

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/82

C12N 15/79 C12N 15/54

C12N 15/11 A01H 5/00

[21] 申请号 96196986.5

[43]公开日 1998 年 10 月 14 日

[11] 公开号 CN 1196093A

[22]申请日 96.7.12

[30]优先权

[32]95.7.14 [33]GB[31]9514435.8

[86]国际申请 PCT/EP96/03052 96.7.12

[87]国际公布 WO97/04112 英 97.2.6

[85]进入国家阶段日期 98.3.16

[71]申请人 丹尼斯科有限公司

地址 丹麦哥本哈根

[72]发明人 P·抛尔森

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 姜建成

权利要求书 2 页 说明书 34 页 附图页数 19 页

[54]发明名称 基因表达的抑制

[57]摘要

本发明描述了一种抑制基因表达的方法。这种影响植物中酶的活性的方法包括在植物（或其细胞，组织或者器官）中表达核苷酸序列，其中该核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码内含子，并且其中该核苷酸序列不含有通常与该内含子有关的外显子序列的反义序列。

权 利 要 求 书

1. 一种影响植物（或其细胞，组织或者器官）中酶的活性的方法，该方法包括在所说的植物（或其细胞，组织或者器官）中表达核苷酸序列，其中所说的核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码内含子；并且其中所说的核苷酸序列不含有通常与所说的内含子有关的外显子序列的反义序列。

2. 一种根据权利要求 1 的方法，其中淀粉分支酶的活性受到了影响和/或其中支链淀粉的含量受到了影响和/或改变了淀粉的组成。

3. 一种影响生产淀粉的生物体（或其细胞，组织或者器官）中酶活性的方法，该方法包括在所说的生产淀粉的生物体（或其细胞，组织或者器官）中表达核苷酸序列，其中所说的核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码内含子；并且其中淀粉分支酶的活性受到了影响和/或其中支链淀粉的含量受到了影响和/或改变了淀粉的组成。

4. 一种根据权利要求 3 的方法，其中所说的核苷酸序列不含有通常与所说的内含子有关的外显子序列的反义序列。

5. 一种根据前述权利要求之任一的方法，其中降低或去除了所说的酶活性。

6. 一种根据前述权利要求之任一的方法，其中所说的核苷酸序列至少基本上以反义取向编码至少一种内含子的全部。

7. 一种根据前述权利要求之任一的方法，其中所说的核苷酸序列以反义取向编码至少一种内含子的全部。

8. 一种根据前述权利要求之任一的方法，其中所说的核苷酸序列包括如 SEQ.I.D. No.15 至 SEQ.I.D. No.27 之任一所示的序列或其变体、衍生物或者同系物，其中也包括上述物质的结合。

9. 一种根据前述权利要求之任一的方法，其中所说的核苷酸序列由具有如 SEQ.I.D. No.14 所示序列的启动子或其变体、衍生物或者同系物来表达。

10. 一种包括如在权利要求 8 中定义的核苷酸序列的反义序列或其变体、衍生物或者同系物。

11. 一种具有如 SEQ.I.D. No.14 所示序列的启动子或其变体、衍生物或者同系物。

12. 一种根据权利要求 11 的启动子，该启动子结合了一种感兴趣的基因（“GOI”）。

13. 一种能够包括或者表达根据权利要求 10 至 12 之任一权利要求的本发明的构建体。

14. 一种包括或者表达根据权利要求 10 至 13 之任一权利要求的本发明的载体。

5 15. 一种核苷酸序列的结合, 该结合包括编码重组酶的第一核苷酸序列; 以及以反义取向对应于内含子的第二核苷酸序列; 其中所说的内含子为一种与编码对应于所说重组酶的酶的基因组基因有关的内含子; 并且其中所说的第二核苷酸序列不含有通常与所说的内含子有关的外显子序列的反义序列。

10 16. 一种包括或者表达根据权利要求 10 至 15 之任一权利要求的本发明的细胞、组织或器官。

17. 一种包括或者表达根据权利要求 10 至 16 之任一权利要求的本发明的转基因生产淀粉的生物体。

15 18. 一种根据权利要求 17 的转基因生产淀粉的生物体, 其中所说的生物体为植物。

19. 一种从根据前述权利要求之任一权利要求的本发明中获得的淀粉。

20. pBEA 8 (NCIMB 40753) 或 pBEA 9 (NCIMB 40815) 。

20 21. 一种核苷酸序列, 该核苷酸序列为任意一个或多个可以从 λ -SBE 3.2 (NCIMB 40751) 或 λ -SBE 3.4 (NCIMB 40752) 得到的内含子序列的反义序列或其变体、衍生物或同系物。

25 22. 一种在宿主生物体中表达重组蛋白或酶的方法, 该方法包括表达编码所说的重组蛋白或酶的核苷酸序列; 以及表达另一个核苷酸序列, 其中所说的另一个核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码内含子; 其中所说的内含子为一种通常与编码对应于所说的重组蛋白或酶的蛋白或酶的基因组基因有关的内含子; 并且其中所说的另一个核苷酸序列不含有通常与所说的内含子有关的外显子序列的反义序列。

说明书

基因表达的抑制

5 本发明涉及一种抑制基因表达、具体是抑制植物中基因表达的方法。本发明也涉及一种用于该方法的核苷酸序列。此外，本发明涉及一种可用于表达该核苷酸序列的启动子。

在植物、尤其是高等植物中，淀粉是主要的贮存糖类之一。淀粉的结构包括直链淀粉和支链淀粉。直链淀粉基本上是由 α -1-4-连接的糖残基的直链组成的。支链淀粉包括具有一些 α -1-6 分支的 α -1-4-连接的糖残基的链。支链淀粉分支的性质是通过其中一种通常称作淀粉分支酶(“SBE”)的酶的作用来实现的。通过在 α -1,6-糖苷分支键中加入 α -1,4 葡聚糖，SBE 催化支链淀粉分子中分支点的形成。在图 1 中示意性地显示出直链淀粉和支链淀粉的生物合成，而在图 2 中显示出 α -1-4-键和 α -1-6 键。

15 已知淀粉是一种重要的原材料。淀粉广泛用于食品、造纸以及化学工业。但是为了得到具有某种所需功能特性的淀粉，用于这些工业应用中的大部分淀粉均是通过化学、物理或者酶的方法采后修饰的。

在过去的几年里，制成能够生产出与采后修饰(modified)淀粉相同的修饰淀粉的基因修饰植物正是人们所需要的。也已知通过表达反义核苷酸的编码序列可能可以制备出上述经基因修饰的植物。在这一方面，June Bourque 提供了一个在植物中进行基因操作的反义方案的详细摘要(Bourque 1995 植物科学 105 pp 125-149)。目前可以参阅图 3，该图是所提出的一种反义-RNA 抑制机制的示意图。

具体说来，WO 92/11375 报道了一种通过基因修饰马铃薯从而形成直链淀粉-类型的淀粉的方法。该方法涉及使用在不同程度上能够明显地抑制编码马铃薯中形成分支酶的基因表达的反义构建体。WO 92/11375 的反义构建体由对块茎具有特异性的启动子、转录起始序列以及位于反义方向上的分支酶的第一个外显子组成。但是，WO 92/11375 没有提供任何反义序列的数据。此外，WO 92/11375 仅公开了马铃薯 GBSS 启动子的使用。

WO 92/14827 报道了一种在插入植物的基因组后可以在再生的植物中显著地引起糖类浓度和糖类组成(诸如直链淀粉和支链淀粉的浓度及组成)变化的质粒。该质粒含有以反义取向的分支酶的部分编码序列。

EP-A-0647715 报道了使用编码 DNA 的反义内源性 mRNA 来改变观赏性植物的特征以及代谢途径。

EP-A-0467349 报道了控制基因表达的启动子上游序列的反义序列的表达。

5 EP-A-0458367 以及 US-A-5107065 报道了在植物中调节基因表达的核苷酸序列的表达。该核苷酸序列互补于一个基因的 mRNA 序列并且可能覆盖该基因的全部或者部分的非编码区。换言之, EP-A-0458367 和 US-A-5107065 的核苷酸序列必须至少包括一个互补于编码区的序列。EP-A-0458367 以及 US-A-5107065 含有最少的序列信息。

10 Kuipers 等人在《分子基因遗传学》[1995] 246 745-755 中报道了一系列马铃薯颗粒结合淀粉合酶的基因组的内含子部分序列的反义核苷酸的表达。此处是把反义内含子序列连接到反义外显子的部分序列上—其中上述内含子序列和外显子序列本来就彼此相关。此外, 所表达的反义内含子序列最长为 231 bp。

15 同样, Kull 等人在《遗传与繁殖杂志》[1995] 49 69-76 中也报道了一系列马铃薯颗粒结合淀粉合成酶的基因组的内含子部分序列的反义核苷酸的表达。而且此处也是把反义内含子序列连接到反义外显子的部分序列上—其中上述内含子序列和外显子序列本来就彼此相关。此外, 所表达的反义内含子序列最长也为 231 bp。

20 Shimada 等人在《应用遗传学原理》[1993] 86 665-672 中报道了一系列大米颗粒结合淀粉合成酶的基因组的内含子部分序列的反义核苷酸的表达。此处是把反义内含子序列连接到反义外显子的部分序列上—其中上述内含子序列和外显子序列本来就彼此相关。此外, 所表达的反义内含子序列的长度小于 350 bp。

25 在 Finnegan 和 McElroy [1994]《生物技术》12 883-888 以及 Matzke 和 Matzke [1995] TIG 11 1-3 的教导中可以找到有关酶的活性是如何受到具体核苷酸序列的表达影响的综述。

虽然已知酶的活性受到具体的核苷酸序列的表达影响, 仍需要一种可以更可靠和/或更有效和/或更具体地影响酶活性的方法。

30 根据本发明的第一方面, 本发明提供了一种在植物(或其细胞, 组织或者器官)中影响酶的活性的方法, 该方法包括在植物(或其细胞, 组织或者器官)中表达核苷酸序列, 其中所说的核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码(是)内含子; 并且其中所说的核苷酸序列不含有通常与该内含子有关的外显子序列的反义序列。

根据本发明的第二方面，本发明提供了一种在生产淀粉的生物体（或其细胞，组织或者器官）中影响酶活性的方法，该方法包括在生产淀粉的生物体（或其细胞，组织或者器官）中表达核苷酸序列，其中该核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码（是）内含子；并且其中淀粉分支酶的活性受到影响和/或支链淀粉的含量受到影响和/或改变了淀粉的组成。

根据本发明的第三方面，本发明提供了一种包括如 SEQ.I.D. No.15 至 SEQ.I.D. No.27 之任一所示的核苷酸序列的反义序列或其变体、衍生物或者同系物。

根据本发明的第四方面，本发明提供了一种包括如 SEQ.I.D. No.14 所示序列的启动子或其变体、衍生物或者同系物。

根据本发明的第五方面，本发明提供了一种能够包括或者表达本发明的构建体。

根据本发明的第六方面，本发明提供了一种包括或者表达本发明的载体。

根据本发明的第七方面，本发明提供了一种包括或者表达本发明的细胞、组织或者器官。

根据本发明的第八方面，本发明提供了一种包括或者表达本发明的转基因的生产淀粉的生物体。

根据本发明的第九方面，本发明提供了一种从本发明得到的淀粉。

根据本发明的第十方面，本发明提供了 pBEA8（NCIMB 40753）或者 pBEA9（NCIMB 40815）。

根据本发明的第十一方面，本发明提供了一种可以从 λ -SBE 3.2（NCIMB 40751）或 λ -SBE 3.4（NCIMB 40752）得到的任意一个或者多个内含子序列的反义核苷酸序列或其变体、衍生物或者同系物。

本发明主要的优点在于它提供了一种用于制备修饰淀粉的方法，而该方法不需要进行淀粉的采后修饰。因此本发明的方法避免了对通常用于淀粉采后修饰的危险化学物质使用的需要。

此外，本发明还提供了经基因修饰的植物，该植物可以生产出其特性将满足不同的工业需要的修饰的和/或新的和/或改进的淀粉。

因此，本发明提供了一种在植物中制备特制（tailor-made）淀粉的方法，其中该淀粉可以代替采后修饰的淀粉。

本发明也提供了一种可以通过与已知的采后修饰方法相比对环境的影响更为有益的方法来制备修饰淀粉的方法，其中的采后修饰方法要求使用危险的化学物质以及大量的能量。

本发明另一个主要的优点在于与已知的影响酶活性的方法相比，它提供了一种可能更可靠和/或更有效和/或更特异地影响酶活性的方法。关于本发明的这一优点，应当指出在 SBEs 的编码区之间存在一定程度的同源性。但与 SBEs 的内含子序列存在极少的或者不存在同源性。

5 因此，反义内含子的表达提供了选择性地影响具体的 SBE 表达的机制。这一有利方面例如可以用来减少或者除去一种具体的 SBE 酶以及用另一种酶来代替该酶，其中的另一种酶可以是另一种分支酶或者甚至为受到影响的酶的重组形式或者甚至为一种比如可以包括来自一个来源的 SBE 酶的一部分以及至少来自另一来源的另一 SBE 酶的至少一部分的杂种酶。以下更详细地讨论本发明结合的几个方面将包括本发明的这一具体特征。

因此本发明提供了一种选择性地影响 SBE 活性的机制，这与现有技术中取决于使用例如反义外显子表达的方法形成对比，通过现有技术的方法是不可能引入新的 SBE 的活性而又不影响原有活性的。

15 优选关于本发明的第一方面，淀粉分支酶的活性受到影响和/或其中支链淀粉的含量受到影响和/或改变了淀粉的组成。

优选关于本发明的第二方面，所说的核苷酸序列不含有通常与所说的内含子有关的外显子序列的反义序列。

20 优选关于本发明的第四方面，所说的启动子与一个感兴趣的基因（“GOI”）结合。

优选地，降低或者去除了所说的酶的活性。

优选地，所说的核苷酸序列至少基本上编码以反义取向的至少一个内含子的全部。

25 优选地，所说的核苷酸序列部分或者完整地编码 2 个或者多个内含子并且其中的每个内含子均以反义取向。

优选地，所说的核苷酸序列包括至少 350 个核苷酸（例如至少 350bp），更优选包括至少 500 个核苷酸（例如至少 500bp）。

30 优选地，所说的核苷酸序列包括如 SEQ.I.D. No.15 至 SEQ.I.D. No.27 之任一所示的序列或其变体、衍生物或者同系物，其中也包括上述物质的结合。

优选地，所说的核苷酸序列是通过具有如 SEQ.I.D. No.14 所示序列的启动子或其变体、衍生物或者同系物表达的。

优选地，转基因的生产淀粉的生物体为植物。

因此，本发明一个优选的方面涉及一种在植物（或其细胞，组织或者

器官)中影响酶的活性的方法,该方法包括在植物(或其细胞,组织或者器官)中表达核苷酸序列,其中所说的核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码内含子;其中所说的核苷酸序列不含有通常与该内含子有关的外显子序列的反义序列;并且其中淀粉分支酶的活性受到影响和/或其中支链淀粉的含量受到影响和/或改变了淀粉的组成。

因此,本发明一个更优选的方面涉及一种在植物(或其细胞,组织或者器官)中影响酶的活性的方法,该方法包括在植物(或其细胞,组织或者器官)中表达核苷酸序列,其中所说的核苷酸序列部分或者完整地编码以反义取向的内含子;其中所说的核苷酸序列不含有通常与该内含子有关的外显子序列的反义序列;其中淀粉分支酶的活性受到影响和/或其中支链淀粉的含量受到影响和/或改变了淀粉的组成;并且其中所说的核苷酸序列包括如 SEQ.I.D. No.15 至 SEQ.I.D. No.27 之任一所示的序列或其变体、衍生物或者同系物,其中也包括上述物质的结合。

与本发明有关的术语“核苷酸”包括 DNA 和 RNA。优选地,该术语是指 DNA,更优选地是指通过使用重组 DNA 技术制备的 DNA。

在常规意义上,使用术语“内含子”来表示核苷酸的一个区段,它通常为 DNA,并且它不编码部分或者全部所表达的蛋白质或酶。

在常规意义上,使用术语“外显子”来表示核苷酸的一个区段,它通常为 DNA,并且它编码部分或者全部所表达的蛋白质或酶。

因此,术语“内含子”是指被转录成 RNA 分子但在把该 RNA 翻译成蛋白质之前从 RNA 中剪接调的基因区。相反地,术语“外显子”是指被转录成 RNA,随后又翻译成蛋白质的基因区。

与本发明的核苷酸序列有关的术语“变体”或“同系物”或“片段”包括各个核苷酸序列的一个(或多个)核酸的任意的取代、变化、修饰、置换、缺失或者添加,只要所得到的核苷酸序列可以影响植物或其细胞或者组织中的酶的活性即可,优选其中所得到的核苷酸序列至少与如 SEQ.I.D. No.s 15-27 所示的反义序列的任意一个序列具有相同的效果。更具体地讲,术语“同系物”包括与结构相似性和/或功能相似性有关的同源性,只要所得到的核苷酸序列具有影响本发明的酶活性的能力即可。就序列同源性(即相似性)而言,优选存在大于 80 % 的同源性,更优选至少有 85 % 的同源性,更优选至少有 90 % 的同源性,甚至于更优选至少有 95 % 的同源性,更优选至少有 98 % 的同源性。以上的术语与序列的等位变异也是同义的。

类似地,与本发明的启动子有关的术语“变体”或“同系物”或“片

段”包括各个启动子序列的一个(或多个)核酸的任意的取代、变化、修饰、置换、缺失或者添加,只要所得到的启动子序列允许 GOI 的表达即可,优选其中所得到的启动子序列至少与 SEQ.I.D. No.14 具有相同的效果。更具体地讲,术语“同系物”包括与结构相似性和/或功能相似性有关

5 的同源性,只要所得到的启动子序列具有允许诸如本发明的一个核苷酸序列 GOI 表达的能力即可。就序列同源性(即相似性)而言,优选存在大于 80 % 的同源性,更优选至少有 85 % 的同源性,更优选至少有 90 % 的同源性,甚至于更优选至少有 95 % 的同源性,更优选至少有 98 % 的同源性。以上的术语与序列的等位变异也是同义的。

10 术语“反义”是指互补于本发明的任意一个或者全部的内含子序列并从而能够与之杂交的核苷酸序列,该序列包括其部分序列。

对本发明而言,反义内含子可以互补于待抑制基因的一个完整的内含子。但在某些情况下,只要部分反义序列影响酶的活性则可以使用该部分序列(即并非或者不包括完整的互补序列的序列)。部分序列的合适的例

15 子包括短于如 SEQ.I.D. No.s 15 至 27 所示的任意一个完整的反义序列的序列,但该序列包括至少是靠近各个外显子(或多个外显子)的有义内含子序列的反义核苷酸。

对于本发明的第二方面而言(即特异性地影响 SBE 活性),本发明的核苷酸序列可以包括 SBE 基因的一个或者多个有义或反义外显子序列,

20 其中也包括其完整的或者部分的序列,而只要该核苷酸序列可以影响 SBE 活性即可,优选其中所说的核苷酸序列降低或者去除了 SBE 活性。优选地,本发明第二方面的核苷酸序列不包括反义外显子序列。

术语“载体”包括表达载体和转化载体。术语“表达载体”是指能够

25 在体内或体外进行表达的构建体。术语“转化载体”是指能够从一个物种转移至另一物种的构建体-诸如从大肠杆菌质粒转移至真菌或者植物细胞中,或者从农杆菌转移至植物细胞中。

与本发明的反义核苷酸序列方面有关的术语“构建体”包括直接或间接地附着到一个启动子上的本发明的核苷酸序列,该术语与诸如“偶联物”、“序列盒”和“杂种分子”之类的术语是同义的。间接附着的实例

30 为提供了一种诸如内含子序列(诸如 *Sh1*-内含子或 ADH 内含子)的合适的间隔序列来间隔本发明的启动子及核苷酸序列。对于与本发明有关的包括直接或间接附着的术语“融合的”而言,情况同样属实。该术语不包括在天然环境下与野生型 SBE 基因启动子有关的野生型 SBE 基因的天然组

合。

所说的构建体甚至可以包括或表达一种可用于选择转移了遗传构建体的植物细胞的标记物，其中的标记物已被转化至该植物细胞中。存在多种可用于例如植物的标记物 - 诸如甘露糖。其它标记物的实例包括那些提供了抗生素抗性的标记物 - 例如对 G418、潮霉素、博来霉素、卡那霉素及庆大霉素的抗性。

本发明的构建体优选包括一个启动子。术语“启动子”按照本领域的通常意义来使用，例如在基因表达的 Jacob-Monod 理论中 RNA 聚合酶的结合位点。合适的启动子的例子为那些可以指导本发明的核苷酸序列有效表达和/或在特异细胞类型中指导有效表达的启动子。在 WO 92/11375 中公开了对组织具有特异性的启动子的一些实例。

该启动子还可以包括如 Pribnow 盒或 TATA 盒之类的保守区。该启动子甚至可以包含影响（诸如维持、提高、降低）本发明的核苷酸序列表达水平的其它序列。上述序列的合适的例子包括 *Sh1* - 内含子或 ADH 内含子。其它序列包括可诱导元件 - 诸如温度，化学药剂，光或者应激可诱导元件。而且可以存在适于提高转录或翻译的元件。一个在后元件的实例为 TMV 5' 前导序列。（参见 Sleat Gene 217 [1987] 217-225；以及 Dawson 植物分子生物学 23 [1993] 97）。

正如所述，本发明的构建体和/或载体可以包括能够提供受调控的或者组成型表达的转录起始区。任意合适的用于转录起始区的启动子为 patatin 启动子或 E35S 启动子。另一方面，优选启动子为 SBE 启动子。

例如，如果生物体为植物的话，那么启动子可以是一种影响在种子、块茎、茎、新芽、根及叶片组织的任意一种或多种中的核苷酸序列表达的启动子，其中优选块茎。举例来说，用于本发明核苷酸序列的启动子可以为如我们在 1994 年 10 月 21 日提交的共同未决的英国专利申请 No.9421292.5 中所述的 α -Amy 1 启动子（此处称作 Amy 1 启动子，Amy 637 启动子或 α -Amy 637 启动子）。另外，用于本发明核苷酸序列的启动子可以为如我们在 1994 年 10 月 21 日提交的共同未决的英国专利申请 No.9421286.7 中所述的 α -Amy 3 启动子（此外称作 Amy 3 启动子，Amy 351 启动子或 α -Amy 351 启动子）。

本发明也包括使用启动子以表达本发明的核苷酸序列，其中使该启动子的一部分失活但其中该启动子仍能起到一个启动子的作用。在某些情况下，一个启动子的部分失活是有利的。尤其对以前提到的 Amy 351 启动子而言，使该启动子的一部分失活从而该部分失活的启动子以更为特异的

方式，诸如仅以一种特异的组织类型或器官，来表达本发明的核苷酸序列是可能的。术语“失活的”是指在改进了启动子的表达模式但其中部分失活的启动子仍起到一个启动子作用的意义上而言的部分失活。但是如上所述，经修饰的启动子能够在原始启动子的至少一种（但并非全部）特异的组织中表达编码本发明的酶的基因。部分失活的实例包括改变启动子序列的折叠模式或者改变与部分核苷酸序列的结合种类，以便于该核苷酸序列的一部分不为例如 RNA 聚合酶所识别。另外并且优选地，使启动子部分失活的方式是截短启动子以形成其片段。另一种方式为使该序列的至少一部分突变，以便于 RNA 聚合酶无法结合到该部分或另一部分上。另一种修饰为突变调节蛋白（例如从丝状真菌中已知的 CreA 蛋白）的结合位点以产生碳的分解代谢物的阻遏并从而消除天然启动子的分解代谢物的阻遏。

本发明的构建体和/或载体可以包括转录的终止区。

本发明的核苷酸可以与额外的构建体组合（但不必同时）加以表达。因此本发明也提供了构建体的一种组合，该组合包括含有可操作地连接到第一启动子上的本发明的核苷酸序列的第一构建体；以及含有可操作地连接到第二启动子上（该启动子不必与第一启动子相同）的 GOI 的第二构建体。就本发明的这一方面而言，构建体的这种组合可以存在于同一载体、质粒、细胞、组织、器官或生物体中。本发明的这一方面也包括表达上述物质的方法，其中优选在生物体的特异的细胞或组织中表达，诸如仅在生物体的一种特异的细胞或组织中表达，而生物体一般为植物。就本发明的这一方面而言，当通常与野生型基因的启动子有关的编码酶的基因与该野生型基因的启动子均处于其天然状态时，所说的第二构建体不包括这种天然组合。

合适的组合的实例为包括本发明的核苷酸序列和启动子，诸如本发明的启动子，的第一构建体以及包括启动子，诸如本发明的启动子，和 GOI 的第二构建体，其中 GOI 以有义或者反义取向来编码另一种淀粉分支酶。

以上有关于针对本发明的反义核苷酸的术语“构建体”的注释同样可用于针对本发明启动子的术语“构建体”。在这一方面，该术语包括直接或间接附着到 GOI 上的本发明的启动子。

就本发明的启动子方面或本发明的组合方面而言的术语“GOI”是指任何感兴趣的基因，如下所述，该基因不必编码蛋白质或酶。GOI 可以是讨论中的生物体，例如植物，外源或者天然的任意核苷酸序列。

GOI 的典型实例包括编码改进了代谢及分解代谢途径的其它蛋白质或者酶的基因。GOI 可以编码用于引入或者提高病原体抗性的试剂。

GOI 甚至可以为用于改进存在于相关组织中的天然转录物表达的反义构建体。上述 GOI 的实例为本发明的核苷酸序列。

5 GOI 甚至可以编码宿主生物体，例如植物，的非天然蛋白质。GOI 可以编码有利于动物或者人类的化合物。例如，GOI 能编码具有药物活性的蛋白质或酶，诸如治疗化合物胰岛素、干扰素、人血清白蛋白、人生长因子以及凝血因子中的任意一种。GOI 甚至可以编码给食品或饲料或作物提供额外的营养价值的蛋白质。典型的实例包括可以抑制抗-营养因子形成的植物蛋白以及具有更为人们所需的氨基酸的组成，例如比非转基因植物具有更高的赖氨酸含量，的植物蛋白。GOI 甚至可以编码可用于食品加工中的酶，诸如木聚糖酶和 α -半乳糖苷酶，GOI 可以为编码任何一种害虫毒素的基因，可以为一种诸如针对 α -淀粉酶、蛋白酶或葡聚糖酶的反义转录物。此外，GOI 可以为本发明的核苷酸序列。

15 GOI 可以是编码阿拉伯呋喃糖苷酶的核苷酸序列，而这是我们共同未决的英国专利申请 9505479.7 的主题。GOI 可以是编码葡聚糖酶的核苷酸序列，而这是我们共同未决的英国专利申请 9505475.5 的主题。GOI 可以是编码 α -淀粉酶的核苷酸序列，而这是我们共同未决的英国专利申请 9413439.2 的主题。GOI 可以是编码 α -淀粉酶的核苷酸序列，而这是我们共同未决的英国专利申请 9421290.9 的主题。GOI 可以是编码 α -glucanlyase 的任意一种核苷酸序列，而这在我们共同未决的 PCT 专利申请 PCT/EP94/03397 中已有描述。

一方面，GOI 甚至可以是可操作地连接到一个不同的启动子的本发明的核苷酸序列。

25 GOI 可以包括编码木聚糖酶、arabinase、乙酰酯酶、鼠李糖半乳糖醛酸聚糖酶 (rhamnogalacturonase)、葡聚糖酶、果胶酶、分支酶或另一种糖类修饰酶或蛋白酶的一种或多种酶的序列。此外，GOI 可以是任意一种上述序列的反义序列。

如上所述，本发明提供了一种选择性地影响特有的酶活性的机制。

30 就本发明一个重要的应用而言，目前可能通过表达特有的基因组的蛋白质或酶的反义内含子构建体以及 (例如同时) 表达该酶或蛋白质的重组形式，换言之即 GOI 为编码该基因组的酶或蛋白质的重组核苷酸序列，来减少或消除编码该基因组的蛋白质或酶的基因组核苷酸序列的表达。这一应用使得可以在缺乏各自的基因组酶及蛋白质 (或者该酶及蛋白质的含

量降低)的条件下表达所需的重组酶或蛋白质。因此,所需的重组酶及蛋白质可以容易地从宿主生物体中分离和纯化。本发明这一特有的方面明显优越于现有技术的方法,例如现有技术的方法取决于使用了反义外显子的表达,而该方法也影响重组酶的表达。

5 因此,本发明另一方面涉及在一个宿主生物体中表达重组蛋白或酶的方法,该方法包括表达编码该重组蛋白或酶的核苷酸序列;以及表达另一个核苷酸序列,其中所说的另一个核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码内含子;其中所说的内含子为通常与编码相应于重组蛋白或酶的蛋白或酶的基因组基因有关的内含子;并且其中所说的另一个核苷酸序列不含
10 有通常与该内含子有关的外显子序列的反义序列。另一方面包括上述核苷酸序列的组合,其中包括所说序列在构建体、载体、细胞、组织、及转基因生物体中的插入。

因此,本发明也涉及核苷酸序列的组合,该组合包括编码重组酶的第一核苷酸序列;以及对应于以反义取向的内含子的第二核苷酸序列;其中
15 所说的内含子为与编码对应于重组酶的酶的基因组基因有关的内含子;并且其中所说的第二核苷酸序列不含有通常与该内含子有关的外显子序列的反义序列。

GOI 甚至可以编码一个或多个内含子,诸如在所附序列表中提供的任意一个或多个内含子序列。例如,本发明也包括与如一个有义内含子组合的一个反义内含子(例如 SEQ.I.D. No.15)的表达,其中优选该有义内含子不互补于所说的反义内含子序列(如 SEQ.I.D. No.2)。
20

术语“细胞”、“组织”和“器官”包括其自身及存在于生物体内的细胞、组织和器官。

与本发明有关的术语“生物体”包括可以含有本发明的核苷酸序列和
25 /或其中当本发明的核苷酸序列存在于该生物体中时可以表达所说序列的任意的生物体。所说的生物体优选为生产淀粉的生物体,诸如任意一种植物、藻类、真菌、酵母、细菌及其细胞系。所说的生物体优选为植物。

术语“生产淀粉的生物体”包括能够生物合成淀粉的任意的生物体。优选地,该生产淀粉的生物体为植物。

30 如本文所使用的术语“植物”包括任何适宜的被子植物,裸子植物,单子叶植物及双子叶植物。合适的植物的典型实例包括如马铃薯等的蔬菜;如小麦、玉米及大麦等的谷物;水果;树木;花卉;以及其它的植物作物。该术语优选是指“马铃薯”。

与本发明有关的术语“转基因生物体”包括含有本发明的核苷酸序列

和/或从中得到产物的任意的生物体，和/或在其中可以表达本发明的核苷酸序列生物体。优选在该生物体的基因组中插入本发明的核苷酸序列。该转基因生物体优选为植物，更优选为马铃薯。

5 为了制备宿主生物体，人们可以使用原核或真核生物体。适宜的原核宿主的实例包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌。关于转化原核宿主的教导在现有技术中已进行了详尽地报道，例如可参阅 Sambrook 等人（Sambrook 等人，《分子克隆：实验室手册》，第 2 版，1989，冷泉港实验室出版社）。

10 尽管在 EP-B-0470145 与 CA-A-2006454 中没有公开本发明的酶和编码该酶的核苷酸序列，但这两篇文献均就可用于制备本发明的转基因植物的技术类型方面提供了一些有用的背景技术的解释。目前，在以下的解释中包括了上述背景技术的一些教导。

在构建遗传修饰的植物中的基本原则为在植物基因组中插入遗传信息以便于达到稳定地维持被插入的遗传材料。

15 存在多种用于插入遗传信息的技术，其中两个主要的原则为直接地引入该遗传信息以及通过使用载体系统来引入遗传信息。在 Potrykus（植物生理植物分子生物学年度回顾 [1991] 42:205 - 225）与 Christou（农业 - 食品 - 工业高技术进步/1994 年 4 月 17-27）的文章中可以找到上述常规技术的综述。

20 因此一方面，本发明涉及一种携带本发明的核苷酸序列或构建体并且能够向生物体（诸如植物）的基因组中引入该核苷酸序列或构建体的载体系统。

所说的载体系统可以包括一个载体，但该系统也可以包括两个载体。在两个载体的情况中，该载体系统通常称作二元载体系统。Gynheung An 25 等人（1980）在《植物分子生物学手册 A3》第 1-19 页的“二元载体”中进一步详细地描述了二元载体系统。

一种用于以给定的启动子或核苷酸序列或构建体来转化植物细胞而广泛使用的系统基于使用来自根瘤农杆菌的 Ti 质粒或来自毛根农杆菌的 Ri 质粒（An 等人（1986）植物生理 81,301-305 以及 Butcher D.N.等人 30 （1980），适于植物病理学家的组织培养方法，版本：D.S. Ingrams 与 J.P. Helgeson，203-208）。已经构建了适于构建上述植物或植物细胞构建体的几种不同的 Ti 与 Ri 质粒。上述 Ti 质粒的一个非限制性的实例为 pGV3850。

应当优选把本发明的核苷酸序列或构建体在介于 T-DNA 的末端序列

之间或靠近 T-DNA 序列处插入 Ti-质粒中，从而避免紧邻 T-DNA 边界序列破裂，这是因为对于向植物的基因组中插入修饰的 T-DNA 而言，上述区域中至少有一个区域似乎是必不可少的。

这正如从上面的解释中理解的那样，如果所说的生物体为植物的话，本发明的载体系统优选为一个含有为感染植物所必需的序列（例如 Vir 区）以及 T-DNA 序列的至少一个边界部分的系统，所说的边界部分与遗传构建体位于同一载体上。

另外，所说的载体系统优选为根瘤农杆菌 Ti-质粒或者毛根农杆菌 Ri-质粒或其衍生物。由于这些质粒是人们熟知的并且广泛用于构建转基因植物，所以存在许多基于上述质粒或其衍生物的载体系统。

在转基因植物的构建中，可以先在微生物中构建本发明的核苷酸序列或构建体，其中载体可以在该微生物中复制并且在插入植物之前该微生物是易于操作的。一种有用的微生物的实例为大肠杆菌，但也可以使用具有以上特性的其它微生物。当在大肠杆菌中已经构建了如上定义的载体系统的载体时，如有需要的话把该载体转化到一种合适的农杆菌菌株中（例如根瘤农杆菌）。因而，优选把包含本发明的核苷酸序列或构建体的 Ti-质粒转化至一种合适的农杆菌菌株中（例如根瘤农杆菌），以便于获得含有本发明的启动子或核苷酸序列或构建体的农杆菌细胞，随后把该 DNA 转化至待修饰的植物细胞中。

例如如果为了转化而使用了所说植物细胞的 Ti-或 Ri-质粒的话，那么至少可以把 Ti-与 Ri-质粒 T-DNA 的右边界、但通常是其右边界和左边界，作为引入基因的侧翼区，连接起来。在 EP-A-120516 中、Hoekema 在《二元植物载体系统》Offset — drukkerij Kanters B.B., Alblasterdam, 1985,第五章中、Fraley 等人在 Crit. Rev. Plant Sci., 4:1-46 中以及 An 等人在 EMBO J. (1985) 4:277-284 中已经深入地研究并描述了用于转化植物细胞而使用的 T-DNA。

由农杆菌直接侵染植物组织是一种现已广泛使用并在 Butcher D.N. 等人 (1980) 《适于植物病理学家的组织培养方法》版本: D.S. Ingrams 与 J.P. Helgeson, 203-208 中有所描述的简单的技术。就这一主题的进一步的教导可参阅 Potrykus (植物生理植物分子生物学年度回顾 [1991] 42:205-225) 和 Christou (农业-食品-工业高技术进步/ 1994 年 4 月 17-27)。就该技术而言，可以在植物的某一部分或组织之中或之上（即在叶、根、茎的一部分上或在该植物的另一部分上）进行植物的侵染。

一般说来，由携带 GOI（诸如本发明的核苷酸序列）以及选择性地携

带启动子的农杆菌直接侵染植物组织,例如通过以剃刀刀片切割植物或用针刺植物或用研磨料摩擦植物来使待侵染的植物受伤。然后用所说的农杆菌接种该伤口。随后在合适的培养基上培养接种的植物或植物的部分并使其发育为成熟的植株。

- 5 当构建植物细胞时,可以根据熟知的组织培养方法来培养和维持上述细胞,诸如通过在提供了如氨基酸、植物激素、维生素等必须的生长因子的合适的培养基上培养细胞。

采用用于从细胞或组织培养物中再生植物的已知方法可以实现转化细胞再生为遗传修饰的植物,例如通过采用抗生素来选择转化的幼苗并且
10 通过在含有合适的营养物、植物激素等的培养基上传代培养上述幼苗。

在 EP-A-0449375 中可以找到有关植物转化的进一步的教导。

正如在 CA-A-2006454 中所报道的,可以得到大量含有大肠杆菌中的复制系统并且能够选择转化细胞的标记物的克隆载体。所说的载体例如包括 pBR 322, pUC 系列, M13mp 系列, pACYC184 等。通过这种方式,
15 可以把本发明的核苷酸或构建体引入位于载体中的合适的限制性位点上。然后使用这种被包含的质粒在大肠杆菌中进行转化。在合适的营养培养基中培养上述大肠杆菌细胞,然后获得细胞并裂解。随后回收上述质粒。作为分析方法,有常用的序列分析、限制酶切分析、电泳以及进一步的生物化学-分子生物学方法。在每种操作之后,所使用的 DNA 序列可
20 以进行限制性消化并与接下来的 DNA 序列连接起来。每种序列均可以在同样的或不同的质粒中克隆。

在植物中引入本发明的核苷酸序列或构建体后,进一步的 DNA 序列的操作和/或插入可能是必须的-诸如为了建立如上提及的组合系统(例如包含构建体的组合的生物体)。

- 25 以上用于以本发明的核苷酸序列转化原核生物和植物的解释同样可用于以本发明的启动子转化上述生物体。

总而言之,本发明涉及通过表达反义内含子序列来影响酶的活性。

而且,本发明也涉及对上述反义内含子序列的表达有用的启动子。

下面的样品已按照布达佩斯条约于 1995 年 7 月 13 日保藏在位于英国
30 苏格兰 Aberdeen AB2 1RY 23 St Machar Drive 的国立工业及海洋细菌有限保藏公司(NCIMB)这一公认的保藏机构中:

NCIMB 40754 (是指如本文所述的 pBEA 11);

NCIMB 40751 (是指如本文所述的 λ -SBE3.2), 以及

NCIMB 40752 (是指如本文所述的 λ -SBE3.4)。

下面的样品已按照布达佩斯条约于1996年7月9日保藏在位于英国苏格兰 Aberdeen AB2 1RY 23 St Machar Drive 的国立工业及海洋细菌有限保藏公司 (NCIMB) 这一公认的保藏机构中:

5 NCIMB 40815 (是指如本文所述的 pBEA 9) ;

因此, 本发明的一个高度优选的实例涉及一种影响植物 (或其细胞, 组织或者器官) 中酶的活性的方法, 该方法包括在植物 (或其细胞, 组织或者器官) 中表达核苷酸序列, 其中所说的核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码内含子; 其中所说的核苷酸序列不含有通常与该内含子有关的外显子序列的反义序列; 其中淀粉分支酶的活性受到影响和/或支链淀粉的含量受到影响和/或改变了淀粉的组成; 并且其中所说的核苷酸序列可以从 NCIMB 40753 或 NCIMB 40815 得到, 或者该序列为任意一个或多个可从 λ -SBE3.2 (NCIMB 40751) 或 λ -SBE3.4 (NCIMB 40752) 得到的内含子序列的反义序列或其变体、衍生物或同系物。

15 因此, 本发明的一个更为高度优选的方面涉及一种影响植物 (或其细胞, 组织或者器官) 中酶的活性的方法, 该方法包括在植物 (或其细胞, 组织或者器官) 中表达核苷酸序列, 其中所说的核苷酸序列部分或者完整地以反义取向编码内含子; 其中所说的核苷酸序列不含有通常与该内含子有关的外显子序列的反义序列; 其中淀粉分支酶的活性受到影响和/或支链淀粉的含量受到影响和/或改变了淀粉的组成; 其中所说的核苷酸序列包括如 SEQ.I.D. No.15 至 SEQ.I.D. No.27 之任一所示的序列或其变体、衍生物或者同系物, 其中也包括上述物质的结合; 并且其中所说的核苷酸序列可以从 NCIMB 40753 或 NCIMB 40815 得到, 或者该序列为任意一个或多个可从 λ -SBE3.2 (NCIMB 40751) 或 λ -SBE3.4 (NCIMB 40752) 得到的内含子序列的反义序列或其变体、衍生物或同系物。

25 现在, 仅通过实施例的方式来描述本发明, 其中参考了以下所附的附图:

图 1 为直链淀粉及支链淀粉生物合成的示意表示;

图 2 为支链淀粉 α -1-4-键及 α -1-6-键的图解表示;

30 图 3 为可能的反义 RNA 抑制机制的图解表示;

图 4 为基因组 SBE 克隆的外显子 - 内含子结构的图解表示;

图 5 为 pPATA1 的质粒图, 其大小为 3936 bp;

图 6 为 pABE6 的质粒图, 其大小为 5106 bp;

图 7 为 pVictorIV Man 的质粒图, 其大小为 7080 bp;

图 8 为 pBEA8 的质粒图, 其大小为 9.54 kb ;

图 9 为 pBEA9 的质粒图, 其大小为 9.54 kb ;

图 10 为 pBEP2 的质粒图, 其大小为 10.32 kb ;

图 11 为 pVictor5a 的质粒图, 其大小为 9.12 kb ; 以及

5 图 12 显示出包括启动子、外显子及内含子的完整的 SBE 基因组的核苷酸序列。

图 1 和图 2 可以参阅以上关于淀粉的一般介绍性的描述。图 3 可以参阅以上关于反义表达的介绍性的描述。

10 正如所提及的, 图 4 为基因组 SBE 克隆的外显子 - 内含子结构的图解表示, 图 12 中所显示的为其序列。这一具有大约 11.5 k 碱基对的克隆包括 14 个外显子和 13 个内含子。从 5' 末端至 3' 末端以升序的方式来编号上述内含子并且这些内含子分别对应于 SEQ.I.D. No.s 1-13。它们各自的反义内含子序列如 SEQ.I.D. No.s 15-27 所示。

15 图 4 和图 12 更加详细地提供了有关马铃薯 SBE 基因的 11478 个碱基对的信息。自第 1 至第 2082 个核苷酸的 5' 区含有 SBE 基因的启动子区。位于第 2048 至 2051 个核苷酸的 TATA 盒的候选物用方框表示。在马铃薯 SBE cDNA 克隆 (Poulsen 与 Kreiberg (1993) 植物生理 102:1053-1054) 与外显子 DNAs 之间的同源性起始于第 2083 bp 并终止于第 9666 bp。在 cDNA 与外显子 DNA 之间的同源性是通过以大写字母表示的核苷酸来表示的, 而翻译成的氨基酸序列则以单字母密码显示在该
20 外显子 DNA 的下面。内含子序列是以小写字母表示的。

下面讨论图 5 至图 7。正如所提到的, 图 8 为 pBEA8 的质粒图, 其大小为 9.54 k 碱基对; 并且图 9 为 pBEA9 的质粒图, 其大小为 9.54 k 碱基对。pBEA8 及 pBEA9 的每一个序列均包括马铃薯 SBE 基因的第一内含子序列的反义序列。这种具有 1177 个碱基对的第一内含子序列示于图
25 4 并且位于第一外显子与第二外显子之间。

现在将更加详细地讨论本发明的一些实验及方面。

实验方案

分离, 在质粒中亚克隆以及基因组 SBE 克隆的测序

30 使用放射性标记的马铃薯 SBE cDNA (Poulsen 与 Kreiberg (1993) 植物生理 102:1053-1054) 作探针从 Desiree 马铃薯基因组文库 (克隆技术实验室公司, Palo Alto CA, USA) 中分离出含有马铃薯 SBE 基因的多种克隆。通过 Southern 分析来鉴别被分离的含有 SBE DNA 的 λ -噬菌体的片段 (λ SBE 3.2-NCIMB 40751-与 λ SBE-3.4-NCIMB 40752), 然后将

该片段亚克隆至 pBluescript II 载体中 (克隆技术实验室公司, Palo Alto CA, USA)。λSBE 3.2 含有 15 kb 的马铃薯 DNA 插入片段, λSBE-3.4 含有 13 kb 的马铃薯 DNA 插入片段。所得到的质粒称作 pGB3, pGB11, pGB15, pGB16 和 pGB25 (参见以下的讨论)。然后使用 Pharmacia 自动读数测序试剂盒 (Pharmacia, Uppsala) 和 A.L.F.DNa 测序仪 (Pharmacia, Uppsala) 对各个插入片段测序。

总计一共对 SBE 基因的一段 11.5 kb 的序列进行了测序。所说的序列可以从上述质粒中推导出来, 其中: pGB25 含有从 1 bp 至 836 bp 的序列, pGB15 含有从 735 bp 至 2580 bp 的序列, pGB16 含有从 2580 bp 至 5093 bp 的序列, pGB11 含有从 3348 bp 至 7975 bp 的序列, 并且 pGB3 含有从 7533 bp 至 11468 bp 的序列。

更详细地讲, 通过把从 λSBE 3.2 分离出来的一段 4 kb 的 *EcoRI* 片段插入 pBluescript II SK(+) 的 *EcoRI* 位点来构建 pGB3。通过把从 λSBE 3.4 分离出来的一段 4.7 kb 的 I 片段插入 pBluescript II SK(+) 的 *XhoI* 位点来构建 pGB11。通过把从 λSBE 3.4 分离出来的一段 1.7 kb 的 *SpeI* 片段插入 pBluescript II SK(+) 的 *SpeI* 位点来构建 pGB15。通过把从 λSBE 3.4 分离出来的一段 2.5 kb 的 *SpeI* 片段插入 pBluescript II SK(+) 的 *SpeI* 位点来构建 pGB16。为了构建 pGB25, 采用引物

5' GGA ATT CCA GTC GCA GTC TAC ATT AC 3'

和

5' CGG GAT CCA GAG GCA TTA AGA TTT CTG G 3'

并以 λSBE 3.4 作模板来生产 PCR 片段。

用 *BamHI* 和 *EcoRI* 消化上述 PCR 片段并将该片段插入以同一限制酶消化的 pBluescript II SK(+) 中。

构建 SBE 反义内含子质粒 pBEA 8 和 pBEA 9

通过 PCR 使用寡核苷酸

5' CGG GAT CCA AAG AAA TTC TCG AGG TTA CAT GG 3'

和

5' CGG GAT CCG GGG TAA TTT TTA CTA ATT TCA TG 3'

5 并以含有 SBE 基因的 λ SBE 3.4 噬菌体作模板扩增 SBE 内含子 1。

用 *Bam*HI 消化上述 PCR 产物并将该产物以反义取向插入介于 patatin 启动子与 35S 终止子之间的质粒 pPATA 1（在 WO 94/24292 中有所描述）的 *Bam*HI 位点。以 *Kpn*II 消化构建体 pABE6，分离出 2.4 kb 的“patatin 启动子-SBE 内含子 1-35S 终止子”的 *Kpn*II 片段并将该片段插入植物转化载体 pVictorIV Man 的 *Kpn*II 位点。以两种取向插入上述 *Kpn*II 片段，便生成了质粒 pBEA8 和 pBEA9。pVictorIV Man 示于图 7 并且是通过把含有从质粒 pVictorIV SGiN Man（WO 94/24292）分离出来的 E35S 启动子-manA-35S 终止子序列盒的补齐的 *Xba*I 片段插入 pVictor IV 的补齐的 *Xho*I 位点而形成的。pVictor IV Man 的 pVictor 区包含在
15 坐标 2.52 bp 至 0.32 bp 之间（参见图 7）。

转基因马铃薯植株的生产

纯性原种培养物

于 25 °C 及 16 小时光照/8 小时黑暗下，将马铃薯‘Bintje’和‘Dianella’
20 的幼苗培养物维持在根据 Linsmaier,E.U.与 Skoog,F.（1965）在《植物生理学》18:100-127 中配制的培养基（LS）上，此外该培养基还含有 2 μ M 的硫代硫酸银。

大约 40 天后，传代培养上述培养物。然后从幼苗上切下叶子，并将其切成每段含有一个节的节切片（segment）（大约 0.8 厘米）。

25 接种马铃薯组织

把来自培养了大约 40 天的幼苗培养物的幼苗（高度约为 5-6 厘米）切成内部节的切片（大约 0.8 厘米）。将该切片放入含有转化的根瘤农杆菌的液体 LS - 培养基中，其中的根瘤农杆菌含有感兴趣的二元载体。在含有合适的抗生素（对应于农杆菌菌株的抗性基因）的 YMB - 培养基（三水合磷酸氢二钾（0.66 g/l）；七水合硫酸镁（0.20 g/l）；氯化钠（0.10 g/l）；甘露糖醇（10.0 g/l）；和酵母提取物（0.40g/l））中培养上述
30 农杆菌过夜，直至在 660 nm 下的光密度（OD-660）约为 0.8，将上述农杆菌离心并重新悬浮于 LS - 培养基至 OD-660 为 0.5。

在农杆菌的悬浮液中保留该切片 30 分钟，然后通过无菌滤纸上吸干

该切片来除去过量的细菌。

共培养

5 直接在含有琼脂 (8.0 g/l)、 2,4 - 二氯苯氧乙酸 (2.0 mg/l) 和反式 - 玉米素 (0.5 mg/l) 的 LS - 培养基上与细菌一起共培养幼苗的切片 48 小时。用无菌滤纸覆盖上述培养基还有外植体, 在 25 ℃ 与 16 小时光照/8 小时黑暗下放置培养皿。

“洗涤”步骤

10 在共培养的培养基上经 48 小时后, 把上述切片转移至含有液体 LS - 培养基的容器中, 其中的培养基含有 800 mg/l 的羧苄青霉素。轻轻地振荡该容器, 通过这一步骤, 农杆菌的主要部分或从切片中洗去和/或被杀死。

选择

15 在洗涤步骤之后, 将上述切片转移至平板, 该平板含有 LS - 培养基、琼脂 (8 g/l)、反式 - 玉米素 (1-5 mg/l)、赤霉素 (0.1 mg/l)、羧苄青霉素 (800 mg/l) 和硫酸卡那霉素 (50-100 mg/l) 或者取决于所使用的载体构建的膦基麦黄酮 (1-5 mg/l) 或甘露糖 (5 g/l)。

每隔 3-4 周, 将上述切片传代培养至新鲜培养基上。

在 3 至 4 周内, 从上述切片发育成幼苗, 并且新的幼苗的形成将持续 3-4 个月。

20 再生幼苗的生根

把再生的幼苗转移至由 LS - 培养基、琼脂 (8g/l) 和羧苄青霉素 (800mg/l) 组成的生根培养基中。

25 通过测试在含有硫酸卡那霉素 (200 mg/l) 的上述培养基上的生根能力, 通过进行 NPTII 测定 (Radke, S.E.等人, 应用遗传学原理 (1988) 75:685-694) 或者根据 Wang 等人 (1993, NAR 21 pp4153-4154) 进行 PCR 分析来验证再生幼苗的转基因的基因型。把在上述任意一种测定中均不呈阳性的植物弃去或用作对照物。另一方面, 通过进行根据 Hodal, L. 等人 (植物科学 (1992) 87:115-122) 有关共同引入的 β -葡糖醛酸酶的基因的 GUS 测定也可以验证上述转基因植物。

30 转移至土壤

把新生根的植物 (高度约为 2-3 厘米) 从生根培养基移植入土壤并放置在生长室中 (21 ℃, 16 小时光照 200 - 400uE/m²/sec)。当植物很好地生长时, 将这些植物移入温室, 在温室中培养该植物直至块茎已经发育并且该植物的上部开始衰老。

收获

在大约 3 个月后收获这些马铃薯，然后进行分析。

分支酶的分析

- 5 采用由 Blennow 与 Johansson (植物化学 (1991) 30:437-444) 所述的 SBE 测定并且通过标准的 Western 方法采用定向的抗马铃薯 SBE 的抗体来测定转基因马铃薯系中 SBE 的表达。

淀粉分析

- 10 从马铃薯块茎中分离出淀粉，该淀粉用于分析直链淀粉与支链淀粉之比 (Hovenkamp-Hermelink 等人 (1988) 马铃薯研究 31:241-246)。此外，通过在 Dionex HPAEC 上分析异淀粉酶消化的淀粉来测定支链淀粉的链长分布。

- 15 通过 N.Nelson (1944) 在《生物化学杂志》153:375-380 中所述的方法来测定异淀粉酶消化的淀粉中还原端的数目。

上述结果表明 SBE 合成的水平和/或 SBE 活性的水平和/或转基因植物中淀粉 SBE 的组成有所下降。

构建 SBE 启动子构建体

- 20 使用引物

5' CCA TCG ATA CTT TAA GTG ATT TGA TGG C 3'

和

25

5' CGG GAT CCT GTT CTG ATT CTT GAT TTC C 3'.

- 30 从λ-SBE 3.4 中扩增一段 SBE 启动子片段。用 *Cla*I 与 *Bam*HI 消化该 PCR 产物。然后将得到的 1.2 kb 的片段插入用 *Cla*I 和 *Bg*AI 线性化的 pVictor 5a 中 (参见图 11)，从而生成 pBEP2 (参见图 10)。

马铃薯块茎的淀粉分支酶的测量

把来自用 pBEA8 或 pBEA9 转化的马铃薯植株的马铃薯切成小块并使用 Ultra-Turax 匀浆器在提取缓冲液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 连二亚硫酸钠 (0.1 g/l) 和 2 mM DTT) 中进行匀浆; 向每 10 克的块茎中加入

1 克 Dowex xl。将粗的匀浆物通过 Miracloth 过滤器进行过滤并在 4℃、24,700g 下离心 10 分钟。上清液用于淀粉分支酶的测定。

淀粉分支酶的测定是在 25℃ 下、体积为 400 μl 的容器中进行的，上述溶液是由 0.1M 柠檬酸钠缓冲液 pH 7.0、0.75 mg/ml 直链淀粉、5 mg/ml 牛血清白蛋白和马铃薯提取物组成的。在 0、15、30 和 60 分钟时，从上述反应中取走 50 μl 的等分试样至 20 μl 的 3N HCl 中。加入 1ml 碘溶液并用 ELISA 分光光度计测量 620 nm 处吸光度的下降。

在来自用质粒 pBEA9 转化的 34 株转基因 *Dianella* 马铃薯植株的块茎提取物中测量淀粉分支酶 (SBE) 的含量。

10 pBEA9 转化的转基因系生产出 SBE 含量为在未转化的 *Dianella* 植株中 SBE 含量的 10% 至 15% 的块茎。

小结

上述实施例涉及马铃薯 SBE 的基因的分离和测序。这些实施例进一步阐明可能可以制备出 SBE 的内含子的反义构建体。可以把这些 SBE 的内含子的反义构建体引入诸如马铃薯之类的植物中。在引入后，可以实现 SBE 合成水平和/或 SBE 活性的水平和/或植物中淀粉组成的降低。

人们认为本发明所表达的反义核苷酸序列结合到位于前-mRNA 的有义内含子上并从而防止了前-mRNA 的剪接和/或随后 mRNA 的翻译，而这并不希望与理论相结合。因此人们认为这一结合降低了植物的酶活性 (尤其是 SBE 活性) 的水平，反过来人们认为 SBE 活性又影响了直链淀粉与支链淀粉的比例并从而影响支链淀粉的分支模式。

因此，本发明提供了一种可能通过采用反义 RNA 技术降低 SBE 活性水平来控制植物或其组织或者细胞 (诸如马铃薯块茎) 中的淀粉组成的方法，其中的反义-RNA 技术使用了反义内含子序列。

因此总而言之，本发明涉及以影响植物中酶的活性的方法来令人吃惊地使用反义内含子序列。

在不偏离本发明的范围的情况下，本发明的其它改进对本领域的普通技术人员而言是显而易见的。

30 例如，可能可以使用反义启动子序列来影响酶的活性，比如反义 SBE 启动子-诸如包括如 SEQ.I.D. No.28 所示的核苷酸序列或其变体、衍生物或者同系物的核苷酸序列。

下面几页提供了已从 SEQ.I.D. No.1 至 SEQ.I.D. No.29 顺序排号的许多序列列表。简而言之，SEQ.I.D. No.1 至 SEQ.I.D. No.13 表示有义内含子序

- 列（基因组 DNA）； SEQ.I.D. No.14 表示 SBE 启动子序列（基因组序列）； SEQ.I.D. No.15 至 SEQ.I.D. No.27 表示反义内含子序列；并且 SEQ.I.D. No.28 表示（是）互补于 SBE 启动子序列的序列—即以反义取向的 SBE 启动子序列。包括启动子、外显子和内含子的 SBE 的完整的基因组核苷酸序列如 SEQ.I.D. No.29 所示并且通过突出了具体的基因特征的图 4 和图 12 进行了解释。
- 5

序列信息

SEQ.I.D. No. 1

内含子1的序列 (1167 bp).

```
GTAATTTTACTAATTTTCATGTTAATTTCAATTATTTTTCAGCCTTTGCATTTTCATTTTCCAATATATCT
GGATCATCTCCTTAGTTTTTATTTTATTTTATAATATCAAATATGGAAGAAAAATGACACTTGTAG
AGCCATATGTAAGTATCATGTGACAAATTTGCAAGGTGGTTGAGTGTATAAAATTCAAAAATTGAGAGA
TGGAGGGGGGGTGGGGGBARAGACAATATTTAGAAAGAGTGTCTAGGAGGTTATGGAGGACACGGATG
AGGGGTAGAAGGTTAGTTAGGTATTTGAGTGTGTCTGGCTTATCCTTTCATACTAGTAGTCGTGGAAT
TATTTGGGTAGTTTCTTGTTTTGTATTGATCTTTGTTATTCTATTTTCTGTTTCTTGTACTTCGATT
ATTGTATTATATATCTTGTCTGATGTTATTGTTCCCTCGGTAAGAATGCTCTAGCATGCTTCCTTTAGTGT
TTTATCATGCCTTCTTTATATTCGCGTTGCTTTGAAATGCTTTTACTTTAGCCGAGGGTCTATTAGAAA
CAATCTCTCTATCTCGTAAGGTAGGGGTAAAGTCCCTCACCACACTCCACTTGTGGGATTACATTGTGTT
TGTTGTTGTAAATCAATTATGTATACATAATAAGTGGATTTTACACACAAATACATGGTCAAGGGC
AAAGTTCGAACACATAAAGGGTTCATTATATGTCCAGGGATATGATAAAAATTGTTTCTTTGTGAAAG
TTATATAAGATTTGTTATGGCTTTTGCTGGAACATAATAAGTTATAATGCTGAGATAGCTACTGAAGT
TTGTTTTTTCTAGCCTTTTAAATGTACCAATAATAGATTCCGTATCGAACGAGTATGTTTTGATTACCT
GGTCATGATGTTTCTATTTTTTACATTTTTTTGGTGTGAACTGCAATTGAAAATGTTGTATCCTATGA
GACGGATAGTTGAGAATGTGTTCTTTGTATGGACCTTGAGAAGCTCAAACGCTACTCCAATAATTTCTA
TGAATTCAAATTCAGTTTATGGCTACCAGTCAGTCCAGAAATTAGGATATGCTGCATATACTTGTTCAA
TTATACTGTAAAATTTCTTAAGTTCTCAAGATATCCATGTAACCTCGAGAATTTCTTTGACAG
```

SEQ.I.D. No. 2

内含子2的序列 (321 bp).

```
GTATGTTTGATAATTTATATGGTTGCATGGATAGTATATAAATAGTTGGAAAACCTTCTGGACTGGTGCT
CATGGCATATTTGATCTGTGCACCGTGTGGAGATGTCAAACATGTGTTACTTCGTTCCGCCAATTTATA
ATACCTTAACTTTGGGAAAGACAGCTCTTTACTCCTGTGGGCATTTGTTATTTGAATTACAATCTTTATG
AGCATGGTGTTTTACATTATCAACTTCTTTCATGTGGTATATAACAGTTTTTTAGCTCCGTTAATACCT
TTCTTCTTTTTGATATAAACTAACTGTGGTGCATTGCTTGCBKKK
```

SEQ.I.D. No. 3

内含子3的序列 (504 bp).

```
GTAACAGCCAAAAGTTGTGCTTTAGGCAGTTTGACCTTATTTTGGGAAGATGAATTGTTTATACCTACTT
TGACTTTGCTAGAGAATTTTGCATACCGGGGAGTAAGTAGTGGCTCCATTTAGGTGGCACCTGGCCATT
TTTTTGATCTTTTAAAAAGCTGTTTGATTGGGTCTTCAAAAAGTAGACAAGGTTTTTGGAGAAGTGAC
ACACCCCCGGAGTGTCAAGTGGCAAAGCAAAGATTTTCACTAAGGAGATTCAAATATAAAAAAGTATA
GACATAAAGAAGCTGAGGGGATTCAACATGTACTATACAAGCATCAAATATAGTCTTAAAGCAATTTTG
TAGAAATAAAGAAAGTCTTCTTCTGTTGCTTCACAATTTCTTCTATTATCATGAGTTACTCTTTCTG
TTCGAAATAGCTTCTTAATATTAAATTCATGATACTTTTGTGAGATTTAGCAGTTTTTTCTTGTGTA
AACTGCTCTCTTTTTTTTGCAG
```

SEQ.I.D. No. 4

内含子4的序列 (146 bp).

GTAGGTCCTCGTCTACTACAAAATAGTAGTTTCCATCATCATAACAGATTTTCCTATTAAAGCATGATG
TTGCAGCATCATTGGCTTTCTTACATGTTCTAATTGCTATTAAGGTTATGCTTCTAATTAACATCCA
CAATGCAG

SEQ.I.D. No. 5

内含子5的序列 (218 bp).

GTTTTGTTATTCATACCTTGAAGCTGAATTTTGAACACCATCATCACAGGCATTTTCGATTCATGTTCTT
ACTAGTCTTGTTATGTAAGACATTTTGAAATGCAAAAGTTAAATAATTGTGTCTTTACTAATTTGGAC
TTGATCCCATACTCTTTCCCTTAACAAAATGAGTCAATTCTATAAGTGCTTGAGAACTTACTACTTCAG
CAATTAAACAG

SEQ.I.D. No. 6

内含子6的序列 (198 bp).

GTATTTTAAATTTATTTCTACAACATAAATAATTCTCAGAACAATTGTTAGATAGAATCCAAATATATAC
GTCCTGAAAGTATAAAAGTACTTATTTTCGCCATGGGCCTTCAGAATATTGGTAGCCGCTGAATATCAT
GATAAGTTATTTATCCAGTGACATTTTATGTTCACTCCTATTATGTCTGCTGGATACAG

SEQ.I.D. No. 7

内含子7的序列 (208bp)

GTTTGTCTGTTTCTATTGCATTTTAAGGTTTCATATAGGTTAGCCACGGAAAATCTCACTCTTTGTGAGG
TAACCAGGGTTCTGATGGATTATTCAATTTTCTCGTTTATCATTTGTTTATTCTTTTCATGCATTGTGT
TTCTTTTCAATATCCCTCTTATTTGGAGGTAATTTTCTCATCTATTCACTTTTAGCTTCTAACCACAG

SEQ.I.D. No. 8

内含子8的序列 (293 bp).

GTATGTCTTACATCTTTAGATATTTTGTGATAATTACAATTAGTTTGGCTTACTTGAACAAGATTCATT
CCTCAAAATGACCTGAACTGTTGAACATCAAAGGGGTTGAAACATAGAGGAAAACAACATGATGAATGT
TTCCATTGTCTAGGGATTTCTATTATGTTGCTGAGAACAAATGTCATCTTAAAAAAACATTGTTTACT
TTTTTGTAGTATAGAAGATTACTGTATAGAGTTTGCAAGTGTGTCTGTTTTGGAGTAATTGTGAAATGT
TTGATGAACTTGTACAG

SEQ.I.D. No. 9

内含子9的序列 (376 bp).

GTTCAAGTATTTTGAATCGCAGCTTGTTAAATAATCTAGTAATTTTATAGATTGCTTACTTGGAAAGTCTA
CTTGGTTCTGGGGATGATAGCTCATTTTCATCTTGTCTACTTATTTTCCAACCGAATTTCTGATTTTGT
TTTCGAGATCCAAGTATTAGATTCATTTACACTTATTACCGCCTCATTCTACCACTAAGGCCTTGATG
AGCAGCTTAAGTTGATTCTTTGAAGCTATAGTTTCAGGCTACCAATCCACAGCCTGCTATATTTGTTGG

ATACTTACCTTTTCTTTACAATGAAGTGATACTAATTGAAATGGTCTAAATCTGATATCTATATTTCTC
CGTCTTTCCTCCCCCTCATGATGAAATGCAG

SEQ.I.D. No. 10
内含子10的序列 (172 bp).

GTAAATCATCTAAAGTTGAAAGTGTTGGGTTTATGAAGTGCTTTAATTCTATCCAAGGACAAGTAGAA
ACCTTTTACCTTCCATTTCTTGATGATGGATTTTATATTATTTAATCCAATAGCTGGTCAAATTCGGT
AATAGCTGTACTGATTAGTTACTTCACTTTGCAG

SEQ.I.D. No. 11
内含子11的序列 (145 bp).

GTATATATGTTTTACTTATCCATGAAATTATTGCTCTGCTGTTTTTAATGTACTGAACAAGTTTTATG
GAGAAGTAACTGAAACAAATCATTTTCACATTGTCTAATTTAACTCTTTTTTCTGATCCTCGCATGACG
AAAACAG

SEQ.I.D. No. 12
内含子12的序列 (242 bp).

GTAAGGATTTGCTTGAATAACTTTTGATAATAAGATAACAGATGTAGGGTACAGTTCTCTCACCAAAAA
GAACTGTAATTGTCTCATCCATCTTTAGTTGTATAAGATATCCGACTGTCTGAGTTCCGGAAGTGTGTTGA
GCCTCCTGCCCTCCCCCTGCGTTGTTTAGCTAATTCAAAAAGGAGAAAACTGTTTATTGATGATCTTTG
TCTTCATGCTGACATACAATCTGTTCTCATGACAG

SEQ.I.D. No. 13
内含子13的序列 (797 bp).

GTACAGTTCTTGCCGTGTGACCTCCCTTTTTATTGTGGTTTTGTTTCATAGTTATTTGAATGCGATAGAA
GTTAACTATTGATTACCGCCACAATCGCCAGTTAAGTCCTCTGAACTACTAATTTGAAAGGTAGGAATA
GCCGTAATAAGGTCTACTTTTGGCATCTTACTGTTACAAAACAAAAGGATGCCAAAAAATTCTTCTCT
ATCCTCTTTTTCCCTAAACCAGTGCATGTAGCTTGCACCTGCATAAACTTAGGTAAATGATCAAAAATG
AAGTTGATGGGAACCTTAAAACCGCCCTGAAGTAAAGCTAGGAATAGTCATATAATGTCCACCTTTGGTG
TCTGCGCTAACATCAACAACAACATACCTCGTGTAGTCCCACAAAGTGGTTTTCAGGGGGAGGGTAGAGT
GTATGCAAACTTACTCCTATCTCAGAGGTAGAGAGGATTTTTTCAATAGACCCTTGGCTCAAGAAAAA
AAGTCCAAAAAGAAGTAACAGAAGTGAAAGCAACATGTGTAGCTAAAGCGACCCAACCTTGTGTTGGGACT
GAAGTAGTTGTTGTTGTTGAAACAGTGCATGTAGATGAACACATGTCAGAAAAATGGACAACACAGTTAT
TTTGTGCAAGTCAAAAAAATGTACTACTATTTCTTTGTGCAGCTTTATGTATAGAAAAAGTTAAATAACT
AATGAATTTTGCTAGCAGAAAAATAGCTTGGAGAGAAATTTTTATATTGAACTAAGCTAACTATATTC
ATCTTTCTTTTGCTTCTTCTCTCCTTGTTTGTGAAG

SEQ.I.D. No. 15

内含子1的反义序列

(1167 bp).

CTGTCAAAGAAATTCTCGAGGTTACATGGATATCTTGAGAACTTAAGAAATTTTACAGTATAATTGAAC
AAGTATATGCAGCATATCCTAATTTCTGGACTGACTGGTAGCCATAAACTGAATTTGAATTCATAGAAA
TTATTGGAGTAGCGTTTGAGCTTCTCAAGGTCCATACAAAGAACACATTCTCAACTATCCGTCTCATAG
GATACAACATTTTCAATTGCAGTTCAACACCAAAAAATGTAAAAATAGAAACATCATGACCAGGTAA
TCAAAACATACTCGTTTCGATACGGAATCTATTATTGGTACATTTAAAGGCTAGAAAAACAACTTCA
GTAGCTATCTCAGCATTATACTTATTATGTTTCCAGCAAAAGCCATAACAAATCTTATATACTTTCA
CAAAGAAACAATTTTTATCATATCCCTGGACATATAATGAACCTTTTATGTGTTCAGAACTTTGCCCTT
GACCATGTATTTGTGTTGTAAAAATCCACTTATTATGTATACATAATTGATTTACAACAACAACACA
ATGTAATCCCACAAGTGGAGTGTGGTGAGGACTTTACCCCTACCTTACGAGATAGAGAGATTGTTTCTA
ATAGACCCTCGGCTAAAGTAAAGCATTTCAAAGCAACGCGAATATAAAGAAGGCATGATAAAACACTA
AAGGAAGCATGCTAGAGCATTCTTACCGAGGAACAATACTACGACAAGATATATAATACAATAATCGA
AGTACAAGAAACAGAAAATAGAATAACAAAGATCAAATAACAAAACAAGAACTACCCAAATAATTCCA
CGACTACTAGTATGAAAGGATAAGCCAGACAACACTCAAATACCTAACTAACCTTCTACCCCTCATCCG
TGTCCTCCATAACCTCCTAGAACACTCTTTCTAAATATTGTCTYTVCCCCCACCCCCCTCCATCTCTC
AATTTTTGAATTTTATACACTCAACCACCTTGCAAATTTGTACATGATACTTACATATGGCTCTACAA
GTGTCATTTTTCTTCATATTTGATATTATAAAAAATAAAATAAAAACTAAGGAGATGATCCAGATAT
ATTGGAAATGAAATGCAAAGGCTAAAAATAATTGAAATTAACATGAAATTAGTAAAAATTAC

SEQ.I.D. No. 16

内含子2的反义序列

(321 bp).

MMMVGCAAGCAATGCACCACAGTTAGTTTATATCAAAAAGAAGAAAGGTATTAACGGAGCTAAAACTG
TTATATACCACATGAAAGAAGTTGATAATGTGAAAACACCATGCTCATAAAGATTGTAATTCAAATAAC
AAATGCCCACAGGAGTAAAGAGCTGTCTTTCCCAAGTTAAGGTATTATAAATTGGCGGAACGAAGTAAC
ACATGTTTGACATCTCCACACGGTGCACAGATCAAATATGCCATGAGCACCAGTCCAGAAGTTTTCCAA
CTATTTATATACTATCCATGCAACCATATAAATTATCAAACATAC

SEQ.I.D. No. 17

内含子3的反义序列

(504 bp).

CTGCAAAAAAAGAGAGCAGTTTACACAAGAAAAAAGTCTAAATCTCAACAAAAGTATCATGAATTTAA
TATTAAGGAAGCTATTTGGAACAGAAAGAGTAACTCATGATAATAGAAGGAAATTGTGAAGCAACAGAA
GGAAGACTTTCTTTATTTCTACAAAATTGCTTTAAGACTATATTTGATGCTTGTATAGTACATGTTGAA
TCCCCTCAGCTTCTTTATGTCTATACTTTTTTTATATTTTGAATCTCCTTAGTGAAAACTTTTGCTTTG
CCACTGACACTCCGGGGGTGTGTCACTTCTCCAAAAACCTTGCTACTTTTTTTGAAGACCCAATCAAAC
AGCTTTTTTAAAGATCAAAAAAATGGCCAGGTGCCACCTAAATGGAGCCACTACTTACTCCCCGGTATG
CAAAATTCTCTAGCAAAAGTCAAAGTAGGTATAACAATTATCTTCCAAAATAAGGTCAAAGTGCCTAA
AGCACAACTTTTGGCTGTTAC

SEQ.I.D. No. 18

内含子4的反义序列

(146 bp).

CTGCATTGTGGATGAGTTAATTAGAAGCATAACCTTAATAGCAATTAGAACATGTAAGAAAGCCAATGA
TGCTGCAACATCATGCTTTAATAGGAAAATCTGTTATGATGATGGAACTACTATTTTGTAGTAGACGA
GGACCTAC

SEQ.I.D. No. 19

内含子5的反义序列

(218 bp).

CTGTTTAATTGCTGAAGTAGTAAGTTCTCAAGCACTTATAGAATTGACTCATTTTGTAAAGGGAAAGAG
TATGGGATCAAGTCCAAATTAGTAAAGACACAATTATTTTAACTTTTGCATTTCAAATGTCTTACATA
ACAAGACTAGTAAGAACATGAATCGAAATGCCTGTGATGATGGTGTTCAAAATTCAGCTTCAAGGTATG
AATAACAAAAC

SEQ.I.D. No. 20

内含子6的反义序列

(198 bp).

CTGTATCCAGCAGACATAATAGGAGTGAACATAAAAATGTCACTGGATAAACTTATCATGATATTC
AGCGGCTACCAATATTCTGAAGGCCCATGGCGAAAATAAGTACTTTTATACTTTCAGGACGTATATATT
TGGATTCTATCTAACAATTGTTCTGAGAATTATTTAGTTGTAGAAATAAATTTAAAATAC

SEQ.I.D. No. 21

内含子7的反义序列

(208 bp).

CTGTGGTTAGAAGCTAAAAGTGAATAGATGAGAAAAATTACCTCCAAATAAGAGGGATATTGAAAAAGA
AACACAATGCATGAAAAGAATAAACAAATGATAAACGAGAAAATTGAATAATCCATCAGAACCCTGGTT
ACCTCACAAAGAGTGAGATTTTCCGTGGCTAACCTATATGAACCTTAAAATGCAATAGAAACAGACAAAAC

SEQ.I.D. No. 22

内含子8的反义序列

(293 bp).

CTGTACAAGTTCATCAAACATTTTACAATTACTCCAAAACAGACACACTTGCAAACCTCTATACAGTAAT
CTTCTATACTACAAAAAGTAAACAATGTTTTTTTTTAAGATGACATTTGTTCTCAGCAACATAATAGAA
ATCCCTAGACAATGGAAACATTCATCATGTTGTTTTCTCTATGTTTCAACCCCTTTGATGTTCAACAG
TTCAGGTCAATTTGAGGAATGAATCTTGTTCAAGTAAGCCAACTAATTGTAATTATCACAAAATATCT
AAAGATGTAAGACATAC

SEQ.I.D. No. 23

内含子9的反义序列

(376 bp).

CTGCATTTTCATCATGAGGGGGAGGAAAGACGGAGAAATATAGATATCAGATTTAGACCATTTCAATTAG
TATCACTTCATTGTAAAGAAAAGGTAAGTATCCAACAAATATAGCAGGCTGTGGATTGGTAGCCTGAAA
CTATAGCTTCAAAGAATCAACTTAAGCTGCTCATCAAGGCCTTAGTGGTAGAAATGAGGCGGTAATAAG
TGTAATGAATCTAATACTTGGATCTCGAAACAAAAATCAGAAATTCGGTTGGAAAATAAGTAGAACAA

GATGAAATGAGCTATCATCCCCAGAACCAAGTAGACTTCCAAGTAAGCAATCTAAAAATTACTAGATTA
TTTAACAAGCTGCGATTCAAAATACTTGAAC

SEQ.I.D. No. 24

内含子10的反义序列

(172 bp).

CTGCAAAGTGAAGTAACTAATCAGTACAGCTATTACCGAATTTGACCAGCTATTGGATTAAATAATATG
AAATCCATCATCAAGAAATGGAAGGTAAAAAGGTTTCTACTTGTCTTGGATAGAATTAAAGCACTTCA
TAAACCAACACTTTCACTTTAGATGATTTTAC

SEQ.I.D. No. 25

内含子11的反义序列

(145 bp).

CTGTTTTCGTCATGCGAGGATCAGAAAAAGAGTTAAATTAGACAATGTGAAAATGATTTGTTTCAGTT
ACTTCTCCATAAACTTGTTTCAGTACATTAAAAACAAGCAGAGCAATAATTTTCATGGATAAGTAAACA
TATATAC

SEQ.I.D. No. 26

内含子12的反义序列

(242 bp).

CTGTCATGAGAACAGATTGTATGTCAGCATGAAGACAAAGATCATCAATAAACAGTTTTCTCCTTTTTG
AATTAGCTAAACAACGCAGGGGGAGGGCAGGAGGCTCAAACACTTCCGAACTCAGACAGTCGGATATCT
TATACAACATAAGATGGATGAGACAATTACAGTTCTTTTTGGTGAGAGAACTGTACCCTACATCTGTTA
TCTTATTATCAAAAGTTATTCAAGCAAATCCTTAC

SEQ.I.D. No. 27

内含子13的反义序列

(797 bp).

CTTCACAAACAAGGAGAAGAAGAAGCAAAAAGAAAGATGAATATAGTTAGCTTAGTTCAATATAAAAAA
TTTCTCTCCAAGCTATTTTTCTGCTAGCAAAATTCATTAGTTATTTAACTTTTCTATACATAAAGCTGC
ACAAAGAAATAGTAGTACATTTTTTTGACTTGCACAAAATAACTGTGTTGTCCATTTTCTGACATGTGT
TCATCTACATGCACTGTTTCAACAACAACACTACTTCAGTCCCAACAAGTTGGGTCGCTTTAGCTAC
ACATGTTGCTTTCACTTCTGTTACTTCTTTTTGGACTTTTTTTCTTGAGCCAAGGGTCTATTGAAAAAA
TCCTCTCTACCTCTGAGATAGGAGTAAGTTTTGCATACACTCTACCCTCCCCCTGAAACCACCTTTGTGG
GACTACACGAGGTATGTTGTTGTTGATGTTAGCGCAGACACCAAAGGTGGACATTATATGACTATTCCCT
AGCTTTACTTCAGGGCGGTTTTAAGTTCCCATCAACTTCATTTTTGATCATTTACCTAAGTTTATGCAG
GTGCAAGCTACATGCACTGGTTTTAGGGAAAAAGAGGATAGAGAAGAATTTTTTGGCATCCTTTTGTTT
TGTAACAGTAAGATGCCAAAAGTAGACCTTATTACGGCTATTCTACCTTTCAAATTAGTAGTTCAGAG
GACTTAACTGGCGATTGTGGCGGTAATCAATAGTTAACTTCTATCGCATTCAAATAACTATGAACAAAA
CCACAATAAAAAGGGAGGTCACACGGCAAGAACTGTAC

SEQ.I.D. No. 28

SBE基因启动子区的反义DNA序列

CGAATGGGTTTTGATAAACTTTGAAATTAATTTCCATTGATTAAATTATGGTACTTTGC	60
TTCAGCTGCTGCCTTCTTGTATGTTCTGATTCTTGATTTCTCATTTTAGTGGCTTTT	120
TAAAAAACATTATGACCCTTTTGTTAGTCCTCCCCTTTCTGAATATTTCACTCAGACCC	180
CATTAGTTTCGAAATTGAAGTAAACATATTTTTTTTAGTATTGTAGTTTTTTTATATTT	240
CTACTTACTTACTCGTTATACAATTTCTATTTAGGTAATCTAATCGACTTTTTGTATACA	300
TAATACATGTATTTTTGGTAAAGAGTTTTTTACTTTCTCCTAGTGGTAAGGCAGATATAG	360
TTAAGGATTTATTGACCTAATATGAACGCCAATAATTTTATATTTTGTATATACGTATAT	420
TTAAAAGTTTACTAGATATGTATAAATAAGATATTTAAAATTTAATTATAAATACAAATG	480
ATTATGGTAAAATTTTGACCTCAAATTTAAAATATTTAAAATCAAGATTTGTCACTACTT	540
ATATATATCTTGTTGTAAATCCCTTTTAATCAAGTTGTGAGTTTACAAATATTCGTTGGT	600
TAGGCTAAAAAAATAAGCTATAAAGATCAAGTATAAAATTATGCATTTTCTGCATTTAA	660
TTTGGA AAAATATGTTGGAGCAATCTAAAATTGTTTGTGATTTATAAATAAGTCGTTTT	720
TTGTTTTTAATAATTGATAAACTATTTATTCTGCTTAAAGTTTTAGAATGTCAAAAAATA	780
ATTTATTTTAATGACCTTAAATGATTGAATAAGATGTAGACACACTCAATTACAAAGTTA	840
CAATATTAATACACTTGTCTATTGGGTGATGATTATATCATCTAATATAAATAACATGT	900
CAAATTAAAGCTTCTTATAAAGTTTCATAGGAAC TAAGATAAACTTTGTGAATGGCCAAGC	960
ATTTTTTCAGAACATCATGGGTGGTATGACAATCAAATTGAAC TTATGGGATGAAAAATGA	1020
ATATCATTCAACTAAGAGGGCACAACCTTGACATGTTAGAAAGTAAAGCAAATTTAGTAGT	1080
GGGCCAAATAAAAGAAATTAATTTGTCAAGTTTATTCTTAAACTTTACCTTCTTTGAACTT	1140
CCACGTTATCAAAGGTTCCACGTTTCATATGAAGGCCATGTGTATCCTTTTTTAATTTTGGT	1200
ATTCGCTGTTCAATATCGATTAATTTAAATTCGCATGACAAAATCCTATATTAAAGTATA	1260
AAGTATTTTCTAAAACAGACAAGTTCAATACTTTAATTTTACACTGAATGCATAAATTTA	1320
CACTATAATAATTCAGTCGCAGTCTACATTACAATAATTAACAATTTTAGCATGAAATG	1380
AAAACTTTAAATTATATGCCATCAAATCACTTAAAGTATACATTTTTTTAATAACTAGT	1440
TCTAATCCCACTTGAAATGAGAGTTATTTTAATATCGACCGTTAATTACCATTTTATTAT	1500
TAAATCTGCAACTACAGTCAACTACACCAATGATTTTGCTGATGCCAACTCATAATATAA	1560
TATCCACCGTTCATGTGATTAATTCATATTTTCATATACGTACGTAACAAAAATTACTAA	1620
ATTAACGTTGGATATACCATACCCTAAGCTCTGCCAAATGTCAATGTTCTATCATTAGCT	1680
ATTTTTATGCATCTATAATAGATGTTAAATTCATATTCTAAGATTGAAC TTAATCATAAA	1740
CTCAAAATTTGTGGTACCTGTCAATGCCTCCAAAAGTTGATTGAACATAAACGTTAAGAT	1800
CTGTGTACTTGTCTTTTCTTGTAAATAATGTATGTATGATAATAATAAGAGAACAAA	1860
ATATGGCAAAATAAACACTTTTTTAACATGTAAC TCAAAACAAGTAATAGGCAAAAGTAC	1920
AGATGACAACACAACACTGTAAACATCATTGAGGAAAAACAAAACCATACAACATTTTGA	1980
CTGTAAATGAAGAGTTTGAAAACAAAACACTATGTTCAAACCGACGCCAAGCTAACGAAAA	2040
TAGCCATAGAGTTCTAAGAAGCAGATGCAACAGTTCCACGGGTTAGTATCGTCTGTAGTA	2100
GGACCGGTCATGAGAACTCGAAAGAATCTGAAAGGAAGTAATGCATTTGAACCAGTAATT	2160
GGCCATGAT	

SEQ.I.D. No. 29

基因组SBE基因

ATCATGGCCA	ATTACTGGTT	CAAATGCATT	ACTTCCTTTC	AGATTCTTTC	GAGTTCTCAT	60
GACCGGTCCT	ACTACAGACG	ATACTAACCC	GTGGAACGTG	TGCATCTGCT	TCTTAGAACT	120
CTATGGCTAT	TTTCGTTAGC	TTGGCGTCGG	TTTGAACATA	GTTTTTGTTT	TCAAACCTCT	180
CATTTACAGT	CAAAATGTTG	TATGGTTTTT	GTTTTTCCTCA	ATGATGTTTA	CAGTGTTGTG	240
TTGTCATCTG	TACTTTTGCC	TATTACTTGT	TTTGAGTTAC	ATGTTAAAAA	AGTGTTTATT	300
TTGCCATATT	TTGTTCTCTT	ATTATTATTA	TCATACATAC	ATTATTACAA	GGAAAAGACA	360
AGTACACAGA	TCTTAACGTT	TATGTTCAAT	CAACTTTTGG	AGGCATTGAC	AGGTACCACA	420
AATTTTGAGT	TTATGATTAA	GTTCAATCTT	AGAATATGAA	TTTAACATCT	ATTATAGATG	480
CATAAAAATA	GCTAATGATA	GAACATTGAC	ATTTGGCAGA	GCTTAGGGTA	TGGTATATCC	540
AACGTTAATT	TAGTAATTTT	TGTTACGTAC	GTATATGAAA	TATTGAATTA	ATCACATGAA	600
CGGTGGATAT	TATATTATGA	GTTGGCATCA	GCAAAATCAT	TGGTGTAGTT	GACTGTAGTT	660
GCAGATTTAA	TAATAAAATG	GTAATTAACG	GTCGATATTA	AAATAACTCT	CATTTCAAGT	720
GGGATTAGAA	CTAGTTATTA	AAAAAATGTA	TACTTTAAGT	GATTTGATGG	CATATAATTT	780
AAAGTTTTTC	ATTTTCATGCT	AAAATTGTTA	ATTATTGTAA	TGTAGACTGC	GACTGGAATT	840
ATTATAGTGT	AAATTTATGC	ATTCAGTGTA	AAATTAAAGT	ATTGAACCTG	TCTGTTTTAG	900
AAAATACTTT	ATACTTTAAT	ATAGGATTTT	GTCATGCGAA	TTTAAATTAA	TCGATATTGA	960
ACACGGAATA	CCAAAATTAA	AAAGGATACA	CATGGCCTTC	ATATGAACCG	TGAACCTTTG	1020
ATAACGTGGA	AGTTCAAAGA	AGGTAAAGTT	TAAGAATAAA	CTGACAAATT	AATTTCTTTT	1080
ATTTGGCCCA	CTACTAAATT	TGCTTTACTT	TCTAACATGT	CAAGTTGTGC	CCTCTTAGTT	1140
GAATGATATT	CATTTTTTCAT	CCCATAAGTT	CAATTTGATT	GTCATACCAC	CCATGATGTT	1200
CTGAAAAATG	CTTGCCATT	CACAAAGTTT	ATCTTAGTTC	CTATGAACCT	TATAAGAAGC	1260
TTTAATTTGA	CATGTTATTT	ATATTAGATG	ATATAATCCA	TGACCCAATA	GACAAGTGTA	1320
TTAATATTGT	AACTTTGTA	TTGAGTGTGT	CTACATCTTA	TTCAATCATT	TAAGGTCATT	1380
AAAATAAATT	ATTTTTTGAC	ATTCTAAAC	TTTAAGCAGA	ATAAATAGTT	TATCAATTAT	1440
TAAAAACAAA	AAACGACTTA	TTTATAAATC	AACAAACAAT	TTTAGATTGC	TCCAACATAT	1500
TTTTCCAAAT	TAAATGCAGA	AAATGCATAA	TTTTATACTT	GATCTTTATA	GCTTATTTTT	1560
TTTAGCCTAA	CCAACGAATA	TTTGTAAGT	CACAACTTGA	TTAAAAGGGA	TTTACAACAA	1620
GATATATATA	AGTAGTGACA	AATCTTGATT	TTAAATATTT	TAATTTGGAG	GTCAAAATTT	1680
TACCATAATC	ATTTGTATTT	ATAATTAAAT	TTTAAATATC	TTATTTATAC	ATATCTAGTA	1740
AACTTTTAAA	TATACGTATA	TACAAAATAT	AAAATTATTG	GCGTTCATAT	TAGGTCAATA	1800
AATCCTTAAC	TATATCTGCC	TTACCACTAG	GAGAAAGTAA	AAAACCTCTT	ACCAAAAATA	1860
CATGTATTAT	GTATACAAAA	AGTCGATTAG	ATTACCTAAA	TAGAAATTGT	ATAACGAGTA	1920
AGTAAGTAGA	AATATAAAAA	AACTACAATA	CTAAAAAATA	TATGTTTTAC	TTCAATTTTCG	1980
AAACTAATGG	GGTCTGAGTG	AAATATTCAG	AAAGGGGAGG	ACTAACAAAA	GGGTCATAAT	2040
GTTTTTTTAT	AAAAAGCCAC	TAAAATGAGG	AAATCAAGAA	TCAGAACATA	CAAGAAGGCA	2100
GCAGCTGAAG	CAAGTACCA	TAATTTAATC	AATGGAAATT	AATTTCAAAG	TTTTATCAAA	2160
ACCCATTCTGA	GGATCTTTTC	CATCTTTCTC	ACCTAAAGTT	TCTTCAGGGG	TAATTTTTTAC	2220
TAATTTTCATG	TTAATTTCAA	TTATTTTTAG	CCTTTGCATT	TCATTTTCCA	ATATATCTGG	2280
ATCATCTCCT	TAGTTTTTTA	TTTTATTTTT	TATAATATCA	AATATGGAAG	AAAAATGACA	2340
CTTGTAAGAGC	CATATGTAAG	TATCATGTGA	CAAATTTGCA	AGGTGGTTGA	GTGTATAAAA	2400
TTCAAAAATT	GAGAGATGGA	GGGGGGGTGG	GGGBARAGAC	AATATTTAGA	AAGAGTGTTC	2460
TAGGAGGTTA	TGGAGGACAC	GGATGAGGGG	TAGAAGGTTA	GTTAGGTATT	TGAGTGTGTG	2520

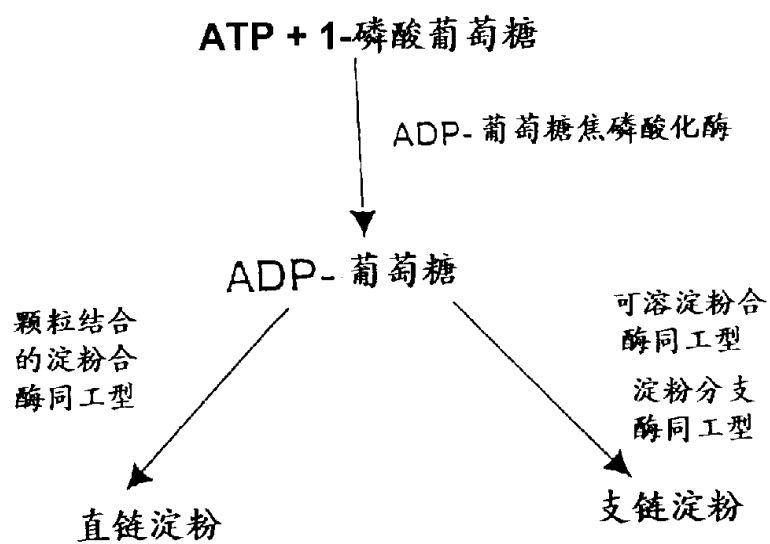
CTGGCTTATC	CTTTCATACT	AGTAGTCGTG	GAATTATTTG	GGTAGTTTCT	TGTTTTGTTA	2580
TTTGATCTTT	GTTATTCTAT	TTTCTGTTTC	TTGTACTTCG	ATTATTGTAT	TATATATCTT	2640
GTCGTAGTTA	TTGTTCCCTG	GTAAGAATGC	TCTAGCATGC	TTCTTTTAGT	GTTTTATCAT	2700
GCCTTCTTTA	TATTCGCGTT	GCTTTGAAAT	GCTTTTACTT	TAGCCGAGGG	TCTATTAGAA	2760
ACAATCTCTC	TATCTCGTAA	GGTAGGGGTA	AAGTCCTCAC	CACACTCCAC	TTGTGGGATT	2820
ACATTGTGTT	TGTTGTTGTA	AATCAATTAT	GTATACATAA	TAAGTGGATT	TTTTACAACA	2880
CAAATACATG	GTCAAGGGCA	AAGTTCTGAA	CACATAAAGG	GTTCAATTATA	TGTCCAGGGA	2940
TATGATAAAA	ATTGTTTTCTT	TGTGAAAGTT	ATATAAGATT	TGTTATGGCT	TTTGCTGGAA	3000
ACATAATAAG	TTATAATGCT	GAGATAGCTA	CTGAAGTTTG	TTTTTTCTAG	CCTTTTAAAT	3060
GTACCAATAA	TAGATTCCGT	ATCGAACGAG	TATGTTTTGA	TTACCTGGTC	ATGATGTTTC	3120
TATTTTTTTAC	ATTTTTTTTGG	IGTTGAACTG	CAATTGAAAA	TGTTGTATCC	TATGAGACGG	3180
ATAGTTGAGA	ATGTGTTCTT	TGTATGGACC	TTGAGAAGCT	CAAACGCTAC	TCCAATAATT	3240
TCTATGAATT	CAAATTCAGT	TTATGGCTAC	CAGTCAGTCC	AGAAATTAGG	ATATGCTGCA	3300
TATACTTGTT	CAATTATACT	GTAAAATTTT	TTAAGTTCTC	AAGATATCCA	TGTAACCTCG	3360
AGAATTTCTT	TGACAGGCTT	CTAGAAATAA	GATATGTTTT	CCTTCTCAAC	ATAGTACTGG	3420
ACTGAAGTTT	GGATCTCAGG	AACGGTCTTG	GGATATTTCT	TCCACCCCAA	AATCAAGAGT	3480
TAGAAAAGAT	GAAAGGGTAT	GTTTGATAAT	TTATATGGTT	GCATGGATAG	TATATAAATA	3540
GTTGGAAAAC	TTCTGGACTG	GTGCTCATGG	CATATTTGAT	CTGTGCACCG	TGTGGAGATG	3600
TCAAACATGT	GTTACTTCGT	TCCGCCAATT	TATAATACCT	TAACTTGGGA	AAGACAGCTC	3660
TTTACTCCTG	TGGGCATTTG	TTATTTGAAT	TACAATCTTT	ATGAGCATGG	TGTTTTCACA	3720
TTATCAACTT	CTTTCATGTG	GTATATAACA	GTTTTTAGCT	CCGTTAATAC	CTTTCCTCTT	3780
TTTGATATAA	ACTAACTGTG	GTGCATTGCT	TGCBKKKATG	AAGCACAGTT	CAGCTATTTT	3840
CGCTGTTTTG	ACCGATGACG	ACAATTCGAC	AATGGCACCC	CTAGAGGAAG	ATGTCAAGAC	3900
TGAAAATATT	GGCCTCCTAA	ATTTGGATCC	AACTTTGGA	CCTTATCTAG	ATCACTTCAG	3960
ACACAGAATG	AAGAGATATG	TGGATCAGAA	AATGCTCATT	GAAAAATATG	AGGGACCCCT	4020
TGAGGAATTT	GCTCAAGGTA	ACAGCCAAAA	GTTGTGCTTT	AGGCAGTTTG	ACCTTATTTT	4080
GGAAGATGAA	TTGTTTATAC	CTACTTTGAC	TTTGCTAGAG	AATTTTGCAT	ACCGGGGAGT	4140
AAGTAGTGCC	TCCATTTAGG	TGGCACCTGG	CCATTTTTTT	GATCTTTTAA	AAAGCTGTTT	4200
GATTGGGTCT	TCAAAAAGT	AGACAAGGTT	TTTGGAGAAG	TGACACACCC	CCGGAGTGTC	4260
AGTGGCAAAG	CAAAGATTTT	CACTAAGGAG	ATTCAAAATA	TAAAAAAAGT	ATAGACATAA	4320
AGAAGCTGAG	GGGATTCAAC	ATGTACTATA	CAAGCATCAA	ATATAGTCTT	AAAGCAATTT	4380
TGTAGAAATA	AAGAAAGTCT	TCCTTCTGTT	GCTTCACAAT	TTCTTCTAT	TATCATGAGT	4440
TACTCTTTCT	GTTGAAATA	GCTTCCTTAA	TATTAAATTC	ATGATACTTT	TGTTGAGATT	4500
TAGCAGTTTT	TTCTTGTTGA	AACTGCTCTC	TTTTTTTGCA	GGTTATTTAA	AATTTGGATT	4560
CAACAGGGAA	GATGGTTGCA	TAGTCTATCG	TGAATGGGCT	CCTGCTGCTC	AGTAGGTCCT	4620
CGTCTACTAC	AAAATAGTAG	TTTCCATCAT	CATAACAGAT	TTTCCTATTA	AAGCATGATG	4680
TTGCAGCATC	ATTGGCTTTT	TTACATGTTT	TAATTGCTAT	TAAGGTTATG	CTTCTAATTA	4740
ACTCATCCAC	AATGCAGGGA	AGCAGAAGTT	ATTGGCGATT	TCAATGGATG	GAACGGTTCT	4800
AACCACATGA	TGGAGAAGGA	CCAGTTTGGT	GTTTGAGATA	TTAGAATTCC	TGATGTTGAC	4860
AGTAAGCCAG	TCATTCCACA	CAACTCCAGA	GTTAAGTTTC	GTTTCAAACA	TGGTAATGGA	4920
GTGTGGGTAG	ATCGTATCCG	TGCTTGATA	AAGTATGCCA	CTGCAGACGC	CACAAAGTTT	4980
GCAGCACCAT	ATGATGGTGT	CTACTGGGAC	CCACCACCTT	CAGAAAGGTT	TTGTTATTCA	5040
TACCTTGAAG	CTGAATTTTG	AACACCATCA	TCACAGGCAT	TTCGATTTCAT	GTTCTTACTA	5100
GTCTTGTTAT	GTAAGACATT	TTGAAATGCA	AAAGTTAAAA	TAATTGTGTC	TTTACTAATT	5160
TGGACTTGAT	CCCATACTCT	TTCCCTTAAC	AAAATGAGTC	AATTCTATAA	GTGCTTGAGA	5220

ACTTACTACT TCAGCAATTA AACAGGTACC ACTTCAAATA CCCTCGCCCT CCCAAACCCC	5280
GAGCCCCACG AATCTATGAA GCACATGTCT GCATGAGCAG CTCTGAGCCA CGTGTAAATT	5340
CGTATCGTGA GTTTGCAGAT GATGTTTTAC CTCGGATTAA GGCAAATAAC TATAATACTG	5400
TCCAGTTGAT GGCCATAATG GAACATTCTT ACTATGGATC ATTTGGATAT CATGTTACAA	5460
ACTTTTTTGC TGTGAGCAGT AGATATGGAA ACCCGGAGGA CCTAAAGTAT CTGATAGATA	5520
AAGCACATAG CTTGGGTTTA CAGGTTCTGG TGGATGTAGT TCACAGTCAT GCAAGCAATA	5580
ATGCTACTGA TGGCCTCAAT GGCTTTGATA TTGGCCAAGG TTCTCAAGAA TCCTACTTTC	5640
ATGCTGGAGA GCGAGGGTAC CATAAGTTGT GGGATAGCAG GCTGTTCAAC TATGCCAATT	5700
GGGAGGTTCT TCGTTTCCTT CTTTCCAAC TGGAGTGGTG GCTAGAAGAG TATAACTTTG	5760
ACGGATTTCTG ATTTGATGGA ATAAC TTCTA TGCTGTATGT TCATCATGGA ATCAATATGG	5820
GATTTACAGG AAACATAAT GAGTATTTCA GCGAGGCTAC AGATGTTGAT GCTGTGGTCT	5880
ATTTAATGTT GGCCAATAAT CTGATTCACA AGATTTTCCC AGATGCAACT GTTATTGCCG	5940
AAGATGTTTC TGGTATGCCG GGCCTTGGCC GGCCTGTTTC TGAGGGAGGA ATTGGTTTTG	6000
TTTACCGCCT GGCAATGGCA ATCCCAGATA AGTGGATAGA TTATTTAAAG AATAAGAATG	6060
ATGAAGATTG GTCCATGAAG GAAGTAACAT CGAGTTTGAC AAATAGGAGA TATACAGAGA	6120
AGTGTATAGC ATATGCGGAG ACCCATGATC AGGTATTTTA AATTTATTTT TACAATAAA	6180
TAATTCTCAG AACAAATTGT AGATAGAATC CAAATATATA CGTCCTGAAA GTATAAAAGT	6240
ACTTATTTTC GCCATGGGCC TTCAGAAATAT TGGTAGCCCG TGAATATCAT GATAAGTTAT	6300
TTATCCAGTG ACATTTTTAT GTTCACTCCT ATTATGTCTG CTGGATACAG TCTATTGTTG	6360
GTGACAAGAC CATTGCATTT CTCCTAATGG ACAAAGAGAT GTATTCTGGC ATGTCTTGCT	6420
TGACAGATGC TTCTCCTGTT GTTGATCGAG GAATTGCGCT TCACAAGGTT TGTCTGTTTC	6480
TATTGCATTT TAAGGTTTAT ATAGGTTAGC CACGGAAAAT CTCACTCTTT GTGAGGTAAC	6540
CAGGGTTCTG ATGGATTATT CAATTTTCTC GTTTATCATT TGTTTATTCT TTTCATGCAT	6600
TGTGTTTCTT TTTCAATATC CCTCTTATTT GGAGGTAATT TTTCTCATCT ATTCACTTTT	6660
AGCTTCTAAC CACAGATGAT CCATTTTTTC ACAATGGCCT TGGGAGGAGA GGGGTACCTC	6720
AATTTTCATGG GTAACGAGGT ATGTCTTACA TCTTTAGATA TTTTGTGATA ATTACAATTA	6780
GTTTGGCTTA CTTGAACAAG ATTCATTCCT CAAAATGACC TGAAGTGTG AACATCAAAG	6840
GGGTTGAAAC ATAGAGGAAA ACAACATGAT GAATGTTTCC ATTGTCTAGG GATTTCTATT	6900
ATGTTGCTGA GAACAAATGT CATCTTAAAA AAAACATTGT TTACTTTTTT GTAGTATAGA	6960
AGATTACTGT ATAGAGTTTG CAAGTGTGTC TGTTTTGGAG TAATTGTGAA ATGTTTGATG	7020
AACTTGATCA GTTTGGCCAT CCTGAGTGGA TTGACTTCCC TAGAGAGGGC AATAATTGGA	7080
GTTATGACAA ATGTAGACGC CAGTGGAAAC TCGCGGATAG CGAACACTTG AGATACAAGG	7140
TTCAAGTATT TTGAATCGCA GCTTGTTAAA TAATCTAGTA ATTTTATAGT TGCTTACTTG	7200
GAAGTCTACT TGGTCTGGG GATGATAGCT CATTTCATCT TGTTCTACTT ATTTTCCAAC	7260
CGAATTTCTG ATTTTGTGTT CGAGATCCAA GTATTAGATT CATTACACT TATTACCGCC	7320
TCATTTCTAC CACTAAGGCC TTGATGAGCA GCTTAAGTTG ATCTTTTGAA GCTATAGTTT	7380
CAGGCTACCA ATCCACAGCC TGCTATATTT GTTGGATACT TACCTTTTCT TTACAATGAA	7440
GTGATACTAA TTGAAATGGT CTAAATCTGA TATCTATATT TCTCCGTCTT TCCTCCCCCT	7500
CATGATGAAA TGCAGTTTAT GAATGCATTT GATAGAGCTA TGAATTCGCT CGATGAAAAG	7560
TTCTCATTCC TCGCATCAGG AAAACAGATA GTAAGCAGCA TGGATGATGA TAATAAGGTA	7620
AAATCATCTA AAGTTGAAAG TGTTGGGTTT ATGAAGTGCT TTAATTCTAT CCAAGGACAA	7680
GTAGAAACCT TTTTACCTTC CATTTCTTGA TGATGGATTT CATATTATTT AATCCAATAG	7740
CTGGTCAAAT TCGGTAAATAG CTGTACTGAT TAGTTACTTC ACTTTGCAGG TTGTTGTGTT	7800
TGAACGTGGT GACCTGGTAT TTGTATTCAA CTTCCACCCA AAGAACACAT ACGAAGGGTA	7860
TATATGTTTT ACTTATCCAT GAAATTATTG CTCTGCTTGT TTTTAATGTA CTGAACAAGT	7920

TTTATGGAGA	AGTAACTGAA	ACAAATCATT	TTCACATTGT	CTAATTTAAC	TCTTTTTTCT	7980
GATCCTCGCA	TGACGAAAAC	AGGTATAAAG	TTGGATGTGA	CTTGCCAGGG	AAGTACAGAG	8040
TTGCACTGGA	CAGTGATGCT	TGGGAATTTG	GTGGCCATGG	AAGAGTAAGG	ATTTGCTTGA	8100
ATAACTTTTG	ATAATAAGAT	AACAGATGTA	GGGTACAGTT	CTCTCACCAA	AAAGAACTGT	8160
AATTGTCTCA	TCCATCTTTA	GTTGTATAAG	ATATCCGACT	GTCTGAGTTC	GGAAGTGTTC	8220
GAGCCTCCTG	CCCTCCCCCT	GCGTTGTTTA	GCTAATTCAA	AAAGGAGAAA	ACTGTTTATT	8280
GATGATCTTT	GTCTTCATGC	TGACATACAA	TCTGTTCTCA	TGACAGACTG	GTCATGATGT	8340
TGACCATTTC	ACATCACCAG	AAGGAATACC	TGGAGTTCCA	GAAACAAATT	TCAATGGTCG	8400
TCCAAATTCC	TTCAAAGTGC	TGTCTCCTGC	GCGAACATGT	GTGGTACAGT	TCTTGCCGTG	8460
TGACCTCCCT	TTTTATTGTG	GTTTTGTTCA	TAGTTATTTG	AATGCGATAG	AAGTTAACTA	8520
TTGATTACCG	CCACAATCGC	CAGTTAAGTC	CTCTGAACTA	CTAATTTGAA	AGGTAGGAAT	8580
AGCCGTAATA	AGGTCTACTT	TTGGCATCTT	ACTGTTACAA	AACAAAAGGA	TGCCAAAAAA	8640
ATTCTTCTCT	ATCCTCTTTT	TCCCTAAACC	AGTGCATGTA	GCTTGACACT	GCATAAACTT	8700
AGGTAAATGA	TCAAAAATGA	AGTTGATGGG	AACTTAAAAAC	CGCCCTGAAG	TAAAGCTAGG	8760
AATAGTCATA	TAATGTCCAC	CTTGGTGTGC	TGCGCTAACA	TCAACAACAA	CATACCTCGT	8820
GTAGTCCCAC	AAAGTGGTTT	CAGGGGGAGG	GTAGAGTGTA	TGCAAAACTT	ACTCCTATCT	8880
CAGAGGTAGA	GAGGATTTTT	TCAATAGACC	CTTGCTCAA	GAAAAAAAGT	CCAAAAAGAA	8940
GTAACAGAAG	TGAAAGCAAC	ATGTGTAGCT	AAAGCGACCC	AACTTGTTTG	GGACTGAAGT	9000
AGTTGTTGTT	GTTGAAACAG	TGCATGTAGA	TGAACACATG	TCAGAAAATG	GACAACACAG	9060
TTATTTTGTG	CAAGTCAAAA	AAATGTACTA	CTATTTCTTT	GTGCAGCTTT	ATGTATAGAA	9120
AAGTTAAATA	ACTAATGAAT	TTTGCTAGCA	GAAAAATAGC	TTGGAGAGAA	ATTTTTTATA	9180
TTGAACTAAG	CTAACTATAT	TCATCTTTCT	TTTTGCTTCT	TCTTCTCCTT	GTTTGTGAAG	9240
GCTTATTACA	GAGTTGATGA	ACGCATGTCA	GAAACTGAAG	ATTACCAGAC	AGACATTTGT	9300
AGTGAGCTAC	TACCAACAGC	CAATATCGAG	GAGAGTGACG	AGAAACTTAA	AGATTTCGTTA	9360
TCTACAAATA	TCAGTAACAT	TGACGAACGC	ATGTCAGAAA	CTGAAGTTTA	CCAGACAGAC	9420
ATTTCTAGTG	AGCTACTACC	AACAGCCAAT	ATTGAGGAGA	GTGACGAGAA	ACTTAAAGAT	9480
TCGTTATCTA	CAAAATATCAG	TAACATTGAT	CAGACTGTTG	TAGTTTCTGT	TGAGGAGAGA	9540
GACAAGGAAC	TTAAAGATTC	ACCGTCTGTA	AGCATCATTA	GTGATGTTGT	TCCAGCTGAA	9600
TGGGATGATT	CAGATGCAAA	CGTCTGGGGT	GAGGACTAGT	CAGATGATTG	ATCGACCCTT	9660
CTACCGATTG	GTGATCGCTA	TCCTTGCTCT	CTGAGAAATA	GGTGAGGCGA	AACAAAAAAT	9720
AATTTGCATG	ATAAAAAGTC	TGATTTTATG	ATCGCTATCC	TCGCTCTCTG	AGAAAGAAGC	9780
GAAACAAAGG	CGACTCCTGG	ACTCGAATCT	ATAAGATAAC	AAAGGCGACT	CCTGGGACTC	9840
GAATCTATAA	GATAACAAAG	GCAATTCCAA	GACTTGAATC	TATAAAAAAT	TTAGTTAAGA	9900
ATGATTAACG	TCCGATCCTA	ATTCGAATCG	AGGCATCTTA	CCACTCCATT	GATAATTATA	9960
TAAGTCAATA	AGTCATATAA	WAGTATTAAA	AACTAAATTG	ACTTGATCGG	TCTATCAAAA	10020
ATMAGATMAA	ATTGTGTTCA	TATGTAACAT	TTTTGTTGTC	ACAATTAGCT	TAATTACATC	10080
TTTCATGTGC	AATAACAAAG	AAATGATAGG	AATTTAGAGA	TTCCAATTTT	TTTGTTGCCA	10140
CAATTAACCT	AATTACATCT	TTCATTTGCA	ATAACAAAGA	AATGATAGGA	ATTTAGAGAT	10200
CCAGTGTCAA	TACACAACCT	AGGCCAACAT	CGAAAGCATA	ACTGTAAACT	CATGCATGAA	10260
GAAATCAGTC	GTA AAAATGA	ATAAATGCGA	CATAAAAACA	AATTGCATGT	ATCATTAAATG	10320
TGACTTAACT	ACAAGTAAAA	ATAAATTTAA	CAAATGTAAAC	TTAACTACAA	GTA AAAATAA	10380
ATTGCTTCTA	TCATTAAACAA	ACAAACAGAA	TTAAAAAGAA	AAAAACATAC	TAAATCTTAC	10440
CGTCATTTCGA	TAAAAA AAAA	TACCAAATTC	ATAATGCAAG	GAAAACGAAA	CGCGTCCTGA	10500
TCGGGTATCA	ACGATGAAAT	GGACCAGTTG	GATCGACTGC	CTGCACAACG	TTAGGTATGC	10560
CAAAAAAAG	AACACGATCC	TTTGCACCCG	TTCGATGATT	ATCAGTATGT	TCACAAAAAA	10620

AACCTTAAGTT	CATCCCAGTG	TACAACAGCC	CCAACATCTG	CCCCAAGTAA	CAAAAAACAA	10680
CCAATTTATC	TTATTCTTAT	CTGCCACAAA	ATAATCGGTT	TCACACTATT	CTCTTGTTAT	10740
ACAAAATTGA	CAAGTAGGAA	GGAGAGGAGT	CATCCAAATA	AACGGTGCAC	GTTCTTTGAG	10800
AAAAGTCTTA	TTTTTCGTAA	GATCCAATTT	CAACAAACTT	TTCTTCAAGT	CAAAATTCCT	10860
GATAGTGTAT	CTCCTCTCGA	CGACCTCTTG	CATTGAACGA	TCTCCGCTTA	TCATGAAAAG	10920
TTGCTTGGAT	AACAAGTATT	GCAAGGGGGG	GACAGTAGCT	ATTAAGTTAG	TCGGCCCAAG	10980
GAAATGGAGG	AGTGATAGTC	TCGAATATTA	TTCACCTCTT	TAGCATTACC	CGGTCTGGCT	11040
TTAAGGAGTT	ACGTCTTTTA	CGCTCGCCAA	TTTCTTTTTT	TAGAATGGTT	GGTGTCAAAA	11100
TCGCGAGTTG	TGGAAGGTTT	AAGTTACTCG	ATTCTGTGATT	TTCAAGTATG	AGTGGTGAGA	11160
GAGATTTCGAT	ATTTTCACGA	GGTGTATTCT	AGGTCTAGTA	GAACGAAGGG	TGTCACTAAT	11220
GAAAGTTTCA	AGAGTTCATC	ATCATCTTCT	TCTAGTAGAT	TTTCGCTTTC	AAATGAGTAT	11280
GAAAATTCTT	CCTCTTTTCT	ATTGATTTTC	TTCATTGTTT	TCTTCATTGT	TGTGGTTGTT	11340
ATTGAAAAGA	AAGAAAATTT	ATAACAGAAA	AAGATGTCAA	AAAAAAGGTA	AAATGAAAGA	11400
GTATCATATA	CTTAAAGAGT	TGCGTAGAGA	TAAGTCAAAA	GAAACAGAAT	TATAGTAATT	11460
TCAGCTAAGT	TAGAATTC					11478

说明书附图



还原端



还原端

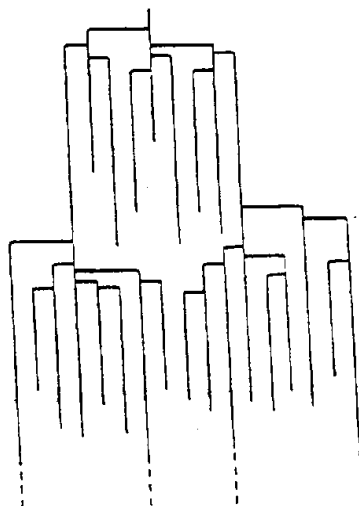


图 1

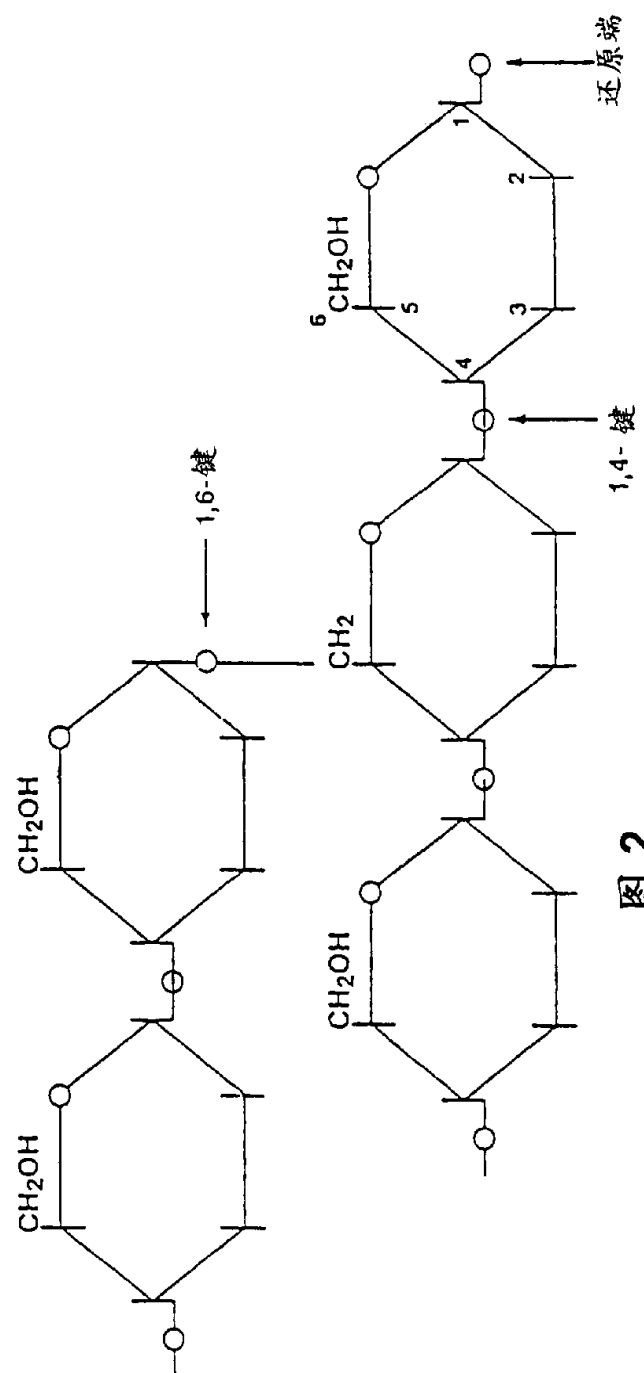


图 2

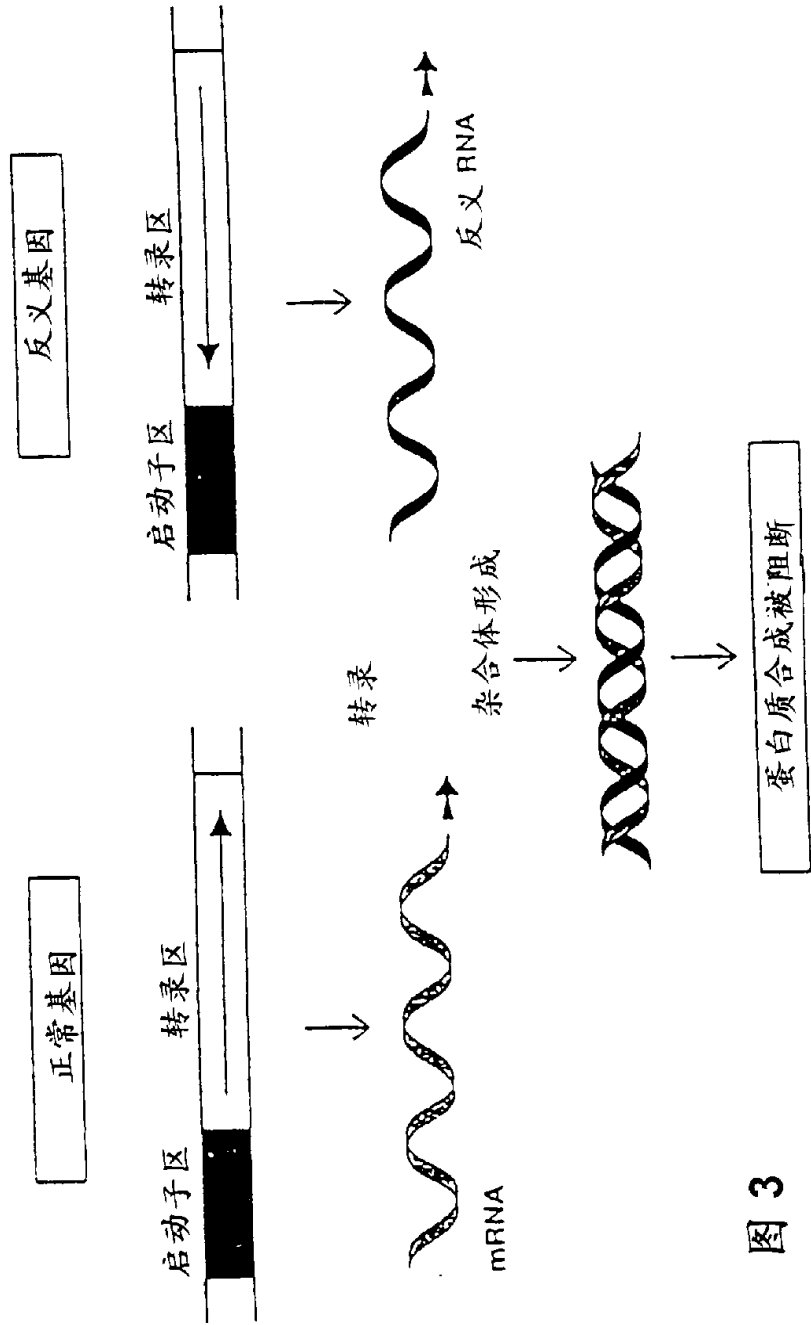


图 3

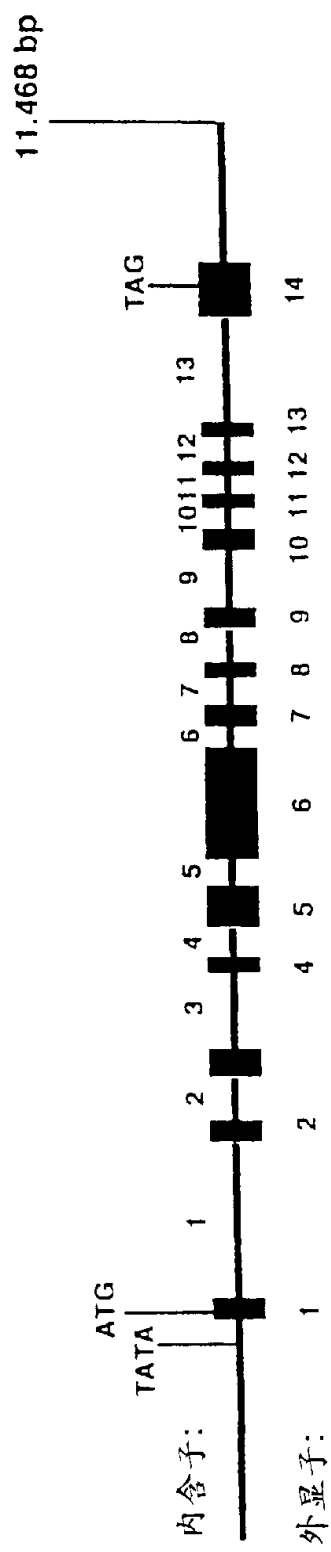


图 4

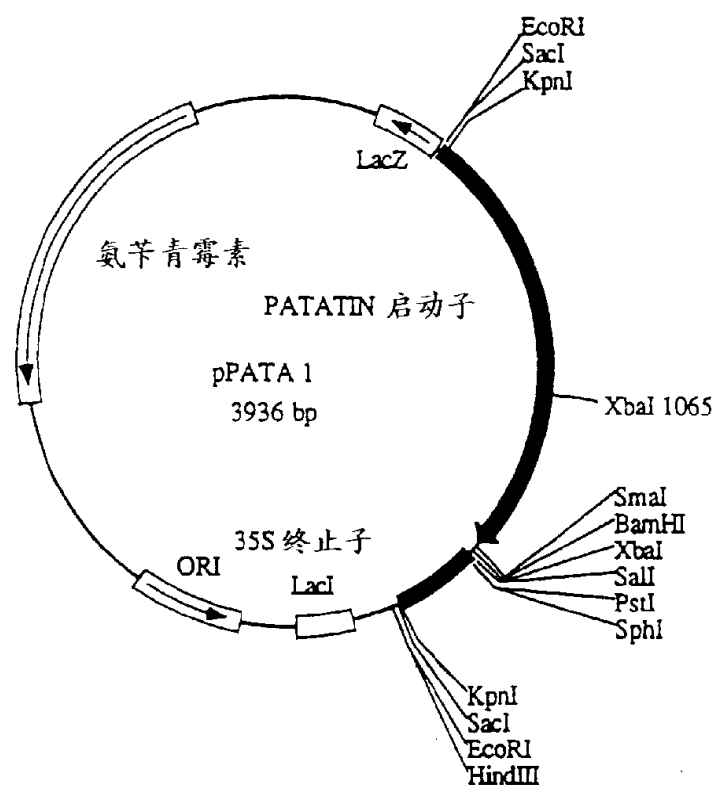


图 5

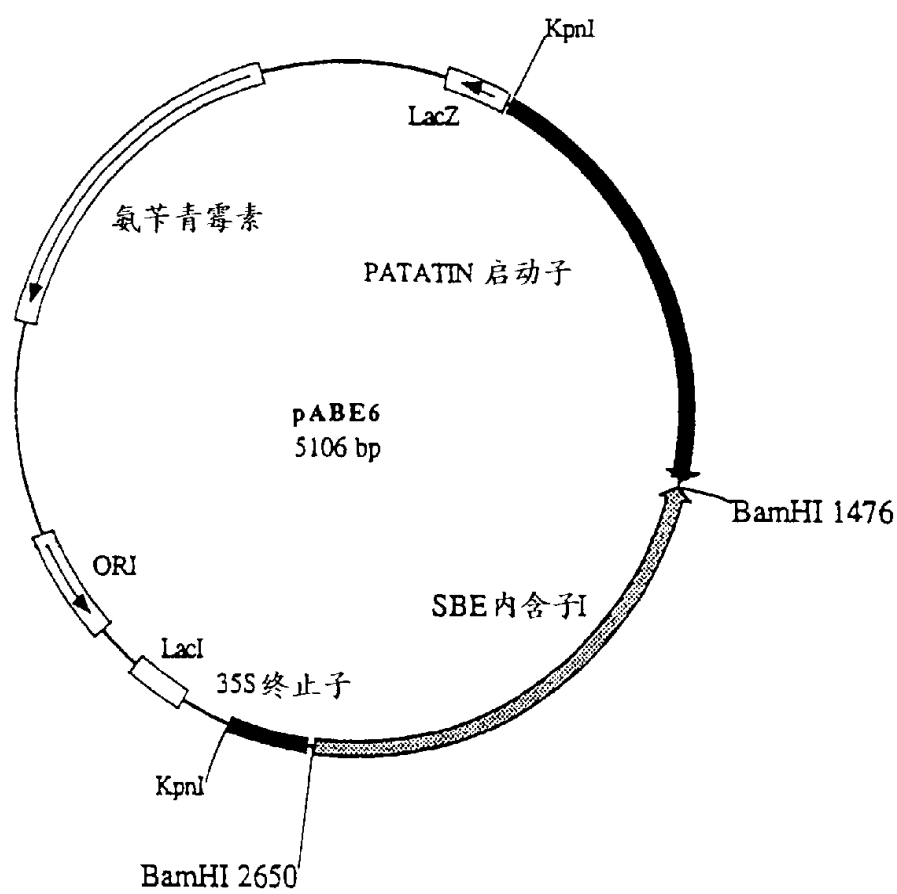


图 6

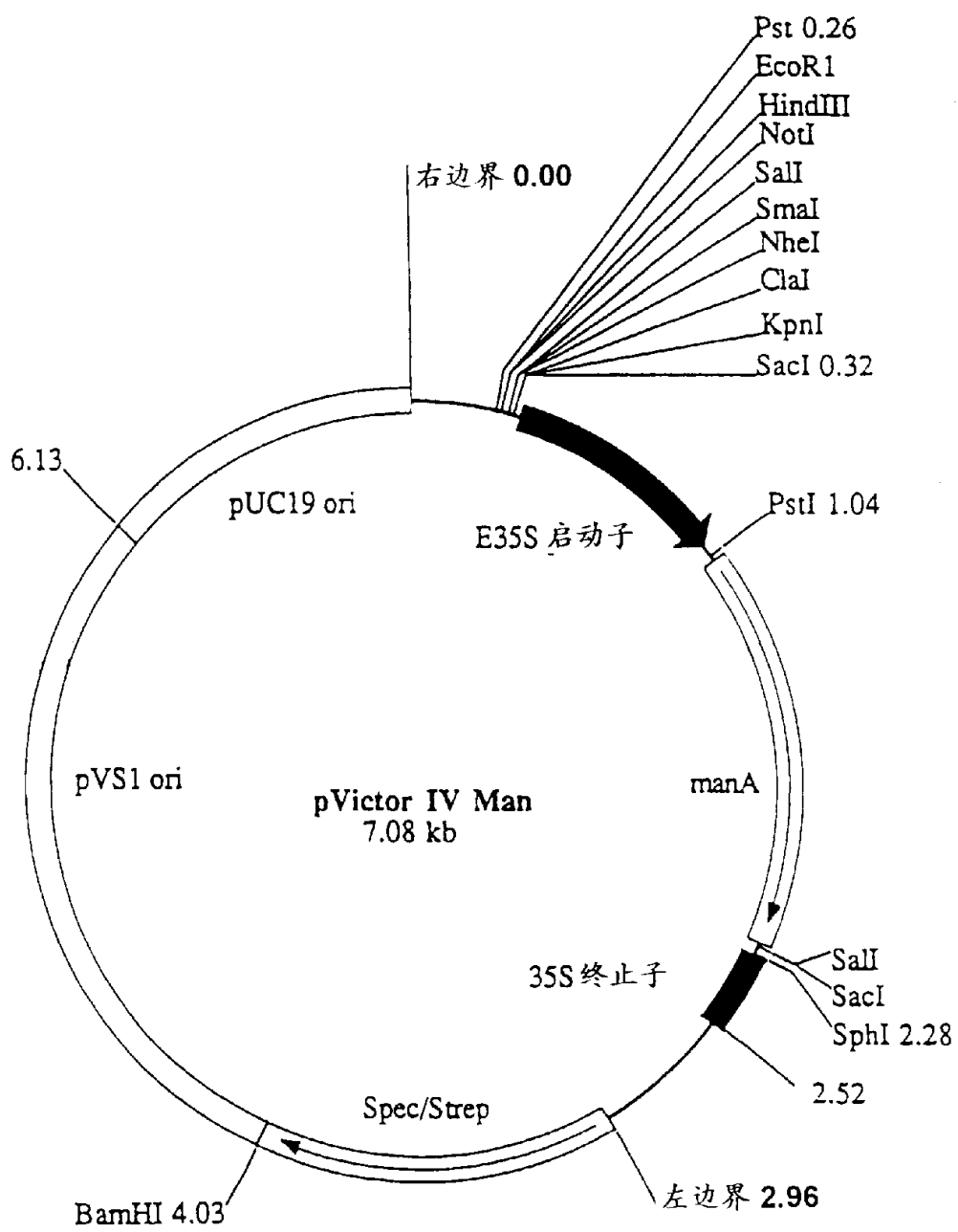


图 7

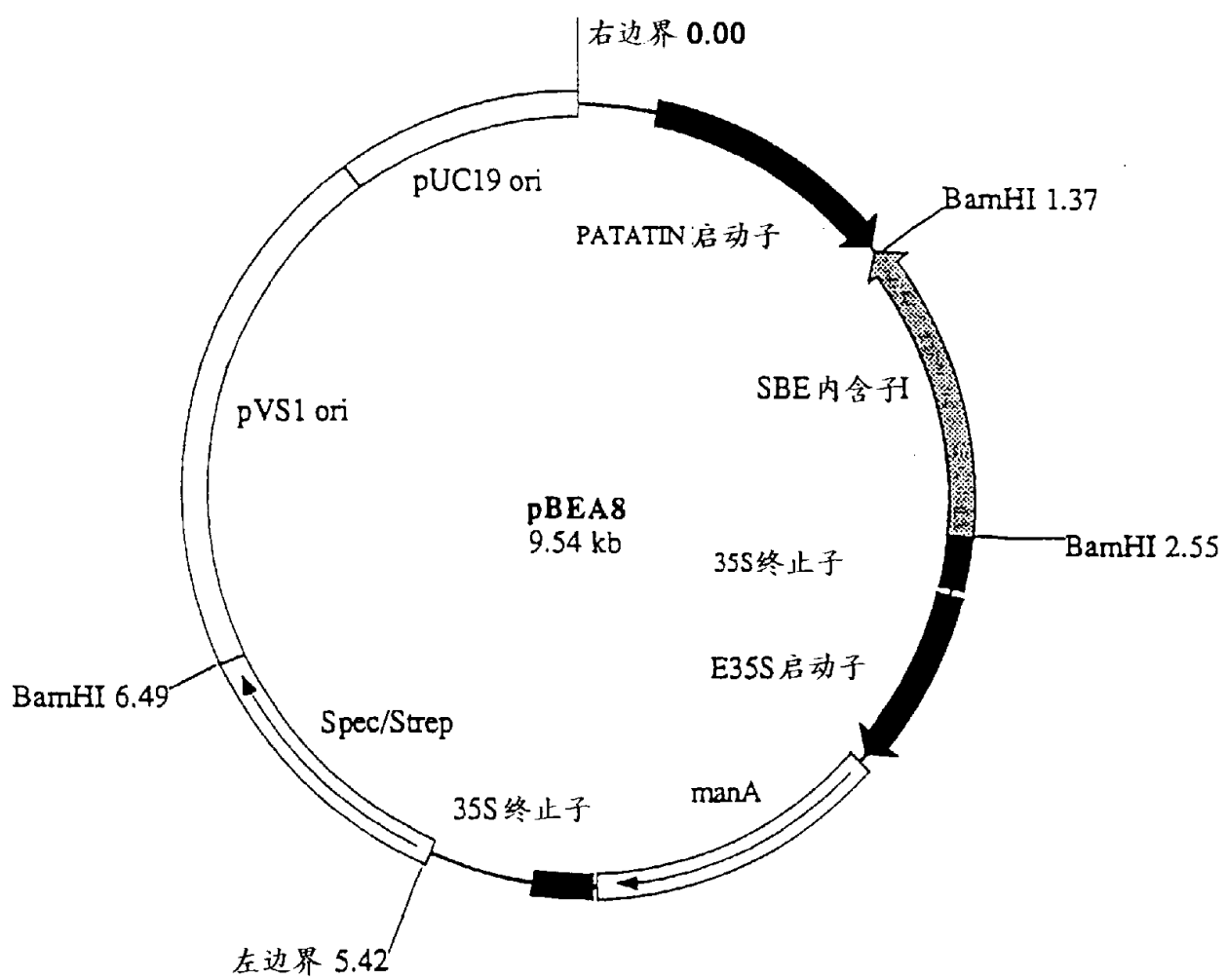


图 8

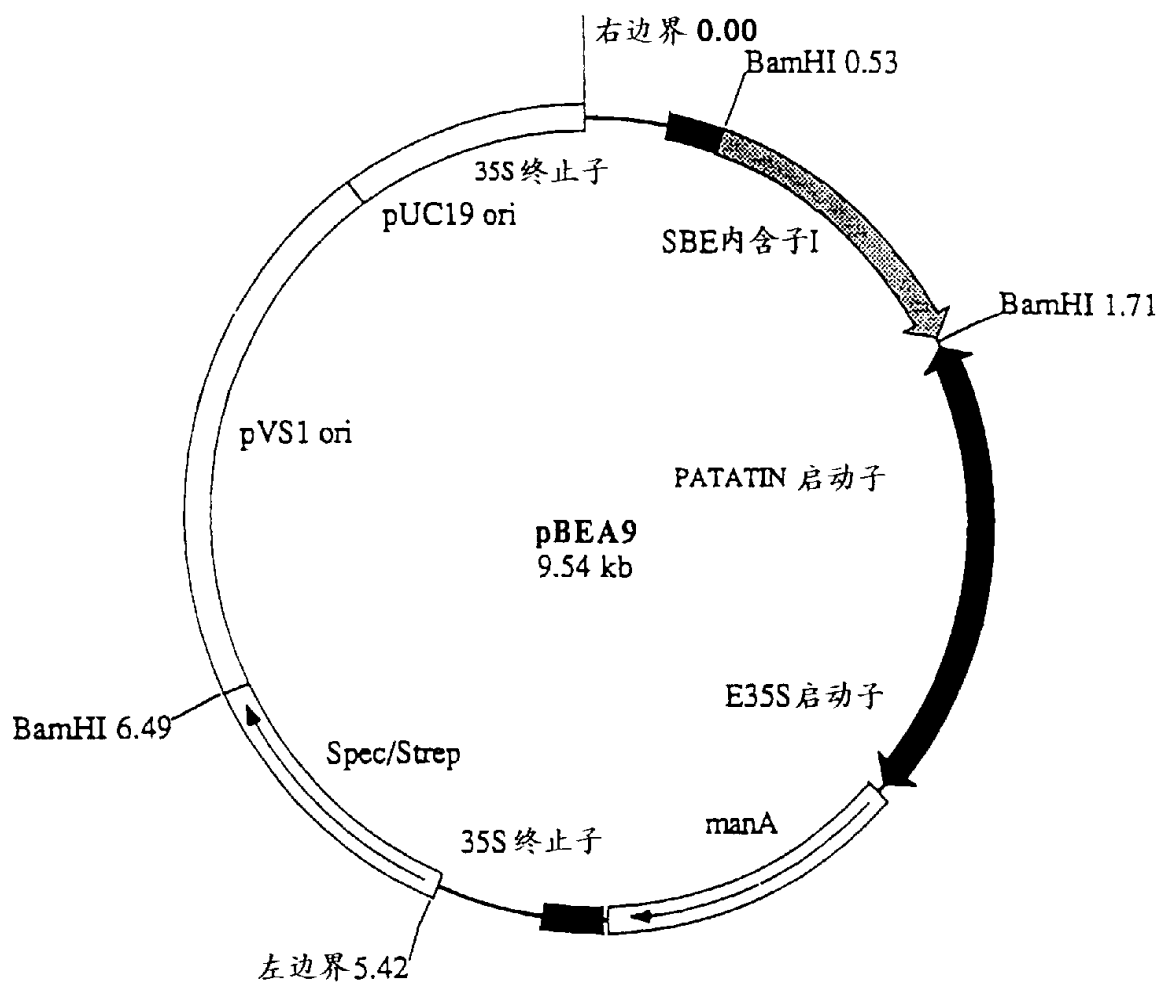


图 9

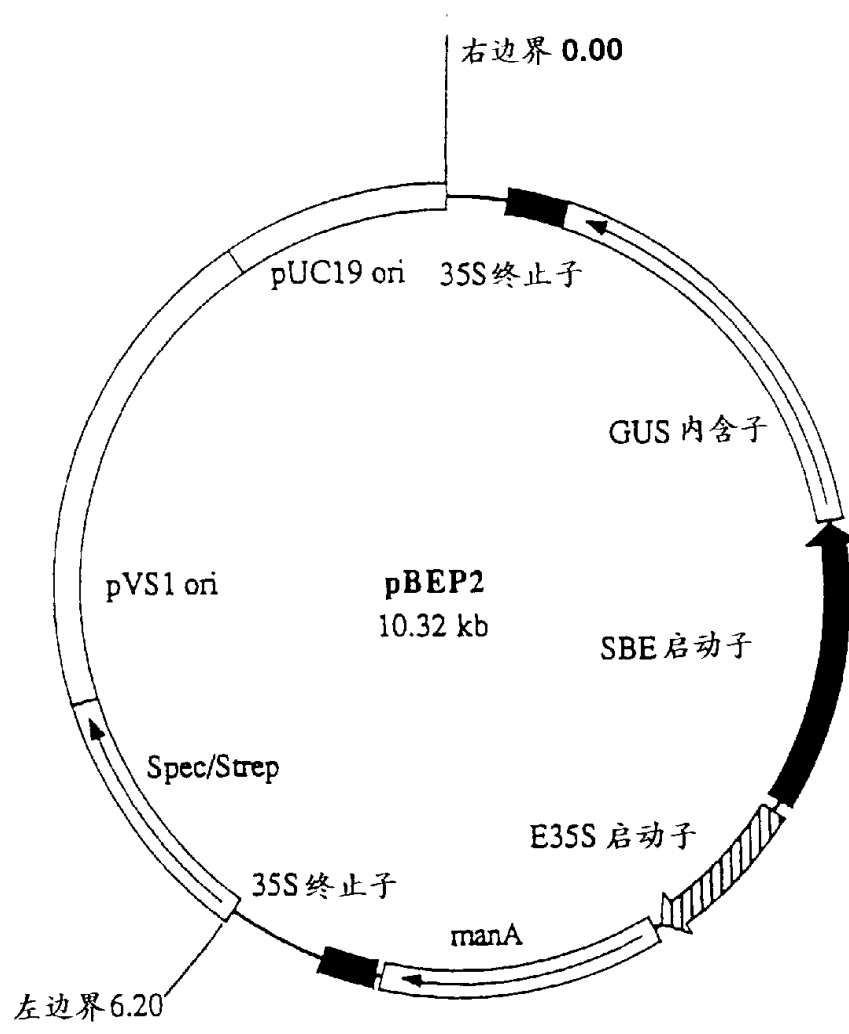


图 10

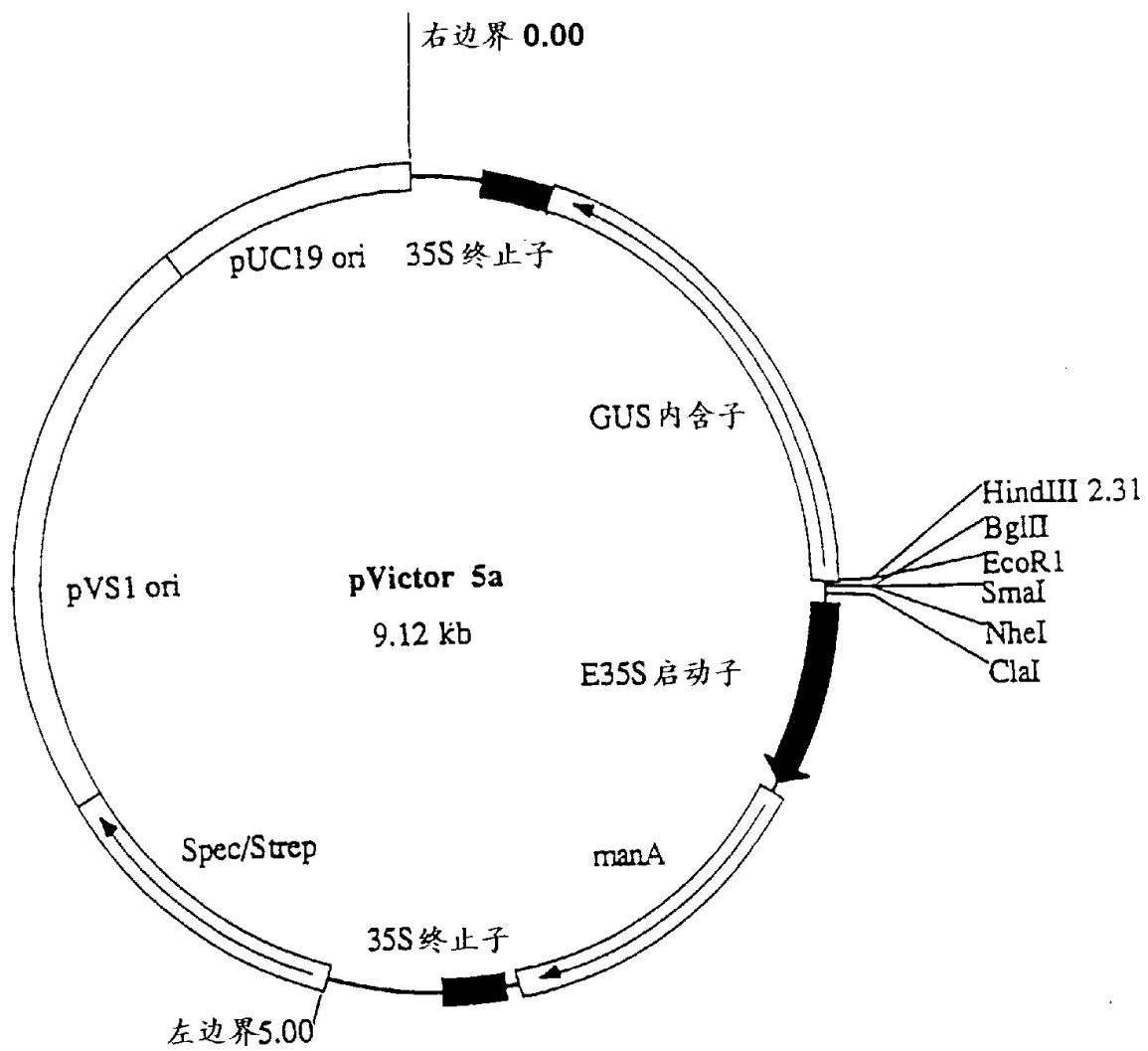


图 11

10	20	30	40	50	60	
12345678901234567890123456789012345678901234567890						
ATCATGGCCAATTACTGGTTCAAATGCATTACTTCCTTTCAGATTCTTCGAGTTCTCAT						60
GACCGGTCCTACTACAGACGATACTAACCCGTGGAAGTGTTCATCTGCTTCTTAGAACT						120
CTATGGCTATTTTCGTTAGCTTGGCGTCGGTTTGAACATAGTTTTTGTTCCTTCAAACCTCTT						180
CATTTACAGTCAAAATGTTGTATGGTTTTTGTTCCTCAATGATGTTTACAGTGTGTG						240
TTGTCATCTGTACTTTTGCCTATTACTTGTTCCTGAGTTACATGTTAAAAAAGTGTATT						300
TTGCCATATTTTGTCTCTTATTATTATATCATACATACATTATTACAAGGAAAAGACA						360
AGTACACAGATCTTAACGTTTATGTTCAATCAACTTTTGGAGGCATTGACAGGTACCACA						420
AATTTTGAGTTTATGATTAAGTTCAATCTTAGAATATGAATTTAACATCTATTATAGATG						480
CATAAAAATAGCTAATGATAGAACATTGACATTTGGCAGAGCTTAGGGTATGGTATATCC						540
AACGTTAATTTAGTAATTTTGTACGTACGTATATGAAATATTGAATTAATCACATGAA						600
CGGTGGATATTATATTATGAGTTGGCATCAGCAAAATCATTGGTGTAGTTGACTGTAGTT						660
GCAGATTTAATAATAAAATGGTAATTAACGGTCGATATTAAATAACTCTCATTTCAGT						720
GGGATTAGAACTAGTTATTAAAAAAATGTATACTTTAAGTGATTTGATGGCATATAATTT						780
AAAGTTTTTCATTTTCATGCTAAAATTGTTAATTATTGTAATGTAGACTGCGACTGGAATT						840
ATTATAGTGTAATTTATGCATTCAGTGTAATAATTAAAGTATTGAACTTGTCTGTTTTAG						900
AAAATACTTTTATACTTTAATATAGGATTTTGTTCATGCGAATTTAAATTAATCGATATTGA						960
ACACGGAATACCAAAATTAAAAAGGATACACATGGCCTTCATATGAACCGTGAACCTTTG						1020
ATAACGTGGAAGTTCAAAGAAGGTAAAGTTTAAAGAATAAACTGACAAATTAATTTCTTTT						1080
ATTTGGCCCACTACTAAATTTGCTTTACTTTCTAACATGTCAAGTTGTGCCCTCTTAGTT						1140
GAATGATATTCATTTTTCATCCCATAAGTTCAATTTGATTGTCATACCACCCATGATGTT						1200
CTGAAAAATGCTTGGCCATTACAAAAGTTTATCTTAGTTCCTATGAACCTTTATAAGAAGC						1260
TTTAATTTGACATGTTATTTATATTAGATGATATAATCCATGACCCAATAGACAAGTGTA						1320
TTAATATTGTAACCTTTGTAATTGAGTGTGTCTACATCTTATTCAATCATTTAAGGTCATT						1380
AAAATAAATTATTTTTTGACATTCTAAAACCTTTAAGCAGAATAAATAGTTTATCAATTAT						1440
TAAAAACAAAAACGACTTATTTTATAAATCAACAAACAATTTTAGATTGCTCCAACATAT						1500

图 12

10	20	30	40	50	60	
12345678901234567890123456789012345678901234567890						
TTTTCCAAATTAAATGCAGAAAATGCATAATTTTATACTTGATCTTTATAGCTTATTTTT						1560
TTTAGCCTAACCAACGAATATTTGTAAACTCACAACCTTGATTAAAAGGGATTTACAACAA						1620
GATATATATAAGTAGTGACAAATCTTGATTTTAAATATTTTAATTTGGAGGTCAAAATTT						1680
TACCATAATCATTTGTATTTATAATTAAATTTTAAATATCTTATTTATACATATCTAGTA						1740
AACTTTTAAATATACGTATATACAAAATATAAAATTATTGGCGTTCATATTAGGTCAATA						1800
AATCCTTAACTATATCTGCCTTACCACTAGGAGAAAGTAAAAAACTCTTTACCAAAAATA						1860
CATGTATTATGTATACAAAAAGTCGATTAGATTACCTAAATAGAAATTGTATAACGAGTA						1920
AGTAAGTAGAAATATAAAAAAACTACAATACTAAAAAAATATGTTTTACTTCAATTTTCG						1980
AAACTAATGGGGTCTGAGTGAAATATTCAGAAAGGGGAGGACTAACAAAAGGGTCATAAT						2040
GTTTTTTTATATAAAAAGCCACTAAAATGAGGAAATCAAGAATCAGAACATACAAGAAGGCA						2100
GCAGCTGAAGCAAAGTACCATAATTTAATCAATGGAAATTAATTTCAAAGTTTTATCAAA						2160
ACCCATTCGAGGATCTTTTCCATCTTTCTCACCTAAAGTTTCTTCAGGGgtaatttttac			M E I N F K V L S K			2220
taattttcatgttaattttcaattatttttagcctttgcattttccaatatatctgg			P I R G S F P S F S P K V S S G			2280
atcatctccttagtTTTTTattttttataatatcaaatatggaagaaaaatgaca						2340
cttgtagagccatatgtaagtatcatgtgacaaatttgcaaggtgggttgagtgtataaaa						2400
ttcaaaaattgagagatggaggggggggtgggggbaragacaatattagaaagagtgttc						2460
taggaggttatggaggacacggatgaggggtagaagggttaggttaggtatttgagtgttgt						2520
ctggcttatcctttcatactagtagtcgtggaattatttgggtagtttcttgttttgtta						2580
tttgatctttgttatctattttctgtttcttgtagcttcgattattgtattatatatctt						2640
gtcgtagttattgttcctcggtagaatgctctagcatgcttccttttagtgttttatcat						2700
gccttctttatattcgcggttgctttgaaatgcttttacttttagccgaggggtctattagaa						2760
acaatctctctatctcgtaaggtaggggtaaagtcctcaccacactccacttggtgggatt						2820
acattgtgtttgttggtgtaaatcaattatgtatacataataagtggttttttacaaca						2880
caaatacatgggtcaagggcaaaagtctgaacacataaaggggttcattatatgtccagga						2940
tatgataaaaattgtttctttgtgaaagttatataagatttggttatggcttttgctggaa						3000

图 12 (续)

10	20	30	40	50	60	
12345678901234567890123456789012345678901234567890						
acataataagttataatgctgagatagctactgaagtttgttttttctagccttttaaat						3060
gtaccaataatagattccgtatcgaacgagtatgttttgattacctggcatgatgtttc						3120
tattttttacatttttttgggtgttgaactgcaattgaaaatgttgatcctatgagacgg						3180
atagttgagaatgtgttcttttgatggaccttgagaagctcaaacgctactccaataatt						3240
tctatgaattcaaattcagtttatggctaccagtcagtcagaaattaggatatgtgca						3300
tatacttgtttcaattatactgtaaaattttcttaagttctcaagatatccatgtaacctcg						3360
agaatttctttgacagGCTTCTAGAAATAAGATATGTTTTCTTCTCAACATAGTACTGG						3420
ACTGAAGTTTGGATCTCAGGAACGGTCTTGGGATATTTCTTCCACCCCAAATCAAGAGT	A S R N K I C F P S Q H S T G					3480
L K F G S Q E R S W D I S S T P K S R V						
TAGAAAAGATGAAAGGgtatgtttgataatttatatggttgcagtgatagtatataaata						3540
R K D E R						
gttggaaaactttctggactgggtgctcatggcatatttgatctgtgcaccgtgtggagatg						3600
tcaaacatgtgttacttcgttccgccaatttataataaccttaacttgggaaagacagctc						3660
tttactcctgtgggcatttgttatttgaattacaatctttatgagcatgggtgttttcaca						3720
ttatcaacttctttcatgtggtatataacagtttttagctccgttaataacctttcttctt						3780
tttgatataaaactaactgtggtgcattgtctgcbkkkATGAAGCACAGTTCAGCTATTTT						3840
CGCTGTTTTGACCGATGACGACAATTCGACAATGGCACCCCTAGAGGAAGATGTCAAGAC	M K H S S A I S					3900
A V L T D D D N S T M A P L E E D V K T						
TGAAAATATTGGCCTCCTAAATTTGGATCCAACTTTGGAAACCTTATCTAGATCACTTCAG						3960
E N I G L L N L D P T L E P Y L D H F R						
ACACAGAATGAAGAGATATGTGGATCAGAAAATGCTCATTGAAAAATATGAGGGACCCCT						4020
H R M K R Y V D Q K M L I E K Y E G P L						
TGAGGAATTTGCTCAAGgtaacagccaaaagttgtgctttaggcagtttgaccttatttt						4080
E E F A Q G						
ggaagatgaattgtttataacctactttgactttgctagagaattttgcataccggggagt						4140
aagtagtggtccatttaggtggcacctggccatttttttgatcttttaaaaagctgttt						4200
gattgggtcttcaaaaaagtagacaagggtttttgggagaagtgcacacccccggagtgtc						4260
agtgggcaaagcaaagattttcactaaggagattcaaaatataaaaaaagtatagacataa						4320
agaagctgaggggattcaacatgtactatacaagcatcaaatatagtcttaaaagcaattt						4380
tgtagaaataaagaaagtcttccttctgttgcttcacaatttccttctattatcatgagt						4440
tactctttctgttcgaaatagcttccttaataattaaattcatgatacttttgttgagatt						4500

图 12 (续)

10	20	30	40	50	60	
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
tagcagttttttcttgtgtaaaactgctctcttttttttcagGTTATTTAAAATTTGGATT						4560
				Y L K F G F		
CAACAGGGAAGATGGTTGCATAGTCTATCGTGAATGGGCTCCTGCTCAGtaggtccct						4620
N R E D G C I V Y R E W A P A A Q						
cgtctactacaaaatagtagtttccatcatcataacagatttttctattaaagcatgatg						4680
ttgcagcatcattggcttttcttacatggttctaattgctattaaggttatgcttcttaatta						4740
actcatccacaatgcagGGAAGCAGAAGTTATTGGCGATTTCATGGATGGAACGGTTCT						4800
				E A E V I G D F N G W N G S		
AACCACATGATGGAGAAGGACCAGTTTGGTGTGGAGTATTAGAATTCCTGATGTTGAC						4860
N H M M E K D Q F G V W S I R I P D V D						
AGTAAGCCAGTCATTCCACACAACCCAGAGTTAAGTTTCGTTTCAAACATGGTAATGGA						4920
S K P V I P H N S R V K F R F K H G N G						
GTGTGGGTAGATCGTATCCCTGCTTGGATAAAGTATGCCACTGCAGACGCCACAAAGTTT						4980
V W V D R I P A W I K Y A T A D A T K F						
GCAGCACCATATGATGGTGTCTACTGGGACCCACCACCTTCAGAAAGgtttttgttattca						5040
A A P Y D G V Y W D P P P S E R						
taccttgaagctgaattttgaacaccatcatcacaggcatttcgattcatgttcttacta						5100
gtcttgttatgtaagacattttgaaatgcaaaagttaaaataattgtgtctttactaatt						5160
tggacttgatcccatactctttcccttaacaaaatgagtcatttctataagtgccttgaga						5220
acttactacttcagcaattaaacagGTACCACTTCAAATACCCTCGCCCTCCCAAACCCC						5280
				Y H F K Y P R P P K P R		
GAGCCCCACGAATCTATGAAGCACATGTCCGCATGAGCAGCTCTGAGCCACGTGTAAAT						5340
A P R I Y E A H V G M S S S E P R V N S						
CGTATCGTGAGTTTGCAGATGATGTTTACCTCGGATTAAGGCAAATAACTATAATACTG						5400
Y R E F A D D V L P R I K A N N Y N T V						
TCCAGTTGATGGCCATAATGGAACATTCTTACTATGGATCATTGGATATCATGTTACAA						5460
Q L M A I M E H S Y Y G S F G Y H V T N						
ACTTTTTTGCTGTGAGCAGTAGATATGGAAACCCGAGGACCTAAAGTATCTGATAGATA						5520
F F A V S S R Y G N P E D L K Y L I D K						
AAGCATAGCTTGGGTTTACAGGTTCTGGTGGATGTAGTTCACAGTCATGCAAGCAATA						5580
A H S L G L Q V L V D V V H S H A S N N						
ATGTCATGATGGCCTCAATGGCTTTGATATTGGCCAAGGTTCTCAAGAATCCTACTTTC						5640
V T D G L N G F D I G Q G S Q E S Y F H						
ATGCTGGAGAGCGAGGGTACCATAAGTTGTGGGATAGCAGGCTGTTCAACTATGCCAATT						5700
A G E R G Y H K L W D S R L F N Y A N W						
GGGAGGTTCTTCGTTTCTTCTTCCAACCTTGAGGTGGTGGCTAGAAGAGTATAACTTTG						5760
E V L R F L L S N L R W W L E E Y N F D						
ACGGATTTTCGATTTGATGGAATAACTTCTATGCTGTATGTTCAATCATGGAATCAATATGG						5820
G F R F D G I T S M L Y V H H G I N M G						
GATTTACAGGAACTATAATGAGTATTTTACGCGAGGCTACAGATGTTGATGCTGTGGTCT						5880
F T G N Y N E Y F S E A T D V D A V V Y						
ATTTAATGTTGGCCAATAATCTGATTACAAAGATTTTCCAGATGCAACTGTTATTGCCG						5940
L M L A N N L I H K I F P D A T V I A E						
AAGATGTTTCTGGTATGCCGGCCTTGGCCGGCCTGTTTCTGAGGGAGGAATTGGTTTTG						6000
D V S G M P G L G R P V S E G G I G F V						

图 12(续)

10	20	30	40	50	60	
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890						
TTTACCGCCTGGCAATGGCAATCCCAGATAAGTGGATAGATTATTTAAAGAATAAGAATG						6060
Y R L A M A I F D K W I D Y L K N K N D						
ATGAAGATTGGTCCATGAAGGAAGTAACATCGAGTTTGACAAATAGGAGATATACAGAGA						6120
E D W S M K E V T S S L T N R R Y T E K						
AGTGTATAGCATATGCGGAGACCCATGATCAGgtatttttaattttattttctacaactaaa						6180
C I A Y A E T H D Q						
taattctcagaacaattgttagatagaatccaaatatatacgtcctgaaagtataaaaagt						6240
acttatttttcgccatgggccttcagaatattggtagccgctgaatatcatgataagttat						6300
ttatccagtgacattttttatgttcactcctattatgtctgctggatacagTCTATTGTTG						6360
				S I V G		
GTGACAAGACCATTGCATTTCTCCTAATGGACAAAGAGATGTATTCTGGCATGCTCTTGCT						6420
D K T I A F L L M D K E M Y S G M S C L						
TGACAGATGCTTCTCCTGTTGTTGATCGAGGAATTGCGCTTCACAAGgtttgtctgtttc						6480
T D A S P V V D R G I A L H K						
tattgcattttaaggttcatatagggttagccacggaaaatctcactctttgtgaggtaac						6540
cagggttctgatggattatttcaattttctcgtttatcatttgtttattcttttcatgcat						6600
tgtgtttctttttcaatatccctcttatttggaggtaatttttctcatctattcactttt						6660
agcttcttaaccacagATGATCCATTTTTTCACAATGGCCTTGGGAGGAGAGGGGTACCTC						6720
				M I H F F T M A L G G E G Y L		
AATTTTCATGGGTAACGAGgtatgtcttacatcttttagatatatttgtgataattacaatta						6780
N F M G N E						
gtttggcttacttgaacaagattcattcctcaaaatgacctgaactgttgaacatcaaag						6840
gggttgaaacatagaggaaaacaacatgatgaatgtttccattgtctagggatttctatt						6900
atgttgctgagaacaaatgtcatcttaaaaaaacattgtttactttttttagtataga						6960
agattactgtatagagtttgcaagtgtgtctgttttggagtaattgtgaaatgttgatg						7020
aacttgtacagTTTGGCCATCCTGAGTGGATTGACTTCCCTAGAGAGGGCAATAATTGGA						7080
				F G H P E W I D F P R E G N N W S		
GTTATGACAAATGTAGACGCCAGTGGAACTCGCGGATACCGAACACTTGAGATACAAGg						7140
Y D K C R R Q W N L A D S E H L R Y K						
ttcaagtattttgaatcgcagcttgtaaataatctagtaatttttagattgcttacttg						7200
gaagtctacttgggttctggggatgatagctcatttcattgttctacttattttccaac						7260
cgaatttctgatttttgtttcgagatccaagtattagattcatttacacttattaccgcc						7320
tcatttctaccactaaggccttgatgagcagcttaagttgattccttgaagctatagttt						7380
caggctaccaatccacagcctgctatatttgttggataacttaccttttctttacaatgaa						7440
gtgatactaattgaaatgggtctaaatctgatattctatatttctcgtctttcctccccct						7500

图 12(续)

10	20	30	40	50	60	
12345678901234567890123456789012345678901234567890						
catgatgaaatgcagTTTATGAATGCATTTGATAGAGCTATGAATTCGCTCGATGAAAAG						7560
	F M N A F D R A M N S L D E K					
TTCTCATTCCTCGCATCAGGAAAACAGATAGTAAGCAGCATGGATGATGATAATAAGgta						7620
F S F L A S G K Q I V S S M D D D N K						
aaatcatctaaagttgaaagtgttgggtttatgaagtgccttaattctatccaaggacaa						7680
gtagaaacctttttaccttccatttcttgatgatggatttcatattatccaatag						7740
ctgggtcaaattcggtaatagctgtactgattagttacttcactttgcagGTTGTTGTGTT						7800
	V V V F					
TGAACGTGGTGACCTGGTATTTGTATTCAACTTCCACCCAAAGAACACATACGAAGGgta						7860
E R G D L V F V F N F H P K N T Y E G						
tatatgttttacttatccatgaaattattgctctgcttgttttaattgtactgaacaagt						7920
tttatggagaagtaactgaaacaaatcattttcacattgtctaatttaactcttttttct						7980
gatcctcgcacatgacgaaaacagGTATAAAGTTGGATGTGACTTGCCAGGGAAGTACAGAG						8040
	Y K V G C D L P G K Y R V					
TTGCACTGGACAGTGATGCTTGGGAATTTGGTGGCCATGGAAGagtaaggatttgcttga						8100
A L D S D A W E F G G H G R						
ataacttttgataataagataacagatgtagggtacagttctctcaccaaaaagaactgt						8160
aattgtctcatccatcttttagttgtataagatatccgactgtctgagttcggaagtgttt						8220
gagcctcctgcccctccccctgcgttgttttagctaattcaaaaaggagaaaactgtttatt						8280
gatgatctttgtcttcatgctgacatacaatctgttctcatgacagACTGGTCATGATGT						8340
	T G H D V					
TGACCATTTACATCACCAGAAGGAATACCTGGAGTTCAGAAACAAATTTCAATGGTCCG						8400
D H F T S P E G I P G V P E T N F N G R						
TCCAAATTCCTTCAAAGTGCTGTCTCCTGCGCGAACATGTGTGgtacagttcttgccgtg						8460
P N S F K V L S P A R T C V						
tgacctccctttttatttgtggttttgttcatagttatttgaatgcgatagaagttaacta						8520
ttgattaccgccacaatcgccagttaagtcctctgaactactaatttgaaaggtaggaat						8580
agccgtaataagggtctacttttggcatcttactgttacaaaacaaaaggatgccaaaaaa						8640
attcttctctatcctctttttccctaaaccagtgcattgttagcttgcacctgcataaactt						8700
aggtaaatgatcaaaaatgaagttgatgggaacttaaaaccgcccctgaagtaagctagg						8760
aatagtcataataatgtccaccttttgggtgtctgcgctaacaacaacaacatacctcgt						8820
gtagtccacaaaagtggtttcagggggagggtagagtgtatgcaaaacttactcctatct						8880
cagaggtagagaggattttttcaatagacccttgggtcaagaaaaaaagtccaaaaagaa						8940
gtaacagaagtgaagcaacatgtgtagctaaagcgaccaacttggttgggactgaagt						9000

图 12 (续)

10	20	30	40	50	60	
12345678901234567890123456789012345678901234567890						
agttgttgttgttgaaacagtgcatgtagatgaacacatgtcagaaaatggacaacacag						9060
ttattttgtgcaagtcaaaaaaatgtactactatttcttttgtgcagctttatgtatagaa						9120
aagttaaataactaatgaatttttgctagcagaaaaatagcttggagagaaattttttata						9180
ttgaactaagctaactatattcatctttctttttgcttcttcttctctcttgtttgtgaag						9240
GCTTATTACAGAGTTGATGAACGCATGTCAGAACTGAAGATTACCAGACAGACATTTGT						9300
A Y Y R V D E R M S E T E D Y Q T D I C						
AGTGAGCTACTACCAACAGCCAATATCGAGGAGAGTGACGAGAACTTAAAGATTTCGTTA						9360
S E L L P T A N I E E S D E K L K D S L						
TCTACAAATATCAGTAACATTGACGAACGCATGTCAGAACTGAAGTTTACCAGACAGAC						9420
S T N I S N I D E R M S E T E V Y Q T D						
ATTTCTAGTGAGCTACTACCAACAGCCAATATTGAGGAGAGTGACGAGAACTTAAAGAT						9480
I S S E L L P T A N I E E S D E K L K D						
TCGTTATCTACAAATATCAGTAACATTGATCAGACTGTTGTAGTTTCTGTTGAGGAGAGA						9540
S L S T N I S N I D Q T V V V S V E E R						
GACAAGGAACTTAAAGATTCCCGTCTGTGAAGCATTCATTAGTGATGTTGTCCAGCTGAA						9600
D K E L K D S P S V S I I S D V V P A E						
TGGGATGATTGAGATGCAAACGTCTGGGGTGAGGACTAGTCAGATGATTGATCGACCCTT						9660
W D D S D A N V W G E D						
CTACCGATTGGTGATCGCTATCCTTGCTCTCTGAGAAATAGGTGAGGCGAAACAAAAAAT						9720
AATTTGCATGATAAAAAGTCTGATTTTATGATCGCTATCCTCGCTCTCTGAGAAAGAAGC						9780
GAAACAAAGGCGACTCCTGGACTCGAATCTATAAGATAACAAAGGCGACTCCTGGGACTC						9840
GAATCTATAAGATAACAAAGGCAATTCCAAGACTTGAATCTATAAAAAATTTAGTTAAGA						9900
ATGATTAACGTCCGATCCTAATTCGAATCGAGGCATCTTACCACTCCATTGATAATTATA						9960
TAAGTCAATAAGTCATATAAWAGTATTAAAACTAAATTGACTTGATCGGTCTATCAAAA						10020
ATMAGATMAAATTGTGTTTCATATGTAACATTTTTGTTGTGACAATTAGCTTAATTACATC						10080
TTTCATGTGCAATAACAAAGAAATGATAGGAATTTAGAGATTCCAATTTTTTTGTTGCCA						10140
CAATTAACTTAATTACATCTTTTCATTTGCAATAACAAAGAAATGATAGGAATTTAGAGAT						10200
CCAGTGTCAATACACAACCTAGGCCAACATCGAAAGCATAACTGTAAACTCATGCATGAA						10260
GAAATCAGTCGTAAAAATGAATAAATGCGACATAAAAAACAAATTGCATGTATCATTAATG						10320
TGACTTAACTACAAGTAAAAATAAATTTAACAAATGTAACCTTAACTACAAGTAAAAATAA						10380
ATTGCTTCTATCATTAACAAACAAACAGAATTA AAAAGAAAAAACATACTAAATCTTAC						10440
CGTCATTTCGATAAAAAAATAACCAAATTCATAATGCAAGGAAAACGAAACGCGTCTGGA						10500

10	20	30	40	50	60	
12345678901234567890123456789012345678901234567890						
TCGGGTATCAACGATGAAATGGACCAGTTGGATCGACTGCCTGCACAACGTTAGGTATGC						10560
CAAAAAAAGAACACGATCCTTTGCACCCGTTTCGATGATTATCAGTATGTTTCACAAAAA						10620
AACTTAAGTTCATCCCAGTGTAACAAGCCCCAACATCTGCCCCAAGTAACAAAAACAA						10680
CCAAATTATCTTATTCTTATCTGCCACAAAATAATCGGTTTCACACTATTCTCTTGTAT						10740
ACAAAATTGACAAGTAGGAAGGAGAGGAGTCATCCAAATAAACGGTGCACGTTCTTTGAG						10800
AAAAGTCTTATTTTTTCGTAAGATCCAATTTCAACAAACTTTTCTTCAAGTCAAAATTCCT						10860
GATAGTGTATCTCCTCTCGACGACCTCTTGCAATTGAACGATCTCCGCTTATCATGAAAAG						10920
TTGCTTGGATAACAAGTATTGCAAGGGGGGACAGTAGCTATTAAGTTAGTCGGCCCAAG						10980
GAAATGGAGGAGTGATAGTCTCGAATATTATTCACCTCTTTAGCATTACCCGGTCTGGCT						11040
TTAAGGAGTTACGTCTTTTACGCTCGCCAATTTCTTTTTTTAGAAATGGTTGGTGTCAAAA						11100
TCGCGAGTTGTGGAAGGTTCAAGTTACTCGATTTCGTGATTTTCAAGTATGAGTGGTGAGA						11160
GAGATTCGATATTTTCACGAGGTGTATTTCGAGGTCTAGTAGAACGAAGGGTGTCACTAAT						11220
GAAAGTTTCAAGAGTTCATCATCATCTTCTTCTAGTAGATTTTCGCTTTCAAATGAGTAT						11280
GAAAATTCTTCCTCTTTTCTATTGATTTTCTTCATTGTTTTCTTCATTGTTGTGGTTGTT						11340
ATTGAAAAGAAAGAAAATTTATAACAGAAAAAGATGTCAAAAAAAGGTAAAATGAAAGA						11400
GTATCATATACTTAAAGAGTTGCGTAGAGATAAGTCAAAAGAAACAGAATTATAGTAATT						11460
TCAGCTAAGTTAGAATTC						11478

图 12 (续)