



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110607301 B

(45) 授权公告日 2021. 07. 09

(21) 申请号 201910934804.1

(22) 申请日 2019.09.29

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110607301 A

(43) 申请公布日 2019.12.24

(73) 专利权人 深圳大学

地址 518060 广东省深圳市南山区南海大道3688号

(72) 发明人 唐玉林 胡家鑫 刘帅

(74) 专利代理机构 深圳市恒申知识产权事务所
(普通合伙) 44312

代理人 鲍竹

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/66 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/46 (2018.01)

A01H 6/54 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 109385424 A, 2019.02.26

Spiegel L.A.等. 登录号: AC007627.

《GenBank》. 1999, 第1-157000位.

Li Chen等. GmPRP2 promoter drives root-preferential expression in transgenic Arabidopsis and soybean hairy roots. 《BMC Plant Biology》. 2014, 第14卷第1-13页.

审查员 严金波

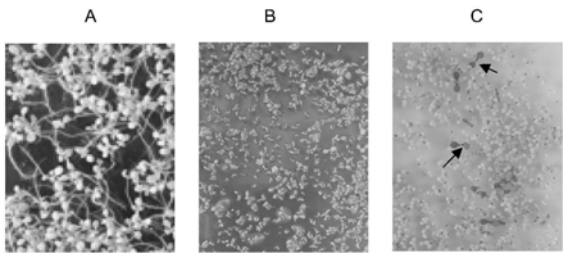
权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种可控制基因在植株根部特异表达的DNA序列及其应用

(57) 摘要

本发明属于基因工程技术领域, 具体涉及一种DNA序列和重组载体及其应用。所述DNA序列含有如SEQ ID: NO 1所示的核苷酸序列, 或如SEQ ID NO: 1所示的核苷酸序列经缺失、插入或替换所获得的具有相同功能的核苷酸序列。该DNA序列可引导目的基因特异性地在根部表达, 因此该DNA序列以及含有该DNA序列序列的重组载体可以适用于特定的转基因植物的生产, 可使待转入的目的基因高选择性的在植物根部表达。适用于一些地下部容易受到害虫的侵害的作物, 如牧草、花生、玉米等。



1. 一种DNA序列,其特征在于,所述DNA序列为如SEQ ID:NO 1所示的核苷酸序列。
2. 如权利要求1所述的DNA序列,其特征在于,所述DNA序列在植物中引导目的基因特异性地在根部表达。
3. 一种重组载体,其特征在于,所述重组载体含有权利要求1-2任一项所述的DNA序列。
4. 如权利要求3所述的重组载体,其特征在于,所述DNA序列下游连接有目的基因。
5. 如权利要求4所述的重组载体,其特征在于,所述目的基因包括抗虫基因、抗除草剂基因、抗真菌基因、抗细菌基因和抗病毒基因中的至少一种。
6. 一种重组载体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:
通过扩增获得如权利要求1-2任一项所述的DNA序列;
将所述DNA序列与质粒p1p100分别进行双酶切处理,然后使DNA序列插入到所述质粒p1p100多克隆位点并与目的基因相连,得到重组质粒。
7. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,扩增所述DNA序列的引物如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示。
8. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述的DNA序列是以拟南芥的基因组DNA为模板扩增得到。
9. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,所述酶切处理用的酶为是HindIII内切酶和NcoI内切酶。
10. 如权利要求1-2任一项所述的DNA序列或权利要求3-5任一项所述的重组载体以及权利要求6-9任一项所述的制备方法得到的重组载体在制备转基因作物中的应用。

一种可控制基因在植株根部特异表达的DNA序列及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种可控制基因在植株根部特异表达的DNA序列及其应用。

背景技术

[0002] 植物生长过程中遭受多种非生物胁迫和生物胁迫的影响,其中,地下害虫是最严重的生物胁迫之一。地下害虫造成植物根系损伤,影响植物对水分和无机盐的吸收,导致生长迟缓,甚至死亡。蛴螬是牧草产地的主要害虫,取食牧草幼根,对于返青期或者芽期的牧草危害极大,导致其生长不良乃至枯萎死亡,对草原生态造成极大危害,是一种典型的地下虫害。蛴螬也可啃食杨树苗根部,导致其根部不能正常吸收水分和营养物质,严重的导致杨树死亡,造成极大的经济损失。金针虫是小麦苗期的主要害虫,通过啃食须根或者根茎交界处,造成枯心苗,甚者整株枯死,导致小麦缺苗断垄。金针虫在商洛地区同样危害巨大,商洛地区盛产核桃,金针虫啃食尚未木质化的核桃树嫩根,造成幼苗烂根、断根,幼苗整株干枯死亡,严重危害当地核桃产业。其中蛴螬和金针虫不仅是危害我国农业生产的主要地下害虫,同时也是世界性的害虫,在印度、日本、美国等地均曾造成玉米、大豆、花生和甘薯等作物大量减产。目前农业生产中防治地下害虫的方法以化学农药防治为主,污染环境的同时,农药残留对食品安全造成极大危害,同时也导致害虫的耐药性逐年增强。所以,利用在根部特异表达的DNA序列驱动抗虫基因表达,使植物根部具备抗虫能力,避免农药大量使用,为植物抗虫增产提供一种新途径。

[0003] 现有的抗虫基因的表达没有良好的选择性,会在各部分表达,很多作物的果实,种子或茎叶是收获部分,人们希望食用部分不出现抗虫基因,因此找到一种只在根部表达的方法是十分有必要的。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种DNA序列和重组载体及其应用以克服现有技术不能高选择性的在根部表达的技术问题。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 本发明一方面提供一种DNA序列,所述DNA序列含有如SEQ ID:NO 1所示的核苷酸序列,或如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列经缺失、插入或替换所获得的具有相同功能的核苷酸序列。

[0007] 本发明另一方面提供一种重组载体,所述重组载体含有本发明的上述DNA序列。

[0008] 相应地,本发明提供一种上述重组载体的制备方法,包括如下步骤:

[0009] 通过扩增获得所述的DNA序列;

[0010] 将所述DNA序列与质粒p1p100分别进行双酶切处理,然后使DNA序列插入到所述质粒p1p100多克隆位点,得到重组质粒。

[0011] 最后,本发明提供一种本发明所述的DNA序列或本发明所述的重组载体以及本发

明所述的制备方法得到的重组载体,在制备转基因作物中的应用。

[0012] 本发明的DNA序列中的SEQ ID:NO 1取自miR9560基因转录起始位点前3000bp的片段(本发明中命名为p9560),通过分析该序列中的顺式作用元件,发现p9560驱动目的基因选择性的在根部表达表达,例如GUS基因;因此p9560片段序列可以适用于特定的抗虫转基因植物的生产,比如:一些地下部容易受到害虫的侵害的作物,如牧草、花生、玉米等,以p9560DNA序列驱动抗虫基因等的表达,使其在生长过程中地下部分具有抗虫的能力,同时收获的农产品尽可能的不含转基因产物,会使作物生长良好同时产量会有所提高。因此,因该DNA序列特有的性能,本发明提供的DNA序列或本发明所述的重组载体以及本发明所述的制备方法得到的重组载体具有在制备转基因作物中的应用。

附图说明

[0013] 图1为本发明一实施例中p1p100-p9560-GUS表达载体结构示意图;

[0014] 图2为本发明实施例中p9560和拟南芥基因得PCR电泳图;

[0015] 图3为本发明一实施例中p1p100-p9560-GUS菌落PCR电泳图;其中,M:marker;1-7:单菌落;

[0016] 图4为本发明一实施例中p1p100-p9560-GUS载体双酶切电泳图;其中,M:marker;1:1号单菌落;2:42号单菌落;3:3号单菌落;

[0017] 图5为本发明一实施例中p1p100-p9560-GUS转基因植株筛选A:1/2MS培养基中的野生型拟南芥;B:在含有50mg/L K⁺的筛选培养基中的野生型拟南芥;C:在含有50mg/L K⁺的筛选培养基中的p1p100-p9560-GUS转基因拟南芥,箭头所示为转基因阳性植株;;

[0018] 图6为本发明一实施例中p1p100-p9560-GUS转基因植株T1代鉴定M:2K Marker;1-22:T1代苗;23:col;24:p1p100-p9560-GUS质粒;

[0019] 图7为本发明一实施例中p1p100-p9560-GUS转基因植株T1代鉴定M:2K Marker;1-22:T2代苗;16:p1p100-p9560-GUS质粒;17:col;

[0020] 图8为为本发明一实施例中GUS染色的拟南芥幼苗图。

具体实施方式

[0021] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0022] 一方面,本发明实施例提供了一种DNA序列,所述DNA序列含有如SEQ ID:NO 1所示的核苷酸序列,或如SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列经缺失、插入或替换所获得的具有相同功能的核苷酸序列。

[0023] 进一步地,本发明实施例的DNA序列为SEQ ID NO:1,序列如下:

[0024] ggctctgataccatgaaagtagtaagctttagagatagtatgtgaaggagactgaaatatatttccatc
ttattttctctcttaatgttgtagattacattagactctcttatatagttctctagattaggttaagctaggtcctcac
tctctagacattcaaacctatttagtcaagattaggtcttgacttggacagctggaattgctttcatcttttagcaa
tttcccttgaagcttccttaattttgtcttcttgttttgcaggtgaccgttgctcttgatgggctaaatgggctgc
ttttctgctttgggcctccagaccatgttatttgggcttggctcatctgatttggtagagctgactcaacgacaccgt

attgagttgtgtctgaagctgaattaggtcttttgtcttcttcaccttttccagtccttctcaatctctttcccaa
cattcttgttttcttcttagcttgtctccattgatactacaacatcaatatattcacaatttatatctaaatgatact
aaaattgagaccagaacaacaatgcagaacgaagagatatacaatcttgaatgatacaaatgtgataccttaa
aaatatatgcagcgacataatgtgattttaaaagctagaatcactctcgttctcgtgtttcatcattgctggctgc
aattcactctgttattgtgttttagaatgcttctgttatcgtgtttcagaataactctgttctcgttctcttcttg
atcagcaatgatgagaaaatgtgatttgatgaagaaaagtgggcgaaaaatggtagaatagtatatcagcgacc
aactttacgccaaagaaagtaactaattgcaaagaagatgaaaccgtataaataaggtgatcaatcaattgcaaga
aggaaacagtttcttcttcttctgctaattagtttgcaactgttgttagtcatggagatcgtggaagagtaaaaaaa
aagtttttaggaatgcaaatattaacatattgtgtgaaagtaaaacatcaaaaattgagacttatgccagatgtca
aaaggagaatacatcagttattgaaaaattgactgtcgtatttagtataattagatagcatatatttatatttagt
tttaaactcaccataacaaaatataacaacatcccacaaacacacatatatttcaactcttataccaatcaataa
atatattttatagctcttaaaacagcaaccattgctaccaaagatcttgcatttgcacctatctattaaccaatca
aatcctaaaattgcctaagttgtgaggctacaatggcgaaggccaaatgtgatgggttaactagcgggtttaatcgg
attaatctatttaattcagtcaaccaacggtacaaaatcggcgctgcgaggacaagaacctaaatcaatagatgat
gactctaacctaaacacataatatggtgacaaaaaatggcaagtagagaacatatgtactatatcgtattgcaaa
ttggagcagtagaccaaatacaacatataggtggacatatataatgtatggtaattaattactttgaaaattttac
atggaccataatatgtgaggtgacacattagcatagattcatattcttgtttggaaagacaatgaactcatattt
gcatttgatgtcatcatatgaacaaaatctacatatcgtatgtactctaagaccaacaaaatgtgatcatcatcat
cataagtttccctatataaaaatccccacaactcttcaccttgttccaaaacaatcaatgttatatatcatacgaaa
ggaaacacatcatcatatccacgctcgtatatctccacggttcataatcttctttatatatatttttcaaaaatcta
tcgcaaatgaagattttttataataaataacaaagagagtagacggataaacaatcttggcccatgtgttctct
acaagcctcactgtctaaaggtcaatgaaatgaagtcaacgaagtagaagaacgtgagaagcgagaatctcgcaact
tgtagatcaaggtacgtcttccaccttctcgtcatcttttttcttaggctcacttcgggtagatcttattctgggt
caggtatatcacaccaataatatacaataaactatatatatatatgttttaacatctaattctatggatacactat
atgattttttaaacttaaatcgcattccctcggaccagtcctatatgtttacatatggctctttttatgctgtccct
aagagactcaactcgcaaaacatttcaagatgttttctaaaataaagtttatgtcattcgtttctaagaaaaaaaa
agcaatttttctgttctttatgcacatacatattgtttgaacacatacatgaacttgagataatcaaatatttttt
caaggatacattaacatatcttttttagtcttttttagcaacctgaacgtatcaatgaaaataaaaccatatattaga
agtattttttggaatctctcaagatttttgggtgaaaataaaacatatcaattgtttataacttttcatactcctttt
ttttgttactatatataaaacatgaaaggctattcaaatcaacgaaatttaaagtgtagttgattgaaacgcaacct
tttaaggttggagtggttgaaacattaacttacatgaacgtaaaatcgaaatttgacctgaggctgaaaatcgaaat
aagagacaggaaagtgccaaactaatcgcatatttaatttccagatatcatccgttcaatcattatttaaatatttt
agtataaactagatatgtgaaaaagtcctcaaccagtcaccttttcatgagtgaactataaaccaagatatattt
gagcatcgtataaatggccagcctatattacctgtacaaaaattataaatataagacaactatataaaagttaaag
atatatatataa。

[0025] 本发明实施例的DNA序列中的SEQ ID:NO 1取自miR9560基因转录起始位点前3000bp的片段(本发明中命名为p9560),通过分析该序列中的顺式作用元件,miR9560DNA序列区域存在多种与组织器官特异性表达相关的元件。例如,与基因在根中的差异表达有关ROOT-MOTIFTAPOX1顺式作用元件23个;胚乳特异性表达相关的ENDOSPERM有7个;与植物生

长素信号相关的AUXIN RESPONSIVENESS有5个;与茉莉酸信号相关的顺式作用元件MEJA-RESPONSIVENESS有3个;与干旱诱导表达有关的DROUGHT-INDUCIBILIT;与光反应有关的LIGHT-RESPONSIVENESS有3个。

[0026] 具体地,所述DNA序列在植物中引导目的基因特异性地在根部表达。

[0027] 另一方面,本发明实施例提供一种重组载体,所述重组载体含有本发明实施例的上述DNA序列。

[0028] 本发明实施例首先发现p9560片段序列可作为DNA序列驱动特定抗虫基因在植物根部特异表达,使得植物具备抵御地下害虫的能力。通过克隆miR9560转录起始位点前3000bp的片段p9560,构建含有该DNA序列的重组载体,具体地,构建p9560-GUS(β -Glucuronidase, β -葡萄糖苷酸酶)的植物表达载体p1p100-p9560-GUS;利用农杆菌将该植物表达载体转化拟南芥,获得由p9560驱动GUS表达的转基因拟南芥;对拟南芥幼苗进行GUS表达分析,证明GUS高选择性的在根部表达。

[0029] 含有该p9560片段序列的重组载体可以适用于特定的转基因植物的生产:以p9560片段的DNA序列下游连接有目的基因,待转入目的基因只在植物根中表达的转基因植物生产。比如:比如:一些地下部容易受到害虫的侵害的作物,如牧草、花生、玉米等,在一实施例中,该重组载体中的所述目的基因包括抗虫基因、抗除草剂基因、抗真菌基因、抗细菌基因和抗病毒基因中的至少一种。通过驱动抗虫基因、抗除草剂基因等目的基因的表达,使其在生长过程中地上部具有抗虫、抗除草剂的能力,而收获的农产品不含转基因产物。

[0030] 相应地,本发明提供一种重组载体的制备方法,包括如下步骤:

[0031] S01:通过扩增获得所述的DNA序列;

[0032] S02:将所述DNA序列与质粒p1p100分别进行双酶切处理,然后使DNA序列插入到所述质粒p1p100多克隆位点,得到重组质粒。

[0033] 具体的所述步骤S01中,所述的DNA序列是以拟南芥的基因组DNA为模板扩增得到。更具体的是扩增拟南芥的基因组DNA中的miR9560基因转录起始位点前3000bp的片段

[0034] 具体的所述步骤S01中,扩增所述DNA序列的引物如SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示。采用特定的引物可以让所述DNA序列带有与质粒p1p100相对应的酶切位点,为后续的重组载体的构建做铺垫。

[0035] 具体的所述步骤S02中,所述酶切处理用的酶为所述酶切处理用的酶为是HindIII内切酶和NcoI内切酶。

[0036] 更具体的所述步骤S02中,是采用Vazyme ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit将9560片段插入到p1p100多克隆位点构建重组质粒。

[0037] 具体的在完成所述步骤S02后还需要验证是否构建成功。具体操作包括将构建好的p1p100-9560-GUS载体转化到大肠杆菌DH5 α 中并进行菌落PCR鉴定;并挑选出有条带的菌落提取阳性菌落质粒,用HindIII和EcoRI对质粒载体进行双酶切鉴定。最终验证是否成功构建重组载体。

[0038] 最后,本发明实施例提供一种本发明实施例所述的DNA序列或本发明实施例所述的重组载体以及本发明实施例所述的制备方法得到的重组载体,在制备转基因作物中的应用。所述转基因作物以收获根分以外为主要产品的作物,如牧草、花生、玉米等。

[0039] 本发明先后进行过多次试验,现举一部分试验结果作为参考对发明进行进一步详

细描述,下面结合具体实施例进行详细说明。

[0040] 实施例1 DNA序列序列的获得及分析

[0041] 在拟南芥基因组数据库TAIR中 (<http://www.arabidopsis.org/>) 寻找miR9560基因,并获得该基因转录起始位点上游3000bp的核苷酸序列,并将该序列片段命名为p9560。通过在线植物转录元件分析工具PLACE对该片段序列进行分析,预测其中存在的顺式作用元件。

[0042] 通过分析发现,p9560片段中存在响应组织器官特异性表达有关的元件:ROOTMOTIFTAPOX1与基因在根中的差异表达有关;另外,ENDOSPERM EXPRESSION与胚乳特异性表达相关;MEJA-RESPONSIVENESS与茉莉酸诱导表达有关;AUXIN RESPONSIVENESS与植物生长素信号有关;DROUGHT-INDUCIBILITY,与干旱诱导表达有关。

[0043] 表1 p9560中相关的顺式作用元件

	潜在顺式作用元件名称	元件所在位置	碱基序列	描述
[0044]	ROOTMOTIFTAPOX1	815 (+); 999 (+); 1007 (+); 111 (+); 1125 (+); 1179 (+); 1208 (+); 1498 (+);	ATATT	与基因在根中差异表达有关

[0045] 实施例2 DNA序列的克隆以及载体的构建

[0046] 将p9560片段连入p1p100载体(图1)中,与GUS基因相连。在多克隆位点选用EcoRI、HindⅢ对p1p100载体进行双酶切,将克隆得到的9560片段插入多克隆位点中间,构成最终载体p1p100-pR9560。具体操作:将野生型拟南芥(Columbia生态型)种子灭菌消毒后播撒到1/2MS平板上进行培养,两周后长出幼苗,CTAB法提取拟南芥的基因组DNA。以基因组DNA为模板,用表2中的引物pAtmiR9560-F和pAtmiR9560-R扩增miR9560基因转录起始位点前3000bp的片段,获得DNA序列9560片段。同时利用拟南芥基因组DNA为模板,用表2中的引物pAtmiR9560-plp100-F/pAtmiR9560-plp100-R扩增带有EcoRI、HindⅢ酶切位点的9560片段。用快切酶QuickCut™HindⅢ和QuickCut™EcoRI对质粒p1p100进行双酶切,用Vazyme ClonExpress MultiS One Step Cloning Kit将9560片段插入到p1p100多克隆位点。构建重组质粒p1p100-p9560-GUS,并测序验证

[0047] 用pAtmiR9560-F/pAtmiR9560-R引物从拟南芥基因组DNA重扩增出了3000的片段,如图2所示;将构建好的p1p100-9560-GUS载体转化到大肠杆菌DH5α中并进行菌落PCR鉴定(使用引物pAtmiR9560-F,pAtmiR9560-R),图3所示,扩增出了3000bp大小的片段,预期片段大小一致;挑选出有条带的菌落提取阳性菌落质粒,用HindⅢ和EcoRI对质粒载体进行双酶切鉴定,图4所示,能切除3000bp大小的条带,与预期酶切片段大小一致。测序分析表明,该序列与p9560序列一致,构建成功重组载体p1p100-p9560-GUS。

[0048] 表2引物及其酶切位点

	引物名字	引物序列	酶切位点
[0049]	pAtmiR9560-F	ggctcgataccatgaaa	
	pAtmiR9560-R	ttaatatatatcttt	
	pAtmiR9560-plp100-F	ccctttcgctcttcaagaattcggctcgataccatgaaa	EcoRI
	pAtmiR9560-plp100-R	gacctgcaggcatgcaagcttttaatatatatcttt	HindIII

[0050] 实施例3拟南芥转化以及转基因植株筛选

[0051] 利用花序侵染法 (Zhang X, Henriques R, Lin S, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 2006, 1 (2) : 641-646.) 将p1p100-p9560-GUS重组质粒转化到农杆菌GV3101中并侵染拟南芥, 收获侵染转化后的T0

[0052] 代种子进行转基因植株的筛选。将种子消毒灭菌后均匀播在含有50mg/L K⁺的筛选培养基上生长约1-2周, 筛选结果见 (图5) 所示。选出叶片较大且绿, 有根长出的幼苗作为阳性转基因候选植株。在T1和T2代对候选植株再次进行抗生素K⁺的筛选和DNA鉴定, 利用扩增GUS的引物gus-F和gus-R进行PCR扩增后, 如图6和图7, 获得纯合转基因植株。

[0053] 实施例4 9560驱动的报告基因GUS的表达分析

[0054] 转p9560-GUS植株在1/2MS培养基上培养10天后, 进行GUS的表达 (Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6 (13) : 3901-3907), 图8可见, GUS明显在拟南芥幼苗的根部表达, 在其它部位中表达很低。

[0055] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已, 并不用以限制本发明, 凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等, 均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]	SEQUENCE LISTING
[0002]	<110> 深圳大学
[0003]	<120> 一种可控制基因在植株根部特异表达的DNA序列及其应用
[0004]	<130> 2019.9.29
[0005]	<160> 1
[0006]	<170> PatentIn version 3.3
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 2967
[0009]	<212> DNA
[0010]	<213> 人工合成
[0011]	<400> 1
[0012]	ggctctgata ccatgaaagt agtaagcttt agagatagta tgtgaaggag actgaaatat 60
[0013]	tttccatctt atttctctct taatgttggtg attacattag actctcttat atagtctcta 120
[0014]	gattagggtta agctagggtcc tcaactctcta gacattcaaa cctatttagtc aagatttaggt 180
[0015]	cttgacttgg acagctggaa ttgctttcat cttttagcaa tttccttgaa gcttccttaa 240
[0016]	ttttgtcttc ttgttttgca ggtgaccgtt gctcttggtg gggctaaatg ggctgctttt 300
[0017]	ctgctttggg cctccagacc atgttattgg gcttggtcat ctgatttggg agagctgact 360
[0018]	caacgacacc gtattgagtt gtgtctgaag ctgaattagg tcttttgtct tcttcacctt 420
[0019]	tttcagtctt ctcaatctct ttcccaaaca ttcttgtttc ttctagcttg tctccattga 480
[0020]	tactacaaca tcaatatatt cacaatttat atctaaatga tactaaaatt gagaccacaga 540
[0021]	acaacaaatg cagaacgaag agatatacaa atcttgaatg atacaaattt gataacctaa 600
[0022]	aaatatatgc agcgacataa ttgattttta aaagctagaa tcaactctctg tctcgtgttt 660
[0023]	catcattgct ggctgcaatt cactctgtta ttgtgtttta gaatgcttct gttatcgtgt 720
[0024]	ttcagaataa ctctgttctc gttctcttct tgatcagcaa tgatgagaaa ttttgatttg 780
[0025]	atgaagaaaa gtgggcgaaa aatggtagaa tagtatattt cagcgaccaa ctttacgcca 840
[0026]	agaaagtaaa ctaattgcaa agaagatgaa accgtataaa taaggtgatc aatcaattgc 900
[0027]	aagaaggaaa cagtttcttc ttctttgcta attagtttgc aactgttgta gtcattgaga 960
[0028]	tcgtggaaga gtaaaaataa aagtttttag gaatgcaaat attaacatat tgttgtgaaag 1020
[0029]	taaaacatca aaaattgaga cttatgccag atgtcaaaag gagaatacat cagttattga 1080
[0030]	aaaattgact gtcgatttag tataattaga tagcatattt tattatatta gttttaaact 1140
[0031]	caccataac aaaatataac aacatccac aaacacacat attttcaact cttataccaa 1200
[0032]	tcaaataaat atttttatag ctcttaaaac agcaaccatt gctacaaaa gatcttgcatt 1260
[0033]	ttgcacctat ctattaacca atcaaatcct aaaattgcct aagttgtgag gctacaattg 1320
[0034]	caaaggccaa atgtgatggt taactagcgg gtttaattccg attaatctat ttaattcagt 1380
[0035]	caaccaacgg taaaaatcg gcgctgcgag gacaagaacc taaatcaata gatgatgact 1440
[0036]	ctaacctaaa cacataatat ggtgacaaaa aaatggcaag tagagaacat atgtactata 1500
[0037]	ttcgattgca aattggagca gtagacaaa atcaacatat aggttgacat atataatgta 1560
[0038]	tggtaatata ttactttgaa aattttacat ggaccataat atttgagggt acacattagc 1620
[0039]	atagattcat attctttgtt tggaaagaca atgaactcat atttgcattt gatgtcatca 1680
[0040]	tatgaacaaa atctacatat tcgatgtact ctaagaccaa caaatgtga tcatcatcat 1740
[0041]	cataagtttc cctatataaa atccccacaa ctcttcacct tgttccaaaa caatcaatgt 1800

[0042] tatatatcat acgaaaggaa acacatcatc atatccacgc tcgtatatct ccacggttca 1860
[0043] taatcttctt tatatatatt ttcaaaaatc tatcgcaa at taagattttt tataataaat 1920
[0044] aacaaagaga ggatagacgg ataaacaatc ttggccatt ggttctctac aagcctcact 1980
[0045] gtctaaggtc aatgaaatga agtcaacgaa gtagaagaac gtgagaagcg agaattctgc 2040
[0046] aacttgtaga tcaaggtacg tctttcacct ttgtcgtcat ctttttttct aggctcactt 2100
[0047] cgggtagatc ttattctggt caggtatatc acaaccaata atatacaata aactatatat 2160
[0048] atatatgttt taacatctaa tctatggata cactatatga tttttaaaac ttaaatacgc 2220
[0049] attccctcgg accagtctat atgttacata tggctctttt tatgctgtcc ctaagagact 2280
[0050] caactcgcaa aacatttcaa gatgttttct aaaataaagt ttatgtcatt cgtttctaag 2340
[0051] aaaaaaaaag caatttttcg ttctttatgc acatacatta attgttgaac acatacatga 2400
[0052] acttgagata atcaaatatt tttcaagga tacattaaca tatcttttta gtcttttttag 2460
[0053] caacctgaac gtatcaatga aaataaaacc atatattaga agtatttttg gaattctctca 2520
[0054] agatttttgg tgaaaataaa acatatcaat tgttttataac ttttcatact cttttttttt 2580
[0055] gttactatat taaaacatga aaggctattc aaatcaacga aatttaaagt gtagttgatt 2640
[0056] gaaacgcaac cttttaaggt tggagtgggt gaaacattaa cttacatgaa cgtaaaatcg 2700
[0057] aatattgacc tgaggtgaa aatcgaaata gagacaggaa agtgccaact aatcgcatat 2760
[0058] taatttccca gatatcatcc gttcaatcat tatttaaata ttttagtgat aaactagata 2820
[0059] ttgaaaaagt ctcaaccagt caccttttca tgagtgacat tataaaccaa gatatatatt 2880
[0060] gagcatcgta taaatggcca gcctatatta cctgtacaaa aattataaat ataagacaac 2940
[0061] tatataaaag ttaaagatat atattaa 2967

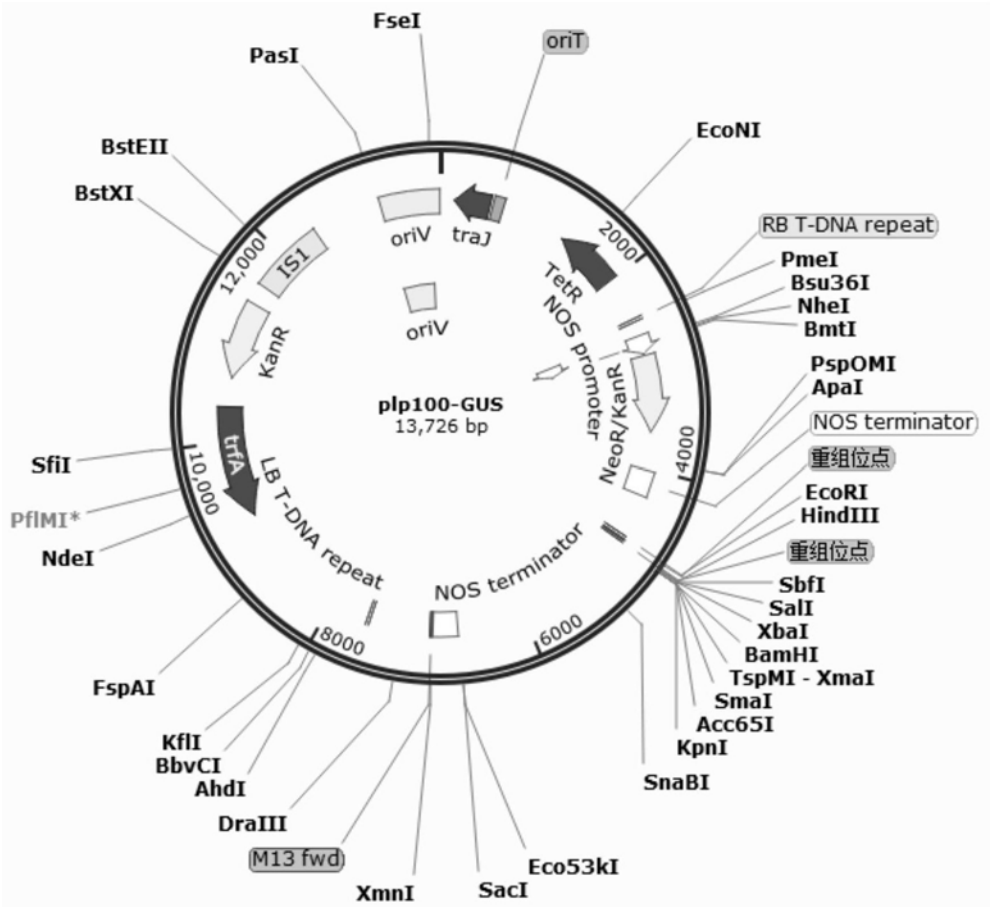


图1

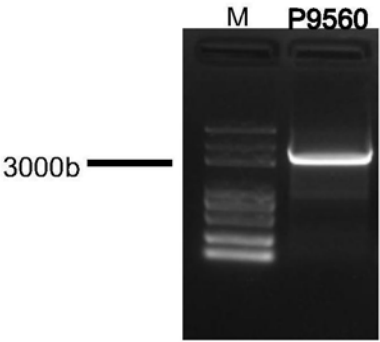


图2

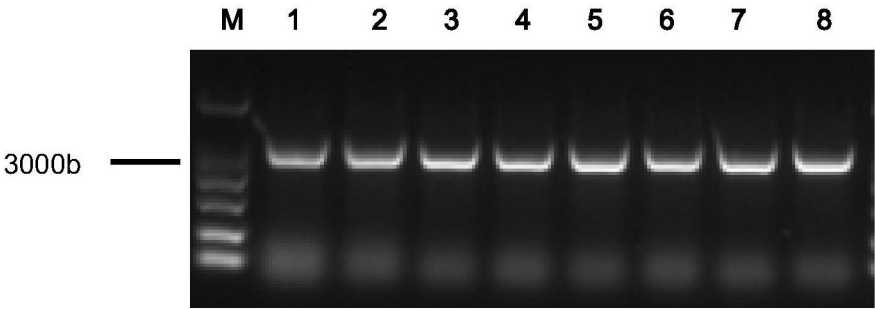


图3

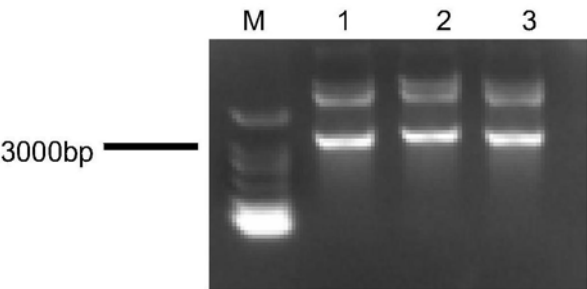


图4

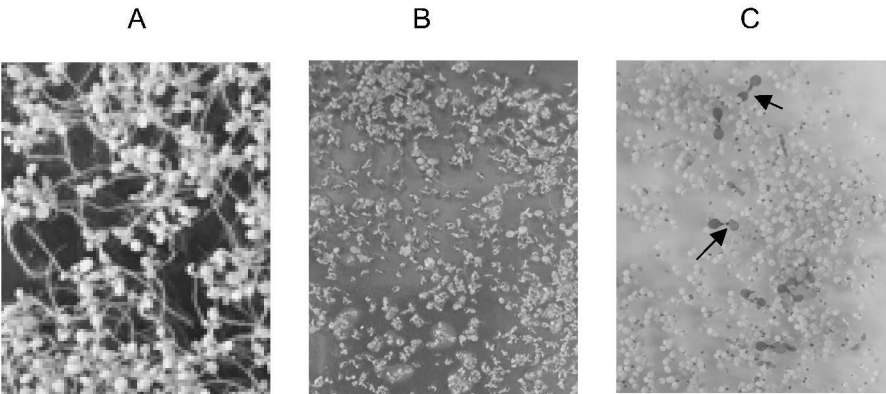


图5

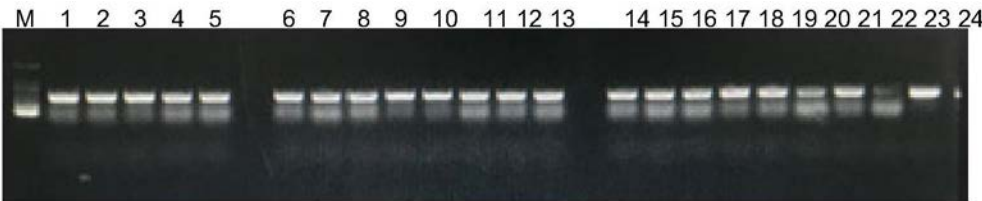


图6

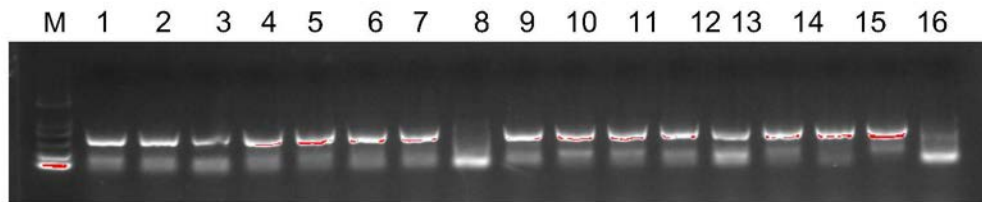


图7

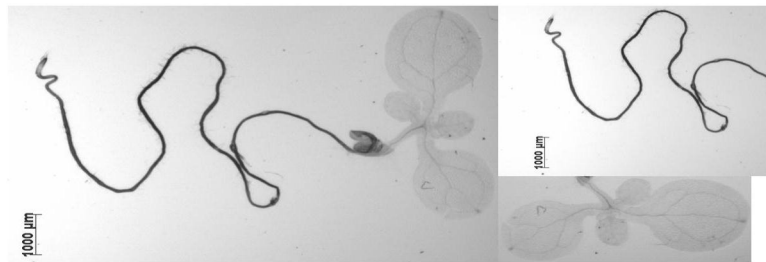


图8