



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109828107 B

(45) 授权公告日 2021.09.14

(21) 申请号 201910039264.0

(22) 申请日 2019.01.16

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109828107 A

(43) 申请公布日 2019.05.31

(73) 专利权人 清华大学  
地址 100084 北京市海淀区北京市100084  
信箱82分箱清华大学专利办公室

(72) 发明人 张新荣 胡志安 孙公伟 张钰清  
邢志 张四纯

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245  
代理人 关畅

(51) Int. Cl.  
G01N 33/534 (2006.01)  
G01N 33/60 (2006.01)  
G01N 27/626 (2021.01)  
G01N 21/64 (2006.01)  
G01N 21/31 (2006.01)  
C12Q 1/6816 (2018.01)  
G01N 33/574 (2006.01)

(56) 对比文件  
Gongwei Sun等.A combinatorial  
immunoassay for multiple biomarkers via a

stable isotope tagging strategy.《Chem Commun (Camb)》.2017,第53卷(第97期),参见 Scheme 1、第13075页左栏至第13076页右栏第2段.

Xiaomei Ren等.Efficient enzymatic synthesis and dual-colour fluorescent labelling of DNA probes using long chain azido-dUTP and BCN dyes.《Nucleic Acids Res》.2016,第44卷(第8期),参见附图1、8、12以及第3页左栏最后一段、第5页右栏最后一段至第10页左栏第1段.

Xudong Lou等.Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays.《Angew Chem Int Ed Engl》.2007,第46卷(第32期),全文.

Daniel Majonis等.Synthesis of a functional metal-chelating polymer and steps toward quantitative mass cytometry bioassays.《Anal Chem》.2010,第82卷(第21期),全文.

Jan Timper等.Surface "click" reaction of DNA followed by directed metalization for the construction of contactable conducting nanostructures.《Angew Chem Int Ed Engl》.2012,第51卷(第30期),全文.

审查员 张婷

权利要求书1页 说明书6页  
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称  
一种多原子元素标记探针及其制备方法与  
应用

(57) 摘要  
本发明公开了一种多原子元素标记探针及其制备方法与应用。本发明利用PCR技术快速合成了含有多种活性基团的DNA分子,并且以这种DNA分子作为骨架结构,将金属大环化合物通过正交反应偶联到骨架结构中,进而高效地获得多标记的元素标签。本发明将这种元素标签用于传统免疫,其灵敏度达到pg/ml,适用于生物大分子

痕量分析检测领域。

1. 一种制备多原子元素标记探针的方法,包括:  
通过化学偶联反应将大环金属离子复合物与含有活性基团R的DNA分子结合,得到所述多原子元素标记探针;  
所述大环金属离子复合物为大环螯合剂与金属离子复合而得;  
或者,通过化学偶联反应将大环螯合剂与所述含有活性基团R的DNA分子结合后,再加入金属离子进行复合,得到所述多原子元素标记探针;  
所述大环螯合剂中含有能与所述R进行共价偶联反应的基团;  
所述含有活性基团R的DNA分子为按照如下方法制得:以R-dNTP和模板DNA为原料,利用PCR法合成而得;  
所述模板DNA分子的5'端修饰有活性基团R';  
所述R'选自-biotin、-SH<sub>2</sub>、-S-S-、-NH<sub>2</sub>、-炔基和-叠氮基中的任意一种,且所述R'与所述R不同;  
所述R-dNTP为活性基团R修饰的核苷酸;  
所述核苷酸为A、G、C和T中至少一种;  
所述R选自-biotin、-SH<sub>2</sub>、-S-S-、-NH<sub>2</sub>、-炔基和-叠氮基中的任意一种;  
所述含有活性基团R的DNA分子中,模板DNA为pUC57质粒负载的β-g-2基因,为序列3,上游引物为序列1,下游引物为序列2。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述大环螯合剂为DOTA或DTPA;  
所述金属离子为稀土金属离子。
3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述稀土金属离子选自如下任意一种:La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm和Yb。
4. 根据权利要求1-3中任一所述的方法,其特征在于:所述化学偶联反应为链霉亲和素和生物素反应、click反应、-NH<sub>2</sub>和-NHS反应、-NH<sub>2</sub>和-NCS反应或-SH<sub>2</sub>和马来酰亚胺基团反应。
5. 一种权利要求1-4任一所述制备方法得到的多原子元素标记探针,包括所述含有活性基团R的DNA分子和所述大环金属离子复合物;  
所述含有活性基团R的DNA分子和大环金属离子复合物通过所述共价偶联反应相连;  
所述多原子元素标记探针中,5'端还修饰有活性基团R'。
6. 由权利要求5所述多原子元素标记探针中的R'与抗体共价偶联而得的抗体-DNA复合物。
7. 权利要求5所述多原子元素标记探针或权利要求6所述抗体-DNA复合物在生物大分子的免疫检测中的应用。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于:所述免疫检测中,所用检测方法为电感耦合等离子体法、原子发射和吸收光谱法或时间分辨免疫荧光分析法;  
所述多原子元素标记探针与待测生物大分子之间的生物反应为DNA杂交反应或抗原抗体免疫反应。

## 一种多原子元素标记探针及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,涉及一种多原子元素标记探针及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 元素标记是指利用原子或者离子作为标签(这里的“原子或者离子”形式可以是金属离子大环化合物也可以是金属原子等),标记生物大分子,经过生物分子的相互作用(抗原抗体相互作用,DNA杂交等),可以利用电感耦合等离子体(ICP-MS)相关技术对原子或离子信号进行捕获,进而直接或者间接地反应生物分子的用量关系。ICP-MS通过结合元素标记生物大分子,在临床和生命分析中展示了多通路分析和绝对定量检测的独特优势,给定量生物分析开辟了一条新途径。其中,100多种ICP-MS可识别元素的同位素几乎都可用于生物大分子标记,赋予了临床和细胞高通量检测相当大的潜力。

[0003] 传统的元素标记是基于DOTA和DTPA的元素-tag设计策略,并将其成功用TSH等蛋白质的高灵敏免疫检测。但是由于灵敏度的限制,这种传统标记的策略无法对血清中稀有疾病标志物和细胞表面蛋白进行检测。因为ICP-MS的信号强度和元素标签上的稀土离子或者原子数目存在线性关系,因此提高标签上的原子负载率是提高灵敏度的关键。纳米颗粒包含上万个原子,粒径在nm级别的金属纳米颗粒就可以使得信号强度提高4~5个数量级,在发展早期受到了重要的关注。但是,由于金属纳米颗粒比表面积巨大,进而带来了严重的非特异性吸附,在实际应用中的增强效果并不好。同时,由于纳米颗粒的粒径难以控制,合成种类有限,在多组分和信号稳定性上存在巨大的问题。为了获得更高的灵敏度,Lou等人设计合成了一种含有多反应位点的copolymer,这种polymer可以携带33个DOTA单元。这种polymer使得该种检测方法的灵敏度获得了提高,并且应用cy-TOF仪器中,实现了对单个细胞多种蛋白的同时检测。但是,有机高分子链存在一些固有的问题,一方面其水溶性和稳定性随着链的增加而急剧衰减,这就使得其标记数目很难得到进一步的提高,另一方面,高分子链的聚合度难以控制,很难合成拥有不同聚合度的元素tag,因此无法根据样品要求对检测线性范围和标记数目进行有效的调节。因此,设计发明高原子负载率,巨大线性范围并同时具有多组分检测潜力的元素标签是这一检测领域一直的追求,具有巨大的科学和商业价值。

### 发明内容

[0004] 针对元素标记探针对水溶性,原子负载率以及线性范围的要求,本发明提供了一种多原子元素标记探针及其制备方法与应用。

[0005] 本发明提供的制备多原子元素标记探针的方法,包括:

[0006] 通过化学偶联反应将大环金属离子复合物与含有活性基团R的DNA分子结合,得到所述多原子元素标记探针;

[0007] 所述大环金属离子复合物为大环螯合剂与金属离子复合而得;

[0008] 或者,通过化学偶联反应将大环螯合剂与所述含有活性基团R的DNA分子结合后,

再加入金属离子进行复合,得到所述多原子元素标记探针。

[0009] 所述大环螯合剂中含有能与所述R进行共价偶联反应的基团。

[0010] 上述方法中,所述大环金属离子复合物可按照各种常规方法制得;

[0011] 所述大环螯合剂为DOTA或DTPA;

[0012] 所述金属离子为稀土金属离子;更具体为如下稀土元素的离子:La、Ce、Pr、Nd、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm和Yb;

[0013] 所述R选自-biotin、-SH<sub>2</sub>、-S-S-、-NH<sub>2</sub>、-炔基和-叠氮基中的任意一种。

[0014] 所述化学偶联反应为链霉亲和素和生物素反应、click反应、-NH<sub>2</sub>和-NHS反应、-NH<sub>2</sub>和-NCS反应或-SH<sub>2</sub>和马来酰亚胺基团反应。

[0015] 所述含有活性基团R的DNA分子可按照各种常规方法制得,如具体可按照如下方法制得:以R-dNTP和模板DNA为原料,利用PCR法合成而得;

[0016] 所述模板DNA分子的5'端修饰有活性基团R' ;

[0017] 所述R-dNTP为活性基团R修饰的核苷酸。

[0018] 具体的,所述核苷酸为A、G、C和T中至少一种;

[0019] 所述R' 选自-biotin、-SH<sub>2</sub>、-S-S-、-NH<sub>2</sub>、-炔基和-叠氮基中的任意一种,且所述R' 与所述R不同。

[0020] 上述多原子元素标记探针的具体制备方法如下:

[0021] 在反应体系中加入一定浓度的:dNTPs (A,G,C,T四种核苷酸),模板DNA,引物以及聚合酶,在聚合酶的作用下,通过引物诱导,利用dNTPs作为反应原料,在短时间内就可以合成大量的具有特定长度的产物DNA。

[0022] 在反应体系中,本发明将传统的A,G,C,T四种核苷酸中的一种或者多种换成了含有活性基团R,例如:-biotin,-SH<sub>2</sub>,-S-S-,-NH<sub>2</sub>,-炔基,-叠氮的化学修饰核苷酸,这样合成的DNA分子就含有大量的活性基团。此外,由于引物控制模板上DNA开始合成的位点,通过设计上游引物和下游引物就可以控制合成产物的聚合度,进而获得不同聚合度,含有不同活性基团数目的DNA。为了将DNA和生物大分子偶联,起到元素标签的作用,本发明在上、下游引物的5'端连接了不同于DNA骨架结构中的活性基团R',例如:-biotin,-SH<sub>2</sub>,-S-S-,-NH<sub>2</sub>,-炔基,-叠氮等。经过PCR过程,就可以合成聚合度可控,含有两种及以上不同活性基团(R和R')的DNA分子骨架。

[0023] 在完成分子骨架的合成后,本发明利用含有炔基,叠氮,NCS或者马来酰亚胺等功能团的大环螯合剂与稀土金属离子进行作用,获得大环金属离子复合物。通过常见的共价偶联反应,例如:链霉亲和素和生物素反应,click反应,-NH<sub>2</sub>和-NHS或-NCS反应,-SH<sub>2</sub>和马来酰亚胺基团反应,将金属离子复合物与DNA分子骨架结构中的R基团反应,获得DNA-稀土分子。这一过程也可以先将大环螯合剂和DNA先偶联反应,然后再按照各种常规方法加入金属离子,获得DNA-稀土分子。

[0024] 在完成元素标签合成后,本发明利用DNA-5'端的另外的活性基团R' 和抗体共价偶联,将抗体-DNA复合物应用到传统的抗原抗体免疫检测中,通过ICP-MS等作为检测器获得抗原和元素信号的标准曲线,进而应用到实际血清或者生物样品中。

[0025] 本发明还要求保护一种多原子元素标记探针,该元素标记探针包括所述含有活性基团R的DNA分子和所述大环金属离子复合物;

[0026] 所述含有活性基团R的DNA分子和大环金属离子复合物通过所述共价偶联反应相连。

[0027] 上述多原子元素标记探针中,5'端还修饰有活性基团R' ;

[0028] 所述含有活性基团R的DNA分子和大环金属离子复合物的定义与前述方法中的定义相同;

[0029] 所述R'的定义与前述方法中R'的定义相同。

[0030] 本发明还保护由所述多原子元素标记探针中的R'与抗体共价偶联而得的抗体-DNA复合物。

[0031] 另外,按照上述方法得到的多原子元素标记探针及抗体-DNA复合物及该多原子元素标记探针或抗体-DNA复合物在生物大分子的免疫检测中的应用,也属于本发明的保护范围。其中,所述免疫检测中,所用检测方法为电感耦合等离子体(ICP-MS)法、原子发射和吸收光谱法或时间分辨免疫荧光分析法;

[0032] 所述多原子元素标记探针与待测生物大分子之间的生物反应为DNA杂交反应或抗原抗体免疫反应。

[0033] 本发明利用PCR方法可以快速合成含有多种活性基团的DNA分子而不需要复杂的合成技术工艺,且纯化过程简单,并且以这种DNA分子作为骨架结构,将金属大环化合物通过正交反应偶联到骨架结构中,可以高效地获得多标记的元素标签。本发明将这种元素标签用于传统免疫,其灵敏度检测达到pg/ml,适用于生物大分子痕量检测。本发明设计的标记探针的检测技术不限于ICP-MS,也可用于其它检测手段,例如原子发射和吸收光谱,时间分辨免疫荧光分析等。

## 附图说明

[0034] 图1为本发明基于PCR技术多官能团DNA分子合成过程。

[0035] 图2为实施例1中金属大环化合物与PCR合成的多炔基DNA分子通过click正交反应偶联的过程。

[0036] 图3为本发明实施例1中多原子元素标记探针应用于传统免疫检测CEA抗原的标准曲线图。

## 具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述,但本发明并不限于以下实施例。所述方法如无特别说明均为常规方法。所述原材料如无特别说明均能从公开商业途径获得。

[0038] 实施例1

[0039] 利用PCR合成180bp长的多炔基DNA骨架结构,利用click反应将多炔基DNA和含有叠氮基团及Eu修饰的大环金属离子复合物偶联,进而获得多原子元素标记探针。

[0040] 其合成过程具体如下:

[0041] (1) 称取含有叠氮基团及Eu修饰的大环金属离子复合物DOTA-N<sub>3</sub> (Azido-mono-amide-DOTA,购自Macrocyclics (Dallas TX):B288) 溶解到PBS缓冲液中(pH=5.8),配制成30mg/ml的母液,4℃保存;

[0042] (2) 另取200μL的离心管,加入DNA聚合酶,DNA模板,PCR缓冲液,A,G,C三种常规的

核苷酸以及5-ethynyl-dUTP,上下游引物(引物序列如表2所示),硫酸镁,并加入去离子水配平至50 $\mu$ L。所用DNA聚合酶和相应的PCR缓冲液均为配套的商用聚合酶和缓冲液(New England Biolabs:#M0259S),5-ethynyl-dUTP购买自Jena Bioscience(CLK-T07-L);DNA模板为pUC57质粒负载的 $\beta$ -g-2基因;所用DNA模板和上下游引物均购买自Sangon Biotech。

[0043] 最终50 $\mu$ L反应体系中相关物质的浓度如表1所示:

[0044] 表1、50 $\mu$ L反应体系中相关物质的浓度

|        |   |             |
|--------|---|-------------|
|        | DNA 聚合酶 (Deep Vent(exo <sup>-</sup> )酶) | 1unit       |
|        | 5-ethynyl-dUTP 和 A,G,C 三种三磷酸核苷酸         | 200 $\mu$ M |
| [0045] | DNA 模板                                  | 400 ng/ml   |
|        | 上、下游引物                                  | 1 $\mu$ M   |
|        | PCR 缓冲液 (商用)                            | 1 $\times$  |
|        | 硫酸镁                                     | 1mM         |

[0046] 表2、上下游引物序列

|        |      |                             |               |
|--------|------|-----------------------------|---------------|
| [0047] | 上游引物 | ACC TTT GCT CAT TGA CGT TAC | 5'-<br>Biotin |
|--------|------|-----------------------------|---------------|

|        |                 |   |               |
|--------|-----------------|---|---------------|
|        | 下游引物            | GCC AGT ATC AGA TGC AGT TC  | 5'-<br>Biotin |
|        | pUC57 质粒载体      |   |               |
| [0048] | $\beta$ -g-2 基因 | TTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGG<br>TGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAG<br>GTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTAAGGCCCTGGGCACGTTGGTATCAAG<br>GTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACA<br>GAGAAGACTCTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGT<br>CTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGT<br>TCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTIATGGGCAAC<br>CCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGG<br>CCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGC<br>TGCCTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTG |               |

[0049] (3) 将装有反应物的离心管放置在PCR程序控温仪中,并设置程序如表3所示:

[0050] 表3、PCR控温程序

|        |       |       |         |
|--------|-------|-------|---------|
| [0051] | 95 °C | 5 min | 循环 35 次 |
|        | 95 °C | 30 s  |         |
|        | 58 °C | 30 s  |         |
|        | 68 °C | 2 min |         |
|        | 4 °C  | 储存    |         |

[0052] (4) 将反应完成的离心管取出,PCR纯化试剂盒纯化,获得炔基功能化的180bp长的DNA骨架结构;所用PCR纯化试剂盒为QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen:28104);

[0053] (5) 将纯化好的反应物大约20 $\mu$ g,加到500 $\mu$ L的离心管中,并加入步骤(1)中的大环金属离子复合物(600 $\mu$ g/ml),硫酸铜(1mM),抗坏血酸钠(5mM)以及稳定剂BTAA(2mM)(2-[4-({双[(1-叔丁基-1H-1,2,3-三唑-4-基)甲基]氨基}甲基)-1H-1,2,3-三唑-1-基]醋酸)(购自MCE(HY-100486))反应,反应利用PCR程序控温仪控制温度,设置click反应温度控制程序如表4所示:

[0054] 表4、click温度控制程序

|        |       |           |         |
|--------|-------|-----------|---------|
| [0055] | 95 °C | 5 min     |         |
| [0056] | 95 °C | 30 s      | 循环 30 次 |
|        | 58 °C | 2min 30 s |         |
|        | 4 °C  | 储存        |         |

[0057] (6) 将反应产物利用超滤管 Vivacon® 500 (30k) 纯化,即可得到多原子元素标记探针。

[0058] 该多原子元素标记探针的头端修饰有生物素,DNA骨架中修饰的多炔基与含有叠氮基团及Eu修饰的大环金属离子复合物偶联。

[0059] 利用该实施例所得多原子元素标记探针进行免疫检测,具体过程如下:

[0060] 1、标准曲线的建立,包括如下步骤:

[0061] (1) 向包被了肿瘤标志物抗体CEA抗体的96孔板中加入不同浓度的肿瘤标志物抗原CEA标准品;该肿瘤标志物抗原CEA标准品采用Tris-HCl缓冲液配制;

[0062] (2) 将标记生物素(biotin)的肿瘤标志物抗体CEA抗体置于96孔板中;

[0063] (3) 步骤(2)中所述免疫反应结束后,向96孔板中再加入链霉亲和素(SA);

[0064] (4) 步骤(3)中所述生物素和链霉亲和素反应结束后,向96孔板中再加入上述实施例1所得多原子元素标记探针,该多原子元素标记探针即可与肿瘤标志物抗体CEA抗体结合,形成免疫反应的产物。

[0065] 上述步骤(2)-(4)操作前,需要对前一步骤进行清洗,排除干扰,保证测定的准确性;

[0066] 所述清洗采用PBST和BWT溶液作为清洗溶液,配制方法如下:

[0067] PBST:向0.01M PBS缓冲液中加入体积百分比为0.05%的吐温20水溶液;

[0068] PBST洗液涉及步骤1中的(1)-(3)步骤清洗;

[0069] BWT:5mM Tris-HCl(pH 7.5),0.5M EDTA,1M NaCl配置成的B&W洗液中加入0.05%的吐温20水溶液;

[0070] BWT洗液涉及步骤1中的(4)步骤清洗;

[0071] (5)将步骤(4)中所得免疫反应的产物进行解离,然后输入至所述电感耦合等离子体质谱仪中进行检测,得到金属Eu的质谱峰强度;

[0072] 检测条件如表5所示:

[0073] 表5、ICP-MS的检测条件

|        | 参数            | 数值      |
|--------|---------------|---------|
|        | 冷却气流速 (L/min) | 13      |
| [0074] | 辅助气流速 (L/min) | 0.7     |
|        | 雾化器气流速(L/min) | 0.96    |
|        | 样品提取时间 (s)    | 38      |
|        | 停留时间 (ms)     | 0.02    |
|        | 检测通道          | 3       |
|        | 每个样品的测试次数     | 3       |
| [0075] | PC 检测器电压(V)   | 1265    |
|        | 射频功率(W)       | 1578.61 |
|        | 模拟检测器电压(V)    | -1960   |

[0076] (6)以标准品中肿瘤标记物CEA的浓度为横坐标,以金属Eu的质谱峰强度为纵坐标,即可建立标准品中肿瘤标志物的浓度与金属的质谱峰强度之间的标准曲线,如图3所示。

[0077] 2、检测血清样本中肿瘤标志物的检测,包括如下步骤:

[0078] 重复步骤1中(1)-(4)的步骤,得到金属的质谱峰强度,根据图3所示标准曲线,即得到检测样本中肿瘤标志物的浓度;所得结果如表6所示。

[0079] 表6、利用该种元素标签检测血清中的CEA抗原

|        | 标准 CEA 值<br>(ng/mL) | 检测值(ng/mL) | 回收率 (%) |
|--------|---------------------|------------|---------|
| [0080] | 20                  | 21.7±1.2   | 108     |
|        | 60                  | 62.1±1.0   | 103     |
|        | 100                 | 98.2±2.2   | 98      |

[0081] 由表6可知,该种元素标签可以很好的一个用于实际样品的检测,基质干扰较小。

| [0001] |       | SEQUENCE LISTING   |     |
|--------|-------|--|-----|
| [0002] | <110> | 清华大学   |     |
| [0003] | <120> | 一种多原子元素标记探针及其制备方法与应用   |     |
| [0004] | <160> | 3  |     |
| [0005] | <170> | PatentIn version 3.5   |     |
| [0006] | <210> | 1  |     |
| [0007] | <211> | 21   |     |
| [0008] | <212> | DNA  |     |
| [0009] | <213> | Artificial sequence  |     |
| [0010] | <400> | 1  |     |
| [0011] |       | acctttgctc attgacgtta c  | 21  |
| [0012] | <210> | 2  |     |
| [0013] | <211> | 20   |     |
| [0014] | <212> | DNA  |     |
| [0015] | <213> | Artificial sequence  |     |
| [0016] | <400> | 2  |     |
| [0017] |       | gccagtatca gatgcagttc  | 20  |
| [0018] | <210> | 3  |     |
| [0019] | <211> | 480  |     |
| [0020] | <212> | DNA  |     |
| [0021] | <213> | Artificial sequence  |     |
| [0022] | <400> | 3  |     |
| [0023] |       | ttgcttctga cacaactgtg ttcactagca acctcaaaca gacaccatgg tgcacctgac  | 60  |
| [0024] |       | tcctgaggag aagtctgccg ttactgcctt gtggggcaag gtgaacgtgg atgaagttgg  | 120 |
| [0025] |       | tggttaaggcc ctgggcacgt tggtatcaag gttacaagac aggtttaagg agaccaatag | 180 |
| [0026] |       | aaactgggca tgtggagaca gagaagactc ttgggtttct gataggcact gactctctct  | 240 |
| [0027] |       | gcctattggt ctattttccc acccttaggc tgctggtggt ctacccttgg acccagaggt  | 300 |
| [0028] |       | tctttgagtc ctttgggat ctgtccactc ctgatgctgt tatgggcaac cctaaggtga   | 360 |
| [0029] |       | aggctcatgg caagaaagtg ctcggtgcct ttagtgatgg cctggctcac ctggacaacc  | 420 |
| [0030] |       | tcaagggcac ctttgccaca ctgagtgagc tgcactgtga caagctgcac gtggatcctg  | 480 |

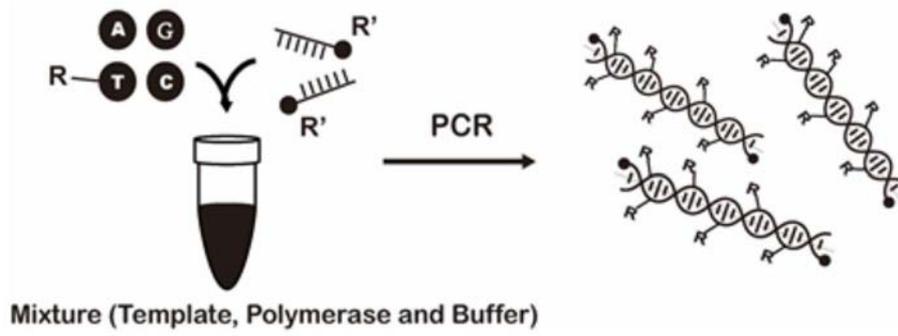


图1

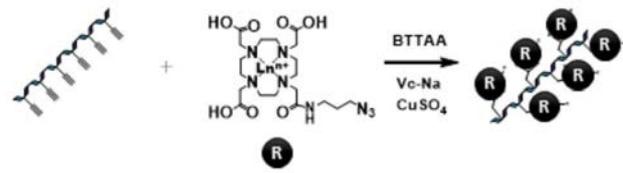


图2

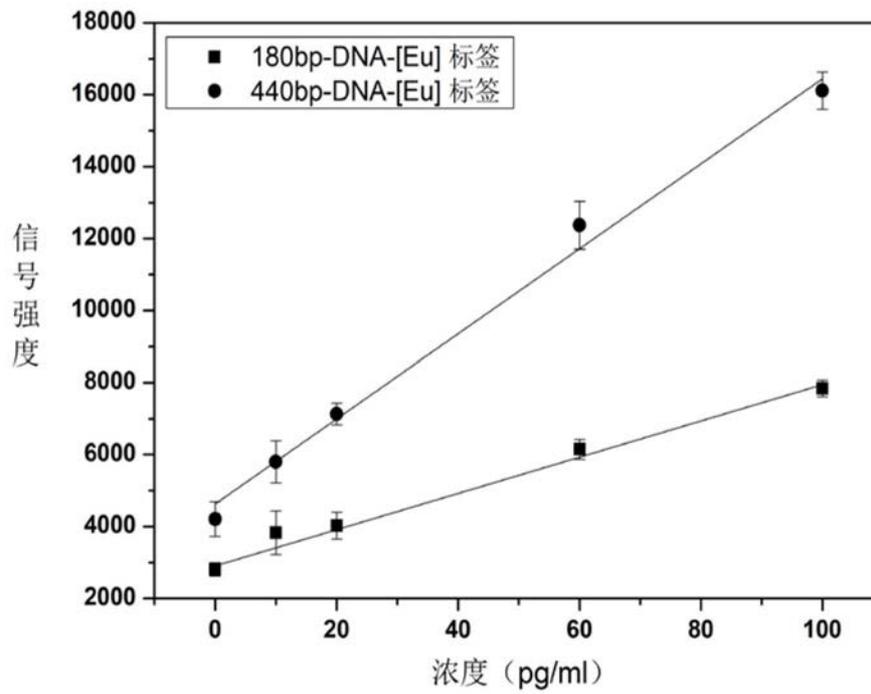


图3