

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/67

C12N 15/82

//C12P21/00, C12N5/04



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 97190687.4

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1151262C

[22] 申请日 1997. 6. 12 [21] 申请号 97190687. 4

[30] 优先权

[32] 1996. 6. 12 [33] JP [31] 172922/1996

[86] 国际申请 PCT/JP1997/002030 1997. 6. 12

[87] 国际公布 WO1997/047755 日 1997. 12. 18

[85] 进入国家阶段日期 1998. 2. 11

[71] 专利权人 日本烟草产业株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 植木润 太田象三 仓屋芳树

森冈真二

审查员 李 博

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 范明娥

权利要求书 3 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 表达异源基因的方法及其所用的载体

[57] 摘要

一种用于异源基因表达的方法，使异源基因的表达比通用方法所得的表达更强。该方法包括，将异源基因插入促进子的下游并在细胞中表达，其中在异源基因的上游插入二个或多个相同或不不同的内含子序列，并能促进异源基因的表达。

ISSN 1008-4274

1. 表达异源基因的方法，包括将异源基因插入启动子的下游，并使该异源基因在细胞中表达，其特征在于，将 2-5 个能促进异源基因表达的、来自内含子的相同或不相同 DNA 片段插入该异源基因的上游，以表达所述异源基因，所述来自内含子的 DNA 片段至少有一个包含选自下组的序列：序列号 1 所示序列或其功能性变异体，序列号 2 所示序列或其功能性变异体，序列号 3 所示序列或其功能性变异体，以及，在序列号 1 所示序列、序列号 2 所示序列、序列号 3 所示序列任一个中添加、缺失或置换一个或多个核苷酸所得到的序列或其功能性变异体。

2. 权利要求 1 所述方法，其中来自内含子的 DNA 片段为 2 或 3 个。

3. 权利要求 1 或 2 所述方法，其中所述来自内含子的 DNA 片段至少有一个包含选自下组的序列：序列号 1 所示序列或其功能性变异体，序列号 2 所示序列或其功能性变异体，序列号 3 所示序列或其功能性变异体，以及，在序列号 1 所示序列、序列号 2 所示序列、序列号 3 所示序列任一个中添加、缺失或置换一个或多个核苷酸所得到的序列或其功能性变异体。

4. 权利要求 1 或 2 所述方法，其特征在于，所述来自内含子的 DNA 片段是在上述启动子和上述异源基因之间插入。

5. 权利要求 1 到 4 中任一项所述方法，其特征在于，所述细胞是植物细胞。

6. 权利要求 1 到 5 任何一项所述的方法，其特征在于，在所述来自内含子的 DNA 片段中，至少有一个含有序列表中序列号 1 所示的序列或其功能性变异体。

7. 权利要求 6 所述方法，其特征在于，所述来自内含子的 DNA 片段含有 2 个如序列表中序列号 1 所示序列或其功能性变异体。

8. 权利要求 1 到 6 中任何一项所述方法，其特征在于，在所述来自内含子的 DNA 片段中，至少一个含有序列表中序列号 2 所示序列或其功能性变异体。

9. 权利要求 8 所记载的方法，其特征在于，所述来自内含子的 DNA 片段含有序列号 1 所示序列或其功能性变异体和序列号 2 所示序列或其功能性变异体。

10. 权利要求 1 到 5 中任何一项所述方法，其特征在于，所述来自内含子的 DNA 片段中，至少有一个含有序列表中序列号 3 所示序列或其功能性变异体。

5 11. 权利要求 10 所述方法，其特征在于，所述来自内含子的 DNA 片段含有序列号 1 所示序列或其功能性变异体和序列号 3 所示序列或其功能性变异体。

12. 重组载体，其特征在于，含有启动子，和插入该启动子下游的要表达的异源基因，以及插入该异源基因上游的、能促进异源基因表达的、2-5 个、相同或不不同的、来自内含子的 DNA 片段，所述来自内含子的 DNA 10 片段至少有一个包含选自下组的序列：序列号 1 所示序列或其功能性变异体，序列号 2 所示序列或其功能性变异体，序列号 3 所示序列或其功能性变异体，以及，在序列号 1 所示序列、序列号 2 所示序列、序列号 3 所示序列任一个中添加、缺失或置换一个或多个核苷酸所得到的序列或其功能性变异体。

15 13. 权利要求 12 所述重组载体，其中来自内含子的 DNA 片段为 2 或 3 个。

14. 权利要求 12 或 13 所述重组载体，其中所述来自内含子的 DNA 片段至少有一个包含选自下组的序列：序列号 1 所示序列或其功能性变异体，序列号 2 所示序列或其功能性变异体，序列号 3 所示序列或其功能性变异 20 体，以及，在序列号 1 所示序列、序列号 2 所示序列、序列号 3 所示序列任一个中添加、缺失或置换一个或多个核苷酸所得到的序列或其功能性变异体。

15. 权利要求 12 或 14 所述重组载体，其特征在于，所述来自内含子的 DNA 片段是插入在所述启动子和所述异源基因之间。

25 16. 权利要求 12 - 15 中任一项所述重组载体，其特征在于，该重组载体可在植物细胞内复制。

17. 权利要求 12 到 16 中任何一项所述重组载体，其特征在于，所述来自内含子的 DNA 片段中，至少有一个含有序列表中序列号 1 所示的序列或其功能性变异体。

30 18. 权利要求 17 所述重组载体，其特征在于，所述来自内含子的 DNA 片段含有 2 个如序列表中序列号 1 所示的序列或其功能性变异体。

19. 权利要求 12 到 16 中任何一项所述重组载体, 其特征在于, 所述来自内含子的 DNA 片段中, 至少有一个含有序列表中序列号 2 所示的序列或其功能性变异体。
20. 权利要求 19 所述重组载体, 其特征在于, 所述来自内含子的 DNA 片段含有序列号 1 所示序列或其功能性变异体和序列号 2 所示序列或其功能性变异体。
21. 权利要求 12 到 16 中任何一项所述的重组载体, 其特征在于, 所述来自内含子的 DNA 片段中, 至少有一个含有序列表中序列号 3 所示的序列或其功能性变异体。
22. 权利要求 21 所述的重组载体, 其特征在于, 所述来自内含子的 DNA 片段含有序列号 1 所示序列或其功能性变异体和序列号 3 所示序列或其功能性变异体。
23. 表达异源基因的方法, 包括将异源基因插入启动子的下游并使该异源基因在细胞中表达, 其特征在于, 将序列表中序列号 3 所示序列或其功能性变异体插入该异源基因的上游, 以表达所述异源基因。
24. 权利要求 23 所述的方法, 其特征在于, 插入的是序列表中序列号 3 所示的序列。
25. 权利要求 23 或 24 所述的方法, 其特征在于, 将序列表中序列号 3 所示序列或其功能性变异体插入所述启动子和所述异源基因之间。
26. 权利要求 23 到 25 中任何一项所述的方法, 其特征在于, 所述细胞是植物细胞。

## 表达异源基因的方法 及其所用的载体

5

### 技术领域

本发明涉及异源基因的表达方法及其所用的重组载体。更具体地说，本发明涉及用基因工程技术在细胞中表达异源基因的方法以及涉及其所用的载体，与现有的异源基因表达法相比较，本发明的方法更能促进异源基因表达。

### 背景技术

异源基因表达的促进是在基因工程中、特别是在将基因工程的技术用于植物中时最必要的技术之一。

作为这类方法之一，已知将来自内含子(intron)的 DNA 片段插入异源基因上游的方法，例如在特开平 3-103182 号公报中所述，通过将来自蓖麻过氧化氢酶基因(CAT-1)的内含子的 DNA 片段插入异源基因上游，并使该异源基因表达，而促进该异源基因的表达。报导了有关来自各种内含子的 DNA 片段的相同现象。

为了促进异源基因的表达，一直使用内含子，但一般不用多个内含子，所以也看不出它的效果。例如：玉米的醇脱氢酶的第一内含子和第六内含子分别单独地呈显促进基因表达的效果，但是两者结合时的效果还不及单独使用第六内含子的效果(Mascarenhas 等, Plant Mol. Biol., 15, 913 - 920)(1990)。又，两个玉米肌动蛋白第三内含子结合时，其效果也不如单独使用的效果(Luehrsen 等人 Mol.Gen.Genet., 225, 81 - 93(1991))。

插入来自内含子的 DNA 片段的现有方法是有效的，但其促进表达的效果大多不充分，人们期望可能有更强地表达的方法。

### 发明内容

因此，本发明的目的是提供一种比现有方法更强烈地表达异源基因的异源基因表达方法及为此所用的重组载体。

经努力研究的结果，本发明人等发现，在插入异源基因上游时，将具有促进异源基因表达效果的不同多个来自内含子的 DNA 片段插入异

源基因的上游的方法比插入一个来自内含子的DNA片段的现有方法能更明显地提高异源基因的表达。

也就是，本发明提供一种表达异源基因的方法，包括将异源基因插入启动子下游并在细胞中表达异源基因，其特征在于将多个具有促进异源基因表达的效果的、相同或不不同的来自内含子的DNA片段插入该异源基因的上游，以表达该异源基因。

又，本发明还提供重组载体，该载体含有：启动子；在其下游所插入的异源基因；以及在该异源基因的上游所插入的、具有促进异源基因表达的效果的相同或不不同的多个来自内含子的DNA片段。

10 本申请人等发现：在具有序列表中序列号3中所示碱基序列的玉米泛素(ユビキチン)的内含子序列单独地被插入异源基因的上游时，也具有促进该异源基因表达的效果，从而完成本申请的第二个目的。

也就是，本发明还提供具有以下特征的异源基因的表达方法，包括将异源基因插入启动子下游，并在细胞中表达该异源基因，其特征在于将序列表中序列号3所示序列或其功能性变体插入该异源基因的上游，以表达上述异源基因。

20 通过本发明可提供与现有表达异源基因的方法相比，具有明显促进异源基因的表达的方法以及为其所用的重组载体。按照本发明，能促进以基因工程方法导入的异源基因的表达，因此，在基因工程领域中，本发明将作出大的贡献。

实施本发明的最佳模式

本发明方法的特征在于，通过将二个以上的具有促进异源基因表达效果的、来自内含子的DNA片段插入要表达的异源基因的上游，以促进异源基因的表达。

25 这里，所谓“具有促进异源基因表达的效果的、来自内含子的DNA片段”是指下述来自内含子的DNA片段，插入该片段比未插入该片段促进了异源基因的表达，使表达水平达到了可检测的程度。已知有多种这样的来自内含子的DNA片段，例如有：蓖麻的过氧化氢酶基因(CAT-1)的第一内含子(特开平3-103182号公报、田中等人，Nucleic Acids Res. 18, 6767-30 6770(1990))、玉米的UDP-葡萄糖：黄酮醇糖基转移酶的内含子(Callis等人，Genes & Develop. 1, 1183-1200(1987))、玉米的醇脱氢酶-1的第一内

含子(Callis 等人, Genes & Develop.1, 1183 - 1200(1987))。玉米的醇脱氢酶-1 的第二和第六内含子(Mascarenhas 等人, Plant Mol. Biol, 15, 913 - 920(1990))、玉米的舒兰肯-1(シユランクン-1)第一内含子(Vasil 等人, Plant Physiol. 91, 1575 - 1579(1989))、拟南芥(Arabidopsis thaliana)的翻译延伸因子 EF-1 $\alpha$  的第一内含子(Curie 等人, Nucleic Acids Res. 19, 1305 - 1310(1991))以及稻的肌动蛋白的第一内含子(McEloy 等人, Plant Cell 2, 163 - 171(1990))等。但是, 本发明所用的来自内含子的 DNA 片段并不限于上述这些, 任何能促进其下游异源基因表达的来自内含子的 DNA 片段都可以使用。

10 又, 本发明人等人此前通过将稻的磷脂酶 D(PLD)基因的 cDNA 和基因组 DNA 的碱基序列进行比较而发现稻 PLD 基因的内含子; 而且发现在这些内含子中之一具有明显促进其下游基因表达的效果, 因此申请专利(PCT/JP96/00812)。此内含子的碱基序列示于序列表的序列号 1 中。在本发明中, 可使用序列号 1 所示的这一来自内含子的 DNA 片段。又, 也可优选  
15 使用在序列表中序列号 2 所表示的蓖麻过氧化氢酶内含子序列和序列号 3 所示的玉米泛素(Ubiquitin)基因的内含子序列。

再者, 本领域专业人员熟知, 一般在具有生理作用的 DNA 序列中, 加入、插入、缺失或置换一个或多个核苷酸时还能维持其生理活性。在本发明中, 对上述公知的来自内含子的 DNA 片段或序列号 1 所示的来自内含子  
20 的 DNA 片段进行这种修饰所得的具有促进其下游基因的表达的 DNA 片段也包含在本发明的所谓“来自内含子的 DNA 片段”中。也就是, 在与上述公知来自内含子的 DNA 片段相同的核苷酸序列, 或序列表中序列号 1 所示的核苷酸序列上, 添加、缺失或置换一个或多个核苷酸并又能促进其下游基因的表达的 DNA 片段也包含在本发明中的“来自内含子的 DNA 片段”  
25 中。这里, 经这样修饰的来自内含子的 DNA 片段优选与原始的来自内含子的 DNA 片段有 70% 以上, 更优选 90% 以上的同源性。同样, 在本申请权利要求中所述的“功能性变异体”也是在原来的序列上添加、缺失或置换一个或多个核苷酸、而且又能促进其下游基因表达的序列, 优选该序列与原始序列有 70% 以上, 更优选有 90% 以上的同源性。例如: 所谓“序列号  
30 1 所示序列的功能性变异体”就是: 序列号 1 所示序列中添加、缺失或置换一个或多个核苷酸, 能促进其下游基因表达的序列, 它优选与原始序列,

有 70% 以上、更优选有 90% 以上的同源性。

上述每一种来自内含子的 DNA 片段因其碱基序列和来源都是公知的，因此，通过常规方法的 PCR 方法就能容易地制备。又，长度不超过 2000bp 的 DNA 片段也可化学合成。又，上述修饰的来自内含子的 DNA 片段也能  
5 用位点特异性诱变法或化学合成法而容易制备。

在本发明方法中，将多个上述来自内含子的 DNA 片段插入要表达的异源基因的上游、也就是插入该异源基因的转录区，优选插入该转录区的 5' 末端。来自内含子的 DNA 片段最好插入启动子和异源基因之间。来自内含子的 DNA 片段也可插入紧邻要表达的异源基因的上游；来自内含子的 DNA  
10 片段和异源基因之间也可以介入其它序列。这种间插序列的长度并不受限制，通常约为 0~1000bp。又，启动子和来自内含子的 DNA 片段直接连接也可以；在它们之间有其它序列介入也可以。这些间插序列的长度并不特别受限制，通常约为 0~1000bp。

在本发明方法中，将多个、优选 2~5 个，更优选 2 或 3 个上述来自内  
15 含子的 DNA 片段插入。插入的来自内含子的 DNA 片段可以是相同序列，也可以是不相同的序列。插入的多个来自内含子的 DNA 片段也可相互直接连接，在它们之间也可介入其它序列。该间插序列的长度不特别受限制，通常约为 0~1000bp。

再者，启动子也可用能使其下游的异源基因表达的任何启动子，优选  
20 的实例可以是 35S 启动子，但也不限于此。

本发明还提供适用于上述本发明方法的重组载体。也就是，本发明所提供如下重组载体，它包含，启动子；在其下游连接的要表达的异源基因；插入于该异源基因上游的、具有促进异源基因表达效果的不同或不不同的  
25 多个来自内含子的 DNA 片段。这样的重组载体可通过将上述多个来自内含子的 DNA 片段和异源基因插入适当的表达载体中而获得。由于表达载体的克隆部位的碱基序列为已知，所以通过使用适当的限制酶和必要时使用接头可容易地进行这种插入操作。

再者，各种这样的表达载体在本领域是众所周知的，并有市售。这些表达载体至少含有：用于在宿主细胞内复制的复制起始点；启动子；提供  
30 插入异源基因所需的限制酶部位的克隆部位以及耐药性基因等选择标记。它们通常含有使复制稳定终结的终止区和当宿主为细菌时的 SD 序列。在本

发明方法中，可采用这些公知的表达载体中的任何一种。

本申请发明人等发现，当将具有序列列表的序列号 3 所示碱基序列的、玉米泛素基因的内含子序列单独地插入在异源基因的上游时，也具有促进该异源基因表达的效果。因此，代替上述多个来自内含子的序列，而只将序列号 3 所示序列或其功能性变异体插入的情况也包含于本发明范围内。但是，即使是使用序列 3 所示序列，在插入多个此序列的情况下，其效果更强，特别是与以序列号 1 所示的稻 PLD 的内含子序列一起插入时，效果特别好。

#### 实施例

以下，基于实施例对本发明进行具体说明，只是，本发明并不限于下述实施例。

#### 实施例 1

在稻 PLD 的基因中，在与 mRNA 的 5' 末端非翻译区相对应的位置上存在有 173bp 的第一内含子(序列号 1, WO 95/09234)。就该内含子研究了它对植物细胞中基因表达的影响。合成 20 个碱基的引物(5' - TCACCACCCGGTAAGCCCAG - 3', 3' - CCCCCGCGTCCATCCCGCTC - 5')，每一引物含有 10 个碱基的来自外显子的区域，以稻基因组克隆(クローン)作为模板而进行 PCR。使用引物各 50pmol, 200 μM 的 dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP、1 × PCR 缓冲液(宝酒造公司制)和 2.5U AmpliTaq DNA 聚合酶(宝酒造公司制)，在总体积为 50 μl 中进行 PCR 反应。反应按下述的温度条件反复进行 30 个循环，即，在 DNA 热循环仪(PARKIN ELMER CETUS 公司制)中，在 94℃ 一分钟、在 40℃ 一分钟和在 72℃ 为二分三十秒。

将 PCR 产物亚克隆至 PCR II 载体(INVITROGEN 公司制)中，将从中切出的 ECoRI 片段进行平滑末端处理后，插入东洋纺公司制备的质粒 pBI221[在 35S 启动子(以下称为“35Spro”)的下游插入 β - 葡糖醛酸酶基因(以下称为“GUS”)的载体质粒]的 SmaI 位点上，获得载体 pBI221P(35S pro, PLD 内含子, GUS)。再将该质粒用 BamHI 消化，对所得片断进行平滑末端处理后，将上述片段嵌入，制备载体 pBI221PP(35S pro, PLD 内含子 × 2, GUS)。

再用 XbaI 将特开平 03 - 103182 号公报上所述的 pIG221[在 35S pro 的下游有蓖麻过氧化氢酶内含子(序列列表中的序列号 2)和 GUS 按此顺序存在]

进行消化，将所得片段进行平滑末端处理后，将具有上述 PLD 内含子序列的 DNA 片段插入，制成载体 pIG221P(35S pro, PLD 内含子, 过氧化氢酶内含子, GUS)。

通过日本稻“日本巴雷”品种的未成熟胚体制成稻培养细胞(Hiei 等人, 5 The Plant Journal, 6, 271 - 282(1994)), 按照现有报道[岛本等人, Nature, 338, 274 - 276(1989)]向这些细胞中导入上述基因后, 测定  $\beta$  - 葡糖醛酸酶(GUS) 活性, 结果示于表 1。

如表 1 所示那样, 可以看出: 与使用单个内含子相比, 导入二种相同或不同内含子, 有明显增大的 GUS 的活性。同时, 很明显, 有 PLD 内含子的碱基序列的 DNA 片段在使用多个具有内含子的碱基序列的 DNA 片段时, 10 可获得促进基因表达的效果。

表 1

质粒	GUS 活性
无	7.2
pBI221 (35S pro, GUS)	14
pBI221P (35S pro, PLD 内含子, GUS)	180
pBI22PP (35S pro, PLD 内含子 × 2, GUS)	430
pIG221 (35S pro, 过氧化氢酶内含子, GUS)	160
pIG221P (35S pro, PLD 内含子, 过氧化氢酶内含子, GUS)	680

#### 实施例 2

就玉米的泛素基因的内含子(Ubi - 1:Christensen A.H.等人, Plant Mol. 15 Biol., 18, 675 - 689(1982)), 研究其对异源基因表达的促进效果, 所用载体有两种。

首先, 用以下方法制备用于研究插入单个内含子时效果的载体。用 PstI 切出启动子和泛素基因的内含子(序列号 3), 插入 pUC 18 载体的 PstI 位点。用 Bgl II 和 BamH I 切出内含子部分, 将其插入 pBI221 载体的 BamH I 位点, 20 制成载体 pBI221U(35S pro、泛素内含子、GUS)。

其次, 用以下方法制备用于研究插入多个内含子时效果的载体。用 Bgl II 和 BamH I 切出内含子部分, 在平滑末端处理后, 将其插入 pBI221 载体的 Sma I 位点。又在该载体的 BamH I 位点进行平滑末端处理, 将所述 PLD 内含子插入, 从而制成载体 pBI221PU(35S pro, PLD 内含子, 泛素内含子,

GUS)。用上述方法将这些载体导入原生质粒，测定 GUS 活性。

正如表 2 所示，可看出使用单个泛素内含子有促进 GUS 表达的效果。又，可看出并用 PLD 内含子和泛素内含子，比使用单个内含子具有更强的促进效果。

5 表 2

质粒	GUS 活性 (pmol MU/min./mg 蛋白质)
无	3.3
pBI221(35S pro, GUS)	13
pBI221(35S pro, PLD 内含子, GUS)	100
pBI221(35S pro, 泛素内含子, GUS)	360
pBI221(35S pro, PLD 内含子, 泛素内含子, GUS)	780

以下是序列表：

序列表

序列号：1

序列长度：173

10 序列类型：核酸

序列种类：基因组的 DNA

来源

生物名：稻(Oryza Sativa)

拓朴学：直链状

15 链数：双链

序列

GTAAGCCCAG TGTGCTTAGG CTAAGCGCAC TAGAGCTTCT TGCTCGCTTG CTTCTTCTCC 60

GCTCAGATCT GCTTGCTTGC TTGCTTCGCT AGAACCCCTAC TCTGTGCTGC GAGTGTGCT 120

GCTTCGTCTT CCTTCCTCAA GTTCGATCTG ATTGTGTGTG TGGGGGGGCG CAG 173.

20 序列号：2

序列长度：217

序列类型：核酸

序列种类：基因组的 DNA

## 来源

生物名: 蓖麻

拓扑学: 直链状

链数: 双链

5 序列 ACATGGATCC CTACAGGGTA AATTTCTAGT TTTTCTCCTT CATTTTCTTG GTTAGGACCC 60  
 TTTTCTCITT TTATTTTTTT GAGCTTTGAT CTTTCTTTAA ACTGATCTAT TTTTAAATTG 120  
 ATTGGTTATG GTGTAATAT TACATAGCTT TAACTGATAA TCTGATTACT TTATTTCTGTG 180  
 TGTCTATGAT GATGATGATA GTTACAGAAC CGTCGAC 217

序列号: 3

10 序列长度: 1010

序列类型: 核酸

序列种类: 基因组的 DNA

## 来源

生物名: 玉米

15 拓扑学: 直链状

链数: 双链

序列: GTACGCCGCT CGTCCTCCCC CCCCCCCCCT CTCTACCTTC TCTAGATCGG CGTTCGGGTC 60  
 CATGGTTAGG GCCCGGTAGT TCTACTTCTG TTCATGTTTG TGTTAGATCC GTGTTTGTGT 120  
 TAGATCCGTG CTGCTAGCGT TCGTACACGG ATGCGACCTG TACGTCAGAC ACGTTCTGAT 180  
 TGCTAACTTG CCAGTGTTTC TCTTTGGGGA ATCCTGGGAT GGCTCTAGCC GTTCCGCAGA 240  
 CGGGATCGAT TTCATGATTT TTTTGTGTTT GTTGATAGG GTTTGGTTTG CCTTTTTCTT 300  
 TTATTTCAAT ATATGCCGTG CACTTGTTTG TCGGGTCATC TTTTCATGCT TTTTTTGTG 360  
 TTGGTTGTGA TGATGTGGTC TGGTTGGGCG GTCGTTCTAG ATCGGAGTAG AATTCTGTTT 420  
 CAAACTACCT GGTGGATTA TTAATTTTGG ATCTGTATGT GTGTGCCATA CATATTCATA 480  
 GTTACGAATT GAAGATGATG GATGGAAATA TCGATCTAGG ATAGGTATAC ATGTTGATGC 540  
 GGGTTTTACT GATGCATATA CAGAGATGCT TTTTGTTCGC TTGGTTGTGA TGATGTGGTG 600  
 TGGTTGGGCG GTCGTTTCATT CGTTCTAGAT CGGAGTAGAA TACTGTTTCA AACTACCTGG 660  
 TGTATTTATT AATTTTGGAA CTGTATGTGT GTGTCATACA TCTTCATAGT TACGAGTTTA 720  
 AGATGGATGG AAATATCGAT CTAGGATAGG TATACATGTT GATGTGGGTT TTAGTATGATGC 780  
 ATATACATGA TGCCATATGC AGCATCTATT CATATGCTCT AACCTTGAGT ACCTATCTAT 840  
 TATAATAAAC AAGTATGTTT TATAATTATT TTGATCTTGA TATACTTGA TGATGGCATA 900  
 TGCAGCAGCT ATATGTGGAT TTTTTAGCC CTGCCTTCAT ACGCTATTTA TTTGCTTGGT 960  
 ACTGTTTCTT TTGTCGATGC TCACCCTGTT GTTTGGTGT ACTTCTGCAG 1010