



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114561384 B

(45) 授权公告日 2023.05.05

(21) 申请号 202011368577.X

(22) 申请日 2020.11.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114561384 A

(43) 申请公布日 2022.05.31

(73) 专利权人 中国农业科学院油料作物研究所
地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东路2号

(72) 发明人 刘军 匡琛 孙兴超 华玮
朱晓义

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所(普通合伙) 42001
专利代理师 江丽丽

(51) Int. Cl.
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/84 (2006.01)
A01H 5/00 (2018.01)
A01H 6/20 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 102876678 A, 2013.01.16
 CN 107099532 A, 2017.08.29
 CN 108070600 A, 2018.05.25
 CN 110724686 A, 2020.01.24
 US 2005091711 A1, 2005.04.28
 US 2006162025 A1, 2006.07.20
 范世航等. 甘蓝型油菜胚胎特异启动子 pBnaA09g21960D的分析.《中国油料作物学报》.2018,第39卷(第06期),第721-728页.
 Vicient, CM等.The Arabidopsis AtEml promoter is active in Brassica napus L. and is temporally and spatially regulated.《Journal of Experimental Botany》.2001,第52卷(第360期),第1587-1591页.

审查员 王碧燕

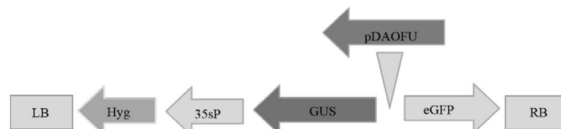
权利要求书1页 说明书5页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

植物维管特异性启动子pDAOFU及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种植物维管特异性启动子pDAOFU及其应用,从甘蓝型油菜明星品种ZS11中克隆DAOFU基因的启动子,构建由该启动子调控的报告基因GUS的植物表达载体DX2181-pDAOFU,用农杆菌介导的方法进行植物转化,得到转基因拟南芥和油菜植株,对获得的转基因植株进行组织化学检测,Gus基因在维管组织有优势表达,而在逆境诱导处理后具有在维管组织中更强烈的诱导表达活性,该启动子能够驱动外源基因在植物维管中表达,尤其在干旱、高温、高光照等诱导条件下驱动外源基因在植物维管中表达更为显著,因此可利用该启动子提高和改进油菜等油料作物生长特性,从而培育出理想的耐干旱耐高温耐高光照油菜新品种。



1. 植物维管特异性启动子pDA0FU, 其特征在于, 所述启动子的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。
2. 一种表达盒, 其特征在于, 包含权利要求1所述的启动子pDA0FU以及外源目的基因。
3. 一种重组表达载体, 其特征在于, 包含权利要求1所述的启动子pDA0FU。
4. 根据权利要求3所述的重组表达载体, 其特征在于, 所述的表达载体为植物双元表达载体DX2181。
5. 权利要求1所述的维管特异性启动子pDA0FU 在驱动目的基因在植物维管中特异表达的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于, 所述的植物包括拟南芥和油菜。
7. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于, 在干旱、高温或高光照条件下利用启动子pDA0FU 驱动目的基因在植物维管中特异表达。

植物维管特异性启动子pDA0FU及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程技术领域,具体涉及一种植物维管特异性启动子及其应用,该启动子能够驱动外源基因在植物维管中表达,尤其在干旱、高温、高光照等诱导条件下驱动外源基因在植物维管中表达更为显著。

背景技术

[0002] 油脂、蛋白质和碳水化合物是人类三大营养素,人们日常所需食用油脂的80%来源于油料作物。油料作物包括油菜、大豆、花生、芝麻等,油料作物在农业生产中占有重要地位。目前我国油料作物年种植面积约3.4亿亩,总产4500万吨。而全国油菜年播种面积1.1亿亩,总产约1280万吨,均居世界首位,菜籽油产量450-500万吨,是国产植物油的第一大来源。保证我国油菜稳产高产是确保我国食物供给安全的重要课题。干旱高温高光照等环境胁迫尤其是高温胁迫对油菜的各个生长发育时期都会造成巨大损害,从而降低油菜产量和品质等农艺性状。因此迫切需要发掘利用油菜耐干旱耐高温耐高光照等种质资源,培育出油菜耐干旱耐高温耐高光照新品种。

[0003] 伴随分子生物学与生物化学技术以及植物基因工程的高速发展,利用基因技术来改良作物的农艺性状,提升其对外界环境胁迫因子的耐受性从而改良作物的农艺性状已经是当前一种重要的技术主流。而外源基因在转基因植物中低水平表达和非特异性表达是限制植物生物技术发展的一个关键要素,造成这种困局的原因是缺少合适的启动子。

[0004] 基因启动子在基因的转录调控中起着决定作用,编码基因Coding sequence(CDS)起始密码子ATG 5'端上游1K-2K区域即为启动子,这段启动子序列决定着编码基因转录方向、效率。启动子在创制异源基因高表达载体和稳定转化植物的过程中起到关键作用,决定外源基因时空表达、强度水平、和转录效率。组织特异型启动子具有基因表达的空间特异性,可将外源基因在转基因植物特定组织中定向表达,既能降低转化植物的能源消耗、减弱对作物产量、品质等农艺性状的损伤,还能增强外源基因翻译蛋白在特定组织部位的浓度,提高转基因的作用效率。同组成型表达启动子相比较,由诱导型启动子驱动的外源基因表达只在特定的刺激处理或者某些组织中才能高水平表达,因此可以根据实验需求来调控目的基因的时空表达。尽管已有文献报道从植物中分离了一些与抗逆有关的诱导特异性表达启动子,如缺水诱导的启动子Lea、OsABA2、RD29A,低温诱导的启动子Atrd29A、cor15、mwcs120,盐诱导的启动子BADH、CMO、Rab16A以及受病原物诱导启动子PPPs、GAFP-2等,但在重要油料作物油菜中尚未分离到受干旱、高温高光照强烈诱导表达的启动子用于植物抗逆遗传工程。因此,挖掘出组织特异性表达特别是受高温诱导的启动子在改良油料等作物抗逆育种上具有重要的意义。

[0005] 本发明通过实验分析,发现启动子pDA0FU呈现出很强的维管特异性表达特性,在pDA0FU转基因拟南芥中,其所驱动的报告基因GUS在转基因拟南芥的维管中表现出很强的优势表达,这些数据充分表明pDA0FU是一个很强的维管特异表达启动子,在植物转基因育种中具有良好的应用前景。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种植物维管特异性启动子pDAOFU及其应用,该启动子具有驱动目的基因在维管中优势表达,而在其他组织器官表达较弱的功能,特别是在干旱、高温、高光照等非生物胁迫处理条件下,目的基因在维管中表达更为显著。

[0007] 一方面,本发明提供一种植物维管特异性启动子pDAOFU,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,从甘蓝型油菜ZS11中克隆DAOFU基因的启动子,具体方法为:以甘蓝型油菜ZS11基因组DNA为模板进行PCR扩增,正向引物pDAOFU-F为5'-GAGATCTACAGCGCTAAGCTTGTTGATATCGTTGT GTGGACG-3',反向引物pDAOFU-R为5'-GGACTGACCACCCGGGGATCCGAGGAACTTCTTTGTATGCTTG-3',特别指出的是本文中所述启动子既可以指上述带有载体留存序列的整体克隆DNA序列(SEQ ID NO.1),也可以指去除上述载体引物留存序列后的DNA序列(SEQ ID NO.2)。

[0008] 另一方面,本发明将提供一种包括上述植物维管特异性启动子pDAOFU的表达盒和重组表达载体。在所述重组表达载体中,启动子pDAOFU连接外源目的基因序列的起始密码子ATG的5'端;优选地,所述重组表达载体为DX2181-pDAOFU,在实际生产应用中,优选耐干旱耐高温耐高光外源基因作为目的基因,通过本发明的启动子在干旱高温高光等逆境诱导条件下,驱动目的基因表达,从而增强植物的耐逆境能力。

[0009] 再一方面,本发明提供了上述植物维管特异性启动子pDAOFU在驱动目的基因在植物维管中特异表达的应用。所述应用包括将本发明提供的启动子pDAOFU连接于载体的待表达的目的基因序列5'端(例如,将所述启动子序列置于目标基因起始密码子ATG的5'端),从而创建重组表达载体,将所述重组表达载体转化到植物细胞、组织或器官中进行遗传转化。所述待表达目的基因优选能够为植物提供耐干旱耐高温耐高光,即抗逆基因。

[0010] 综合上述,本发明从甘蓝型油菜(*Brassica napus*, ZS11)中克隆得到包含转录起始位点在内的2025bp的DNA序列,并将其命名为pDAOFU(序列列表中的SEQ ID NO.1)。将重组连接到植物双元表达载体DX2181上,获得对应的重组质粒,利用该重组质粒转化根癌农杆菌菌株GV3101,然后用农杆菌介导的方法进行植物转化,得到转基因拟南芥和油菜植株。对获得的转基因拟南芥和油菜进行组织化学检测,转基因植株Gus基因在维管组织有优势表达,而在逆境诱导处理后,整体上的Gus蛋白水平在维管组织表达相对更高并呈现深蓝色,从而证实该启动子的序列具有驱动外源基因表达的活性,并且该启动子驱动目的基因在油菜和拟南芥逆境诱导处理后在维管优势表达。

[0011] 本发明所述的启动子能够与植物双元表达载体重组,用于替代组成型启动子。并且,该启动子序列可以与外源目的基因连接,构建重组植物表达载体,经植物转化,尤其在逆境诱导处理后能驱动外源目的基因在植株维管组织优势表达,从而提高外源目的基因在植物中的表达水平,增强转基因改良植物农艺性状的效果。

[0012] 本发明技术效果:本发明所克隆的甘蓝型油菜启动子pDAOFU能够调控目的基因在植株维管中优势表达。通过该启动子对农作物品种进行农艺性状改造,代替35S等组成型泛表达启动子,从而创制出理想的生物安全性高的耐逆境的转基因植物新品种,在实际生产育种中具有显著应用价值。

附图说明

- [0013] 图1为甘蓝型油菜DAOFU基因启动子片段电泳图
- [0014] 泳道1、2、3是以甘蓝型油菜ZS11基因组DNA为模板的PCR扩增的启动子片段结果。泳道M为DL2000的核酸Marker。
- [0015] 图2为pDAOFU启动子序列分析结果图
- [0016] TATA-box:启动子核心元件;CAAT-box:启动子、增强子核心元件;auxin-responsive element:生长素响应元件;salicylic acid responsiveness:水杨酸调控元件;abscisic acid responsiveness:脱落酸响应元件;circadian control:细胞周期控制元件;MYB binding site involved in drought-inducibility:参与干旱诱导的MYB结合位点;light responsiveness:光响应元件;MeJA-responsiveness:茉莉酸甲酯响应顺式作用元件;zein metabolism regulation:玉米醇溶蛋白代谢调节。
- [0017] 图3为植物表达载体DX2181的结构示意图。
- [0018] 图4为构建载体DX2181-pDAOFU的T-DNA区示意图。
- [0019] 图5为DX2181-pDAOFU的农杆菌菌落PCR鉴定结果
- [0020] 泳道1-10为农杆菌单菌落,“+”为阳性质粒对照,“-”为阴性对照。
- [0021] 图6为DX2181-pDAOFU的转基因拟南芥植株PCR鉴定结果图
- [0022] 泳道M为DL2000的核酸Marker;泳道1-11,13-24为转基因拟南芥,泳道12为DX2181-pDAOFU阳性质粒对照。
- [0023] 图7为DX2181-pDAOFU的转基因油菜植株PCR鉴定结果图
- [0024] 泳道M为DL2000的核酸Marker;泳道1-11为转基因油菜,泳道12为DX2181-pDAOFU阳性质粒对照。
- [0025] 图8为pDAOFU启动子转基因拟南芥和转油菜GUS组织化学染色结果图
- [0026] A:DX2181-pDAOFU驱动GUS表达示意图;B:转基因拟南芥叶片正常生长与逆境胁迫处理维管组织优势表达;C:转基因油菜叶片正常生长与逆境胁迫处理维管组织优势表达。

具体实施方式

- [0027] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。
- [0028] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法,所用引物均从擎科生物科技有限公司(武汉)合成,测序由擎科生物科技有限公司(武汉)完成,ClonExpress®Entry One Step Cloning Kit购自南京诺唯赞生物科技有限公司,快速内切酶购自Thermo Fisher Scientific,DNA凝胶回收试剂盒、DNA Marker等购自大连宝生物公司,实验中所用的甘蓝型油菜品种ZS11为本实验室留存材料;col-0野生型拟南芥、大肠杆菌感受态菌株DH5 α 、农杆菌感受态菌株GV3101和改造后的植物双元表达载体DX2181等,均为本实验室留存。
- [0029] 实施例1:克隆包含酶切位点和载体接头序列的pDAOFU启动子
- [0030] 步骤1:设计引物
- [0031] 根据油菜ZS11全基因组测序获得的DAOFU基因上游的基因间隔序列2205bp设计一对引物进行PCR扩增,扩增获得油菜DAOFU的5'上游启动子序列,所用引物为pDAOFU-F:5'-GAGATCTACAGCGCTAAGCTTGTGATATC GTTGTGTGGACG-3'和pDAOFU-R:5'-

GGACTGACCACCCGGGATCCGAG GAACTTCTTTGTATGCTTG-3'。在引物pDAOFU-F中,接头序列GAGATCT ACAGCGCT为载体DX2181融合位点的同源臂序列,而序列AAGCTT是Hind III的酶切位点;引物pDAOFU-R中,接头序列GGACTGACCACCCGG为载体DX2181融合位点的同源臂序列,而序列GGATCC是BamH I的酶切位点。

[0032] 步骤2:PCR扩增克隆

[0033] 本发明所用油菜为甘蓝型油菜ZS11 (*Brassica napus* L.),油菜播种于温室。以油菜ZS11 DNA为模板,利用正向引物、反向引物进行聚合酶链式反应PCR (Polymerase chain reaction) 扩增启动子pDAOFU。

[0034] 采用如下PCR体系和扩增程序:

[0035] 2×Mix buffer 25μL,pDAOFU-F:1μL,pDAOFU-R:1μL,DNA 1μL,ddH₂O 22μL。PCR程序为:94℃5min;94℃30s,56℃30s,72℃1min,35个循环;72℃10min;4℃。

[0036] PCR产物大小为2K左右(见图1),经1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定并按试剂盒说明书进行纯化回收、检测浓度。回收PCR扩增的目的片段,目的片段长度2025bp左右,序列如SEQ ID NO.1所示。

[0037] 实施例2:油菜启动子pDAOFU的序列分析及功能预测

[0038] 将所克隆并测序得到的pDAOFU序列用启动子核心元件预测软件PLACE中的PlantCARE(Lescot M,Déhais P,Thijs G,et al.PlantCARE,a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J].Nucleic acids research,2002,30(1):325-327.http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)在线进行功能元件的预测分析。如图2所示,pDAOFU包含真核生物的启动子必需核心元件TATA盒与CAAT盒。更进一步分析此启动子序列,除含有必须核心元件外,序还存在其他多种启动子功能元件。ABRE(ACGTG,AACCCGG);脱落酸响应顺式作用元件cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness;光响应元件Box 4(ATTAAT)part of a conserved DNA module involved in light responsiveness;茉莉酸响应CGTCA-motif (CGTCA) cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness;G-box(CACGTC,CAGACGTGGCA),GATA-motif (AAGATAAGATT),GT1-motif (GGTTAAT),TCT-motif (CCATCTTTTT),chs-CMA1a(TTACTTAA):cis-acting regulatory element involved in light responsiveness;MYB介导的干旱响应元件MBS(CAACTG)MYB binding site involved in drought-inducibility;O₂-site(GTTGACGTGA):cis-acting regulatory element involved in zein metabolism regulation;TCA-element(CCATCTTTTT):cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness;TGA-element(AACGAC):生长素响应元件auxin-responsive element;昼夜节律控制元件circadian(CAAAGATATC):cis-acting regulatory element involved in circadian control.从结果可以发现,大多数为激素或逆境响应元件,由此可以推测pDAOFU是个逆境诱导的优势表达型启动子。

[0039] 实施例3:构建植物表达载体DX2181-pDAOFU及植物转化根癌农杆菌菌株GV3101

[0040] DX2181载体质粒经Hind III和BamH I双酶切完全,并经1%琼脂糖凝胶电泳检测回收。从“克隆包含酶切位点和载体接头序列的pDAOFU启动子”过程中回收的PCR产物与酶切质粒按一步克隆试剂盒(ClonExpress®Entry One Step Cloning Kit)说明书进行操作

(5×CE II Buffer 4μL,线性化克隆载体50~200ng,插入片段扩增产物200ng, Exnase® II 2μL, ddH₂O补充至20μL),重组连接后产物按照热激法转化大肠杆菌DH5α感受态细胞后,将携带目的片段的载体转入到大肠杆菌,经菌落PCR筛选获得阳性克隆,挑取单克隆摇菌液提质粒DX2181-pDA0FU,将经过鉴定的阳性克隆送交擎科公司,测序正确的质粒即DX2181-pDA0FU。采用冻融法将植物表达载体DX2181-pDA0FU转入根癌农杆菌GV3101,菌落PCR鉴定结果如图5。

[0041] 实施例4:植物表达载体DX2181-pDA0FU在拟南芥和油菜中的遗传转化

[0042] 步骤1:使用浸花法转化拟南芥,参照Steven J.Clough(Floral dip:a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana)等提出的方法;

[0043] 步骤2:使用农杆菌介导法转化油菜,将油菜种子消毒点种,置于黑暗培养7天,切取状态良好的下胚轴,统一长度为2-3cm用于农杆菌转化。采用上述“构建植物表达载体DX2181-pDA0FU及植物转化根癌农杆菌菌株GV3101”过程中转入重组表达载体的根癌农杆菌进行农杆菌介导的油菜下胚轴遗传转化,该遗传转化、转基因家系筛选等参照Cardoza V (Cardoza V, Stewart C N. Increased Agrobacterium-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21 (6) :599-604.)等提出的方法。

[0044] 如图6和图7所示,共获得11株DX2181-pDA0FU::gus转基因油菜家系,23株转基因拟南芥家系。

[0045] 实施例5:维管优势表达pDA0FU启动子的功能分析

[0046] 采用组织化学染色法检测GUS在植株组织细胞中的表达。将所获得植株在35℃高温下,缺水,高光强为500μmol quanta m⁻²s⁻¹处理72小时后,再经过12小时的GUS染色,参照Jefferson(Jefferson RA等人.GUS fusion:β-Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant[J].EMBO J.,1987,6:3901-3907)等提出的染色方法,将需要染色的组织抽真空,然后浸入染色液中。脱色时在37℃条件下用95%乙醇处理,至阴性对照材料呈白色。如图8所示,在22℃,不缺水,缺水,光强为100μmol quanta m⁻²s⁻¹条件下正常生长的植株,经12小时染色后,利用体视镜(Olympus SZX7)进行观察拍照,发现pDA0FU::gus在维管组织具有优势表达活性,而在逆境处理72小时后,再经过12小时染色后,在维管组织GUS具有更强烈表达。结果表明,该启动子驱动的GUS基因在拟南芥和油菜的维管组织中优势表达,而在逆境处理后具有在维管组织中更强烈的诱导表达活性。因此,该启动子驱动目的基因在植物维管中优势表达。这一具有组织特异性表达的启动子在植物基因工程中具有优良的潜在应用价值。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 中国农业科学院油料作物研究所	
[0003]	<120> 植物维管特异性启动子pDAOFU及其应用	
[0004]	<160> 2	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 2025	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0010]	<400> 1	
[0011]	gttgatatcg ttgtgtggac gttaagactt taatatccag tacctaacta atgaccaaaa	60
[0012]	attcaatctg actgggggta tcaaatatga aaattctcga caactgacag acaaacaaat	120
[0013]	ctaataattac tatacaatct ttttacaaaa aaaaaatatt actacacaat tagaagttgg	180
[0014]	aagttgacgt ggtatcaaat taataatata cacagtcaaa atatttccaa aagcagaaga	240
[0015]	gccgtatggt gcatgtcaat aggatttacg caacttggtt tatgaggctt aattagcgcg	300
[0016]	ttgaaatggt tatatatata aacatcttta caataaaagt ctactgtaag tacaatggt	360
[0017]	tttttttttt tttttttttt gttaatccag gggttcctcg cttacgcggg tcattcccct	420
[0018]	gggcccggtc aggcagcagg ccagctcac cgggaagt tttccctggg cccgaaggcc	480
[0019]	cagtaccgcg tttagtgtcc agacgaggca gggtagtctc cgcattgggg gatcgaacc	540
[0020]	ggattgtttt agcaacccaa gcccgctcct ccacttggac tacctgttcc ggacaagtat	600
[0021]	aatgttaac tagatgaaat atggtgcgaa tcggtagcaa atataagtaat ttaattataa	660
[0022]	aacccttaa taagctactg atcttttagta atttagaaag taataacatg gtaaaaatac	720
[0023]	aataacttat aactctttaa atgtcatttt gtacgtttga tgtggaacta ttgcgttagt	780
[0024]	ttaacgacgg atgaacatca aatttaaaat tcaactagat tttgaccgc gctttcaaag	840
[0025]	cgcgggttta tttttgtttt ttttttcaat tgacaaatat ttagtaaatg tcacatttcc	900
[0026]	atataattgt gttttatttt ataaaagact taaaatttt atctttattt atcgtatttc	960
[0027]	attttaaatg actatttatg ttaaaaaat taaattttat ttttttaatg aattaagttg	1020
[0028]	gtataactct gataaattaa ttttattatg gggttaatat ttttaattaa aaattatata	1080
[0029]	cttttaataa aaatttatac ttttcaataa aaaaattcaa ttatttttat gaatgcttaa	1140
[0030]	attatattaa gaaaagaaaa aaataataat taagaatggt tgaaaaaaaa aattatttga	1200
[0031]	acttgactc aatggcccaa aggaaaaata aaggttgaga attgaatctg attttttaat	1260
[0032]	aggcccaaat gatccaagag agatttgatt tgggctggat ccaaaaataa tgaccaata	1320
[0033]	tagatttggt attaataata cttaattaac cttaatgaaa catgcaatgt tagtgaagga	1380
[0034]	aacatgcccc taaggttaatt atgacaatag aatcctgctt taatagtata gatatgttcg	1440
[0035]	aggttttaaa ataacttaga aataacaaaa ttcaataaat acaaaaagaag ccaatttttt	1500
[0036]	taaatacatt ttacgttata attaactagc aactattagg tgttactgat ttccccgcta	1560
[0037]	ccaccagcaa acgcagcttt tgcggttggg agcagttgac gccgtttcga aacaattata	1620
[0038]	taaaccgcta caaatgctt caaacctctc tgaacctctt aaaatcaaaa gctggttcca	1680
[0039]	gctagcgttt gcggttgacg gcggttgccg gatgttttaag aaaaaaactt aagcagttaa	1740
[0040]	aagcaccatt atgatctatc ctccctacat tctcaagtat catcttattc caaataacat	1800
[0041]	aaataacaca tatttacacc tattgtaaga cccatagggt gaataataat ataagcctac	1860

[0042] acatacatgc atacactata tatgtacgcg tattaaagta tctatTTTTtC agtacgacaa 1920
 [0043] agattcccac tcggaatggt ttgtaatTTt atattagaca attaggtccc tctctctatc 1980
 [0044] tctaccataa agcaactgtg agacaagcat acaaagaagt tcctc 2025
 [0045] <210> 2
 [0046] <211> 1982
 [0047] <212> DNA
 [0048] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0049] <400> 2
 [0050] ttaagacttt aatatccagt acctaactaa tgaccaaaaa ttcaatctga ctggggttat 60
 [0051] caaatatgaa aattctcgac aactgacaga caaacaatc taatattact atacaatctt 120
 [0052] tttacaaaaa aaaaatatta ctacacaatt agaagttgga agttgacgtg gtatcaaatt 180
 [0053] aataatacac acagtcaaaa tatttccaaa agcagaagag ccgtatgttg catgtcaata 240
 [0054] ggatttacgc aacttgTTTT atgaggtta attagcgcgt tgaaatgTTt atatattaaa 300
 [0055] acatctttac aataaaagtc tactgtaagt acaaatgTTt tttttttttt tttttttttg 360
 [0056] ttaatccagg gtttctcgc ttacgcgggt cattcccctg ggccccgtca ggcagcaggc 420
 [0057] cagcttcacc cgggaagttt ttccctgggc ccgaaggccc agtaccctct ttagtgtcca 480
 [0058] gacgaggcag ggtagtctc gcattggggg atcgaaccg gattgtttta gcaaccaag 540
 [0059] cccgtccttc cacttgact acctgtccg gacaagtata aatgttaact agatgaaata 600
 [0060] tgggtcgaat cggtagcaaa tatagtaatt taattataaa acccttaaat aagctactga 660
 [0061] tctttagtaa tttagaaagt aataacatgg taaaaataca ataacttata actctttaaa 720
 [0062] tgtcatTTTT tacgtttgat gtggaactat tgcgttagtt taacgacgga tgaacatcaa 780
 [0063] atttaaaatt caactagatt ttgaccgcg ctttcaaagc gcgggtttat ttttgTTTTt 840
 [0064] ttttcaatt gacaaatatt tagtaaattg cacatttca tatattgtg ttttatttta 900
 [0065] taaaagactt aaaaatttta tctttattta tcgtatttca ttttaaatga ctatttatgt 960
 [0066] taaaaaaatt aaattttatt tttttaatga attaagttg tataactctg ataaattaat 1020
 [0067] tttattatgg ggttaatatt ttaattaaaa aattatatac ttttaataaa aattttact 1080
 [0068] tttcaataaa aaaattcaat ttttttatg aatgcttaa ttatattaag aaaagaaaa 1140
 [0069] aataataatt agaattggtt gaaaaaaaa attattttaa cttggactca atggcccaaa 1200
 [0070] ggaaaaataa aggttgagaa ttgaatctga ttttttaata ggcccaaatg atccaagaga 1260
 [0071] gatttgattt gggctggatc caaaaataat gacccaatat agatttgTTa ttaatattac 1320
 [0072] ttaattaacc ttaatgaac atgcaatggt agtgaaggaa acatgccctt aaggttaatta 1380
 [0073] tgacaataga atcctgcttt aatagtatag atatgttcga ggttttaaaa taatctagaa 1440
 [0074] ataacaaaat tcaataaata caaagaagc caattttttt aaatacattt tacgttataa 1500
 [0075] ttaactagca actattaggt gttactgatt tccccgtac caccagcaaa cgcagctttt 1560
 [0076] gcggttggtg gcagttgacg ccgtttcgaa acaattatat aaaccgttac aaatcgttc 1620
 [0077] aaaccgtctt gaacctctta aatcaaaag ctggttccag cttagcgtttg cggttgcagg 1680
 [0078] cggttgcggg atgtttaaga aaaaaactta agcagtgaaa agcaccatta tgatctatcc 1740
 [0079] tcctacatt ctcaagtatc atcttatcc aaataacata aataacacat atttacacct 1800
 [0080] attgtaagac ccataggtg aatataaata taagcctaca catacatgea tacactatat 1860
 [0081] atgtacgcgt attaaagtat ctatttttca gtacgacaaa gattcccact cggaatgTTt 1920
 [0082] tggtaattta tattagacaa ttaggtccct ctctctatct ctaccataaa gcaactgtga 1980
 [0083] ga 1982

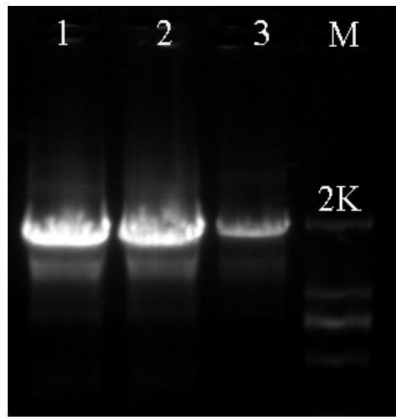


图1

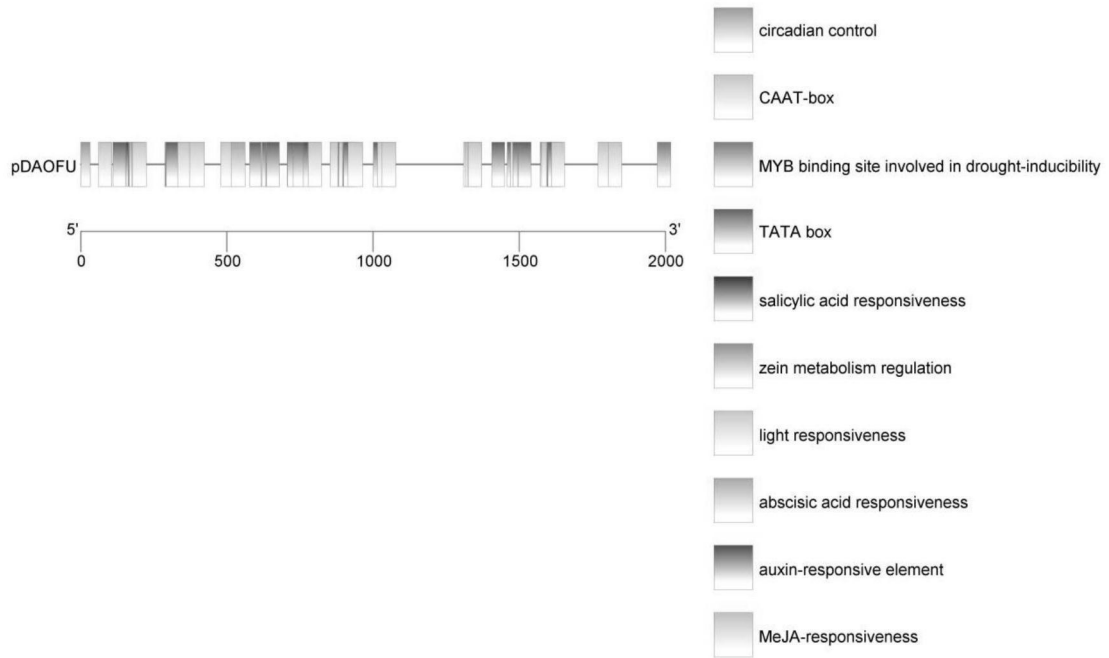


图2

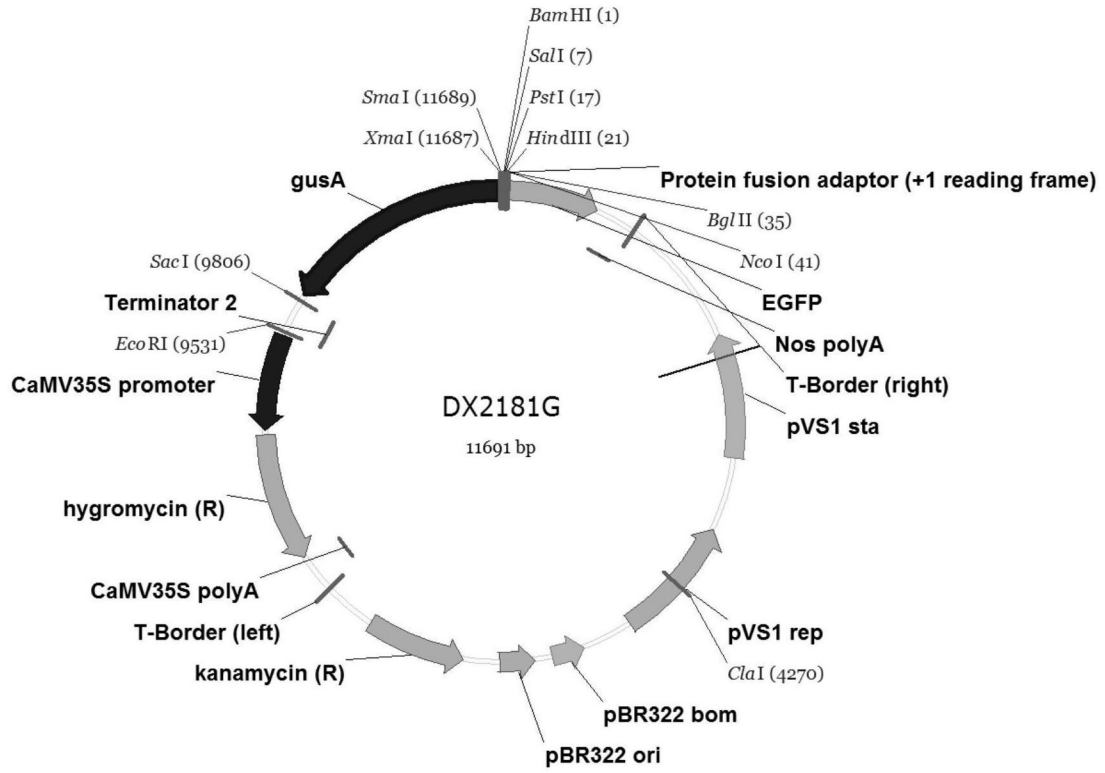


图3

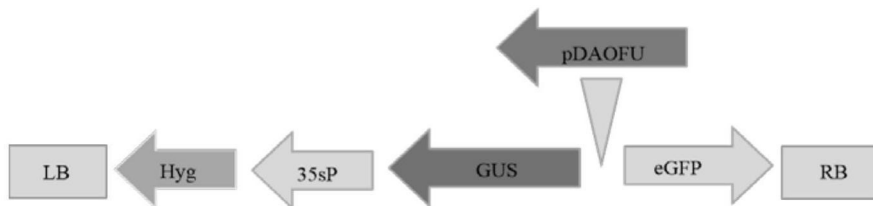


图4

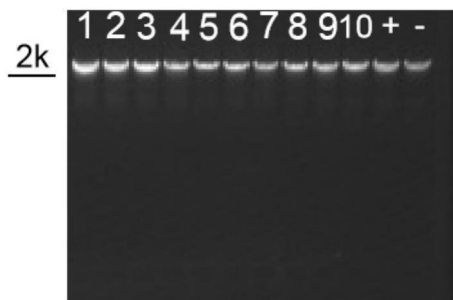


图5

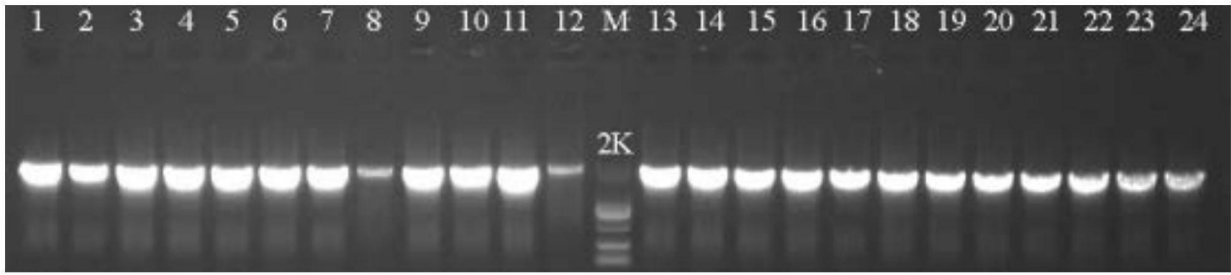


图6

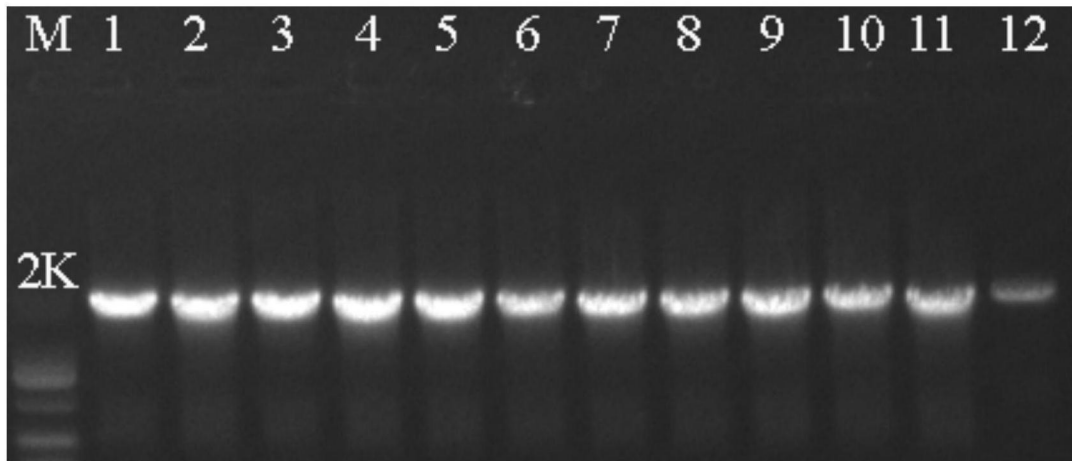


图7

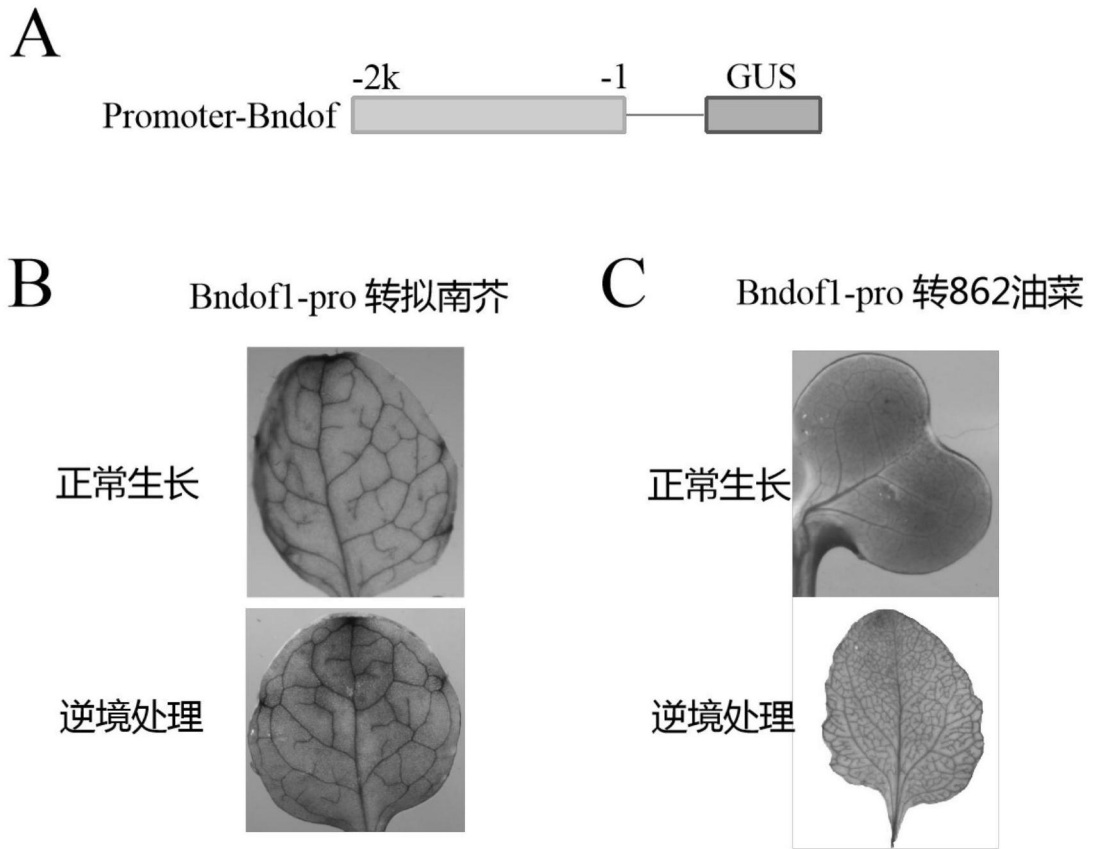


图8