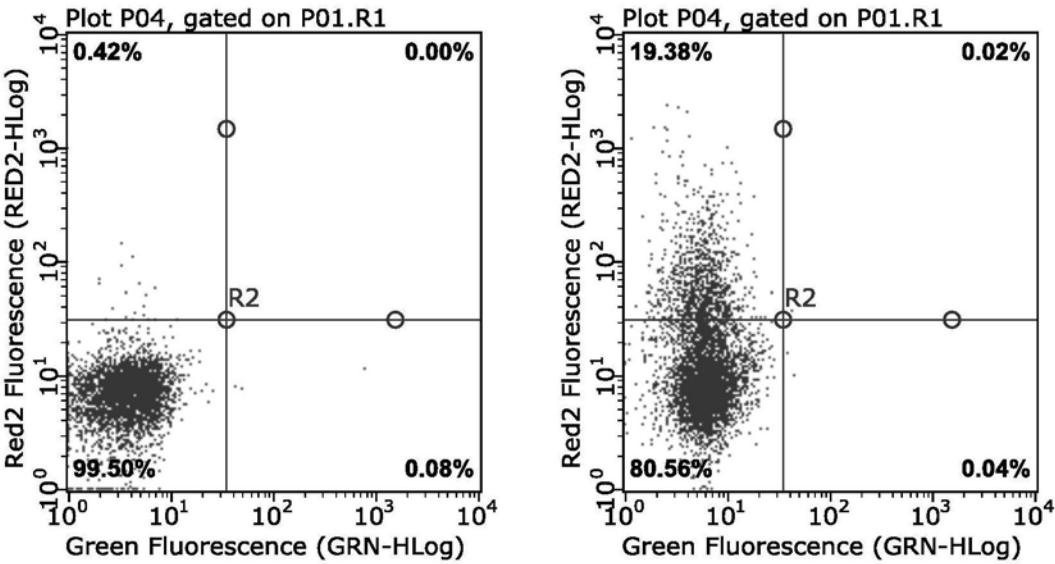


图8