



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109679997 A

(43)申请公布日 2019.04.26

(21)申请号 201811623323.0

(22)申请日 2018.12.28

(71)申请人 佛山科学技术学院

地址 528000 广东省佛山市南海区狮山镇
仙溪水库西路佛山科学技术学院

(72)发明人 刘燊 邓赣奇 杨雪珍 邹海燕
赵云翔

(74)专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

代理人 谢泳祥

(51)Int.Cl.

C12N 15/85(2006.01)

A01K 67/027(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

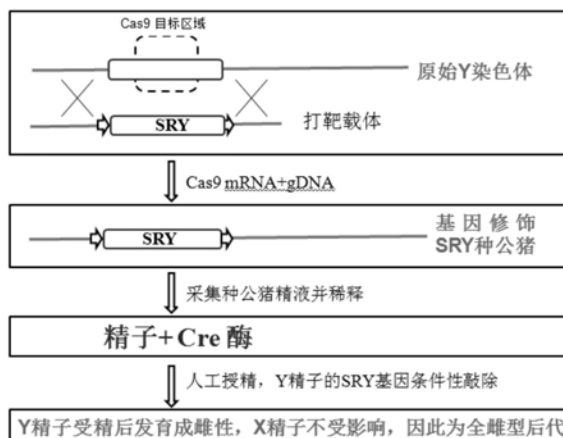
权利要求书2页 说明书3页
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

控制猪只性别的育种方法、种公猪克隆细胞构建方法及应用

(57)摘要

本发明提供了控制猪只性别的育种方法、种公猪克隆细胞构建方法及应用。控制猪只性别的育种方法,在含有Y染色体的猪只胚胎的性别分化期抑制其Sry基因表达,从而获得雌性性征的猪只。本技术方案通过在性别分化期抑制含有Y染色体的猪只胚胎的Sry基因表达,从而获得雌性性征的猪只,使得孕育的子代能够全部为雌性性征的猪只。该技术方案无需对种公猪采集所得的精液进行分离,而是直接控制受精卵使其不会向雄性体征进行分化,有效控制似样猪只的性状,免去饲养猪只过程中需要对公猪去势的烦恼。



1. 控制猪只性别的育种方法,其特征在于,在含有Y染色体的猪只胚胎的性别分化期抑制其Sry基因表达,从而获得雌性性征的猪只。

2. 根据权利要求1所述的控制猪只性别的育种方法,其特征在于,抑制Sry基因表达的方法为:利用Cre/LoxP重组酶系统对含有Y染色体的猪只胚胎中的Sry基因进行敲除。

3. 根据权利要求2所述的控制猪只性别的育种方法,其特征在于,敲除Sry基因的方法为:

(a1) 对种公猪的细胞进行编辑,使该细胞的Sry基因的上、下游分别引入方向相同的LoxP序列,获得供体细胞;

(a2) 以供体细胞进行克隆,获得基因重组种公猪;

(a3) 采集基因重组种公猪的精液,进行人工授精,获得所述含有Y染色体的猪只胚胎;

(a4) 对处于性别分化期的所述含有Y染色体的猪只胚胎添加Cre酶,敲除Sry基因。

4. 根据权利要求2所述的控制猪只性别的育种方法,其特征在于,敲除Sry基因的方法为:

(b1) 将含有LoxP位点的gRNA-Sry基因供体载体和Cas9mRNA共注射到受精猪卵子中;

(b2) 培育步骤(b1)所得的受精卵,获得基因重组种公猪;

(b3) 采集基因重组种公猪的精液,进行人工授精,获得所述含有Y染色体的猪只胚胎;

(b4) 对处于性别分化期的所述含有Y染色体的猪只胚胎添加Cre酶,敲除Sry基因。

5. 种公猪克隆细胞构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 获取种公猪成纤维细胞,经接种培养后进行传代培养;

(2) 将如SEQ IDNo.1所示序列片段与如SEQ IDNo.2所示序列片段分别接入含有Cas9载体中,分别获得可对Sry基因上游插入LoxP位点的打靶载体和可对Sry基因下游插入LoxP位点的打靶载体;

(3) 取步骤(1)传代培养获得的成纤维细胞,将步骤(2)制得的打靶载体进行电转染,然后单克隆培养。

6. Y染色体条件敲除Sry基因的种公猪培育方法,其特征在于,包括以下步骤:

(I) 猪卵母细胞体外成熟:从母猪卵巢分离出胞质均匀、卵丘致密且包裹2层以上的卵丘细胞-卵母细胞复合体,洗涤后转入在培养箱中已经平衡2h以上的培养液内或四孔板中,用胚胎级矿物油覆盖,在39℃、5%的CO₂、95%空气、饱和湿度的条件下成熟培养42~44h;

(II) 脱卵丘:将培养成熟的卵丘细胞-卵母细胞复合体转移到含透明质酸酶的容器中,吹打2min后再转移到培养皿中,加入DPBS-PVA稀释,将脱去卵丘的卵母细胞拣出,洗涤后挑出带有第一极体的成熟卵母细胞,放到操作液滴中备用;

(III) 供体细胞准备:取得经权利要求5所述构建方法获得的克隆细胞,消化后离心洗涤,然后用操作液将其沉淀重悬;

(IV) 卵母细胞去核与核移植:以盲吸法对脱卵丘后的成熟卵母细胞进行细胞去核,再将供体细胞从去核时裂口处放入卵周隙,用注射针点压透明带,使供体细胞与成熟卵母细胞的胞膜接触紧密,然后转移到培养液PZM3中,在39℃、5%的CO₂、100%湿度的环境下恢复1h,获得重构卵;

(V) 融合与激活:将恢复好的重构卵转移到融合液中平衡2min,用融合/激活液洗涤后,放入已经铺满融合液的融合槽内,以直流电脉冲诱导融合激活,接着用PZM3培养液洗

涤,立即转入矿物油覆盖的胚胎培养液中或辅助激活液中,39℃、5%的CO₂、100%湿度环境下培养4h;

(VI) 胚胎培养:将融合的重构卵用胚胎培养液洗涤后,转入预平衡2h以上的胚胎培养液PZM3中,培养条件39℃、5%的CO₂、5%的O₂、90%的N₂、饱和湿度,获得克隆胚胎;

(VII) 胚胎移植:将克隆胚胎缓慢的注射到自然发情的母猪的输卵管中。

控制猪只性别的育种方法、种公猪克隆细胞构建方法及应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种对种公猪进行生育控制细胞系的构建方法,以及通过该构建方法获得的种公猪实现全雌子代的育种方法。

背景技术

[0002] 公猪肉含有粪臭素和雄烯酮,公猪好斗难饲养,因此,须在小公猪时进行阉割,不利于集约化生产。国外为鲜肉上市,主要采用免疫去势。国内活猪出售,免疫去势后公猪尚存睾丸残迹,不好出售或售价较低。猪的性控精液生产存在着一系列的难题,包括:1.分离效率低(单位时间分离量);2.猪精液冷冻保存技术不成熟;3.分离猪精液对稀释比和温度敏感;4.分离猪精受孕率低等等。猪性控精液不能获得产业上的推广应用,所面临的技术难题很多,主要是物种的特异性决定的,且短期内不能获得重大突破,因此业内目前尚无好的解决方案。

发明内容

[0003] 基于现有技术猪的性控精液存在难以突破的难题的情况,本技术方案提出利用转基因技术实现对猪的性别进行生育控制。

[0004] 控制猪只性别的育种方法,在含有Y染色体的猪只胚胎的性别分化期抑制其Sry基因表达,从而获得雌性性征的猪只。

[0005] 进一步,所述抑制Sry基因表达的方法为:利用Cre/LoxP重组酶系统对含有Y染色体的猪只胚胎中的Sry基因进行敲除。

[0006] 进一步,所述敲除Sry基因的方法为:

[0007] (a1)对种公猪的细胞进行编辑,使该细胞的Sry基因的上、下游分别引入方向相同的LoxP序列,获得供体细胞;

[0008] (a2)以供体细胞进行克隆,获得基因重组种公猪;

[0009] (a3)采集基因重组种公猪的精液,进行人工授精,获得所述含有Y染色体的猪只胚胎;

[0010] (a4)对处于性别分化期的所述含有Y染色体的猪只胚胎添加Cre酶,敲除Sry基因。

[0011] 又或者,所述敲除Sry基因可以通过另一种方法实现:

[0012] (b1)将含有LoxP位点的gRNA-Sry基因供体载体和Cas9mRNA共注射到受精猪卵子中;

[0013] (b2)培育步骤(b1)所得的受精卵,获得基因重组种公猪;

[0014] (b3)采集基因重组种公猪的精液,进行人工授精,获得所述含有Y染色体的猪只胚胎;

[0015] (b4)对处于性别分化期的所述含有Y染色体的猪只胚胎添加Cre酶,敲除Sry基因。

[0016] 本申请文件同时提供了对应供体细胞进行克隆获得基因重组种公猪所需的种公猪克隆细胞的构建方法,其包括步骤:

[0017] (1) 获取种公猪成纤维细胞,经接种培养后进行传代培养;

[0018] (2) 将如SEQ ID No.1所示序列片段与如SEQ ID No.2所示序列片段分别接入含有Cas9载体中,分别获得可对Sry基因上游插入LoxP位点的打靶载体和可对Sry基因下游插入LoxP位点的打靶载体;

[0019] (3) 取步骤(1)传代培养获得的成纤维细胞,将步骤(2)制得的打靶载体进行电转染,然后单克隆培养。

[0020] 利用上述构建方法获得的种公猪克隆细胞可以用于培育Y染色体条件敲除Sry基因的种公猪的方法,具体包括以下步骤:

[0021] (I) 猪卵母细胞体外成熟:从母猪卵巢分离出胞质均匀、卵丘致密且包裹2层以上的卵丘细胞-卵母细胞复合体,洗涤后转入在培养箱中已经平衡2h以上的培养液内或四孔板中,用胚胎级矿物油覆盖,在39℃、5%的CO₂、95%空气、饱和湿度的条件下成熟培养42~44h;

[0022] (II) 脱卵丘:将培养成熟的卵丘细胞-卵母细胞复合体转移到含透明质酸酶的容器中,吹打2min后再转移到培养皿中,加入DPBS-PVA稀释,将脱去卵丘的卵母细胞拣出,洗涤后挑出带有第一极体的成熟卵母细胞,放到操作液滴中备用;

[0023] (III) 供体细胞准备:取得种公猪克隆细胞,消化后离心洗涤,然后用操作液将其沉淀重悬;

[0024] (IV) 卵母细胞去核与核移植:以盲吸法对脱卵丘后的成熟卵母细胞进行细胞去核,再将供体细胞从去核时裂口处放入卵周隙,用注射针点压透明带,使供体细胞与成熟卵母细胞的胞膜接触紧密,然后转移到培养液PZM3中,在39℃、5%的CO₂、100%湿度的环境下恢复1h,获得重构卵;

[0025] (V) 融合与激活:将恢复好的重构卵转移到融合液中平衡2min,用融合/激活液洗涤后,放入已经铺满融合液的融合槽内,以直流电脉冲诱导融合激活,接着用PZM3培养液洗涤,立即转入矿物油覆盖的胚胎培养液或辅助激活液中,39℃、5%的CO₂、100%湿度环境下培养4h;

[0026] (VI) 胚胎培养:将融合的重构卵用胚胎培养液洗涤后,转入预平衡2h以上的胚胎培养液PZM3中,培养条件39℃、5%的CO₂、5%的O₂、90%的N₂、饱和湿度,获得克隆胚胎;

[0027] (VII) 胚胎移植:将克隆胚胎缓慢的注射到自然发情的母猪的输卵管中。

[0028] 本技术方案通过在性别分化期抑制含有Y染色体的猪只胚胎的Sry基因表达,从而获得雌性性征的猪只,使得孕育的子代能够全部为雌性体征的猪只。该技术方案无需对种公猪采集所得的精液进行分离,而是直接控制受精卵使其不会向雄性体征进行分化,有效控制似样猪只的性状,免去饲养猪只过程中需要对公猪去势的烦恼。

附图说明

[0029] 图1是实施例1所述控制猪只性别的育种方法的步骤示意图。

具体实施方式

[0030] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。以下实施例中所采用的分子生物学实验技术包括PCR扩增、质粒提取、质粒转化、DNA片段连接、酶切、凝胶电泳

等,如无特殊说明,通常按照常规方法操作,具体可参见《分子克隆实验指南》(第三版)(Sambrook J,Russell DW,Janssen K,Argentine J.黄培堂等译,2002,北京:科学出版社),或按照制造厂商所建议的条件。

[0031] 实施例1:控制猪只性别的育种方法,原理如图1所示,具体步骤包括:

[0032] (01) 获取种公猪成纤维细胞,经接种培养后进行传代培养;

[0033] (02) 将序列片段TCACTACCAAATAAATGAAAAGG (SEQ ID No.1) 和序列片段GCCCCGCCCCGCCCCAGGTGG (SEQ ID No.2) 分别接入含有Cas9载体中,分别获得可对Sry基因上游插入LoxP位点的打靶载体和可对Sry基因下游插入LoxP位点的打靶载体;

[0034] (03) 取步骤(01) 传代培养获得的成纤维细胞,将步骤(02) 制得的打靶载体进行电转染,PCR法鉴定成纤维细胞是否正确打靶,含有如SEQ ID No.3所示的序列,然后单克隆培养;

[0035] (04) 猪卵母细胞体外成熟:从母猪卵巢分离出胞质均匀、卵丘致密且包裹2层以上的卵丘细胞-卵母细胞复合体,洗涤后转入在培养箱中已经平衡2h以上的培养液内或四孔板中,用胚胎级矿物油覆盖,在39℃、5%的CO₂、95%空气、饱和湿度的条件下成熟培养42~44h;

[0036] (05) 脱卵丘:将培养成熟的卵丘细胞-卵母细胞复合体转移到含透明质酸酶的容器中,吹打2min后再转移到培养皿中,加入DPBS-PVA稀释,将脱去卵丘的卵母细胞拣出,洗涤后挑出带有第一极体的成熟卵母细胞,放到操作液滴中备用;

[0037] (06) 供体细胞准备:取得种公猪克隆细胞,消化后离心洗涤,然后用操作液将其沉淀重悬;

[0038] (07) 卵母细胞去核与核移植:以盲吸法对脱卵丘后的成熟卵母细胞进行细胞去核,再将供体细胞从去核时裂口处放入卵周隙,用注射针点压透明带,使供体细胞与成熟卵母细胞的胞膜接触紧密,然后转移到培养液PZM3中,在39℃、5%的CO₂、100%湿度的环境下恢复1h,获得重构卵;

[0039] (08) 融合与激活:将恢复好的重构卵转移到融合液中平衡2min,用融合/激活液洗涤后,放入已经铺满融合液的融合槽内,以直流电脉冲诱导融合激活,接着用PZM3培养液洗涤,立即转入矿物油覆盖的胚胎培养液或辅助激活液中,39℃、5%的CO₂、100%湿度环境下培养4h;

[0040] (09) 胚胎培养:将融合的重构卵用胚胎培养液洗涤后,转入预平衡2h以上的胚胎培养液PZM3中,培养条件39℃、5%的CO₂、5%的O₂、90%的N₂、饱和湿度,获得克隆胚胎;

[0041] (10) 胚胎移植:将克隆胚胎缓慢的注射到自然发情的母猪的输卵管中,待其着床、怀孕、分娩并成长为基因重组种公猪;

[0042] (11) 采集基因重组种公猪的精液,进行人工授精,获得所述含有Y染色体的猪只胚胎;

[0043] (12) 对处于性别分化期的所述含有Y染色体的猪只胚胎添加Cre酶,敲除Sry基因,该猪只胚胎经怀孕、分娩即能成长为含有Y染色体但呈现雌性体征的猪只。

SEQUENCE LISTING

<110> 佛山科学技术学院

<120> 控制猪只性别的育种方法、种公猪克隆细胞构建方法及应用

<130> 2018

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

tcactaccaa ataaatgaaa agg 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gccccgccc ccgccccagg tgg 23

<210> 3

<211> 6232

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatcattta tttggtagt acctttgatg 60
cacaagcatt ttagtacttg ctactatgca ctttatccac ttttccctt tgtgtgttt 120
tctttggtgt cctttatttc attaggcatt aaaagatggt tcctgggaaa actgtaaagg 180
aaatggacat gtgagtgcac ttaggttagt aaactacaag tgggtgaaga tttgagggg 240
ttattttaca atcacatata ttcatatatt gatggggatg tcctgataaa attaaaggaa 300
attaatgtgg taatagtcac gtcattttca ttgtatgcat ttcttaatta aaaaatgttc 360
tgaatttttt gtgtgtgtat gtgtgtggag ggggagtgat gaggaggaaa aaaattaaaa 420
aaaattatta atgtaaaatt gttcagactt gattaggaaa aactgttga gctctgcttc 480
cattcccat agaagttaaa acaacatcaa catcaacaat gtgaatagag tgtgtagcac 540
aaatacactt tatttcattg gaataateta aattatcatt ttcagttctc gtttattttt 600
tattctaagt tgaaaaggaa ccagaccata catgaaatta ctggaatctg atatctcttg 660
agcatttttc tactgcaaag ctgtaatctt ccccaaagaa aaaaatgagt ttgttagttg 720
gacagcattt attctcagta aattccattt ggatttaaca ttggtaggac ttactccac 780
tttgcttttg ggtctgattg aggaaaagat atttaacaac tgttgggaca tagccaaaaa 840
tgaaaaagaa aactggtagt catttaacac aatagtgtct taaaattttc tttactgaac 900

ataggggatg gaaatggcat tccagttacc caggagtcca ggcaagcata tttgcactct 960
ccagaataaa gactcaatgt tctaagaacg gttaaatatt gcacctgggc acagcagctg 1020
agtatcagcc atgcctgtga aataaaaatg agttgaaaca ttaaataatgt acttataaat 1080
tccttgggta agctcagtgg gttaaggagc tggcattgtc actgctgtgg ctttggttac 1140
tgctgtgggtg ggggttcaat tcctggccag ggaacttaaa aaaaataaat aaataaaagg 1200
cactcaaaga aacattaggt aaactgttga tatcatatta acaaggtgga ccatgcctcc 1260
ctctccccct cccctttcct ccatttttga ataaaaaggt gttacttttg agactcattg 1320
ggggttttgt ttgtttgttt taagtggatt accactttct ttctttctcc aggcttggag 1380
ctattttcac tccttttgtg atttgaagca ttgaagaaat attgcaagga cctaattgat 1440
gccaggctct attttaggag ctgcacatct aaaagtgatg aaatctctct ttttattgta 1500
catgttcttg ccaccccctc cctcaacgaa ttctcccac cttttgtgta attatattca 1560
tatctgagag gctctatfff tcattttctt tttctgatat gattaaacat acataataat 1620
aatattcatt ccattcattt taaagatcta aagtgtacaa tttggtagct caagagcatt 1680
cacaatgttg tgcacccatc atctgtgtct agttccagaa tgtttcatca cccaggaag 1740
acaccctgca cctcttggca attaccccc ctgcectct cctctttatt cagtctgcg 1800
caaccatcac agatctggtc cctgactctt atgtatttgc ttcttctgta aatgaaatca 1860
ttcagtatat ggctctgggt gtctgcectt tttttcaca taaggtgatg ttttcacata 1920
aggatgatgt ttcacagtgc ttccatagtc cagaatgtgt cacttctttg ctttttaatt 1980
tcaaatttga aatgatatat atttactfff tttctcatat attaatttct agctttacaa 2040
aatctgcttt tatgtatgag cgcaatttaa acacttgagt ctgtaccaat acagctgctt 2100
taaattagat caagtaacag tatttcatat tttatttgag tcttgaacac taaacttctt 2160
tgggtgacta agatacaatt atggaattta tacatgcttt ttgaatgaat aaagttaatt 2220
tttgtttgga ctttttaata ttattgtacc ataacactta ttgcttgaat cacatttgggt 2280
gatgcagatt atttgtatgt gatgcattta aattttattt tctcatgcat tgtggcatca 2340
ttcttatgca gtcttgggtg gacttatttt tacttttcat aggttatgtt ctgtgcaatc 2400
tacagtcaat actcccattt cccaacatg gttttaaac tgtacggggg acatttcctc 2460
ctatttttagc acatgtaagt attttatgac aacttccaag tctgccttaa caatctattt 2520
ggaggaagta ttcacttatt tcatttggta agccatgacc tttaaatttt aaaaatgttg 2580
tcctaagatt gaactagaat aaaaaaatg atgaatcagt ggctgtaatt taaaaatta 2640
gatttgtaaa gcattgttct tttcattttg ttctgttttg atcattagtg atgtaaaagt 2700
gaagaagaca gaggccagtg gtgagcatac tctgacagt ctcgagaaca aatgggtccc 2760
tttgaagtgt tatgttcacc tcgggaaact ttgagttcca aggttatctg tttttctctt 2820
aatggaacca tttttaagtc tcttgccaga attcagctc tgtctgccag tgccgaattg 2880
aaagaattga aacgcagaga tggggtttgg ggtaaagaaa aaaaaatag ctttattgct 2940
ttgccaggca aaggaggatc agagcaggct aattaatgcc ctaaagactg tgaagactgt 3000
gtccccccac gccccacccc cccccccaa agaattgtga ggagtttaca gtaaaaaagg 3060
agaaaaacag gtttgccgat agaaccgat tgggacacac atgcattctt ctttctttgg 3120
gggaatcttt gtctcaaaa ctggagttag gagatgttca tgatgggtgt cttctgggtt 3180
attgcctagg ataacagtgc ttgcaaaaag ggcgtactga tcagagatta gaacaaacca 3240

ggaaagttcc tgacaaacat caggtactag tcattcttaa cccacaggcc attatgctca 3300
 gagggcctga cctttagctt agaggtagtc ctgtttaggg tgcaattaag tcagggagaa 3360
 ggacaaggaa ggactctaag ctgtttaact tcaaagtagt catttctaaa agacacataa 3420
 ggaatataac ttttctctca ggagtatgag gcacctgcat catatctaatt gttatttgac 3480
 tctgagactg gccattaaat agatgctagt atatattaac atactgataa tcatcagcag 3540
 aggtattcac atttagaatt cccaattatt tgccacagga aaacttaaca gaattttcaa 3600
 tagttcttta agtagaagt aagaacaag aatgacgact agcattcaac tctataacat 3660
 ccgccgcctg gcaggcgcac gtgctgcat tcttgctgt gggcctgagt gctctaattg 3720
 ccgaaaggaa aggaattggg ttatcttgaa tctctgtgtt aaacatagca tttacatatg 3780
 ctcataacga taaaccattg tcagatgctg ctgcaccgtc atccttttaa ttgagtggat 3840
 aaaataaaat aacttaataa tgacaaagtt tccggttttt taaggttagc agagccttca 3900
 gcaactcgga ttagacctag aacagaaagc aagccttatt atcataataa gtaagcagtt 3960
 ttgcttgaga atgggtaggt tggttcggtt ttggctggct ggctgctgc cgaccccagc 4020
 ggtttccagg ggaggtactg ggggcggaga aattggtatt tcactacaaa gattagagtt 4080
 actcaaatct ctggtggaaa taacctttaa atagtgaaga caactttcca aacgcttacg 4140
 cttttgattt cgcttctcc ccttttcaa atggtgcagt catatgcttc tgctatgttc 4200
 agagtattga aagcggacga ttacagcca gcggcacagc agcaaaatat tctgccttg 4260
 gggaaaggct cctcactatt tccgacggac aatcatagct caaacgatgg acgtgaaact 4320
 agaggaagtg gtagagagag tggccaggat cgtgtcaagc gacctatgaa cgctttcatt 4380
 gtgtggtctc gtgatcaaag gagaaaagt gctctagaga accctcaaat gcaaaactca 4440
 gagatcagca agtggctggg atgcaagtgg aaaatgctta cagaagccga aaagcggcca 4500
 ttcttcgagg aggcacagag gctacaggcg gtgcaccgag ataaataccg gggctataaa 4560
 taccgacctc gtcgcaaggg agagagggca cagaatttgc ttccggcaga ggcggcagta 4620
 ctatgcagcc aagtgcgct agaggagagg atgtatcct tcacatacac agtcgccaag 4680
 gccaaagtgc caggaacaga aagccagta agtcaactca agcccatgaa cataaccagc 4740
 tcaactctgc aacaggagga tcgctgcaac tggacaggcc tgtgccacag taggtaaca 4800
 tccaccgggc agatccgctc cgacttgctt tttaccgtg gtttacagcc gggactttct 4860
 cacatttatt ttccatattg atttcttta ctgtcgcgaa cagaggcct attcatctca 4920
 gttttactgt tatttcacct gtgacttagt ttacagattaa ggcagattaa catgtttgac 4980
 ctataaagaa ttagggcatg ccaatatgac tcaacctgtc tttacgactg cttaaagag 5040
 cactacctta ataagaaaag atcttaacac acaaactgct tgatttcgaa aaccatctgt 5100
 ttttccttct aatagaacaa ttttttata cctaatttta gttgttcccg tgattagcca 5160
 ttaagtacgt aacagtatat attagtattc tgataatcct tagcatagct gatagaattc 5220
 tctttattct cactgtcaaa actgtagtgc tggggagcat gcacaaattt atgatacagg 5280
 aacttccatg gaagtattg tacctaataa agcagtcct tgtagagtct gttcttttgt 5340
 cttttcagct attttgctg tctttgtaa ctgcaggtaa agtagtgaat atatatgtgt 5400
 agtctatctg ttttgagatt ctttctgata tattgctct cccagcttca gaagagaaag 5460
 aagagttttg ctgccattg caactcagtt cttcactcc gcacaaatct atgcactttg 5520
 acctgagtt tgaacctca tgacatcct ctgctaagac gaaatctttt tcttcttctt 5580

tttaatgaaa tctttaattg gctcctgtga gactcacggt ttcgctctt ttccgaaagt 5640
tttcttttaa ccaggaccaa atgtttgttt ccattgtcct caactttgac gttctggggg 5700
gtgcgggtgg ggaatagga tataatgttg agaatatgaa ctattcagat tggtagggag 5760
ggcgggggg aagggggcat gggagggtga cgagcctgtc cggttaatct ggtgagaagt 5820
cagtgaaaat gtaagtcaaa ggcattataa aatttgctta tggcctaaag tagaaactct 5880
ggcagttttc agagaaaagc atcaatttt gaaataaaaa taagctgatg gtctcttgtc 5940
tctgtattta tataccatat gccaaaatta actttccagt gcatatattc caaagcttta 6000
aaaaaaaaaa aaattgtctc aggtagtaaa actcaaaaca ggaaatgta tgtgtagag 6060
taaaatgtca cgtttttgaa agaaaataca agttaaaca ggaattaatt tcacggacta 6120
attcgctcca gaaacagtgc tgtttattcg gagatttact gcccctctc cctctacccc 6180
cgccccgcc cccgcccct aacttcgtat agcatacatt atacgaagtt at 6232

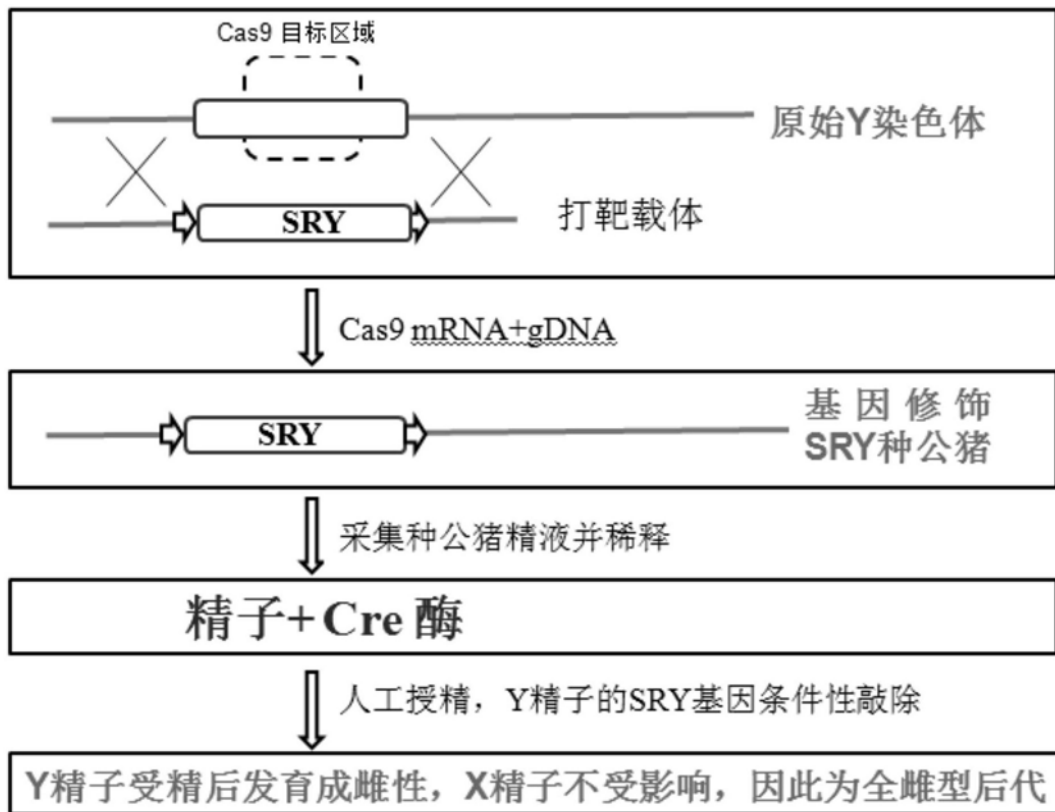


图1