



РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

(19) KZ (13) B (11) 34375
(51) C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

МИНИСТЕРСТВО ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 2019/0189.1

(22) 11.03.2019

(45) 05.06.2020, бюл. №22

(72) Мукантаев Канатбек Найзабекович; Муканов Касым Касенович; Тохтарова Лаура Абдыхалыковна; Канаев Дархан Бабанович; Раманкулов Ерлан Мирхайдарович

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56)

https://www.researchgate.net/publication/26791874_Epitope_mapping_and_crossreactivity_analysis_of_the_monoclonal_antibodies_against_hexon_protein_of_human_adenovirus_type_3

US 2010008947 A1, 14.01.2010

US 6569677 B1, 27.05.2003

US 2009274724 A1, 05.11.2009

(54) **ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ РЕТ28/HEXONBAV3-ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФРАГМЕНТА ГЕКСОНА АДЕНОВИРУСА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 3-ГО ТИПА**

(57) Генетическая конструкция рЕТ28/HexonBAV3 - биотехнологический продукт, содержащий ген фрагмента N-концевой области гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа, предназначенный для трансформации компетентных экспрессионных штаммов кишечной

палочки и получения рекомбинантного фрагмента гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения генетической конструкции, содержащей ген фрагмента N-концевой области гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа, предназначенный для получения рекомбинантного фрагмента гексона аденовируса 3-го типа.

Генетическая конструкция рЕТ28/HexonBAV3 содержащий ген фрагмента N-концевой области гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа, а также получение рекомбинантного фрагмента гексона аденовируса и разработка экспресс тест-система для серологической диагностики вирусной диареи и пневмонии телят является актуальной задачей для сельского хозяйства Республики. Современная ситуация с аденовирусными инфекциями в животноводстве требует разработки и внедрение современных диагностических препаратов на основе рекомбинантных антигенов и моноклональных антител.

Техническим результатом изобретения является обеспечение более эффективного получения рекомбинантного гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-типа в генетической конструкции содержащей ген фрагмента N-концевой области длиной 503 пар оснований нуклеиновых кислот.

(19) KZ (13) B (11) 34375

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к биотехнологии и касается получения генетической конструкции, содержащей ген фрагмента N-концевого области гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа, предназначенный для трансформации компетентных экспрессионных штаммов кишечной палочки и получения рекомбинантного фрагмента гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа.

Уровень техники

Аденовирусы крупного рогатого скота 3 типа играют важную роль в возникновении и развитии болезней дыхательной и пищеварительной систем у телят. Инфекционные респираторные и желудочно-кишечные заболевания у телят, в число которых входит и аденовирусная инфекция, являются наиболее распространенными болезнями животных. Заболеваемость инфекционными болезнями дыхательной системы в частном секторе составляет от 33 до 44%, а при промышленном содержании свыше 60%. На долю желудочно-кишечных инфекционных болезней приходится от 70 до 90% заболеваемости.

Аденовирусные инфекции крупного рогатого скота, также, как и другие возбудители инфекционных болезней органов дыхания и желудочно-кишечного тракта телят имеют широкое распространение во всем мире. В настоящее время аденовирусная инфекция зарегистрирована в Италии, Польше, Великобритании, ФРГ, Канаде, Молдове, Беларуси, на Украине и др. О значимости инфекционных респираторных и желудочно-кишечных болезней молодняка свидетельствуют мероприятия по профилактике данных инфекций, проводимые во многих странах. Например, широкомасштабные совместные исследования, проведенные ветеринарными службами Республики Беларусь и Российской Федерации, показали, что возбудители этих инфекций являются доминирующими в возникновении болезней и падеже молодняка.

Диагноз на аденовирусную инфекцию затруднен в следствие идентичности клинических симптомов с симптомами различных болезней. Пневмоэнтерит, вызванный бычьим аденовирусом, должен быть дифференцирован от вирусной диареи крупного рогатого скота, респираторного синцитиального вируса крупного рогатого скота, ринотрахеита и парагриппа-3. Аденовирус крупного рогатого скота диагностируются различными методами, такими как выделение вирусов, гибридизация *in situ*, ИФА, прямая иммунофлуоресценция, рестрикционный анализ и ПЦР.

Одним из важных диагностических антигенов является гексон вируса. Моноклональные антитела против гексона аденовируса 2Hx-2 эффективно выявляли аденовирусы методом иммуноферментного анализа. Этот вывод был подтвержден при исследовании 15 различных штаммов аденовируса и аденовирусного антигена в

клинических образцах методом ИФА на основе моноклональных антител.

Гексоновый белок содержит групповой специфический эпитоп, общий для всех членов рода *Mastadenovirus*, со значительным сохранением аминокислотной последовательности. Гексоновый белок также несет специфические детерминанты серотипа аденовирусов. Было обнаружено сохранение последовательности гексонового белка между аденовирусом серотипа 10 и несколькими видами аденовирусов млекопитающих. Ген гексона транскрибируется из позднего 3(L3) участка генома под контролем основного позднего промотора и имеет ORF приблизительно 2900 пар оснований. Область L3 кодирует белки, необходимые для репликации вируса и сборки капсидов.

Проведенный патентный поиск выявил патент US20040234549A1 от 1999-04-09, «Novel recombinant and mutant adenoviruses». Изобретение относится к мутантным и рекомбинантным аденовирусам крупного рогатого скота 3-готипа, имеющим делецию и/или вставку ДНК в раннюю область гена 4 (E4). Изобретение также относится к мутантным и рекомбинантным аденовирусам крупного рогатого скота 1-го типа, имеющий делецию и/или вставку ДНК в раннюю область гена 3 (E3). Настоящее изобретение также предусматривает использование вирусных векторов для вакцинации, генной терапии или других применений в зависимости от ситуации.

Патент US20050032045A1 от 2003-06-10, «Chimeric adenovirus capsid proteins». Изобретение относится к капсидным белкам химерного аденовируса, содержащим часть или весь капсидный белок аденовируса и белка по связыванию сайта связывания клеточной поверхности на клетках, присутствующих в кишечно-ассоциированных лимфоидных тканях (GALT) млекопитающего. Изобретение также относится к капсидам аденовируса, содержащим химерный белок капсида, к комплексам, содержащим химерный капсидный белок аденовируса, связанный с клеткой в GALT, к системам и векторам капсидирования, в частности к аденовирусным векторам, способных экспрессировать капсидный белок химерного аденовируса. Настоящее изобретение также относится к вирусным частицам, клеткам-хозяевам и композициям, содержащим такие векторы, в частности, для использования в вакцинах, способам вызывания иммунного ответа и способам направленной доставки гетерологичных белков, таких как антигены, к клеткам-мишеням.

Патент US6569677B1 от 1997-04-02, «Modified adenoviral fiber and target adenoviruses». Изобретение относится к аденовирусному фибрину, модифицированному мутацией одного или нескольких аминокислотных остатков. Модифицированный участок специфичен к природному клеточному рецептору в трехмерной структуре указанного аденовируса. Изобретение, кроме того, относится к фрагменту ДНК, вектору экспрессии и клеточной линии, экспрессирующей

указанный фибрин, а также касается аденовируса, способа получения аденовируса этого типа и инфицирующий клетки-хозяина, а также их терапевтического применения и соответствующая фармацевтическая композиция.

Патент US20030099615A1 от 2001-09-24, «Porcine adenovirus E1 and E4 regions». Настоящее изобретение относится к характеристике областей E1 и E4 свиного аденовируса. Полная нуклеотидная последовательность генома аденовируса свиньи типа 3 (PAV-3), обеспечивающая характеристику области E1 PAV3. Предложены методы конструирования инфекционных геномов PAV путем гомологичной рекомбинации в прокариотических клетках. Рекомбинантные вирусы PAV получают путем трансфекции клеток млекопитающих рекомбинантными геномами PAV. Геном PAV-3 можно использовать в качестве вектора для экспрессии гетерологичных нуклеотидных последовательностей, например, для приготовления и введения субъединичных вакцин свиньям или другим млекопитающим.

В результате поиска выявлена научная статья описывающая получение реагентов на основе рекомбинантного гексона аденовируса человека 3-го типа для разработки диагностических реагентов (Hongling Qiu, Zhichao Zhou, Kaixia Feng, Xingui Tian, Xiao Li, Haitao Li, Ke Xing, Jingxian Chen, Chuanjiang Li, Rong Zhou. Epitope mapping and cross-reactivity analysis of the monoclonal antibodies against hexon protein of human adenovirus type 3// Virus Research. - 2009. - Vol.146. - P. 58-65, doi:10.1016/j.virusres.2009.08.011). В этом исследовании три моноклональных антитела (MAb) 5D4, 7B2 и 3D10 были получены против рекомбинантного гексона HAdV-3. Для получения рекомбинантных гексонов авторы использовали генетическую конструкцию на основе pGEX. По данным авторов полученные МКА и рекомбинантные фрагменты гексона могут играть важную роль в клинической серотип-специфической диагностике, анализе структуры вируса, а также в идентификации новых серотипов человеческого аденовируса. В отличие от аналога, генетическая конструкция, описанная в заявке, несет ген гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа и клонирован в плазмиду pET28.

Сущность изобретения

Существенным признаком изобретения является способность генетической конструкции экспрессировать белок с аминокислотной последовательностью полностью совпадающие с аминокислотной последовательностью фрагмента N-концевой области гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа. Нуклеотидная последовательность синтезированного гена должна полностью совпадать с кодон оптимизированной последовательностью гена гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа.

Задачей изобретения является получение генетической конструкции, содержащей кодооптимизированный ген фрагмента N-концевой области гексона аденовируса крупного рогатого

скота 3-го типа предназначенный для трансформации компетентных экспрессионных штаммов кишечной палочки и получения рекомбинантного ahfvutynf гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа. Техническим результатом изобретения является генетическая конструкция содержащая ген фрагмента N-концевой части гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа длиной 503 пар оснований, в том числе нуклеотидные последовательности сайтов рестрикции BamHI, XhoI и гекса-гистидиновой метки. Генетическая конструкция вследствие использования полноразмерного и кодон оптимизированного гена обеспечит более эффективное получение рекомбинантного гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа.

Поиск аминокислотной последовательности гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа проводили с использованием баз данных PubMed NCBI и GenBank NCBI. Анализ первичных структур проводился с использованием пакета программ Vector NTI 9.0. Для синтеза в условиях de novo гена фрагмента N-концевой части гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа использована аминокислотная последовательность, представленная в базе данных по № AAD09728.1.

В работе использовались хемокомпетентные штаммы E.coli DH5a (Invitrogen, USA) и электрокомпетентные клетки E. coli штамма BL21(DE3), плазмидные вектора pGEM-TEasy (Promega, USA) и pET28 (NovogenUSA). Клетки E. coli выращивали в жидкой и на плотной питательной среде LB.

Генетическая конструкция создавалась в условиях de novo. Для этого, предварительно были синтезированы 14 олигомера размером 60 олигонуклеотидов, для синтеза гена гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа с 4 концевыми сайтами рестрикции. Полученные гены кодон оптимизированы для достижения максимальной экспрессии в E.coli. Сборку гена осуществляли 2 раундовой полимеразной цепной реакцией с использованием Phusion полимеразы.

Фракционирование продуктов полимеразной цепной реакции осуществляли методом электрофореза в 1% легкоплавком агарозном геле. Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере (0,04М трис-ацетат pH 8,1, 0,002М ЭДТА) с содержанием 0,5 мкг/мл бромистого этидия, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30-60 мин. Фрагмент ДНК выделяли из геля используя набор GenElute™ Gel Extraction Kit sufficient for 70 purifications (Sigma, США).

Для клонирования синтезированного гена в вектор pGEM-TEasy, предварительно к гену достраивали концевые A нуклеотиды используя Tag-полимеразу. К 2 мкл раствора ДНК добавляли 23 мкл Master-Mixt для Taq-полимеразы и 0,5 мкл Taq-полимеразы, перемешивали, консолидировали содержимое на дно пробирки и инкубировали смесь при 72°C в течение 20 минут. Далее к 25 мкл реакционной смеси добавляли 25 мкл воды MQ.

Добавляли 40-50 мкл фенола и тщательно перемешивали содержимое пробирки встряхиванием на вортексе до образования однородной суспензии. Центрифугировали при 10000 об/мин - 5 минут.

Полученную водную фазу добавили в новую пробирку, добавили 1 мкл декстрана и 5 мкл 5М хлорида натрия. Капли консолидировали на дно пробирки и добавили 170 мкл этанола 96%. Выдерживали 10 минут при - 20°C и центрифугировали 1000 об/минуту в течение 10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку вносили 50 мкл 96% этанола и центрифугировали при 10000 об/минуту в течение 1 минуты. Надосадочную жидкость удаляли, 10 минут просушивали осадок для полного удаления этанола, осадок растворяли в 5 мкл чистой воды MQ для лигазных реакций.

Для клонирования полученного гена в вектор pGEM использовали набор pGEM-T Cloning Kit (Promega) по инструкции производителя. Лигирование проводили в течение ночи при 4-5°C с использованием суховоздушного настольного термостата.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* DH5a проводили по методу «Heat Shock». Предварительно приготовили LB агар с канамицином, IPTG и X - gal. Эффективность трансформации определяли использованием в качестве контроля pUC19, входящий в комплект. Чашки Петри инкубировали в течение ночи при 37°C.

Полученные белые колонии тестировались на полимеразной цепной реакцией с использованием праймеров M13-forward и M13-revers. Длина получаемого ПЦР продукта составил 593 пар оснований. Отобранные колонии пересеивались в 50 мл среды LB + канамицин и культивировались при 37°C в течение 18 часов при постоянной аэрации. После культивирования клетки собирались центрифугированием при 5000 об/минуту в течение 20 минут при 4°C. Очистку плазмиды проводили с использованием набора PureLink® HiPure Plasmid Midiprep Kit.

Первичную структуру ДНК определяли по методу Sanger с использованием наборов BigDye на автоматических анализаторах ДНК ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

Гидролиз полученной плазмидной ДНК и pET28 проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции EcoRI и XhoI в соответствующих буферных и температурных условиях согласно рекомендациям производителей.

Разделение продуктов гидролиза проводили электрофорезом в 1% левокоплавкой агарозе. Предварительно в рестрикционную смесь добавляли 1 мкл декстрана и 5 мкл 5М хлорида натрия. Капли консолидировали на дно пробирки и добавляли 170 мкл этанола 96%. Выдерживали 10 минут при - 20°C и центрифугировали 1000 об/минуту в течение 10 минут. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку вносили 50 мкл 96% этанола и центрифугировали при 10000 об/минуту в течение 1 минуты. Надосадочную жидкость удаляли, 10 минут

просушивали осадок для полного удаления этанола, осадок растворяли в 5 мкл чистой воды MQ. Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис- ацетатном буфере (0,04М трис-ацетат pH 8,1, 0,002М ЭДТА) с содержанием 0,5 мкг/мл бромистого этидия, при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 30-60 мин. Фрагменты ДНК из геля выделяли, используя набор GenElute™ Gel Extraction Kit sufficient for 70 purifications (Sigma, США).

Для лигирования фрагментов ДНК использовали T4 ДНК лигазу. Лигирование проводили в строгом соответствии с инструкцией производителя. Реакцию проводили при 4°C в течение ночи. Последовательность SEQ ID NO1. Генетическая конструкция экспрессирует аминокислотную последовательность SEQ ID NO2.

Компетентные клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали полученными экспрессионными плазмидами с использованием электропоратора MicroPulser для бактерий и дрожжей (Bio-Rad), трансформанты высевали на селективную среду с канамицином (100 мкг/мл). Полученные белые колонии тестировались на полимеразной цепной реакцией с использованием праймеров T7-forward и T7-revers. Длина получаемого ПЦР продукта составил 744 пар оснований.

Для определения экспрессионной активности штамм-продуцентов, отобранные колонии инокулировали в 50 мл среды LB (канамицин 50 мкг/мл) и инкубировали до OD600 ~ 0,6-0,8 при 37°C в течение 18-24 часов. По достижении необходимой плотности добавляли 0,2 мМ IPTG и культивировали в течение 12 часов при комнатной температуре. Через каждые два часа после добавления IPTG отбирали по 5 мл среды. Клетки осаждали центрифугированием при 4000g в течение 10 минут, осадок и ресуспендировали в 500 мкл TNE буфера (20 мМ Трис pH 7,5, 1 мМ ЭДТА, 100мМ NaCl). Клетки разрушали ультразвуком (22kHz, 4 раза по 120 секунд), полученный лизат клеток анализировали денатурирующим электрофорезом в 15% ПААГ.

Электрофорез осуществляли по методу Laemmli V.K., на аппарате для вертикального электрофореза (BioRad, США) с использованием трис-глицинового буфера.

Для приготовления 10% разделяющего полиакриламидного геля смешивали 10 мл 30% раствора мономеров (28,5 г акриламида, 1,5 г бис-акриламида, дистиллированная вода до 100 мл), 7,5 мл разделяющего буфера (1,5 М Трис HCl, pH-8,8), 12 мл дистиллированной воды. После смешивания растворов проводили дегазацию раствора и добавляли 150 мкл 10% раствора персульфата аммония, 0,3 мл 10% додецилсульфата натрия, 10 мкл N-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД). После добавления ТЕМЕД, гель вносили в камеру и аккуратно настилали дистиллированную воду. Гель оставляли на 45 минут для полимеризации.

Концентрирующий гель готовили смешиванием 1,33 мл 30% раствора мономеров, 2,5 мл концентрирующего буфера (0,5 М Трис HCl, pH-

6,8), 6,1 мл дистиллированной воды. После перемешивания компонентов проводили дегазацию раствора и добавляли 50 мкл 10% раствора персульфата аммония, 0,1 мл 10% раствора додецилсульфата натрия, 5 мкл ТЕМЕД. Раствор концентрирующего геля наслаивали на подготовленный разделяющий гель, вставляли гребенку и оставляли на 45 минут для полимеризации.

Приготовленную полиакриламидную пластинку закрепляли в камере для электрофореза и заливали трис-глициновый буфер (0,025 М трис рН-8,3, 0,192 М глицин, 0,1% додецилсульфата натрия). Преэлектрофорез проводили при силе тока 20 мА в течение 30 минут. Препараты антигенов разводили в буфере для образцов (0,125 М трис-НС1 рН-6,8, 4% додецилсульфат натрия, 20% глицерин, 10% меркаптоэтанол) в соотношении 1:1. Смесь выдерживали при 100°C в течение 3 минут. В лунки геля вносили по 10 мкл приготовленного образца. Электрофорез проводили в стадии концентрирующего геля при 10 мА, в стадии разделяющего геля при 20 мА. Белковые полосы выявляли с помощью окраски электрофореграммы Кумасси R-250. Оценку электрофореграммы проводили на гель документирующей системе (BioRad, США).

Определение концентрации очищенного рекомбинантного антигена проводили по методу Брэдфорда. В лунки первого ряда вносили по 0,1 мл пробы образца очищенного антигена, контролем служил бычий сывороточный альбумин в концентрации 1 мг/мл. В лунки следующих рядов вносили по 0,05 мл забуференного раствора. Опытные и контрольные пробы белка раститровывали в объеме 0,05 мл. В каждую лунку вносили по 0,05 мл реактива Брэдфорда и учитывали результат на спектрофотометре при длине волны 492 нм.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

Генетическая конструкция рЕТ28/HexonBAV3 содержит ген фрагмента N-концевой области гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа. Генетическая конструкция получена путем синтеза гена в условиях de novo и клонированием в экспрессионную плазмиду рЕТ28. Генетическая конструкция в компетентных клетках E.coli штамма BL21(DT3) экспрессирует рекомбинантный гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа. Для

этого, клетки выращивают в 50 мл среды LB+канамицин до OD600 ~ 0.8 при 37°C в течение 18-24 часов. По достижении необходимой плотности добавляют 0,2 мМ IPTG и культивируют в течение 8 часов при комнатной температуре. После этого, клетки осаждают центрифугированием при 4000g в течение 10 минут, осадок промывают в 1/3 объема физиологического раствора, центрифугируют при 4000g течение 10 минут и ресуспендируют в 10 мл TNE буфера (20 мМ Трис рН 7.5, 1 мМ ЭДТА, 100мМ NaCl). Клетки разрушают ультразвуком (22kHz, 4 раза по 120 секунд), нерастворимую фракцию отделяют центрифугированием при 13000 об/мин в течение 60 минут. Нерастворимую фракцию (осадок) ресуспендируют в 10 мл буфер №1 (20мМ HEPES, 500 mM NaCl, 1M мочевиной), инкубируют 30 минут на орбитальном шейкере при комнатной температуре, затем центрифугируют при 13000 об/мин в течение 30 минут. Нерастворимую фракцию ресуспендируют в буфере для металл-аффинной хроматографии (20мМ HEPES, 500 mM NaCl, 20 mM имидазол, 8 M мочевины, 10 mM 2-меркаптоэтанол) и обрабатывают ультразвуком (22kHz, 1 раз 60 секунд). После обработки ультразвуком суспензию инкубируют 30 минут на орбитальном шейкере при комнатной температуре, затем центрифугируют при 6000 об/мин в течение 20 минут, нерастворимую фракцию отбрасывают. Рекомбинантный белок из надосадочной жидкости очищают на колонке HisTrap (Amersham, США). Элюцию проводят буфером для металл-аффинной хроматографии содержащий 8M мочевины и 200 mM имидазол. Ренатурацию рекомбинантного белка проводят с помощью диализа против 300-кратного объема 25мМ натрий-фосфатного буфера рН 7.25 с 300мМ NaCl. Ренатурированный белок анализируют денатурирующим электрофорезом в 15% ПААГ.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Генетическая конструкция рЕТ28/HexonBAV3 для получения рекомбинантного фрагмента гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа, содержащая ген гексона, *отличающаяся* тем, что содержит ген фрагмента N-концевой области гексона аденовируса крупного рогатого скота 3-го типа и клонирован в плазмиду рЕТ28.

<110> Republican State Enterprise "National Center for Biotechnology" under the Science Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan

<120> Genetic construction PET28 / HexonBAV3 - containing bovine adenovirus type 3 hexon gene

<160> 1

<211> 5818

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

```

tcgagcacca ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg 60
agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg 120
tcttgagggg ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg attggcgaat gggacgcgcc 180
ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 240
tgccagcgcc ctagcgcccg ctcccttcgc tttcttccct tcccttctcg ccacgttcgc 300
cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt 360
acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta ggtgatggt tcacgtagtg ggccatcgcc 420
ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccaag tctttaata gtggactcct 480
gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataagggat 540
tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 600
ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg 660
aacccctatt tgtttatfff tctaaataca ttcaaatacg tatccgctca tgaattaatt 720
cttagaaaaa ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaattt attcatalca ggattatcaa 780
taccatattt ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc 840
ataggatggc aagatcctgg tatcggctcg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac 900
ctattaattt cccctcgta aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgacga 960
ctgaatccgg tgagaatggc aaaagtttat gcatttcttt ccagacttgt tcaacaggcc 1020
agccattacg ctcgctatca aaactactcg catcaaccaa accgttatcc attcgtgatt 1080
gcgccctgagc gagacgaaat acgcatcgcc tgtaaaaagg acaattacaa acaggaatcg 1140
aatgcaaccg gcgcaggaac actgccagcg catcaacaat attttcacct gaatcaggat 1200

```

atttctetaa taactggaat gctgttttcc cggggatcgc agtggtgagt aaccatgcat 1260
 catcaggagt acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg cataaattcc gtcagccagt 1320
 ttagtctgac catctcatct gtaacatcat tggcaacgct acctttgcca tgtttcagaa 1380
 acaactctgg cgcacgggc ttcccataca atcgatagat tgtcgcaect gattgcccga 1440
 cattatcgcg agcccattta taccatata aatcagcacc catgttgaa ttaatcgcg 1500
 gcctagagca agacgtttcc cgttgaatat ggctcataac accccttgta ttaactgtta 1560
 tgtaagcaga cagttttatt gttcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttcac 1620
 tgagcgtcag acccctaga aaagatcaa ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc 1680
 gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgcggat 1740
 caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gatacaaat 1800
 actgtccttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgect 1860
 acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgt 1920
 cttaccgggt tggactcaag acgatagta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg 1980
 gggggttctg gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta 2040
 cagcgtgagc tatgagaaag cgcacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggatccg 2100
 gtaagcggca ggtcggaaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg 2160
 tatctttata gtccgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc 2220
 tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg 2280
 gccttttctg ggccttttgc tcacatgttc tttctcggct tatcccctga ttctgtggat 2340
 aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgc gcagccgaac gaccgagcgc 2400
 agcagtcag tgagcgagga agcgggaagag cgcctgatgc ggtattttct ccttacgcat 2460
 ctgtgcggta tttcacaccg catatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg 2520
 catagttaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggtcatgg ctgcgccccg 2580
 acaccgccca acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta 2640
 cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc 2700
 gaaacgcgag aggcagctgc ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg attcacagat 2760

gctgcctgt tcatccgct ccagctcgtt gagtttctcc agaagcgtta atgtctggct 2820
 totgataaag cgggccatgt taagggcgtt ttttctctgt ttggctactg atgcctccgt 2880
 gtaaggggga tttctgttca tgggggtaat gataccgatg aaacgagaga ggatgctcac 2940
 gatacgggtt actgatgatg aacatgcccg gttactggaa cgttgtgagg gtaaacaact 3000
 ggcggtatgg atgcggcggg accagagaaa aatcaactcag ggtcaatgcc agcctctcgt 3060
 taatacagat gtaggtgttc cacagggtag ccagcagcat cctgcgatgc agatccggaa 3120
 cataatggtg cagggcgtg acttccgctt ttccagactt tacgaaacac ggaaaccgaa 3180
 gaccattcat gttgttgctc aggtcgcaga cgttttgtag cagcagtcgc ttcacgttcg 3240
 ctgcgctatc ggtgattcat tctgctaacc agtaaggcaa ccccgccagc ctagccgggt 3300
 cctcaacgac aggagcaca tcattgcgac ccgtggggcc gccatgccgg cgataatggc 3360
 ctgcttctcg ccgaaacgtt tggtagcggg accagtgcg aaggttgtag cgagggcgtg 3420
 caagattccg aataccgcaa gcgacaggcc gatcatcgtc gcgctccagc gaaagcggtc 3480
 ctgcgccgaa atgaccgaga gcgctgcggg cacctgtcct acgagttgca tgataaagaa 3540
 gacagtcata agtgccgaga cgatagtcct gccccgcgcc caccggaagg agctgactgg 3600
 gttgaaggct ctcaagggca tcggtcgaga tcccggtgcc taatgagtga gctaacttac 3660
 attaattgctg ttgcgctcac tgcccgtttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca 3720
 ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgctt attgggcgcc aggggtggtt 3780
 ttctttcac cagtgcgagc ggcaacagct gattgccctt caccgcctgg ccctgagaga 3840
 gttgcagcaa gcggtccagc ctggtttgcc ccagcaggcg aaaatcctgt ttgatggtg 3900
 ttaacggcgg gatataacat gagctgtctt cggtatcgtc gtatcccact accgagatat 3960
 ccgcaccaac gcgcagcccg gactcggtaa tggcgcgcat tgcgcccagc gccatctgat 4020
 cgttggaac cagcatcgca gtgggaacga tgccctcatt cagcatttgc atggtttggt 4080
 gaaaaccgga catggcactc cagtgcctt cccgttccgc taccgctga atttgatttc 4140
 gagtgcagata tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc cgagacagaa cttaatgggc 4200
 ccgctaacaq cgcqatttgc tqqtqacca atqcqacca atqctccacq cccagtcgcq 4260
 taccgtcttc atgggagaaa ataatactgt tgatgggtgt ctggtcagag acatcaagaa 4320

```

ataacgccgg aacattagtg caggcagctt ccacagcaat ggcacccctg tcatccagcg 4380
gatagttaat gatcagccca ctgacgcggt gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac 4440
aggcttcgac gccgcttctg totaccatcg acaccaccac gctggcacc agttgatcgg 4500
cgcgagattt aatcgccgag acaatttgcg acggcgcggt cagggccaga ctggaggtgg 4560
caacgccaat cagcaacgac tgtttgcccg ccagttgttg tgcacgcgg ttggaatgt 4620
aattcagctc gccatcgcc gcttccactt tttcccgct tttccgagaa acgtggctgg 4680
cctggttcac cagcgggaa acggtctgat aagagacacc ggcatactct gcgacatcgt 4740
ataacgttac tggtttcaca ttcaccacc tgaattgact ctcttccggg cgctatcatg 4800
ccataccgag aaaggttttg cgcattcga tgggtgcgg gatctcgacg ctctccctta 4860
tgcgactcct gcattaggaa gcagcccagt agtaggtga ggccgttgag caccgccgcc 4920
gcaaggaatg gtgcacgaa ggagatggcg cccaacagtc ccccgccac ggggctgcc 4980
accataccca cgcgaaaca agcgtctatg agcccgaagt ggcgagccc atcttcccca 5040
tcggtgatgt cggcgatata ggcgccagca accgcacctg tggcgccggt gatgccggcc 5100
acgatgcgtc cggcgtagag gatcgagatc tccatccgc gaaattaata cgactcacta 5160
taggggaatt gtgagcggat acaattccc ctctagaaat aattttgttt aactttaaga 5220
aggagatata cc atg ggc agc agc cat cat cat cat cac agc agc ggc 5271
                Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly
                1          5          10
ctg gtg ccg cgc ggc agc cat atg gct agc atg act ggt gga cag caa 5319
Leu Val Pro Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln
    15          20          25
atg ggt cgg atc cga att ccc atg gag acc gcg ggc agc atg gcg gtg 5367
Met Gly Arg Ile Arg Ile Pro Met Glu Thr Ala Gly Ser Met Ala Val
    30          35          40          45
att gat cag gcg ggc ggc cgc gtg ctg cgc aat ccg acc cag acc ccg 5415
Ile Asp Gln Ala Gly Gly Arg Val Leu Arg Asn Pro Thr Gln Thr Pro
    50          55          60
tgc tat ggc agc tat gcg aaa ccg acc aac gaa cac ggc ggc att acc 5463
Cys Tyr Gly Ser Tyr Ala Lys Pro Thr Asn Glu His Gly Gly Ile Thr
    65          70          75
aaa gcg aac acc cag gtg gaa aaa aaa tat tat cgc acc gcc gat aac 5511
Lys Ala Asn Thr Gln Val Glu Lys Lys Tyr Tyr Arg Thr Gly Asp Asn
    80          85          90
ggc aac ccg gaa acc gtg ttt tat acc gaa gaa gcg gat gtg ctg acc 5559
Gly Asn Pro Glu Thr Val Phe Tyr Thr Glu Glu Ala Asp Val Leu Thr
    95          100          105

cgc gat acc cat ctg gtg cac gcg gtg ccg gcg gcg gat cgc gcg aaa 5607
Pro Asp Thr His Leu Val His Ala Val Pro Ala Ala Asp Arg Ala Lys
    110          115          120          125
gtg gaa ggc ctg agc cag cat gcg gcg ccg aac cgc ccg aac ttt att 5655
Val Glu Gly Leu Ser Gln His Ala Ala Pro Asn Arg Pro Asn Phe Ile
    130          135          140
ggc ttt cgt gat tgc ttt gtg ggc ctg atg tat tat aac agc ggc ggc 5703
Gly Phe Arg Asp Cys Phe Val Gly Leu Met Tyr Tyr Asn Ser Gly Gly
    145          150          155
aat ctg ggc gtt ctg gcg ggc cag agc agc cag ctg aac gcg gtg gtg 5751
Asn Leu Gly Val Leu Ala Gly Gln Ser Ser Gln Leu Asn Ala Val Val
    160          165          170
gat ctg cag gat cgc aac acc gaa ctg agc tat cag atg ctg ctg cat 5799
Asp Leu Gln Asp Arg Asn Thr Glu Leu Ser Tyr Gln Met Leu Leu His
    175          180          185
cat cat cat cat cat taa c 5818
His His His His His
    190          194

```