

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12N 15/82
C07H 21/04
A01H 5/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 99811041.8

[45] 授权公告日 2005 年 9 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1219064C

[22] 申请日 1999.8.4 [21] 申请号 99811041.8
[30] 优先权
[32] 1998. 8. 4 [33] US [31] 60/095,317
[86] 国际申请 PCT/US1999/017653 1999.8.4
[87] 国际公布 WO2000/007430 英 2000.2.17
[85] 进入国家阶段日期 2001.3.16
[71] 专利权人 嘉吉有限公司
地址 美国明尼苏达州
[72] 发明人 B·S·肖罗沙
审查员 欧阳石文

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 徐 迅

权利要求书 4 页 说明书 22 页 附图 9 页

[54] 发明名称 植物脂肪酸去饱和酶启动子
[57] 摘要

本文描述了脂肪酸去饱和酶 5'调节元件，以及
核酸构建物和含有这些调节元件的转基因植物。
本文还描述了脂肪酸去饱和酶 3'非翻译区域。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种分离的核酸分子，其特征在于，选自：
- (a)具有 SEQ ID NO: 4 核苷酸序列的核酸分子；
- 5 (b)具有 SEQ ID NO: 5 核苷酸序列的核酸分子；
- (c)具有 SEQ ID NO: 4 核苷酸 5113-5796 的核苷酸序列的核酸分子；
- (d)具有 SEQ ID NO:5 核苷酸 3197-3867 的核苷酸序列的核酸分子；
- (e)具有互补于(a)、(b)、(c)或(d)所述的核酸分子的核苷酸序列的核酸分子；
- 和
- 10 (f)长度至少为 600 个核苷酸且至少有 90%序列与(a)、(b)、(c)、(d)或(e)所述核酸分子相同的核酸分子，其中，所述核酸分子能启动异源核酸分子在转化的植物细胞中表达。
2. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其特征在于，所述的(f)部分的核酸分子长度至少为 800 个核苷酸。
- 15 3. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其特征在于，所述的(f)部分的核酸分子至少有 95%与(a)、(b)、(c)、(d)或(e)所述的核酸分子相同。
4. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其特征在于，所述的核酸分子片段含有 SEQ ID NO: 4 的核苷酸 5113-5796。
5. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其特征在于，所述的核酸分子片段含有 SEQ
- 20 ID NO: 4 的核苷酸 3179-3867。
6. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其特征在于，所述核酸分子具有 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列。
7. 如权利要求 1 所述的核酸分子，其特征在于，所述核酸分子具有 SEQ ID NO:5 的核酸序列。
- 25 8. 一种核酸构建物，其特征在于，所述核酸构建物包含第一核酸分子，该第一核酸分子可操纵性连接于与其异源的第二核酸分子，它包含脂肪酸去饱和酶基因的调节元件，并启动所述第二核酸分子的表达，其中，该第一核酸分子选自：
- (a)具有 SEQ ID NO: 4 核苷酸序列的核酸分子；
- (b)具有 SEQ ID NO: 5 核苷酸序列的核酸分子；
- 30 (c)具有 SEQ ID NO: 4 核苷酸 5113-5796 的核苷酸序列的核酸分子；
- (d)具有 SEQ ID NO:5 核苷酸 3197-3867 的核苷酸序列的核酸分子；
- (e)具有互补于(a)、(b)、(c)或(d)所述的核酸分子的核苷酸序列的核酸分子；

和

(f)长度至少为 600 个核苷酸且至少有 90%序列与(a)、(b)、(c)、(d)或(e)所述核酸分子相同的核酸分子, 其中, 所述核酸分子能启动异源核酸分子在转化的植物细胞中表达。

- 5 9. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述构建物还包含可操纵性连接于所述第二核酸分子的第三核酸分子, 所述的第三核酸分子包含脂肪酸去饱和酶基因的 3'非翻译区域, 所述的 3'非翻译区域位于天然基因组中所述的脂肪酸去饱和酶基因的 3'。

- 10 10. 如权利要求 9 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述的第三核酸分子选自:

- (a)具有 SEQ ID NO: 6 核苷酸序列的核酸分子;
- (b)具有 SEQ ID NO: 7 核苷酸序列的核酸分子;
- (c)具有 SEQ ID NO: 6 核苷酸 1-894 的核苷酸序列的核酸分子;
- (d)具有 SEQ ID NO: 7 核苷酸 1-817 的核苷酸序列的核酸分子;

- 15 (e)长度至少为 400 个核苷酸且至少有 90%序列与(c)或(d)所述的核酸分子相同的核酸分子; 和

- (f)具有互补于(a)、(b)、(c)、(d)或(e)的核酸分子的核苷酸序列的核酸分子。

- 20 11. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述的构建物还包含将所述第一核酸分子可操纵性连接于所述第二核酸分子的第四核酸分子, 所述的第四核酸分子是转运肽。

12. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述的构建物还包含将所述第一核酸分子可操纵性连接于所述第二核酸分子的第四核酸分子, 所述的第四核酸分子是内含子。

- 25 13. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述的异源核酸序列编码核酶。

14. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述的异源核酸序列编码多肽。

15. 如权利要求 14 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述的多肽具有除草剂抗性。

- 30 16. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述(f)部分的核酸分子长度至少为 800 个核苷酸。

17. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述第一核酸分子和第

二核酸分子以反义方向操纵性连接。

18. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述异源核酸序列编码单链的 Fv 抗体。

19. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述异源核酸序列编码潮霉素磷酸转移酶多肽。

20. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述异源核酸分子编码 5-烯醇丙酮酰基莽草酰基-3-磷酸合成酶多肽。

21. 如权利要求 8 所述的核酸构建物, 其特征在于, 所述异源核酸序列编码膦丝菌素乙酰转移酶多肽。

22. 一种转化的植物细胞, 其特征在于, 所述的植物细胞含有核酸构建物, 该核酸构建物包含可操纵性连接于异源核酸的脂肪酸去饱和酶基因的调节元件, 所述的调节元件启动所述的异源核酸的表达, 所述的调节元件选自:

(a)具有 SEQ ID NO: 4 核苷酸序列的核酸分子;

(b)具有 SEQ ID NO: 5 核苷酸序列的核酸分子;

(c)具有 SEQ ID NO: 4 核苷酸 5113-5796 的核苷酸序列的核酸分子;

(d)具有 SEQ ID NO:5 核苷酸 3197-3867 的核苷酸序列的核酸分子;

(e)具有互补于(a)、(b)、(c)或(d)所述的核酸分子的核苷酸序列的核酸分子;

和

(f)长度至少为 600 个核苷酸且至少有 90%序列与(a)、(b)、(c)、(d)或(e)所述核酸分子相同的核酸分子, 其中, 所述核酸分子能启动异源核酸分子在转化的植物细胞中表达。

23. 如权利要求 22 所述的转化的植物细胞, 其特征在于, 所述的植物细胞是双子叶植物细胞。

24. 如权利要求 23 所述的转化的植物细胞, 其特征在于, 所述的双子叶植物细胞是苜蓿、大豆、油菜籽或向日葵的细胞。

25. 如权利要求 22 所述的转化的植物细胞, 其特征在于, 所述的植物细胞是单子叶植物细胞。

26. 如权利要求 25 所述的转化的植物细胞, 其特征在于, 所述的单子叶植物细胞是玉米、小麦、黑麦、稻或高粱的细胞。

27. 如权利要求 22 所述的转化的植物细胞, 其特征在于, 所述(f)部分的核酸分子长度至少为 800 个核苷酸。

28. 如权利要求 22 所述的转化的植物细胞, 其特征在于, 所述(f)部分的核

酸分子至少有 95% 序列与(a)、(b)、(c)、(d)或(e)所述核酸分子相同。

29. 如权利要求 22 所述的转化的植物细胞，其特征在于，所述核酸分子具有 SEQ ID NO:4 的核苷酸序列。

植物脂肪酸去饱和酶启动子

5 发明领域

本发明涉及可用于在转基因植物中表达各种核酸分子的植物调节元件。

发明背景

10 用于植物基因工程的基本元件是能在各种植物组织中表达基因的。启动子元件所含的特异性序列指导形成转录复合物需要的蛋白质的结合，并使转录开始。组成型启动子如花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 和 19S 启动子，以及土壤杆菌属衍生的启动子如胭脂氨酸合成酶和章鱼氨酸合成酶启动子，已广泛用于在转化的植物中表达基因。

15 发明概述

本发明基于鉴定到植物脂肪酸去饱和酶基因的调节元件，该元件让异源核酸分子在植物细胞和植物中表达。因此，可产生含有营养价值增加的改良的脂肪酸组合物或改良的碳水化合物、蛋白质或次级代谢产物的植物。另外，也可用该调节元件在植物中产生新药物。

20 另一方面，本发明涉及一种分离的核酸分子，它包括脂肪酸去饱和酶基因的调节元件，所述的调节元件位于天然基因组中脂肪酸去饱和酶基因的 5'。所述的脂肪酸去饱和酶基因可以是例如芸苔属 *fad2D* 基因或芸苔属 *fad2F* 基因。

本发明还涉及一种分离的核酸分子，它具有 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列、SEQ ID NO: 4 的核苷酸 5113-5796、或 SEQ ID NO: 5 的核苷酸
25 3197-3867，以及这些核酸分子的互补序列。核酸分子的长度可至少为 100 个核苷酸(如 400、600 或 800 个核苷酸)，至少有 70% 序列(如 80%、90% 或 95%)与这些核酸分子相同。在一些实施例中，该分离的核酸分子包括 SEQ ID NO: 4 的核苷酸 5113-5796 或 SEQ ID NO: 5 的核苷酸 3197-3867。

30 本发明还涉及一种核酸构建物。这种构建物包括的第一核酸分子可操纵连接于第二核酸分子(与第一核酸分子是异源的)。第一个核酸分子包括脂肪酸去饱和酶基因的调节元件，所述的调节元件位于天然基因组中的脂肪酸去饱和酶基因的 5'。第一核酸分子启动异源的第二核酸分子的表达，第二核酸分子可编码如核酶

或多肽，如赋予除草剂抗性的多肽。

该核酸构建物还可包括可操纵连接于第二核酸分子 3'端的第三核酸分子。第三核酸分子包括脂肪酸去饱和酶基因的 3'非翻译区域，所述的 3'非翻译区域位于天然基因组中的脂肪酸去饱和酶基因的 3'。该第三核酸分子包括的核酸分子具有
5 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、的核苷酸序列、SEQ ID NO: 6 的核苷酸 1-894 或 SEQ ID NO: 7 的核苷酸 1-817，以及这些分子的互补序列。核酸分子的长度可至少为 100 个核苷酸，至少有 70% 序列与具有 SEQ ID NO: 6 的核苷酸 1-894 或 SEQ ID NO: 7 的核苷酸 1-817 的核酸分子相同。

该核酸构建物还可包括可操纵连接于第一和第二核酸分子的第四核酸分子，
10 所述的第四核酸分子是一转运肽或内含子。

另一方面，本发明涉及的分离的核酸构建物包括的第一核酸分子可操纵连接于第二核酸分子，这两个核酸分子是异源的。第一核酸分子包含脂肪酸去饱和酶基因的 3'非翻译区域，所述的 3'非翻译区域位于天然基因组中的脂肪酸去饱和酶基因的 3'。

15 本发明还涉及转化的植物细胞和转基因植物。该转化的植物细胞和转基因植物包含一核酸构建物。该核酸构建物包含可操纵性连接于一异源核酸的脂肪酸去饱和酶基因的调节元件，所述的调节元件启动该异源核酸的表达，所述的调节元件位于天然基因组中的脂肪酸去饱和酶基因的 5'。该转基因植物可以是双子叶植物(如苜蓿、大豆、油菜籽或向日葵)或单子叶植物(如玉米、小麦、黑麦、稻或高粱)。还涉及转基因植物的种子。

20 另一方面，本发明涉及 ATCC 登录号为 PTA-2535 的质粒 pMB102 和 ATCC 登录号为 PTA-2536 的质粒 pMB103。

除非另有指明，本文所用的所有技术和科学术语都具有本领域普通技术人员通常理解的含义。以下列出了适当的方法和材料，但可用许多与本文所描述的类似方法和材料或等价物来实施本发明。本文所引用的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献本文全部纳入作为参考。为避免冲突，本发明的说明书包括定义受限。另外，材料、方法和实施例仅起说明作用，无任何限制作用。

本发明的其它特征和优点通过以下的发明详述和权利要求而显而易见。

30 附图简述

图 1 质粒 pMB103 的模式图，其含有亚克隆入 pSP72 的 SalI 位点的蔓菁“桥(Bridger)”的 1-3A1A SalI 基因组 DNA 片段，本图表明了与 fad2D 编码序列相关

的 fad2D 启动子、fad2D 内含子和 fad2D 3'非翻译区域(UTR)。

图 2 质粒 pMB102 的模式图,其含有亚克隆入 pSP72 的 SalI 位点的蔓菁“桥”的 1-2A1A SalI 基因组 DNA 片段,本图表明了与 fad2F 编码序列相关的 fad2F 启动子、fad2F 内含子和 fad2F 3'非翻译区域(UTR)。

5 图 3 蔓菁 fad2D 启动子的核苷酸序列。

图 4 蔓菁 fad2F 启动子的核苷酸序列。

图 5 蔓菁 fad2D 3'非翻译区域的核苷酸序列。

图 6 蔓菁 fad2F 3'非翻译区域的核苷酸序列。

10 发明详述

本发明涉及一种分离的核酸分子,其包含编码脂肪酸去饱和酶(FAD)基因的调节元件。在天然基因组中,该调节元件位于脂肪酸去饱和酶基因(fad)的 5',如 fad1、fad2 或 fad3 基因,包括这些 fad 基因的内含子。例如,该调节元件可在芸苔属 fad2D、fad2F 或 fad2U 基因的上游。本文所述的“fad 基因的 5'”是指 fad 15 编码区域的 7000 碱基对(bp)中的序列。本文所述的“分离的”是指相应于脂肪酸去饱和酶基因的调节元件的核苷酸序列,但不含植物基因组中通常侧接于该调节元件一边或两边的序列。分离的调节元件可以是例如重组 DNA 分子,只要除去或缺失通常在天然基因组中发现的侧接于此重组 DNA 分子的一个核酸序列。因此分离的调节元件包括(但并不限于)作为分离的分子存在的、无侧翼序列的重组 20 DNA(如由 PCR 或限制性核酸内切酶处理产生的基因组 DNA 片段),和掺入一载体、一自主复制质粒的重组 DNA,或掺入一植物基因组 DNA 的重组 DNA(作为杂合体或融合核酸分子的一部分)。

以 Clustal 算法,用 MEGALIGN®(DNASTAR, Madison, WI)序列对比软件确定,蔓菁 fad2D、fad2F 和 fad2U 基因的编码区域在核苷酸水平上有 84-96%序列 25 相同。fad2D 和 fad2F 基因各编码胞质 δ -12 去饱和酶(也称为 FAD2),该酶参与油酸酶促转化成亚油酸。fad2D 和 fad2F 基因的序列见美国专利 No.5,850,026。fad2U 基因的核苷酸序列编码表明其也编码胞质 δ -12 去饱和酶。fad2U 基因的序列见 WO98/56239。另外, fad2U 可能编码胞质脂肪酸羟化酶、或环氧酶、或其它酶,因为编码这些酶的核酸与 fad2 基因家族是同源的。fad1 和 fad3 基因分别编码 δ -9 30 和 δ -15 去饱和酶。

本发明的调节元件是用 fad2D 的编码区域作为探针,从蔓菁品种“桥(Bridger)”的基因组 DNA 文库筛选分离的。图 3 的核苷酸序列(SEQ ID NO: 4)是

本发明调节元件的一个例子，其包括 *fad2D* 内含子 5'端上游的约 5800 个碱基对。

图 4 的核苷酸序列(SEQ ID NO: 5)是一调节元件，其包括 *fad2F* 内含子 5'端上游的约 3800 个碱基对。本发明的调节元件可具有从 SEQ ID NO: 4 和 SEQ ID NO: 5 所示的核苷酸序列衍生的核苷酸序列，并保留了启动核酸分子表达的能力。例如，

- 5 具有与 SEQ ID NO: 4 和 5 的核苷酸序列至少 70%相同的核酸序列能启动核酸分子的表达。在一些实施例中，该核酸序列可具有与 SEQ ID NO: 4 或 5 的核酸分子至少 80%、90%或 95%相同的序列。

通常，序列相同百分比是通过将相对比核酸序列中匹配位置数除以对比核苷酸总数，再乘以 100 计算的。匹配的位置是指相同的核苷酸位于相对比核酸序列的相同位置。排列对比核酸序列，用 MEGALIGN®(DNASTAR, Madison, WI,1997)

10 序列对比软件的 Clustal 算法计算相同性百分比。在该方法中，通过检验所有碱基对间的距离将序列排成组。Clusters 先对比碱基对，然后对比组。在排列对比中采用 100 为空隙罚分，2 为空隙长度罚分。

可制造保留启动感兴趣核酸分子表达能力的调节元件的片段。图 1 和 2 提供了产生片段的方便的限制性内切位点。例如，产生的 *fad2D* 调节元件的片段含有

15 SEQ ID NO: 4 的核苷酸 4581-5796 或 SEQ ID NO: 4 的核苷酸 5113-5796。*fad2F* 调节元件的片段可含有 SEQ ID NO:5 的核苷酸 2081-3867 或 SEQ ID NO: 5 的核苷酸 3197-3867。可用本文描述的方法检验这些片段启动核酸分子表达的能力。具体地说，可将该片段可操纵性连接于一核酸序列，用于瞬时或稳定转化一植物细胞。可用标准方法监测该核酸序列编码的基因产物在这种转化的植物细胞中的表达。

20

通常，调节元件片段的长度至少为 100 个核苷酸，例如长约 200、400、600 或 800 个核苷酸，且至少有 70%序列与 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 的核苷酸序列相同，或与它们的片段如 SEQ ID NO: 4 的核苷酸 5113-5797 或 SEQ ID NO: 5

25 的核苷酸 3197-3867 相同。在一些实施例中，这些片段至少有 80%、90%或 95%序列与 SEQ ID NO: 4 或 5 或它们的片段的核苷酸序列相同。也可将调节元件片段作为杂交探针或用于启动核酸分子的表达。已鉴定了不到 400bp 的调节元件，其能启动植物中核酸分子的表达。例如，在缺失了转录起始上游的 290bp 的核苷酸(该区域相应于翻译起始的 358 核苷酸)后，一酰基载体蛋白(ACP)保留了功能。蔓菁

30 ACP 启动子的分离及其使用见欧洲专利-91303098 和美国专利 NO.5,767,363。在转录起始 140bp(该区域相应于翻译起始的 167 核苷酸)缺失后，拟南芥属质体(plastidial)乙烯基辅酶 A 羧化酶的生物素羧化酶亚基保留了功能启动子。另外，

转录起始位点 47bp 的缺失不改变种子表达烯酰基-ACP 还原酶启动子, 表明在这个小区域存在种子高水平表达所需的所有元件。

本文所公开的调节元件的片段可在高度严谨条件下与 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 或它们的片段杂交。杂交通常包括 Southern 分析(Southern 印迹)。见如
5 Sambrook 等人, 1989, “Molecular Cloning, A Laboratory Manual”第二版, Cold Spring Harbor Press, Plainview: NY, 的第 9.37 和 9.52 章节。高度严谨条件包括用低离子强度和高温洗涤, 例如 0.015M NaCl/0.0015 M 柠檬酸钠(0.1X SSC)、0.1%十二烷基硫酸钠(SDS), 65°C。另外, 在杂交时可用变性试剂如甲酰胺, 例如含 0.1%牛血清白蛋白的 50%甲酰胺/0.1%聚蔗糖/0.1%聚乙烯吡咯烷酮/50mM 磷酸钠(pH6.5)和
10 750mM NaCl、75mM 柠檬酸钠(42°C)。另一例子是用 50%甲酰胺、5X SSC(0.75M NaCl、0.075 柠檬酸钠)、50mM 磷酸钠(pH 6.8)、0.1%焦磷酸钠、5X Denhardt 溶液、超声处理过的鲑鱼精子 DNA(50µg/ml)、0.1% SDS 和 10%葡聚糖硫酸酯(42°C), 用 0.2X SSC 和 0.1% SDS 洗涤(42°C)。

也可从基因组 fad 基因的 5'侧翼序列克隆本发明的调节元件, 或用其它方法
15 获得, 包括化学合成和聚合酶链式反应(PCR)技术。PCR 指扩增靶核酸的一种方法或技术。通常用感兴趣区域终端或其前的序列信息来设计寡核苷酸引物, 该引物与待扩增模板相反链的序列相同或相似。可用 PCR 扩增 DNA 以及 RNA 的特异性序列, 包括基因组总 DNA 或细胞总 RNA 的序列。引物长度通常为 14-40 个核苷酸, 但其长度范围也可从 10 个核苷酸到数百个核苷酸。例如 PCR Primer: A
20 Laboratory Manual, Dieffenbach C. 和 Dveksler, G., 编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 中描述了 PCR。可用连接酶链式反应、链置换扩增、自身支持的序列置换或基于核酸列的扩增。见例如 Lewis, R. Genetic Engineering News, 12(9):1(1992); Guatelli 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874-1878(1990); 和 Weiss, R., Science, 254:1292(1991)。

25

核酸构建物

本发明的调节元件可用于在植物中表达核酸分子。本文所用的“异源核酸分子”是指脂肪酸去饱和酶 5'调节元件以外的核酸分子, 其结合的编码序列, 且包括对该植物是部分或完全异源(即外源的)性的外源核酸, 或对植物的内源核酸分子是同源的外源核酸。可以有义或反义取向连接调节元件和异源核酸分子。本文
30 所用的“可操纵性连接”是指以可能发生转录或翻译的方式(即利于产生多肽或 RNA 分子的方式), 将两个或多个核酸分子共价连接。

用完整的 cDNA 序列以及部分 cDNA 序列, 可用反义 RNA 抑制植物靶基因。也有证据表明 3'非编码序列片段和 5'编码序列片段在反义抑制中起重要作用。反义核酸构建物包括可操纵性连接于(反义方向)感兴趣核酸分子(与调节元件是异源的)的本发明的调节元件。

- 5 可用以有义方向可操纵性连接的构建物来抑制内源基因的表达。用全长 cDNA 序列以及部分 cDNA 序列进行共抑制是本领域已知的。见如美国专利 No.5,231,020。

- 10 异源性核酸分子可编码例如设计的核酶来切割特定的 mRNA 转录物, 从而防止某多肽的表达。可用锤头核酶来破坏特定 mRNA, 也可用各种核酶在位点-特异性识别序列上切割 mRNA。锤头核酶切割 mRNA 的位点是由形成与靶 mRNA 互补碱基对的侧翼区域指定的。唯一的要求是靶 RNA 含有 5'-UG-3'核苷酸序列。构建物和锤头核酶的产生是本领域熟知的。见如美国专利 No.5,254,678。可将锤头核酶序列嵌入一稳定的 RNA 如转运 RNA(tRNA)中, 以增加体内的切割效率。Perriman, R 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA92(13):6175-6179 (1995); de Feyter, R 和
- 15 Gaudron, J., Methods in Molecular Biology, Vol.74, 第 43 章, “植物中核酶的表达”, Turner P.C.编辑, Humana Press Inc., Totowa, NJ。RNA 内切核糖核酸酶如噬热四膜虫中的, 以及那些由 Cech 和其合作者详细描述的都是有用的。见例如美国专利 No.4,987,071。

- 20 异源核酸分子也可编码多肽。本文所用的“多肽”指氨基酸链, 无论其长度或翻译后的修饰。多肽可包括调节生长、激素产生、光合作用的效率、营养价值和油或蛋白成分的酶或其片段, 或受体多肽, 如绿荧光蛋白、新霉素磷酸转移酶 II、或 β -葡糖醛酸酶。多肽也可提供对环境应力的抗性, 如对干旱、寒冷、病原体、昆虫或除草剂的抵抗力。可在植物中表达苏云金芽孢杆菌毒素基因, 以提供对昆虫的抗性。见如美国专利 No.5,380,831。表达编码 5-烯醇丙酮酰基莽草酰基
- 25 (enolpyruvylshikimate)-3-磷酸合成酶(EPSPS)多肽和 膦丝菌素乙酰基转移酶(PAT)多肽的核酸分子, 分别提供对草甘膦和 glufosinate 的除草剂抗性。例如见美国专利 No.4,940,835 和 5,489,520。另外, 对草甘膦和 glufosinate 的抗性也可通过在植物物质体中表达编码潮霉素磷酸转移酶(HPH)多肽的核酸或假单胞菌属的 glpA 和 glpB 基因来提供。例如见 WO99/05265。对咪唑啉类除草剂的抗性可通过表达编
- 30 码羧乙酸合成酶多肽的核酸分子来提供, 例如见美国专利 No.4,761,373。通过在玉米中表达编码除草剂抗性乙酰辅酶 A 羧化酶多肽 (ACC1 和 ACC2)的核酸分子, 可提供对环己二酮或芳氧基苯氧基丙酸类除草剂的抗性。如见 WO98/08963 和

Herbert 等人, Pestic.Sci., 1997,50:67-71。抗卟啉(porphyrin)除草剂的原卟啉原氧化酶多肽的表达提供了除草剂对原卟啉原抑制除草剂的抗性。如见 WO98/29554。对苯酰基环己二酮类除草剂的抗性可通过表达编码抗 4-羟苯基丙酮酸双加氧酶多肽除草剂的核酸分子来提供。如见 Barta 和 Boger, Pestic. Sci., 1996,48(2):109-116; 5 WO98/02562; 和 WO99/24586。除草剂抗性也可由编码单链 Fv 抗体(能结合除草剂)的核酸分子的表达来提供。对病毒衣壳蛋白有特异性结合亲和力的单链 Fv 抗体在植物细胞液中的表达, 能提供对病毒病原体的抗性。如见 Conrad 和 Fiedler, Plant Mol. Biol., 1998,38(1&2):101-109 和 WO98/42852。

本发明的核酸构建物还包括编码 3'非翻译区域(3'UTR)的核酸分子, 通过在转
10 录的 mRNA 序列的 3'端添加多个腺苷酸核糖核苷酸, 增加转录序列的稳定性。
3'UTR 可以是胭脂氨酸合成酶(NOS)的 3'UTR 或 fad 基因的 3' UTR, 在天然基因组中位于 fad 编码序列的 3'。本文所用的“3'”指 fad 编码区域下游的 4000bp 或更少的序列(如约 2000bp 或更少)。如本文所述, fad2D 和 fad2F 基因的 3'UTR 是分离的, 且分别具有图 5(SEQ ID NO: 6)和图 6(SEQ ID NO: 7)列出的核苷酸序列。
15 fad2D 和 fad2F 的 3'非翻译区域的一部分与各种植物品种的肌动蛋白基因是同源的。在 pMB103 中, 肌动蛋白同源区域自核苷酸 9341(5'端)开始, 在核苷酸位点 8846(3'端)结束。在 pMB102 中, 肌动蛋白同源区域在核苷酸 7491(5'端)开始, 在核苷酸位点 7007(3'端)结束。可产生 SEQ ID NO: 6 和 7 的核酸分子片段, 例如包含 SEQ ID NO: 6 的 1-894 核苷酸或 SEQ ID NO: 7 的 1-817 核苷酸的核酸片段, 其
20 不包括部分肌动蛋白基因。也可产生长度至少为 100 个核苷酸, 且有至少 70%序列与 SEQ ID NO: 6 的 1-894 核苷酸或 SEQ ID NO: 7 的 1-817 核苷酸序列相同的其它片段, 用于本发明的构建物。例如, 可将 fad 基因的 3'UTR 连接于一异源核酸分子的 3'端, 其还可连接于任何 5'调节元件, 包括 35SCaMV 启动子。

核酸构建物也可包含元件如可诱导元件、内含子序列、增强子序列或靶序列。
25 这些元件对异源核酸分子的功能而言不是必须的, 虽然它们能提供较好的表达或让核酸分子靶向特定的细胞器(如质体)。例如, 为提高表达, 可提供核酮糖二磷酸羧化酶小亚基的 5'UTR。可用编码核酮糖二磷酸羧化酶或其它质体靶蛋白质小亚基的运输肽的核酸分子, 使编码的产物靶向质体。见美国专利 No.5,925,806 和 Tingey 等人, J.Biol.Chem., 1988,263(20):9651-9657。适用于本发明的内含子包括
30 fad2D 和 fad2F 内含子。WO98/56239 中公开了 fad2D 内含子的序列。

由 fad 基因 5'调节元件控制的核酸分子表达的时间不同于由 ACP 或 napin 启动子控制的核酸(以相应天然基因的不同表达为根据)。另外, fad5'调节元件的表

达和调节水平与 napin 和 ACP 启动子的不相同。在调节外源或内源基因的表达中，fad 基因的 5'调节元件优于其它启动子。

令人惊讶的是，fad2D 和 fad2F 基因的启动子能在许多不同的植物中表达核酸分子。如上述鉴定的导致 canola(低芥酸菜籽)植物种子中油酸含量改变(而根和叶子中含量没有改变)的 fad2D 突变体基因，希望 fad2D 基因特异性表达在植物种子中。另外，当在低温或在田地中培养时，含 fad2D 和 fad2F 基因点突变的 canola 植物的种子中含有高达 85%油酸。这些植物根中显示改变的脂类组合物与种子中油酸含量类似。基于这些数据，认为种子和根都表达 fad2F，而 fad2D 在种子中表达。如本文所述，根中表达的 fad2D 水平甚至比 fad2F 水平高(基于 RT-PCR 分析)。可用本发明的调节元件指导感兴趣基因在适当发育阶段和相应于内源性 fad2D 和 fad2F 表达的组织中的表达和共抑制。

在指导芸苔属和大豆叶子以及芸苔属胼胝体中 β -葡萄糖醛酸酶(GUS)的瞬时表达方面，本发明的调节元件与 35S 启动子类似。在芸苔属根和胚胎组织中，fad2D 和 fad2F 启动子表达 GUS 的水平比 35S 启动子高。另外，fad2F 启动子在指导玉米叶子 GUS 表达的水平与 35S 启动子类似。这意味除在双子叶植物中表达外，fad2F 启动子可用于在单子叶植物中表达感兴趣的基因。

转基因植物

如本文所述，可通过将至少一个核酸构建物引入植物细胞获得转基因植物。适合的植物包括双子叶植物如苜蓿、大豆、油菜籽(高芥酸和 canola)或向日葵，以及单子叶植物玉米、小麦、黑麦、稻或高粱。可培养转基因植物产生种子，自交(或杂交和自交)，以得到含构建物的纯合植物。可以分析种子以鉴定那些具有所需的构建物表达的纯合子。可将转基因植物引入繁殖程序，如增加种子、将新的构建物逐渐渗入其它品系或属、或进一步选择其它理想性状。另外，也可通过营养繁殖转化的植物细胞得到转基因植物(对那些适合于这些方法的品种)。

本文所述的转基因植物还指初始转基因植物的后代。所述的后代包括特定植物或植物系的后代，如直接从植物发育得到的种子。植物的后代也包括 F_1 、 F_2 、 F_3 形成的种子和及其后代植物，或 BC_1 、 BC_2 、 BC_3 形成的种子及其后代植物。

本发明所用的转基因方法包括，但并不限制于，土壤杆菌属介导的转化、电穿孔法和粒子枪转化。PCT 专利申请 No.99/04117(芸苔属的粒子轰击)和美国专利 5,188,958(土壤杆菌属)中描述了转化方法的实例。用土壤杆菌亚类的 Ti 和 Ri 质粒的转化方法通常用双类型的载体。Walkerpeach, C 等人, Plant Molecular Biology

Manual, S.Gelvin 和 R.Schilperoort 编辑, Kluwer Dordrecht, C1:1-19(1994)。若将细胞或组织培养物作为转化的接受组织, 可用本领域技术人员已知的方法从转化的培养物中再生植物。

5 本发明的转基因植物可用于各种商业和研究目的, 本发明的调节元件可用于表达感兴趣的异源核酸分子。由于转基因植物细胞能在培养中能连续繁殖, 所以是有用的。这些培养物可用于在体外生产各种有用材料, 如二级代谢物和香精油。

以下实施例进一步描述了本发明, 但对本发明在权利要求书所定的本发明范围无任何限制。

10 实施例

实施例 1-启动子序列的鉴定

通过与 *fad2D* 编码区域的杂交, 筛选蔓菁品种 “Bridger” 的基因组 DNA 文库(300, 000 噬斑)。在第三轮筛选中鉴定到约 16 个阳性噬斑, 然后纯化。用各种限制性内切酶作 16 个阳性噬斑的噬菌体 DNA 图, Southern 分析用 *fad2D* 编码区域作探针。将两个噬斑(克隆 1-3A1A 和 1-2A1A)的阳性基因组 DNA 片段(用 *Sal*I 消化产生的, 用 Southern 分析鉴定), 分别亚克隆入 pSP72 载体的 *Sal*I 位点, 产生质粒 pMB103 和 pMB102(图 1 和 2)。质粒 pMB102 和 pMB103 保藏于美国典型培养物保藏中心, ATCC 登录号分别为 PTA-2535 和 PTA-2536。用各种限制性内切酶作 pSP72 中亚克隆的 *Sal*I DNA 片段的图谱。

20 用 PCR 验证了在 pMB103 和 pMB102 的亚克隆 *Sal*I DNA 片段中存在 *fad2D* 和 *fad2F*。反应条件包括 5 μ l 10X PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})(Boehringer Mannheim, 带有 Taq 聚合酶)、1 μ l 10mM dNTP(Boehringer Mannheim, 产品编号 # 1 051 458, 1 051 440, 1 051 466 和 1 051 482)、1 μ l 10 μ M *Fad2D* RT-1(caucaucaucauACCGCTACGCTGCTGTCCAA, SEQ ID NO: 1)或 1 μ l 10 μ M *Fad2F*-RT2(caucaucaucauCTCTTCCGTTACGCCTTCACGTAC, SEQ ID NO: 2)、1 μ L 10 μ M BS4(caucaucaucauCATAACTTATTGTTGTACCAG, SEQ ID NO: 3)、0.5 μ l Tag DNA 聚合酶(Boehringer Mannheim 分案号 1647679)、40.5 μ L ddH₂O 和 1.0 μ l 10ng/ μ l DNA 模板。将样品加热到 95 $^{\circ}$ C 4 分钟, 然后扩增 30 轮: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 65 $^{\circ}$ C 退火 2 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 分钟, 然后 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 分钟。*Fad2F*RT-1 和 BS-4 引物对特异性扩增 *fad2F* 基因, 而 *Fad2D*RT-1 和 BS-4 特异性扩增 *fad2D* 基因。产生的反应产物与含 *fad2F* 基因的 1-2A1A 片段和含 *fad2D* 基因的 1-3A1A 片段一致。

另外, 用根据 *fad2D* 和 *fad2F* 编码区域合成的引物测定 1-2A1A 和 1-3A1A

克隆的序列。用 ABI PRISM310(Perkin Elmer)测序仪、AmpliTaq DNA 聚合酶和染料终止剂进行 DNA 测序(如制造商所述)。鉴定到 1-2A1A 和 1-3A1A 基因组克隆中的编码序列与先前 fad2F 和 fad2D 编码区域测定的序列相同,证实了 1-2A1A 和 1-3A1A 片段分别含有 fad2F 和 fad2D 基因。从每个构建物得到基因组 DNA 片段的完整核苷酸序列,并在图 3 和 4 中列出。这两个克隆的翻译“ATG”密码子起始处上游四个核苷酸处存在有一个内含子。

用消化 pMB102 和 pMB103 的 SalI 和 PpuMI 限制性内切酶,来分别产生约 3.9kB 和 5.8kB 的 DNA 片段,它们含有启动子但无内含子或编码序列。将限制性内切酶消化释放的 DNA 片段在琼脂糖凝胶中分辨和纯化(如制造商所述, Qiagen)。将纯化的片段连接入 pMB160 的 SalI/SmaI 位点,其含有克隆入 pSP72 的 XbaI/EcoRI 位点的 GUS-NOS DNA 片段,以分别得到新质粒 pMB168 和 pMB166。如制造商(BRL)所述,用 T4 DNA 连接酶进行 DNA 的连接,然后在 DH5 α 细菌细胞中增殖。将 fad 基因的 5'调节元件置于 pMB160 中,从而该调节元件能推动 GUS 的表达。

用 MEGALIGN®(DNASTAR, Madison, WI)序列排列对比软件和 Clustal V 方法和算法(Higgins 和 Sharp, *Gene*, 1988, 73(1)237-44; 和 *Comput. Appl. Biosci.*, 1989, 5(2):151 -153)比较 pMB166 和 pMB168 启动子区域的核苷酸序列。在多个对比中以 100 为空隙罚分, 2 为空隙长度罚分。两两对比的参数包括 Ktupe(2)、以 5 为空隙罚分、4 窗口 4 对角线。pMB166 和 pMB168 中 fad2D 和 fad2F 启动子的对比,分别鉴定出有 86.4%相同的一个区域。fad2D 启动子(图 3, SEQ ID NO: 4)中该区域分别起始和结束于 4940 和 5796 核苷酸, fad2F 启动子(图 4, SEQ ID NO: 5)中该区域分别起始和结束于 3132 和 3867 核苷酸。看来这个保守的区域含有两种启动子全部功能的所有必须元件(见实施例 3)。用相同的计算机程序和参数排列对比 fad2D 和 fad2F 内含子核苷酸序列。这两个内含子有 73%是相同的。

25 实施例 2-RT-PCR 分析 Fad2F 和 Fad2D 在不同植物组织中的表达:

RNA STAT-60 RNA 分离:从温室中培育 2 周的蔓菁(Westar 品种)的叶子和根分离 RNA,并从田间生长的蔓菁 IMC129 开花后第 10、20、30、30-50 和 45-55 天收集的种子中分离 RNA。美国专利 No.5,668,299 中描述了 IMC129。在提取 RNA 前, -70℃保存样品。按 RNA STAT-60 产品说明(Tel-Test®B"简报 No.1)进行 RNA 的分离。每 2ml 试剂用于约 200mg 组织。在液氮下,用研钵和研杵研磨组织,加入试剂,在提取前用 polytron 匀化器匀化。见 Chomczynski 和 Sacchi, *Anal. Biochem.*, 1987, 162:156-159;和 Kedzierski 和 Porter, *Biotechniques*, 1991, 10:210-214。

5 逆向转录：制备单链 cDNA 反应混合物，含有 10 μ l 5X 单链缓冲液(BRL)、5 μ l 各种 dNTP(5mM)、1 μ l 寡 dT₍₁₂₋₁₈₎引物(0.5mg/ml)、1 μ l p₆d(N)₆引物(0.5mg/ml)、1 μ l RNA(共 1-2 μ g)和 28 μ l dH₂O。65℃培育此反应混合物 2 分钟后，在室温中冷却到 35℃，加入 2 μ l 100mM DTT、1 μ l RNasin(Promega)和 1 μ l Superscript II 反转录酶 (BRL)，混合。再将反应物在 25℃培育 5 分钟，30℃培育 5 分钟，37℃培育 60 分钟。用 2.5 μ l 第一链 cDNA 反应混合液或 0.5 μ g pMB102 或 pMB103 DNA 构建物、0.5 μ l 10X PCR 缓冲液 II(Perkin-Elmer)、2.5 μ l 各 dNTP(5mM)、1.0 μ l 上游引物(共 50 μ M)、1.0 μ l 下游引物(共 50 μ M)、0.5 μ l Amplitaq 聚合酶(Perkin-Elmer)和 37.5 μ l dH₂O(共 50 μ l)进行 PCR。反应条件包括 94℃、15 秒变性，60℃、30 秒退火，和 10 72℃、60 秒延伸共 35 轮。所用的引物包括下游引物 BS-4(SEQ ID NO: 3)和 FadD-RT1 或 Fad2F-RT2(分别为 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2)作为上游引物。

15 扩增产物为 fad2D 和 fad2F 的 434 个核苷酸，并用琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色检测。用 BalI 或 SspI 限制性内切酶消化证明了扩增产物的特异性。BalI 限制性消化产生 fad2D 的 274 和 160 碱基对的片段，而 SspI 消化产生 fad2F 的 234 和 200 碱基对的片段。RT-PCR 数据表明 fad2F 和 fad2D 基因在所有检验的组织中表达，包括叶子、根和种子，但 fad2D 基因的表达水平比 fad2F 基因高。这一数据与下述 fad2F 和 fad2D 启动子分析相关。

20 实施例 3-fad2D 和 fad2F 启动子分析：在 fad2D 启动子(pMB166)调控下，在 fad2D 启动子 5'缺失(pMB179 和 pMB180)调控下、在 fad2F 启动子(pMB168)调控下、在 fad2F 启动子 5'缺失(pMB167 和 pMB176)调控下，或在 35S 启动子(pMB146)调控下，制备含有 GUS 报告基因无启动子(pMB160)的构建物。

表 1
质粒的描述

质粒	描 述	启动子长(bp)
pMB103	从“Bridger”基因组文库分离得的 1-3A1A SalI 基因组 DNA 片段, 含有 fad2D 基因和启动子。将此片段亚克隆入 pSP72 载体的 SalI 位点。	
pMB102	从“Bridger”基因组文库分离得的 1-2A1A SalI 基因组 DNA 片段, 含有 fad2F 基因和启动子。将此片段亚克隆入 pSP72 载体的 SalI 位点。	
pMB166	将 pMB103 构建物的 SalI 和 PpuMI(平头的)DNA 片段(含有 fad2D 内含子上游基因组 DNA 序列)连接到 pMB160 构建物的 SalI 和 SmaI 位点。	5800
pMB179	用 PstI 消化 pMB166 构建物并再连接, 以除去上游启动子区域。	683
pMB180	用 HindIII 消化 pMB166 构建物并再连接, 以除去上游启动子区域。	1215
pMB168	将 pMB102 构建物的 SalI 和 PpuMI(平头的)DNA 片段(含有 fad2F 内含子上游基因组 DNA 序列)克隆到 pMB160 构建物的 SalI 和 SmaI 位点。	3800
pMB167	用 PvuII 消化 pMB168 构建物并再连接, 以除去上游启动子区域。	1786
pMB175	用 PstI 消化 pMB168 构建物并再连接, 以除去上游启动子区域。	670
对照质粒		
pMB146	用 HindIII 和 EcoRI 消化, 从 pBI121 二元(binary)载体(Clontech)释放 35S-GUS-NOS DNA 片段, 然后亚克隆入 SP72 的 HindIII 和 EcoRI 位点。	
pMB160	用 XbaI 和 EcoRI 消化, 从 pBI121 二元(binary)载体(Clontech)释放 GUS-NOS DNA 片段, 然后亚克隆入 SP72 的 XbaI 和 EcoRI 位点。该质粒不含启动子	

生物弹射(biolistic)转化后, 根据在各种植物组织中驱动瞬时 GUS 表达的能力, 评价各种启动子-GUS 构建物的强度。见 PCT 申请 No.99/04117, 其描述了芸苔属的生物弹射转化。用于粒子轰击的装置是 Biolistic PDS-1000/He 系统 (Dupont)。粒子轰击步骤用 0.6 μ m 金粒子按照 Bio-Rad US/EG Bulletin 1689 进行。

- 5 每次轰击送递约 2 μ g DNA。轰击后, 培养组织或将它们保存在潮湿环境中 24 小时, 如 PCT 申请 No.99/04117 所述, 然后染色测定 GUS 表达。Stopm 在 Gus Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, Sean R. Gallagher(编辑), 1992, 第 103-13 页, Academic Press, San Diego, California 中描述了 GUS 染色方法。

- 用评分系统 0-5, 估计 GUS 染色的启动子长度。“0”表示未观察到蓝色点;
10 “1”表示观察到 1-10 个蓝色点; “2”表示观察到 11-100 个蓝色点; “3”表示观察到 101-1000 个蓝色点; “4”表示观察到 1001-5000 个蓝色点; “5”表示观察到的蓝色点>5000 个。用小麦和大豆作了 1-4 个实验。用芸苔属、玉米和向日葵作了 2-8 个实验。表 2 列出了在实验中观察到的最高评分。

- 用 pMB160 构建物评价 GUS 基因的背景表达。在芸苔属的叶子、小孢子胚
15 胎和根中, 按所检验的组织不同 GUS 的背景表达从 0-1 不等。在大豆叶子中测得的 GUS 背景表达水平为 1-2。

- pMB168 构建物中的 fad2F 启动子(3866bp)在芸苔属(蔓菁和蔓芥子)的叶子、根、小孢子胚胎、培养的组织、子叶和下胚轴中, 瞬时表达 GUS 的评分水平分别为 5、2、2、3 和 2。在大豆叶子(评分为 5)和向日葵叶子(评分为 3)中观察到高 GUS
20 表达。fad2F 启动子能指导玉米叶子中 GUS 的表达评分为 1。

- 当用 fad2F 启动子的片段时, 也得到了 GUS 表达。已缺失 5' 1800 核苷酸的 pMB167 构建物的 fad2F 启动子(剩下 SEQ ID NO: 5 的核苷酸 2081-3867), 在芸苔属叶子、小孢子胚胎和培养的组织中瞬时表达 GUS, 评分分别达到 4、2 和 2。pMB175 构建物的 fad2F 启动子(SEQ ID NO: 5 的核苷酸 3197-3867)在芸苔属叶子
25 和小孢子中瞬时表达 GUS 的水平评分分别达到 3 和 1。pMB167 和 pMB168 构建物的 fad2F 启动子以类似水平瞬时表达 GUS, 而用 pMB175 构建物检测到较低的 GUS 瞬时表达。这些数据表明 pMB168 的 fad2F 启动子具有指导 GUS 瞬时表达所需的所有元件, 而没有减少表达水平(用全启动子构建物 pMB167 观察到的)。用 pMB175 构建物观察到的较低 GUS 活性可能表明已除去了影响启动子结构的
30 活性元件或区域。

pMB166 构建物的 fad2D 启动子(5800bp)在芸苔属叶子、根、小孢子胚胎和培养组织中瞬时表达 GUS 的水平分别达到 4、1、2 和 3。也在大豆叶子中达到“3”

表达水平。

fad2D 启动子片段也表达 GUS。pMB179 构建物的 fad2D 启动子(685bp,SEQ ID NO: 4 的核苷酸 5113-5796)在芸苔属叶子中瞬时表达 GUS 至多达到级别 3(取决于组织发育的阶段)。pMB 构建物的 fad2D 启动子(1216bp,SEQ ID NO: 4 的核苷酸 4581-5796)在芸苔属叶子中瞬时表达 GUS 的水平达到级别 4(取决于所用组织的发育阶段)。pMB180 和 pMB166 构建物的 fad2D 启动子瞬时表达 GUS 的水平相似,表明 pMB180 启动子具有指导 GUS 瞬时表达所需的所有元件。用 pMB179 构建物观察到略微较低的 GUS 活性,表明可能已除去影响启动子结构的活性元件或区域。

10 作为对比,用 35S 启动子检验了 GUS 的表达。35S 启动子在芸苔属叶子、小孢子胚胎和培养组织中瞬时表达 GUS 的水平达到的级别分别为 5、1 和 2。但 35S 启动子不能在根中表达可检测的 GUS 活性(表 II)。在玉米和小麦叶子、大豆叶子和向日葵叶子中观察到表达水平分别为 2、5 和 3。

15 pMB166 和 pMB168 的 fad2D 和 fad2F 启动子在不同植物组织(表 II)中指导了 GUS 报导基因的瞬时表达强度相似。如上述 RT-PCR 分析表明 fad2D 基因的表达比 fad2F 高。fad2D 和 fad2F 基因内源性表达和 fad2D 和 fad2F 启动子瞬时分析之间的差异,可能是由内源性 fad2D 和 fad2F 转录物半衰期(half-live)的差异造成的。另外, fad2D 和 fad2F 转录物的内源性表达可能受染色体结构的影响。

20 本文所述的数据提供了 fad2D 和 fad2F 启动子是功能性的,且可用于在所有植物组织中表达感兴趣的基因(瞬时和稳定转化后)的证据。

表 II
粒子轰击后用 GUS 瞬时表达测定不同启动子的 GUS 分析

品种	组织	35S (pMB146)	Fad2D (pMB166)	Fad2D5'△ (pMB179)	Fad2D5'△ (pMB180)	Fad2F (pMB168)	Fad2F 5'△ (pMB167)	Fad2F 5'△ (pMB175)
蔓芥子	嫩叶子	4	-	-	-	5	-	-
蔓菁	子叶和下胚轴	3	-	-	-	2	-	-
	根	0	1	-	-	2	-	-
	细胞培养物	2	3	-	-	3	2	-
	小孢子胚胎	1	2	-	-	2	2	1
	叶子	5	4	3	4	4	4	3
玉米	叶子	2	-	-	-	1	-	-
大豆	叶子	5	3	-	-	5	-	-
向日葵	叶子	3	-	-	-	3	-	-
小麦	叶子	2	-	-	-	0	-	-

“-” = 未测试

实施例 4-转基因植物中启动子的活性：在 fad2D 或 fad2F 启动子的调控下，用 GUS 报告基因构建了 pMB177 和 pMB178 双载体。也可制备类似的含有编码 HPH、NPTII 或 PAT 核酸分子的构建物。

- 5 用土壤杆菌转化，用上述双构建物在 canola 植物中进行稳定的整合。评价转基因植物在不同发育阶段，各种组织中 GUS 活性。将 fad2D 和 fad2F 启动子调控下，GUS 的表达与无启动子的 GUS 表达和在 napin 启动子调控下 GUS 的表达(用相同的载体骨架)比较。分别在含潮霉素、卡那霉素或 glufosinate 的培养基上选择用 HPH、NPTII 或 PAT 双构建物产生的转化体。将潮霉素、卡那霉素或 glufosinate 抗性的转化体在植物中再生，并进入繁殖程序。

10

其它实施例

易于理解已用详述的实施例联合描述了本发明，上述描述仅起说明作用，对本发明的范围无任何限制作用，本发明的范围由权利要求书明确。本发明的其它方面内容、优点和改进都在权利要求书的范围之内。

序列表

	<110> Shorrosh, Basil	
5	<120> 植物脂肪酸去饱和酶启动子	
	<130> 07148/093001	
10	<150> 60/095,317 <151> 1998-08-04	
	<160> 7	
15	<170> FastSEQ for Windows Version 3.0	
	<210> 1	
	<211> 32	
	<212> DNA	
20	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
25	<400> 1	
	caucaucauc auaccgctac gctgctgtcc aa	32
	<210> 2	
	<211> 36	
30	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
35	<400> 2	
	caucaucauc auctcttccg ttacgccttc acgtag	36
	<210> 3	
40	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
45	<223> 引物	
	<400> 3	
	cuacuacuac uacataactt attgttgtac cag	33
50	<210> 4	
	<211> 5796	

<212> DNA

<213> 蔓菁

<400> 4

5	tcgacctgca ggtcaacgga tctggtttta tggatacttt cgtgcactgg ttttaagatgc	60
	aatgtttgac acattttctca acgtcggttg aaagagaaat ttgtgccgaa aacatcatta	120
	tacatatagc tactatcatg aaaatagtc atgaattttt aaaattttga gttttcataa	180
	tgtatatatg attacaacaa atgtgaaata tgtattagtt tagtcatttt tagatcgtga	240
	acaagatgat tctgaaatta tgttagtcct ggtgaattat atagtaaagt aaattatggg	300
10	tatttttaga aatttgtttt agcttgtttg ttgttgtttt ttaatgtata tacatcgatt	360
	aagttgtgtg gaacttacct atattttgtt gtgctagcta tctaaccatt ttttggtata	420
	acaataaaat atatcctttt ttatcagcag caataagata tatttttggg taattattat	480
	agttatattt aaaaatttaa ataatatcat actattatgt caaaactttg tgatctaaac	540
	acaaaaacta ttttactaaa attttcacat aattcaagtt atattatgta ttttttaaat	600
15	taaacttttag ttttatcatt tgttatatgt tttacttttg gttctcaatt ttaaaaaatc	660
	attatggttt tctatttttt tgaattttt tcaaatttga aatttgtagc ttgaacaatt	720
	atatttcttg taagatatat atatatatat atatatatat atatatatat atactgactt	780
	tcactgcttc gttttcaaca aaataattta gtttctacat aaatatacag taattttgta	840
	agatgatttt cctcttttaa attttttttg ttgtgtacct aaccaaacccg acccggtgtc	900
20	cgaagtgtt agagctaaaa acccattcgg tatttgcttg gtcccgttac cgaaccggac	960
	ccattatttc ggttcggtt aagggtgtga ctctgtttta agttaaaaaac gtccagccct	1020
	aaggtaaatt ataaaacatt ggttggtgtg ctgtctctc ggtaggaaa acataataga	1080
	atccgaactt actagaccag tacgcgattt attttctgc ttacgtcgta agatgtcgaa	1140
	taaggaacaa gcaacgtcat tatacatggt aaccgtatca aaggaatcga aacagcctca	1200
25	tcttgcaat ccggttatct tccatccttt ttccaggaca ctccggttta ctttttgtt	1260
	tgttcgatac gtcactccgg tttaaatcga atttaaaaaa aaaaatcggg aagagttagg	1320
	aaaaaaaaag aaaatctcat ctccaccggt caccctcgac gacaagacaa caccaccctt	1380
	agggttaaaa aggtttattt atcttattac tagggctcggc ccgccctacg ggcgggatat	1440
	tagttaattt gatattcact aaatgctcga gttgaaattt gttttaagat ttaagaattt	1500
30	ggttatctgt tatgtcttac ttattagtat gcggtggtat agttgtttt cgattattct	1560
	tgctttggta ttgtatcaaa ttaactaatt gtataactca taattataga tgtacaaatg	1620
	tagatttggtg ataaagtctg atgacaatac tgtttttttt ttaattttta ttcatagtg	1680
	agtgtgcatg tgtcagaaag aagcctgtaa caacttttat gtttttgtgt atggatttta	1740
	aatatatatt attttgata atgcatactt gtctacaac atttgcttgt agactaaaaa	1800
35	aattgttttt tatattttta aaagagaaaa tatttagtct agaataaac atgcacatat	1860
	gtattgacta tatatagaag ttgagtgtta ttttaaaata acatatgtat agagattttt	1920
	caactattac ttcactggca caaaacattt ataactgtaa ataatttctt ttaaaagcaa	1980
	aactaataaa agcgtgtaca acaaatgtat ttgatataat attatatgca tcaagttata	2040
	aagggttgaa acattgcaaa actgttttga gcaaagttt taacttcacg attttcatct	2100
40	tgacgtcagt tcagtgtcgg cctggccac aagcagaaga agcatgggct tccagctgac	2160
	acgataataa gtattttcgc ggccacatat ttataaaaag tgacttttagc ctagtggttc	2220
	taagagaaat taccagtgt agaggtgtg ggttcaatta cccttaactg catttattta	2280
	ttttggccct aaatataaaa tgggacacgt gtcactccca aaacgcacaa attgatgatg	2340
	tggcttcacg ggagagaggc gaacatttct ttatatatat agattattct ctctctcta	2400
45	ctcgttcctt ctccctttaa tcccgatttc gatttgcctt ctccgattcg ctctctagac	2460
	actcacacag tagggtttct aattcggatc tgtacacctt tagccatgga tgctcgtaa	2520
	aggggacggc ctgaagctgg ctcatcaca tccaatggcg gcggattcaa gaagtcgaag	2580
	caaggttagc tctttcgtta ttctcttacc ttgtctatct cgaagagtg ttatagttct	2640
	gttggtgctt acttgctctg ttaaagggtt aaactttaga tcttaattga tggatgaata	2700
50	gttcctttgt tgtcaatttg atttggggtg gcgatgattt cttcaattcg agcttcgtac	2760
	tgtttttact caacaaaagt tttgttttt agttatgaga ttctctagga aattcaagtt	2820
	tggatctttg ctgcagtctt tgatctgatg caaatctaaa gtccattaat ttttcagttt	2880

	aatgatggat gagcttttga taagtgatct taaagttaat caagcttata gttctttttaa	2940
	ctgtcttttg agtttgcttt agtttaatcc ctcttgtaac atattatcac catgccccaa	3000
	gcttgagttt gctgtgattg aattagcttt tttatgtgtt agttattcat gtggtagtgtg	3060
	ttggtaaata atcctgaaaa ttctagagta gcagctttga ttttaagtgtg aagttacata	3120
5	tagatgagaa tttatgaatg atatgtatga ttctaaaagc aaatattatt gagcatcagc	3180
	aaagtcttaa ctaaagaaaa acacttaatc tttggaacag agatggaatc tggtttagga	3240
	agcaaatacga agccatgcac aaaatttttc aggttataat cctttttctt aactaaatta	3300
	atattcaaaa ttgttattta tagtctgagc ttcaaattaa caactaaaaa tgtatatgct	3360
	aatgaagtga ttagctctta ttacaggtat gtattattat tcatgctgaa ccagttaaaa	3420
10	aaaagtttca atataacaaa tatgatattc gattataaat ttagaaatgt attgagctca	3480
	actggtgatt atagcgtaga aaatcaatcc acaccttttg tttgagctgt ggcagtagtt	3540
	aagatatgtg tttagatttt ctgtttgggt gtaagatatt agttattttg tgtttgtatc	3600
	atcatggta ttagtctct agtaagggtt ttgcattact gaatactggt gaacatgtcc	3660
	gtcgtagaca agcagttagc atagttgcta tgtgccaat cttctgtgtt tcaactgttt	3720
15	gttctcttgt gtcttctcaa tgccaatggt ttttaactct cttgacatat ttattatgcg	3780
	tctgttcgag cacttctggc tgtcttttg gtgagaactg ccatttcttg cactttgttc	3840
	ccggaggata caatcctgta tcacagatga caaacatggg atcacccatg tctcaagttt	3900
	ccagaaacat gcaaggatct ggtggtggtg gtggtggagg tcggttttcg gggagaggag	3960
	agtcagggcc tggccatgtc tctagctttg gtgcctcagc cacagccaag atcagtgtgg	4020
20	atgcttcctt ggcaggcgca atcattggaa aaggtggagt ctgttcgaaa cagatatgtc	4080
	gtcagacagg agcaaagcta tcgatccaag atcacgagag agatcccaac ctgaagaaca	4140
	ttgagcttga aggaacattc gagcagataa acgaagcgag cgcaatggtt agagagctga	4200
	ttgggaggct taattccgca tctaggagac cacctggtgg cgggtggtggc gggggtgggc	4260
	ttggttctga agggaaacca catccaggaa gcaacttcaa gacgaagatg tgtgagagat	4320
25	tctctaaagg aagctgtaca tttggtgata gatgtcactt tgctcacggg gaagcagagc	4380
	tacgcaggtc atgaattgag cctagagtta ctggtgaaac aagtctcttt catttgttgt	4440
	ggtgattcct aatatcatct tctcctactt gtttttagtt gtctttgttt tttgaaacta	4500
	caatgtttag ttttcattgt cagtgttaagt tttcccat tgggtgtttt ttagaatcta	4560
	gtttgaattt gagatggggc aagcttgatg aatgattggc aaaacagtgg ttaggatttg	4620
30	tgtgtctgtc ctacttaata tttcatgttt tatctacttt attttggtca gcaagttgat	4680
	gtgtttctct gatgtgtgtg tgattatcag cttagattat tttgtgagta tgctagactg	4740
	tataactaat cgttgtcgat gttatagtgc tcttataatg tttgatagac tatataacta	4800
	aaaattcatg ttattaatag ccgtcgtgta tagtaacagc tgaataaatg aaatgaaatc	4860
	atggtagggt atgatcttta aagaatgtta aaaataatgt gtcgttataa gcggtaatgc	4920
35	atagaaaaac tctaataatc ttaacataag agagagcgat agctttaata aagtacttaa	4980
	attaattact agtcggcagt cgctgcctac ttgtgtacca cctaaattaa tttattataa	5040
	tatatgacga atctccaaag tacatcacac acactcgggg ctattcacgt gatctcaacc	5100
	acaatgtctg cagatatttt ttttaagttt ctctcacat gggagaagaa gaagccaagc	5160
	acgatcctcc atcctcaact ttatagcatt tttttctttt ctttcgggt accactaact	5220
40	tctacagttc tacttgtgag tcggcaagga cgtttctca tattaaagta aagacatcaa	5280
	ataccataat cttaatgcta attaacgtaa cggtatgagt ctataacata acccaaacta	5340
	gtctttgtga acattaggat tgggtaaacc aatattttaca ttttaaaaac aaaatacaaa	5400
	aagaaacgtg ataaacttta taaaagcaat tatatgatca cggcatcttt ttcacttttc	5460
	cgtaaatata tataagtggg gtaaatatca gatatttgga gtagaaaaaa aaaaaaagaa	5520
45	aaaagaaata tgaagagagg aaataatgga ggggccact tgtaaaaaag aaagaaaaga	5580
	gatgtcactc aatcgtctca cacgggcccc cgtcaattta aacggcctgc cttctgcccc	5640
	atcgcactct accagaacca gagagattca ttaccaaaga gatagagaga gagagaaaga	5700
	gaggagacag agagagagtt tgaggaggag cttcttcgta gggttcatcg ttattaacgt	5760
50	taaatyttca tcccccccta mgtcagccag ctcaag	5796

	<210> 5	
	<211> 3867	
	<212> DNA	
	<213> 蔓菁	
5	<400> 5	
	tcgacctgca ggtcaacgga tctttctttc gtgtcactt gctgcagtct ttgatctgat	60
	gcaaactctaa agtcaattaa tttttcagtt taattgggtg atgagctttt gataagtgat	120
	gttaaagtta gtttgagtgc tgttcgtagc aagcttattg ttatttgact ttctcttgag	180
10	tttcattatt gctttagttt aatccctttt gcattagcta gtaacatctt atcaccatgc	240
	ccaaagcttg agtttgctgt gattgaatka gckttttatg tgttagtat kcatgtgtct	300
	agttgttggt aaataatcct gaaaattcta gagaatatat ctbgcagctt tgatttatgt	360
	gtgaagttag atatatagta atttgatag tatgattcta aaagcaaata ttattgaaca	420
	tcagcaaagt cttactaaa gaaaaacact taatctttgg aacagagatg gaatctgggt	480
15	taggaagcaa atcgaagcca tgcacaaaat ttttcaggtt ataatccttt tcttaactaa	540
	attaatatat aaaaattgta tttatagtct gagcttttaa ttgacaagta aaaatgtatg	600
	ctaataaggt agttagtgtt tattacaggt atgcatcatc ctcatgcta aacaagttaa	660
	aaaaaagttt cagtataaca aatatgatat tcactaggaa cggaaaaaca aatctggatt	720
	ataaatttag aaatattaag ctcaactggt gattatagct tagaaaatca atccacacct	780
20	tttgtttgag ctgtggcagt agttaagata tgtgttgtaa ttctctgttt ggtgtaaga	840
	tattagtat tgtgttgta tcatcatggt catatagtgt ctagtaaggt tgttgatta	900
	ctgaatactg gtgaacatgt ccgtcataga caagcagtta gcatagttgc tatgtgcaa	960
	ttcttctgtg ttcaactgt ttgttctctt gtgtcttctc aatgccaatg gtttttaact	1020
	ttctgacgta ttgttatcc ttcttttgca gcacttctgg ctgtcctttt ggtgagaact	1080
25	gccatttctt gcactttgtt cccggaggat acaatcctat ggcacagatg acaaacatgg	1140
	gatcacccat gtctcaagtt tccagaaaca tgcaaggtgg tgggtggtgg gggggccgat	1200
	tttcggggag aggagagtct ggacctggcc acgtctctag ctttggtgcc tcagccacag	1260
	ccaaaatcag tgtggatgct tccttggcag gcgcaatcat tggaaaaggt ggagtctgtt	1320
	cgaacagat atgtcgtcaa acaggagcaa agctatcgt ccaagaccac gagagagatc	1380
30	ccaacctgaa gaacattgag cttgaaggaa cattcgagca gatcaacgaa gcgagcgcaa	1440
	tggttagaga gctgattggg aggcctaatt ctgcatctag gagaccacct ggtggtggtg	1500
	gcggtggact tggttcagaa gggaaaccgc atccaggag caacttcaa acgaagatgt	1560
	gtgagagatt ctcgaaagga agctgtacat ttggtgatag atgtcacttt gcacacggg	1620
	aagcagagct acgcagggtc tgaattgcgc ctagagttgc tgggtggagt agagagttt	1680
35	ctggcgaaac aagtctcttt ctttgttgtt ggtgattcct aatatcatct tctcctactt	1740
	gttttttagt gtctttgttt tttagacta caatgttttag ttttcattgt cagtgtagt	1800
	tttccccatt tgggtgtttt ttagaatcta gtttgaattt gagatggggg gatgcttgat	1860
	gaatgattga caaaacagtg gttaggattt gtatgctgtt tctacttaat atttcatgtt	1920
	ttctctgctt tattttggtc agtaagttca tgtgtttctc tgacatgtgt gtgattatca	1980
40	gctttgatta ttttccgagt atgtagatgt tatagttctc ttatgataga caatataact	2040
	aaaaattcat gttaataata gccgtcgtg atagtaacag ctgaataaat gaaatgaaat	2100
	catggttagt gatgatctta aaaaaatgt tgaaaataat gtgcgttgtt acaatagcat	2160
	ctcctaacca cttttatata tgtctctata atagcattta gatttagaag taaaatcact	2220
	gcaatcctac tttatttctt cctctaaaat aaaaattgtt attttcacgg aaatacattc	2280
45	ctttataata aaaacatact tttttattca caaaataatc ttttaatttt ttattttaac	2340
	aattataacc aaaataaata ttttttaatg aaaatgtact gtttatataa atatataatc	2400
	atacttttta ttacataat agtttctata aaaatattca gtataaataa tatcatagtt	2460
	ttatgaatgt tacactaaat tggattgggt ttcaactttc acaataaaaa agtactattt	2520
	ataaaaattag aaaaaaatat atcaagacta ttctttttta gaggaagaaa tagaagaata	2580
50	cattggaaac aaatctatct ctattatata gttttcctat tttagaaaa aaaaatagag	2640
	aaatacattg gagatggttt aagcsgtagt aacacaaaaga aaaactctaa atatcttaag	2700
	mgcatctcta atgtacactt ctgtaatttc ttctaaaata gagatctcta ttmtasaggt	2760

	gaaaaatgctc caatgtatgc ctctataata gaattcatct attttaaaag aaaatataga	2820
	gaaaaattac tttttgcttt tatattttaa ggtggaaata aaatatctct atataaataa	2880
	ataaactcta ttatacatgt atacattgga gcattttcac ttttataata gagttttttt	2940
	attttaagaa aaaatataga gatagaaata gaaatagaaa tagagatgag ttggagatta	3000
5	gaaatagaga tgagtttgag atgttggtac gtaagaaaga gctagagctt taataaagta	3060
	cttaaattaa ttactagtcg gcagtcgctg cctacttggt taccacctaa attaatttat	3120
	tataatatat attacgaatc tccaaagtac acatcacaca cactctactc acgtgatctc	3180
	aaccacaatg tctgcagata ttttttatag ttttttctca catgggagag aagaagccaa	3240
	gcacgatcct ccactctcaa ctttatagca tttttttctt ttctttccgg ctaccacttg	3300
10	tgagtcgagt cggcaagggc gtttccttat attaaagtaa agacatcaaa taccatcgctc	3360
	ttaatgctaa ttaacgtaat tgatgagttc tataacataa tccaaactag tctttgtgaa	3420
	cattaggatt gggtaaacca atattttacat tttaaaaaca aaatacaaaa agaaacgtga	3480
	taaactttat aaaagcaatt atatgatcac tgcactcttt ccacttttcc gtaaataaat	3540
	acataaaaagt gccgtaaata tcagatattt ggagtagaaa agtaataaag aaaagaaata	3600
15	tgaggagagg gaataatgga gggggcccac ttgtaaaaaa gaaagaaaag agatgtcact	3660
	caatcgtctc ccacgggccc ccgtcaattt aaacggcctg ccttctgccc aatcgcactc	3720
	tatcagaacc agacagattc attaccaaa agatagagaa agagagagag agagagagag	3780
	agagagagtg agtttgagga ggagcttctt cgtagggttc atcgttatta acgttaaatc	3840
	ttcacccctc acgtcagcca gctcaag	3867
20	<210> 6	
	<211> 1333	
	<212> DNA	
	<213> 蔓菁	
25	<400> 6	
	agcaaagaag aaactgaacc tttctcatct atgattgtct ttgttttaag aagctatggt	60
	tctgtttcaa taacttttaa ttatccattt tgttgtgttt tctgacattt tggctaaaat	120
	tatgtgatgt tggaagttag tgtctaaaat gtcttgtgtc tgtattgttc ttcttctcat	180
30	cgtgttatg tttgggatcg ttgaaatgtg actytcggac tagtgaactc ttgttctcga	240
	actatcttaa tgtggatccc tgaacagtgt aatggcttag cttcctctga aactactatt	300
	atgttctagt gaactctgac ataaagcaac ttgtcgtttc aagacatacc aatgctttta	360
	gaaaaatggt ttactcacct gaagtgaacc ataaatctaa tcttcgttac agttaagtta	420
	gtttgagtta ttgcgttgtt tggttggcag atcaccttta ctactcatgt ggttcagctc	480
35	ctttgtaaaa aactctattc ttctctttta attttagtaa acctgtcaac ataagccaaa	540
	ttcatttctt catattttatt tgctttcaga tttgtgaggg aacaaaagaa aataagacaa	600
	atgaatcttt ttttttctca ttaatggcag aaacaaccaa agagagtgtg acaacaagaa	660
	acaattgtag tgaggaaaaa ccaaagaaaa aaaattgtct gaaaccaact cgttgaacat	720
	ataaaaataat acgaaaaaat ctttcatcca acggcgagcg taactcttaga agcatttctc	780
40	gtggactatc gatggccctg cctcatcata ctacgccttt gctatccaca tctgcaatac	840
	caacattgtg tatcatagtc agcttacaac acgagtaaca agcagaaaag atgatttacc	900
	tgttggaagg tactgagtga tgctagaatg gatcctccga tccagacact atacttctc	960
	tccggtggag caaccacctt aatcttcata ctacttgag caagagcagt aatctcttta	1020
	ctcatcctat cagcaattcc agggnaacat cgtgggtcca cactaagca caatgtttcc	1080
45	atacaaatcc ttcctgatat caacatcaca cttcatgac gaattgtaag tcgtctctgtg	1140
	gataccagca gcttcattc cgaccaaaga cggctggaaa agaacctcgg gacacctgaa	1200
	cctctcccct ccgatgggtga tcacctgtcc atcaggcaac tcgtagctct tgtcgacctg	1260
	caggcatgca agcttcagct gctcgagttc tatagtgtca cctaaatcgt atgtgtatga	1320
	tacataaggt tat	1333
50	<210> 7	
	<211> 1102	

<212> DNA

<213> 芜菁 (*Brassica napus*)

<400> 7

5	ggatatgatg atggtgaaag aacaaagaag atattgtcac gaacctttct cttgctgtct	60
	ctggtcgtct ttgttttaag aagctatgtt ttcgtttcaa taatcttaac tatccatttt	120
	gttgtgtttt ctgacatttt ggctaagtta tgtgatgtgg gacacgtag tgtctaaaat	180
	gtctctgtgt ctgtattgtt cttctcatct gtgactttcg gacaactaaa ctcttgttct	240
	cgaactacct caatgtggca ttaatgaaag tgttattgtt gattttaatc tgaaactgct	300
10	attatttagt gaatttttac atcagccaac ttgtttgttt aagacctacc aatggtataa	360
	gaaggtttgt gtactaatgt tcacatgtc catagtgtta agacataacc atgatcttct	420
	gtccaattaa ttgcgtcga gttatcgtgt tatttggcac ctttactatg ttttttgta	480
	aagaactcct tacagaatag ctttttgtaa agaactacgt tttatctttt tgtaagaacc	540
	ttttaacaaa agccaaattc attattacct ggcacaagaa aaaactctgg tttcttcctc	600
15	tttctctgtt tttagatttg aggaggaaca tgaagatgaa gagrrakaac aaatarvtar	660
	rratctctt ttwtycrta rsggsagaga caccaaaaca gagtgrsrac aagaaacrgg	720
	tgtartgagg aaaaacsaaa gagaaaagaa tatktgarg ccaactcgtt gaacatatkc	780
	aaatarcgaa acaatctttc atccagnccg cgakcgtaat cgtagargca tttcctgtgg	840
	actakcgatg gccctgcctc atcatastcg kcctttgcta tccacatctg caagaccaac	900
20	rttgtgtatc atagtcagct taaaaacgag taacaagcag aatcgacaat ttacctgtt	960
	ggaaggctact gagtgatgct agaatanatc ctccaatcca aacactatac ttcctctccg	1020
	gtggagcaac caccttaatc ttcatactac tcggagccaa agcagtaatc tccttactca	1080
	tcctatcanc aatcccangg aa	1102

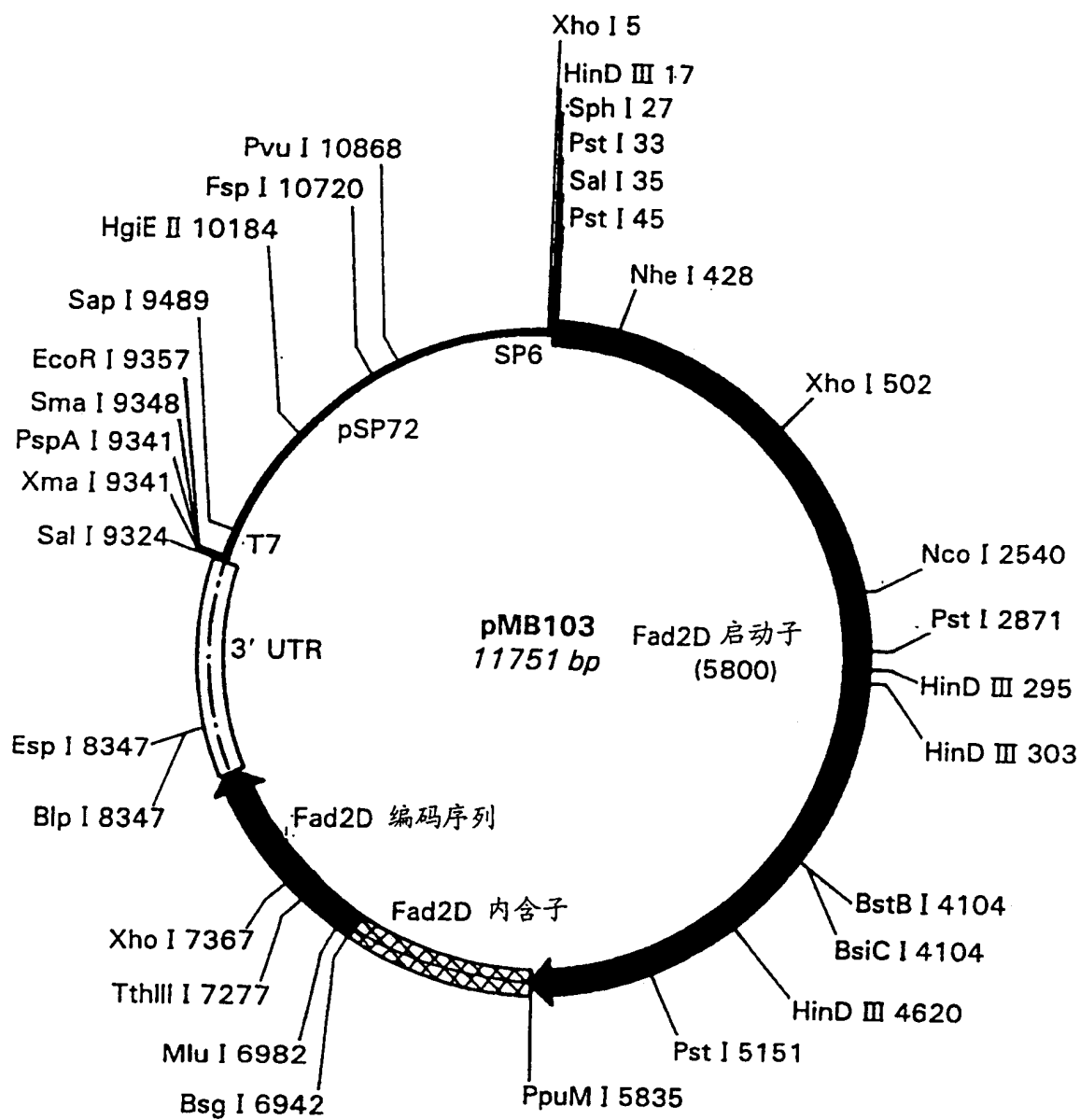


图 1

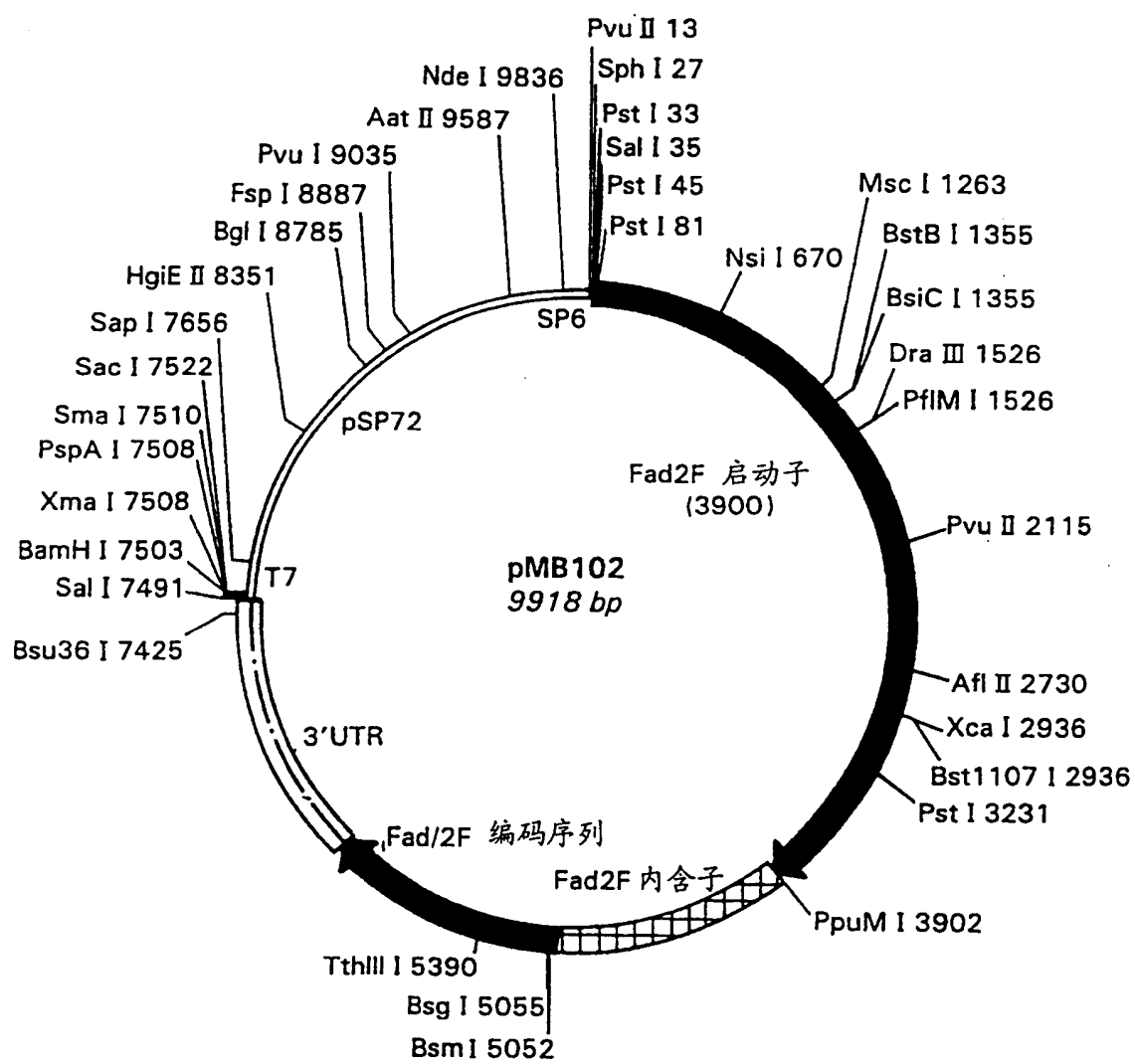


图 2

TCGACCTGCAGGTCAACGGATCTGGTTTTATGGATACTTTCGTGCACTGGTTTAAGAT
GCAATGTTTGACACATTTCTCAACGTCGGTTGAAAGAGAAATTTGTGCCGAAAACATC
ATTATACATATAGCTACTATCATGAAAATAGTGCATGAATTTTTAAAAATTTGAGTTTTCT
ATAATGTATATATGATTACAACAAATGTGAAATATGTATTAGTTTAGTCATTTTTAGATC
GTGAACAAGATGATTCTGAAATTATGTTAGTCTTGGTGAATTATATAGTAAAGTAAATT
ATGGGTATTTTTAGAAATTTGTTTTAGCTTGTTTGTTGTTGTTTTTAATGTATATACAT
CGATTAAGTTGTGTGGAACCTTACCTATATTTTGTTGTGCTAGCTATCTAACCATTTTTT
GTTATAACAATAAAATATATCCTTTTTTATCAGCAGCAATAAGATATATTTTTGGGTAAAT
TATTATAGTTATATTTAAAAATTTAAATAATATCATACTATTATGTCAAAACTTTGTGATC
TAAACACAAAACTATTTTACTAAAATTTTACATAAATCAAGTTATATTATGTATTTTTT
TAATTAAACTTTAGTTTTATCATTTGTTATATGTTTTACTTTTGGTTCTCAATTTTAAAAA
TCTATTATGGTTTTCTATTTTTTTGTAATTTTTTCAAATTTGAAATTTGTGACTTGAACAA
TTATATTTCTTGTAAGATACTGACT
TTCCTGCTTCGTTTTCAACAAAATAATTTAGTTTCTACATAAATATACAGTAATTTTGT
AAGATGATTTTCTCTTTTAAATTTTTTTGGTTTGGTACCTAACCAAACCGACCCGGTG
TCCGAAGTGCTTAGAGCTAAAAACCCATTCCGGTATTTGCCTGGTCCCGTTACCGAAC
CGGACCCATTATTTCCGGTTCGGTTTAAAGGTGTGGACTCTGTTTTAAGTTAAAAACGTC
CAGCCCTAAGGTAAATTATAAAACATTGGTTGTGTGTCTGTCTCCTCGGTATGGAAAA
CATAATAGAATCCGAACCTTAGACCCAGTACGCGATTTATTTTTCGTCTTACGTCGTA
AGATGTGGAATAAGGAACAAGCAACGTCATTATACATGTTAACCGTATCAAAGGAATC
GAAACAGCCTCATCTTGCGAATCCGGTTATCTTCCATCCTTTTTTTCAGGACACTCCGG
TTTACCTTTTTGTTTGTTGCGATACGTCACCTCCGGTTTAAATCGAATTTAAAAAAAAT
CGGGAAGAGTTAGGAAAAAAAAGGAAAATCTCATCTCACCGGCTCACCTCGACGAC
AAGACAACACCACCCTTAGGGTTAAAAGGTTTATTTATCTTATTACTAGGGTCGGCC
CGCCCTACGGGCGGGATATTAGTTAATTTGATATTCATAAATGCTCGAGTTGAAATT
TGTTTTAAGATTTAAGAATTTGGTTATCTGTTATGTCTTACTTATTAGTATGCGGTGGT
ATAGTTGTTTTTCGATTATTCTTGCTTTGGTATTGTATCAAATTAATAATTGTATAACT
CATAATTATAGATGTACAAATGTAGATTTGTGATAAAGTCTGATGACAATACTGTTTTT
TTTTTAATTTTTATTATAGTGGAGTGTGCATGTGTGAGAAAGAAGCCTGTAACAACCT
TTATGTTTTTGTGTATGGATTTTAAATATATATTATTTTGTATAATGCATACTTGTCTAC
AACATTTGCTTGTAGACTAAAAAAATGTTTTTATTTTTTAAAGAGAAAATATTTAG
TCTAGAATATAACATGCACATATGTATTGACTATATATAGAAGTTGAGTGTTATTTTAA
AATAACATATGTATAGAGATTTTTCAACTATTACTTCACTGGCACAAAACATTTATAACT
GTAAATAATTTCTTTTAAAAGCAAACTAATAAAAGCGGTGTACAACAAATGTATTTTGA
TATATATTATATGCATCAAGTTATAAAGGTTGGAAACATTGCAAACTGTTTGGAGCAA

图 3A

AGTTTTTAACTTCACGATTTTCATCTTGACGTCAGTTCAGTGTCGGCCCTGGCCACAA
GCAGAAGAAGCATGGGCTTCCAGCTGACACGATAATAAGTATTTTCGCGGCCACATA
TTTATAAAAAGTGACTTTAGCCTAGTGGTCTAAGAGAAATTACCAAGTGCTAGAGGTG
CTGGGTTC AATTACCCTTAACTGCATTTATTTATTTTGGCCCTAAATATAAAATGGGAC
ACGTGTCACTCCCAAACGCACAAATTGATGATGTGGCTTCACGGGAGAGAGGGCGAA
CATTTCTTTATATATATAGATTATTCTCTTCTCTCTACTCGTTCCTTCTCCCTTTAATCC
CGATTTGATTTGTCTTCTCCGATTGCTCTCTAGACACTCACACAGTAGGGTTTCTA
ATTCGGATCTGTACACCTTTAGCCATGGATGCTCGTAAGAGGGGACGGCCTGAAGCT
GGCTCATTCAACTCCAATGGCGGCGGATTCAAGAAGTCGAAGCAAGGTTAGCTCTTT
CGCTATTCTCTTACTTTGCTATCTCGAAAGAGTGTTATAGTTCTGTTGTGCTTCACCT
GCTCTGTTAAAGGTTGAACTTTAGATCTTAATTGATGGATGAATAGTTCTTTGTTGT
CAATTTGATTTGGGGTAGCGATGATTTCTTCAATTGAGCTTCGTACTGTTTTACTCA
ACAAAAGTTTTTGTGTTTAGTTATGAGATTCTCTAGGAAATTCAAGTTTGGATCTTTGC
TGCAGTCTTTGATCTGATGCAAATCTAAAGTCCATTATTTTTTCAAGTTAATGATGGAT
GAGCTTTTGATAAGTGATCTTAAAGTTAATCAAGCTTATAGTTCTTTTAACTGTCTTTTG
AGTTTGCTTTAGTTTAATCCCTCTTGTAACATATTATCACCATGCCCAAAGCTTGAGTT
TGCTGTGATTGAATTAGCTTTTTTATGTGTTAGTTATTCATGTGGTAGTTGTTGGTAAA
TAATCCTGAAAATTCTAGAGTAGCAGCTTTGATTTAAGTGGAAGTTACATATAGATGA
GAATTTATGAATGATATGTATGATTCTAAAAGCAAATATTATTGAGCATCAGCAAAGTC
TTAACTAAAGAAAAACACTTAATCTTTGGAACAGAGATGGAATCTGGTTTAGGAAGCA
AATCGAAGCCATGCACAAAATTTTTAGGTTATAATCCTTTTTCTTAACTAAATTAATAT
TCAAAATTGTTATTTATAGTCTGAGCTTCAAATTAACAACATAAAATGTATATGCTAATG
AAGTGATTAGCTCTTATTACAGGTATGTATTATTATTCATGCTGAACCAGTTAAAAAAA
AGTTTCAATATAACAAATATGATATTCGATTATAAATTTAGAAATGTATTGAGCTCAACT
GGTGATTATAGCGTAGAAAATCAATCCACACCTTTTGTGTTGAGCTGTGGCAGTAGTTA
AGATATGTGTTGTAGTTTTCTGTTTGGTGGTAAGATATTAGTTATTTGTGTTGTATC
ATCATGGTCATATAGTGTCTAGTAAGGTTGTTGCATTACTGAATACTGGTGAACATGT
CCGTCGTAGACAAGCAGTTAGCATAGTTGCTATGTGCCAATTCTTCTGTGTTTCAACT
GTTTGTTCTCTTGTGTCTTCTCAATGCCAATGGTTTTTAACTCTCTTGACATATTTATTA
TGCGTCTGTTGCAGCACTTCTGGCTGTCCTTTTGGTGAGAACTGCCATTTCTTGCACT
TTGTTCCCGGAGGATACAATCCTGTATCACAGATGACAAACATGGGATCACCCATGT
CTCAAGTTTCCAGAAACATGCAAGGATCTGGTGGTGGTGGTGGGAGGTGGGTTTT
CGGGGAGAGGAGAGTCAGGGCCTGGCCATGTCTCTAGCTTTGGTGCCTCAGCCACA
GCCAAGATCAGTGTGGATGCTTCCTTGGCAGGCGCAATCATTGGAAAAGGTGGAGT
CTGTTGGAACAGATATGTCGTCAGACAGGAGCAAAGCTATCGATCCAAGATCACGA
GAGAGATCCCAACCTGAAGAACATTGAGCTTGAAGGAACATTGAGCAGATAAACGA
AGCGAGCGCAATGGTTAGAGAGCTGATTGGGAGGCTTAATTCCGCATCTAGGAGAC

图

3B

CACCTGGTGGCGGTGGTGGCGGGGGTGGGCTTGGTTCTGAAGGGAAACCACATCC
AGGAAGCAACTTCAAGACGAAGATGTGTGAGAGATTCTCTAAAGGAAGCTGTACATT
TGGTGATAGATGTCACCTTGCTCACGGGGAAGCAGAGCTACGCAGGTCATGAATTGC
GCCTAGAGTTACTGGTGAAACAAGTCTCTTCATTTGTTGTGGTGATTCTAATATCAT
CTTCTCCTACTTGTTTTAGTTGTCTTTGTTTTTGAAGTACAATGTTTAGTTTTATT
GTCAGTGTAAAGTTTTCCCATTTGGTGTTTTTTAGAATCTAGTTTGAATTTGAGATGG
GGCAAGCTTGATGAATGATTGGCAAAACAGTGGTTAGGATTTGTGTGCTGTCTACT
TAATATTTTATGTTTTATCTACTTTATTTTGGTCAGCAAGTTGATGTGTTTCTCTGATGT
GTGTGTGATTATCAGCTTAGATTATTTTGTGAGTATGCTAGACTGTATAACTAATCGTT
GTCGATGTTATAGTTCTCTTATAATGTTTGATAGACTATATAACTAAAAATTCATGTTAT
TAATAGCCGTCGCTGATAGTAACAGCTGAATAAATGAAATGAAATCATGGTAGGTGAT
GATCTTTAAAGAATGTTAAAAATAATGTGTCGTTATAAGCGGTAATGCATAGAAAACT
CTAATCATCTTAACATAAGAGAGAGCGATAGCTTTAATAAAGTACTTAAATTAATTACT
AGTCGGCAGTCGCTGCCTACTTGTTGTACCACCTAAATTAATTTATTATAATATGACG
AATCTCCAAAGTACATCACACACACTCGGGGCTATTCACGTGATCTCAACCACAATGT
CTGCAGATATTTTTTAAGTTTTCTTCTCACATGGGAGAAGAAGAAGCCAAGCACGAT
CCTCCATCCTCAACTTTATAGCATTTTTTTCTTTTCTTTCCGGCTACCACTAACTTCTAC
AGTTCTACTTGTTGAGTCGGCAAGGACGTTTCCTCATATTAAGTAAAGACATCAAATA
CCATAATCTTAATGCTAATTAACGTAACGGATGAGTTCTATAACATAACCCAACTAGT
CTTTGTGAACATTAGGATTGGGTAAACCAATATTTACATTTTAAAAACAAAATACAAAA
AGAAACGTGATAAACTTTATAAAAGCAATTATATGATCACGGCATCTTTTTCATTTTC
CGTAAATATATATAAGTGGTGTAATATCAGATATTTGGAGTAGAAAAAAAAAAAAAGA
AAAAAGAAATATGAAGAGAGGAAATAATGGAGGGGCCCACTTGTAAGAAAGAAAGAA
AAGAGATGTCACCTCAATCGTCTCACACGGGGCCCCCGTCAATTTAAACGGCCTGCCTT
CTGCCCCAATCGCATCTTACCAGAACCAGAGAGATTCAATACCAAAGAGATAGAGAGA
GAGAGAAAGAGAGGAGACAGAGAGAGAGATTTGAGGAGGAGCTTCTTCGTAGGGTTC
ATCGTTATTAACGTTAAATYTTTCATCCCCCCTAMGTCAGCCAGCTCAAG

图 30

TTCGAGCTCGGTACCCGGGCATCTCTAGAG
TCGACCTGCAGGTCAACGGATCTTCTTTCTGCTCACTTGCTGCAGTCTTTGATCTG
ATGCAAATCTAAAGTCAATTAATTTTTCAGTTTAATTGGTGGATGAGCTTTTGATAAGT
GATGTTAAAGTTAGTTTGAGTGCTGTTTCGTAGCAAGCTTATTGTTATTTGACTTTCTCT
TGAGTTTCATTATTGCTTTAGTTTAATCCCTTTTGCATTAGCTAGTAACATCTTATCACC
ATGCCCAAAGCTTGAGTTTGCTGTGATTGAATKAGCKTTTTATGTGTTAGTTATKCATG
TGTCTAGTTGTTGGTAAATAATCCTGAAAATTCTAGAGAATATATCTBGCAGCTTTGAT
TTATGTGTGAAGTTACATATAGATGAATTTGATATGTATGATTCTAAAAGCAAATATTAT
TGAACATCAGCAAAGTCTTAAGTAAAGAAAAACACTTAATCTTTGGAACAGAGATGGA
ATCTGGTTTAGGAAGCAAATCGAAGCCATGCACAAAATTTTTCAGGTTATAATCCTTTT
CTTAAGTAAATTAATATTTAAATTTGTTATTTATAGTCTGAGCTTTAAATTGACAAGTAA
AAATGTATGCTAATGAAGTAGTTAGTTGTTATTACAGGTATGCATCATCCTTCATGCTA
AACAGTTAAAAAAAAGTTTCAGTATAACAAATATGATATTCAGTACAGGAACGGAAAAAC
AAATCTGGATTATAAATTTAGAAATATTAAGCTCAACTGGTGATTATAGCTTAGAAAAT
CAATCCACACCTTTTGTGTTGAGCTGTGGCAGTAGTTAAGATATGTGTTGTAATTCTCT
GTTTGGTGGTAAGATATTAGTTATTGTGTTTGATCATCATGGTCATATAGTGTCTAGT
AAGGTTGTTGCATTACTGAATACTGGTGAACATGTCCGTCATAGACAAGCAGTTAGCA
TAGTTGCTATGTGCCAATTCTTCTGTGTTTCAACTGTTTGTCTCTTGTGTCTTCTCAA
TGCCAATGGTTTTTAACCTTCTGACGTATTTGTTATCCTTCTTTTGCAGCACTTCTGGC
TGTCTTTTGGTGAGAACTGCCATTTCTTGCACTTTGTTCCCGGAGGATACAATCCTA
TGGCACAGATGACAAACATGGGATCACCCATGTCTCAAGTTTCCAGAAACATGCAAG
GTGGTGGTGGTGGTGGGGGCCGATTTTCGGGGAGAGGAGAGTCTGGACCTGGCCA
CGTCTCTAGCTTTGGTGCCTCAGCCACAGCCAAAATCAGTGTGGATGCTTCCTTGGC
AGGCGCAATCATTGAAAAGGTGGAGTCTGTTCGAAACAGATATGTCGTCAAACAGG
AGCAAAGCTATCGATCCAAGACCACGAGAGAGATCCCAACCTGAAGAACATTGAGCT
TGAAGGAACATTCGAGCAGATCAACGAAGCGAGCGCAATGGTTAGAGAGCTGATTG
GGAGGCTTAATTCTGCATCTAGGAGACCACCTGGTGGTGGTGGCGGTGGACTTGGT
TCAGAAGGGAAACCGCATCCAGGGAGCAACTTCAAACGAAGATGTGTGAGAGATTCT
TCGAAAGGAAGCTGTACATTTGGTGATAGATGTCACCTTGCACACGGGGAAGCAGAG
CTACGCAGGTCATGAATTGCGCCTAGAGTTGCTGGTGGAGTTAGAGAGTTTGCTGGC
GAAACAAGTCTCTTTCATTTGTTGTGGTGATTCTTAATATCATCTTCTCCTACTTGTTTT
TAGTTGTCTTTGTTTTTTGAGACTACAATGTTTAGTTTTATTGTCAGTGTAAGTTTTCC
CCATTTGGTGTTTTTTTAGAATCTAGTTTGAATTTGAGATGGGGGGATGCTTGATGAA
TGATTGACAAAACAGTGGTTAGGATTTGTATGCTGTTTCTACTTAATATTTTCATGTTTT
CTCTGCTTTATTTTGGTCAGTAAGTTCATGTGTTTCTCTGACATGTGTGTGATTATCAG
CTTTGATTATTTCCGAGTATGTAGATGTTATAGTTCTCTTATGATAGACAATATAACTA

图 4A

AAAATTCATGTTAATAATAGCCGTCGCTGATAGTAACAGCTGAATAAATGAAATGAAAT
CATGGTAGGTGATGATCTTAAAAAAATGTTGAAAATAATGTGCGTTGTTACAATAGC
ATCTCCTAACCACCTTTTATATATGTCTCTATAATAGCATTAGATTAGAAAGTAAATCA
CTGCAATCCTACTTTATTTCTTCCTCTAAAATAAAAAATTGTTATTTTCACGGAAATACAT
TCCTTTATAATAAAAAACATACTTTTTTATTCACAAAATAATCTTTTAATTTTTTATTTTAA
CAATTATAACCAAAAATAAATATTTTTTAATGAAAATGTACTGTTTATATAAATATATAATC
ATACTTTTTATTTACATAATAGTTTCTATAAAAAATATTCAGTATAAATAATATCATAGTTT
TATGAATGTTACACTAAATTGGATTGGTTTTCACTTTACAAAATAAAAAGTACTATTTA
TAAATTAGAAAAAATATATCAAGACTATTCTTTTTTAGAGGAAGAAATAGAAGAATA
CATTGGAAACAAATCTATCTCTATTATATAGTTTTCTATTTAGAAAAAAAAAATAGAG
AAATACATTGGAGATGGTTTAAGCSGTAGTAACACAAAGAAAACTCTAAATATCTTAA
GMGCATCTCTAATGTACACTTCTGTAATTTCTTCTAAAATAGAGATCTCTATTMTASAG
GTGAAAATGCTCCAATGTATGCCTCTATAATAGAATTCATCTATTTTAAAGAAAAATAT
AGAGAAAAATTACTTTTTGCTTTTATTTTAAAGGTGGAAATAAATATCTCTATATAAA
TAAATAAACTCTATTATACATGTATACATTGGAGCATTTCCTTTTATAATAGAGTTTT
TTTATTTTAAGAAAAAATATAGAGATAGAAATAGAAATAGAAATAGAGATGAGTTGGAG
ATTAGAAATAGAGATGAGTTTGAGATGTTGTTACGTAAGAAAGAGCTAGAGCTTTAAT
AAAGTACTTAAATTAATTACTAGTCGGCAGTCGCTGCCTACTTGTTACCACCTAAATT
AATTTATTATAATATATTACGAATCTCCAAAGTACACATCACACACACTCTACTCAC
GTGATCTCAACCACAATGTCTGCAGATATTTTTTATAGTTTTTTCTCACATGGGAGAGA
AGAAGCCAAGCACGATCCTCCATCCTCAACTTTATAGCATTTTTTTCTTTTCTTCCGG
CTACCACTTGTTGAGTCGAGTCGGCAAGGGCGTTTTCTTATATTAAAGTAAAGACATCA
AATACCATCGTCTTAATGCTAATTAACGTAATTGATGAGTTCTATAACATAATCCAAAC
TAGTCTTTGTGAACATTAGGATTGGGTAAACCAATATTTACATTTTAAAAACAAAATAC
AAAAAGAAACGTGATAAACTTTATAAAAGCAATTATATGATCACTGCATCTTTTCCACT
TTTCCGTAAATAAATACATAAAAGTGCCGTAAATATCAGATATTTGGAGTAGAAAAGTA
ATAAAGAAAAGAAATATGAGGAGAGGGAATAATGGAGGGGGCCCACTTGTA AAAAAG
AAAGAAAAGAGATGTCACTCAATCGTCTCCACGGGGCCCCCGTCAATTTAAACGGCC
TGCCCTTCTGCCCAATCGCATCTTATCAGAACCAGACAGATTCATTACCAAAGAGATAG
AGAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTGAAGTTGAGGAGGAGCTTCTTCG
TAGGGTTCATCGTTATTAACGTAAATCTTCACCCCTACGTCAGCCAGCTCAAG

图

4B

AGCAAAGAAGAACTGAACCTTTCTCATCTATGATTGTCTTTGTTTTAAGAAGCTATGT
TTCTGTTTCAATAATCTTTAATTATCCATTTTGTTGTGTTTTCTGACATTTTGGCTAAAA
TTATGTGATGTTGGAAGTTAGTGTCTAAAATGTCTTGTGTCTGTATTGTTCTTCTTCTC
ATCGCTGTTATGTTTGGGATCGTTGAAATGTGACTYTCGGACTAGTGAACCTTTGTTT
TCGAACTATCTTAATGTGGATCCCTGAACAGTGTAAATGGCTTAGCTTCCTCTGAAACT
ACTATTATGTTCTAGTGAATCTTGACATAAAGCAACTTGTGTTTTCAAGACATACCAAT
GCTTTAAGAAAAATGTTTTACTCACCTGAAGTGAACCATAAATCTAATCTTCGTTACAG
TTAAGTTAGTTTGAGTTATTGCGTTGTTTGGTTGGCAGATCACCTTTACTACTCATGTG
GTTCACTCTCTTTGTAAAAACTCTATTCTTCTCTTTAATTTGTAGAAACCTGTCAACA
TAAGCCAAATTCATTTCTTCATATTTATTTGCTTTCAGATTTGTGAGGGAACAAAAGAA
AATAAGACAAATGAATCTTTTTTTTTCTCATTAAATGGCAGAAACAACCAAAGAGAGTGT
GACAACAAGAAACAATTGTAGTGAGGAAAAACCAAAGAAAAAAATTTGTCTGAAACCA
ACTCGTTGAACATATAAAATAATACGAAAAATCTTTCATCCAACGGCGAGCGTAATC
TTAGAAGCATTTCTGTGGACTATCGATGGCCCTGCCTCATCATACTCAGCCTTTGCT
ATCCACATCTGCAATACCAACATTGTGTATCATAGTCAGCTTACAAAACGAGTAACAA
GCAGAAAAGATGATTTACCTGTTGGAAGGTACTGAGTGATGCTAGAATGGATCCTCC
GATCCAGACACTATACTTCCTCTCCGGTGGAGCAACCACCTTAATCTTCATACTACTT
GGAGCAAGAGCAGTAATCTCTTTACTCATCCTATCAGCAATTCCAGGGNAACATCGT
GGTTCCACCACTAAGCACAATGTTTCCATACAAATCCTTCCTGATATCAACATCACAC
TTCATGATCGAATTGTAAGTCGTCTCGTGGATACCAGCAGCTTCCATTCCGACCAAAG
ACGGCTGGAAAAGAACCTCGGGACACCTGAACCTCTCCCCTCCGATGGTGATCACC
TGTCATCAGGCAACTCGTAGCTCTTGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTCAGCTGC
TCGAGTTCTATAGTGTACCTAAATCGTATGTGTATGATACATAAGGTTAT

图 5

GGATATGATGATGGTGAAAGAACAAAGAAGATATTGTCACGAACCTTTCTCTTGCTGT
CTCTGGTCGTCTTTGTTTTAAGAAGCTATGTTTTCGTTTCAATAATCTTAACTATCCATT
TTGTTGTGTTTTCTGACATTTTGGCTAAGTTATGTGATGTGGGACACGTTAGTGTCTAA
AATGTCTCTGTGTCTGTATTGTTCTTCTCATCTGTGACTTTCGGACAACCTAACTCTTG
TTCTCGAACTACCTCAATGTGGCATTAAATGAAAGTGTTATTGTTGATTTTAATCTGAAA
CTGCTATTATTTAGTGAATTTTACATCAGCCAACCTGTTTGTTTAAGACCTACCAATG
GTATAAGAAGGTTTGTGTAATAATGTTACCATGTCCATAGTGTTAAGACATAACCAT
GATCTTCTGTCCAATTAATTTGCGTCGAGTTATCGTGTTATTTGGCACCTTTACTATGT
TTTTTTGTAAAGAACTCCTTACAGAATAGCTTTTTGTAAAGAACTACGTTTTATCTTTTT
GTAAGAACCTTTTAACAAAAGCCAAATTCATTATTACCTGGCACAAGAAAAAACTCTG
GTTTCTTCCTCTTTCTCTGTTTTTAGATTTGAGGAGGAACATGAAGATGAAGAGRRAK
AACAAATARVTARCRATCTCTTTWTYCRRTARSGGSAGAGACACCAAACAGAGTG
RSRACAAGAAACRGGTGTARTGAGGAAAAACSAAAGAGAAAAGAATATKCTGARGCC
AACTCGTTGAACATATKCAATARCGAAACAATCTTTCATCCAGNCGGCGAKCGTAAT
CGTAGARGCATTTCTGTGGACTAKCGATGGCCCTGCCTCATCATASTCGKCCTTTG
CTATCCACATCTGCAAGACCAACRTTGTGTATCATAGTCAGCTTAAAAACGAGTAACA
AGCAGAATCGACAATTTTACCTGTTGGAAGGTACTGAGTGATGCTAGAATANATCCTC
CAATCCAAACACTATACTTCCTCTCCGGTGGAGCAACCACCTTAATCTTCATACTACT
CGGAGCCAAAGCAGTAATCTCCTTACTCATCCTATCANCAATCCCANGGAA

图

6