



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113163740 B
(45) 授权公告日 2023. 09. 08

(21) 申请号 201980062483.9
(22) 申请日 2019.08.12
(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113163740 A
(43) 申请公布日 2021.07.23
(30) 优先权数据
62/717,201 2018.08.10 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.23
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/046088 2019.08.12
(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/033940 EN 2020.02.13
(73) 专利权人 水产养殖技术中心有限公司
地址 美国加利福尼亚州
(72) 发明人 X·C·劳斯 J·T·布坎南
(74) 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司
11283
专利代理师 刘伊南 刘依云

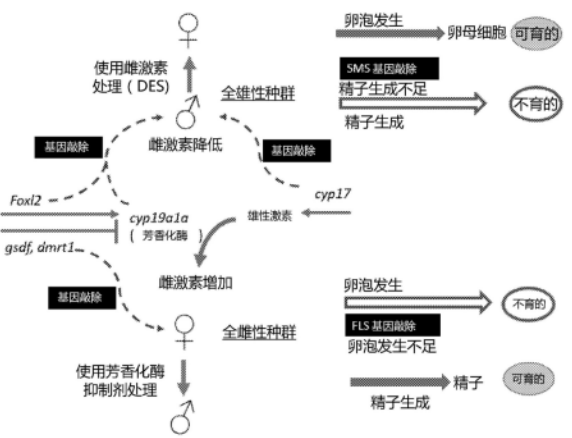
(51) Int.Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)
(56) 对比文件
CN 1994072 A, 2007.07.11
US 2015096499 A1, 2015.04.09
CN 103088066 A, 2013.05.08
US 8921643 B2, 2014.12.30
US 2012304323 A1, 2012.11.29
CN 105695477 A, 2016.06.22
CN 1528131 A, 2004.09.15
CN 105475202 A, 2016.04.13
CN 102695798 A, 2012.09.26
US 2010212039 A1, 2010.08.19
US 6307121 B1, 2001.10.23
CN 106614142 A, 2017.05.10
CN 103891640 A, 2014.07.02 (续)
审查员 郭玉莹

权利要求书7页 说明书95页 附图21页

(54) 发明名称
一种产生不育和单性后代的方法

(57) 摘要
本发明提供了一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法。该方法包括繁殖(i)具有至少第一突变和第二突变的可育纯合突变雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,和(ii)具有至少第一突变和第二突变的可育纯合突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物,或软体动物。所述第一个突变破坏了一个或多个指定性别分化的基因,所述第二突变破坏了一个或多个指定配子功能的基因,并且所述的可育纯合子雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述的可育纯合子突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的育性得到了拯救。本发明还提供了用于生产不育的性

别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的亲代的制造方法,以及亲代本身。



CN 113163740 B

[接上页]

(56) 对比文件

Tang Haipei 等.Fertility impairment
with defective spermatogenesis and

steroidogenesis in male zebrafish lacking
androgen receptor+.BIOLOGY OF
REPRODUCTION.2018,第98卷(第2期),图2-4.

1. 一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法,包括以下步骤:

繁殖(i)具有至少第一突变和第二突变的可育杂合突变的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以及(ii)具有至少第一突变和第二突变的可育杂合突变的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物;以及

通过基因型选择选择纯合子的后代,纯合子突变的后代为不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物,

其中所述第一突变破坏一个或多个指定性分化的基因,包括:(a)一个或多个调节雄激素和/或雌激素合成的基因中的突变;和/或(b)一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因中的突变,以及

其中所述第二突变破坏一个或多个指定配子功能的基因,包括:(c)一个或多个调节精子发生的基因中的突变;和/或(d)一个或多个调节:(aa)卵子发生,(bb)卵泡发生,和/或(cc)其组合的基因中的突变。

2. 一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法,包括以下步骤:

繁殖(i)具有至少第一个突变和第二个突变的可育纯合突变雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以及(ii)具有至少第一个突变和第二个突变的可育纯合突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物,

其中所述第一突变破坏一个或多个指定性分化的基因,包括:(a)一个或多个调节雄激素和/或雌激素合成的基因中的突变;和/或(b)一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因中的突变,

其中所述第二突变破坏一个或多个指定配子功能的基因,包括:(c)一个或多个调节精子发生的基因中的突变;和/或(d)一个或多个调节:(aa)卵子发生,(bb)卵泡发生,和/或(cc)其组合的基因中的突变,并且

其中,所述可育纯合子雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述可育纯合子突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的育性已拯救。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述育性拯救包含种系干细胞移植。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述育性拯救进一步包含性类固醇改变。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述性类固醇之改变系雌激素之改变或芳香化酶抑制剂之改变。

6. 根据权利要求3所述的方法,其中该种系干细胞移植包含以下步骤:

从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得一个或多个种系干细胞,或从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得一个或多个种系干细胞;以及

将一个或多个生殖系干细胞移植到无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物中,或移植到无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物中。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物为dnd1、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因的空突变或功能丧失突变的纯合子。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物是使用倍性操作培育的。

9. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类甲壳类动物或软体动物通过杂交产生。

10. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类甲壳类动物或软体动物是通过暴露于高水平的性激素而产生的。

11. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述种系干细胞移植包含以下步骤:

从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得一个或多个精原干细胞, 或从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得一个或多个卵原干细胞; 以及

将一个或多个精原干细胞或一个或多个卵原干细胞移植到无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的精巢或无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物的卵巢中。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物为dnd1、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因突变的纯合子。

13. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物是使用倍性操作培育的。

14. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类甲壳类动物或软体动物通过杂交产生。

15. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类甲壳类动物或软体动物是通过暴露于高水平的性激素而产生的。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述不育的性别决定的鱼类、甲壳动物或软体动物为不育雄性鱼类、甲壳动物或软体动物。

17. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述一个或多个调节雄激素和/或雌激素合成的基因为一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a、Cyp17或其组合的表达的基因。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述调节芳香化酶Cyp19a1a的表达的一个或多个基因是从由Cyp19a1a、FoxL2及其直系同源物组成的组中选择一个或多个基因。

19. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述调节Cyp17表达的一个或多个基因为cyp17I或其同源基因。

20. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述一个或多个调节雄激素和/或雌激素合成的基因为一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a、Cyp17或其组合的表达的基因。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述调节芳香化酶Cyp19a1a的表达的一个或多个基因是从由Cyp19a1a、FoxL2及其直系同源物组成的组中选择一个或多个基因。

22. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述调节Cyp17表达的一个或多个基因为cyp17I或其同源基因。

23. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述调节精子形成的一个或多个基因为导致珠精子症的一个或多个基因, 其导致精子具有圆头、圆核、无组织的中段、部分卷曲的尾部或其组合。

24. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述调节精子形成的一个或多个基因为导致珠精子症的一个或多个基因, 其导致精子具有圆头、圆核、无组织的中段、部分卷曲的尾部或其组合。

25. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述调节精子形成的一个或多个基因为导致珠精子症的一个或多个基因, 其导致精子具有圆头、圆核、无组织的中段、部分卷曲的尾部或其组合。

26. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述调节精子形成的一个或多个基因为导致珠精子症的一个或多个基因, 其导致精子具有圆头、圆核、无组织的中段、部分卷曲的尾部或其组合。

27. 根据权利要求23所述的方法, 其中所述导致珠精子症的一个或多个基因选自Gopc、Hiat1、Tjpl1a、Smap2、Csnk2a2及其直系同源物组成之组中。

28. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述导致珠精子症的一个或多个基因选自Gopc、Hiat1、Tjpl1a、Smap2、Csnk2a2及其直系同源物组成之组中。

29. 根据权利要求25所述的方法, 其中所述导致珠精子症的一个或多个基因选自Gopc、Hiat1、Tjpl1a、Smap2、Csnk2a2及其直系同源物组成之组中。

30. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述导致珠精子症的一个或多个基因选自Gopc、Hiat1、Tjpl1a、Smap2、Csnk2a2及其直系同源物组成之组中。

31. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述不育的性别决定的鱼类、甲壳动物或软体动物为不育雌性鱼类、甲壳动物或软体动物。

32. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因为选自Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr及其直系同源基因的组中的一个或多个基因。

33. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂的表达的一个或多个基因为Gsdf、dmrt1或其直系同源基因。

34. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因为选自Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr及其直系同源基因的组中的一个或多个基因。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂的表达的一个或多个基因为Gsdf、dmrt1或其直系同源基因。

36. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵子发生的基因调节雌激素的合成。

37. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵子发生的基因调节雌激素的合成。

38. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵子发生的基因调节雌激素的合成。

39. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵子发生的基因调节雌激素的合成。

40. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵子发生的基因为FSHR或其直系同源基因。

41. 根据权利要求37所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵子发生的基因为FSHR或

其直系同源基因。

42. 根据权利要求38所述的方法, 其中所述一个或多个调节雌激素合成的基因为FSHR或其直系同源基因。

43. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述一个或多个调节雌激素合成的基因为FSHR或其直系同源基因。

44. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵泡形成的基因调节卵黄蛋白原的表达。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵黄蛋白原表达的基因为vtgs或其同源基因。

46. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因编码或调节以下中的突变: 卵黄蛋白原; 雌激素受体1; 细胞色素p450, 家族1, 亚家族a; 透明带糖蛋白; 绒毛膜原H; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 类固醇生成急性调节蛋白, 或其直系同源物。

47. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵泡形成的基因调节卵黄蛋白原的表达。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵黄蛋白原表达的基因为vtgs或其同源基因。

49. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因编码或调节以下中的突变: 卵黄蛋白原; 雌激素受体1; 细胞色素p450, 家族1, 亚家族a; 透明带糖蛋白; 绒毛膜原H; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 类固醇生成急性调节蛋白, 或其直系同源物。

50. 根据权利要求32所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵泡形成的基因调节卵黄蛋白原的表达。

51. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵黄蛋白原表达的基因为vtgs或其同源基因。

52. 根据权利要求50所述的方法, 其中所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因编码或调节以下中的突变: 卵黄蛋白原; 雌激素受体1; 细胞色素p450, 家族1, 亚家族a; 透明带糖蛋白; 绒毛膜原H; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 类固醇生成急性调节蛋白, 或其直系同源物。

53. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵泡形成的基因调节卵黄蛋白原的表达。

54. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵黄蛋白原表达的基因为vtgs或其同源基因。

55. 根据权利要求53所述的方法, 其中所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因编码或调节以下中的突变: 卵黄蛋白原; 雌激素受体1; 细胞色素p450, 家族1, 亚家族a; 透明带糖蛋白; 绒毛膜原H; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 类固醇生成急性调节蛋白, 或其直系同源物。

56. 一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法, 包括以下步骤:

繁殖(i)具有纯合子突变的可育雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物, 以及(ii)具有纯合

子突变的可育雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物,

其中所述突变直接或间接破坏精子发生,和/或直接破坏卵黄发生,以及

其中所述可育雌鱼、甲壳动物或软体动物和所述可育雄鱼、甲壳动物或软体动物的可育性已拯救。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中直接或间接中断精子形成之突变系Gopc、Hiat1、Tjpl1a、Smap2、Csnk2a2或其直系同源基因中之突变。

58. 根据权利要求56所述的方法,其中所述直接干扰卵黄发生之突变系编码或调节以下中的基因突变:卵黄原蛋白;雌激素受体1;细胞色素p450,家族1,亚家族a;透明带糖蛋白;绒毛膜原H;过氧化物酶体增殖物活化受体;类固醇急性调节蛋白,或其直系同源物。

59. 根据权利要求57所述的方法,其中所述直接干扰卵黄发生之突变系编码或调节以下中的基因突变:卵黄原蛋白;雌激素受体1;细胞色素p450,家族1,亚家族a;透明带糖蛋白;绒毛膜原H;过氧化物酶体增殖物活化受体;类固醇急性调节蛋白,或其直系同源物。

60. 根据权利要求56所述的方法,其中所述可育雌鱼、甲壳类动物或软体动物和所述可育雄鱼、甲壳类动物或软体动物具有多个纯合突变,其组合:直接或间接破坏精子发生;直接破坏卵黄发生;或两者兼而有之。

61. 根据权利要求56所述的方法,其中所述育性拯救包括种系干细胞移植。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述育性拯救进一步包含性类固醇改变。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述性类固醇之改变系雌激素之改变或芳香化酶抑制剂之改变。

64. 根据权利要求61所述的方法,其中所述种系干细胞移植包括以下步骤:

从至少具有纯合突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得一个或多个种系干细胞,或从至少具有纯合突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获一个或多个种系干细胞;以及

将一个或多个生殖系干细胞移植到无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物中,或移植到无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物中。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物为dnd1、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因的空突变或功能丧失突变的纯合子。

66. 根据权利要求64所述的方法,其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物是使用倍性操作培育的。

67. 根据权利要求64所述的方法,其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类甲壳类动物或软体动物通过杂交产生。

68. 根据权利要求64所述的方法,其中所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类甲壳类动物或软体动物是通过暴露于高水平的性激素而产生的。

69. 根据权利要求56-68中任一项所述的方法,其中所述可育雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述可育雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物具有指定性分化的额外纯合突变。

70. 根据权利要求69所述的方法,其中该指定性分化之突变调节芳香化酶Cyp19a1a、

Cyp17、芳香化酶Cyp19a1a之抑制剂或其组合之表达。

71. 根据权利要求70所述的方法, 其中调节Cyp17表达的突变为cyp17I中的突变或其同源基因。

72. 根据权利要求70或71所述的方法, 其中所述调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达之突变系Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr中之突变或其直系同源。

73. 根据权利要求56所述的方法, 其中所述繁殖步骤包括: a) 杂交或激素操作; 和b) 繁殖策略, 以指定性分化。

74. 一种产生可育的纯合突变鱼类、甲壳动物或软体动物的方法, 其产生不育的性别决定的鱼类、甲壳动物或软体动物, 包括以下步骤:

繁殖(i) 具有至少第一突变和第二突变的可育杂合突变雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物, 以及(ii) 具有至少第一突变和第二突变的可育杂合突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物;

通过基因型选择选择纯合子的后代; 以及

拯救纯合子后代的育性,

其中第一突变破坏一个或多个指定性分化的基因, 包括: (a) 一个或多个调节雄激素和/或雌激素合成的基因中的突变; 和/或(b) 一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因中的突变, 以及

其中所述第二突变破坏一个或多个指定配子功能的基因, 包括: (c) 一个或多个调节精子发生的基因中的突变; 和/或(d) 一个或多个调节: (aa) 卵子发生, (bb) 卵泡发生, 和/或(cc) 其组合的基因中的突变。

75. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述一个或多个调节雄激素和/或雌激素合成的基因中的突变为一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a、Cyp17或其组合的表达的基因中的突变。

76. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述调节芳香化酶Cyp19a1a的表达的一个或多个基因是从由Cyp19a1a、FoxL2及其直系同源物组成的组中选择一个或多个基因。

77. 根据权利要求75所述的方法, 其中所述调节Cyp17表达的一个或多个基因为cyp17I或其同源基因。

78. 根据权利要求74或75所述的方法, 其中所述调节精子形成的一个或多个基因为导致珠精子症的一个或多个基因, 其导致精子具有圆头、圆核、无组织的中段、部分卷曲的尾部或其组合。

79. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述导致珠精子症的一个或多个基因选自Gopc、Hiat1、Tjpl1a、Smap2、Csnk2a2及其直系同源物组成之组中。

80. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因为选自Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr及其直系同源基因的一个或多个基因。

81. 根据权利要求74或80所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵子发生的基因调节雌激素的合成。

82. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述一个或多个调节雌激素合成的基因为FSHR或其直系同源基因。

83. 根据权利要求74或80所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵泡形成的基因调节

卵黄蛋白原的表达。

84. 根据权利要求83所述的方法, 其中所述一个或多个调节卵黄蛋白原表达的基因为vtgs或其同源基因。

85. 根据权利要求83所述的方法, 其中所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因编码或调节以下中的突变: 卵黄蛋白原; 雌激素受体1; 细胞色素p450, 家族1, 亚家族a; 透明带糖蛋白; 绒毛膜原H; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 类固醇生成急性调节蛋白, 或其直系同源物。

一种产生不育和单性后代的方法

技术领域

[0001] 本发明一般涉及对淡水和海水生物进行绝育和性别决定的方法。

背景技术

[0002] 以下段落并非承认其中讨论的任何内容是现有技术或本领域技术人员知识的一部分。

[0003] 鱼类已经过基因工程 (GE) 改造来生产有价值的药用蛋白质或结合水产养殖的有利特性。为了满足未来对海产品的需求和提高水产养殖业可持续性的需要,已经培育了各种生长率、食物转化率、抗病性和营养价值都有所提高的鱼类。然而,由于担心转基因鱼意外释放到自然生态系统中,这些转基因鱼在世界范围内的应用受到阻碍。人工养殖的鱼类已被证明能在自然环境中繁殖和生存,从而形成野生种群。同样地,转基因鱼可能有本地的同类,这增加了基因修饰在整个野生种群中传播并改变本地基因库的可能性。因此,商业转基因鱼对环境构成潜在威胁,对负责风险效益评估的政策制定者和监管机构构成挑战。

[0004] 解决上述一个或多个问题的一种方法是对鱼类进行绝育。三倍体诱导是生产不育鱼类最常用和研究最为深入的方法。一般来说,三倍体鱼是通过将受精卵施加温度或压力冲击,迫使第二极体结合,产生具有三个染色体组 (3N) 的细胞而产生的。三倍体鱼不能发育正常的性腺,因为额外的染色体组会干扰减数分裂。在工业规模上,对成批鱼卵可靠地施加压力或温度冲击的操作是复杂的,而且成本高昂。物理处理诱导三倍体的另一种方法是遗传诱导三倍体,它是四倍体鱼类与二倍体鱼类杂交的结果。然而,由于胚胎存活率低和生长缓慢,四倍体鱼很难繁殖。在一些例子中,三倍体雄性产生一些正常的单倍体精子细胞,从而使雄性使鱼卵受精,尽管其效率降低。此外,在一些物种中,负性表现特征与三倍体表型有关,包括生长和对疾病的敏感性的降低。

[0005] 另一种对鱼进行绝育的方法是持续数周的激素处理。然而,在许多情况下,包括这些密集的长期处理过程,都没有理想的不育效果,且和/或与鱼类生长性能下降有关。此外,涉及合成类固醇的处理可能导致更高的死亡率。

[0006] 另一种对鱼类进行绝育的方法是使用转基因技术,其中包括整合一个转基因的步骤,该转基因会导致生殖细胞死亡或破坏其迁移模式,导致它们在发育中的胚胎中被切除。然而,除了沉寂外,转基因还受到位置效应的影响。因此,此类方法在被认为可用于商业用途之前,必须经过更广范围的监管审查程序。

[0007] 使鱼绝育的另一种方法是通过敲除或沉寂控制原始生殖细胞 (PGC) 发育的基因。据报道,此类方法会导致 PGC 丢失和不育。然而,这些鱼的不育特性是不可遗传的。相应地,利用敲除或沉寂控制 PGC 发育的基因的方法可能在操作上具有挑战性且成本高昂,因此在商业规模上有效地大规模生产不育鱼是不切实际的。

[0008] 硬骨鱼类性分化或性腺分化的机制是受内部 (遗传和内分泌因素) 和外部因素影响的复杂过程,包括物种相互作用和环境条件 (水温、pH 值和氧),其相对贡献因物种而异。

[0009] 在繁殖不育、决定性别的鱼类、甲壳类动物或软体动物方面的改进是可取的。

发明内容

[0010] 以下的介绍旨在向读者介绍本说明,但不定义任何发明。下文或本文件其他部分所述的重要元素或方法步骤的组合或子组合中可存在一项或多项发明。发明人不会仅由于在权利要求书中不描述此类其他发明而放弃或不主张其对本说明书中公开的任何一项或多项发明的权利。

[0011] 先前提出的一种或多种淡水和海水生物绝育的方法可能导致:(1)效果不足;(2)增加了繁殖不育性状的难度,例如,必须进行遗传选择以鉴定不育个体的亚群,和/或每代重复处理;(3)运营成本的增加,例如,在养殖业实践中实施重大变化,不能跨多个物种进行转移,增加生产时间,增加发育降低的不育生物的百分比,增加对疾病的敏感性,增加不育生物的死亡率或以上的组合;(4)培养的非本地物种基因流向野生种群和对新栖息地的定植;或(5)以上的组合。

[0012] 本发明提供了通过破坏性分化和配子发生途径来产生性别决定的不育淡水和海水生物的方法。本发明的一个或多个实施例可以:(1)通过例如允许不育个体的大规模生产并确保所有个体完全不育来提高绝育的效率;(2)通过例如减少商业规模的昂贵设备或处理的数量来降低操作成本,可在多个物种间转移,减少饲料,减少生产时间,减少达到性成熟的有机体的百分比,增加性成熟有机体的物理尺寸,或其组合;(3)减少培养的非本地物种的基因流向野生种群和对新栖息地的定植;(4)通过减少性腺发育的能量损失来提高养殖效率;或(5)与一种或多种先前提出的用于不育淡水和海水生物的方法相结合。

[0013] 与目前在生产系统中使用的其他生产方式(甲基睾酮处理)相比,本发明的一个或多个实例可至少提高10%的食物转化率($FCR = \text{每喂食量增加的重量}$)和大约20%的生长速率。这些性能优势可能只影响饲料成本(直接降低饲料成本)和劳动力(由于缩短培养时间而减少劳动力)。根据生产1000磅产品的美国罗非鱼养殖作业的平均分项成本,使用全部雄性不育罗非鱼,每条可销售大小的鱼(1.5磅)可节省约0.23美元,这表明,如一家企业选择保留其在生产成本方面的节约,其利润率可能会增加约130%。

[0014] 本发明还探讨了培育用于生产性别决定的不育淡水和海水生物的淡水和海水亲鱼的方法,以及亲鱼本身。

[0015] 本发明提供了一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法,包括以下步骤:繁殖(i)具有至少第一突变和第二突变的可育半合子突变的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以及(ii)具有可育半合子突变的雄性鱼类、甲壳类动物,或至少具有所述第一突变和所述第二突变的软体动物;以及通过基因型选择选择纯合子的前体,所述纯合子突变的前体是不育的性别决定的鱼、甲壳类动物或软体动物,其中所述第一突变破坏一个或多个指定性别分化的基因,以及其中所述第二突变破坏一个或多个指定配子功能的基因。

[0016] 本发明还提供了一种产生不育性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法,包括以下步骤:繁殖(i)具有至少第一突变和第二突变的可育纯合突变雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以及(ii)可育纯合突变雄性鱼类、甲壳类动物,或至少具有第一突变和第二突变以产生不育性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的软体动物,其中第一突变破坏一个或多个指定性分化的基因,其中第二突变破坏一个或多个指定配子功能的基因,其中,所述可育纯合子雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述可育纯合子突变雄性鱼类、甲壳

类动物或软体动物的育性已被拯救。

[0017] 育性拯救可能包括生殖系干细胞移植。育性拯救还可包括性类固醇改变。性类固醇的改变可能是雌激素的改变,或芳香化酶抑制剂的改变。

[0018] 种系干细胞移植可包括以下步骤:从具有至少第一突变和第二突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞,或从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞;以及将生殖系干细胞移植到无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物中,或移植到无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物中。无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可能是dnd、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因的空突变的纯合子。无生殖细胞的受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞的受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可以通过倍性操作来产生。无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过杂交产生。无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过暴露于高水平的性激素而产生。

[0019] 种系干细胞移植可包括以下步骤:从具有至少第一突变和第二突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得精原干细胞,或从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得卵原干细胞;以及将精原干细胞移植到生殖细胞缺乏的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的精巢中,或将卵原干细胞移植到生殖细胞缺乏的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物的卵巢中。无生殖细胞的可育雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞的可育雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可能是dnd、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因突变的纯合子。无生殖细胞的受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞的受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可以通过倍性操作来产生。无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过杂交产生。无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过暴露于高水平的性激素而产生。

[0020] 不育的性别决定的不育鱼类、甲壳动物或软体动物可以是不育雄性鱼、甲壳动物或软体动物。第一突变可包括一个或多个调节雄激素和/或雌激素合成的基因中的突变。第一突变可包含调控芳香化酶Cyp19a1a、Cyp17或其组合的表达的一个或多个基因中的突变。调节芳香化酶Cyp19a1a的表达的一个或多个基因可以是选自cyp19a1a、FoxL2及其直系同源物的组的一个或多个基因。所述调节Cyp17表达的一个或多个基因可以是cyp17I或其同源基因。第二突变可包括一个或多个调节精子发生的基因中的突变。所述第二种突变可包括导致珠精子症的一个或多个基因中的突变。所述一个或多个基因的第二突变可能导致精子圆头、圆核、中段紊乱、部分卷曲的尾巴或其组合。所述第二突变可包含选自Gopc、Hiat1、Tjpl1a、Smap2、Csnk2a2及其直系同源基因组成的组中的一个或多个基因中的突变。

[0021] 不育的性别决定的不育鱼类、甲壳动物或软体动物可以是不育的雌性鱼、甲壳动物或软体动物。第一突变可包括一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因中的突变。调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂的表达的一个或多个基因可以是选自Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr及其直系同源基因的一个或多个基因。第二突变可包括一个或多个调节卵子发生、卵泡发生或其组合的基因中的突变。所述调节卵子发生的一个或多个基因可能调节雌

激素的合成。所述调节雌激素合成的一个或多个基因可以是FSHR或其直系同源基因。所述调节卵泡发育的一个或多个基因可能调节卵黄蛋白原的表达。所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因可以是vtgs或其同源基因。所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因可以是编码或调节的基因中的突变：卵黄蛋白原；雌激素受体1；细胞色素p450，家族1，亚家族a；透明带糖蛋白；绒毛膜原H；过氧化物酶体增殖物激活受体；类固醇生成急性调节蛋白或其直系同源物。

[0022] 本发明还提供了一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法，包括以下步骤：繁殖(i)具有纯合突变的可育雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物和(ii)具有纯合子突变的可育雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物，其产生不育的性别决定的鱼类、甲壳动物或软体动物，其中所述突变直接或间接干扰精子发生和/或直接干扰卵黄发生，并且其中所述可育的雌性鱼、甲壳动物或软体动物和所述可育的雄性鱼、甲壳动物或软体动物的育性被拯救。

[0023] 直接或间接破坏精子发生的突变可以是Gopc、Hiat1、Tjpla、Smap2、Csnk2a2中的突变或其直系同源基因。直接破坏卵黄发生的突变可以是编码或调节以下基因的突变：卵黄原蛋白；雌激素受体1；细胞色素p450，家族1，亚家族a；透明带糖蛋白；绒毛膜原H；过氧化物酶体增殖物激活受体；类固醇生成急性调节蛋白或其直系同源物。可育雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物和可育雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物可能具有多个纯合突变，这些突变组合在一起：直接或间接破坏精子发生；直接破坏卵黄发生；或两者兼而有之。

[0024] 育性拯救可能包括生殖系干细胞移植。育性拯救还可包括性类固醇改变。性类固醇的改变可能是雌激素的改变，或芳香化酶抑制剂的改变。

[0025] 种系干细胞移植可包括以下步骤：从至少具有纯合突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞，或从至少具有纯合突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞；以及将生殖系干细胞移植到无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物中，或移植到无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物中。无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可能是dnd、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因的空突变的纯合子。无生殖细胞的受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞的受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可以通过倍性操作来产生。无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过杂交产生。无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过暴露于高水平的性激素而产生。

[0026] 可育的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物和可育的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物可能有一个额外的确定性别分化纯合子突变。确定性分化的突变可调节芳香化酶Cyp19a1a、Cyp17、芳香化酶Cyp19a1a的抑制剂或其组合的表达。所述调节Cyp17表达的突变可以是cyp17I中的突变或其同源基因。所述调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的突变可为Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr中的突变或其直系同源。

[0027] 本文公开的方法的繁殖步骤可包括杂交或激素操作和繁殖策略，以指定性分化。

[0028] 本文公开的方法中的鱼类、甲壳动物或软体动物可以是鱼。

[0029] 本发明还提供了一种培育可育纯合子突变鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法，

用于生产不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物,所述可育纯合子突变鱼类、甲壳类动物或软体动物至少具有第一突变和第二突变,其中,所述第一突变破坏指定性分化的一个或多个基因,其中所述第二突变破坏指定配子功能的一个或多个基因,并且其中所述可育纯合子突变鱼类、甲壳类动物或软体动物的育性已被拯救。育性拯救可能包括生殖系干细胞移植。育性拯救还可包括性类固醇改变。所述性类固醇的改变可能是雌激素的改变,或芳香化酶抑制剂的改变。

[0030] 种系干细胞移植可包括以下步骤:从具有至少第一突变和第二突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞,或从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞;以及将生殖系干细胞移植到无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物中,或移植到无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物中。无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可能是dnd、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因的空突变的纯合子。无生殖细胞的受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞的受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可以通过倍性操作来产生。无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过杂交产生。无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过暴露于高水平的性激素而产生。

[0031] 种系干细胞移植可包括以下步骤:从具有至少第一突变和第二突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得精原干细胞,或从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得卵原干细胞;以及将精原干细胞移植到生殖细胞缺乏的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的精巢中,或将卵原干细胞移植到生殖细胞缺乏的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物的卵巢中。无生殖细胞的可育的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞的可育的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可能是dnd、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因突变的纯合子。无生殖细胞的受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞的受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可以通过倍性操作来产生。无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过杂交产生。无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过暴露于高水平的性激素而产生。

[0032] 不育的性别决定的不育鱼类、甲壳动物或软体动物可以是不育雄性鱼、甲壳动物或软体动物。第一突变可包括一个或多个调节雄激素和/或雌激素合成的基因中的突变。第一突变可包含一个或多个调控芳香化酶Cyp19a1a、Cyp17或其组合的表达的基因中的突变。所述调节芳香化酶Cyp19a1a的表达的一个或多个基因可以是选自cyp19a1a、FoxL2及其直系同源物的组的一个或多个基因。所述调节Cyp17表达的一个或多个基因可以是cyp17I或其同源基因。第二突变可包括一个或多个调节精子发生的基因中的突变。所述第二种突变可包括导致珠精子症的一个或多个基因中的突变。所述一个或多个基因的第二突变可能导致精子圆头、圆核、中段紊乱、部分卷曲的尾巴或其组合。所述第二突变可包含选自Gopc、Hiat1、Tjpl1a、Smap2、Csnk2a2及其直系同源基因组成的组中的一个或多个基因中的突变。

[0033] 不育的性别决定的不育鱼类、甲壳动物或软体动物可以是不育的雌性鱼、甲壳动

物或软体动物。第一突变可包括一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因中的突变。调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂的表达的一个或多个基因可以是选自Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr及其直系同源基因的一个或多个基因。第二突变可包括一个或多个调节卵子发生、卵泡发生或其组合的基因中的突变。所述调节卵子发生的一个或多个基因可能调节雌激素的合成。所述调节雌激素合成的一个或多个基因可以是FSHR或其直系同源基因。所述调节卵泡发育的一个或多个基因可能调节卵黄蛋白原的表达。所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因可以是vtgs或其同源基因。所述调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因可以是编码或调节的基因中的突变：卵黄蛋白原；雌激素受体1；细胞色素p450，家族1，亚家族a；透明带糖蛋白；绒毛膜原H；过氧化物酶体增殖物激活受体；类固醇生成急性调节蛋白或其直系同源物。

[0034] 本发明还提供了一种具有纯合突变的可育鱼类、甲壳类动物或软体动物，所述纯合突变用于产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物，其中所述突变直接或间接干扰精子发生和/或直接干扰卵黄发生，并且其中所述可育鱼类、甲壳类动物或软体动物的可育性被拯救。

[0035] 直接或间接破坏精子发生的突变可以是Gopc、Hiat1、Tjpla、Smap2、Csnk2a2中的突变或其直系同源基因。直接破坏卵黄发生的突变可以是编码或调节以下基因的突变：卵黄原蛋白；雌激素受体1；细胞色素p450，家族1，亚家族a；透明带糖蛋白；绒毛膜原H；过氧化物酶体增殖物激活受体；类固醇生成急性调节蛋白或其直系同源物。可育的鱼类、甲壳类动物或软体动物可能有多种纯合子突变，这些突变组合在一起：直接或间接破坏精子发生；直接破坏卵黄发生；或两者兼而有之。所述育性拯救可能包括生殖系干细胞移植。所述育性拯救还可包括性类固醇改变。所述性类固醇的改变可能是雌激素的改变，或芳香化酶抑制剂的改变。

[0036] 种系干细胞移植可包括以下步骤：从至少具有纯合突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞，或从至少具有纯合突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞；以及将生殖系干细胞移植到无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物中，或移植到无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物中。所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可能是dnd、Elavl2、vasa、nanos3或piwi样基因的空突变的纯合子。所述无生殖细胞的受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞的受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可以通过倍性操作来产生。所述无生殖细胞受体雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过杂交产生。所述无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物和所述无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物可通过暴露于高水平的性激素而产生。

[0037] 所述可育的鱼类、甲壳类动物或软体动物可能有一个额外的指定性分化的纯合子突变。所述指定性分化的突变可调节芳香化酶Cyp19a1a、Cyp17、芳香化酶Cyp19a1a的抑制剂或其组合的表达。所述调节芳香化酶Cyp19a1a的表达的一个或多个基因可以是选自Cyp19a1a、FoxL2及其直系同源物的组的一个或多个基因。所述调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的一个或多个基因可以是选自Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr及其直系同源基因的一个或多个基因。

[0038] 产生不育的性别决定的不育鱼类、甲壳类动物或软体动物可包括包括杂交或激素操作和繁殖策略的繁殖步骤,以指定性分化。

[0039] 本文公开的可育鱼类、甲壳动物或软体动物可以是鱼。

[0040] 本发明还提供了一种培育可育纯合子突变鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法,所述可育纯合子突变鱼类、甲壳类动物或软体动物产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物,所述方法包括以下步骤:繁殖(i)可育半合子突变雌性鱼类、甲壳类动物,或具有至少第一突变和第二突变的软体动物,以及(ii)具有至少第一突变和第二突变的可育半合子突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物;通过基因型选择选择纯合子的祖细胞;以及挽救纯合子祖细胞的育性,其中第一突变打乱一个或多个指定性分化的基因,其中第二个突变打乱一个或多个指定配子功能的基因。

[0041] 本发明的其他方面和特征对于本领域的普通技术人员在结合附图查看以下具体实施例的描述后变得显而易见。

附图说明

[0042] 现在将参考附图且仅以示例的方式描述当前公开的方法和生物体的示例。

[0043] 图1是示出产生不育的性别决定的鱼类、甲壳动物或软体动物并繁殖突变系的方法的示例的流程图。

[0044] 图2是示出F0突变体识别和选择策略的示例的图示和图。突变等位基因通过荧光PCR和基因特异性引物进行鉴定,目的是扩增靶位点周围的区域(120-300bp)。对于荧光PCR,在反应中加入基因特异性引物和两个带有荧光团6-FAM或NED的正向寡核苷酸。使用野生型DNA的对照反应来确认每个基因座上是否存在单峰扩增。结果扩增子通过毛细管电泳(CE)和添加的LIZ标记的大小标准来确定精确到碱基对分辨率(Retrogen)的扩增子大小。原始跟踪文件在峰值扫描软件(ThermoFisher)上进行分析。相对于野生型峰对照的峰大小决定突变的性质(插入或缺失)和长度。峰的数目表示镶嵌程度。我们选择了携带最少突变等位基因(2-4峰为佳)的F0镶嵌首建者。

[0045] 图3是图示显示杂合子、纯合子突变体和野生型样品的基因型的示例熔融曲线图。绘制了荧光负变化与温度(-dF/dT)的关系曲线。每个轨迹代表一个样本。本例中野生型等位基因的熔融温度为~81°C(野生型峰),纯合突变产物的熔融温度(纯合缺失峰)为~79°C。剩余轨迹表示杂合子。

[0046] 图4的A至D是罗非鱼F0代不同生长阶段的照片,包括色素沉着基因的双等位基因敲除。

[0047] 图5的A和B是罗非鱼在包含死端1(dnd)和酪氨酸酶(Tyr)的多基因打靶后的照片。图5A是F0 Tyr缺陷的白化鱼。图5B显示对照(WT)和不育(F0 dnd KO)罗非鱼的精巢解剖。

[0048] 图6A和B是来自Elav12敲除罗非鱼($Elav12^{\Delta 8/\Delta 8}$)的生殖细胞缺失的精巢和卵巢(箭头指向性腺)的照片。小照片插入显示泌尿生殖突起。将靶向Elav12编码序列的工程化核酸酶微注射到罗非鱼单细胞期胚胎中,获得Elav12突变体。其中一条雄性首建者与一条野生型雌性交配,并在F1代产生杂合突变体。这些F1突变体 $Elav12^{\Delta 8/+}$ 的交配产生了一个F2代,其中大约25%为两种性别的不育纯合突变体。

[0049] 图7的A至C是罗非鱼cyp17基因座上所选突变等位基因的图解。图7A是cyp17基因

的示意图。外显子(E1-8)显示为阴影框;翻译起始和终止位点分别为ATG和TAA。箭头指向第一外显子中的靶点。图7B是具有来自Cyp17 F0突变罗非鱼后代的所选种系突变等位基因(序列号(SEQ ID NO):61)的野生型参考序列(序列号:60)。这一11nt+5nt的缺失被预测会产生一个截短的蛋白质,终止于氨基酸44而不是521位。图7C是WT(序列号:62)和突变cyp17等位基因(序列号:63)的预测蛋白质序列,其中前16个氨基酸与野生型cyp17蛋白质的氨基酸相同,并且44个氨基酸被错误编码。改变的氨基酸被突出显示。

[0050] 图8的A至C是显示cyp17功能丧失产生的所有雄性后代没有第二性征的图表、插图和照片。图8A是显示Cyp17突变鱼表现出完全雄性偏倚的图。将具有cyp17基因座种系突变的首建雄性与野生型雌性繁殖,选择携带空 $\Delta 16$ -cyp17等位基因的雄性和雌性F1后代并杂交产生野生型纯合子(-/-)和半合子突变体(+/-)的F2代。图表显示了给定基因型的雄性和雌性的数量。图8B显示cyp17功能丧失突变体中检测不到的睾酮水平。从尾静脉采集血液并在3000rpm下离心10分钟。分离血浆并在-80℃下冷冻,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)(美国密歇根州开曼化学公司)测量游离血浆睾酮水平。血浆样品一式三份进行分析。图8C显示了两个带有未发育UGP的cyp17 F0 KO(-/-)雄性与年龄匹配的未处理雄性相对比的照片(右图)。

[0051] 图9的A至E显示Cyp17功能丧失突变体性延迟,精巢变小和少精子。来自半合子cyp17突变体的F2子代饲养到5月龄,称重(图9C),并进行基因分型。图9A显示雄性被处死,其精巢暴露(图9A)并解剖(图9B),显示颜色和大小梯度(图9D),野生型具有最成熟的性腺,纯合性表现为性延迟。图9E显示了8条纯合子和野生型雄性的可剥离生殖腺体积,图9F显示了精子浓度的分光光度比较(600nm波长下的吸光度)。

[0052] 图10的A至C是罗非鱼紧密连接蛋白1(Tjp1a)基因座上所选突变等位基因的图解。图10A是Tjp1a基因的示意图。外显子(E1-32)显示为阴影框;翻译起始和终止位点分别为ATG和TAA。箭头指向目标外显子15和17。图10B为野生型参考序列(序列号:71),其具有来自Tjp1a F0突变罗非鱼后代的所选种系突变等位基因(序列号:72)。据预测,这种7nt缺失会产生一种截短的蛋白质,其终止于氨基酸439而不是1652位。图10C是野生型(序列号:73)和突变体Tjp1a等位基因(序列号:74)的预测蛋白质序列,其中前439个氨基酸与野生型Tjp1a蛋白质的相同。

[0053] 图11的A至C是罗非鱼海马丰富转录物1a(Hiat1)基因座的选定突变的图解。图11A是罗非鱼Hiat1基因的示意图。外显子(E1-12)显示为阴影框;5'和3'未翻译区域显示为开放框。箭头指向目标外显子4和6。图11B是野生型参考序列(序列号:75)和来自Hiat1 F0突变罗非鱼后代的所选种系突变等位基因(序列号:76)的序列。17个核苷酸缺失的位置用破折号表示。据预测,这种移码突变会产生一种截短的蛋白质,其终止于氨基酸234而不是491位。图11C显示了野生型(序列号:77)和截短突变体Hiat1蛋白质(序列号:78)的预测蛋白质序列,其中前218个氨基酸与野生型的氨基酸相同,并且以下16个氨基酸被错误编码。

[0054] 图12的A至C是罗非鱼小ArfGAP2(Smap2)基因座的选定突变的图示。图12A是罗非鱼Smap2基因的示意图。外显子(E1-12)显示为阴影框,3'非翻译区显示为开放框。箭头指向目标外显子2和9。图12B是野生型参考序列(序列号:79)和来自Smap2 F0突变罗非鱼后代的所选种系突变等位基因(序列号:80)的序列。17个核苷酸缺失的位置用破折号表示。据预测,这种移码突变会产生一种截短的蛋白质,终止于氨基酸118而不是429位。图12C显示了

野生型(序列号:81)和截短突变Smap2蛋白质(序列号:82)的预测蛋白质序列,其中前53个氨基酸与野生型的氨基酸相同,并且以下63个氨基酸被错误编码。

[0055] 图13的A至C是罗非鱼酪蛋白激酶2 α -原发性多肽A(Csnk2a2)基因座上所选突变等位基因的图解。图13A是Csnk2a2基因的示意图。外显子(E1-11)显示为阴影框;翻译起始和终止位点分别为ATG和TGA。箭头指向目标外显子1和2。图13B是具有来自Csnk2a2 F0突变罗非鱼后代的所选种系突变等位基因(序列号:84)的野生型参考序列(序列号:83)。这个22nt的缺失预计会产生一个截短的蛋白质,终止于氨基酸31而不是350位。图13C是预测的野生型(序列号:85)和突变的Csnk2a2等位基因(序列号:86)的蛋白质序列,其中前31个氨基酸被错误编码。

[0056] 图14的A至C是罗非鱼高尔基体相关PDZ和卷曲线圈基序(Gopc)基因座上所选突变等位基因的图解。图14A是Gopc基因的示意图。外显子(E1-9)显示为阴影框;翻译起始和终止位点分别为ATG和TAA。箭头指向目标外显子1和2。图14B是具有来自Gopc F0突变罗非鱼后代的所选种系突变等位基因(序列号:88)的野生型参考序列(序列号:87)。这一8nt的缺失预测会产生一个截短的蛋白质,终止于氨基酸30而不是444位。图14C是野生型(序列号:89)和突变Gopc等位基因(序列号:90)的预测蛋白质序列,其中前9个氨基酸与野生型Gopc蛋白质的氨基酸相同,并且以下21个氨基酸被错误编码。

[0057] 图15的A和B是显示罗非鱼精子发生特异性基因敲除表型人类和小鼠缺陷的照片和图表。图15A显示五个候选基因F0缺陷罗非鱼精子畸形。野生型和Tjpl1a、Gopc、Smap2、Hiat1和Csnk2a2 F0突变鱼精子的显微图像。黑色箭头表示野生型大小的精子头,黄色箭头表示增大的圆形精子头。比例尺:100 μ m。图15B显示了人工剥离配子的受精成功率,然后是体外受精,其中将干配子(200个卵和剥离的雄鱼精液)混合在一起,并立即用2mL孵化水激活。数据为均值 $\pm$ 标准差,n=3次重复。

[0058] 图16的A至C是显示可育和无生殖细胞精巢中SMS基因表达水平的图像和图表。图16A显示了从4月龄的dnd1基因敲除和野生型年龄匹配对照中解剖的精巢。图16B显示生殖细胞特异性基因vasa的相对表达水平在dnd1 KO鱼的精巢中降低到不可检测的水平,但在野生型精巢中强烈表达,而Sertoli特异性基因Dmrt1在野生型和不育罗非鱼的精巢中表达为相同水平。 β -肌动蛋白作为参考基因,使vasa和Dmrt1的表达水平正常化。图16C显示了野生型和不育罗非鱼精巢中SMS基因Tjpl1a、Hiat1、Gopc和Csnk2a2的相对表达水平。以Dmrt1为参照基因,对SMS基因的表达水平进行正常化。在所有情况下,值代表3次生物重复的平均值 $\pm$ 标准差。

[0059] 图17的A至C是Cyp9a1a基因座上所选突变的图示。图17A是罗非鱼Cyp9a1a基因的示意图。外显子(E1-9)显示为阴影框。箭头指向目标外显子1和9。图17B是野生型参考序列(序列号:65),其中包含来自Cyp9a1a F0突变罗非鱼的所选种系突变等位基因序列(序列号:66和67)。7个nt(缺失8和插入1)和10个nt的删除用破折号表示。据预测,这些移码突变会产生截短的蛋白质,终止于氨基酸12和11,而不是511位。图17C是预测的野生型(序列号:68)和截短的突变蛋白(序列号:69和70)的蛋白质序列,其中前7和5个氨基酸与野生型Cyp9a1a蛋白质的氨基酸相同,并且以下5和6个氨基酸被错误编码。改变的氨基酸被突出显示。

[0060] 图18是双杂合子亲本的突变后代的育种方案和预期基因型示例的图解和表格。

m1,2,3符号表明F0镶嵌母体内Tjp1a基因座的不同突变。表中的每一列显示了cyp17和Tjp1a等位基因每个组合的预期F2子代频率,以及预计的性别比和可育状况。后代预期全部为雄性,不育后代被圈出。

[0061] 图19的A至C是在Dmrt1基因座处选择的突变的图示。图19A是罗非鱼Dmrt1基因的示意图。外显子(E1-9)显示为阴影框。箭头指向目标外显子1和3。图19B是野生型参考序列(序列号:91)和来自Dmrt1 F0突变罗非鱼的所选种系突变等位基因序列(序列号:92和93)。删除的7个nt和13个nt用破折号表示。据预测,这些移码突变会产生截短的蛋白质,终止于氨基酸40和38,而不是293位。图19C是野生型(序列号:94)和截断突变蛋白(序列号:95和96)的预测蛋白质序列,其中前16个氨基酸与野生型Dmrt1蛋白质的氨基酸相同,并且以下24和22个氨基酸被错误编码。改变的氨基酸被突出显示。

[0062] 图20的A至C是生长/分化因子6-B样基因座(Gsdf)处所选突变的图示。图20A是罗非鱼Gsdf基因的示意图。外显子(E1-5)显示为阴影框。箭头指向目标外显子2和4。图20B是野生型参考序列(序列号:97),其中包含来自Gsdf F0突变罗非鱼的所选种系突变等位基因序列(序列号:98和99)。5个nt和22个nt的删除用破折号表示。据预测,这些移码突变会产生截短的蛋白质,终止于氨基酸56和46,而不是213位。图20C是野生型(序列号:100)和截短突变体蛋白质(序列号:101和102)的预测蛋白质序列,其中前52和46个氨基酸与野生型Gsdf蛋白质的相同,并且以下4和0个氨基酸被错误编码。改变的氨基酸被突出显示。

[0063] 图21的A至C是罗非鱼促卵泡生成激素受体(FSHR)基因座的选定突变的图解。图21A是罗非鱼FSHR基因的示意图。外显子(E1-15)显示为阴影框;5'和3'未翻译区域显示为开放框。箭头指向目标外显子11和15。图21B是野生型参考序列(序列号:103)和来自FSHR F0突变罗非鱼后代的所选种系突变等位基因(序列号:104)的序列。5个核苷酸缺失的位置用破折号表示。这种移码突变被预测会产生一种截短的蛋白质,其终止于氨基酸264而不是689位。图21C显示了野生型(序列号:105)和截断突变FSHR蛋白(序列号:106)的预测蛋白质序列,其中前258个氨基酸与野生型的相同,并且以下6个氨基酸被错误编码。

[0064] 图22的A至C是卵黄蛋白原Aa(VtgAa)基因座上所选突变的图示。图22A是罗非鱼VtgAa基因的示意图。外显子(E1-35)显示为阴影框。箭头指向目标外显子7和22。图22B是野生型参考序列(序列号:107)和来自VtgAa F0突变罗非鱼的所选种系突变等位基因序列(序列号:108和109)。删除的5个nt和25个nt用破折号表示。据预测,这些移码突变会产生截短的蛋白质,终止于279和301氨基酸,而不是1657位。图22C是野生型(序列号:110)和截短突变体蛋白质(序列号:111和112)的预测蛋白质序列,其中前278和269个氨基酸与野生型VtgAa蛋白质的氨基酸相同,并且以下1和32个氨基酸被错误编码。改变的氨基酸被突出显示。

[0065] 图23的A至C是罗非鱼卵黄蛋白原Ab(VtgAb)基因座的选定突变的图解。图23A是罗非鱼VtgAb基因的示意图。外显子(E1-35)显示为阴影框;5'未翻译区域显示为开放框。箭头指向目标外显子5和22。图23B是野生型参考序列(序列号:113)和来自VtgAb F0突变罗非鱼后代的所选种系突变等位基因(序列号:114)的序列。8个核苷酸缺失的位置用破折号表示。据预测,这种移码突变会产生一种截短的蛋白质,终止于氨基酸202而不是1747位。图23C显示了野生型(序列号:115)和截短突变体VtgAb蛋白质(序列号:116)的预测蛋白质序列,其中前270个氨基酸与野生型VtgAb蛋白质的氨基酸相同,并且以下32个氨基酸被错误编码。

改变的氨基酸被突出显示。

[0066] 图24的A和B为显示缺乏VtgAa的雌性不能产生可存活的后代照片和图表。图24A是受精后胚胎在含有亚甲基蓝(Roth, 孵化水中原液的0.01%)的孵化水中孵化8小时的照片。蓝色染色显示未受精卵和死胚。每天在光学立体显微镜下检查胚胎, 计数并取出死亡胚胎。图24B显示了F0 VtgAa雄性和雌性与野生型鱼类异交后代的存活率。数据为均值 $\pm$ 标准差, $n=2 \times 3$ 重复。

[0067] 图25显示了双杂合子亲本突变后代的育种方案和基因型。m1-n和m1符号表示F0中的镶嵌突变和为每个靶基因座选择的一个特定突变。显示的F1基因型对应于我们计划建立的四个等位基因组合中的一个。表中的每一列显示了每个等位基因组合的预期F2子代的相对频率, 以及预计的性别比和生育状况。预期全部为雌性且不育的子代用红色圆圈圈出。

[0068] 图26是显示FSHR缺乏对卵巢发育影响的照片。对12月龄的可育对照组(野生型体色-下图)和体型相似的白化F0 FSHR突变雌性(FSHR $^{-/-}$, tyr $^{-/-}$; 上图)的同胞进行了性腺形态分析。左图显示对照组和突变组雌性腹腔内的卵巢被解剖。白色箭头指向性腺, 黑色箭头指向泌尿生殖突起。FSHR突变导致卵泡发育完全停止, 性腺萎缩。野生型雌性表现出一个大而突出的泌尿生殖突起, 而白化F0 FSHR $^{-/-}$ 雌性表现出明显较小的突起。

[0069] 图27是示出生殖细胞移植策略的图示, 以允许大量生产携带FEM(cyp17, Cyp19a1a)、SMS(Tjp1a, Csnk2a2, Gopc, Smap2, Hiat1)、MA(Dmrt1, Gsdf)和FLS(Vtgs, FSHR)基因突变的供体衍生配子。在突变供体中, 缺陷基因导致单性雄性(FEM基因)或雌性(MA基因)群体的发育, 或使精子(SMS基因)或卵母细胞(FLS基因)失去功能。因此, 大规模生产这些纯合突变体是不可能的。为了克服这一局限性, 我们只针对其突变表型是由胞体功能缺陷而不是生殖细胞功能缺陷引起的基因, 并利用“生殖细胞移植”技术产生嵌合胚胎。为了产生嵌合体, 将从幼年纯合子突变鱼获得的卵巢或精巢细胞悬浮液移植到目的基因野生型的无生殖细胞受体胚胎的腹腔中。通过这种策略, 野生型宿主嵌合胚胎具有正常的体细胞, 但有一个突变的种系。这些嵌合受体由于具有功能性体细胞基因而恢复了正常的性比和/或不育性。这些受体鱼可作为商业亲鱼用于单性和/或不育鱼的大规模生产。

[0070] 图28是示出大量生产携带精子发生缺陷基因(SMS(-))的功能精子的生殖细胞移植方法的图示。从杂合子突变亲本获得的SMS缺失鱼后代在原始生殖细胞(PGCs)和精原细胞的产生过程中没有发现缺陷。然而, 在成熟期, SMS突变的雄性只产生圆头的、不活动的精子, 并且是不育的。雌性SMS突变体是可育的。SMS基因在生殖细胞(支持细胞和间质细胞)周围的体细胞中表达, 并在那里发挥其活性。SMS蛋白的缺乏导致精子成熟受损的微环境缺陷。为了恢复精子的形成, 可以从未成年SMS突变体中分离出生殖系干细胞, 并将其移植到缺乏自身PGC但携带有功能性SMS基因的受体胚胎中。移植的SMS $^{-/-}$ 精原干细胞将定植于受体的性腺, 由于SMS对其持续发育是必不可少的, 受体的体细胞将护理移植的生殖细胞, 恢复精子形成, 并允许产生功能性精子, 且所有这些精子都携带突变的SMS基因。

[0071] 图29是示出用于产生携带卵黄蛋白原缺陷基因(Vtg(-))的功能性卵的生殖细胞移植方法的图示。从杂合子Vtg突变亲本获得的Vtg缺失鱼后代在原始生殖细胞(PGC)和卵原细胞的产生过程中未发现缺陷。然而, 在成熟期, Vtg突变体雌性只产生缺乏Vtg蛋白的卵母细胞, 导致雌性不育。缺乏Vtg的雄性发育正常且可育。Vtg基因通常在肝细胞中表达, Vtg蛋白通过血流输送到卵母细胞。Vtg蛋白的缺乏导致卵细胞缺乏维持早期胚胎或幼体发育

所必需的关键营养物质,导致发育停滞。因此,Vtg^{-/-}雌性没有子代。为了恢复卵黄发生,可以从幼年Vtg缺失突变体中分离出种系干细胞,并将其移植到缺乏自身PGC但携带功能性Vtg基因的受体胚胎中。移植的Vtg^{-/-}种系干细胞将定植于受体性腺,代孕母体的肝细胞将确保支持早期发育的营养物质被适当地装载到卵子中。这些雌性受体与Vtg^{-/-}雄性杂交将产生可存活的Vtg^{-/-}后代。

[0072] 图30是示出用于产生活的FSHR突变卵(FSHR⁽⁻⁾)的生殖细胞移植方法的图示。从杂合FSHR突变亲本获得的FSHR缺失鱼后代在原始生殖细胞(PGC)和卵原细胞的产生过程中未发现缺陷。然而,在成熟期,FSHR突变体雌性对FSH介导的信号没有反应,导致卵泡发育停滞和雌性。FSHR基因敲除的雄性发育正常且可育。由于FSHR仅在体细胞滤泡细胞中表达,因此将来自未成年FSHR缺失突变体的种系干细胞移植到缺乏自身PGC但携带有功能FSHR基因的受体胚胎中,将恢复正常卵母细胞发育并允许产生活卵。这些受体雌性与FSHR^(-/-)雄性杂交只会产生FSHR^(-/-)后代。

[0073] 图31是示出用于产生功能性FEM突变卵(FEM:Cyp19a1a和cyp17)的生殖细胞移植方法的图示。我们从杂合的FEM突变亲本获得的FEM缺失鱼后代中,在原始生殖细胞(PGC)和卵原细胞的产生过程中没有发现缺陷。然而,在成熟期,FEM突变的雌性不将雄激素转化为雌激素,导致卵巢体细胞支持细胞(鞘细胞和颗粒细胞)重编程为精巢体细胞支持细胞(Leydig细胞和Sertoli细胞),遗传雌性回复为表型雄性。FEM缺乏雄性发育正常且可育。FEM基因在卵巢体细胞中正常表达。为了大规模生产携带FEM缺陷基因的卵母细胞,可以从FEM缺失突变体中分离出种系干细胞,并将其移植到缺乏自身PGC但携带功能FEM基因的受体胚胎中。移植的FEM^{-/-}生殖细胞将定植于受体性腺。供体卵母细胞周围的体细胞将产生正常量的雌激素,从而促进卵泡发育并维持雌性。这些受体雌性与FEM^(-/-)雄性杂交将只产生FEM^{-/-}后代。

[0074] 图32是大规模生产均为雄性不育鱼类种群的策略的示意图。双KO亲本(例如SMS和cyp17)可通过生殖细胞移植技术繁殖,如图27-32所示。这些亲本只产生带有突变基因的供体衍生配子。自然交配或人工交配只产生一个全雄性不育群体。

[0075] 图33的A和B显示了生殖细胞移植实验,证明源于罗非鱼配子成功定植和产生供体。图33A显示了生殖细胞移植到新孵化的无生殖细胞罗非鱼幼鱼中的图示。将携带突变的供体精原干细胞(SSC)移植到缺乏内源性生殖细胞的幼体腹腔。同时移植两组SSC,一组在参考基因中携带框内 $\Delta 3nt$ 缺失和色素基因($tyr^{i6/i6}$)中的6nt插入,另一组在参考基因中携带框外4nt缺失和色素基因中的22缺失($tyr^{\Delta 22/\Delta 22}$)。3nt缺失不会改变基因的功能,因此可以作为阳性对照。移植的细胞迁移并定植于受体的生殖嵴。在获得性成熟后,收集受体鱼配子,并利用供体来源配子突变区两侧的PCR引物,通过PCR片段大小分析对其DNA进行分析。扩增产物的大小和检测采用毛细管电泳。提供了在精原干细胞移植后产生功能性卵子和来自供体细胞的精子的雌雄受体的百分比。图33B显示了野生型对照和移植可育罗非鱼精子DNA的毛细管片段长度分析。底部轨迹仅显示来自参考基因的供体衍生的 $\Delta 3nt$ 和 $\Delta 4nt$ 缺失片段,以及色素基因中的6nt插入和 $\Delta 22nt$ 缺失片段。图中显示了一个阴性对照,试验基因具有野生型大小的基因特异性片段(268bp),tyr基因具有467nt,以供参考。

[0076] 图34的A至D是示出繁殖单性不育群体的不同方法的图示。FEM^{-/-}和MA^{-/-}代表雌性和雄性空基因。SMS^{-/-}和FLS^{-/-}代表精子发生和卵泡发生的空基因。雄性和雌性种子通

过类固醇激素操作和生殖细胞移植(图34A和B)产生,生殖细胞移植仅通过生殖细胞移植产生(图34C和D)。有限数量的种子库可以杂交来批量生产数百万个用于水产养殖系统的全雄性不育胚胎(图34A和C)或全雌性不育胚胎(图34B和D)。

具体实施方式

[0077] 一般而言,本发明提供了一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法。该方法包括以下步骤:繁殖(i)具有至少第一突变和第二突变的可育半合子突变的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以及(ii)具有至少第一突变和第二突变的可育半合子突变的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物;以及通过基因型选择,纯合子突变的祖先是由不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物。第一突变破坏了一个或多个指定性分化的基因。第二突变会破坏一个或多个指定配子功能的基因。

[0078] 本发明还提供一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法。该方法包括以下步骤:繁殖(i)具有至少第一突变和第二突变的可育纯合子突变雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以及(ii)具有至少第一突变和第二突变的可育纯合子突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以产生不育的性别决定鱼类,甲壳类动物或软体动物。第一突变破坏了一个或多个指定性分化的基因。第二突变会破坏一个或多个指定配子功能的基因。可育纯合子的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物和可育纯合子突变的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的可育性得以拯救。

[0079] 本发明还提供一种产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法。该方法包括以下步骤:繁殖(i)具有纯合突变的可育雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以及(ii)具有纯合突变的可育雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物。所述突变直接或间接破坏精子发生,和/或直接破坏卵黄发生。可育雌鱼、甲壳动物或软体动物和可育雄鱼、甲壳动物或软体动物的可育性已被拯救。

[0080] 本发明还提供了一种培育可育纯合子突变鱼类、甲壳类动物或软体动物的方法,所述可育纯合子突变鱼类、甲壳类动物或软体动物产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物。该方法包括以下步骤:繁殖(i)具有至少第一突变和第二突变的可育半合子突变雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,以及(ii)具有至少第一突变和第二突变的可育半合子突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物;通过基因型选择选择纯合子的祖细胞;以及挽救纯合子祖细胞的育性。所述第一突变破坏了一个或多个指定性分化的基因。所述第二突变会破坏一个或多个指定配子功能的基因。

[0081] 本发明还提供了一种可育的纯合突变鱼类、甲壳类动物或软体动物,用于生产不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物。所述可育的纯合子突变的鱼类、甲壳类动物或软体动物至少具有第一突变和第二突变,其中第一突变破坏一个或多个指定性分化的基因,第二突变破坏一个或多个指定配子功能的基因。可育的纯合子突变的鱼类、甲壳类动物或软体动物的可育性已被拯救。

[0082] 本发明还提供了一种具有纯合突变的可育鱼类、甲壳类动物或软体动物,所述纯合突变用于产生不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物,其中所述突变直接或间接中断精子发生和/或直接中断卵黄发生,并且其中所述可育鱼类、甲壳类动物或软体动物的可育性已被拯救。

[0083] 在本发明的上下文中,鱼类是指任何没有四肢和手指的有鳃有骨动物。鱼的例子包括鲤鱼、罗非鱼、鲑鱼、鳟鱼和鲶鱼。在本发明的上下文中,甲壳动物是指任何节肢动物分类单元。甲壳类动物的例子包括螃蟹、龙虾、小龙虾和虾。在本发明的上下文中,软体动物是指具有软的未分段身体的任何无脊椎动物,通常封闭在钙质壳中。软体动物的例子包括蛤蜊、扇贝、牡蛎、章鱼、鱿鱼和石鳖。

[0084] 不育鱼类、甲壳动物或软体动物是指与野生型鱼类、甲壳动物或软体动物相比,通过繁殖或杂交产生后代的能力减弱的任何鱼类、甲壳动物或软体动物;例如,不育鱼类、甲壳动物或软体动物产生后代的可能性降低约50%、75%、90%、95%,或者其产生可存活后代的可能性降低了100%。相比之下,可育的鱼类、甲壳动物或软体动物是指任何具有通过繁殖或杂交具有产生后代能力的鱼类、甲壳动物或软体动物。繁殖和杂交是指雄性物种和雌性物种交配产生后代的过程。

[0085] 性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物是指任何鱼类、甲壳类动物或软体动物的前体的性别是通过破坏前体的性分化途径而预先决定的。在一些例子中,同一代的性别决定的祖先是单性的。

[0086] 配子功能是指在有性生殖的有机体受精过程中,一个配子与另一个配子融合的过程。

[0087] 破坏一个或多个特定性分化基因的突变是指任何直接或间接调节性腺功能的基因突变。直接或间接影响性腺功能是指:(1)突变一个或多个性腺基因的编码序列;(2)突变对一个或多个性腺基因的转录至少有一定控制作用的非编码序列;(3)突变参与一个或多个性腺基因转录后调控的另一个基因的编码序列;或(4)其组合,以调节性腺功能。调节性腺功能是指指定性腺产生雌配子或产生雄配子。当优选雄性化时的实例包括对调节雄激素和/或雌激素合成的一个或多个基因进行调节,例如,调节芳香化酶Cyp19a1a、Cyp17或其组合的表达。参与调节芳香化酶Cyp19a1a表达的基因包括cyp19a1a、FoxL2、sf1(类固醇生成因子1)及其直系同源。参与调节Cyp17表达的基因包括cyp17I或其同源基因。当优选雌性化时的实例包括调节一个或多个调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因。参与调节芳香化酶Cyp19a1a抑制剂表达的基因包括Gsdf、dmrt1、Amh、Amhr及其直系同源基因。

[0088] 或者,性别分化可以在没有多个基因突变的情况下指定。指定性分化的非遗传突变方法的例子包括利用性逆转(荷尔蒙操纵)和繁殖、后代测试、雄性发育和雌性发育,这些方法可以产生纯合子XX、YY或ZZ的单性雄性或雌性群体(参见实施例[21];Dunham 2004,通过引用合并)。在根据本发明的一些实例中,繁殖(i)具有纯合突变的可育雌性鱼类、甲壳动物或软体动物与(ii)具有纯合突变的可育雄性鱼类、甲壳动物或软体动物以产生不育的性别决定的鱼类、甲壳动物或软体动物的步骤包括用非基因方法指定性别分化。在根据本发明的一些实例中,使用大西洋鲑鱼,创建新雄性(XX)并与雌性杂交产生雌性的单性后代。在根据本发明的另一实例中,可通过种间杂交来实现指定性分化(例如参见通过引用并入的Pruginin、Rothbard等人1975年、Wolters和DeMay 1996年论述)。

[0089] 破坏一个或多个指定配子功能的基因的突变是指直接或间接调节精子发生、卵子发生和/或卵泡发生以产生不育鱼类、甲壳类动物或软体动物的任何基因突变。直接或间接调节精子发生、卵子发生和/或卵泡发生是指:(1)突变一个或多个配子基因的编码序列;(2)突变对一个或多个配子基因的转录至少有一定控制的非编码序列;(3)突变参与一个或

多个配子基因转录后调控的另一个基因的编码序列；或(4)其组合，以产生不育的鱼类、甲壳类动物或软体动物。

[0090] 直接或间接破坏精子发生和/或直接破坏卵黄发生的突变是指任何直接或间接调节精子发生和/或直接破坏卵黄发生以产生不育鱼类、甲壳类动物或软体动物的基因突变。直接或间接调节精子发生是指：(1)突变一个或多个参与精子发生的配子基因的编码序列；(2)突变一个对一个或多个参与精子发生的配子基因的转录至少有一定控制的非编码序列；(3)突变另一个参与一个或多个参与精子形成的配子基因的转录后调控；或(4)其组合，以产生不育的鱼类、甲壳类动物或软体动物。直接调控卵黄发生是指：(1)突变一个或多个参与卵黄发生的配子基因的编码序列；(2)突变一个至少对一个或多个参与卵黄发生的配子基因的转录有一定控制作用的非编码序列；或(3)二者的组合，以产生一种不育的鱼类、甲壳类动物、或软体动物。

[0091] 当优选产生不育雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物时，示例包括调节一个或多个调节精子发生的基因。调节精子发生的一个或多个基因的实例可引起精子球形、圆头、圆核、中段紊乱、尾部部分卷曲或其组合。引起球形精子症的基因的实例包括Gopc、Hiat1、Tjpla、Smap2、Csnk2a2及其直系同源基因。当优选产生不育雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物时，示例包括调节一个或多个调节卵子发生、卵泡发生或其组合的基因。调节卵子发生的一个或多个基因的实例包括调节雌激素合成的一个或多个基因。调节雌激素合成的一个或多个基因的实例包括FSHR或其直系同源物。调节卵泡形成的一个或多个基因的实例包括调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因。调节卵黄蛋白原表达的一个或多个基因的实例包括vtgs或其直系同源物。直接或间接破坏精子形成的突变的实例为Gopc、Hiat1、Tjpla、Smap2、Csnk2a2或其直系同源基因中的突变。直接破坏卵黄发生的突变的实例为编码或调节以下基因中的突变：卵黄原蛋白；雌激素受体1；细胞色素p450，家族1，亚家族a；透明带糖蛋白；绒毛膜原H；过氧化物酶体增殖物激活受体；类固醇生成急性调节蛋白或其直系同源物。

[0092] 突变可以是相关的核苷酸序列的任何类型的改变，例如，核苷酸插入、核苷酸缺失和核苷酸替换。

[0093] 拯救不育或育性是指将不育的鱼类、甲壳类动物或软体动物转化为可育的鱼类、甲壳类动物或软体动物的任何过程。在一些例子中，将芳香化酶抑制剂提供给不育鱼类，甲壳类动物，或软体动物以恢复育性。在其他例子中，无菌鱼类、甲壳类动物或软体动物的生殖系干细胞移植可以恢复育性。生殖系干细胞移植是指将不育鱼类、甲壳动物或软体动物的生殖干细胞移植到可育鱼类、甲壳动物或软体动物体内，以恢复其育性的任何过程。在根据本发明的一些实例中，种系干细胞移植这一过程包括：从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞，或从至少具有第一突变和第二突变的不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得种系干细胞；以及将生殖系干细胞移植到无生殖细胞受体的雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物中，或移植到无生殖细胞受体的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物中。雄性或雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物的受体，是指没有自己的生殖细胞，但携带指定性分化和配子功能的基因功能拷贝的胚胎。或者，生殖细胞缺失的受体可以是携带靶基因功能拷贝的幼鱼或成年鱼。受体物种最好与供体物种相同(同种异体受体)，但也可使用其他物种(异种受体)。移植后的受体是一种嵌合

体鱼类、甲壳类动物或软体动物,体细胞正常,但种系突变。这些嵌合受体由于具有功能性体细胞基因而恢复了正常的性比和/或不育性。无生殖细胞的受体可以通过倍性操作、杂交策略或暴露于高水平的性激素来产生。幼年水生物种暴露于高水平的性激素可能导致暴露动物不育。这项技术已经得到证实(Hunter等人,1982年;Solar等人,1984年;Piferer等人,1994年),但尚未用于商业规模。虽然这项技术可以有效地创造不育鱼类,但从未被证明在被处理鱼中100%诱导不育有效。处理过的鱼可能适合用于研究,或作为生殖细胞移植的受体,但该技术可能不足以生产商业养殖用不育鱼(另见Hunter,G.A.,E.M.Donaldson,F.W.Goetz和P.R.Edge11982年著《均为雌性和不育Coho鲑鱼的生产,以及雄性异配子性的实验证据》,《美国渔业协会学报》111:367-372;Piferer,F,M Carillo,S.Zanuy,I.I.Solar和E.M.Donaldson1994年著《首次摄食前雄激素浸泡诱导银鲑(*Oncorhynchus kisutch*)不育的研究》,《水产养殖》119:409-423;以及Solar,I.,E.M.Donaldson,和G.A.Hunter1984年著《口服17 α -甲基睾酮对野生虹鳟性别分化和绝育处理方案的优化》,《水产养殖》42:129-139。)

[0094] 在一些实例中,生殖系干细胞移植这一过程包括:从不育纯合雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得精原干细胞或从不育纯合雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物获得卵原干细胞,并将精原干细胞移植到生殖细胞的腹膜腔中鱼类、甲壳类动物或软体动物的无细胞胚胎或生殖细胞分化程度较低的精巢或卵巢。或者,除了种系干细胞移植之外,向不育的鱼类、甲壳类动物或软体动物提供外源性类固醇,例如雌激素以恢复其育性。在其它实例中,向不育鱼类、甲壳类动物或软体动物提供芳香化酶抑制剂以恢复其育性。

[0095] 图1示出了根据本发明的流程图,该流程图说明了如何制造雄性和雌性亲鱼群,即可育的纯合突变雄性和雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物,用于生产不育的性别决定的鱼类、甲壳类动物或软体动物。

[0096] 图1说明了控制性别分化和配子发生的遗传途径以及产生单性不育群体的基因KO策略。

[0097] 基因cyp19a1a、FoxI2或其组合中的一个或多个突变导致雌激素表达降低或减少,从而导致精巢形成和雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的产生。类似地,cyp17基因的一个或多个突变导致雌激素和雄激素表达降低或减少,从而产生雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物。更多的一个或多个破坏精子发生(SMS)的基因突变导致雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物不育。相应地,将产生不育纯合突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物。

[0098] 在繁殖品系的另一个步骤中,可通过雌激素处理以拯救不育纯合子突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的育性。经过处理,将产生可育的纯合子突变的雌性鱼类,甲壳类动物或软体动物。在这个性别逆转过程中,表型雌性携带一个或多个破坏精子发生的突变,应该是可育的,携带一个或多个破坏精子发生的突变的卵母细胞应该产生,并允许该系的繁殖。或者,如实施例10所述,可通过将来自不育纯合突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的生殖细胞植入可育野生型雄性精巢细胞以产生可育纯合突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物来拯救不育纯合突变雄性鱼类、甲壳类动物或软体动物的可育性,以允许该系的繁殖。

[0099] 在图1的另一面,基因Gsdf、Dmrt1或其组合中的一个或多个突变导致Cyp19a1a抑制剂失活,并导致雌激素高表达或增加,导致卵巢形成和雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物

的产生。调节卵子发生、卵泡发生 (FLS) 或其组合的基因中的一个或多个额外突变导致雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物不育。因此,将产生不育纯合突变的雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物。

[0100] 在繁殖品系的另一个步骤中,可通过芳香化酶抑制剂的处理拯救不育纯合子突变雌性鱼类、甲壳类动物或软体动物的育性。经过处理,将产生可育的纯合子突变的雄性鱼类,甲壳类动物,或软体动物。在这个性别逆转过程中,表型雄性携带一个或多个破坏卵子发生、卵泡发生或其组合的突变,应该是可育的,携带一个或多个破坏卵子发生、卵泡发生或一个组合的突变的精子应该产生,并允许该系的繁殖。或者,如实施例10所述,可通过将来自不育纯合突变雌鱼、甲壳动物或软体动物的生殖细胞植入可育野生型雌性卵巢细胞以产生可育纯合突变雌鱼来挽救不育纯合突变雌鱼、甲壳动物或软体动物的育性,以允许该系的繁殖。

[0101] 实施例

[0102] 实施例1-材料和方法

[0103] 使用的动物和伦理声明:所有实验均符合美国法规,确保动物福利和畜牧程序按照IACUC批准的动物方案CAT-004进行。本研究中使用的罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 品系来自于从美国商业生产商获得的巴西品系。

[0104] 核酸酶的产生及其策略:F0突变体的产生:罗非鱼的 *cyp17*、*Cyp19a1a*、*Tjpla*、*Csnk2a2*、*Hiat1*、*Smap2*、*Gopc*、*Gsdf*、*Dmrt1*、*FSHR*和卵黄原蛋白基因 (*VtgAa*和*VtgAb*) 的同源基因系通过计算机从基因组数据库中鉴定。

[0105] 为了在特定的基因组位点产生DNA双链断裂 (DSB),我们使用了工程化核酸酶。在大多数应用中,在没有修复模板的情况下产生单个DSB,导致非同源末端连接 (NHEJ) 修复途径的激活。NHEJ可能是一个不完善的修复过程,在目标位置生成插入或缺失标记。插入缺失标记的引入可以在基因编码区内产生移码,导致氨基酸序列不正确的异常蛋白质产物。为了提高相关的基因产生空突变的频率,除了靶向 *cyp17* 的外显子,我们同时打靶2个不同的外显子。除了相关的基因外,我们还靶向了一个色素沉着基因作为突变选择标记。通常,色素基因和相关基因之间的突变频率是相关的。因此,与镶嵌色素表型 (部分基因失活) 相比,显示完全缺乏色素沉着 (白化表型) 的胚胎被优先选择。为了证实新设计的核酸酶的功能性,从每批处理的5个白化胚胎中,通过PCR片段分析,定量分析在相关的位点上的基因组修饰。如果5个受试胚胎在靶基因座上均未显示插入缺失标记,则同一批次的受试胚胎被剔除。此外,我们优先培养在一个或两个细胞阶段产生突变的胚胎批次 (即通过片段分析检测每个靶基因座2或4个突变等位基因)。

[0106] 利用DNA-Clean&concentrator-5柱 (Zymo研究机构) 对工程化核酸酶的模板DNA进行线性化和纯化。一微克线性化模板用于使用mMESSAGE mMACHINE T3试剂盒 (英杰生命) 合成封端RNA,使用Qiaquick (德国凯杰) 柱纯化,并在-80°下储存在最终浓度为800ng/μl的核糖核酸酶游离水中。

[0107] 胚胎注射:胚胎来自体外受精。将约10nL总体积的含有程序化核酸酶的溶液共同注射到单细胞期胚胎的细胞质中。注射200个胚胎通常产生10-60个完全色素沉着缺陷 (白化表型) 的胚胎。在注射后的第10-12天,监测胚胎/幼体存活情况。

[0108] 首建者选择:将至少10个白化胚胎培育至3月龄,并通过荧光PCR片段分析定量测

定基因组修饰(见表1,基因特异性基因分型引物第8列和第11列)。我们优先选择一个或两个细胞阶段产生突变的首建者(通过片段分析检测每个靶基因座的2或4个突变等位基因)(见图2)。

[0109] F1基因分型:所选的首建者与野生型系进行了异交。其F1后代被饲养到2月龄,浸泡在200mg/L MS-222(三卡因)中麻醉,并用塑料勺转移到干净的表面。它们的鳍用剃须刀片夹好,放在孔中(带盖子96孔板)。用荧光PCR法对鱼鳍DNA进行分析。简言之,向每个孔中添加60μl含有9.4% Chelex和0.625mg/ml蛋白酶K的溶液,用于在55℃培养箱中过夜进行组织消化和gDNA提取。然后对板进行涡流和离心。然后用超净水将gDNA提取液稀释10倍,以去除混合物中的PCR抑制剂。通常,我们分析了80个未成年体/首建者,以选择并饲养了一批大约20个携带相同大小突变的未成年体。

[0110] 荧光PCR(参见图2):PCR反应使用3.8μL水、0.2μL鱼鳍DNA和5μL PCR主混合物(德国凯杰Multiplex PCR)以及1μL由以下三种引物组成的引物混合物:带有荧光标记的标记尾部引物(6-FAM,NED),带前尾的扩增子特异性正向引物(序列号:117:5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'和序列号:118:5'-TAGGAGTGCAGCAAGCAT-3')扩增子特异性反向引物(荧光PCR基因特异性引物列于表1)。PCR条件如下:在95℃下变性15分钟,然后进行30个扩增周期(94℃30秒,57℃45秒,72℃45秒),然后进行8个扩增周期(94℃30秒,53℃45秒,72℃45秒),最后在72℃下延长10分钟,并在4℃下无限期保持。

[0111] 通过毛细管电泳(CE)和添加的LIZ标记的大小标准品对1-2微升1:10稀释的扩增产物进行分离,以确定精确到碱基对分辨率的扩增产物大小(Retrogen公司,圣地亚哥)。原始跟踪文件在峰值扫描软件(ThermoFisher)上进行分析。相对于野生型峰对照的峰大小决定突变的性质(插入或缺失)和长度。峰的数目表示镶嵌程度。我们选择了携带最少突变等位基因(2-4峰优先)的F0镶嵌首建者。

[0112] 等位基因大小用于计算观察到的插入缺失标记突变。选择不是3bp倍数的突变,因此预测为移码突变,通过测序进一步确认。优先选择大小大于8bp但小于30bp的突变,以便于通过QPCR熔融分析对后代进行基因分型。为了序列确认,将所选插入缺失标记的PCR产物进一步提交测序。PCR的测序层析显示两次同时读取表明存在插入缺失标记。缺失或插入的开始通常在读取的序列发散时开始。仔细分析双序列以检测独特的核苷酸读取。独特的核苷酸读取模式随后对照一系列人工单一读取模式进行分析,这些模式是通过逐步将野生型序列转移到自身而产生的。

[0113] F1代和F2代QPCR基因分型:在ROTOR-GENE RG-3000实时PCR系统(Corbett研究机构)上实施实时qPCR。使用1μL基因组DNA(gDNA)模板(稀释至5-20ng/μL),总体积为10μL,含有0.15μM浓度的正向和反向引物以及5μL QPCR 2x主混合物(Apex Bio research产品)。使用的qPCR引物见表2(基因分型RT-PCR引物第11-14列)。采用40个周期(95℃下15秒,60℃下60秒)进行qPCR,然后进行熔融曲线分析,以确认分析的特异性(67℃至97℃)。在这种方法中,包括相关区域的短PCR扩增子(约120-200bp)是从gDNA样品产生的,经过温度依赖性分离(熔融曲线)。当诱导的插入缺失标记存在于半合子gDNA中时,会形成异源双链以及不同的纯双链分子。通过熔体剖面图可以检测到多种形式的双相分子的存在,显示双相熔融是作为单个物种还是作为多个物种。通常,熔融曲线和熔融温度的对称性取决于dsDNA序列及其长度的均一性。因此,纯合子和野生型(WT)表现出对称的熔融曲线,可通过不同的熔融温

度来区分。熔融分析通过与参照DNA样品(来自对照野生型DNA)进行比较来进行,参照DNA样品以相同的主混合反应平行扩增。简言之,熔体轮廓的变化区分了纯合、半合和野生型-gDNA产生的扩增子(见图3)。

[0114] 雄性不育性的评估:对每种基因型的10个雄性(5月龄)进行可剥离精子体积和精子密度测定。用Neubauer血细胞仪玻片和连续稀释样品的分光光度法(600nm处的光密度)对精子进行计数。精子的活动性是用视野中活动精子的百分比来衡量的[4]。在400倍光镜下观察了伊红-黑色素染色的精子细胞的形态,并以最佳精卵比(100个卵子对应 $5 \cdot 10^6$ 个精子)对3种不同雌性野生型卵子进行体外受精,测定了精子的可育能力。用野生型雄性精子平行检测野生型卵子的质量。受精率以存活胚胎占受精后24小时收集的卵子总数的百分比表示。从这些研究中获得的平均值通过非配对t-检验在不同的突变基因型之间进行比较。

[0115] 雌性不育性的评估:我们记录了所有取样鱼的体重。在4月龄和6月龄时,对每种基因型至少6只雌性进行解剖,并在解剖前对其性腺进行原位拍照。所有基因型的平均性腺体指数进行统计学比较(非配对T-检验)。统计分析(未配对T-检验)并与对照组(野生型雌性与突变雄性杂交)比较至少6个突变雌性与野生型雄性杂交产生的卵、胚胎和幼体的存活率。

[0116] 供体细胞分离与生殖细胞移植:生殖细胞干细胞是从3-4月龄的鱼(~50-70克)的性腺中通过酶消化获得的,如Lacerda所述[5]。简言之,将新鲜分离的性腺切碎并在含有5%胎牛血清(纽约州格兰德岛Gibco Invitrogen公司)和0.05%DNA酶I(德国曼海姆罗氏诊断公司)的PBS(pH 8.2)中的1ml 0.5%胰蛋白酶(新泽西州Worthington生化公司)中于25°C下培养3-4小时。孵化期间,使用温和的移液对任何剩余的完整部分的性腺进行物理破坏。所得细胞悬浮液通过孔径为42 μ m的尼龙筛网(N-No.330T;东京筛网株式会社,日本东京)过滤以去除任何未分离的细胞团,然后在L-15培养基(Gibco Invitrogen公司)中再悬浮,然后在冰上储存直至移植。

[0117] 用0.0075%3-氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(Sigma-Aldrich公司)麻醉无生殖细胞受体幼虫(5-7dpf),并转移到涂有2%琼脂的培养皿中。细胞移植是通过将大约15000个精巢细胞注射到大约80个来自Elav12半合子突变亲本的幼虫后代的腹腔中进行的。或者,从MSC纯合雌性和野生型雄性杂交获得无PGC胚胎[6]。移植后,受体幼虫被转移回充气的胚胎孵化水中,并饲养至成年。

[0118] 表1:引物

[0119]

基因全名	罗非鱼同源基因 (alias)	NCBI 和 Ensembl加入#	靶向 外显子	标记	正向引物	序列号	正向引物	反向引物	序列号	反向引物	扩增子 尺寸(bp)
cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	Cyp17	Acc: ZFIN-GENE-040213-2 ENSMG000000001168	1	FAM	5'UTR	SEQ1	tgaagtgctacataaag	1	SEQ2	TGGTTGATGACAAATCACAAGTGT	357
				FAM	5'UTR	SEQ1	tgaagtgctacataaag	1	SEQ2	TGGTTGATGACAAATCACAAGTGT	357
cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a gene	Cyp19a1a	Acc: NM_003279586 ENSMG000000001155	1	NED	5'UTR	SEQ3	tgctacacatcacctcttc	1	SEQ4	AGCAGACAGACGACGATATCAG	189
				FAM	9	SEQ5	TGATGGAGAGCTTTCATCTACGAA	9	SEQ6	GTTCCAGGTTAAATTGATTG	186
Tight junction protein 1a	Tjp1a	Acc: ZFIN-GENE-031001-2 ENSMG000000006221	15	NED	Intron14-15	SEQ7	ggcggatggtgacattttac	15	SEQ8	acactaacctcGAGAAATCTGG	216
				FAM	16	SEQ9	GAAAAAGGATGgtagggatgac	17	SEQ10	GAGTGTGCTACCAACAGCGGAAAA	239
Casein Kinase II subunit alpha	Csk2a2	Acc: 100690588 ENSMG000000001598	1	FAM	5'UTR	SEQ11	gltatagaaaggagggaagtc	1	SEQ12	CAGTTTGGCACATGAGCATCGTA	153
				NED	1	SEQ13	ATGCTCATGTGCCAAACTG	2	SEQ14	cCTTCAGGATTTTCACCACCACT	222
Hippocampus abundant transcript 1a	Hiat1	Acc: 100705862 ENSMG000000001865	4	FAM	Intron3-4	SEQ15	tactgacacatcacagagctct	Intron4-5	SEQ16	cagcactgagcgtcagatctct	211
				NED	6	SEQ17	TGGAGCCTACCTGTCTGAG	6	SEQ18	lactaacAGCGAAAGGGTCT	182
small ArfGAP2	Snap2	Acc: ZFIN-GENE-060931-374 ENSMG000000004822	2	NED	Intron1-2	SEQ19	gctctctgagagactctc	2	SEQ20	aagactcagactGGACTTGCT	211
				FAM	9	SEQ21	AGAGAGGGCACAGTCAAGAAAC	10	SEQ22	TTGGATATCCCATTTGGTTTCAT	226
Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing gene	Gopc	Acc: 100692751 ENSMG000000001688	1	NED	5'UTR	SEQ23	tttaacagggtggcagagatt	1	SEQ24	AGATCCACATCCAGGAAAGCCT	207
				FAM	Intron1-2	SEQ25	tgccctttaaacacactta	2	SEQ26	CTCAGCTTGGCCTTGCTTGACAT	207
doublesex and mab-3 related transcription factor 1	Dmrt1	Acc: ZFIN-GENE-050511-1 ENSMG0000000014201	1	NED	5'UTR-1	SEQ27	tggcaggaccatTGAGCCAG	1	SEQ28	AGACAGTATCCGTGATTCTTAC	135
				FAM	Intron2-3	SEQ29	ctcttcatctctgtgtctc	3	SEQ30	GGGTTTCCAGCAGGAGGTGAGA	140
growth/differentiation factor 6-B-like	Gsdf	Acc: 100710262 ENSMG000000007633	2	NED	2	SEQ31	ttagttcagTGCCTAAGGTG	2	SEQ32	TGGCTGTGTGAGAAACGATGCTG	156
				FAM	4	SEQ33	agaTCTGGGCTGGGACA	4	SEQ34	tgtaactatcctGTGTGTTGG	145
Follicle stimulating hormone receptor	FSHR	Acc: ZFIN-GENE-020423-6 ENSMG0000000015917	11	NED	Intron10-11	SEQ35	ttttctcgtctgtcttgc	11	SEQ36	AAAGAGCTGAATAGGAGGAAGTT	137
				FAM	15	SEQ37	CATCTTGGCGTTCTTCTGTGT	15	SEQ38	CTTGAGGGCAGCTGAGATGGC	181
Vitellinogen Aa	VitgAa	Acc: ZFIN-GENE-001201-1 ENSMG000000007555	7	NED	7	SEQ39	GCAATCCTTGATGCTCCTTGAC	7	SEQ40	CTGAGACTCTATGCTGTTGATA	163
				FAM	22	SEQ41	AGAAGATCATCAACACATCAGG	22	SEQ42	GACTTGTGAGCAGTTGCATCAA	227
Vitellinogen Ab	VitgAb	Acc: ZFIN-GENE-001201-1 ENSMG0000000007369	5	NED	5	SEQ43	tttttgatctagTCTGGAG	5	SEQ44	gctctacAGCTTTCACAATCAT	183
				FAM	22	SEQ45	CTTCTGGACCAAGTCATTGAG	22	SEQ46	AGACTTGTGAGGCTAGAG	227

[0120] 表2:引物

[0121]

基因全名	罗非鱼同源基因 (alias)	基因分型引物RT-PCR						扩增产 尺寸(bp)
		前向引物 外显子	序列号	正向引物序列	反向引物 外显子	序列号	反向引物序列	
cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	Cyp17	1	SEQ47	GAACCAAAACCCCTCTGTCACTG	1	SEQ48	GTAATTCACTCCGCGAGGCTCAG	184
		1	SEQ47	GAACCAAAACCCCTCTGTCACTG	1	SEQ48	GTAATTCACTCCGCGAGGCTCAG	184
cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a gene	Cyp19a1a	1	SEQ49	ggcgATGAATCCTGTAG	1	SEQ50	ATGGCATTTGAGGTCACAGAGA	63
		9	SEQ5	TGATGGAGAGCTTCATCTACGAA	9	SEQ6	GTTCCAGGTTAAATGATTG	186
		15	SEQ51	GTTCAAGAGGGAGAGAGT	15	SEQ52	AAAAATCCCAACATCGTT	61
Tight junction protein 1a	Tjp1a	17	SEQ53	tgcttggctcagTGTATC	17	SEQ54	AATGCGTTTCCGAATGTAGAA	71
Casein Kinase II subunit alpha	Csnk2a2	5'UTR	SEQ11	gtattagaaggcgggaaggic	1	SEQ12	CAGTTTGGCACATGAGCATCGTA	153
		1	SEQ13	ATGCTCATGTGCCAAACTG	2	SEQ14	gcTTCAGGATTTTTCACCACCACT	222
Hippocampus abundant transcript 1a	Hial1	Intron3-4	SEQ15	tactgacacatccagcagctct	Intron4-5	SEQ16	cagcacagcagcagcagctatct	211
		6	SEQ55	CATCTGCTTCATCTGTGGCTG	6	SEQ18	lactacAGCGAAGGGGTCT	110
small ArfGAP2	Smap2	2	SEQ56	AATTGGGCATCTTCATCTGTAT	2	SEQ57	GACAGACTTGACCTTGGAGATG	81
		9	SEQ21	AGAGGAGGGCACAGTCAAGAAAC	10	SEQ22	TTGGATATCCCATTTTGGTTTCAAT	226
Golgi-associated PDZ and coiled-coil motif containing gene	Gopc	1	SEQ58	ATGTCTGCTTCGACTGGATGC	1	SEQ59	GCCATCGAAACATGGACATACATG	76
		Intron1-2	SEQ25	tgcccttbaaccaccta	2	SEQ26	CTCAGCTTGGGCTTGTCTTGACAT	207
doublesex and mab-3 related transcription factor 1	Dmr1	5'UTR-1	SEQ27	ttgccaggaccATGAGCCAG	1	SEQ28	AGACACGTATCCGTGAATTTCTAC	135
		Intron2-3	SEQ29	ctcttctctctgtgtctatc	3	SEQ30	GGGTTTCCAGCAGGAGGTCAGA	140
		2	SEQ31	ttatgtttagTGCCCAAGGTG	2	SEQ32	TGGCTGTGTGAGAAACGATGCTG	156
growth/differentiation factor 6-B-like	Gsdf	4	SEQ33	agATCTGGGCTGGGACA	4	SEQ34	tgtaactalacCTGTGTGTGG	145
		Intron10-11	SEQ35	ttttcdcgctgtgtctgc	11	SEQ36	AAAGAGCTGAATAGGAGGAAGTT	137
Follicle stimulating hormone receptor	FSHR	15	SEQ37	CATCTTGGGCTTCTTCTGTGT	15	SEQ38	CTTGAGGGCAGCTGAGATGGC	181
Vitellogenin Aa	Vigla	7	SEQ39	GCAATCCTTGATGCTCCTTGAC	7	SEQ40	CTGAGACTCTATGTGCTTGATA	163
		22	SEQ41	AGAAGATCATCAAAACACATCAG	22	SEQ42	GACTTGTGAGCAGTTGCATCAA	227
Vitellogenin Ab	Viglb	5	SEQ43	ttttgtatciagtCTGGAG	5	SEQ44	gctdtlacAGCTTCACAATCAT	183
		22	SEQ45	CTTCTGACCACAGTCATTGAG	22	SEQ46	AGACTTGTGGAGCTAGAG	227

[0122] 实施例2-利用基因编辑工具诱导罗非鱼F0代双等位基因敲除

[0123] 我们独立地靶向了两个与色素沉着有关的基因,即编码酪氨酸酶(tyr) [2]的基因和线粒体内膜蛋白MpV17 (MpV17) (Krauss,Astrinides等人2013著) [8]。我们发现50%和46%的注射胚胎在tyr和mpv17基因座上分别显示出高度突变(图4)。细胞功能等位基因的丧失自主地导致胚胎体(图4B)和视网膜色素上皮(图4C)中的无色细胞团,产生从黑色素完全丧失到部分丧失和虹膜色素沉着的胚胎表型,这些表型很容易与野生型表型相鉴别

(图4A和C)。显示完全缺乏色素沉着的胚胎(10-30%经处理的鱼)饲养至3月龄,所有均缺乏野生型tyr和mpv17序列。这些鱼显示透明和白化表型(图4D),表明功能研究可在F0罗非鱼中进行。

[0124] 实施例3-罗非鱼的多基因打靶

[0125] 我们测试了罗非鱼基因组中多个基因座是否可以同时靶向,以及在一个基因座上测定的诱变效率是否可以预测其他基因座的突变。为了验证我们的假设,我们共同打靶tyr和死端1(dnd)。Dnd是一种PGC特异性RNA结合蛋白(RBP),维持生殖细胞的命运和迁移能力[3]。注射程序化核酸酶后,我们发现两个基因靶点tyr和dnd的突变高度相关。大约95%的abino(tyr)突变体也在dnd位点携带突变,证明了色素沉着缺陷作为选择标记的适用性(图5A)。在进一步分析10条白化鱼的性腺后,6条有半透明的无生殖细胞精巢(图5B)。vasa是一种在野生型精巢中强烈表达的生殖细胞特异性标记物,在dnd突变型精巢中没有明显表达。这一结果表明合子dnd的表达对生殖细胞的维持是必要的,母系贡献的dndmRNA和/或蛋白不能挽救该基因的合子缺失。

[0126] 实施例4-产生无生殖细胞性腺

[0127] 我们通过微量注射反义修饰的寡核苷酸(dnd-吗啉基和dnd-AUM寡核苷酸)来实现胚胎dnd基因的瞬时沉寂,从而生产出不育罗非鱼。我们先将浸泡胚胎暴露于一个最初在屏幕上发现的用于烧蚀斑马鱼体内的PGC[10]的小分子,然后生产出不育罗非鱼。我们进一步利用基因敲除策略产生了不育罗非鱼,如上面一节中描述的dnd(实施例3)。我们还发现,培育Elavl2杂合子突变系和选择纯合子突变后代可以产生两性的无生殖细胞成体(图6)。这些基因敲除方法与上述其他方法一起产生不育罗非鱼,表现为雌性泌尿生殖突起(UGP)和弦状性腺或雄性UGP和半透明管状性腺(图6)。然而,这些方法对于不育鱼的商业化生产不是可行的解决方案,因为只有25%的杂合突变亲本的后代是不育的,而其他的沉寂方法不足以确保每批处理中每一条鱼的完全不育性。在本发明中,不育鱼的大规模生产依赖于亲鱼代亲代,这些亲代从无生殖细胞鱼开始,然后接受生殖系干细胞移植,最终产生供体衍生的精子或卵子。在我们的方法中,这些受体亲鱼的绝育优先使用敲除策略(例如杂合子亲代的空elavl2子代;参见实施例11)。除Elavl2外的敲除策略可用于产生不育受体,包括死端1、vasa、nanos3或piwi样基因的空突变体。这种敲除受体确保移植后只产生供体衍生的配子。根据鱼类、甲壳类动物或软体动物的种类,可以使用其他策略来产生不育受体,包括杂交和三倍体(Benfey等人1984年著;Felip2001年著)。

[0128] 实施例5-Cyp17I是尼罗罗非鱼雌性发育所必需的

[0129] 类固醇激素的平衡可能控制硬骨鱼性腺的性别分化和成熟,而雌激素在雌性分化中起重要作用。然而,在缺乏雄激素和雌激素的情况下,性腺分化和配子发生尚未被研究。为此,我们制作了缺乏cyp17I基因(以下简称cyp17)的活体罗非鱼模型。

[0130] 在尼罗罗非鱼中,这种酶仅在卵泡膜细胞中表达,并产生雄激素以响应促黄体生成素(LH)[13]。雄激素通过卵泡刺激素(FSH)诱导的芳香化酶(cyp19a1a)在生长卵泡的相邻颗粒细胞中转化为雌激素。相应地,cyp17功能丧失(通过基因编辑敲除)应同时阻断雄激素和雌激素的合成。与此模型一致,我们发现22个选择的F0白化/cyp17突变体中有20个发展为表型雄性,均显示出微小的UGP(图8C)。考虑到雄激素和生殖突起之间的关系,生殖器萎缩并不意外[14]。然而,这些F0雄性仍然可育,这可能是由于镶嵌F0背景下功能表型的部

分丧失。为了进行完整的表型分析,我们通过选择繁殖F1后代,在其身体的所有细胞中产生携带相同的空 Δ 16-cyp17突变的个体(图7)。F1杂合子(cyp17+/-)之间的杂交产生了约360个F2子代和典型的孟德尔分离野生型($n=110$;cyp17+/+)、半合子($n=159$;cyp17+/-)和纯合子动物($n=91$;cyp17-/-)。根据泌尿道突起(UGP)的形态特征,对155个F2代在6月龄时进行了性别鉴定。我们发现,所有33条纯合子鱼均发育为表型雄性,具有萎缩性UGP(图8A)。我们的结果表明,Cyp17为雌性发育所不可缺少的。

[0131] 我们随后用ELISA法测定野生型罗非鱼和cyp17突变型罗非鱼的血浆游离睾酮含量。在野生型(cyp17+/+)和杂合突变罗非鱼(cyp17+/-)中测得的睾酮平均值为86pg/mL,而在纯合突变型(cyp17-/-)中未发现可检测到的睾酮水平(图8B)。这证实了这种酶在雄激素产生中的必不可少的作用。

[0132] 我们进一步研究了具有Cyp17缺陷的鱼的性腺形态和功能。对5月龄的cyp17+/+、cyp17+/-和cyp17-/-同胞雄性进行了解剖,并从体腔中取出除性腺以外的所有器官(图9A)。野生型和半合型突变体的精巢呈粉红色,通常见于性成熟鱼类,而纯合型突变体的精巢呈半透明(图9A和B)。此外,突变的精巢比对照组小50%(图9D),可剥离的精巢体积小于重量的20%(图9E)。此外,纯合子cyp17突变体的精子浓度在5月龄和6月龄时分别降低了20倍和6倍(图9F)。我们没有发现精子形态、运动能力或功能上的缺陷,从10个空突变体中收集的精液成功地使野生型卵子受精就证明了这一点。

[0133] cyp17缺失突变体可以进行精子发生的事实表明,雄性激素在尼罗罗非鱼的这一过程中并不是严格必需的。因此,该基因的功能缺失突变可能不足以产生全部不育雄性群体。为了确定功能精子形成的调控机制,我们研究了哺乳动物中与雄性不育相关的额外基因。

[0134] 实施例6-靶向精子发生的候选基因

[0135] 哺乳动物精子和鱼类精子在形态和功能上存在显著差异。尤其是鱼类精子缺乏顶体,在精液中是不动的,而哺乳动物精子具有顶体(穿透卵子绒毛膜所必需的关键细胞器),在精液中是可移动的。球形精子症是一种罕见的严重的人类不育症,其特征是精子在形态和功能上都有缺陷。然而,这种疾病的鱼类模型尚未开发出来,可能是因为鱼类精子缺乏顶体。利用基因组数据库,我们通过计算机鉴定了罗非鱼以下哺乳动物基因的同源序列: Csnk2a2[15]Gopc[16,17],Hiat1[18],Tjp1a,Smad2[21]。为了探索它们在罗非鱼中的功能,我们打靶每个基因的2个独立外显子(见图10至14)。一个色素沉着基因(酪氨酸酶)被共同靶向并用作突变选择标记。

[0136] 与未经处理的对照组相比,每个显示色素沉着缺陷的候选基因大约有20个胚胎饲养到成年。5月龄时,取F0雄性和野生型对照组的精液,测定精子密度、活力和形态。与对照组相比,所有F0突变雄性都产生稀释的精子。在显微镜下,突变精子基本上只产生颤抖的运动,我们发现异常形状精子头的频率范围很广(25%-95%),这是人类和小鼠球形精子症的特征(图15A)。这些突变导致受精率显著降低(图15B)。此外,我们发现不育表型的严重程度与观察到的精子畸形频率呈正相关,在95%精子畸形的Tjp1a突变体中发现的受精率最低(图15A和B)。我们发现这些F0突变系中的所有雌性都是可育的。

[0137] 我们的结果表明,在鱼类和哺乳动物中存在一个进化上保守的控制精子发生的途径。这些结果支持这样一种观点,即这些相应基因的靶向破坏将导致许多其他硬骨鱼类的

不育表型,也可能在其他类群中引起更广泛的不育表型。

[0138] 实施例7-在cyp17敲除背景下将全雄鱼绝育

[0139] 为了控制雄性不育,我们首先评估了cyp17基因零突变的影响,该基因控制类固醇激素合成的一个重要分支点,调节雄激素和雌激素的产生。我们发现所有的cyp17^{-/-}鱼都发育成雄性。令人惊讶的是,cyp17^{-/-}产生的精液含有少量成熟精子,可以通过体外受精使卵母细胞受精。我们随后研究了阻断精子发生的可能性。我们的初步筛选集中在5个与球形精子症相关的基因(统称为精子发生特异性基因或SMS基因:Smad2、Cnsk2a2、Gopc、Hiat1和Tjp1a),这些基因的突变导致有严重少弱畸形精子症的F0雄性的生育能力低下,而F0突变雌性完全可育。F0敲除鱼类先前的遗传特征表明,它们通常在相应的靶基因座上携带镶嵌突变,其中一些通常在框架内引起表型的部分拯救。因此,为了测量完全丧失功能的表型,我们对纯合的SMS空突变体进行了额外的表型鉴定。我们进一步建立了罗非鱼双纯合子突变株系,以探讨同时损害精子发生和类固醇激素合成的影响。

[0140] 实验:为了活体评估cyp17和5个SMS基因中的一个的双基因敲除的功能,我们将F0 SMS突变的雌性与cyp17^{Δ16/+}雄性杂交。后代(120到180条鱼)通过PCR片段分析(如图2所示)在每个目标位点进行基因分型[22]。我们只培育了在选定的SMS基因座(通常12-50%的F1后代群体共享相同的基因型)携带相同突变等位基因的个体,以下称为m1(图18)。至少有10个双杂合子(如cyp17^{Δ16/+};SMS^{m1/+})被培养到成年。这些双杂合子是相互杂交的,其后代在1个月龄时通过QPCR熔融分析进行基因分型。对于随后出现的9种可能的F2基因型(见图9),目前至少有30条鱼被饲养到成年期,并将进行生育力分析。将雌性cyp17^{+/+};SMS^{+/m1}(例如cyp17^{+/+};Tjp1a^{+/m1})留作下文第2节所述的进一步研究。图9总结了该实验方案,使用Tjp1a作为SMS基因靶点的示例。

[0141] 在不受理论约束的情况下,我们认为,在鳍鱼和哺乳动物中,所有5个保守的精子发生特异性基因的空突变将导致少弱畸形精子症并导致不育。我们期望所有的双纯合突变体(cyp17^{-/-};SMS^{-/-})都能发育成不育雄性,其精子数甚至比任何一个精子发生缺陷的KO雄性(SMS^{-/-})都要低。事实上,cyp17^{-/-}鱼类应该缺乏11-酮睾酮,这是精子发生的一个积极调节因子。与雄激素在精子发生中起着睾丸旁分泌作用的观点一致,cyp17^{-/-}罗非鱼此前已显示精子计数较低。图9显示了九种基因型以及四种不同的相应表型,其预期百分比为:1)两性可育约56%,2)可育雌性和不育雄性约19%,3)均为可育雄性约19%;4)均为不育雄性约6%。通过单独观察每一个性状,我们预计后代群体中有62%的雄性,其中25%的雄性不育。

[0142] 实施例8-在cyp19a1a敲除背景下将全雄鱼绝育

[0143] 另一种产生均为雄性种群的策略是使Cyp19a1a芳香化酶(以下简称Cyp19)失活。我们在罗非鱼cyp19基因的编码序列中产生了框外突变(图17)。这种酶由体细胞性腺产生,将睾酮转化为雌激素。与此模型一致,我们发现在所选的25个F0 Cyp19突变体中,有20个突变体发展为表型雄性(表3)。值得注意的是,这些突变的雄性表现出正常的雄性泌尿生殖突起,这表明雄激素的生产没有受到损害,第二性征正常发育。这与CYP17敲除雄性形成对照,后者缺乏雄激素,因此出现萎缩的泌尿生殖突起。均为雄性不育罗非鱼群体的产生,无论是表达还是不表达雄激素(分别在cyp19敲除和cyp17敲除背景中),都将使我们能够探讨雌性类固醇激素对罗非鱼生长性能的影响。睾酮对生长激素分泌和反应性的刺激作用在哺乳动

物中已被充分证明。为了进行完整的表型分析,我们产生了在身体的所有细胞携带相同的零突变的个体。选择第1外显子缺失 $\Delta 10$ -cyp19的杂合cyp19 F1后代培育F2代。这种移帧突变预计会产生一种缺失其野生型氨基酸序列>98%的截短蛋白质(图17)。对F2代进行了基因型和性别鉴定。与预期一样,我们发现纯合 $\Delta 10$ -cyp19罗非鱼均发育为雄性(n=38),而半合子(n=97)和野生型(n=40)的性比正常。我们进一步建立了罗非鱼双纯合子突变株系,以探讨同时损害精子发生和类固醇激素合成的影响。

[0144] **实验:**我们首先将杂合子F1雄性 $\Delta 10$ -cyp19a1a与来自实施例7的杂合子突变体雌性(Gopc ^{$\Delta 8/+$} ;Smap2 ^{$\Delta 17/+$} ;Tjp1a ^{$\Delta 7/+$} ;Csnk2a2 ^{$\Delta 22/+$} ;Hiat1 ^{$\Delta 17/+$})异交。只有在Cyp17空背景(来自实施例7的结果)中被破坏时引起雄性不育的SMS基因才会被选择。后代将进行基因分型,至少有10个双杂合子将被培养到成年期,进行性别鉴定和杂交。如实施7所述,将对产生的后代进行育力分析。最多可产生5个不同的双敲除雄性。在不受理论约束的情况下,我们预计双敲除cyp19-/-;SMS-/-鱼将发展为不育雄性,并预计其后代群体62%为雄性,其中25%是不育的。

[0145] 表3:说明本研究产生的单基因突变等位基因、双半合突变等位基因和纯合突变等位基因。基因名称是根据其在雌性化(FEM)、精子发生(SMS)、雄性化(MA)和卵泡发生(FLS)中的特定作用列出的。对在选定的F0突变体中观察到的表型进行了描述。

[0146]

基因类别	基因名称	F0白化病的表型	选定的F1基因型(半合子)	选定的双半合子突变体	F2纯合子
FEM	<i>Cyp17</i>	80% male (n=20)	<i>Cyp17</i> ^{$\Delta 16/+$}		<i>Cyp17</i> ^{$\Delta 16/\Delta 16$}
	<i>Cyp19a1a</i>	75% male (n=23)	<i>Cyp19</i> ^{$\Delta 17/+$} , <i>Cyp19</i> ^{$\Delta 16/+$}		<i>Cyp19</i> ^{$\Delta 16/\Delta 16$}
SMS	<i>Tjp1a</i>	Reduced fertility in males (70-90%)	<i>Tjp1a</i> ^{$\Delta 7/+$}	<i>Tjp1a</i> ^{$\Delta 7/+$} and <i>Cyp19</i> ^{$\Delta 16/+$}	<i>Tjp1a</i> ^{$\Delta 7/\Delta 7$}
	<i>Csnk2a2</i>		<i>Csnk2a2</i> ^{$\Delta 22/+$}	<i>Csnk2a2</i> ^{$\Delta 22/+$} and <i>Cyp17</i> ^{$\Delta 16/+$}	<i>Csnk2a2</i> ^{$\Delta 22/\Delta 22$}
	<i>Hiat1</i>		<i>Hiat1</i> ^{$\Delta 17/+$}	<i>Hiat1</i> ^{$\Delta 17/+$} and <i>Cyp17</i> ^{$\Delta 16/+$}	<i>Hiat1</i> ^{$\Delta 17/\Delta 17$}
	<i>Smap2</i>		<i>Smap2</i> ^{$\Delta 17/+$}	<i>Smap2</i> ^{$\Delta 17/+$} and <i>Cyp19</i> ^{$\Delta 16/+$}	<i>Smap2</i> ^{$\Delta 17/\Delta 17$}
	<i>Gopc</i>		<i>Gopc</i> ^{$\Delta 8/+$}		<i>Gopc</i> ^{$\Delta 8/\Delta 8$}
MA	<i>Dmrt1</i>	50% female (n=24)	<i>Dmrt1</i> ^{$\Delta 17/+$} , <i>Dmrt1</i> ^{$\Delta 13/+$}		
	<i>Gsdf</i>	95% female (n=20)	<i>Gsdf</i> ^{$\Delta 15/+$} , <i>Gsdf</i> ^{$\Delta 22/+$}		
FLS	<i>FSHR</i>	Sterile females (2 in 6 tested)	<i>FSHR</i> ^{$\Delta 5/+$}	<i>FSHR</i> ^{$\Delta 5/+$} and <i>Dmrt1</i> ^{$\Delta 17/+$}	
	<i>VtgAa</i>	Sterile females (3 in 5 tested)	<i>VtgAa</i> ^{$\Delta 5/+$} , <i>VtgAa</i> ^{$\Delta 15/+$}	<i>VtgAa</i> ^{$\Delta 5/+$} and <i>Gsdf</i> ^{$\Delta 22/+$}	<i>VtgAa</i> ^{$\Delta 25/\Delta 25$}
	<i>VtgAb</i>	Reduced fertility in females (70-90%)	<i>VtgAb</i> ^{$\Delta 8/+$}	<i>VtgAb</i> ^{$\Delta 8/+$} and <i>VtgAa</i> ^{$\Delta 15/+$}	<i>VtgAb</i> ^{$\Delta 8/\Delta 8$}

[0147] 实施例9-评估两个靶向雄性分化的基因与另外两个控制卵子发生的基因联合产生一个不育的全雌性群体

[0148] 转录抑制剂性腺体源性因子(Gsdf)是一个TGF- β 超家族成员,仅在鱼类的性腺中表达,主要是在支持细胞中。类似地,转录因子Dmrt1优先在前支持细胞和支持细胞以及精巢上皮细胞中表达。这两种基因都是精巢正常发育所必需的([23,24])。

[0149] 为了产生全雌性罗非鱼群体,我们在Dmrt1或Gsdf基因(雄性基因或MA)中产生了空突变(图19和图20)。我们发现20只Gsdf突变的白化罗非鱼中有19只发育成雌性(表3)。相反,表现镶嵌色素缺陷的F0突变体的性比正常。假设共同靶向的酪氨酸酶和Gsdf基因之间的突变频率正相关,我们的结果表明Gsdf的高突变率导致XY雄性性反转为雌性。令人惊讶的是,我们在所选的F0 Dmrt1突变体中没有观察到雌性性别偏向(表3)。

[0150] 为了使雌性不育,我们以参与卵泡成熟的基因为靶点。在控制卵泡发育的分子途径中,我们发现了两个基因:1)FSHR,它在卵巢雌激素合成和分泌的上游起作用。2)卵黄蛋白原(Vtgs),作用于卵巢雌激素合成的下游。卵黄蛋白原优先由肝脏产生,而卵泡刺激素(FSH)受体FSHR在发育中的卵母细胞周围的卵泡膜细胞中表达。为了测试FSHR和Vtgs在正常卵巢发育(卵泡发育特异性基因或FLS)中的必要性,我们在独立的F0系中产生了这些基因的功能缺失突变(图22-24)。

[0151] 我们发现FSHR对卵泡发育是必不可少的,FSHR基因的破坏导致卵泡激活完全失败和雌性不育(图26和表3)。在罗非鱼中,FSHR突变后没有将遗传雌性雄性化为雄性,如之前在斑马鱼示例中所述[29]。然而,我们发现F0 FSHR突变雌性的泌尿生殖突起明显小于对照组雌性。这一观察结果可能反映了FSHR突变体中雌激素水平的降低,与FSHR在局部上调芳香化酶表达和雌激素产生中的作用一致。我们在F0 FSHR突变雄性中未发现明显的生殖表型。

[0152] 尼罗罗非鱼只有3个Vtg基因[25],两种形式的完全Vtg(VtgAa和VtgAb)和一种形式的不完全C型硬骨鱼类卵黄蛋白,缺少3个蛋白质结构域(VtgC)。由于VtgAa和VtgAb的表达水平高于VtgC,并且被认为是早期胚胎发育的关键,因此我们将这两个基因单独或联合定位(图22、23和表3)。与卵母细胞成熟和胚胎发育营养支持的功能一致,我们发现在4个受试体中,3个在VtgAa中突变的F0雌性反复未能产生可存活的后代(图24)。我们还发现,五分之一携带VtgAb突变的F0雌性产生的胚胎后代在孵化前死亡(数据未示出)。

[0153] 为了获得完整的表型特征,必须在动物的每个细胞中产生相同的突变。因此,我们将建立并鉴定4个缺乏雄性化和卵黄发生的罗非鱼品系。

[0154] 在6月龄时,将镶嵌F0-XX MA m_{1-n} 雌性(例如Dmrt1 m_{1-n} 或Gsdf m_{1-n})与镶嵌F0 FLS m_{1-n} 雄性(FSHR m_{1-n} 或Vtgs m_{1-n})异交,并对其F1后代进行基因分型,以鉴定在每个位点携带相同基因特异性指数的双杂合突变体(例如Dmrt1 $\Delta^{7/+}$ -FSHR $\Delta^{5/+}$)(见表3)。

[0155] 实验:目前,至少有10个双杂合子(四个基因组合中的每一个)被饲养至成年。野生型等位基因应确保这些F1鱼同时发育为可育雄性和雌性。然后将这些双杂合突变体进行品系杂交,并通过QPCR熔融分析对其1月龄的后代进行基因分型。对于接下来的9种可能的基因型(见图25),将至少有30条鱼被饲养到成年期,然后进行性别鉴定和生育能力鉴定。

[0156] 图25显示了九种基因型和相应的四种不同的表型,我们预期其分数比率如下:1)两性均可育约56%,2)可育雌性和不育雄性约19%,3)均为可育雄性约19%;4)均为不育雌性约6%。从每一个性状来看,我们预计后代中有62%为雌性,其中25%是不育的。

[0157] 我们对F0突变系的表型研究(表3)大多与我们最初的假设一致,我们完全期望在后代中证实基因型-表型关系。我们发现Gsdf缺乏导致雌性化,而FSHR和Vtgs失活导致雌性不育。这些结果有力地表明,FSHR-Gsdf双敲除将发展成为以卵巢萎缩为特征的单性不育雌性群体,卵巢中的卵泡阻滞在前生殖阶段。F0 Dmrt1突变体缺乏性分化表型可能反映了不完全编辑、区域镶嵌和非突变细胞的代偿。然而,在不受理论限制的情况下,我们相信FSHR-dmrt1双敲除突变通过种系遗传,将发展成为全雌性不育群体。在我们的F0突变筛查中,我们观察到阻断主要卵黄蛋白的前体(如Vtg敲除)会损害卵子质量,损害胚胎的发育和存活。因此,我们预计Gsdf-Vtgs和Dmrt1-Vtgs双敲除将发展成为单性不育的雌性种群。

[0158] 实施例10-种系移植到不育代成体中繁殖全雄性和全雌性不育系

[0159] 上述实施例8和9说明了如何通过培育双半合子突变体和单独选择双敲除子代的亚群来产生单性不育鱼。然而,这种方法可能不够有效,在工业环境中使用起来可能过于昂贵。辅助生殖中的胞质内单精子注射为繁殖精子发生缺陷的雄亲提供了一种解决方案。然而,这种方法也不适用于商业鱼群的大规模生产(因为它需要一次对一条鱼实施方法)。大规模生产的关键是产生只产生突变配子的雌雄亲,这样就不需要选择来鉴定双敲除子代。重要的是,这些突变体配子也应该是功能性的,以便这些亲代的自然交配可以用来产生一个单性不育后代的可行群体。这只有在亲鱼的性别比例和配子功能得以拯救时才有可能。我们推测这可以通过将双敲除突变鱼的生殖系干细胞移植到没有相同基因突变的无生殖细胞受体来实现。这种移植的亲代有正常的体细胞,但有一个突变的种系(见图27-32)。假设突变基因在生殖细胞中不起作用,这些嵌合受体具有确保正常性比的功能性MA或FEM体细胞基因(图34C和D)和拯救精子发生(图28)或卵子发生(图34C和D)的功能性SMS或FLS体细胞基因。

[0160] 由于生精失败可能是由于生殖细胞或其躯体环境中的缺陷造成的,我们分析了SMS基因的表达,以确定那些优先不在生殖细胞中表达的基因(图16)。我们在不育精巢中的SMS基因表达研究表明性腺体细胞在支持生殖细胞发育中的作用。例如,我们发现Tjpl α 在不育精巢中的高表达水平高于野生型精巢,而Hiat1和Gopc的表达水平仅比可育精巢略低(图16)。

[0161] 这些结果表明,这些基因的突变体形成了精巢微环境,在那里,由于支持细胞和/或Leydig特异性缺陷,精子形成受到损害(图28)。因此,我们期望将来自雄性敲除不育供体的精原干细胞移植到容许的野生型精巢环境中将恢复精子功能和生育能力(图28)。

[0162] 同样,FSHR和Vtgs在体细胞(分别是卵泡膜细胞和肝细胞)中严格表达。因此,携带这些基因的空等位基因的卵母细胞应保持其固有的增殖和分化能力,确保来自不育雌性突变供体的卵原干细胞可以重新植入卵巢,并在移植到野生型/容许的受体后分化为功能性卵细胞(图29和30)。因此,我们相信受体雄性或雌性可以产生携带供体基因型的配子。

[0163] 实施例11-Elav12敲除受体可产生功能性配子

[0164] 为了证实不育的Elav12敲除受体可以从供体来源的生殖细胞中产生功能性配子,我们从携带参考基因突变(框内和框外)的白化($tyr^{-/-}$)雄性罗非鱼的精巢中获取精原干(图33A)。我们将两个突变系的精巢细胞悬液移植到Elav12 $^{-/+}$, $tyr^{+/+}$ 亲本的生殖细胞缺失受体胚胎后代中。我们对移植鱼进行基因分型,以选择纯合的Elav12 $^{-/-}$ 突变体,并将其培育至成年。在5个月龄时,31-50%的移植Elav12 $^{-/-}$ 雄性和40%的6个月龄移植Elav12 $^{-/-}$ 雌性在与白化雄性和雌性异交时只产生白化子代。未移植的Elav12 $^{-/-}$ 对照组不育。因此,Elav12 $^{-/-}$ 受体可以在种系干细胞移植后产生供者源性配子,说明了建立只产生供体源性配子的罗非鱼的可行性。利用白化病来检测携带 tyr 等位基因的配子为突变等位基因的种系传递效率提供了一种易于量化的高通量检测方法,但这些实验并没有证明空突变是成功繁殖的。为此,我们提取并分析了一个可育受体的精子DNA。使用毛细管电泳确定扩增产物的大小(图33B)。结果显示,受体鱼仅产生含有来自框内和框外(3nt和4nt)缺失片段的供体精子,这表明空等位基因(4nt缺失)可以定植于性腺,并与阳性对照突变(3nt缺失)一样有效地增殖(图33B)。

[0165] 实验:精原干细胞和卵原干细胞(SSC、OSC)将从所有雄性和雌性罗非鱼幼鱼系(根

据实施例7、8和9开发)中分离。收获后,这些种系干细胞将被移植到上述Elavl2敲除受体幼体中。在不受理论限制的情况下,我们期望产生携带供体基因型的功能性精子和卵母细胞。为了评估移植后产生的供体来源配子的功能,将进行体外受精试验。此外,我们期望只有白化子代产生于自然色素受体携带白化供体配子和白化系之间的杂交。我们将对10个供体来源的精子发生和卵黄发生特异性基因的突变后代进行基因分型。

[0166] 如图34B所示,通过芳香化酶抑制剂治疗获得的具有双敲除性反转雄性的杂交代孕母体将产生全雌性不育后代。或者,将代孕父体与雌激素处理后获救的双敲除性逆转雌性突变体杂交,将产生全雄性不育群体(图34A)。使用雌激素(如图34A)或雄激素抑制剂(如图34B)的双敲除的性逆转可以通过生殖系移植方法来替代,以产生雌性亲鱼(图34C)或雄性亲鱼(图34D)。

[0167] 实施例12-鱼缸成长试验

[0168] 在生长和繁殖之间有一个直接的权衡,因为进入性腺的能量会影响体细胞的生长。尼罗罗非鱼早熟,全年都能繁殖,卵黄形成期短[26],生理过程需要高代谢率。此外,罗非鱼物种可以抑制生长以维持其繁殖能力[27],而在其他鱼类中,性成熟期的开始会对鱼类养殖的重要生产参数产生重大影响,如食欲、生长速度、饲料转化效率、肉质性状、外观、健康和生存率。因此,延迟或阻止性成熟可能会给商业水产养殖生产者带来重大利益。在我们培养不育单性群体的努力中,我们打靶了突变会阻止或延缓性成熟期开始的基因。然而,有这些效应的靶向基因也可能具有多效性效应,通过未知的激素、生理或行为变化而起作用,对品系有害。

[0169] 实验:为了产生用于生长性能试验的群体,将为每一个相关的品系生产来自单对杂交(至少三个单独杂交)的胚胎。处理胚胎组和对照胚胎组将采用既定的孵化程序分别饲养。在喂食阶段,一半的对照动物将使用适当的外源激素处理方案(即喂食甲基睾酮或DES)进行性逆转。当一组(处理组和对照组)中的鱼平均重量达到60克时,将对其进行PIT标签,并将其分到6个1000升的鱼缸(3个对照组和3个处理组,每个鱼缸50条鱼)。所有的鱼每天都要喂三次,直至喂饱。

[0170] 每条鱼将单独称重,每4周测量一次鱼的长度,以达到可销售规格(680克Sdv:77克,8月龄)。实验结束后,将鱼处死并根据泌尿生殖孔的结构进行性别鉴定。我们将记录分离的性腺和胴体的个体重量,以计算性腺体指数(GSI)和胴体指数(每组n=60)。具体增长率(G)将根据Houde&Scheckter公式[28]计算。

[0171] 在不受理论约束的情况下,我们相信大多数(如果不是全部的话)在实施例7、8和9中培养的双敲除鱼将发展为单性,并且在没有其他生物过程受损的情况下不育。因此,选定的突变不应对鱼类的整体性能产生负面影响。相反,我们期望找到一个生长率和饲料转化率与性腺重量呈负相关的改善。突变株系应该是性延迟(雄性不育)或不成熟(雌性在前生殖阶段被阻止)。在不太可能的情况下,我们只实现单性群体的部分绝育,我们期望罗非鱼生产力的提高与群体中绝育鱼的比例成正比,这是由于能量消耗的减少。在所有情况下,我们预计不育鱼和性腺萎缩的鱼在生长特性方面的表现将超过其完全可育的同类(例如,来自外源激素处理的单性群体)。

[0172] 参考文献

[0173] 1. Dunham, R., 《水产养殖与渔业生物技术》, CABI出版社2004年。

- [0174] 2. Pruginin, Y. 等人著《尼罗罗非鱼×金黄罗非鱼杂交种全雄幼鱼》,《水产养殖》,1975年6(1):第11-21页。
- [0175] 3. Wolters, W.R. 和 R. DeMay 著《条鲈×白鲈和条鲈×黄鲈杂交种的生产特性》,《世界水产养殖学会杂志》1996年,27(2):第202-207页。
- [0176] 4. McMaster, M. 等人著《漂白硫酸盐厂废水对白吸盘鱼的精液特性、繁殖性能和幼鱼存活发育的影响》,《生态毒理学与环境安全》1992年,23(1):第103-117页。
- [0177] 5. Lacerda, S.M. 等人著《成年鱼生殖细胞移植后快速繁殖新技术:尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)模型》,《公共科学图书馆:综合》2010年,5(5):第e10740页。
- [0178] 6. Lauth, X. 和 J.T. Buchanan 著《通过母体诱导动物不育》,2015年,谷歌专利。
- [0179] 7. Koga, A. 等人著《在酪氨酸酶基因中插入一个新的转座因子是导致青鱼(*oryzias latipes*)白化突变的原因》,《分子遗传学和普通遗传学》1995年,249(4):第400-405页。
- [0180] 8. Krauss, J. 等人著《透明蛋白是一种影响斑马鱼条纹形成的基因,编码虹膜载体存活所需的线粒体蛋白Mpv17》,《公开生物学》2013年,2(7):第703-710页。
- [0181] 9. Weidinger, G. 等人著《死角是斑马鱼原始生殖细胞迁移和存活所必需的一种新的脊椎动物种质成分》,《当代生物学》2003年,13(16):第1429-1434页。
- [0182] 10. Peterson, R.T. 和 P.J. Schlueter 著《生殖细胞消融化合物及其用途》,2017年,谷歌专利。
- [0183] 11. Benfey, T.J. 和 A.M. Sutterlin 著《三倍体内陆大西洋鲑的生长和性腺发育》,《加拿大渔业和水产科学杂志》1984年,41(9):第1387-1392页。
- [0184] 12. Felip, A. 等人著《硬骨鱼类三倍体和雌核发育的诱导(以海洋鱼类为重点)》,《遗传学杂志》2001年,111(1-3):第175-195页。
- [0185] 13. Zhou, L.-Y. 等人著《缺乏裂解酶活性的新型P450c17负责鱼卵巢和头肾C21甾体的生物合成》,《内分泌学》2007年,148(9):第4282-4291页。
- [0186] 14. Carlisle, S. 等人, Carneiro, L. 和 Grober, MS (2000年)。《11-酮睾酮对变性鱼生殖突起形态的影响》,《鱼类生物学杂志》57, 445-456。最初打印时,图2的分辨率不令人满意。更正。《鱼类生物学杂志》2001年,58:第299页。
- [0187] 15. Xu, X. 等人著《缺乏酪蛋白激酶 II α' 催化亚单位小鼠的卵母细胞》,《自然遗传学》1999年,23(1):第118页。
- [0188] 16. Yao, R. 等人著《缺乏高尔基体蛋白(GOPC)的小鼠缺乏顶体的形成》,《美国国家科学院学报》2002年,99(17):第11211-11216页。
- [0189] 17. Suzuki-Toyota 等人著《Gopc-/-小鼠附睾成熟过程中维持正常精子尾部结构的因素研究》,《生殖生物学》2007年,77(1):第71-82页。
- [0190] 18. Doran, J. 等人著《Mfsd14a(Hiat1)基因断裂导致雄性小鼠的卵子增多和不育》,《生殖》2016年,152(1):第91-99页。
- [0191] 19. Rocha, D. 和 N. Affara 著《精子发生障碍与男性不育的遗传学基础》,《当代妇产科学》2000年,10(3):第139-145页。
- [0192] 20. Truong, B. 等人著《寻找男性不育的候选基因》,《亚洲男科学杂志》2003年,5(2):第137-147页。

- [0193] 21.Funaki,T.等人著《Arf GAP SMAP2是精子发生过程中有组织的囊泡从跨高尔基网络出芽和随后顶体形成所必需的》,《细胞分子生物学》2013年,24(17):第2633-2644页。
- [0194] 22.Oka,K.等人著《用通用荧光PCR对38个插入/缺失多态性进行基因分型,以供人类鉴定》,《分子和细胞探针》2014年,28(1):第13-18页。
- [0195] 23.Jiang,D.N.等人著《gsdf是dmrt1在尼罗罗非鱼雄性性别决定途径中起作用的下游基因》,《分子繁殖与发育》2016年,83(6):第497-508页。
- [0196] 24.Li,M.等人著《CRISPR/Cas9基因打靶罗非鱼的研究》,《遗传学》2014年,197(2):第591-599页。
- [0197] 25.Davis,L.K.等人著《多种雌激素受体、生长激素受体、胰岛素样生长因子和卵黄蛋白原在雄性罗非鱼中的性别特异性表达及17 β -雌二醇的影响》,《普通与比较内分泌学》2008年,156(3):第544-551页。
- [0198] 26.Naylor,R.L.等人著《水产养殖对世界鱼类供应的影响》,《自然》2000年,405(6790):第1017页。
- [0199] 27.Coward,K.和N.R.Bromage著《从第一次摄食到有性成熟,两组罗非鱼的产卵频率、繁殖力、卵大小和卵巢组织学均维持在两种不同的日粮大小》,《水生生物资源》1999年,12(1):第11-22页。
- [0200] 28.Houde,E.D.著《海鱼仔鱼的生长率、口粮和群体消费量与猎物浓度的关系》,国际海洋考察理事会《会议报告和纪要》1981年,178:第441-453页。
- [0201] 29.Zhang,Z.等人著《转录激活物样效应核酸酶破坏斑马鱼促卵泡激素受体(fshr)而不是促黄体生成激素受体(lhcgr)基因,导致雌性动物卵泡激活失败,随后雄性动物发生性逆转》,《内分泌学》2015年,156(10):第3747-3762页。
- [0202] 序列列表
- [0203] 序列号1
- [0204] 长度:38
- [0205] 类型:DNA
- [0206] 生物体:人工序列
- [0207] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
- [0208] 序列:1
- [0209] TGTAAACGACGGCCAGTttgaagttgctacataaaag
- [0210] 序列号2
- [0211] 长度:22
- [0212] 类型:DNA
- [0213] 生物体:人工序列
- [0214] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0215] 序列:2
- [0216] TGGTTGATGACAATCACACTGT
- [0217] 序列号3
- [0218] 长度:41

- [0219] 类型:DNA
[0220] 生物体:人工序列
[0221] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
[0222] 序列:3
[0223] TAGGAGTGCAGCAAGCATtgttctacatcatcacccttctc
[0224] 序列号4
[0225] 长度:23
[0226] 类型:DNA
[0227] 生物体:人工序列
[0228] 其他信息:人工序列描述:引物
[0229] 序列:4
[0230] AGCAGACAGACGAGCAGTATCAG
[0231] 序列号5
[0232] 长度:41
[0233] 类型:DNA
[0234] 生物体:人工序列其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
[0235] 序列:5
[0236] TGTAAAACGACGGCCAGTTGATGGAGAGCTTCATCTACGAA序列号6
[0237] 长度:20
[0238] 类型:DNA
[0239] 生物体:人工序列
[0240] 其他信息:人工序列描述:引物
[0241] 序列:6
[0242] GTTCCAGGTAAATTGATTG
[0243] 序列号7
[0244] 长度:41
[0245] 类型:DNA
[0246] 生物体:人工序列
[0247] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
[0248] 序列:7
[0249] TAGGAGTGCAGCAAGCATgcgtgatttgctgacctttttac
[0250] 序列号8
[0251] 长度:22
[0252] 类型:DNA
[0253] 生物体:人工序列
[0254] 其他信息:人工序列描述:引物
[0255] 序列:8
[0256] acacttacCCTGAGAATCTGG
[0257] 序列号9

- [0258] 长度:41
- [0259] 类型:DNA
- [0260] 生物体:人工序列
- [0261] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
- [0262] 序列:9
- [0263] TGTAAAACGACGGCCAGTGAAAAAGGATGgtgagggatgac
- [0264] 序列号10
- [0265] 长度:23
- [0266] 类型:DNA
- [0267] 生物体:人工序列
- [0268] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0269] 序列:10
- [0270] GAGTGTGTCTACCACACGGAAAA
- [0271] 序列号11
- [0272] 长度:41
- [0273] 类型:DNA
- [0274] 生物体:人工序列
- [0275] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
- [0276] 序列:11
- [0277] TGTAAAACGACGGCCAGTgtatttagaaggcggtgaaggtc
- [0278] 序列号12
- [0279] 长度:23
- [0280] 类型:DNA
- [0281] 生物体:人工序列
- [0282] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0283] 序列:12
- [0284] CAGTTTGGCACATGAGCATCGTA
- [0285] 序列号13
- [0286] 长度:37
- [0287] 类型:DNA
- [0288] 生物体:人工序列
- [0289] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
- [0290] 序列:13
- [0291] TAGGAGTGCAGCAAGCATATGCTCATGTGCCAAACTG
- [0292] 序列号14
- [0293] 长度:23
- [0294] 类型:DNA
- [0295] 生物体:人工序列
- [0296] 其他信息:人工序列描述:引物

- [0297] 序列:14
[0298] cCTTCAGGATTTTCACCACCACT
[0299] 序列号15
[0300] 长度:41
[0301] 类型:DNA
[0302] 生物体:人工序列
[0303] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
[0304] 序列:15
[0305] TGTAAACGACGGCCAGTtactgacacatccagcagcgtct
[0306] 序列号16
[0307] 长度:23
[0308] 类型:DNA
[0309] 生物体:人工序列
[0310] 其他信息:人工序列描述:引物
[0311] 序列:16
[0312] cagcactgagccgtcagtattct
[0313] 序列号17
[0314] 长度:37
[0315] 类型:DNA
[0316] 生物体:人工序列
[0317] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
[0318] 序列:17
[0319] TAGGAGTGCAGCAAGCATTGGAGCCTACCTGTCTGAG
[0320] 序列号18
[0321] 长度:20
[0322] 类型:DNA
[0323] 生物体:人工序列
[0324] 其他信息:人工序列描述:引物
[0325] 序列:18
[0326] tactcacAGCGAAGGGGTCT
[0327] 序列号19
[0328] 长度:38
[0329] 类型:DNA
[0330] 生物体:人工序列
[0331] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
[0332] 序列:19
[0333] TAGGAGTGCAGCAAGCATgctcctctgcgaagactctc
[0334] 序列号20
[0335] 长度:23

- [0336] 类型:DNA
[0337] 生物体:人工序列
[0338] 其他信息:人工序列描述:引物
[0339] 序列:20
[0340] aagacctccgacCTGGACTTGCT
[0341] 序列号21
[0342] 长度:41
[0343] 类型:DNA
[0344] 生物体:人工序列
[0345] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
[0346] 序列:21
[0347] TGTAAAACGACGGCCAGTAGAGGAGGGCACAGTCAAGAAAC
[0348] 序列号22
[0349] 长度:22
[0350] 类型:DNA
[0351] 生物体:人工序列
[0352] 其他信息:人工序列描述:引物
[0353] 序列:22
[0354] TTGGATATCCCATTGTTTCAT
[0355] 序列号23
[0356] 长度:40
[0357] 类型:DNA
[0358] 生物体:人工序列
[0359] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
[0360] 序列:23
[0361] TAGGAGTGCAGCAAGCATtttaacggtgttggcagagatt
[0362] 序列号24
[0363] 长度:22
[0364] 类型:DNA
[0365] 生物体:人工序列
[0366] 其他信息:人工序列描述:引物
[0367] 序列:24
[0368] AGATCCACATCCACGAAAGCCT
[0369] 序列号25
[0370] 长度:37
[0371] 类型:DNA
[0372] 生物体:人工序列
[0373] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
[0374] 序列:25

- [0375] TGTAAAACGACGGCCAGTtgcccctttaaacaccta
- [0376] 序列号26
- [0377] 长度:23
- [0378] 类型:DNA
- [0379] 生物体:人工序列
- [0380] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0381] 序列:26
- [0382] CTCAGCTTGGCCTTGCTTGACAT
- [0383] 序列号27
- [0384] 长度:39
- [0385] 类型:DNA
- [0386] 生物体:人工序列
- [0387] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
- [0388] 序列:27
- [0389] TAGGAGTGCAGCAAGCATttgccaggacccATGAGCCAG
- [0390] 序列号28
- [0391] 长度:23
- [0392] 类型:DNA
- [0393] 生物体:人工序列
- [0394] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0395] 序列:28
- [0396] AGACACGTATCCGTGATTCTAC
- [0397] 序列号29
- [0398] 长度:41
- [0399] 类型:DNA
- [0400] 生物体:人工序列
- [0401] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
- [0402] 序列:29
- [0403] TGTAAAACGACGGCCAGTtctttcatcctctgtgtctcatc
- [0404] 序列号30
- [0405] 长度:22
- [0406] 类型:DNA
- [0407] 生物体:人工序列
- [0408] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0409] 序列:30
- [0410] GGGTTTCCAGCAGGAGGTCAGA
- [0411] 序列号31
- [0412] 长度:39
- [0413] 类型:DNA

- [0414] 生物体:人工序列
- [0415] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
- [0416] 序列:31
- [0417] TAGGAGTGCAGCAAGCATttatgttcagTGCCAAGGTG
- [0418] 序列号32
- [0419] 长度:23
- [0420] 类型:DNA
- [0421] 生物体:人工序列
- [0422] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0423] 序列:32
- [0424] TGGCTGTGTGAGAAACGATGCTG
- [0425] 序列号33
- [0426] 长度:35
- [0427] 类型:DNA
- [0428] 生物体:人工序列
- [0429] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
- [0430] 序列:33
- [0431] TGTAAAACGACGGCCAGTagATCTGGGCTGGGACA
- [0432] 序列号34
- [0433] 长度:23
- [0434] 类型:DNA
- [0435] 生物体:人工序列
- [0436] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0437] 序列:34
- [0438] tgttaactatacCTGTGTGTTGG
- [0439] 序列号35
- [0440] 长度:38
- [0441] 类型:DNA
- [0442] 生物体:人工序列
- [0443] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
- [0444] 序列:35
- [0445] TAGGAGTGCAGCAAGCATttttctccgcttgcttctgc
- [0446] 序列号36
- [0447] 长度:23
- [0448] 类型:DNA
- [0449] 生物体:人工序列
- [0450] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0451] 序列:36
- [0452] AAAGAGCTGAATAGGAGGAAGTT

- [0453] 序列号37
[0454] 长度:39
[0455] 类型:DNA
[0456] 生物体:人工序列
[0457] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
[0458] 序列:37
[0459] TGTAAAACGACGGCCAGTCATCTTGGCGTTCTTCTGTGT
[0460] 序列号38
[0461] 长度:21
[0462] 类型:DNA
[0463] 生物体:人工序列
[0464] 其他信息:人工序列描述:引物
[0465] 序列:38
[0466] CTTGAGGGCAGCTGAGATGGC
[0467] 序列号39
[0468] 长度:40
[0469] 类型:DNA
[0470] 生物体:人工序列
[0471] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
[0472] 序列:39
[0473] TAGGAGTGCAGCAAGCATGCAATCCTTGATGCTCCTTGAC
[0474] 序列号40
[0475] 长度:22
[0476] 类型:DNA
[0477] 生物体:人工序列
[0478] 其他信息:人工序列描述:引物
[0479] 序列:40
[0480] CTGAGACTCTATGTCGTTGATA
[0481] 序列号41
[0482] 长度:41
[0483] 类型:DNA
[0484] 生物体:人工序列
[0485] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
[0486] 序列:41
[0487] TGTAAAACGACGGCCAGTAGAAGATCATCAAACACATCACG
[0488] 序列号42
[0489] 长度:23
[0490] 类型:DNA
[0491] 生物体:人工序列

- [0492] 其他信息:人工序列描述:引物
[0493] 序列:42
[0494] GACTTGTTGAGCAGTTGCATCAA
[0495] 序列号43
[0496] 长度:38
[0497] 类型:DNA
[0498] 生物体:人工序列
[0499] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(NED)
[0500] 序列:43
[0501] TAGGAGTGCAGCAAGCATttttgtgatctagTCTGGAG
[0502] 序列号44
[0503] 长度:22
[0504] 类型:DNA
[0505] 生物体:人工序列
[0506] 其他信息:人工序列描述:引物
[0507] 序列:44
[0508] gctcttacAGCTTCACAATCAT
[0509] 序列号45
[0510] 长度:41
[0511] 类型:DNA
[0512] 生物体:人工序列
[0513] 其他信息:人工序列描述:前尾引物(FAM)
[0514] 序列:45
[0515] TGTA AACGACGCCAGTAGAAGATCATCAAACACATCACG
[0516] 序列号46
[0517] 长度:23
[0518] 类型:DNA
[0519] 生物体:人工序列
[0520] 其他信息:人工序列描述:引物
[0521] 序列:46
[0522] GACTTGTTGAGCAGTTGCATCAA
[0523] 序列号47
[0524] 长度:22
[0525] 类型:DNA
[0526] 生物体:人工序列
[0527] 其他信息:人工序列描述:引物
[0528] 序列:47
[0529] GAACCAAACCCCTCTGTCCTG
[0530] 序列号48

[0531] 长度:22
[0532] 类型:DNA
[0533] 生物体:人工序列
[0534] 其他信息:人工序列描述:引物
[0535] 序列:48
[0536] GTAATTCACTCCGCAGGCTCAG
[0537] 序列号49
[0538] 长度:17
[0539] 类型:DNA
[0540] 生物体:人工序列
[0541] 其他信息:人工序列描述:引物
[0542] 序列:49
[0543] ggcgATGAATCCTGTAG
[0544] 序列号50
[0545] 长度:22
[0546] 类型:DNA
[0547] 生物体:人工序列
[0548] 其他信息:人工序列描述:引物
[0549] 序列:50
[0550] ATGGCATTGAGGTCACAGAGA
[0551] 序列号51
[0552] 长度:19
[0553] 类型:DNA
[0554] 生物体:人工序列
[0555] 其他信息:人工序列描述:引物
[0556] 序列:51
[0557] GTTCAAGAAGGGAGAGAGT
[0558] 序列号52
[0559] 长度:18
[0560] 类型:DNA
[0561] 生物体:人工序列
[0562] 其他信息:人工序列描述:引物
[0563] 序列:52
[0564] AAAAATTCCCACATCGTT
[0565] 序列号53
[0566] 长度:20
[0567] 类型:DNA
[0568] 生物体:人工序列
[0569] 其他信息:人工序列描述:引物

[0570] 序列:53
[0571] tgcttttgcttcagTGTATC
[0572] 序列号54
[0573] 长度:19
[0574] 类型:DNA
[0575] 生物体:人工序列
[0576] 其他信息:人工序列描述:引物
[0577] 序列:54
[0578] AATGCGTTCGAATGTAGAA
[0579] 序列号55
[0580] 长度:23
[0581] 类型:DNA
[0582] 生物体:人工序列
[0583] 其他信息:人工序列描述:引物
[0584] 序列:55
[0585] CATCTGCTTCATCCTGGTGGCTG
[0586] 序列号56
[0587] 长度:23
[0588] 类型:DNA
[0589] 生物体:人工序列
[0590] 其他信息:人工序列描述:引物
[0591] 序列:56
[0592] AATTGGGCATCTTCATCTGTAT
[0593] 序列号57
[0594] 长度:22
[0595] 类型:DNA
[0596] 生物体:人工序列
[0597] 其他信息:人工序列描述:引物
[0598] 序列:57
[0599] GACAGACTTGACCTTGAGATG
[0600] 序列号58
[0601] 长度:21
[0602] 类型:DNA
[0603] 生物体:人工序列
[0604] 其他信息:人工序列描述:引物
[0605] 序列:58
[0606] ATGTCTGCTTCGACTGGATGC
[0607] 序列号59
[0608] 长度:23

- [0609] 类型:DNA
- [0610] 生物体:人工序列
- [0611] 其他信息:人工序列描述:引物
- [0612] 序列:59
- [0613] GCCATCGAAACATGGACATACTG
- [0614] 序列号60和62(野生型Cyp17a1)
- [0615] 长度:1563bp和521aa
- [0616] 类型:cDNA(序列号:60) 和蛋白(序列号:62)
- [0617] 生物体:尼罗罗非鱼

[0618]

1	GAACCAAACCCCTCTGTCACTGATATGGCTTGGTTTTTGTGTCTGTGCGTGTTCATGGCG	60
1	-E--P--N--P--S--V--T--D--M--A--W--F--L--C--L--C--V--F--M--A-	20
61	GTGGGCCTCACTTTGTTAGCACTGCAGTTCAAGTTCAGGATGTCTGCACATGGTTCTGGG	120
21	-V--G--L--T--L--L--A--L--Q--F--K--F--R--M--S--A--H--G--S--G-	40
121	GAGCCGCCACACCTCCCTGCACTACCACTGATTGGCAGCCTGCTGAGCCTGCGGAGTGAA	180
41	-E--P--P--H--L--P--A--L--P--L--I--G--S--L--L--S--L--R--S--E-	60
181	TTACCACCGCATGTGCTTTTCAAAGAACTGCAGGTAAAATACGGACATACATACTCGCTG	240
61	-L--P--P--H--V--L--F--K--E--L--Q--V--K--Y--G--H--T--Y--S--L-	80
241	ATGATGGGCTCCACAGTGTGATTGTCATCAACCAGCATGTGCACGCCAAAGAAGTCTTG	300
81	-M--M--G--S--H--S--V--I--V--I--N--Q--H--V--H--A--K--E--V--L-	100
301	CTCAAGAAGGGAAAGACGTTTGCAGGAAGACCTAGAACTGTAACCACAGATATTCTGACT	360
101	-L--K--K--G--K--T--F--A--G--R--P--R--T--V--T--T--D--I--L--T-	120
361	AGAGATGGGAAGGACATTGCATTTGGAGACTACAGTGCTACGTGGAAGTTCCACAGGAAG	420
121	-R--D--G--K--D--I--A--F--G--D--Y--S--A--T--W--K--F--H--R--K-	140
421	ATAGTCCATGGAGCCCTGTGCATGTTTGGAGAAGGTTCTGCCTCTATTGAGAAGACCATT	480
141	-I--V--H--G--A--L--C--M--F--G--E--G--S--A--S--I--E--K--T--I-	160
481	TGTGCAGAGGCCAGTCTCTGTGCTCCGTGCTGTCTGAGGCAGCAGATGTGGGACTGGCC	540
161	-C--A--E--A--Q--S--L--C--S--V--L--S--E--A--A--D--V--G--L--A-	180
541	CTGGATCTTGCTCCTGAGCTGACTCGCGCTGTCACCAACGTTATCTGTTCTCTCTGCTTC	600
181	-L--D--L--A--P--E--L--T--R--A--V--T--N--V--I--C--S--L--C--F-	200
601	AACTCGTCCTACTGCCGAGGCGACTCAGAGTTTGAGACAATGCTGCAGTACAGCCAGGGC	660
201	-N--S--S--Y--C--R--G--D--S--E--F--E--T--M--L--Q--Y--S--Q--G-	220
661	ATTGTGGACACTGTGGCTAAAGACAGCCTGGTAGACATTTTCCCCTGGCTTCAGATCTTT	720
221	-I--V--D--T--V--A--K--D--S--L--V--D--I--F--P--W--L--Q--I--F-	240
721	CCTAATGCGGACCTACGTCTCCTAAAACATTGTGTTTCCATCAGAGACAACTTCTACAG	780
241	-P--N--A--D--L--R--L--L--K--H--C--V--S--I--R--D--K--L--L--Q-	260
781	AGGAAATTTGATGAACACAAGGTGAATTACAATGATCACGTGCAGAGAGACTTGATAGAC	840

261	-R--K--F--D--E--H--K--V--N--Y--N--D--H--V--Q--R--D--L--I--D-	280
841	GCTCTGCTAAGAGCCAAGCGCAGTGC GGAGAACAACAACACATCAGAGATAAGTGCAGAG	900
281	-A--L--L--R--A--K--R--S--A--E--N--N--N--T--S--E--I--S--A--E-	300
901	TCTGTGGGCCTGAGTGATGACCACATTCTCATGACAGTGGGAGACATCTTTGGCGCTGGC	960
301	-S--V--G--L--S--D--D--H--I--L--M--T--V--G--D--I--F--G--A--G-	320
961	GTGGAACCACTACCACTGTGCTCAAATGGGCCATAACGTACCTCATTCATCACCCAGAG	1020
321	-V--E--T--T--T--T--V--L--K--W--A--I--T--Y--L--I--H--H--P--E-	340
1021	GTGCAAAGACGTATCCAGGATGAGCTGGACAGGACGGTGGGTGACAGCCGCTCTCCTAAA	1080
341	-V--Q--R--R--I--Q--D--E--L--D--R--T--V--G--D--S--R--S--P--K-	360
1081	CTCACCGACAGAGGCAGTCTGCCTTATCTGGAGGCCACCATAGGGAAGTATTGCGGATT	1140
361	-L--T--D--R--G--S--L--P--Y--L--E--A--T--I--R--E--V--L--R--I-	380
1141	CGCCCCGTGGCACCCTACTCATCCCCATGTGGCTCTCTGTGACACCAGCATTTGGAGAT	1200
381	-R--P--V--A--P--L--L--I--P--H--V--A--L--C--D--T--S--I--G--D-	400
[0619]		
1201	TTCACAGTGAGAAAAGGAAGCTCGAGTCATTATCAACCTGTGGGCTCTGCACCATGATGAG	1260
401	-F--T--V--R--K--G--T--R--V--I--I--N--L--W--A--L--H--H--D--E-	420
1261	AAGGAGTGGAGAAGCAAGAGCGGTTTGACCCGTGGCCGGTTCTTGAAAAGTGAAGGCACA	1320
421	-K--E--W--K--N--P--E--R--F--D--P--G--R--F--L--K--S--E--G--T-	440
1321	GGACTGACAATCCCATCACCCAGCTACCTGCCCTTTGGTGCTGGGCTGAGAGTATGTTTA	1380
441	-G--L--T--I--P--S--P--S--Y--L--P--F--G--A--G--L--R--V--C--L-	460
1381	GGTGAGGCCTTGGCCAAGATGGAGCTCTTTCTCTCCTGTCTGATCCTGCAGCGCTTC	1440
461	-G--E--A--L--A--K--M--E--L--F--L--F--L--S--W--I--L--Q--R--F-	480
1441	ACTCTGTCTGTCCCACAGGCCACAGTCTGCCAGTCTGGAGGGAAAAGTTTGGAGTGGTC	1500
481	-T--L--S--V--P--P--G--H--S--L--P--S--L--E--G--K--F--G--V--V-	500
1501	CTGCAGACAGCCAAGTACAAGGTGAATGCCACAATCAGACCAGACTGGGCAAGACATAAG	1560
501	-L--Q--T--A--K--Y--K--V--N--A--T--I--R--P--D--W--A--R--H--K-	520
1561	TGC	1563
521	-C-	521

[0620] 序列号61和63(Cyp17a1突变等位基因-16nt缺失)

[0621] 长度:1563bp和44aa

[0622] 类型:cDNA(序列号:61) 和蛋白(序列号:63)

[0623] 生物体:尼罗罗非鱼

	1	GAACCAAACCCCTCTGTCTACTGATATGGCTTGGTTTTTGTGTCTGTGCGGTGGGCCTCAC	60
	1	-E--P--N--P--S--V--T--D--M--A--W--F--L--C--L--C--G--G--P--H--	20
[0624]	61	TTGTGTAGCACTGCAGTTCAAGTTCAGGATGTCTGCACATGGTTCTGGGGAGCCACCTCC	120
	21	-F--V--S--T--A--V--Q--V--Q--D--V--C--T--W--F--W--G--A--T--S--	40
	121	CTGCACTACCACCTGATTGGCAGCCTGCTGAGCCTGCGGAGTGAATTACCACCGCATGTGC	180
	41	-L--H--Y--H--*-	44
[0625]	序列号65和68(野生型Cyp19a1a)		
[0626]	长度:1707bp和511aa		
[0627]	类型:cDNA(序列号:65)和蛋白(序列号:68)		
[0628]	生物体:尼罗罗非鱼		
	1	GCGATGAATCCTGTAGGCTTAGACGCCGTGGTGGCAGATCTCTCTGTGACCTCAAATGCC	60
		...-M--N--P--V--G--L--D--A--V--V--A--D--L--S--V--T--S--N--A--	19
	61	ATCCAATCGCATGGGATATCAATGGCAACCAGAACGCTGATACTGCTCGTCTGTCTGCTG	120
	20	-I--Q--S--H--G--I--S--M--A--T--R--T--L--I--L--L--V--C--L--L--	39
	121	TTGGTTGCCTGGAGTCACACGGACAAGAAAATTGTGCCAGGTCCTTCTTTCTGTTTGGGT	180
	40	-L--V--A--W--S--H--T--D--K--K--I--V--P--G--P--S--F--C--L--G--	59
	181	TTGGGCCCACCTTCTGTCTATCTGAGATTTATCTGGACTGGCATAGGCACAGCCAGCAAC	240
	60	-L--G--P--L--L--S--Y--L--R--F--I--W--T--G--I--G--T--A--S--N--	79
[0629]	241	TACTACAATAACAAGTATGGAGACATTGTTAGAGTCTGGATCAACGGAGAAGAGACGCTC	300
	80	-Y--Y--N--N--K--Y--G--D--I--V--R--V--W--I--N--G--E--E--T--L--	99
	301	ATACTAAGCAGATCTTCAGCAGTGCACCATGTGCTGAAGAACGGAAACTATACTTCACGT	360
	100	-I--L--S--R--S--S--A--V--H--H--V--L--K--N--G--N--Y--T--S--R--	119
	361	TTTGGGAGCATCCAGGGACTCAGCTGCCTCGGCATGAACGAGAGAGGCATCATATTCAAC	420
	120	-F--G--S--I--Q--G--L--S--C--L--G--M--N--E--R--G--I--I--F--N--	139
	421	AACAACGTAACCTCTGTGGAAAAAGATACGCACCTATTTTGCTAAAGCTCTGACAGGCCCA	480
	140	-N--N--V--T--L--W--K--K--I--R--T--Y--F--A--K--A--L--T--G--P--	159
	481	AATTTGCAGCAGACGGCGGATGTTTGCCTCTCCTCCATACAGGCTCACCTGGACCACCTG	540
	160	-N--L--Q--Q--T--A--D--V--C--V--S--S--I--Q--A--H--L--D--H--L--	179

541	GACAGCCTGGGACACGTTGATGTCCTCAATTTGCTGCGCTGCACCGTGCTGGACATCTCT	600
180	-D--S--L--G--H--V--D--V--L--N--L--L--R--C--T--V--L--D--I--S-	199
601	AACCGACTCTTCCTGGACGTACCTCTCAATGAGAAAGAGCTGATGCTGAAGATTCAAAAG	660
200	-N--R--L--F--L--D--V--P--L--N--E--K--E--L--M--L--K--I--Q--K-	219
661	TATTTTCACACATGGCAGGATGTGCTTATCAAACCTGACATCTACTTCAAGTTCGGCTGG	720
220	-Y--F--H--T--W--Q--D--V--L--I--K--P--D--I--Y--F--K--F--G--W-	239
721	ATTCACCACAGGCACAAGACAGCAACCCAGGAGTTACAAGATGCCATTAAACGTCTTGTA	780
240	-I--H--H--R--H--K--T--A--T--Q--E--L--Q--D--A--I--K--R--L--V-	259
781	GATCAAAAGAGGAAAAATATGGAGCAGGCAGATACGCTGGACAACATCAACTTCACGGCA	840
260	-D--Q--K--R--K--N--M--E--Q--A--D--T--L--D--N--I--N--F--T--A-	279
841	GAGCTCATATTTGCACAAAACCGGTGAGCTGTCTGCTGAGAATGTGACGCAGTGCCTG	900
280	-E--L--I--F--A--Q--N--H--G--E--L--S--A--E--N--V--T--Q--C--V-	299
901	CTGGAGATGGTGATTGCAGCTCCGGACACTCTGTCCCTCAGTCTCTTCTTCATGCTTCTG	960
300	-L--E--M--V--I--A--A--P--D--T--L--S--L--S--L--F--F--M--L--L-	319
[0630]	961 CTCTCAAACAAAACCCGCACGTGGAGCCGAGCTGCTACAGGAGATAGACGCTGTTGTG	1020
320	-L--L--K--Q--N--P--H--V--E--P--Q--L--L--Q--E--I--D--A--V--V-	339
1021	GGTGAGAGACAGCTTCAGAACCAGGATCTTCACAAGCTGCAGGTGATGGAGAGCTTCATC	1080
340	-G--E--R--Q--L--Q--N--Q--D--L--H--K--L--Q--V--M--E--S--F--I-	359
1081	TACGAATGCTTGGCTTCCACCCAGTGGTGGACTTCACCATGCGTCGAGCCCTGTCTGAT	1140
360	-Y--E--C--L--R--F--H--P--V--V--D--F--T--M--R--R--A--L--S--D-	379
1141	GACATCATAGAAGGCTACAGGATCTCGAAGGGCACAAACATCATTCTGAACACAGGCCGA	1200
380	-D--I--I--E--G--Y--R--I--S--K--G--T--N--I--I--L--N--T--G--R-	399
1201	ATGCACCGCACCGAGTTTTTCCTCAAAGCCAATCAATTTAACCTGGAACACTTTGAAAAC	1260
400	-M--H--R--T--E--F--F--L--K--A--N--Q--F--N--L--E--H--F--E--N-	419
1261	AATGTTCTCGGCGCTACTTTTCAGCCGTTCCGGTTCAGGCCCTCGCGCATGCATTGGCAAG	1320
420	-N--V--P--R--R--Y--F--Q--P--F--G--S--G--P--R--A--C--I--G--K-	439
1321	CACATCGCCATGGTGATGATGAAATCCATTTTGGTGACACTGCTGTCTCAGTACTCTGTT	1380
440	-H--I--A--M--V--M--M--K--S--I--L--V--T--L--L--S--Q--Y--S--V-	459
1381	TGTACTCACGAGGGCCCGATCCTGGACTGCCTCCCACAAACCAACAACCTTTCCCAGCAG	1440
460	-C--T--H--E--G--P--I--L--D--C--L--P--Q--T--N--N--L--S--Q--Q-	479

1441 CCTGTAGAGCACCAGCAGGCGGAGACTGAACATCTCCACATGAGGTTCTTACCCAGGCAG 1500
480 -P--V--E--H--Q--Q--A--E--T--E--H--L--H--M--R--F--L--P--R--Q- 499

1501 AGAAGCAGCTGTCAAACCTCCGAGACCCGAACCTTTAGCTGTACCTGCACTTTTGTATA 1560
500 -R--S--S--C--Q--T--L--R--D--P--N--L--*-..... 511

[0631]

1561 CTTAATTTGTATAATCTTATAACGACACACAGCTAGCCTTTATATTTGATAGACGCAA 1620
.....
1621 GATTGTATTTGTACTCAAACCTGTATGCATGATGTGAAATGTACATTAAACCTGCTAACA 1680
.....
1681 CTGAAATAAATGTAAGTTATTGTGTCA 1707
.....

[0632] 序列号66和69(Cyp19a1a突变等位基因-7nt缺失)

[0633] 长度:1707bp和12aa

[0634] 类型:cDNA(序列号:66)和蛋白(序列号:69)

[0635] 生物体:尼罗罗非鱼

[0636] 1 GCGATGAATCCTGTAGGCTTAGACTGGCAGATCTCTCTGTGACCTCAAATGCCATCCAAT 60
...-M--N--P--V--G--L--D--W--Q--I--S--L--*- 12

[0637] 序列号67和70(Cyp19a1a突变等位基因-10nt缺失)

[0638] 长度:1707bp和11aa

[0639] 类型:cDNA(序列号:67)和蛋白(序列号:70)

[0640] 生物体:尼罗罗非鱼

[0641] 1 GCGATGAATCCTGTAGGCTGGTGGCAGATCTCTCTGTGACCTCAAATGCCATCCAATCGC 60
...-M--N--P--V--G--W--W--Q--I--S--L--*- 11

[0642] 序列号71和73(野生型Tjp1a)

[0643] 长度:6674bp和1652aa

[0644] 类型:cDNA(序列号:71)和蛋白(序列号:73)

[0645] 生物体:尼罗罗非鱼

1	AAAGAGGAAAAACAATGCATCATATAACTTTATAAGTAAGAGTGCGGCGATGGAGGAAACC	60
1	-K--E--E--N--N--A--S--Y--N--F--I--S--K--S--A--A--M--E--E--T-	20
61	GTCATATGGGAACAGCACACAGTTACCCTTCACAGGGCCCCAGGATTTGGGTTTGGCATT	120
21	-V--I--W--E--Q--H--T--V--T--L--H--R--A--P--G--F--G--F--G--I-	40
121	GCCATCTCGGGTGGGCGAGACAACCCTCATTTCAGAGTGGTGAAACATCTATTGTAATA	180
41	-A--I--S--G--G--R--D--N--P--H--F--Q--S--G--E--T--S--I--V--I-	60
181	TCGGATGTGCTGAAAGGAGGTCCTGCAGAGGGTCTGCTACAAGAAAATGATCGAGTAGTA	240
61	-S--D--V--L--K--G--G--P--A--E--G--L--L--Q--E--N--D--R--V--V-	80
241	ATGGTCAATGCAGTCTCTATGGACAATGTAGAGCATGCCTATGCTGTTCAACAACCTCGA	300
81	-M--V--N--A--V--S--M--D--N--V--E--H--A--Y--A--V--Q--Q--L--R-	100
301	AAGAGTGGCAAAAATGCAAAGATAACTATTCGCAGAAAAAGGAAAGTACAAATCCCAGCG	360
101	-K--S--G--K--N--A--K--I--T--I--R--R--K--R--K--V--Q--I--P--A-	120
[0646]	361 TCACGGCACGGGGACAGGGAGACGATGTCTGAGCACGAGGAGGAGACAGCGATGAGGCT	420
121	-S--R--H--G--D--R--E--T--M--S--E--H--E--E--E--D--S--D--E--A-	140
421	GATGCTTACGATCACCGCAGTGGACGTGGTGGACAAAACGATCGGGAGCGTAGCAGCAGT	480
141	-D--A--Y--D--H--R--S--G--R--G--G--Q--N--D--R--E--R--S--S--S-	160
481	GGGAGGCGGGATCACAGTGCCTCACAGGAGAGGAGCATCTCACCACGCTCCGATCGCCGA	540
161	-G--R--R--D--H--S--A--S--Q--E--R--S--I--S--P--R--S--D--R--R-	180
541	TCACAAGCCTCTTCTGCTCCACCCAGGCCCTCCAAGGTCACTCTTGTCAAGTCCCGCAA	600
181	-S--Q--A--S--S--A--P--P--R--P--S--K--V--T--L--V--K--S--R--K-	200
601	AACGAAGAATATGGACTGCGGCTGGCCAGCCATATCTTTGTGAAGGACATCTCTCCAGAG	660
201	-N--E--E--Y--G--L--R--L--A--S--H--I--F--V--K--D--I--S--P--E-	220
661	AGCCTTGCAGCCAGAGATGGAACATTTCAGGAGGGAGATGTTGTACTTAAGATTAACGGC	720
221	-S--L--A--A--R--D--G--N--I--Q--E--G--D--V--V--L--K--I--N--G-	240
721	ACAGTTACAGAGAACCTATCACTGACAGATGCCAAGAAGCTGATTGAGAGGTCAAAGGGC	780
241	-T--V--T--E--N--L--S--L--T--D--A--K--K--L--I--E--R--S--K--G-	260

	781	AAGCTGAAGATGGTAGTGCAGAGAGACGAGCGGGCCACGCTGCTCAATATTCTGACCTT	840
	261	-K--L--K--M--V--V--Q--R--D--E--R--A--T--L--L--N--I--P--D--L-	280
	841	GACGACAGCATCCCATCAGCCAATAACTCAGACAGAGATGACATTTCAGAGATACATTCA	900
	281	-D--D--S--I--P--S--A--N--N--S--D--R--D--D--I--S--E--I--H--S-	300
	901	CTGACATCCGATCATTTCCAATCGATCCCATGGGAGAGGAAGTCAATCCCATTTCGCTGAC	960
	301	-L--T--S--D--H--S--N--R--S--H--G--R--G--S--Q--S--H--S--P--D-	320
	961	AGGGTTGAAACATCCGAGCATCTCCGCCACTCACC GCGGCAGATCAGCAATGGCAGTAAT	1020
	321	-R--V--E--T--S--E--H--L--R--H--S--P--R--Q--I--S--N--G--S--N-	340
	1021	GGATTCTCTGGGAAAGAGCTGAGGAATTAATCAAACAGGAATGGGTGGTGAAACAGGAA	1080
	341	-G--F--L--W--E--R--A--E--E--L--I--K--Q--E--W--V--V--K--Q--E-	360
	1081	TGTTATTTTGCTGTGCCATACTATAAAATGTGTAATAACCGTGACAGTTTGGGCAAAA	1140
	361	-C--Y--F--A--C--A--H--T--I--K--C--V--I--T--V--T--V--W--A--K-	380
	1141	AAACCCCAAAACAGTAACATGCCAGAACCAAAGCCAGTTTATGCACAGCCTGGTCAGCCT	1200
	381	-K--P--Q--N--S--N--M--P--E--P--K--P--V--Y--A--Q--P--G--Q--P-	400
[0647]	1201	GACGTGGACCTGCCTGTCAGCCCATCTGATGCCCTGTACCCAGTGCTGCACATGATGAC	1260
	401	-D--V--D--L--P--V--S--P--S--D--A--P--V--P--S--A--A--H--D--D-	420
	1261	AGCATTTCTCAGACCAAGTATGAAGCTGGTCAAGTTCAAGAAGGGAGAGAGTGTCTGCTG	1320
	421	-S--I--L--R--P--S--M--K--L--V--K--F--K--K--G--E--S--V--G--L-	440
	1321	AGGTTAGCAGGCGGAAACGATGTGGGAATTTTGTGGCAGGAGTTTGGGAAGACAGCCCC	1380
	441	-R--L--A--G--G--N--D--V--G--I--F--V--A--G--V--L--E--D--S--P-	460
	1381	GCAGCCAAGGAGGGGCTGGAAGAGGGAGACCAGATTCTCAGGGTGAACAACGTGGACTTT	1440
	461	-A--A--K--E--G--L--E--E--G--D--Q--I--L--R--V--N--N--V--D--F-	480
	1441	GCTAACATCATCCGGAAGAGGCTGTGCTTTTCTGCTCGATCTTCCAAAAGGAGATGAC	1500
	481	-A--N--I--I--R--E--E--A--V--L--F--L--L--D--L--P--K--G--D--D-	500
	1501	GTTACTATTCTGGCTCAGAAGAAAAGGATGTGTATCGAAGGATAGTGAATCAGACGTG	1560
	501	-V--T--I--L--A--Q--K--K--K--D--V--Y--R--R--I--V--E--S--D--V-	520
	1561	GGTGACTCCTTCTACATTCTGAACGCATTTTGAATATGAAAAAGAGTCACCGTATGGGCTG	1620
	521	-G--D--S--F--Y--I--R--T--H--F--E--Y--E--K--E--S--P--Y--G--L-	540
	1621	AGCTTTAACAAGGGAGAGGTTTTCCGTGTGGTAGACACACTCTATAATGGCAAATTAGGC	1680
	541	-S--F--N--K--G--E--V--F--R--V--V--D--T--L--Y--N--G--K--L--G-	560

1681	TCCTGGCTCGCTATCCGTATCGGCAAGAACCACCAGGAAGTGGAAGAGGCATAATCCCC	1740
561	-S--W--L--A--I--R--I--G--K--N--H--Q--E--V--E--R--G--I--I--P-	580
1741	AACAAGAATAGAGCCGAGCAGCTATCCAGTGTGCAGTACACCCTTCCTAAAACGCCTGGG	1800
581	-N--K--N--R--A--E--Q--L--S--S--V--Q--Y--T--L--P--K--T--P--G-	600
1801	GGCGACAGAGCTGACTTCTGGAGGTTTCAGAGGGCTGCGGAGTTCCAAGAGGAATTTGCGG	1860
601	-G--D--R--A--D--F--W--R--F--R--G--L--R--S--S--K--R--N--L--R-	620
1861	AAAAGCAGGGAGGACCTGTTCGGCCCAGCCTGTTTCAGACCAAGTTCCCTGCCTATGAGAGG	1920
621	-K--S--R--E--D--L--S--A--Q--P--V--Q--T--K--F--P--A--Y--E--R-	640
1921	GTGGTGCTGAGGGAAGCTGGGTTCTGAGGCCTGTGGTTATCTTTGGGCCGATTGCAGAC	1980
641	-V--V--L--R--E--A--G--F--L--R--P--V--V--I--F--G--P--I--A--D-	660
1981	GTGGCCCCGAGAGAACTGGCCAGGGAGGTGCCCGAAGTGTTCGAGCTAGCCAAGAGTGAA	2040
661	-V--A--R--E--K--L--A--R--E--V--P--E--V--F--E--L--A--K--S--E-	680
2041	CCCAGGGATGCAGGAACAGACCAGAAGAGCTCTGGCATCATCCGCCTGCACACCATTAAG	2100
681	-P--R--D--A--G--T--D--Q--K--S--S--G--I--I--R--L--H--T--I--K-	700
[0648]	2101 CAGATCATTGATCGAGACAAGCATGCAGTGCTGGATATAACCCCGAATGCAGTGGACCGA	2160
701	-Q--I--I--D--R--D--K--H--A--V--L--D--I--T--P--N--A--V--D--R-	720
2161	CTGAACCTACGCTCAGTGGTATCCAATTGTGGTGTTCCTCAACCCGGACACCAAGCAGGGC	2220
721	-L--N--Y--A--Q--W--Y--P--I--V--V--F--L--N--P--D--T--K--Q--G-	740
2221	ATCAAGAACATGAGGACACGGCTCTGCCCCGAGTCTAGGAAGAGCGCGAGAAAGCTTTAT	2280
741	-I--K--N--M--R--T--R--L--C--P--E--S--R--K--S--A--R--K--L--Y-	760
2281	GATCGAGCCCTCAAGTTAAGAAAGAACAACCACCACCTCTTCACCACAACCATTAACCTG	2340
761	-D--R--A--L--K--L--R--K--N--N--H--H--L--F--T--T--T--I--N--L-	780
2341	AACAACATGAACGATGGTTGGTTTGGAGCACTGAAAGAAATCATCCATCAGCAGCAGAAC	2400
781	-N--N--M--N--D--G--W--F--G--A--L--K--E--I--I--H--Q--Q--Q--N-	800
2401	CAGCTGGTGTGGGTTTCAGAGGGCAAGGCTGATGGAGTTGGCGACGATGACCTGGACATC	2460
801	-Q--L--V--W--V--S--E--G--K--A--D--G--V--G--D--D--D--L--D--I-	820
2461	CACGACGACCGCCTTTCTACCTGTTCGGCGCCAGGCAGTGAGTATTCATGTACAGCACC	2520
821	-H--D--D--R--L--S--Y--L--S--A--P--G--S--E--Y--S--M--Y--S--T-	840
2521	GACAGCCGCCACACCTCCGATTACGAGGACACGGACACAGAGGGAGGAGCCTACACCGAC	2580

841	-D--S--R--H--T--S--D--Y--E--D--T--D--T--E--G--G--A--Y--T--D-	860
2581	CAGGAGCTGGATGAAACGCTGAACGATGACGTGGGTCCACCCACGGAGCCTGCCATCACG	2640
861	-Q--E--L--D--E--T--L--N--D--D--V--G--P--P--T--E--P--A--I--T-	880
2641	CGGTCCTCTGAGCCTGTCCGTGAGGACCCGCTGTTCATCCAAGAGCCCCCTGGCTATGTC	2700
881	-R--S--S--E--P--V--R--E--D--P--P--V--I--Q--E--P--P--G--Y--V-	900
2701	AGCTACCCGCACACAGTGCAGCCGGACCCCTGAACCGCATCGACCCGGCTGGTTTCAAG	2760
901	-S--Y--P--H--T--V--Q--P--D--P--L--N--R--I--D--P--A--G--F--K-	920
2761	GCACCAGCGCCGACGAGATGTTTCAGAAGGATCCGTACAGCACAGACAACATAGGCAGA	2820
921	-A--P--A--P--Q--Q--M--F--Q--K--D--P--Y--S--T--D--N--I--G--R-	940
2821	GGTGGTCACGGCATGAAGCCTGTGACGTACAACCCCTCAGCAGGGGTATCACCCCGACGAG	2880
941	-G--G--H--G--M--K--P--V--T--Y--N--P--Q--Q--G--Y--H--P--D--E-	960
2881	CAGCCATACAGAGATTACGATCACCCACCCAGCCGGTATGACATCAGCAGCAGTGGTGTC	2940
961	-Q--P--Y--R--D--Y--D--H--P--P--S--R--Y--D--I--S--S--S--G--V-	980
2941	GGCGGTGGCTACCAGGAGCCAAAGTACCGTAACTATGAGAGCTATGAGAACAGCGTGCCT	3000
[0649] 981	-G--G--G--Y--Q--E--P--K--Y--R--N--Y--E--S--Y--E--N--S--V--P-	1000
3001	CACTACGACCAGCAACCGTGAACCCCTACAACCAGCCGTTCTCCACTGCCAACCCAG	3060
1001	-H--Y--D--Q--Q--P--W--N--P--Y--N--Q--P--F--S--T--A--N--T--Q-	1020
3061	GCCTACGATCCCCGTCCTCCTTACGGTGAGGGCCCCGACTCTCATTACACCCCTCCCTG	3120
1021	-A--Y--D--P--R--P--P--Y--G--E--G--P--D--S--H--Y--T--P--P--L-	1040
3121	CGCTACGACGAGCCGCCACCTCAGCAGGGATTGACGGACGGCCTCGCTACGGCAAACCG	3180
1041	-R--Y--D--E--P--P--P--Q--Q--G--F--D--G--R--P--R--Y--G--K--P-	1060
3181	ACAGTTTCAGCACCTGTCCGTTACGATGATCTTCGCCTCCCCCTCAGCCGTCTGAATTG	3240
1061	-T--V--S--A--P--V--R--Y--D--D--L--P--P--P--P--Q--P--S--E--L-	1080
3241	CACTATGACCCAAATTCTCACCTGAGCACATACCCCTCAGCTGCCCCGCTCACCAGAACCC	3300
1081	-H--Y--D--P--N--S--H--L--S--T--Y--P--S--A--A--R--S--P--E--P-	1100
3301	GCTGCCCAGCGACCCGCTATAACCAGGGACCAGCATCGCAGCAGAAAGGTTACAAACCT	3360
1101	-A--A--Q--R--P--A--Y--N--Q--G--P--A--S--Q--Q--K--G--Y--K--P-	1120
3361	CAGCAGTACGATCCTGCTCCTGTGAACCTCTGAATCCAGCCCCAGCCTTCATAAAGTCGAG	3420
1121	-Q--Q--Y--D--P--A--P--V--N--S--E--S--S--P--S--L--H--K--V--E-	1140

3421	ACGCCCTCACCTTCACCTGCTGATGTTCCAAAAGCTGCACCTGCAAGAGATGAGCAGCAG	3480
1141	-T--P--S--P--S--P--A--D--V--P--K--A--A--P--A--R--D--E--Q--Q-	1160
3481	GAGGAGGATCCAGCCATGCGGCCTCAGTCAGTACTGACGAGGGTCAAAATGTTTGAGAAC	3540
1161	-E--E--D--P--A--M--R--P--Q--S--V--L--T--R--V--K--M--F--E--N-	1180
3541	AAACGCTCTGTGTCCATGGACCGAGCCAGAGATGCCGGGGATTTCATTGGGAATAAGGCA	3600
1181	-K--R--S--V--S--M--D--R--A--R--D--A--G--D--S--F--G--N--K--A-	1200
3601	GCCGATTGCCCCTTGAAAGCTGGTGGAGTAATCCCTAAAGCAAATCTCTGAGCAACCTG	3660
1201	-A--D--L--P--L--K--A--G--G--V--I--P--K--A--N--S--L--S--N--L-	1220
3661	GATCAAGAGAAGACCTTTAGCAGAGGGCCAGAGCCTCAGAAGCCTCAGTCCAAGGGATCC	3720
1221	-D--Q--E--K--T--F--S--R--G--P--E--P--Q--K--P--Q--S--K--G--S-	1240
3721	GATGACATCGTGCCTCCAACCATTTATGACCCTGATGAGGATGAGGACTACTACAGGAAA	3780
1241	-D--D--I--V--R--S--N--H--Y--D--P--D--E--D--E--D--Y--Y--R--K-	1260
3781	CAGTTGTCTTACTTTGACAGACTGCAGACTGGCTCCAATAAAACCCCAACCACAAGCACAG	3840
1261	-Q--L--S--Y--F--D--R--L--Q--T--G--S--N--K--P--Q--P--Q--A--Q-	1280
[0650]	3841 TCCAGCCACAGCTTCCCCAGCCATTATACACATTTTGGATATTCAAGTGTCTTTCTTTTC	3900
1281	-S--S--H--S--F--P--S--H--Y--T--H--F--G--Y--S--S--V--F--L--F-	1300
3901	TTTTCTTAATGATGGACTCTGTGGAGAAACCAAGCCCACTGGAGAAAAATATGAACCA	3960
1301	-F--S--L--M--M--D--S--V--E--K--P--S--P--L--E--K--K--Y--E--P-	1320
3961	GTTCCCAAGTGACACCAGCTGTGCCACCGCCACGCTGCCCAAGCCCTCACCTGATGGT	4020
1321	-V--P--Q--V--T--P--A--V--P--P--A--T--L--P--K--P--S--P--D--G-	1340
4021	AAAATTGACTGTAGTCAGGATTTTATCTCATCTCTTTGACTGATGTGCGTTGCTCTTCC	4080
1341	-K--I--D--C--S--Q--D--F--Y--L--I--S--L--T--D--V--R--C--S--S-	1360
4081	ACAGCCAAACCTCCTGCTCGAGAGGACACGGTCCAGACCAACTTTCTTCCTCACAAGAGC	4140
1361	-T--A--K--P--P--A--R--E--D--T--V--Q--T--N--F--L--P--H--K--S-	1380
4141	TTCCCTGAGAAGTCTCCAGTCAATGGCACCAGTGAACAGCCTCCAAAGACGGTCACTAGC	4200
1381	-F--P--E--K--S--P--V--N--G--T--S--E--Q--P--P--K--T--V--T--S-	1400
4201	ACCGGGGGTTTGCCACATCCACCTACAACCGCTTTGCGCCCAAGCCCTACACCTCCTCT	4260
1401	-T--G--G--L--P--T--S--T--Y--N--R--F--A--P--K--P--Y--T--S--S-	1420
4261	GCCAAGCCTTTTTCGCGCAAGTTCGACAGTCCTAAATTCAACCACAACCTCCTGTCCAAT	4320
1421	-A--K--P--F--S--R--K--F--D--S--P--K--F--N--H--N--L--L--S--N-	1440

4321	GACAAGCCTGAGAGTGCTCCCAAGGGACGGAGCTCGAGTCCGGTAAAGCCTCAGGTACCC	4380
1441	-D--K--P--E--S--A--P--K--G--R--S--S--S--P--V--K--P--Q--V--P-	1460
4381	CCACAGCCCCAGAACGCAGACCAAGACAGTGGCCTGGACACTTTCACACGCACAACGGAC	4440
1461	-P--Q--P--Q--N--A--D--Q--D--S--G--L--D--T--F--T--R--T--T--D-	1480
4441	CCCCGATCCAAATACCAGCAGAACACGTAAACGCCGTGCCCAAGGCCATCCCTGTGAGC	4500
1481	-P--R--S--K--Y--Q--Q--N--N--V--N--A--V--P--K--A--I--P--V--S-	1500
4501	CCCAGTGCCCTAGAGGATGATGAAGATGAAGACGAAGGTCACACTGTGGTGGCAACAGCT	4560
1501	-P--S--A--L--E--D--D--E--D--E--D--E--G--H--T--V--V--A--T--A-	1520
4561	CGTGGCATCTTCAACTCTAACGGTGGCGTTCTGAGCTCCATCGAGACAGGTGTCAGCATC	4620
1521	-R--G--I--F--N--S--N--G--G--V--L--S--S--I--E--T--G--V--S--I-	1540
4621	ATTATCCACAGGGTGCCATCCCCGACGGCGTGGAGCAAGAGATTACTTCAAGGTCTGT	4680
1541	-I--I--P--Q--G--A--I--P--D--G--V--E--Q--E--I--Y--F--K--V--C-	1560
4681	CGAGACAACAGCATCCTGCCGCCACTCGACAAGGAGAAAGGAGAGACTCTGCTCAGCCCT	4740
1561	-R--D--N--S--I--L--P--P--L--D--K--E--K--G--E--T--L--L--S--P-	1580
[0651]	4741 CTGGTGATGTGTGGACCTCACGGCCTAAAGTTCTGAAGCCTGTGGAGCTACGTTACCT	4800
1581	-L--V--M--C--G--P--H--G--L--K--F--L--K--P--V--E--L--R--L--P-	1600
4801	CACTGTGCGTCAATGACCCCTGATGGTTGGTCTTTTGTCTCTAAATCCTCCGACTCCTCG	4860
1601	-H--C--A--S--M--T--P--D--G--W--S--F--A--L--K--S--S--D--S--S-	1620
4861	TCGGGTGATCCAAAAGCTGGCAGAACAAGTCTCTCACC GGAGACCCCAACTACCTGGTG	4920
1621	-S--G--D--P--K--S--W--Q--N--K--S--L--T--G--D--P--N--Y--L--V-	1640
4921	GGAGCCAACTGTGTCTCTGTGCTCATTGACCACTTTTAAAGAAGAAGCAGCAGGTGTGAT	4980
1641	-G--A--N--C--V--S--V--L--I--D--H--F--*-.....	1652
4981	GTTACTGAATGTGGAAGAATGGCGGATGAAATGAAGACGATGGAAACGCACGCACGCAAA	5040
5041	CACACACATATACCACTACACACACACACACTGACAGACGCAC'TCCAAGCAAACCAAC	5100
5101	ACACAGCATAGAGTATGAAGAAGACCCAGACAGTGCTGGACGAAGGAGAGACACCAATGA	5160
5161	TCGTTACGAGCTGTTCTTTAAACTCAATTTCAAAGTTTGTATGTAAAATGATGCATGCC	5220
5221	AACGTCAC'TGACGATTGACACTTATATATAAAGCAATGTTTAATGTAAATTTTCTTTTTT	5280

[0652]

5281 CTTTTTTTACAAAAGTATAGATGGATGTATGGCTTTTGAGGCAGCATACATGCTTGAAAA 5340
.....
5341 ATCTGTGTCAATGTATTTATGCTATATATGCCTACAGTATATATAGAAGAATAGAGAAGA 5400
.....
5401 AATTGGACTCGAATTCGATCGCCAGTCAACATCTTGTGTGTTTTTTCAGTTCAGGGGACTG 5460
.....
5461 GATTTTTTGTGTTGTGTTGTGTTGTGTTTTTTCCCTTCCACATTGAAGGAATCTTACTGA 5520
.....
5521 AGGTTTGATACAGTTGGTTTAAGGAGGTGGCAAGACATGAGCTGGACATGAACCCAAGCA 5580
.....
5581 GCAGCAACAGCACACTTTTAGAGACGTTCTTCTACACTTCTCACTTTGTTCTTCTCTTTT 5640
.....
5641 CTTACCTTTTGTAGCTTCTCTCTTACTGAGCACCACCTCTCTCCTTCCAGCCTGAGGGA 5700
.....
5701 GATCTATGCATGTTCTTTACTCAGGTCCAGTAGCCTCCTCGGTTCTTCTCCTCACATCTAC 5760
.....
5761 TTAATATCTTTTCTTCTCTGTGCACTCTTTGCACTCACACAAATAAGCAGTGATGCCTT 5820
.....
5821 ATCTGCAGATTATTCACCTTTTCATTAAGAAAAAAGTAAGTTATGATAAATTATGGTAT 5880
.....
5881 AATGTCATTTGTTTTGCCATTTTTTGTGAACCTCTGTATAAATAAACTTGGGTTTAGC 5940
.....
5941 ACACGCAGAAACAGTCGATAAAAGATAACAAAGGTATGCTCTTCTTTTATCTGCTATGCA 6000
.....
6001 TTGCTTAAAAACAAAAACCATCAGAGAAGAAGTGGCTGTAAATAAAGCTAGCATATTGC 6060
.....
6061 CTTGTTTCTTTTTTGTGTAATGAACTTTTTGTATGTCCTTTCTTTTTTGTATAAACTT 6120
.....
6121 AGAGAAAAATGTTTTAAAAAAGCAGAAGGAAGTGAAAGTGGTTATCTTTGTATTATGGG 6180
.....
6181 CATACCTTCAAGCCTTTGAATTGTAACTTAACAATAATACATCACACCTTTTCTACCGAT 6240
.....
6241 ATGTTGCCGCGCTATTTTACCGTCTCAAAAAGGTCGTCTTTTTTTATTTTTTATTTCTAT 6300
.....
6301 TTTTATTACTTTGTCCACGTAGGGTTAAGGAAAGTATTTGCGGCTCAGATGCATTTAAAA 6360
.....
6361 CATCTTCATTTGGAAGGGTGTGCTCTCAAAGTGTCCTCTCACTGATTTCTGATACTGGA 6420
.....
6421 TGCTATATTGTGTGCCCTTAAATGTATTTTTGTACTAATAGACAATATATTACGTATGGC 6480
.....
6481 ACACCACTACTGTTTTACTTTTAGATATAACACGGCTTTATTGGATATTAGCTCTTCACT 6540
.....
6541 TGTGGCTGACTTTTTTTTTTTTTCCCTCTGCAACACAATTTTAAGTATACCACTGTATTA 6600
.....

	6601 ATAAATAAAATCATTTTTTAAATTAAAGAGTGTGTAAGGATTTTTTATTTTTTTTACCCCT	6660
[0653]		
	6661 ACAGGGTTTTGTAT	6674
		
[0654]	序列号72和74(Tjp1a突变等位基因-7nt缺失)	
[0655]	长度:6674bp和439aa	
[0656]	类型:cDNA(序列号:72) 和蛋白(序列号:74)	
[0657]	生物体:尼罗罗非鱼	
	1 AAAGAGGAAACAATGCATCATATAACTTTTATAAGTAAGAGTGCGGCGATGGAGGAAACC	60
	1 -K--E--E--N--N--A--S--Y--N--F--I--S--K--S--A--A--M--E--E--T-	20
	61 GTCATATGGGAACAGCACACAGTTACCCCTTCACAGGGCCCCAGGATTGGGTTTGGCATT	120
	21 -V--I--W--E--Q--H--T--V--T--L--H--R--A--P--G--F--G--F--G--I-	40
	121 GCCATCTCGGGTGGGCGAGACAACCCTCATTTCCAGAGTGGTGAACATCTATTGTAATA	180
	41 -A--I--S--G--G--R--D--N--P--H--F--Q--S--G--E--T--S--I--V--I-	60
	181 TCGGATGTGCTGAAAGGAGGTCCTGCAGAGGGTCTGCTACAAGAAAATGATCGAGTAGTA	240
	61 -S--D--V--L--K--G--G--P--A--E--G--L--L--Q--E--N--D--R--V--V-	80
	241 ATGGTCAATGCAGTCTCTATGGACAATGTAGAGCATGCCTATGCTGTTCAACAACCTCGA	300
	81 -M--V--N--A--V--S--M--D--N--V--E--H--A--Y--A--V--Q--Q--L--R-	100
	301 AAGAGTGGCAAAATGCAAAGATAACTATTCGCAGAAAAAGGAAAGTACAAATCCCAGCG	360
[0658]	101 -K--S--G--K--N--A--K--I--T--I--R--R--K--R--K--V--Q--I--P--A-	120
	361 TCACGGCACGGGGACAGGGAGACGATGTCTGAGCACGAGGAGGAGACAGCGATGAGGCT	420
	121 -S--R--H--G--D--R--E--T--M--S--E--H--E--E--E--D--S--D--E--A-	140
	421 GATGCTTACGATCACCGCAGTGGACGTGGTGGACAAAACGATCGGGAGCGTAGCAGCAGT	480
	141 -D--A--Y--D--H--R--S--G--R--G--G--Q--N--D--R--E--R--S--S--S-	160
	481 GGGAGGCGGGATCACAGTGCCTCACAGGAGAGGAGCATCTCACCACGCTCCGATCGCCGA	540
	161 -G--R--R--D--H--S--A--S--Q--E--R--S--I--S--P--R--S--D--R--R-	180
	541 TCACAAGCCTCTTCTGCTCCACCCAGGCCCTCCAAGGTCACCTTGTCAAGTCCCGCAA	600
	181 -S--Q--A--S--S--A--P--P--R--P--S--K--V--T--L--V--K--S--R--K-	200
	601 AACGAAGAATATGGACTGCGGCTGGCCAGCCATATCTTTGTGAAGGACATCTCTCCAGAG	660
	201 -N--E--E--Y--G--L--R--L--A--S--H--I--F--V--K--D--I--S--P--E-	220
	661 AGCCTTGCAGCCAGAGATGGAAACATTCAGGAGGGAGATGTTGTACTTAAGATTAACGGC	720

	221 -S--L--A--A--R--D--G--N--I--Q--E--G--D--V--V--L--K--I--N--G-	240
	721 ACAGTTACAGAGAACCTATCACTGACAGATGCCAAGAAGCTGATTGAGAGGTCAAAGGGC	780
	241 -T--V--T--E--N--L--S--L--T--D--A--K--K--L--I--E--R--S--K--G-	260
	781 AAGCTGAAGATGGTAGTGCAGAGAGACGAGCGGGCCACGCTGCTCAATATTCCTGACCTT	840
	261 -K--L--K--M--V--V--Q--R--D--E--R--A--T--L--L--N--I--P--D--L-	280
	841 GACGACAGCATCCCATCAGCCAATAACTCAGACAGAGATGACATTTTCAGAGATACATTCA	900
	281 -D--D--S--I--P--S--A--N--N--S--D--R--D--D--I--S--E--I--H--S-	300
	901 CTGACATCCGATCATTCCAATCGATCCCATGGGAGAGGAAGTCAATCCCATTGCGCTGAC	960
	301 -L--T--S--D--H--S--N--R--S--H--G--R--G--S--Q--S--H--S--P--D-	320
	961 AGGGTTGAAACATCCGAGCATCTCCGCCACTCACCGCGGCAGATCAGCAATGGCAGTAAT	1020
[0659]	321 -R--V--E--T--S--E--H--L--R--H--S--P--R--Q--I--S--N--G--S--N-	340
	1021 GGATTTCTCTGGGAAAGAGCTGAGGAATTAATCAAACAGGAATGGGTGGTGAAACAGGAA	1080
	341 -G--F--L--W--E--R--A--E--E--L--I--K--Q--E--W--V--V--K--Q--E-	360
	1081 TGTTATTTTGCCTGTGCCATACTATAAAATGTGTAATAACCGTGACAGTTTGGGCAAAA	1140
	361 -C--Y--F--A--C--A--H--T--I--K--C--V--I--T--V--T--V--W--A--K-	380
	1141 AAACCCCAAAACAGTAACATGCCAGAACCAAAGCCAGTTTATGCACAGCCTGGTCAGCCT	1200
	381 -K--P--Q--N--S--N--M--P--E--P--K--P--V--Y--A--Q--P--G--Q--P-	400
	1201 GACGTGGACCTGCCTGTCAGCCCATCTGATGCCCTGTACCCAGTGCTGCACATGATGAC	1260
	401 -D--V--D--L--P--V--S--P--S--D--A--P--V--P--S--A--A--H--D--D-	420
	1261 AGCATTCTCAGACCAAGTATGAAGCTGGTCAAGTTCAAGAAGGGAGAGAGTGTCGGTTAG	1320
	421 -S--I--L--R--P--S--M--K--L--V--K--F--K--K--G--E--S--V--G--*-	439

[0660] 序列号75和77(野生型Hiat1a)

[0661] 长度:5281bp和491aa

[0662] 类型:cDNA(序列号:75) 和蛋白(序列号:77)

[0663] 生物体:尼罗罗非鱼

	1 TTCTGCTTCGCCCTTGTATTAGACAGCCAATCGCTGGACGTCACTCCGCCAGAAGGGGTG	60
		
[0664]	61 GGTTCACGTAGTACAGGAAGCCAGGCGAGGTGAGGTGGGAGGAGAGATCACAAAATTGT	120
		
	121 TAGCTCGCTGCTAGCTGCCTCCTCCGATTTGCCCGAAGTGCGATGAGCCCAGGAGGCGAA	180
		

181	ATTTGTGGGGTTTTTTGGTTTTGATTGGCGCGACGATGACCCTCTGACCCTAAGAATGGA	240
241	CATAAGTTAATGATGACGGGGGAGAAGAAGAAGAAGCGGCTGAACCGCAGCATTCTT	300
	-M--M--T--G--E--K--K--K--K--R--L--N--R--S--I--L-	17
301	CTTGCAAAGAAAATTATAATAAAAGATGGAGGAAGTCCTCAGGGAATCGGGGAGCCCAGT	360
18	-L--A--K--K--I--I--I--K--D--G--G--S--P--Q--G--I--G--E--P--S-	37
361	GTTTACCATGCTGTGGTGGTCATCTTCCTGGAGTTTTTTGCATGGGGTCTGCTCACTACC	420
38	-V--Y--H--A--V--V--V--I--F--L--E--F--F--A--W--G--L--L--T--T-	57
421	CCGATGCTCACGGTATTACACCAGACATTCCCCCAACACACATTCTGATGAATGGGCTC	480
58	-P--M--L--T--V--L--H--Q--T--F--P--Q--H--T--F--L--M--N--G--L-	77
481	ATTCATGGTGTGAAGGGCCTGTTATCATTTCTCAGTGCTCCGCTAATTGGAGCGTTGTCA	540
78	-I--H--G--V--K--G--L--L--S--F--L--S--A--P--L--I--G--A--L--S-	97
541	GACGTATGGGGACGCAAGTCCTTCCTGCTGCTAACGGTCTTCTTCACTTGCGCGCCCAT	600
98	-D--V--W--G--R--K--S--F--L--L--L--T--V--F--F--T--C--A--P--I-	117
601	CCGCTGATGAAGATCAGTCCATGGTGGTACTTTGCAGTCATCTCGATGTCCGGTGTTTTT	660
[0665] 118	-P--L--M--K--I--S--P--W--W--Y--F--A--V--I--S--M--S--G--V--F-	137
661	GCCGTCACCTTCTCTGTGATCTTTGCCTATGTGGCAGACATCACACAAGAGCATGAGAGG	720
138	-A--V--T--F--S--V--I--F--A--Y--V--A--D--I--T--Q--E--H--E--R-	157
721	AGCACAGCTTATGGTTTGGTATCAGCTACCTTTGCAGCAAGCCTGGTTACCAGCCCAGCC	780
158	-S--T--A--Y--G--L--V--S--A--T--F--A--A--S--L--V--T--S--P--A-	177
781	ATTGGAGCTACCTGTCTGAGGCTTACAGTGACACCTTGGTTGTGATCCTGGCCACAGCC	840
178	-I--G--A--Y--L--S--E--A--Y--S--D--T--L--V--V--I--L--A--T--A-	197
841	ATCGCACTGCTCGACATCTGCTTCATCCTGGTGGCTGTACCAGAGTCGCTGCCGAGAAG	900
198	-I--A--L--L--D--I--C--F--I--L--V--A--V--P--E--S--L--P--E--K-	217
901	ATGAGGCCAGCGTCATGGGGAGCGCCCATCTCCTGGGAACAGGCAGACCCCTTCGCTTCT	960
218	-M--R--P--A--S--W--G--A--P--I--S--W--E--Q--A--D--P--F--A--S-	237
961	CTGCGTAAAGTGGGCCAGGACTCTACGGTGCTCCTCATCTGTATCACAGTGTTCCTCTCC	1020
238	-L--R--K--V--G--Q--D--S--T--V--L--L--I--C--I--T--V--F--L--S-	257
1021	TACCTCCCTGAGGCCGCCAGTACTCCAGCTTCTTCCTCTATCTCAGACAGGTCATAGGC	1080
258	-Y--L--P--E--A--G--Q--Y--S--S--F--F--L--Y--L--R--Q--V--I--G-	277

1081	TTCTCCTCAGAGACAGTGGCTGCCTTCATCGCTGTTGTGGGAATCCTCTCAATATTAGCT	1140
278	-F--S--S--E--T--V--A--A--F--I--A--V--V--G--I--L--S--I--L--A-	297
1141	CAGACGGTCGTGTTGGGGATCCTGATGCGCTCTATAGGAAATAAGAACACAATCCTGCTC	1200
298	-Q--T--V--V--L--G--I--L--M--R--S--I--G--N--K--N--T--I--L--L-	317
1201	GGCCTCGGCTTTCAGATCCTCCAGCTGGCCTGGTATGGCTTTGGATCTCAGCCCTGGATG	1260
318	-G--L--G--F--Q--I--L--Q--L--A--W--Y--G--F--G--S--Q--P--W--M-	337
1261	ATGTGGGCAGCTGGAGCCGTTGCTGCCATGTCCAGCATCACGTTCCCGCCATCAGCGCC	1320
338	-M--W--A--A--G--A--V--A--A--M--S--S--I--T--F--P--A--I--S--A-	357
1321	ATTGTGTCCCGTAATGCGGATCCTGACCAGCAAGGTGTTGTTTCAGGGCATGATCACTGGA	1380
358	-I--V--S--R--N--A--D--P--D--Q--Q--G--V--V--Q--G--M--I--T--G-	377
1381	ATTCGAGGCCTCTGTAAACGGTTTGGGTCCTGCTCTTTACGGCTTCGTCTTCTACTTATTC	1440
378	-I--R--G--L--C--N--G--L--G--P--A--L--Y--G--F--V--F--Y--L--F-	397
1441	CACGTGGAGCTGACCGACACGGACGGCTCTGAGAAAGGTGCCAAAGGGAACATGGCCAAC	1500
398	-H--V--E--L--T--D--T--D--G--S--E--K--G--A--K--G--N--M--A--N-	417
[0666]	1501 CCCACTGACGAGAGTGCCATCATCCCAGGTCCTCCCTTCCTCTTTGGTGCATGCTCAGTG	1560
418	-P--T--D--E--S--A--I--I--P--G--P--P--F--L--F--G--A--C--S--V-	437
1561	CTGCTGTCTCTGCTGGTGGCGCTGTTTCATCCCGGAGCACACTGGGCCCGGTATGAGGCC	1620
438	-L--L--S--L--L--V--A--L--F--I--P--E--H--T--G--P--G--M--R--P-	457
1621	GGCTCCTACAAGAAGCACAGCAACGGGGCACAGAGTCACCTCCACAGCCCGCAAGGCAGC	1680
458	-G--S--Y--K--K--H--S--N--G--A--Q--S--H--S--H--S--P--Q--G--S-	477
1681	GGGGCAGAGGGCAAGGAGCCGCTGCTGGAGGACAGCAGCGTATAACCTCAGCTCAGGGG	1740
478	-G--A--E--G--K--E--P--L--L--E--D--S--S--V--*-.	491
1741	GGCAGACTCCCTCGCTCCACCTCAAAATGCCCTGCACACATGGACAGATACACATAATTT	1800
		
1801	ATCACAAAGGACACACACGCACCTCAGGCACACGTACACTCGAGTGCCGCAAAGAGATGT	1860
		
1861	TTGTCTGTTTGTGCTGTCCACAGCACAAAGTTGGGCGCTCCTTCCTTAGCAACCTTTTCT	1920
		
1921	TTATAATAGCTGGGTATTGTGAGGACTTTCTAAAGACCCTGTGTGAAGAAAGTGTGTCG	1980
		
1981	AGCATCATCAGGGCTGCAGTGGAAGACCGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT	2040
		
2041	GTGTGTGTGGCTGAGCTGAGCTGAGCTGGACTCCAATCTTTGGTTTGTCTGAAGTTGTAA	2100

[0667]

.....
2101 CAGTGGAGCACACAACAGCTTGTCCCCCTCCTGGCGCGAAACAGGACTGAAGTGACTTTG 2160
.....
2161 GTTTAATGTGCGAGTGGGGATATATCTCTGATACGTTACTAAATACCTGTGTGACTCTTG 2220
.....
2221 ATTATTCCTCTTTAGTTAGCCAAGTGGCACCTTCGTTTGTTCAGAGGAGAGCGTGACGAAC 2280
.....
2281 GCCCTCTCACATGCTAATACTTCTGTCTGTATGCTTGTCTTTATGACTACAGCTCTGTTT 2340
.....
2341 AGGCGTCCAAGAAGGAAACATAGTTCTTCTCTGTGTGGACAACAGGGGAGCGCAGCAGC 2400
.....
2401 TGTAAACCTGTGAAAGGAGCCTGCAAACAGTATTGGAGAGGCGCTGCCTAATTGCAGT 2460
.....
2461 CAGGGTTGGCAACCAGTTCAGATACAAAAAGCTTTGTTAGGACCAGGTTTGTTCAAATA 2520
.....
2521 TCAAACCTCTTACAGAGAGATGACTAGAAGAGACCACTTTATTAGCTCAAAATGGTTTTT 2580
.....
2581 CAATGTTTACTTGCCATTCTCTAGATTAGTAGTACAGTTTGGGTTGTATATTTTTCTCTG 2640
.....
2641 TTCAAACCTGAAGGCTAGTTGTGCTTCAAGTTTTTATTCAAGAAACAAATGTTGCCTTGAA 2700
.....
2701 GTGACTTAAGATATATATGGAGACATTACGTAACCTGTATGAAGACCGAGGTCTGAGAAG 2760
.....
2761 GCTCTGTAATCTTGCGCTATTGCTCCCATCGGAGCCGTTACACACTTTTTATTCTTTGT 2820
.....
2821 ATTCATGCCCTTCTGTACTTTGTTTCTGACATTTATCACCATCAAGTTGAGGCTTAC 2880
.....
2881 AGAGACACGGTTTTTATTTTTAAAAAGCCTCTGGACCATTGAGGCTGGAGCATTGCTATC 2940
.....
2941 AGGATGTCGGTGTCTGCACTGACTGTTTGTAGTTGATATCATTAGGTTTCAGCAGAATATCA 3000
.....
3001 GCCATGCTGCTGCAGTAGTAAATACAAAGGTTAATCAGTGTGGCGTAAAGTGGTGGATAA 3060
.....
3061 GAATTATAACTGTGTCTTGTAGTCCCTGACATTTAAGCTAACATGCGTACACTCAAAGAG 3120
.....
3121 GCAGGCCACACTTCTCCCAATGCCTAACATGAAGCACCTCACGGACGTGTCTGGCAACTT 3180
.....
3181 GTGTAGAAGCTCTGCAGATGCCAGCCTGCGCCACCTAAGAGGCAGAAACAAATAGCAGTA 3240
.....
3241 GTGGAGTAGATGGCTGGAAATGTTTCATGTTATCCTCAAACAGTGAAGCAAAGTAAAAATC 3300
.....
3301 TGGAGGTTGTGTCAATGTGGAGAGTATTGCGAAATCTGCAATGATCCCAGATTTTCATTAG 3360
.....
3361 TTTAAAAAAAAGAGAAAATAAGAAGAAGAAGAAAATCCACTTAAAAGTGTAATCCTGAA 3420

[0668]

.....
3421 TTTTATTATCGTTCAGATCTGCAGATGTCTCTGGGTTTTCTGCAGGTCTGAACCTGCTG 3480
.....
3481 CTGCCACGTTTATTTTATTTTCCCCGGTCAACAGGTGGCGCAGTCTGTACCTGGCATGC 3540
.....
3541 CTGTAAGGTGCTCGTGTGGTTTTTGTCTTTTTCAGTCATGTGGATCAGCGATACT 3600
.....
3601 GCGTTCCTTCATTACATACTATGTCGCCACCTTCCACATTGTAACTTTGATCTGTGA 3660
.....
3661 ATGCCTCTCGTAGCTAACAACTGGTTTCATGCTGTTTAACATCTGTATGAACGAAACAT 3720
.....
3721 ACGTCACGTATTTAGTGCCATATCTTCTTGATTGCTTTTTCTTTTGTACTGTGTGTGT 3780
.....
3781 GAATGTACACTTGTGTGATTTGAGTGTCTTTGTGTTCTTTTATTTTCTTGTCTTAA 3840
.....
3841 TTTCTTTGACTGAAGATTTAAGTTTAAATGCTATTTTTTAAATAGCTTTTAAACTTCA 3900
.....
3901 GTCATTTTTTTAGGATTAATTGTCAAAATTGGATGGTAAATTATCAAATGCCATCTGTC 3960
.....
3961 CCCTTTGTATGTTGTTTGTCTTTGATTTACGCCTCGGTCCTCATTAAATAACAAGCATT 4020
.....
4021 TCACCATGGTTTGTAAAGCTCATAATTTTTTCCCAGATTTCTCTGAATGTTCCAATGAA 4080
.....
4081 ACTGAACATGTTGACCACACAGTACCCTCAATCTTTAGGTTTTTTTTGTTTGTCTTTTA 4140
.....
4141 AGAGGGGATGTTACTACACAGGAGGCCATTATCCCGTTTTTTTTTTTTTGTGTTTGT 4200
.....
4201 TTTAAATCATGTAATTGAACAACAGAAAATCGGATCCTGGTAAGATTCTGCACCAGCCCC 4260
.....
4261 CCACCACCACCACCCACGTGCACACCTACAGCTCCAAGCAGACGACTGTAAATGTACAA 4320
.....
4321 AAATCACCTGTACCTAGAGAAAAATGTATATATTTATTCTCAAGGAGATGGCCACCTCT 4380
.....
4381 TGGTCAATTTGGTTGTATGGTGCATTTATTATTATAATTATTATATATTTCTCCAGAATT 4440
.....
4441 ACCTGCTAGCCACTCCTGTTTTTAGTACAATGTGGTTTGTGGCCTGAACTCCCCTCTCTG 4500
.....
4501 TGTGCCTAAAATTAGCCAAGAAATGAGTATGGCAACCTAAGTAAGTAAATGGTGGTTAT 4560
.....
4561 TAATGTAAATATGGGAACTAATGATAAACTATTTATTAAAGGTTTATTGTACAATGAAA 4620
.....
4621 CGTTTCGGGTTGCCCTCTGTGGTTTCTGGGTGGGTAACACAGGTGAAATCATGTTACTGTA 4680
.....
4681 GCAGTGAGTGAGCATCTGAGCAGCGATAATCATTTGGTCGTTGCATTTACGGCGATGATC 4740

.....
4741 CTATAGTTAATGGCTGCTAAATCCCAGTAAGTCTCACTATAAACTGGTAGCATTCCTGTT 4800
.....
4801 GGGCTTTACTTGCTGTTATATTACTGCACCCCCATTTTTTTTTTAATGTAATGCTCTGAC 4860
.....
4861 TTTGCTGGCTGTTGGTTTTGTAAACCTGCCCTTTGAAGCTTAATGTTACCGCTAATGCCT 4920
.....
4921 CCTCCACCTACACAGTGTATATAGTCGTGCATTGACCTGAGCTCATTATGGGCGGTGGA 4980
.....
4981 TTTGTAATTAAATCCACATGGAGGCAGTAGTTACATCTGGCAGGAACTTTAAAGAGTCTT 5040
[0669]
5041 CTCCCTGAATAACAGTGAACGCAAAGTGGGAGATGTCACAAAATGTGATATTTATCCAAA 5100
.....
5101 ATAAAGAATACGATAAAGTGGCCAGAACAATTTATTTTGTATTATAATGTAGTGTAGGGG 5160
.....
5161 AATTTAATGTCTTATAATTAGCAGCTAATAACTTGCCCATCATTTTGTGTAATTTCTGTG 5220
.....
5221 TGAATGATGAAGTTTTACTGGGTCAATGCTCAAATCTTAAGGTGATTAATGAGTATTTGC 5280
.....
5281 A 5281
.

[0670] 序列号76和78(Hiat1a突变等位基因-17nt缺失)

[0671] 长度:5281bp和234aa

[0672] 类型:cDNA(序列号:76) 和蛋白(序列号:78)

[0673] 生物体:尼罗罗非鱼

1 TTCTGCTTCGCCCTTGTATTAGACAGCCAATCGCTGGACGTCCTCCGCCAGAAGGGGTG 60
.....
61 GGTTGACGTAGTACAGGAAGCCAGGCGAGGTGAGGTGGGGAGGAGAGATCACAAAATTGT 120
.....
121 TAGCTCGCTGCTAGCTGCCTCCTCCGATTTGCCCGAAGTGCATGAGCCCAGGAGGCGAA 180
.....
181 ATTTGTGGGGTTTTTTGGTTTTGATTGGCGCGACGATGACCCTCTGACCCTAAGAATGGA 240
[0674]
241 CATAAGTTAATGATGACGGGGGAGAAGAAGAAGAAGCGGCTGAACCGCAGCATTCCTT 300
.....-M--M--T--G--E--K--K--K--K--R--L--N--R--S--I--L- 17
.....
301 CTTGCAAAGAAAATTATAATAAAAGATGGAGGAAGTCCTCAGGGAATCGGGGAGCCAGT 360
18 -L--A--K--K--I--I--I--K--D--G--G--S--P--Q--G--I--G--E--P--S- 37
.....
361 GTTACCATGCTGTGGTGGTCATCTTCTGGAGTTTTTTCATGGGGTCTGCTCACTACC 420
38 -V--Y--H--A--V--V--V--I--F--L--E--F--F--A--W--G--L--L--T--T- 57

	421 CCGATGCTCACGGTATTACACCAGACATTCCCCAACACACATTCCCTGATGAATGGGCTC	480
	58 -P--M--L--T--V--L--H--Q--T--F--P--Q--H--T--F--L--M--N--G--L-	77
	481 ATTCATGGTGTGAAGGGCCTGTTATCATTTCTCAGTGCTCCGCTAATTGGAGCGTTGTCA	540
	78 -I--H--G--V--K--G--L--L--S--F--L--S--A--P--L--I--G--A--L--S-	97
	541 GACGTATGGGGACGCAAGTCCTTCCTGCTGCTAACGGTCTTCTTCACTTGCGCGCCCAT	600
	98 -D--V--W--G--R--K--S--F--L--L--L--T--V--F--F--T--C--A--P--I-	117
	601 CCGCTGATGAAGATCAGTCCATGGTGGTACTTTGCAGTCATCTCGATGTCCGGTGTTTT	660
	118 -P--L--M--K--I--S--P--W--W--Y--F--A--V--I--S--M--S--G--V--F-	137
[0675]	661 GCCGTACCTTCTCTGTGATCTTTGCCTATGTGGCAGACATCACACAAGAGCATGAGAGG	720
	138 -A--V--T--F--S--V--I--F--A--Y--V--A--D--I--T--Q--E--H--E--R-	157
	721 AGCACAGCTTATGGTTTGGTATCAGCTACCTTTGCAGCAAGCCTGGTTACCAGCCCAGCC	780
	158 -S--T--A--Y--G--L--V--S--A--T--F--A--A--S--L--V--T--S--P--A-	177
	781 ATTGGAGCCTACCTGTCTGAGGCTTACAGTGACACCTTGGTTGTGATCCTGGCCACAGCC	840
	178 -I--G--A--Y--L--S--E--A--Y--S--D--T--L--V--V--I--L--A--T--A-	197
	841 ATCGCACTGCTCGACATCTGCTTCATCCTGGTGGCTGTACCAGAGTCGCTGCCGGAGAAG	900
	198 -I--A--L--L--D--I--C--F--I--L--V--A--V--P--E--S--L--P--E--K-	217
	901 ATGAGCGCCCATCTCCTGGGAACAGGCAGACCCCTTCGCTTCTCTGCGTAAAGTGGGCCA	960
	218 -M--S--A--H--L--L--G--T--G--R--P--L--R--C--V--S--A--*-	234
[0676]	<u>序列号79和81(野生型Smap2)</u>	
[0677]	长度:4207bp和429aa	
[0678]	类型:cDNA(序列号:79) 和蛋白(序列号:81)	
[0679]	生物体:尼罗罗非鱼	
	1 ATGACGGGCAAATCTGTGAAAGACGTTGACAGATACCAGGCTGTCCTCAACTCTTTACTG	60
	1 -M--T--G--K--S--V--K--D--V--D--R--Y--Q--A--V--L--N--S--L--L-	20
	61 GCGCTGGAGGAGAAACAAATACTGCGCTGACTGTGAATCGAAAGGTCCACGATGGGCATCC	120
[0680]	21 -A--L--E--E--N--K--Y--C--A--D--C--E--S--K--G--P--R--W--A--S-	40
	121 TGAATTTGGGCATCTTCATCTGTATCCGCTGTGCTGGTATCCATCGAAACCTGGGGGTT	180
	41 -W--N--L--G--I--F--I--C--I--R--C--A--G--I--H--R--N--L--G--V-	60
	181 CACATCTCCAAGGTCAAGTCTGTCAACCTGGATCAGTGGACGCAGGAGCAAGTCCAGTGT	240

61	-H--I--S--K--V--K--S--V--N--L--D--Q--W--T--Q--E--Q--V--Q--C-	80
241	GTTCAAGAGATGGGAAATGCCAAGGCCAAACGGCTCTACGAGGCTTTTTACCCGAGTGC	300
81	-V--Q--E--M--G--N--A--K--A--K--R--L--Y--E--A--F--L--P--E--C-	100
301	TTCCAGCGTCCCGAGACAGACCAGGCTGCCGAGATCTTCATTAGGGACAAATACGAAAAG	360
101	-F--Q--R--P--E--T--D--Q--A--A--E--I--F--I--R--D--K--Y--E--K-	120
361	AAGAAATACATGGATAAAGTTATTGACATCCAGATGCTCAGGAAAGAAAAGAGTTGTGAC	420
121	-K--K--Y--M--D--K--V--I--D--I--Q--M--L--R--K--E--K--S--C--D-	140
421	AACATCCCAAAGGAGCCAGTTGTATTTGAGAAGATGAAATTGGTAGTTAAAAAGGAGAAC	480
141	-N--I--P--K--E--P--V--V--F--E--K--M--K--L--V--V--K--K--E--N-	160
481	ACTAAGAAAAAGACGTCAGCCCAAAGACAGATTCCCAGTCTGTACAGACCTGCTCGGA	540
161	-T--K--K--K--D--V--S--P--K--T--D--S--Q--S--V--T--D--L--L--G-	180
541	CTAGAACTGCTTTTATGTTGCAAGTCTGCACCTAAAAAGCAAATAAACACGTCAGACTCT	600
181	-L--E--L--L--L--C--C--K--S--A--P--K--K--Q--I--N--T--S--D--S-	200
601	GCCCTGGATCTCTTCAGCTCCCTCGCAGCCCCCTCCCCTGCTTCCTCTACAAAAAGCACG	660
[0681] 201	-A--L--D--L--F--S--S--L--A--A--P--S--P--A--S--S--T--K--S--T-	220
661	GTAGTAGACACCATGCCTCAGAGCAGAGTGACTGCCTCAGTGCCTGAGAATCTGAGCTTG	720
221	-V--V--D--T--M--P--Q--S--R--V--T--A--S--V--P--E--N--L--S--L-	240
721	TTCTTAGGCCCAGCACCCAAAGCAGAGGAGGGCACAGTCAAGAACTATCCAAGGACTCC	780
241	-F--L--G--P--A--P--K--A--E--E--G--T--V--K--K--L--S--K--D--S-	260
781	ATTCTTTCCCTGTACGCCTCCACTCCCTCGGTACATGCCAGCAGTATGGCCGCACATGGC	840
261	-I--L--S--L--Y--A--S--T--P--S--V--H--A--S--S--M--A--A--H--G-	280
841	TTGTACATGAACCAAATGGGATATCCAACACACCCGTACGGTCCATACCATTCTTTAGCC	900
281	-L--Y--M--N--Q--M--G--Y--P--T--H--P--Y--G--P--Y--H--S--L--A-	300
901	CAGGCAGGGGAATGGGAGGCACTATGATGACATCACAGATGGCCATGATGGGGCAGCAG	960
301	-Q--A--G--G--M--G--G--T--M--M--T--S--Q--M--A--M--M--G--Q--Q-	320
961	CAGAGCGGGGTGATGGCGGTGCCACAAAACAGCATGATTGGAATTCAGCAGAACTGCATG	1020
321	-Q--S--G--V--M--A--V--P--Q--N--S--M--I--G--I--Q--Q--N--C--M-	340
1021	ATGGGGCAGCAGAATGGCTTAATGGGACAGCAACAAAGTGGGATGATAGGACAGCAGCAG	1080
341	-M--G--Q--Q--N--G--L--M--G--Q--Q--Q--S--G--M--I--G--Q--Q--Q-	360

1081	CAGGTTGGGGGTTTGGCCGCATTACCCAGCAGCAGGCTTACGGAGTCCAGCAAGCCCAG	1140
361	-Q--V--G--G--L--P--A--L--P--Q--Q--Q--A--Y--G--V--Q--Q--A--Q--	380
1141	CAGCTACAGTGGAAACATCAGCCAGATGACTCAGCACATGGCCGGCGTGAATCTTTACAAC	1200
381	-Q--L--Q--W--N--I--S--Q--M--T--Q--H--M--A--G--V--N--L--Y--N--	400
1201	ACCAGCGGTATGATGGGATACAGCGGTCAACAAATGGGAGGTTTCAGCAGCTCCAAGTTCG	1260
401	-T--S--G--M--M--G--Y--S--G--Q--Q--M--G--G--S--A--A--P--S--S--	420
1261	GCACACATGACAGCGCACGTGTGGAAATGAGCTTGTCTATCTGAGATTCGATGGAGTGCC	1320
421	-A--H--M--T--A--H--V--W--K--*--.....	429
1321	AACGACCACAAAAGGAGAAGAGAAAACGCCGTGGATCAGACTCTCCATTAAACATTTTCT	1380
		
1381	GATGCAAGGGAGGAGGAGGAGGAGAAGAAGAAGAAGGTTTGAGAAACCACTACTACC	1440
		
1441	TCTCTCTCTCTCTCTGCGCGCTTCTCTTGCCGTCTCATGCATAGCCATGTTCTGCA	1500
		
1501	GATTTCCATGTTTGCTTCAGGACCTTTTCATATGATGACTAAGACAAGGGGGTCTGAG	1560
		
1561	GCCACTGGTTAGGACTCCAGAGCTTCTTTCTGCCTAGCCTTTATGAGAGAGCGCTCGTG	1620
		
[0682]	1621 TGCAGAAACATTATGAGGGTATCAAGCAGCTGCAGAATTGCACTGTTTCTTATTTAATCA	1680
		
1681	GATGGCACTGGGGTTGGCATTGGGGTTAGCCTTAAAGCTCAAATAGACCGAGAT	1740
		
1741	ATATAATCTGGTAACCTAAATAGGTGGCTCATACTTTAAATTCATTAGCCCTACATTACC	1800
		
1801	AGTATTTACCCAACCTGATGGAGCGACATTTAGTGATGATATGTACAGTGGCCCTGAGAGG	1860
		
1861	TCAAACACACTGCAGCCTAATAAAACACCAGCAAAAATGAAAAATGGTGCAAAGCACAC	1920
		
1921	AAACATAATGGAAGGTCAATAAAACCAATGGAAATAGAAAGAAAAACACTGGAGAAGC	1980
		
1981	TAGCAGAAAAAATCTCACAAAACACAACAGAAATGTTTTTGCTAAAAATGTGACGGCTA	2040
		
2041	ACAGCTAACAGTAAACGGCTAACAGCAACCATGTACCTACAGTGTCATTGTGTTTGTGTC	2100
		
2101	AGAATTTTTTTTCTATGTCCATTGTATTTTAATCAACTTCTGTGGTGCTTTTGCAAAAT	2160
		
2161	TTTTCTGTTTTGCTGGTGTTTCTACAGTTGCAGTGCATGTGACCTCTCAGGGCCACCGT	2220
		
2221	AGACATAGCTACATTTTAACAGCAGCCATATTTGCAAAGTGTAGCAACTACAACTTTATT	2280
		

[0683]

2281 CAGCCAATTTCAAGGTAGAGATTTAGAGCTTTTCAAAAGTATATTTTCACATAAGTGAGA 2340
.....
2341 TGAGCTGCTGCTAATTCACCTTAATAATCATTAACAAATATAAAAGCTAGGCTAGCCTAAT 2400
.....
2401 AGTCCCTTCATGCTGCATGCAGAAGACAAATACACATAACCATTTTTAGCAACATATATC 2460
.....
2461 TAGAAATTTCTACTCATTTAACAATATTTAATTCAAGCAACAAAACCTACCTACACAGCC 2520
.....
2521 CGTAATATTGATGTCTTCATCTCAATTTCTAGAGGGCTTCTTTTAGAATCTTTAATCTTG 2580
.....
2581 ACTTTAAAGTGTCAAAAGTCCAAAACCATATTTTGGGAGACCAAAGATCAACACTAGCTT 2640
.....
2641 TACTGTAAGTGGACAGTATTCCTGTATGCTTATTCCTGTTCAACCACTTAACTAGTGATT 2700
.....
2701 AATAGAAAAAAAACAGCAATTCAGCAGTCCGGCATCACTGTCTTCACTGTGCTGTCT 2760
.....
2761 TTCACCAAGGGTAGGACACTTAAAAAAAAGAAAAAGAAGAAAGAAATCATTTTGCATGCA 2820
.....
2821 GTGTATCATCAGCGCCCGCACACCTCCAGTTAAGAATCTACCTGGTGCATTAGTGGCCTCAA 2880
.....
2881 ATAACGTTGAATGTCTGTAAATAGGAGGTGAACAGAGAAGTGGGAGTAGAGACGGAAAAAC 2940
.....
2941 TTCAAGGTGAAGGTGAGCCGGGTTTCCAGATGCTTCCACTGAATTGCATGAAAAGAAATGTG 3000
.....
3001 TATCTAGCTCTGATTGTATGTACTGTACTGTATGTTTGTAAAGATTGCGAATGTGTCTC 3060
.....
3061 TCTGAATGTTTCTCCCTCTGACTCAGTCTTTGACAAAGACTGACAAAAAACTATAAAAA 3120
.....
3121 AAAATAGGTAAAACATATGTTCTGAATGTGATCTCGGTTGACTCGTTTGATCGCGCGCAA 3180
.....
3181 TTGTTCTTCGGTGTGTTTTTGTTTTTTATATATTCCTTGCTAGAAACGTACACCTGTG 3240
.....
3241 TCTCTGGAATGTCTGTGCTCGATGGCATCCTGTGGGTTTCCAGTTTTGCTGTAACGGCCT 3300
.....
3301 CACCTTTGCGTTGGGGGCAAACAGTGAGCTGTTTTGTTTTTTTTTCTTTTGAGAGGGG 3360
.....
3361 ATGGGAGTATTTAACAATCTGGCCAAACCACATCGTGAAGCATAAAGCGATTGTAAAACC 3420
.....
3421 ACAATCTTTCACGTCTGTTTAAGCTGATGCTTGTACGCTTCTCCACACAAACCATCTCT 3480
.....
3481 GTGCCCCGATTTCTCTTAAAGTGTTGCTAAATCTGCCTTTTCTGATAAATGCTTATGGA 3540
.....
3541 AATGCTGTGTTTCTCTTATTTAATTTTATTTGACACTTGTTAAGCTGGTAAGATGCTG 3600
.....

	3601	CTTTTAATGTGAGTGGCAGCAATATAGGAGGTGCCTATGTGCAGCATATAAGGTCTTATT	3660
	3661	TCACAACAGTGTGACAGCAGCAGTCACCTTCTCCACTGAGAGCAACATTTATATAAGAGA	3720
	3721	GAGCACATCCAGCACAGCAACAGCAAATCTGTCAAGTCAACAAAAGTTTCTGGAAAGGCAG	3780
	3781	TGCAAGTCCACCTCTGTGGACGCTCAGGCCTCACCTGAGTTTTTCCATTTGTGATCAGGC	3840
	3841	TACTTTTTTTTTTGGTCCGATATTTTTTCAATGAAACAAAAACGAATAAAGGAATGTAAGT	3900
[0684]	3901	TTGTACGTACTTGTGATCAAGATACTGTATATTTTAATTCTTTATCAAAATATCGCTGT	3960
	3961	ATATTATGTTTCTTAAACAACATGTTCTGTATATTAGTTTTTCTTTCCACATGCTTTGC	4020
	4021	CCCACTTTACACAATTTCAATAAAATTTAACAATGTATATGTGACATATGATAATTGTCC	4080
	4081	CTGTGAAAACATGCAAATAAATATTGTTTTGGTTAAATTTTATGTTGTTTGTGTTGT	4140
	4141	GTTCAATTGCTGGGTGTCAGGAGTTTCTCTGTTATGCAACTCAGGTCAGAATAAACGCTC	4200
	4201	AGACAGG	4207
[0685]	序列号80和82 (Smap2突变等位基因-17nt缺失)		
[0686]	长度:4207bp和118aa		
[0687]	类型:cDNA (序列号:80) 和蛋白 (序列号:82)		
[0688]	生物体:尼罗罗非鱼		
	1	ATGACGGGCAAATCTGTGAAAGACGTTGACAGATACCAGGCTGTCCTCAACTCTTTACTG	60
	1	-M--T--G--K--S--V--K--D--V--D--R--Y--Q--A--V--L--N--S--L--L-	20
	61	GCGCTGGAGGAGAAACAAATACTGCGCTGACTGTGAATCGAAAGGTCCACGATGGGCATCC	120
	21	-A--L--E--E--N--K--Y--C--A--D--C--E--S--K--G--P--R--W--A--S-	40
	121	TGGAATTTGGGCATCTTCATCTGTATCCGCTGTGCTGGGGGTTACATCTCCAAGGTCAA	180
[0689]	41	-W--N--L--G--I--F--I--C--I--R--C--A--G--G--S--H--L--Q--G--Q-	60
	181	GTCTGTCAACCTGGATCAGTGGACGCAGGAGCAAGTCCAGTGTGTTCAAGAGATGGGAAA	240
	61	-V--C--Q--P--G--S--V--D--A--G--A--S--P--V--C--S--R--D--G--K-	80
	241	TGCCAAGGCCAAACGGCTCTACGAGGCTTTTTTACCCGAGTGTCCAGCGTCCCGAGAC	300
	81	-C--Q--G--Q--T--A--L--R--G--F--F--T--R--V--L--P--A--S--R--D-	100
	301	AGACCAGGCTGCCGAGATCTTCATTAGGGACAAATACGAAAAGAAGAAATACATGGATAA	360
[0690]	101	-R--P--G--C--R--D--L--H--*-	118

[0691] 序列号83和85(野生型Csnk2a2)

[0692] 长度:1053bp和350aa

[0693] 类型:cDNA(序列号:83) 和蛋白(序列号:85)

[0694] 生物体:尼罗罗非鱼

```
1 ATGCCTGGCCCCACACCGACCATCAGCAAAGCTCGGGTTTACACCGACGTTAATACACAG 60
1 -M--P--G--P--T--P--T--I--S--K--A--R--V--Y--T--D--V--N--T--Q- 20

61 AAGAACAGAGAGTACTGGGACTACGATGCTCATGTGCCAAACTGGAGTAATCAAGACAAC 120
21 -K--N--R--E--Y--W--D--Y--D--A--H--V--P--N--W--S--N--Q--D--N- 40

121 TATCAGCTGGTGCGTAAACTGGGCAGAGGGAAGTACAGTGAAGTGTGAGGCCATAAAT 180
41 -Y--Q--L--V--R--K--L--G--R--G--K--Y--S--E--V--F--E--A--I--N- 60

181 GTGACCAATAATGAGAAAGTGGTGGTGAATAATCCTGAAGCCTGTCAAGAAGAAGAAGATC 240
61 -V--T--N--N--E--K--V--V--V--K--I--L--K--P--V--K--K--K--K--I- 80

241 AAACGCGAAATCAAAATTCTTGAAAAGTTCGCGAGGAGGAACCAACATCATCCGCCTGGTG 300
81 -K--R--E--I--K--I--L--E--N--L--R--G--G--T--N--I--I--R--L--V- 100

301 GACACGGTCAAAGACCCGGTGTCCAGAACACCAGCGCTAGTCTTTGAGTACATCAATAAC 360
101 -D--T--V--K--D--P--V--S--R--T--P--A--L--V--F--E--Y--I--N--N- 120

[0695] 361 ACAGATTTTAAGGAGCTTTACCAGAAGCTGACAGACTACGATATCCGTTACTACATGTAT 420
121 -T--D--F--K--E--L--Y--Q--K--L--T--D--Y--D--I--R--Y--Y--M--Y- 140

421 GAGCTTCTAAAGGCTCTGGACTTCTGTACAGTATGGGGATCATGCACAGGGACGTGAAG 480
141 -E--L--L--K--A--L--D--F--C--H--S--M--G--I--M--H--R--D--V--K- 160

481 CCGCACAATGTGATGATTGACCACCAGCTGAGGAAGCTGCGTCTTATAGATTGGGGTTTG 540
161 -P--H--N--V--M--I--D--H--Q--L--R--K--L--R--L--I--D--W--G--L- 180

541 GCTGAATTTTACCATCCCGCTCAGGAATATAATGTCAGGGTGGCCTCGCGCTATTTCAAA 600
181 -A--E--F--Y--H--P--A--Q--E--Y--N--V--R--V--A--S--R--Y--F--K- 200

601 GGCCCCGAGCTGCTAGTGGACTATCAGATGTATGATTACAGTTTGGACATGTGGAGTCTC 660
201 -G--P--E--L--L--V--D--Y--Q--M--Y--D--Y--S--L--D--M--W--S--L- 220

661 GGCTGCATGTTGGCCAGTATGATTTTCTGAAGGAACCGTTTTTTCATGGCCAGGACAAC 720
221 -G--C--M--L--A--S--M--I--F--L--K--E--P--F--F--H--G--Q--D--N- 240
```

721	TATGACCAGCTGGTCCGCATCGCTAAGGTTCTCGGCACCGATGAGCTCTTTGGCTACCTG	780
241	-Y--D--Q--L--V--R--I--A--K--V--L--G--T--D--E--L--F--G--Y--L-	260
781	CACAAATATCACATAGAACTGGACACTCGCTTCAAAGACATGCTGGGGCAGCAAAACACGG	840
261	-H--K--Y--H--I--E--L--D--T--R--F--K--D--M--L--G--Q--Q--T--R-	280
841	AAACGCTGGGAGCAGTTCATCCAATCAGAGAACCAGCACCTGGTGAGTCCAGAGGCTCTG	900
281	-K--R--W--E--Q--F--I--Q--S--E--N--Q--H--L--V--S--P--E--A--L-	300
[0696]		
901	GACCTGCTGGACAAGCTGCTGCGCTATGACCACCAGCAGAGGCTGACGGCGGCCGAGGCC	960
301	-D--L--L--D--K--L--L--R--Y--D--H--Q--Q--R--L--T--A--A--E--A-	320
961	ATGCAGCACCCGTACTTCTATCCTGTGGTGAAGGAACAAGCAAATGCCAACACAGATGGC	1020
321	-M--Q--H--P--Y--F--Y--P--V--V--K--E--Q--A--N--A--N--T--D--G-	340
1021	TCAAAGGCAATAAGCAGCTCCAATGCAACATGA	1053
341	-S--K--A--I--S--S--S--N--A--T--*-	350
[0697]	<u>序列号84和86 (Csnk2a2突变等位基因-22nt缺失)</u>	
[0698]	长度:1053bp和31aa	
[0699]	类型:cDNA(序列号:84) 和蛋白(序列号:86)	
[0700]	生物体:尼罗罗非鱼	
1	ATGCTCATGTGCCAAACTGGAGTAATCAAGACAACATATCAGCTGGTGCGTAAACTGGGCA	60
1	-M--L--M--C--Q--T--G--V--I--K--T--T--I--S--W--C--V--N--W--A-	20
[0701]		
61	GAGGGAAGTACAGTGAAGTGTGTTGAGGCCATAAATGTGACCAATAATGAGAAAGTGGTG	120
21	-E--G--S--T--V--K--C--L--R--P--*-	31
[0702]	<u>序列号87和89(野生型Gope)</u>	
[0703]	长度:1335bp和444aa	
[0704]	类型:cDNA(序列号:87) 和蛋白(序列号:89)	
[0705]	生物体:尼罗罗非鱼	
1	ATGTCTGCTTCGACTGGATGCTCCCCATCGGGCCAGCACTCGGGCCTTGTCCTCCAGTATG	60
1	-M--S--A--S--T--G--C--S--P--S--G--Q--H--S--G--L--V--P--S--M-	20
[0706]		
61	TCCATGTTTCGATGGCTAGAAAGTGCTGGAGAAGGAATTTGATAAGGCTTTCGTGGATGTG	120
21	-S--M--F--R--W--L--E--V--L--E--K--E--F--D--K--A--F--V--D--V-	40

121	GATCTGTTGCTTGGAGAAATAGATCCAGATCAAGTGGATATAACGTATGAGGGTCGGCAG	180	
41	-D--L--L--L--G--E--I--D--P--D--Q--V--D--I--T--Y--E--G--R--Q-	60	
181	AAGATGACCAGCCTCAGCTCCTGTTTCGCTCAGCTCTGTCATAAAACCCAGACTGTCTTC	240	
61	-K--M--T--S--L--S--S--C--F--A--Q--L--C--H--K--T--Q--T--V--F-	80	
241	CAGCTCAACCATAAACTAGAGGCTCAGCTGGTGGACCTGCGCTCAGAGTTGACCGAAGCT	300	
81	-Q--L--N--H--K--L--E--A--Q--L--V--D--L--R--S--E--L--T--E--A-	100	
301	AAAGCTGCACGGGTGGTGGCAGAAAGGGAGGTCCACGACTTGCTCCTGCAGCTTCATGCT	360	
101	-K--A--A--R--V--V--A--E--R--E--V--H--D--L--L--L--Q--L--H--A-	120	
361	CTCCAATGCAGCTTCATGTCAAGCAAGGCCAAGCTGAGGAGTCAGATACCATCAAAGAT	420	
121	-L--Q--L--Q--L--H--V--K--Q--G--Q--A--E--E--S--D--T--I--K--D-	140	
421	AAACTGCCTACACCAACCTTAGAAGAGCTGGAACAGGAGCTCGAGGCCAGTAAGAAGGAG	480	
141	-K--L--P--T--P--T--L--E--E--L--E--Q--E--L--E--A--S--K--K--E-	160	
481	AAATTAGCAGAGGCAAAAATGGAGGCAGAAACCAGACTATATAAGAAAGAAAACGAGGCC	540	
161	-K--L--A--E--A--K--M--E--A--E--T--R--L--Y--K--K--E--N--E--A-	180	
[0707]	541	CTTCGAGGCACATGGCAGTACTGCAGGCCGAAGTCTACGGAGCCAGACTGGCTGCTAAA	600
181	-L--R--R--H--M--A--V--L--Q--A--E--V--Y--G--A--R--L--A--A--K-	200	
601	TACTTGGACAAGGAACTGGCTGGCAGGGTGCAGCAGATACAGTTACTGGGTCTGACATG	660	
201	-Y--L--D--K--E--L--A--G--R--V--Q--Q--I--Q--L--L--G--R--D--M-	220	
661	AAAGGGCCAGCACATGACAAGCTCTGGAATCAACTGGAGGCAGAAATTCACCTTCACCGC	720	
221	-K--G--P--A--H--D--K--L--W--N--Q--L--E--A--E--I--H--L--H--R-	240	
721	CATAAACTGTGATCCGAGCATGTAGAGGTGGAAGTGACCCTAAGAGACCTCTTCCCTCT	780	
241	-H--K--T--V--I--R--A--C--R--G--R--S--D--P--K--R--P--L--P--S-	260	
781	CCTGTGGGACATGATCCAGACATGCTGAAGAAAACCCAGGGAGTTGGCCCTATCCGAAAG	840	
261	-P--V--G--H--D--P--D--M--L--K--K--T--Q--G--V--G--P--I--R--K-	280	
841	GTTGTGCTGGTCAAAGAGGATCATGAGGGTCTAGGAATTTCCATTACAGGTGGGAAGGAG	900	
281	-V--V--L--V--K--E--D--H--E--G--L--G--I--S--I--T--G--G--K--E-	300	
901	CACGGCGTTCCTATTTTAATTTTCAGAGATCCATCCCAGTCAGCCCGCAGACAGATGTGGA	960	
301	-H--G--V--P--I--L--I--S--E--I--H--P--S--Q--P--A--D--R--C--G-	320	
961	GGGCTGCATGTTGGAGATGCCATCCTTGCTGTCAACAGCATCAATTTGCGAGATGCCAAA	1020	
321	-G--L--H--V--G--D--A--I--L--A--V--N--S--I--N--L--R--D--A--K-	340	

1021	CATAAGGAAGCTGTCACCATTCTCTCTCAGCAGCGAGGACAGATAGAGTTTGAGGTCGTG	1080
341	-H--K--E--A--V--T--I--L--S--Q--Q--R--G--Q--I--E--F--E--V--V-	360
1081	TACGTGGCTCCTGAAGTGGACAGCGATGATGAGAATGTGGAGTACGAGGATGACAGCGGT	1140
361	-Y--V--A--P--E--V--D--S--D--D--E--N--V--E--Y--E--D--D--S--G-	380
1141	CATCGCTACAGACTCTACCTGGATGAACTGGATGACAGCATCACAGCACCACCTAGCAAC	1200
381	-H--R--Y--R--L--Y--L--D--E--L--D--D--S--I--T--A--P--P--S--N-	400
[0708]		
1201	AGTTCAGCATCACTTCAAGCACTGGAGAAGTTGTCACTGAGCAATGGAGCAGAGTCTGGA	1260
401	-S--S--A--S--L--Q--A--L--E--K--L--S--L--S--N--G--A--E--S--G-	420
1261	GATACTGGGATGTCCAGTGAGACACCTTCAGGGGAAACCCCTTCAAAGCCACCAGAACT	1320
421	-D--T--G--M--S--S--E--T--P--S--G--E--T--P--S--K--P--P--E--T-	440
1321	GACTGCTCTTCCTAG	1335
441	-D--C--S--S--*-	444
[0709]	<u>序列号88和90(Gope突变等位基因-8nt缺失)</u>	
[0710]	长度:1335bp和30aa	
[0711]	类型:cDNA(序列号:88)和蛋白(序列号:90)	
[0712]	生物体:尼罗罗非鱼	
1	ATGTCTGCTTCGACTGGATGCTCCCCAGCACTCGGGCCTTGTCGCCAGTATGTCCATGTT	60
1	-M--S--A--S--T--G--C--S--P--A--L--G--P--C--P--Q--Y--V--H--V-	20
[0713]		
61	TCGATGGCTAGAAAGTGCTGGAGAAGGAATTTGATAAGGCTTTTCGTGGATGTGGATCTGTC	120
21	-S--M--A--R--S--A--G--E--G--I--*-	30
[0714]	<u>序列号91和94(野生型DMRT-1)</u>	
[0715]	长度:882bp和293aa	
[0716]	类型:cDNA(序列号:91)和蛋白(序列号:94)	
[0717]	生物体:尼罗罗非鱼	
1	ATGAGCCAGGACAAACAGAGTAAGCAGGTACCGGATTGCAGCGGACCGATGTCCCCGACC	60
1	-M--S--Q--D--K--Q--S--K--Q--V--P--D--C--S--G--P--M--S--P--T-	20
[0718]		
61	AAAGCCCAGAAATCCCCAGGATGCCCAAGTGCTCTCGCTGTAGAAATCACGGATACGTG	120
21	-K--A--Q--K--S--P--R--M--P--K--C--S--R--C--R--N--H--G--Y--V-	40

121	TCTCCACTGAAGGGACACAAGCGCTTTTGCAACTGGAGGGACTGCCAGTGTCCCAAATGC	180
41	-S--P--L--K--G--H--K--R--F--C--N--W--R--D--C--Q--C--P--K--C-	60
181	AAATTGATCGCGGAGAGGCAGAGAGTCATGGCGGCCAGGTTGCTCTGAGGAGGCAGCAG	240
61	-K--L--I--A--E--R--Q--R--V--M--A--A--Q--V--A--L--R--R--Q--Q-	80
241	GCCCAAGAAGAAGAGCTTGGGATTGTAGTCCTGTGTCTCTGTCCGGTTCCGAGATGATG	300
81	-A--Q--E--E--E--L--G--I--C--S--P--V--S--L--S--G--S--E--M--M-	100
301	GTCAAGAATGAAGTTGGAGCAGACTGCCTGTTCTCTGTGGAGGGACGGTCCCCGACACCT	360
101	-V--K--N--E--V--G--A--D--C--L--F--S--V--E--G--R--S--P--T--P-	120
361	ACCAGCCACGCCACCTCTGCTGTACAGGGACCCGCTCGGCATCGTCCCCAGCCCATCT	420
121	-T--S--H--A--T--S--A--V--T--G--T--R--S--A--S--S--P--S--P--S-	140
421	GCTGCTGCCAGGGCTCATACCGAGGGACCGTCTGACCTCCTGCTGGAAACCCCTATTAC	480
141	-A--A--A--R--A--H--T--E--G--P--S--D--L--L--L--E--T--P--Y--Y-	160
[0719]	481 AATTTCTACCAGCCTTCGCGCTACCCACCTACTATGGAAACCTTTACAACCTACTCGCAG	540
161	-N--F--Y--Q--P--S--R--Y--P--T--Y--Y--G--N--L--Y--N--Y--S--Q-	180
541	TACCAGCAGATGCCTCATGGTGATGGCCGCCTGCCAGCCACAGCGTGTCTCTCAGTAC	600
181	-Y--Q--Q--M--P--H--G--D--G--R--L--P--S--H--S--V--S--S--Q--Y-	200
601	CGCATGCACTCCTACTACCCAGCAGCCACCTACCTGACTCAGGGCCTGGGCTCCACCAGC	660
201	-R--M--H--S--Y--Y--P--A--A--T--Y--L--T--Q--G--L--G--S--T--S-	220
661	TGTGTGCCACCCTTCTTTAGCCTGGATGACAACAATAACAGCTGCTCTGAGACCATGGCA	720
221	-C--V--P--P--F--F--S--L--D--D--N--N--N--S--C--S--E--T--M--A-	240
721	GCCTCCTTCTCACC CGCAGCATCTCCGCTGGTCACGACTCCACCATGGTCTGCCGCTCC	780
241	-A--S--F--S--P--G--S--I--S--A--G--H--D--S--T--M--V--C--R--S-	260
781	ATCAGCTCCCTGGTTAACGGCGACGCCAAGGCTGAATGCGAGGCCAGCAGCCAGGCAGCC	840
261	-I--S--S--L--V--N--G--D--A--K--A--E--C--E--A--S--S--Q--A--A-	280
841	GGCTTCACCGTCGACGCCATCGAAGGCGGCGCCACCAAATAA	882
281	-G--F--T--V--D--A--I--E--G--G--A--T--K--*-	293

[0720] 序列号92和95 (DMRT-1突变等位基因-7nt缺失)

[0721] 长度:882bp和40aa

[0722] 类型:cDNA(序列号:92) 和蛋白(序列号:95)

[0723] 生物体:尼罗罗非鱼

	1	ATGAGCCAGGACAAACAGAGTAAGCAGGTACCGGATTGCAGCGGACCCCGACCAAAGCCC	60
	1	-M--S--Q--D--K--Q--S--K--Q--V--P--D--C--S--G--P--R--P--K--P-	20
[0724]	61	AGAAATCCCCCAGGATGCCCAAGTGCTCTCGCTGTAGAAATCACGGATACGTGTCTCCAC	120
	21	-R--N--P--P--G--C--P--S--A--L--A--V--E--I--T--D--T--C--L--H-	40
	121	TGAAGGGACACAAGCGCTTTTGCAACTGGAGGGACTGCCAGTGTCCCAAATGCAAATTGA	180
	41	-*-	40
[0725]	序列号93和96(DMRT-1突变等位基因-13nt缺失)		
[0726]	长度:882bp和38aa		
[0727]	类型:cDNA(序列号:93)和蛋白(序列号:96)		
[0728]	生物体:尼罗罗非鱼		
	1	ATGAGCCAGGACAAACAGAGTAAGCAGGTACCGGATTGCAGCGGACCAAAGCCCAGAAAT	60
	1	-M--S--Q--D--K--Q--S--K--Q--V--P--D--C--S--G--P--K--P--R--N-	20
[0729]	61	CCCCCAGGATGCCCAAGTGCTCTCGCTGTAGAAATCACGGATACGTGTCTCCACTGAAGG	120
	21	-P--P--G--C--P--S--A--L--A--V--E--I--T--D--T--C--L--H--*-	38
[0730]	序列号97和100(野生型GSDF)		
[0731]	长度:840bp和213aa		
[0732]	类型:cDNA(序列号:97)和蛋白(序列号:100)		
[0733]	生物体:尼罗罗非鱼		
	1	AACAGGGGAAAAGTCTACAGTGTTAACTATGTCAAGGCCACCTTGGGGTACAAGCAGATA	60
	61	AAAACCGTGGTTCTCAGACCCTGACAAACAATACCTAGGGCAGCATCCCAGTTTTGTCTGC	120
	121	TACTATCTCTCTCCGACCAGACGTTCCGGACCAACCGCAGCTTTTGTCTGCAGCCAGT	180
	181	CTTACGTGTTTCATCCACCATGGCCTTTCCATTTCATGTCATGACATTACTTTTGGGCTCT	240
[0734]		-M--A--F--P--F--I--V--M--T--L--L--L--G--S-	14
	241	TCCATGATGATGGCATTGTCTTGATCCATCCAGGAAAGAACCCGAAGCTGCCGTCTTA	300
	15	-S--M--M--M--A--F--V--L--D--P--S--R--K--E--P--E--A--A--V--L-	34
	301	GGTGACAGGTGCCAAGGTGAGTCATGGCAGTCCATCAGAAAGAACCTCCTTAGGGTTCTG	360
	35	-G--D--R--C--Q--G--E--S--W--Q--S--I--R--K--N--L--L--R--V--L-	54
	361	AACTTGCAGACTGAGCCGCAGCTACCTGCCGGTGCAGTGGACAGTGTGAGAGCAGTGG	420

	55 -N--L--Q--T--E--P--Q--L--P--A--G--A--L--D--S--V--R--E--Q--W-	74
	421 AACCGAACCTTCAGCATCGTTTCTCACACAGCCAAGCATACTGCAACCCCAGCAGTCCCA	480
	75 -N--R--T--F--S--I--V--S--H--T--A--K--H--T--A--T--P--A--V--P-	94
	481 GGCTACTCTGCATCAGCTGATAATGGAAACAGTGCGAGCCTGAAGTGTGTTCCATTGCC	540
	95 -G--Y--S--A--S--A--D--N--G--N--S--A--S--L--K--C--C--S--I--A-	114
	541 TCAGAGATCTTCATGAAAGATCTGGGCTGGGACAGCTGGGTGATCCACCCGTTGAGTCTT	600
	115 -S--E--I--F--M--K--D--L--G--W--D--S--W--V--I--H--P--L--S--L-	134
[0735]	601 ACCTATGTTTCAGTGCGCAACCTGCAACTCTGCCATGACCACTGTTCAATGTCCATCATCC	660
	135 -T--Y--V--Q--C--A--T--C--N--S--A--M--T--T--V--Q--C--P--S--S-	154
	661 CAAGTAAATGTCCAGGATGCCAACACACAGGACCAGGTGCCATGCTGTCGGCCCACCTCC	720
	155 -Q--V--N--V--Q--D--A--N--T--Q--D--Q--V--P--C--C--R--P--T--S-	174
	721 CAAGAAGAGGTGCCCATAGTCTATATGGATGGATCCAGCGCCATTGTCATGTCTCCATG	780
	175 -Q--E--E--V--P--I--V--Y--M--D--G--S--S--A--I--V--M--S--S--M-	194
	781 CAGCTGACCCGCAGTTGTGGCTGTGAGCTGGGCAACTCTGAGGATCGTGGCAAGGAGTAG	840
	195 -Q--L--T--R--S--C--G--C--E--L--G--N--S--E--D--R--G--K--E--*-	213
[0736]	序列号98和101 (GSDF突变等位基因-5nt缺失)	
[0737]	长度:840bp和56aa	
[0738]	类型:cDNA(序列号:98)和蛋白(序列号:101)	
[0739]	生物体:尼罗罗非鱼	
	1 AACAGGGGAAAAGTCTACAGTGTTAACTATGTCAAGGCCACCTTGGGGTACAAGCAGATA	60
		
	61 AAAACCGTGGTTCTCAGACCCTGACAAACAATACCTAGGGCAGCATCCCAGTTTTGTCGC	120
		
	121 TACTATCTCCTCCTCCGACCAGACGTTTCGGGACCAACCGCAGCTTTTGTCTGCAGCCAGT	180
		
	181 CTTACGTGTTTCATCCACCATGGCCTTTCCATTTCATTGTCATGACATTACTTTTGGGCTCT	240
	-M--A--F--P--F--I--V--M--T--L--L--L--G--S-	14
[0740]	241 TCCATGATGATGGCATTGTCTTGGATCCATCCAGGAAAGAACCCGAAGCTGCCGTCTTA	300
	15 -S--M--M--M--A--F--V--L--D--P--S--R--K--E--P--E--A--A--V--L-	34
	301 GGTGACAGGTGCCAAGGTGAGTTCATGGCAGTCCATCAGAAAGAACCTCCGTTCTGAACTT	360
	35 -G--D--R--C--Q--G--E--S--W--Q--S--I--R--K--N--L--L--R--S--E-	54
	361 GCAGACTGAGCCGCAGCTACCTGCCGGTGCAGTGGACAGTGTGAGAGAGCAGTGGAAACCG	420
[0741]	55 -L--A--*-	56

[0742] 序列号99和102 (GSDF突变等位基因-22nt缺失)

[0743] 长度:840bp和46aa

[0744] 类型:cDNA(序列号:99) 和蛋白(序列号:102)

[0745] 生物体:尼罗罗非鱼

1 AACAGGGGAAAAGTCTACAGTGTTAACTATGTCAAGGCCACCTTGGGGTACAAGCAGATA 60
.....
61 AAAACCGTGGTTCTCAGACCCCTGACAAACAATACCTAGGGCAGCATCCCAGTTTTGTTCGC 120
.....
121 TACTATCTCCTCCTCCGACCAGACGTTCTGGGACCAACCGCAGCTTTTGTCTGCAGCCAGT 180
.....
181 CTTACGTGTTTCATCCACCATGGCCTTTCCATTTCATGTCATGACATTACTTTTGGGCTCT 240
[0746]-M--A--F--P--F--I--V--M--T--L--L--L--G--S- 14

241 TCCATGATGATGGCATTGTCTTGGATCCATCCAGGAAAGAACCCGAAGCTGCCGTCTTA 300
15 -S--M--M--M--A--F--V--L--D--P--S--R--K--E--P--E--A--A--V--L- 34

301 GGTGACAGGTGCCAAGGTGAGTCATGGCAGTCCATCTGAACCTTGCAGACTGAGCCGCAGC 360
35 -G--D--R--C--Q--G--E--S--W--Q--S--I--*- 46

[0747] 序列号103和105 (野生型FSHR)

[0748] 长度:5853bp和689aa

[0749] 类型:cDNA(序列号:103) 和蛋白(序列号:105)

[0750] 生物体:尼罗罗非鱼

1 GCATTCACTACTGCATGACAGAAAACACCAAAACACCTCACATTTCTCTCTAGCTGACCT 60
.....
61 GGCGCCGAACCCCTCGAGCGGACAGACAGGCAAAGGCGTTTCATATCAAATGTGGAGTGTGG 120
.....-M--W--S--V-- 4

121 ACCAGAGACAATATCAGAGTAAAATACACAAAAGAAGACAAACTAGAAAAGTGAAACCAC 180
[0751] 5 D--Q--R--Q--Y--Q--S--K--I--H--K--R--R--Q--T--R--K--V--K--P-- 24

181 TCTGTGGACCCAGGCAGACTGAAATGATGCTGGTGATGTTTGGAGTCACGGCGTTTCCCT 240
25 L--C--G--P--R--Q--T--E--M--M--L--V--M--F--G--V--T--A--F--P-- 44

241 CCAACATCTCCAACGCCCAGTGCCTGGAAGTTAAGCAGACGCAGATCAGAGAGATTTCAGC 300
45 S--N--I--S--N--A--Q--C--L--E--V--K--Q--T--Q--I--R--E--I--Q-- 64

301	AGGGCGCCCTCTCCAGCCTCCAGCATCTAATGGAAGTACCATTCTGAGAACGACCTGC	360
65	Q--G--A--L--S--S--L--Q--H--L--M--E--L--T--I--S--E--N--D--L--	84
361	TGGAGAGTATCGGTGCTTTTGCCTTTTCTGGCCTCCCTCACCTCACCAAAATCTTAATAT	420
85	L--E--S--I--G--A--F--A--F--S--G--L--P--H--L--T--K--I--L--I--	104
421	CTAAAAATGCTGCTCTGAGGAATATCGGGGCTTTTGTCTTCTCCAACCTCCCTGAACTCA	480
105	S--K--N--A--A--L--R--N--I--G--A--F--V--F--S--N--L--P--E--L--	124
481	GTGAGATAATCATAACAAAATCAAAACACCTGAGTTTCATCCACCCCGATGCATTGAGGA	540
125	S--E--I--I--I--T--K--S--K--H--L--S--F--I--H--P--D--A--F--R--	144
541	ACATGGCAAGACTACGGTCTTGACTATCTCCAACACCGGGCTGAGGATTTTCCAGACT	600
145	N--M--A--R--L--R--F--L--T--I--S--N--T--G--L--R--I--F--P--D--	164
601	TCTCCAAGATCCATTCCACCGCCTGCTTTCTGCTGGATCTTCAGGACAACAGCCACATAA	660
165	F--S--K--I--H--S--T--A--C--F--L--L--D--L--Q--D--N--S--H--I--	184
661	AGAGAGTCCCTGCCAATGCCTTCAGAGGCCTCTGCACTCAAACCTTCGCAGAGATACGGC	720
185	K--R--V--P--A--N--A--F--R--G--L--C--T--Q--T--F--A--E--I--R--	204
[0752]	721 TCACCAGAAATGGCATCAAGGAGGTGGCAAGTGACGCCTTCAACGGAACAAAGATGCACA	780
205	L--T--R--N--G--I--K--E--V--A--S--D--A--F--N--G--T--K--M--H--	224
781	GACTGTTCTTAGGAGGCAACCGACAGCTTACTCACATCAGTCCCAATGCCTTTGTGGGTT	840
225	R--L--F--L--G--G--N--R--Q--L--T--H--I--S--P--N--A--F--V--G--	244
841	CCAGTGAGTTGGTGGTACTAGACGTCTCCGAAACAGCCCTCACCTCTTTGCCAGACTCGA	900
245	S--S--E--L--V--V--L--D--V--S--E--T--A--L--T--S--L--P--D--S--	264
901	TCCTTGATGGCCTCAAGAGGCTGATTGCCGAGTCAGCCTTCAACCTGAAAGAACTTCCTC	960
265	I--L--D--G--L--K--R--L--I--A--E--S--A--F--N--L--K--E--L--P--	284
961	CTATTCAGCTCTTTACCAAAGTGCACCAGGCAAAGCTGACATACCCATCACACTGCTGCG	1020
285	P--I--Q--L--F--T--K--L--H--Q--A--K--L--T--Y--P--S--H--C--C--	304
1021	CTTTCCTGAACATGCACAGAAACAGATCGAGATGGCACTCACTGTGTGACAACCCCGAGG	1080
305	A--F--L--N--M--H--R--N--R--S--R--W--H--S--L--C--D--N--P--E--	324
1081	CTAAAAATAACCTGCACTTCTTCAGGAATACTGCTCCAACCTCCACCAACATCACTTGCA	1140
325	A--K--N--N--L--H--F--F--R--E--Y--C--S--N--S--T--N--I--T--C--	344
1141	GCCCGGCCCTGATGACTTTAACCCCTGTGAAGATATCATGTCTGTACCCCTTACGCA	1200

345	S--P--A--P--D--D--F--N--P--C--E--D--I--M--S--A--T--P--L--R--	364
1201	TCCTCATCTGGATCATCTCTGTCTCGCCCTGCTGGGCAACGCAGTAGTTCTCCTTGAT	1260
365	I--L--I--W--I--I--S--V--L--A--L--L--G--N--A--V--V--L--L--V--	384
1261	TGTTAGGCAGCCGCTATAAGCTGACTGTTCTCGATTCTCATGTGCCACCTGGCCTTTG	1320
385	L--L--G--S--R--Y--K--L--T--V--P--R--F--L--M--C--H--L--A--F--	404
1321	CTGACCTCTGCATGGGCATCTACCTGGTAGTCATAGCAACCGTGGATATGCTCACACGTG	1380
405	A--D--L--C--M--G--I--Y--L--V--V--I--A--T--V--D--M--L--T--R--	424
1381	GACGGTACTACAACCTATGCTATAGACTGGCAGATGGGCTTGGGCTGCAATGCTGCAGGCT	1440
425	G--R--Y--Y--N--Y--A--I--D--W--Q--M--G--L--G--C--N--A--A--G--	444
1441	TCTTCACGGTGTTCCGAGTGAGCTGTCTAGTGTTCCTTGACAGCAATCACCGTGGAGC	1500
445	F--F--T--V--F--A--S--E--L--S--V--F--T--L--T--A--I--T--V--E--	464
1501	GCTGGCACACCATCACGCATGCTCTGCGACTTGACCGCAAACCTTCGCCTGAGACACGCCT	1560
465	R--W--H--T--I--T--H--A--L--R--L--D--R--K--L--R--L--R--H--A--	484
1561	GCATCATCATGACAATAGGTTGGATCTTCTCCTTGCTGGCTGCACTGCTGCCCACAGTTG	1620
[0753] 485	C--I--I--M--T--I--G--W--I--F--S--L--L--A--A--L--L--P--T--V--	504
1621	GGATCAGCAGCTATGGCAAAGTGAGCATCTGCCTCCCCATGGATGTTGAGTCCCTAGTCT	1680
505	G--I--S--S--Y--G--K--V--S--I--C--L--P--M--D--V--E--S--L--V--	524
1681	CCCAGTTCTACGTGGTCTGTCTTCTCCTCCTCAACATCTTGGCGTTCTTCTGTGTGCG	1740
525	S--Q--F--Y--V--V--C--L--L--L--L--N--I--L--A--F--F--C--V--C--	544
1741	GCTGCTACCTCAGCATCTACCTACCTTTCGCAAGCCTTCATCAGCGGCAGCCCACGCCG	1800
545	G--C--Y--L--S--I--Y--L--T--F--R--K--P--S--S--A--A--A--H--A--	564
1801	ACACCCGTGTGGCTCAACGCATGGCCGTCCTCATCTTCACAGACTTCATCTGCATGGCTC	1860
565	D--T--R--V--A--Q--R--M--A--V--L--I--F--T--D--F--I--C--M--A--	584
1861	CGATCTCCTTCTTCGCCATCTCAGCTGCCCTCAAGCTCCCTCTCATCACCGTCTCAGACT	1920
585	P--I--S--F--F--A--I--S--A--A--L--K--L--P--L--I--T--V--S--D--	604
1921	CCAAGCTACTGTTGGTGCTATTCTACCCCATCAACTCGTGCTCCAACCCCTTCTTATATG	1980
605	S--K--L--L--L--V--L--F--Y--P--I--N--S--C--S--N--P--F--L--Y--	624
1981	CCTTTTTACCCGTAACCTCAGAAGGGATTCTTTCTCCTCGCAGCTCGCTTCGGGCTGT	2040
625	A--F--F--T--R--N--F--R--R--D--F--F--L--L--A--A--R--F--G--L--	644

2041	TTAAGACTCGAGCACAGATTTACCGGACAGAGGGTTCCTCGTGTCAGCAGCCAACATGGA	2100
645	F--K--T--R--A--Q--I--Y--R--T--E--G--S--S--C--Q--Q--P--T--W--	664
2101	CCTCTCCAAAGAACAGCCGTGTTATCTTGTATTCCCTTGGTCAATACGTTAAGTCTAGATG	2160
665	T--S--P--K--N--S--R--V--I--L--Y--S--L--V--N--T--L--S--L--D--	684
2161	GAAAACAAGAGTGCTGACTTTTACGCACATTTACAGGTACGGACTGTTTGCCTTGATTGC	2220
685	G--K--Q--E--C--*-.....	689
2221	ATATTATATCCATACAAACAGGCTGCTAATTCCCTTAAAATGATGCCTCAGATCATGTCTT	2280
		
2281	TTGATCACTACCTGGGAAAATTTTCTATCTACTTAGACTAGAAAGAAAAAACACAAA	2340
		
2341	AGGCAACCAAGTGAAGGCAAAAGAGCTGAGAACTCTTTTTTGACAATTTGACCCAGGAG	2400
		
2401	TCTGCAAAACACAGTGATTGTTAAAATAAACAATGCTCTTGCTCTTGCTTCTGTTGTGC	2460
		
2461	TCCTAATCTGATGCTGTGTTTTTTGGGCTTGAGCCAGTGAAGGCTTCCACTGAAGACTGC	2520
		
2521	TCTTCAGTCAATAAATAGCATCCAGAGACCCAGCTCTCAACAGAGGTGATGATCCTCTAT	2580
		
[0754] 2581	ATAAAGATGTTGGTCAGTTCAACAAAGAAGTTGATGCTTGTCTCTGTGCAAGTCTGAGAT	2640
		
2641	CTCTGTTAGGGATGTACATGTACAAGTGGTCAAGATTGGACTTCCAGGCCATGAGACCAG	2700
		
2701	AGGTCTACAAGTCACAAAACCTTTTAAAGCTTTTTATAAAATTATATATATCTATGTCGC	2760
		
2761	CACAATCTGAGCAGTTCAGACACTGATGATTCCAGACTGATCACTGACCCAAGAGAAAGC	2820
		
2821	ATGCATACATGTTCCACCTGTCTTTTAAGGTTACACATAAATCAACATGTTTCAATCAC	2880
		
2881	AATAGTATCAGTTGACTATTTCAGCACAAAGTACACACAGCGTTCAGTGGCATGTCTAAAC	2940
		
2941	CTGGTTACCTGAGCTATGCTCTGCAGCAATCCATGCAAACATGACCACAAAAGAACTAAT	3000
		
3001	TATACACTCACTGGCCACTTTATTAGGTATACTTGTTTGGCTGCTTGGTAATGCAAATAC	3060
		
3061	TTAATGAGCCAATCGCATGGTAGCAGCTCAGTGCATTTAGACATGTAATCTGGGGCATT	3120
		
3121	TTAAGATTTTTTAAATGTGGTGGCACGGCAGAGACCAAGAACACAGTAGAGGGGGACATT	3180
		
3181	TAAATATTTGATTAGCAAAAAGATCAGAAAAGTACAGAAATTATTGGGCATGATTTTTG	3240
		
3241	GTGTGCAACCTTATGTTTTATTACAAGTTTATTGTGTGAAAAGTGGTGCTGCAGAATGCT	3300

[0755]

.....
3301 CTACATAGAATTTTGTGTTGGACAATTGTTTTGCAACGTGGAAAAAGAAGTATTTAGACT 3360
.....
3361 TAACCTAAGTAAAAGTTGTAATTGCACTTAAATAGCTTAATAGTTCACAAGTTATATAAT 3420
.....
3421 CAAAATGTATTCAAAGTGCCTAAAGTAAACACACTCTTTATATAGAATGGCCCTTTTTTT 3480
.....
3481 CTCGTCTCTTTAATGAGGCAGCTGTTGATGAGTTTGATTCTGATATATTGTTCAATAGA 3540
.....
3541 TTCATTTATAAAAAATACAATTAATGTACAAAATAAGAAGAAGCTAAAAATAATTTGGGGT 3600
.....
3601 GGGCTAATGCCACTCCAAGCTCCTCCCCCTCCAAACATGCCTCTATGTAGACATAATCAA 3660
.....
3661 GACAACTTGCTAAAGTTCAAATGAGCATCAGAATGGGAAAAAGGTGACTGAAGTGACTT 3720
.....
3721 TGAAAGTTAATTGTTGTTGGTGCCAGATGGTCCCACATGTCGCCACAATCTGCTGGCCG 3780
.....
3781 GACTGCAAACTGATAGGAAAGCAACAGTAACTTAAATAACTTCTATACAATCAAGGTGTA 3840
.....
3841 CAAGTTACATAAGAAAAGTGGGCATCACTTAGTCTGATAACTCTTGATTCTATTCTGAC 3900
.....
3901 ATTCTTATAGTAGGTTCAAGTTTGTATTTAACTGAGCAAAGTCAAGTCAAGGCTCAGAT 3960
.....
3961 CATCTAAAAGTATTTCTTGAAAATGAAAAGGAGTTCAACACAGTCACCAATTTCAATC 4020
.....
4021 CAGCAGAGCACATTTGGGATTTAGTCAAATGGGAGATTGCCATCACAGATGTGCAGCTGA 4080
.....
4081 CAACTTGCAGCACCTGTGTGATGCTATCACATCAATATGGACCACAATCTCTGAGGAAT 4140
.....
4141 GTTTCCTCCACTCAATTCCAGTTGAATATATTTTAAAAATTAAGACAGTGTGAAGACAAA 4200
.....
4201 GGGGTGTTTAACTAGCAAAATGTACCCAATAAAGTAGCTAGTGAGTGTAGTTTACTAA 4260
.....
4261 ATCTGGGTCAGACAGCTCTTTTAGATACCCATGGGTTTCTTTTAACTCAAGTGAAGTGCC 4320
.....
4321 AGATGGGTGGAGTTCTCAGCAACATAATTTAGAGGTAAAAGAAGAAAAGATGGAGGGGG 4380
.....
4381 GAGAAAATAATGACTTCATCTACTATGTAACAAACACCATCCGTCTGGCATCCCAAGAT 4440
.....
4441 AATCTAACAACTAAAATGCCTCAGAATGGTTTAAAGCAGGTTGGATGCTTGGGATTTC 4500
.....
4501 AGCATATGCACACTGCAAAAGAAACATATTCATTCAACATTCAGTGCTGTGATTGAATGA 4560
.....
4561 TATTCATTAAGAAGAACTGCAGGGACCTGCTGATTAACAATCTCCTCATACACCCAGT 4620

		
4621	CTGCTGAACCTCTCAATGTCTACAATTTGCCACCAACTCCGTCTATTTTGTAGCCACAG	4680
		
4681	ACCTGTAATTATCTTTGAAATGTAATTATGTTTACGTTTCAAACAAACATCCAATTAAG	4740
		
4741	TGTCACTTTTGAATCTGTTTTCTGAAGAATATTTCAATGTGCTGTTTTTACACTATTT	4800
		
4801	TATAAAGTGTTTTATTATATCCTCTCAGCTTGAATAGATTTTGTATGATGAATGTGAGCG	4860
		
4861	TTTGAAGAGGCGTGACAAACAGAAAACTCTCTCACACACACATATGCAATAATTGAG	4920
		
4921	CTGTCTTTATCTAGCAATGCTGTCCTTCAGAGCATCCAAAGCTTCAAGGACAAAGTGAC	4980
		
4981	CCTCCCAACCTCTGCTCTGTGCAGCAAAGTGGGTGGGTGGGCGTAGGAGGAGAGGTACGC	5040
		
5041	AGCTGCTCTTTCTGCTTATTACGGGGGGATGGATATGGCAGCTAGATAAGCTGTGTGTGT	5100
		
5101	GCGCGCACACACACACACACACACACAATAGCAACCCACACTCTCAAGGCTGCAGC	5160
		
5161	TGCAAGAAGGAATCCAAGACCATCTCATTTGATATGGATACACTGCCTCCTACATGCCAAC	5220
		
[0756]	5221 ATTCAAAGTTAGGGTGCAATTATATACTTTCACCACCAGGTGATGCTACTGGGGCTAGAT	5280
		
5281	TTCTGGTGAGTTTACCTCCATCTGTTTGACAAAAGTCCAAACAAATTCACCAGTCTCAG	5340
		
5341	TAGATCCTACAAATTTTGCTCGATGTTGTCTTATGAGAAAAATAAATAAATAAATATTTT	5400
		
5401	TTTCCTAAATTTGCTTTTTTTTAAATAACTTTTTATTCTACATAATTTTCATAAAAGA	5460
		
5461	TTATATCAATTCCCTGCATGAGGATTAATGCTCATCAGACAGTTACCTGTCCCCTACATAC	5520
		
5521	ACTGTATTTCTTCTTCATTTTATATCATATCATATAGTTTCCAAGTAAAAGATAAATC	5580
		
5581	ACTCTAATGCATTTGCACTCAAATTTATGTGCACAAAAAAAAGTGAGTGTGCAATACAG	5640
		
5641	AAAGACATGCCGTTATGCTCTCTGACATCTTCTCTAGACAGCACTGGAGATGGTATAACA	5700
		
5701	AAACACCCTCAGTATAAAGCCTTCAAGTTCATGACTAATCGTTGGCAGCTAAACAATGCC	5760
		
5761	CTCTGGTGGTCGTCGTCGTCATAATAAATATACAAGTTAAAGTGTTAAAGTTGTATTCCACT	5820
		
5821	CAAAATCTGTAATTTGGTTTGGGGTCAGTGTCC	5853
		
[0757]	序列号104和106(FSHR突变等位基因-5nt缺失)	
[0758]	长度:5853bp和264aa	

[0759] 类型:cDNA(序列号:104)和蛋白(序列号:106)

[0760] 生物体:尼罗罗非鱼

```
1 GCATTCACTACTGCATGACAGAAAACACCAAAACACCTCACATTTCTCTCTAGCTGACCT 60
.....

61 GGCGCCGAACCCCTCGAGCGGACAGACAGGCAAAGGCGTTCATATCAAATGTGGAGTGTGG 120
.....-M--W--S--V-- 4

121 ACCAGAGACAATATCAGAGTAAAATACACAAAAGAAGACAAACTAGAAAAGTGAAACCAC 180
5 D--Q--R--Q--Y--Q--S--K--I--H--K--R--R--Q--T--R--K--V--K--P-- 24

181 TCTGTGGACCCAGGCAGACTGAAATGATGCTGGTGTGTTTGGAGTCACGGCGTTTCCCT 240
25 L--C--G--P--R--Q--T--E--M--M--L--V--M--F--G--V--T--A--F--P-- 44

241 CCAACATCTCCAACGCCAGTGCCTGGAAGTTAAGCAGACGCAGATCAGAGAGATTCAGC 300
45 S--N--I--S--N--A--Q--C--L--E--V--K--Q--T--Q--I--R--E--I--Q-- 64

301 AGGGCGCCCTCTCCAGCCTCCAGCATCTAATGGAAGTACCATTCTTGAGAACGACCTGC 360
65 Q--G--A--L--S--S--L--Q--H--L--M--E--L--T--I--S--E--N--D--L-- 84

[0761] 361 TGGAGAGTATCGGTGCTTTTGCCTTTTCTGGCCTCCCTCACCTCACCAAAATCTTAATAT 420
85 L--E--S--I--G--A--F--A--F--S--G--L--P--H--L--T--K--I--L--I-- 104

421 CTAAAAATGCTGCTCTGAGGAATATCGGGGCTTTTGTCTTCTCCAACCTCCCTGAACTCA 480
105 S--K--N--A--A--L--R--N--I--G--A--F--V--F--S--N--L--P--E--L-- 124

481 GTGAGATAATCATAACAAAATCAAAACACCTGAGTTTCATCCACCCCGATGCATTTCAGGA 540
125 S--E--I--I--I--T--K--S--K--H--L--S--F--I--H--P--D--A--F--R-- 144

541 ACATGGCAAGACTACGGTTCTTGACTATCTCCAACACCGGGCTGAGGATTTTCCAGACT 600
145 N--M--A--R--L--R--F--L--T--I--S--N--T--G--L--R--I--F--P--D-- 164

601 TCTCCAAGATCCATTCCACCGCCTGCTTTCTGCTGGATCTTCAGGACAACAGCCACATAA 660
165 F--S--K--I--H--S--T--A--C--F--L--L--D--L--Q--D--N--S--H--I-- 184

661 AGAGAGTCCCTGCCAATGCCTTCAGAGGCCTCTGCACTCAAACCTTCGCAGAGATACGGC 720
185 K--R--V--P--A--N--A--F--R--G--L--C--T--Q--T--F--A--E--I--R-- 204

721 TCACCAGAAATGGCATCAAGGAGGTGGCAAGTGACGCCTTCAACGGAACAAAGATGCACA 780
205 L--T--R--N--G--I--K--E--V--A--S--D--A--F--N--G--T--K--M--H-- 224
```

	781	GACTGTTTCCTAGGAGGCAACCGACAGCTTACTCACATCAGTCCCAATGCCTTTGTGGGTT	840
	225	R--L--F--L--G--G--N--R--Q--L--T--H--I--S--P--N--A--F--V--G--	244
[0762]	841	CCAGTGAGTTGGTGGTACTAGACGTCCTCCGAAACAGCCCTCTTTGCCAGACTCGATCCTT	900
	245	S--S--E--L--V--V--L--D--V--S--E--T--A--L--F--A--R--L--D--P--	264
	901	GATGGCCTCAAGAGGCTGATTGCCGAGTCAGCCTTCAACCTGAAAGAACTTCCTCCTATT	960
	265	*--	264
[0763]	序列号107和110(野生型VtgAa)		
[0764]	长度:4974bp和1657aa		
[0765]	类型:cDNA(序列号:107)和蛋白(序列号:110)		
[0766]	生物体:尼罗罗非鱼		
	1	ATGAGAGCGCTCGTGCTCGCCCTGATTCTGGCCTTTGTGGCTGGTGATCTTCAACATCAA	60
	1	-M--R--A--L--V--L--A--L--I--L--A--F--V--A--G--D--L--Q--H--Q--	20
	61	GATCCTGTTTTTTGAAGCTGATAAAACCTATGTGTACAAGTATGAGGCGCTGCTCCTGGCG	120
	21	-D--P--V--F--E--A--D--K--T--Y--V--Y--K--Y--E--A--L--L--L--A--	40
	121	GGCCTGCTCGAGAAAGGTTTCAGCGAGAGCTGGACTAAATATCAGCAGCAAAGTTAGCATC	180
	41	-G--L--L--E--K--G--S--A--R--A--G--L--N--I--S--S--K--V--S--I--	60
	181	AATGCTATAGACCAGAACACATACTTCATTAAGCTTGAGGAACCTGAGCTCCAGGAGTAT	240
	61	-N--A--I--D--Q--N--T--Y--F--I--K--L--E--E--P--E--L--Q--E--Y--	80
	241	AGTGAATTTGGCCTGAGGATCCTTTTATCCCAGCAACTGAGCTGACTTCAGCCCTCCAA	300
[0767]	81	-S--G--I--W--P--E--D--P--F--I--P--A--T--E--L--T--S--A--L--Q--	100
	301	GCTGAGCTCACGACTCCCATTAAGTTTGAATATGTCAATGGTGCTGTTGGAAGTCTTC	360
	101	-A--E--L--T--T--P--I--K--F--E--Y--V--N--G--A--V--G--K--V--F--	120
	361	GCCCCTGAAACCGTCTCAACAACAGTGCTTAACATCTACAGAGGTATCCTGAATGTCTTT	420
	121	-A--P--E--T--V--S--T--T--V--L--N--I--Y--R--G--I--L--N--V--F--	140
	421	CAGCTCAACGTCAAAAAGACACTAAATGTCTACGAGTTGCAGGAGGCTGGAACCTCAGGGT	480
	141	-Q--L--N--V--K--K--T--L--N--V--Y--E--L--Q--E--A--G--T--Q--G--	160
	481	GTGTGCAAGACACTTTACTCCATCACTGAGGACACAGAGGCTGAACGTGTCTATCTGAGA	540
	161	-V--C--K--T--L--Y--S--I--T--E--D--T--E--A--E--R--V--Y--L--R--	180
	541	AAGACCAGGGACATGAGCCACTGTCAAGAAAGAATAACTAAAGACATGGGGTTAGCATAC	600

181	-K--T--R--D--M--S--H--C--Q--E--R--I--T--K--D--M--G--L--A--Y-	200
601	ACAGAGAAATGTGGAAAGTGCCAGGAGGACACTAAAAACCTGAAAGGAGTTTCATCATAC	660
201	-T--E--K--C--G--K--C--Q--E--D--T--K--N--L--K--G--V--S--S--Y-	220
661	AGTTACATCATGAAACCACTCGATAATGGCATCCAGATCAAGGAGGCATCGGTCCATGAG	720
221	-S--Y--I--M--K--P--L--D--N--G--I--Q--I--K--E--A--S--V--H--E-	240
721	CTGATCCAGTTCTCACCTTTCAGTGAGCAGCATGGAGCCGCCCATATGGAGACCAAGCAA	780
241	-L--I--Q--F--S--P--F--S--E--Q--H--G--A--A--H--M--E--T--K--Q-	260
781	TCCTTGATGCTCCTTGACGTTCTGAAGACCCCTTATGCACCCACTACACCACCACCCAG	840
261	-S--L--M--L--L--D--V--R--R--P--P--Y--A--P--T--T--P--P--P--Q-	280
841	GCTGAGTATTCACACCGTGGAATCTCACATATCAGTTCTCCACTGAGCTTCTTCAGTTA	900
281	-A--E--Y--S--H--R--G--N--L--T--Y--Q--F--S--T--E--L--L--Q--L-	300
901	CCCATTCTGCTCCTCAATATCAACGACATAGAGTCTCAGCTCGAGGACACTCTGGTCAAA	960
301	-P--I--L--L--L--N--I--N--D--I--E--S--Q--L--E--D--T--L--V--K-	320
961	CAGGCTGTAGAAAGAGTTCATGAAGATGCACCTCTGGAATTTTTGAAGTTTGTTCAACTC	1020
[0768] 321	-Q--A--V--E--R--V--H--E--D--A--P--L--E--F--L--K--F--V--Q--L-	340
1021	CTCCGTGCAGCCTCCAATGAAACTCTGGAGAACCTCTGGAGCAAACACTCAGGGATTCT	1080
341	-L--R--A--A--S--N--E--T--L--E--N--L--W--S--K--H--S--G--I--S-	360
1081	CCCCACAGAAAATGGATCATGGACGCCATCCCTGCTGTGGGAAATCCTGATGCTCTGAGA	1140
361	-A--H--R--K--W--I--M--D--A--I--P--A--V--G--N--P--D--A--L--R-	380
1141	TTTATCAAAGAGAAATACCTAGCAGAAACCATAACTGTGTTTGAAGCCGTTCAGGCTTTG	1200
381	-F--I--K--E--K--Y--L--A--E--T--I--T--V--F--E--A--V--Q--A--L-	400
1201	ATTACTTCATTTACATGGTGACAGCAACCACTGAGGCCATTGAGGTCATCGAGAGCCTA	1260
401	-I--T--S--F--H--M--V--T--A--T--T--E--A--I--E--V--I--E--S--L-	420
1261	ACAAAGGAAAGCAAAATAGTGAGAAACCCAGTTCTGCGTCAGATTGTATTCTTGGCTAC	1320
421	-T--K--E--S--K--I--V--R--N--P--V--L--R--Q--I--V--F--L--G--Y-	440
1321	GGTACCATGATTTACAAACACTGCTATGAGAGGACTTCCTGTCCTGCTGAGCTCATAAG	1380
441	-G--T--M--I--Y--K--H--C--Y--E--R--T--S--C--P--A--E--L--I--Q-	460
1381	CCCATTCAAGACCTTCTTGCGCAGGCACTGAAAGATGGAACACAGAGGACATCATCCTG	1440
461	-P--I--Q--D--L--L--A--Q--A--L--K--D--G--N--T--E--D--I--I--L-	480

1441	TTTGTGAAGGCTTTGGGAAATGCTGCGCATCCTTCTAGCCTCAAGAAAATCACAAAGATG	1500
481	-F--V--K--A--L--G--N--A--A--H--P--S--S--L--K--K--I--T--K--M-	500
1501	CTGCCCCCTACATAGTAAATTAGGTTTCATCACTGCCAGTGAGAGTTCATGCTGAAGCCATG	1560
501	-L--P--L--H--S--K--L--G--S--S--L--P--V--R--V--H--A--E--A--M-	520
1561	ATGGCCTTGAAGAACATCGCCAAAAAGGAGCCTAAAACGGTCCAGTATTTAGCCTTTCAG	1620
521	-M--A--L--K--N--I--A--K--K--E--P--K--T--V--Q--Y--L--A--F--Q-	540
1621	CTCTACGGGGACAAGACTCTTCATTCAGAGATCCGCATGCTTGCGTGCATGGTGTCTTTT	1680
541	-L--Y--G--D--K--T--L--H--S--E--I--R--M--L--A--C--M--V--L--F-	560
1681	GAGACAAAACCTTCAATGAGTTTGGTGTGCTGCTGTTGTTTCATATTGTGAAGACAGATACA	1740
561	-E--T--K--P--S--M--S--L--V--S--A--V--V--H--I--V--K--T--D--T-	580
1741	AATTTGCAAGTAGTAAGCTTCACCTATTTCCACATGAAGTCCCTGACTAGGAGCACCAGC	1800
581	-N--L--Q--V--V--S--F--T--Y--S--H--M--K--S--L--T--R--S--T--S-	600
1801	GTTATTTATGCCTCAGTTGCTGCAGCATGCAAAGCTGCCCTGAGAATGTTGGGCCCCAAC	1860
601	-V--I--Y--A--S--V--A--A--A--C--K--A--A--L--R--M--L--G--P--N-	620
[0769]	1861 CTGGACAAACTGAGCTCACGTTTCAGCAAAGCCATCCATGTCGACGTCTATAGCAGTCCC	1920
621	-L--D--K--L--S--S--R--F--S--K--A--I--H--V--D--V--Y--S--S--P-	640
1921	TTTATGCTTGGTGTGCTGCGACTGCTTACTACATCAATGATGCTGCCACCATCATGCCC	1980
641	-F--M--L--G--A--A--A--T--A--Y--Y--I--N--D--A--A--T--I--M--P-	660
1981	AAATCTATTACGACTAGGATCAAGGCTTTCTTTGCTGGAGCTGCTGCTGACATTCTGGAG	2040
661	-K--S--I--T--T--R--I--K--A--F--F--A--G--A--A--A--D--I--L--E-	680
2041	GTTGGAGTAAGAACTGAGGGACTACAGGAGGCTTTTCTGAAAAACCCAGCAGTTTTTGAT	2100
681	-V--G--V--R--T--E--G--L--Q--E--A--F--L--K--N--P--A--V--F--D-	700
2101	AGTGCTGACAGGGTCACCGAGATGAAACATGTCATTAAGGCTCTCTCTCACTGGAAGTCT	2160
701	-S--A--D--R--V--T--R--M--K--H--V--I--K--A--L--S--H--W--K--S-	720
2161	GCACCCAACAGCAAATCCCTGACTTCCATCTATGTCAAGTTCTTTGGACAAGAAGTTGCC	2220
721	-A--P--N--S--K--S--L--T--S--I--Y--V--K--F--F--G--Q--E--V--A-	740
2221	TTTGTGACTTTTGACAAAATCTGGTTTGACAACATCTTTAATCTCATCTTTGCCAATAAC	2280
741	-F--V--D--F--D--K--I--W--F--D--N--I--F--N--L--I--F--A--N--N-	760
2281	AATGCTGACACGTTTGGTAGAGATGTTTTCAAGGCTCTGCAGTCTGGTCCTACTTTGCGC	2340
761	-N--A--D--T--F--G--R--D--V--F--K--A--L--Q--S--G--P--T--L--R-	780

2341	TTTGTTAAGCCTCTGCTGGCTAATGAGGTGAGACGTATCATGCCTACTATAGCTGGTTTT	2400
781	-F--V--K--P--L--L--A--N--E--V--R--R--I--M--P--T--I--A--G--F-	800
2401	CCCATGGAGCTCGGTCTGTACACTGCTGCTGTGGCTGCTGTTCTGGTCAAATCAAAGTC	2460
801	-P--M--E--L--G--L--Y--T--A--A--V--A--A--V--P--G--Q--I--K--V-	820
2461	ACCACGACTCCAGCTCTGCCAGAAGACTTTTATCTCAGATACCTTCTCAAGGCAGATATA	2520
821	-T--T--T--P--A--L--P--E--D--F--Y--L--R--Y--L--L--K--A--D--I-	840
2521	CACATTAGTACCAAGGTCACACCAAGTGTGCTGTGAACACATTTGCTGTGTTTGGGATA	2580
841	-H--I--S--T--K--V--T--P--S--V--A--V--N--T--F--A--V--F--G--I-	860
2581	AACACTGCCATACTCCAGGCTGTCATGGTATCCAGAGCCAAACTCTACTCCATCACACCA	2640
861	-N--T--A--I--L--Q--A--V--M--V--S--R--A--K--L--Y--S--I--T--P-	880
2641	GCCAAACTGAAGTCACATTTAACATCAATGAGGGCTACTTGAATTTACAGCTCTTCCT	2700
881	-A--K--T--E--V--T--F--N--I--N--E--G--Y--L--N--F--T--A--L--P-	900
2701	GTTTCAGTGCCTGAAAACATTACAGCTGTGGAGGTTGAGACTTTTGCTGTGGTAAGAAAT	2760
901	-V--S--V--P--E--N--I--T--A--V--E--V--E--T--F--A--V--V--R--N-	920
[0770]	2761 CCTGCTTCGGGAGAAAGAATCACTCCTGTGATCCCTGCCAACCCAAGACAGATTCTTATA	2820
921	-P--A--S--G--E--R--I--T--P--V--I--P--A--N--P--R--Q--I--L--I-	940
2821	TCCAGTAATACTTCTTCTGATGCTGTTAGTGAGTCAAGATCCGAAGAGTTCATTTCTCAG	2880
941	-S--S--N--T--S--S--D--A--V--S--E--S--R--S--E--E--F--I--S--Q-	960
2881	CGTCAGAAAGCTGGCATGCACATCAAATCTAAATGGTGAAGAGTAAGAAGAAGTACTGC	2940
961	-R--Q--K--A--G--M--H--I--K--S--K--M--V--K--S--K--K--Y--C-	980
2941	GCTCAGACTGTAAACGCTGGACTCAAGGCCTGTCTCAAGATTGCCACTGCTTACACGGGG	3000
981	-A--Q--T--V--N--A--G--L--K--A--C--L--K--I--A--T--A--Y--T--G-	1000
3001	GATGCTGCAGTGTATAAACTGGCTGGAAAGCACTCCGCTGCTTTTTCTGTACACCAATT	3060
1001	-D--A--A--V--Y--K--L--A--G--K--H--S--A--A--F--S--V--T--P--I-	1020
3061	GAAGGTGAAGCTGCTGAGAGACTGGAATTAGAGGTTCAACTTGGAAGTAAGGCTGCACAG	3120
1021	-E--G--E--A--A--E--R--L--E--L--E--V--Q--L--G--S--K--A--A--Q-	1040
3121	AAGATCATCAAACACATCAGCTTAGAGAAGAAGAAATCCCAGAGGAAACACCAGTCTTA	3180
1041	-K--I--I--K--H--I--T--L--R--E--E--E--I--P--E--E--T--P--V--L-	1060
3181	ATGAAGCTCCACAAAATCCTGGCCTCTACCCAGAAGAATAGCACCATGTCCTCCTCATCC	3240

1061	-M--K--L--H--K--I--L--A--S--T--Q--K--N--S--T--M--S--S--S--S-	1080
3241	TCCAGTTCCAGGAGCTCTCGCTTTCATGTCAGATCCTCTTCTTCCAATTCCAGCTCTTCA	3300
1081	-S--S--S--R--S--S--R--F--H--V--R--S--S--S--S--N--S--S--S--S-	1100
3301	TCCCATTCTAGCAGGAAGACCATTGATGCAACTGCTCAACAAGTCTTCAGCTTCTCCACC	3360
1101	-S--H--S--S--R--K--T--I--D--A--T--A--Q--Q--V--F--S--F--S--T-	1120
3361	TCTGTCAGTACTTCCAAGTCCAGCTTTCATGTCAGCTTTCATCACTCTTCAGTCTTAGT	3420
1121	-S--V--S--T--S--K--S--S--F--A--S--S--F--A--S--L--F--S--L--S-	1140
3421	TCAAGCTCTTCTCACTACAGTGCACACCACAGAAAGCATCCTGCGAGTCGCCACAAACCC	3480
1141	-S--S--S--S--H--Y--S--A--H--H--R--K--H--P--A--S--R--H--K--P-	1160
3481	AAGGAGAAACACAAGCATCCACCTCTAAAGCCACATCGTCACAGGTTTCAAAAGCAGA	3540
1161	-K--E--K--H--K--H--P--T--S--K--A--T--S--S--Q--V--F--K--S--R-	1180
3541	AGCAGTGGCTCAAGCTTGGACGCTATCCAACATAAGAAGCGGTTCTTGACAGTCAAGCT	3600
1181	-S--S--G--S--S--L--D--A--I--Q--H--K--K--R--F--L--D--S--Q--A-	1200
3601	GCTATCTTTGGCATGATCTTCCGTGCTGTTAAAGCTGACACGAAGAAGCAGGGATACCAG	3660
[0771] 1201	-A--I--F--G--M--I--F--R--A--V--K--A--D--T--K--K--Q--G--Y--Q-	1220
3661	TTCAGTCTTACATGGACAAAACCACCAGCAGACTTCAAATCATTCTAGATGACATTGTT	3720
1221	-F--T--A--Y--M--D--K--T--T--S--R--L--Q--I--I--L--D--D--I--V-	1240
3721	CCTGATAACAACTGGAGGCTCTGTGCTGATGGAGCCGTGTTGAGCATGCACAAAGTCAAA	3780
1241	-P--D--N--N--W--R--L--C--A--D--G--A--V--L--S--M--H--K--V--K-	1260
3781	GCTAAATGAAGTGGGAGCAGAATGCAACCAATATGACACCACGATTACAACAGAAACT	3840
1261	-A--K--M--N--W--G--A--E--C--N--Q--Y--D--T--T--I--T--T--E--T-	1280
3841	GGTCTTGTCGGTCGAAACCCTGCAGCTCGGCTGAAGGTGGACTGGAATCGGCTACCGTCT	3900
1281	-G--L--V--G--R--N--P--A--A--R--L--K--V--D--W--N--R--L--P--S-	1300
3901	GATCTCAAGCACCATGCAAAGACGATGTATAAGTACATTTCTGCTCACATGCCTGCCGGC	3960
1301	-D--L--K--H--H--A--K--T--M--Y--K--Y--I--S--A--H--M--P--A--G-	1320
3961	TTGATTCAAGGAAAAGGACAGAAACAGCGACAAGCAGCTCTCGTTGACTGTGGCTGTAGTA	4020
1321	-L--I--Q--E--K--D--R--N--S--D--K--Q--L--S--L--T--V--A--V--V-	1340
4021	TCTGACAAGATCATCGACCTGATTTGGAAAACACCGAGAAGCACGTGTCATAAGCGGGCT	4080
1341	-S--D--K--I--I--D--L--I--W--K--T--P--R--S--T--V--H--K--R--A-	1360

	4081	TTGCATCTTCCCATCACTCTGCCACGTAACGAGATCAAAGATCTTACTTCCTTCAGTGAC	4140
	1361	-L--H--L--P--I--T--L--P--R--N--E--I--K--D--L--T--S--F--S--D-	1380
	4141	GTCTCTGGAAAAGTCAAGCACTTGTTAGCTGCGGCTGGCGCAGCTGAATGTAGCTTCACC	4200
	1381	-V--S--G--K--V--K--H--L--L--A--A--A--G--A--A--E--C--S--F--T-	1400
	4201	GACAATACGCTGACCACATTCAACAACAAGAAATTAAAGAACGAGATGCCCTCAAACCTGC	4260
	1401	-D--N--T--L--T--T--F--N--N--K--K--L--K--N--E--M--P--S--N--C-	1420
	4261	TATCAGGTTCTGGCACAGGATGGCACAGACGAGCTGAAATTCATCGTTCTACTGAGGAAG	4320
	1421	-Y--Q--V--L--A--Q--D--G--T--D--E--L--K--F--I--V--L--L--R--K-	1440
	4321	GATCGCACTGAACAGAAGCAGATCAGTGTGAAAATTGCTCATATAGACATTGACCTCTAT	4380
	1441	-D--R--T--E--Q--K--Q--I--S--V--K--I--A--H--I--D--I--D--L--Y-	1460
	4381	CAGAGGAGAACCAGTGTGACTGTGAATGTGAATGGGCTGGAAATACCCATGAGCAACCTG	4440
	1461	-Q--R--R--T--S--V--T--V--N--V--N--G--L--E--I--P--M--S--N--L-	1480
	4441	CCATATCGTTATCCCCAAGCTGACATCCAGATCAAACAAAATGGCGAAGGCATCTCTGTG	4500
	1481	-P--Y--R--Y--P--Q--A--D--I--Q--I--K--Q--N--G--E--G--I--S--V-	1500
[0772]	4501	TATGCAGCTAGCTATGGTCTTCATGAAGTCTACTTTGACAAGAAGTCATGGAAGATTAAA	4560
	1501	-Y--A--A--S--Y--G--L--H--E--V--Y--F--D--K--K--S--W--K--I--K-	1520
	4561	GTTGTGGACTGGATGAAGGGGAAGACTTGTGGGCTCTGTGGAAAGGCTGACGGGGAGACC	4620
	1521	-V--V--D--W--M--K--G--K--T--C--G--L--C--G--K--A--D--G--E--T-	1540
	4621	ATGCAGGAGTATCGCACACCCACTGGATGGATAGCCACGACAGCAGTGAGCTTTGCTCAT	4680
	1541	-M--Q--E--Y--R--T--P--T--G--W--I--A--T--T--A--V--S--F--A--H-	1560
	4681	TCTTGGATTCTGCCAGCTGAGAGCTGCAGAGACGCCACTGAGTGCCGTATGAGGCATGAA	4740
	1561	-S--W--I--L--P--A--E--S--C--R--D--A--T--E--C--R--M--R--H--E-	1580
	4741	TCTGTGCAGCTGGAGAAACAGGAAAACGTGCAAGCTCAGAACTCCAAGTGCTACTCTGTC	4800
	1581	-S--V--Q--L--E--K--Q--E--N--V--Q--A--Q--N--S--K--C--Y--S--V-	1600
	4801	GACCTGTGCTGCGCTGCATGGCTGGGTGCTTCCCTGTGCGCACCACCAACGTCAGTGTT	4860
	1601	-D--P--V--L--R--C--M--A--G--C--F--P--V--R--T--T--N--V--T--V-	1620
	4861	GGCTTCCACTGCCTTCCAGCTGGTTCCAGCCCTCCAGCATGTATACGAGCGTGACCTG	4920
	1621	-G--F--H--C--L--P--A--G--S--S--P--S--S--M--Y--T--S--V--D--L-	1640
	4921	ATGGAAACTACGGAGAGTCACCTCGCCTGCACCTGCACTGCTCAGTGTGCTTAA	4974
	1641	-M--E--T--T--E--S--H--L--A--C--T--C--T--A--Q--C--A--*-	1657

[0773] 序列号108和111(VtgAa突变等位基因-5nt缺失)

[0774] 长度:4974bp和279aa

[0775] 类型:cDNA(序列号:108)和蛋白(序列号:111)

[0776] 生物体:尼罗罗非鱼

```

1  ATGAGAGCGCTCGTGCTCGCCCTGATTCTGGCCTTTGTGGCTGGTGATCTTCAACATCAA      60
1  -M--R--A--L--V--L--A--L--I--L--A--F--V--A--G--D--L--Q--H--Q-      20

61  GATCCTGTTTTTGAAGCTGATAAAACCTATGTGTACAAGTATGAGGCGCTGCTCCTGGCG      120
21  -D--P--V--F--E--A--D--K--T--Y--V--Y--K--Y--E--A--L--L--L--A-      40

121  GGCCTGCTCGAGAAAGGTTTCAGCGAGAGCTGGACTAAATATCAGCAGCAAAGTTAGCATC      180
41  -G--L--L--E--K--G--S--A--R--A--G--L--N--I--S--S--K--V--S--I-      60

181  AATGCTATAGACCAGAACACATACCTTCATTAAGCTTGAGGAACCTGAGCTCCAGGAGTAT      240
61  -N--A--I--D--Q--N--T--Y--F--I--K--L--E--E--P--E--L--Q--E--Y-      80

241  AGTGAATTTGGCCTGAGGATCCTTTTATCCCAGCAACTGAGCTGACTTCAGCCCTCCAA      300
81  -S--G--I--W--P--E--D--P--F--I--P--A--T--E--L--T--S--A--L--Q-      100

301  GCTGAGCTCACGACTCCCATTAAGTTTGAATATGTCAATGGTGCTGTTGAAAAGTCTTC      360
101  -A--E--L--T--T--P--I--K--F--E--Y--V--N--G--A--V--G--K--V--F-      120

[0777] 361  GCCCCTGAAACCGTCTCAACAACAGTGCTTAACATCTACAGAGGTATCCTGAATGTCTTT      420
121  -A--P--E--T--V--S--T--T--V--L--N--I--Y--R--G--I--L--N--V--F-      140

421  CAGCTCAACGTCAAAAAGACACTAAATGTCTACGAGTTGCAGGAGGCTGGAACCTCAGGGT      480
141  -Q--L--N--V--K--K--T--L--N--V--Y--E--L--Q--E--A--G--T--Q--G-      160

481  GTGTGCAAGACACTTTACTCCATCACTGAGGACACAGAGGCTGAACGTGTCTATCTGAGA      540
161  -V--C--K--T--L--Y--S--I--T--E--D--T--E--A--E--R--V--Y--L--R-      180

541  AAGACCAGGGACATGAGCCACTGTCAAGAAAGAATAAATAAGACATGGGGTTAGCATAC      600
181  -K--T--R--D--M--S--H--C--Q--E--R--I--T--K--D--M--G--L--A--Y-      200

601  ACAGAGAAATGTGGAAAGTGCCAGGAGGACACTAAAAACCTGAAAGGAGTTTCATCATAC      660
201  -T--E--K--C--G--K--C--Q--E--D--T--K--N--L--K--G--V--S--S--Y-      220

661  AGTTACATCATGAAACCACTCGATAATGGCATCCAGATCAAGGAGGCATCGGTCCATGAG      720
221  -S--Y--I--M--K--P--L--D--N--G--I--Q--I--K--E--A--S--V--H--E-      240

721  CTGATCCAGTTCTCACCTTTTCAAGTGTGAGCAGCATGGAGCCGCCCATATGGAGACCAAGCAA      780
241  -L--I--Q--F--S--P--F--S--E--Q--H--G--A--A--H--M--E--T--K--Q-      260

```

[0778] 781 TCCTTGATGCTCCTTGACGTTCAAGACCCCTTATGCACCCACTACACCACCAGGCTGA 840
 261 -S--L--M--L--L--D--V--R--R--P--P--Y--A--P--T--T--P--P--G--*- 279

[0779] 序列号109和112(VtgAa突变等位基因-25nt缺失)

[0780] 长度:4974bp和301aa

[0781] 类型:cDNA(序列号:109)和蛋白(序列号:112)

[0782] 生物体:尼罗罗非鱼

1	ATGAGAGCGCTCGTGCTCGCCCTGATTCTGGCCTTTGTGGCTGGTGATCTTCAACATCAA	60
1	-M--R--A--L--V--L--A--L--I--L--A--F--V--A--G--D--L--Q--H--Q-	20
61	GATCCTGTTTTTGAAGCTGATAAAACCTATGTGTACAAGTATGAGGCGCTGCTCCTGGCG	120
21	-D--P--V--F--E--A--D--K--T--Y--V--Y--K--Y--E--A--L--L--L--A-	40
121	GGCCTGCTCGAGAAAGGTTTCAGCGAGAGCTGGACTAAATATCAGCAGCAAAGTTAGCATC	180
41	-G--L--L--E--K--G--S--A--R--A--G--L--N--I--S--S--K--V--S--I-	60
181	AATGCTATAGACCAGAACACATACTTCATTAAGCTTGAGGAACCTGAGCTCCAGGAGTAT	240
61	-N--A--I--D--Q--N--T--Y--F--I--K--L--E--E--P--E--L--Q--E--Y-	80
241	AGTGAATTTGGCCTGAGGATCCTTTTATCCCAGCAACTGAGCTGACTTCAGCCCTCCAA	300
81	-S--G--I--W--P--E--D--P--F--I--P--A--T--E--L--T--S--A--L--Q-	100
[0783]	301 GCTGAGCTCACGACTCCCATTAAGTTTGAATATGTCAATGGTGCTGTGGAAAAGTCTTC	360
101	-A--E--L--T--T--P--I--K--F--E--Y--V--N--G--A--V--G--K--V--F-	120
361	GCCCCTGAAACCGTCTCAACAACAGTGCTTAACATCTACAGAGGTATCCTGAATGTCTTT	420
121	-A--P--E--T--V--S--T--T--V--L--N--I--Y--R--G--I--L--N--V--F-	140
421	CAGCTCAACGTCAAAAAGACACTAAATGTCTACGAGTTGCAGGAGGCTGGAACCTCAGGGT	480
141	-Q--L--N--V--K--K--T--L--N--V--Y--E--L--Q--E--A--G--T--Q--G-	160
481	GTGTGCAAGACACTTTACTCCATCACTGAGGACACAGAGGCTGAACGTGTCTATCTGAGA	540
161	-V--C--K--T--L--Y--S--I--T--E--D--T--E--A--E--R--V--Y--L--R-	180
541	AAGACCAGGGACATGAGCCACTGTCAAGAAAGAATAACTAAAGACATGGGGTTAGCATAC	600
181	-K--T--R--D--M--S--H--C--Q--E--R--I--T--K--D--M--G--L--A--Y-	200
601	ACAGAGAAATGTGGAAAGTGCCAGGAGGACACTAAAAACCTGAAAGGAGTTTCATCATAC	660
201	-T--E--K--C--G--K--C--Q--E--D--T--K--N--L--K--G--V--S--S--Y-	220

	661 AGTTACATCATGAAACCACTCGATAATGGCATCCAGATCAAGGAGGCATCGGTCCATGAG	720
	221 -S--Y--I--M--K--P--L--D--N--G--I--Q--I--K--E--A--S--V--H--E-	240
	721 CTGATCCAGTTCTCACCTTTTCAGTGAGCAGCATGGAGCCGCCCATATGGAGACCAAGCAA	780
	241 -L--I--Q--F--S--P--F--S--E--Q--H--G--A--A--H--M--E--T--K--Q-	260
[0784]	781 TCCTTGATGCTCCTTGACGTTCTGAAGACACCCAGGCTGAGTATTCACACCGTGGAAATC	840
	261 -S--L--M--L--L--D--V--R--R--H--P--R--L--S--I--H--T--V--E--I-	280
	841 TCACATATCAGTTCTCCACTGAGCTTCTTCAGTTACCCATTCTGCTCCTCAATATCAACG	900
	281 -S--H--I--S--S--P--L--S--F--F--S--Y--P--F--C--S--S--I--S--T-	300
	901 ACATAGAGTCTCAGCTCGAGGACACTCTGGTCAAACAGGCTGTAGAAAGAGTTCATGAAG	960
	301 -T--*-	301
[0785]	序列号113和115(野生型VtgAb)	
[0786]	长度:5339bp和1747aa	
[0787]	类型:cDNA(序列号:113) 和蛋白(序列号:115)	
[0788]	生物体:尼罗罗非鱼	
	1 CGCCATTTAGTTAATGATACATTTGATGGGCAACGTCAGCAAAAAATCTGCTTAAAAAGG	60
		
	61 ACGCCTCTGCCTGCAGATCCTCACATCCACCAGCCATGAGGGTGCTTGTAAGTCTCTTG	120
	-M--R--V--L--V--L--A--L--	8
	121 CTGTGGCTCTCGCAGTGGGGGACCAGTCCAACCTGGCCCCAGGATTCGCCTCTGTTAAGA	180
	9 A--V--A--L--A--V--G--D--Q--S--N--L--A--P--G--F--A--S--V--K--	28
	181 CCTACATGTACAAATATGAAGCGGTTCTTATGGGCGCCTGCCGAAGAGGGCTGGCTC	240
	29 T--Y--M--Y--K--Y--E--A--V--L--M--G--G--L--P--E--E--G--L--A--	48
[0789]	241 GAGCTGGGGTTAAAAATCCGGGGCAAAGTTTTGATCAGTGCAACAAGTGCCAACGACTACA	300
	49 R--A--G--V--K--I--R--G--K--V--L--I--S--A--T--S--A--N--D--Y--	68
	301 TTCTGAAGCTTGTAAGACCTCAGTTGCTGGAGTACAGTGGCATCTGGCCCCAAGATCCTT	360
	69 I--L--K--L--V--D--P--Q--L--L--E--Y--S--G--I--W--P--K--D--P--	88
	361 TCCATCCAGCCACCAAGCTCACCACAGCCCTGGCTACTCAGCTCTCGACACCGGTCAAGT	420
	89 F--H--P--A--T--K--L--T--T--A--L--A--T--Q--L--S--T--P--V--K--	108
	421 TTGAGTATACAAACGGCGTTGTTGGGAGACTGGCTGCACCTCCTGGGGTCTCCACAACAG	480

109	F--E--Y--T--N--G--V--V--G--R--L--A--A--P--P--G--V--S--T--T--	128
481	TGCTGAATATCTACAGGGGCATCATCAACCTCCTGCAGCTGAATGTAAAGAAGACACAGA	540
129	V--L--N--I--Y--R--G--I--I--N--L--L--Q--L--N--V--K--K--T--Q--	148
541	ATGTCTACGAGATGCAAGAGTCTGGAGCTCATGGTGTGTGCAAGACCAACTATGTGATCA	600
149	N--V--Y--E--M--Q--E--S--G--A--H--G--V--C--K--T--N--Y--V--I--	168
601	GGGAGGACGCGAGGGCCGAACGCATTTCATCTGACCAAGACCAAGGACCTGAACCACTGCC	660
169	R--E--D--A--R--A--E--R--I--H--L--T--K--T--K--D--L--N--H--C--	188
661	AGGAGAAAATCATGAAGGCCATCGGCTTGGAAACACGTAGAGAAAATGCCATGATTGTGAAG	720
189	Q--E--K--I--M--K--A--I--G--L--E--H--V--E--K--C--H--D--C--E--	208
721	CTAGAGGAAAGAGCCTGAAGGGAAC TGCTTCCTATAACTACATCATGAAGCCAGCACCCA	780
209	A--R--G--K--S--L--K--G--T--A--S--Y--N--Y--I--M--K--P--A--P--	228
781	GTGGTTCTCTGATTATGGAGGCTGTGCTAGAGAGGTCATCGAGTTTTCACCTTTCAACA	840
229	S--G--S--L--I--M--E--A--V--A--R--E--V--I--E--F--S--P--F--N--	248
841	TTTTGAATGGCGCTGCTCAGATGGAGTCTAAGCAAATTCGACCTTCCTGGATATTGAGA	900
[0790] 249	I--L--N--G--A--A--Q--M--E--S--K--Q--I--L--T--F--L--D--I--E--	268
901	ACACCCCTGTGGATCATGCCAGATACACCTATGTTACCGCGGATCCCTGCAGTATGAGC	960
269	N--T--P--V--D--H--A--R--Y--T--Y--V--H--R--G--S--L--Q--Y--E--	288
961	ATGGCAGCGAGATTCTCCAGACACCCATCCATCTTCTGAGGGTCACCCATGCCGAGGCTC	1020
289	H--G--S--E--I--L--Q--T--P--I--H--L--L--R--V--T--H--A--E--A--	308
1021	AGATTGTCTCAGCACTCTGAACCACTGGTAGCCTCCAACGTGGCCAAGGTCCATGAAGATG	1080
309	Q--I--V--S--T--L--N--H--L--V--A--S--N--V--A--K--V--H--E--D--	328
1081	CCCCTCTGAAGTTTGTGAGCTCATCCAGGTGATGCGTGTGGCCAGATTTGAGACTATTG	1140
329	A--P--L--K--F--V--E--L--I--Q--V--M--R--V--A--R--F--E--T--I--	348
1141	AGTCCCTCTGGGCTCAGTTTAAATCTAGACCTGATCACAGGTACTGGTTACTGAATGCTG	1200
349	E--S--L--W--A--Q--F--K--S--R--P--D--H--R--Y--W--L--L--N--A--	368
1201	TCCCCACATTTCGACTCACGCTGCGCTTAAGTTCCTCATTGAGAAGCTCCTTGCTAATG	1260
369	V--P--H--I--R--T--H--A--A--L--K--F--L--I--E--K--L--L--A--N--	388
1261	AGTTAAGTGAGACTGAAGCTGCTATGGCTCTCTTGGAAATGTCTGCACTCTGTGACAGCTG	1320
389	E--L--S--E--T--E--A--A--M--A--L--L--E--C--L--H--S--V--T--A--	408

1321	ACCAGAAAACCATTTGAACCTGTGCAGAAGCCTGGCTGAGAACCACAGAGTGAAACGTAACG	1380
409	D--Q--K--T--I--E--L--V--R--S--L--A--E--N--H--R--V--K--R--N--	428
1381	CTGTGCTCAACGAGATTGTGATGCTGGGCTGGGGCACTGTAATTTCCAGGTTCTGTAAAG	1440
429	A--V--L--N--E--I--V--M--L--G--W--G--T--V--I--S--R--F--C--K--	448
1441	CGCAGCCATCTTGCTCATCTGATCTTGTGACACCTGTACATAGACAAGTTGCAGAGGCTG	1500
449	A--Q--P--S--C--S--S--D--L--V--T--P--V--H--R--Q--V--A--E--A--	468
1501	TTGAAACTGGTGACATCGATCAGCTCACTGTCACTCTCAAATGCCTGGATAACGCTGGAC	1560
469	V--E--T--G--D--I--D--Q--L--T--V--T--L--K--C--L--D--N--A--G--	488
1561	ATCCTGCTAGCCTTAAGACAATCATGAAGTTCCTGCCTGGCTTTGGCAGTGCTGCTGCCC	1620
489	H--P--A--S--L--K--T--I--M--K--F--L--P--G--F--G--S--A--A--A--	508
1621	GAGTCCCCTCAAGTTCAGGTTGACGCTGTTCTAGCCCTGAGGAGAATTGCAAAGAGGG	1680
509	R--V--P--L--K--V--Q--V--D--A--V--L--A--L--R--R--I--A--K--R--	528
1681	AACCCAAGATGGTCCAGGAAATAGCTGCTCAGTTGCTCATGGAAGCATCTCCATGCAG	1740
529	E--P--K--M--V--Q--E--I--A--A--Q--L--L--M--E--K--H--L--H--A--	548
[0791]	1741 AACTGCGTATGGTTGCTGCCATGGTGCTCTTTGAGACTAAACTCCCCGTGGGTCTAGCAG	1800
549	E--L--R--M--V--A--A--M--V--L--F--E--T--K--L--P--V--G--L--A--	568
1801	CTAGCATTTCCACAGCCTTGATCAAAGAAAAGAACCTGCAGGTCGTTAGCTTTGTCTACT	1860
569	A--S--I--S--T--A--L--I--K--E--K--N--L--Q--V--V--S--F--V--Y--	588
1861	CTTACATGAAGGCCATGGCCAAGACCACATCCCCTGACCACGTTTCTGTTGCTGCAGCAT	1920
589	S--Y--M--K--A--M--A--K--T--T--S--P--D--H--V--S--V--A--A--A--	608
1921	GTAATGTTGCCTTGAGGTTCTCAACCCCAAATTAGGCAGACTGAACTTCCGCTACAGCC	1980
609	C--N--V--A--L--R--F--L--N--P--K--L--G--R--L--N--F--R--Y--S--	628
1981	GAGCCTTCCATGTGGATACCTATAACAATGCCTGGATGATGGGTGCTGCCGCCAGTGCCG	2040
629	R--A--F--H--V--D--T--Y--N--N--A--W--M--M--G--A--A--A--S--A--	648
2041	TCTTAATTAACGACGCTGCAACCGTGTTACCAAGAATGATTATGGCCAAAGCCCGTACTT	2100
649	V--L--I--N--D--A--A--T--V--L--P--R--M--I--M--A--K--A--R--T--	668
2101	ACATGGCCGGAGCTTATGTTGATGCTTTTGAGGTTGGAGTGAGGACTGAGGGAATCCAGG	2160
669	Y--M--A--G--A--Y--V--D--A--F--E--V--G--V--R--T--E--G--I--Q--	688
2161	AGGCTCTTTTGAAAAGACGACATGAAAATTCTGAGAATGCAGACAGGATCACCAAGATTA	2220
689	E--A--L--L--K--R--R--H--E--N--S--E--N--A--D--R--I--T--K--I--	708

2221	AACAAGCCATGAGAGCTCTTTCTGAGTGGAGGGCTAATCCTTCGAGCCAGGCCCTGGCCT	2280
709	K--Q--A--M--R--A--L--S--E--W--R--A--N--P--S--S--Q--A--L--A--	728
2281	CTATGTATGTGAAGGTCTTCGGACAAGAAATTGCATTGCGCAACATTGACAAATCCAAGG	2340
729	S--M--Y--V--K--V--F--G--Q--E--I--A--F--A--N--I--D--K--S--K--	748
2341	TTGACCAGCTTATCCAGTTTGCCAGTGGACCTTTGAGAAACGTATTCAGAGATGCTGTGA	2400
749	V--D--Q--L--I--Q--F--A--S--G--P--L--R--N--V--F--R--D--A--V--	768
2401	ATTCTGTGCTGTCTGGTTATGCAACACATTTTGCTAAACCAATGCTGCTCGGTGAGCTCC	2460
769	N--S--V--L--S--G--Y--A--T--H--F--A--K--P--M--L--L--G--E--L--	788
2461	GTCTCATCCTTCCCACCACTGTTGGGTTGCCCATGGAGATCAGCCTCATTACATCCGCTG	2520
789	R--L--I--L--P--T--T--V--G--L--P--M--E--I--S--L--I--T--S--A--	808
2521	TGACTGCTGCATCTGTTGACGTCCAAGCCACTGTGTCAACCACTCTGCCTGTCAACTACC	2580
809	V--T--A--A--S--V--D--V--Q--A--T--V--S--P--P--L--P--V--N--Y--	828
2581	GAGTTTCCCAGCTTCTGGAGTCCGATATCCAACCTGAGGGCTACAGTTGCTCCAAGTCTTG	2640
829	R--V--S--Q--L--L--E--S--D--I--Q--L--R--A--T--V--A--P--S--L--	848
[0792]	2641 CCATGCAGACCTATGCATTCATGGGTGTGAACACCGCCTTAATCCAGGCTGCAGTGATGA	2700
849	A--M--Q--T--Y--A--F--M--G--V--N--T--A--L--I--Q--A--A--V--M--	868
2701	CAAAAGCCAAAGTTTACACAGCTGTTCCCTGCACAGATAAAAGCAAGGATTGACATTGTTA	2760
869	T--K--A--K--V--Y--T--A--V--P--A--Q--I--K--A--R--I--D--I--V--	888
2761	AGGGCAACTTGAAGGTTGAGTTCCTGTCACTCCAGGGCATTAACACAATTGCATCTGCAC	2820
889	K--G--N--L--K--V--E--F--L--S--L--Q--G--I--N--T--I--A--S--A--	908
2821	ATGCGGAGACGGTTGCCATTGCAAGAAATGTGGAAGACCTCCCAGCCGCAAGAAGCACAC	2880
909	H--A--E--T--V--A--I--A--R--N--V--E--D--L--P--A--A--R--S--T--	928
2881	CACTGATCTCATCTGAAACTGCATCACAACTTTCAAAGGCCTCTCTCAACTCAAAGATCT	2940
929	P--L--I--S--S--E--T--A--S--Q--L--S--K--A--S--L--N--S--K--I--	948
2941	CCAGGATGGCATCCTCTGTGACTGGTGGCATGTCTGCGTCATCTGAAATCATTCTGCTG	3000
949	S--R--M--A--S--S--V--T--G--G--M--S--A--S--S--E--I--I--P--A--	968
3001	ACCTGCCAAGTAAGATTGGGAGGAAAATGAACTCCCTAAAACCTACAGGAAGAAAATCC	3060
969	D--L--P--S--K--I--G--R--K--M--K--L--P--K--T--Y--R--K--K--I--	988
3061	GTGCTTCAAGCAGAATGCTAGGATTCAAGGCCTACGCTGAGATTAAATCTCACAATGCCG	3120

	989 R--A--S--S--R--M--L--G--F--K--A--Y--A--E--I--K--S--H--N--A--	1008
	3121 CCTACATCAGAGACTGCCCTCTCTACGCTCTGATCGGAAAGCATGCTGCTTCTGTTAGGA	3180
	1009 A--Y--I--R--D--C--P--L--Y--A--L--I--G--K--H--A--A--S--V--R--	1028
	3181 TTGCTCCAGCTTCTGGACCAGTCATTGAGAAGATTGAAGTTGAGATTCAGGTCGGAGATA	3240
	1029 I--A--P--A--S--G--P--V--I--E--K--I--E--V--E--I--Q--V--G--D--	1048
	3241 AAGCAGCAGAAAATATGATTAAAGCGATTGACATGAGCGAAGAGGAGGAAGCTCTTGAGG	3300
	1049 K--A--A--E--N--M--I--K--A--I--D--M--S--E--E--E--E--A--L--E--	1068
	3301 ATAAGAATGTCCTCTTGAAAATCAAGAAAATACTGGCACCTGGTCTCAAGAACACCACAT	3360
	1069 D--K--N--V--L--L--K--I--K--K--I--L--A--P--G--L--K--N--T--T--	1088
	3361 CATCTTCCTCCAGCTCCTCCAGCTCCTCTTCATCCAGCTCTAGCTCCAACAAGTCTTCTT	3420
	1089 S--S--S--S--S--S--S--S--S--S--S--S--S--S--S--N--K--S--S--	1108
	3421 CATCCAGTTCCTCGCTCCAGCAGCTCCAGTCATCCAGCTCTCGTTCCTCATAGGTCTCGCT	3480
	1109 S--S--S--S--R--S--S--S--S--Q--S--S--S--S--R--S--H--R--S--R--	1128
	3481 CCAGAAAGTCCAGTCTAGCAGCTCTCAGTCAAGCCGCTCTCCCTCAAGCTCTTCTCTCT	3540
[0793]	1129 S--R--K--S--Q--S--S--S--S--Q--S--S--R--S--P--S--S--S--S--S--	1148
	3541 CTTCTCTCTTTCATCATCCAGATCTTCTTCCAGGTCATCTTCCAGATCATCTTCCAGAT	3600
	1149 S--S--S--S--S--S--S--R--S--S--S--R--S--S--S--R--S--S--S--R--	1168
	3601 CTTCTTCTAGGTCTCTCTCGCTCCAGAACTAAGATGGCTGACATTGTTGCTCCTATTA	3660
	1169 S--S--S--R--S--S--S--R--S--R--T--K--M--A--D--I--V--A--P--I--	1188
	3661 TCACGACGTCCACCAGAGTGAGCAGTTCCTCCAGTCGATCAGCCTCTAACAGCTCTTCCA	3720
	1189 I--T--T--S--T--R--V--S--S--S--S--S--R--S--A--S--N--S--S--S--	1208
	3721 GCAGTGCTTCATACTTGCTCAGCTCATCTAAGTCATCAAGCTCTAGATCCTCTCGGCGCA	3780
	1209 S--S--A--S--Y--L--L--S--S--S--K--S--S--S--S--R--S--S--R--R--	1228
	3781 GTGCTCAGTCTAAGCAACAACTGCTTGCCTTGAAGTTCAGAAAGAACCACGTCCACAGGC	3840
	1229 S--A--Q--S--K--Q--Q--L--L--A--L--K--F--R--K--N--H--V--H--R--	1248
	3841 ATGCCATCTCCACACAGCGCGGAGCAGTCACAGCAGTGCCCGCAGCTTCGATTCCATCT	3900
	1249 H--A--I--S--T--Q--R--G--S--S--H--S--S--A--R--S--F--D--S--I--	1268
	3901 ACAATAAGGCCAAGTACCTCGCTAACACACTCACTCCTGCCATGTCCATTGCAATCCGTG	3960
	1269 Y--N--K--A--K--Y--L--A--N--T--L--T--P--A--M--S--I--A--I--R--	1288

3961	CCGTGAGAGTCGACCACAAGGTCCAGGGATACCAGCTAGCAGCTTACCTGGACAAACAGA	4020
1289	A--V--R--V--D--H--K--V--Q--G--Y--Q--L--A--A--Y--L--D--K--Q--	1308
4021	CCAATAGACTGCAGCTGATTTTTGCCAGAGTCGCTGAGAAGGACAACCTGGAGAATCTGTG	4080
1309	T--N--R--L--Q--L--I--F--A--R--V--A--E--K--D--N--W--R--I--C--	1328
4081	CCGACATTGTGCAGCTGAGTTCGCACAAGATGATGGCCAAGATTGCCTGGGGTGCTGAAT	4140
1329	A--D--I--V--Q--L--S--S--H--K--M--M--A--K--I--A--W--G--A--E--	1348
4141	GCAAGCAATACTCCACCATGATTGTAGCTGAAACTGGTCTTTTGGGTCATGAGCCCGCAG	4200
1349	C--K--Q--Y--S--T--M--I--V--A--E--T--G--L--L--G--H--E--P--A--	1368
4201	CCCCTTGAAGCTGACCTGGGACAAACTGCCAGGAAGCATAAAGCACTACGCAAAGAGGG	4260
1369	A--R--L--K--L--T--W--D--K--L--P--G--S--I--K--H--Y--A--K--R--	1388
4261	CGTTGAAATCCATTGTCCCTATTGCTCAAGAATATGGAGTAAACTACGCAAAGCCAAGA	4320
1389	A--L--K--S--I--V--P--I--A--Q--E--Y--G--V--N--Y--A--K--A--K--	1408
4321	ATCCTCGTAATCAAATCAAACCTGACTGTAGCTGTTGCTACTGAGACAAGCATGAATATTG	4380
1409	N--P--R--N--Q--I--K--L--T--V--A--V--A--T--E--T--S--M--N--I--	1428
[0794]	4381 TGCTGAACACACCAAAGGCAATCATTTACAAGCGTGGGGTGTGTCTACCTGTTGCTTTAC	4440
1429	V--L--N--T--P--K--A--I--I--Y--K--R--G--V--C--L--P--V--A--L--	1448
4441	CAATTGGAAACACTGCTGCCGAGCTGCAAGCGACCCGGGACAACCTGGGCTGACAAGATGT	4500
1449	P--I--G--N--T--A--A--E--L--Q--A--T--R--D--N--W--A--D--K--M--	1468
4501	CCTATTTGGTTACCAAAGCTAACGCAGTTGAATGCTCCCTCATCAACAACACACTGACCA	4560
1469	S--Y--L--V--T--K--A--N--A--V--E--C--S--L--I--N--N--T--L--T--	1488
4561	CATTCAACAACAGGAAAGCTAGAGATGAGCTGCCACACTCGTGCTACCAGGTCTTGGCTC	4620
1489	T--F--N--N--R--K--A--R--D--E--L--P--H--S--C--Y--Q--V--L--A--	1508
4621	AGGATTGCACACCAGAAGCTCAAATTCATGGTTCTGCTGAAGAAAGACCAAATACAGGATC	4680
1509	Q--D--C--T--P--E--L--K--F--M--V--L--L--K--K--D--Q--I--Q--D--	1528
4681	AGAAGCAGATCAATGTTAAGATTTCAGACATCGATGTGGACATGTATCGGAAGAACAACG	4740
1529	Q--K--Q--I--N--V--K--I--S--D--I--D--V--D--M--Y--R--K--N--N--	1548
4741	CCATTGCGGTGATGGTTAACGGAGTTGAAATCCCTAACAGCAACCTGCCATACCTGCATC	4800
1549	A--I--A--V--M--V--N--G--V--E--I--P--N--S--N--L--P--Y--L--H--	1568
4801	CATCAGGTAACATACATATAAGACAGTCAAATGAAGGCATTACTCTCAATGCACCCAGCC	4860
1569	P--S--G--N--I--H--I--R--Q--S--N--E--G--I--T--L--N--A--P--S--	1588

4861	ATGGTCTTCAGGAGGTCTTCCTTGGCTTCAACGAGCTGAGGGTTAAAGTTGCAGACTGGA	4920
1589	H--G--L--Q--E--V--F--L--G--F--N--E--L--R--V--K--V--A--D--W--	1608
4921	TGAAAGGAAAGACTTGTGGTGCCTGTGGAACGGCAAGCGGAAATGTCGGAGACGAGTACC	4980
1609	M--K--G--K--T--C--G--A--C--G--T--A--S--G--N--V--G--D--E--Y--	1628
4981	GCACACCCAGTGAACAGGTGACCAAGGATGCCATCAGCTACGCCCCTCCTGGGTCTGT	5040
1629	R--T--P--S--E--Q--V--T--K--D--A--I--S--Y--A--H--S--W--V--L--	1648
5041	CTTCAAACACCTGCCGTGATCCCTCCGAGTGTTCATCAAGCAGGAATCTGTGAAGCTGG	5100
1649	S--S--N--T--C--R--D--P--S--E--C--S--I--K--Q--E--S--V--K--L--	1668
[0795]		
5101	AGAAGCGGGTGATCTTTGAAGGTGTGGAGTCCAAATGCTACTCTGTTGAGCCCGTGCTGC	5160
1669	E--K--R--V--I--F--E--G--V--E--S--K--C--Y--S--V--E--P--V--L--	1688
5161	AGTGCCTGCCCGGCTGTATCCCAGTGAGAACCACTACCGTCAACGTTGGCTTTCCTGCTGC	5220
1689	Q--C--L--P--G--C--I--P--V--R--T--T--T--V--N--V--G--F--H--C--	1708
5221	TGCCCAGTGACACAACCTGTGGACCGTTCTGGTCTGAGCAGCTTCTTTGAGAAGAGCATCG	5280
1709	L--P--S--D--T--T--V--D--R--S--G--L--S--S--F--F--E--K--S--I--	1728
5281	ACCTGAGGGATACTGCAGAAGCCCACCTGGCCTGTCGCTGCACTCCTCAGTGTGCTTAA	5339
1729	D--L--R--D--T--A--E--A--H--L--A--C--R--C--T--P--Q--C--A--*	1747
[0796]	序列号114和116(VtgAb突变等位基因-8nt缺失)	
[0797]	长度:5339bp和202aa	
[0798]	类型:cDNA(序列号:114)和蛋白(序列号:116)	
[0799]	生物体:尼罗罗非鱼	
	1 CGCCATTTAGTTAATGATACATTTGATGGGCAACGTCAGCAAAAAATCTGCTTAAAAAGG	60
		
	61 ACGCCTCTGCCTGCAGATCCTCACATCCACCAGCCATGAGGGTGCTTGTACTAGCTCTTG	120
	-M--R--V--L--V--L--A--L--	8
	121 CTGTGGCTCTCGCAGTGGGGGACCAGTCCAACCTGGCCCCAGGATTCGCCTCTGTTAAGA	180
[0800]	9 A--V--A--L--A--V--G--D--Q--S--N--L--A--P--G--F--A--S--V--K--	28
	181 CCTACATGTACAAATATGAAGCGGTCTTTATGGGCGCCTGCCTGAAGAGGGCCTGGCTC	240
	29 T--Y--M--Y--K--Y--E--A--V--L--M--G--G--L--P--E--E--G--L--A--	48
	241 GAGCTGGGGTTAAAAATCCGGGGCAAAGTTTTGATCAGTGCAACAAGTGCCAACGACTACA	300
	49 R--A--G--V--K--I--R--G--K--V--L--I--S--A--T--S--A--N--D--Y--	68

	301 TTCTGAAGCTTGTAGACCCTCAGTTGCTGGAGTACAGTGGCATCTGGCCCAAAGATCCTT	360
	69 I--L--K--L--V--D--P--Q--L--L--E--Y--S--G--I--W--P--K--D--P--	88
	361 TCCATCCAGCCACCAAGCTCACCACAGCCCTGGCTACTCAGCTCTCGACACCGGTCAAGT	420
	89 F--H--P--A--T--K--L--T--T--A--L--A--T--Q--L--S--T--P--V--K--	108
	421 TTGAGTATACAAACGGCGTTGTTGGGAGACTGGCTGCACCTCCTGGGGTCTCCACAACAG	480
	109 F--E--Y--T--N--G--V--V--G--R--L--A--A--P--P--G--V--S--T--T--	128
[0801]	481 TGCTGAATATCTACAGGGGCATCATCAACCTCCTGCAGCTGAATGTAAAGAAGACACAGA	540
	129 V--L--N--I--Y--R--G--I--I--N--L--L--Q--L--N--V--K--K--T--Q--	148
	541 ATGTCTACGAGATGCAAGAGTCTGGAGCTCATGGTGTGTGCAAGACCAACTATGTGATCA	600
	149 N--V--Y--E--M--Q--E--S--G--A--H--G--V--C--K--T--N--Y--V--I--	168
	601 GGGAGGGCCGAACGCATTCATCTGACCAAGACCAAGGACCTGAACCACTGCCAGGAGAAA	660
	169 R--E--G--R--T--H--S--S--D--Q--D--Q--G--P--E--P--L--P--G--E--	188
	661 ATCATGAAGGCCATCGGCTTGGAAACACGTAGAGAAATGCCATGATTGTGAAGCTAGAGGA	720
	189 N--H--E--G--H--R--L--G--T--R--R--E--M--P--*-	202

[0802] 序列号117

[0803] 长度:18

[0804] 类型:DNA

[0805] 生物体:人工序列

[0806] 其他信息:人工序列描述:5' 尾引物延长序列(FAM)

[0807] 序列:1

[0808] TGTAAAACGACGGCCAGT

[0809] 序列号118

[0810] 长度:18

[0811] 类型:DNA

[0812] 生物体:人工序列

[0813] 其他信息:人工序列描述:5' 尾引物延长序列(NED)

[0814] 序列:3

[0815] TAGGAGTGCAGCAAGCAT

[0816] 在上述描述中,出于讲解的目的,阐述了许多细节,以便提供对实施例的透彻理解。然而,显而易见的是,对于本领域技术人员来说并非需要这些具体细节。

[0817] 上述实施例仅旨在作为示例。本领域技术人员可以对特定实施例进行改变、修改和变化。权利要求的范围不应受到本文阐述的特定实施例的限制,而应以与整体说明一致的方式来解释。

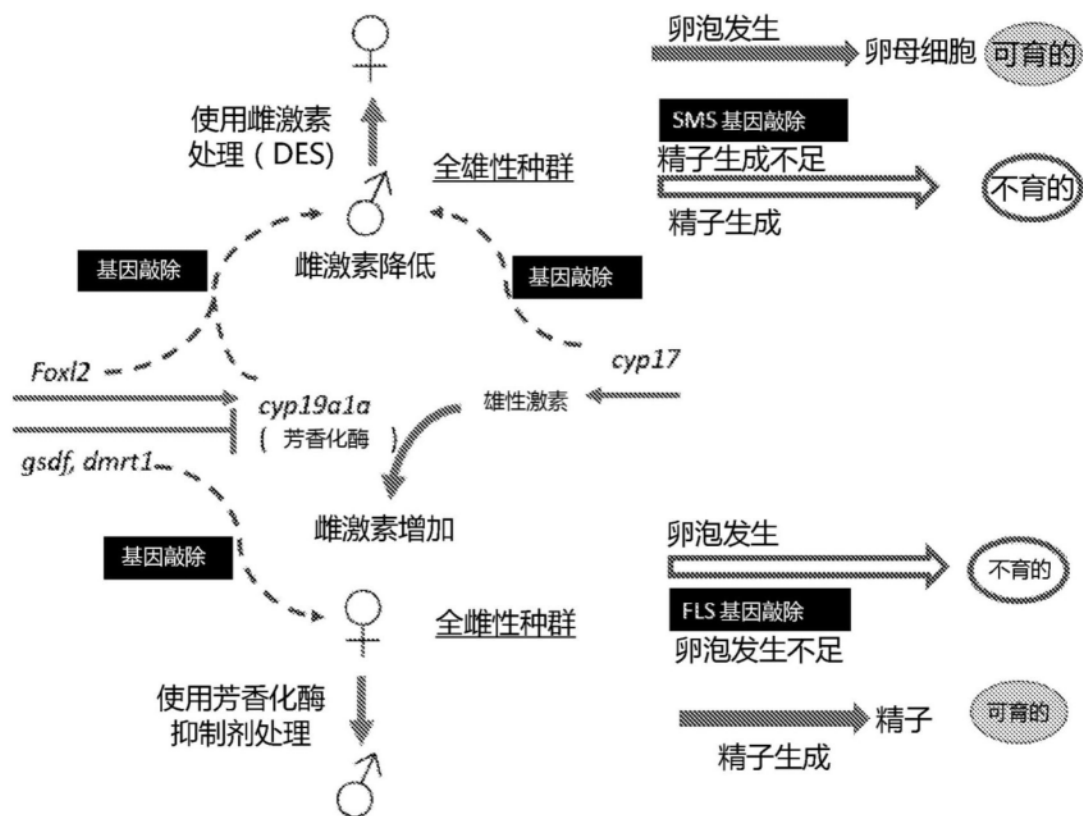


图1

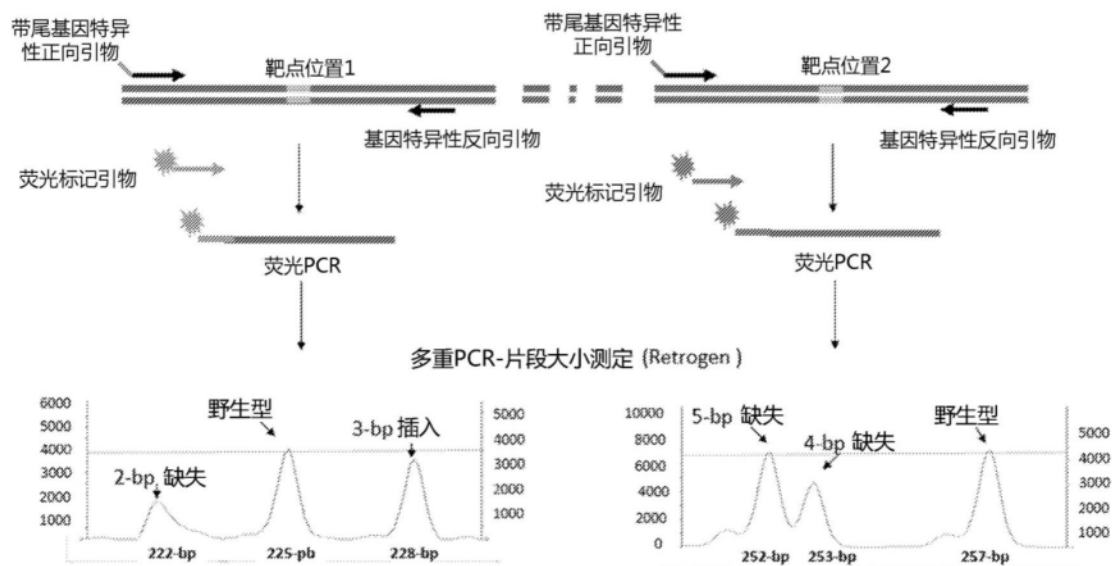


图2

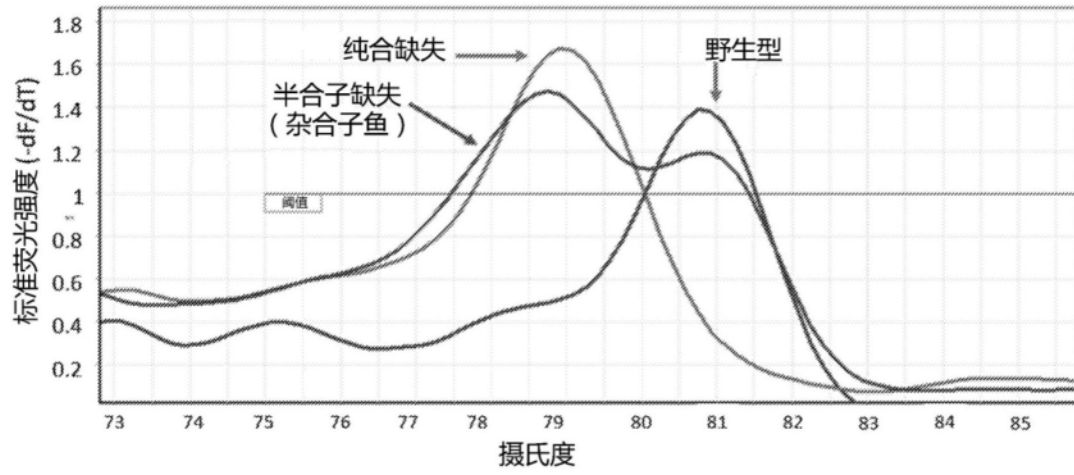


图3

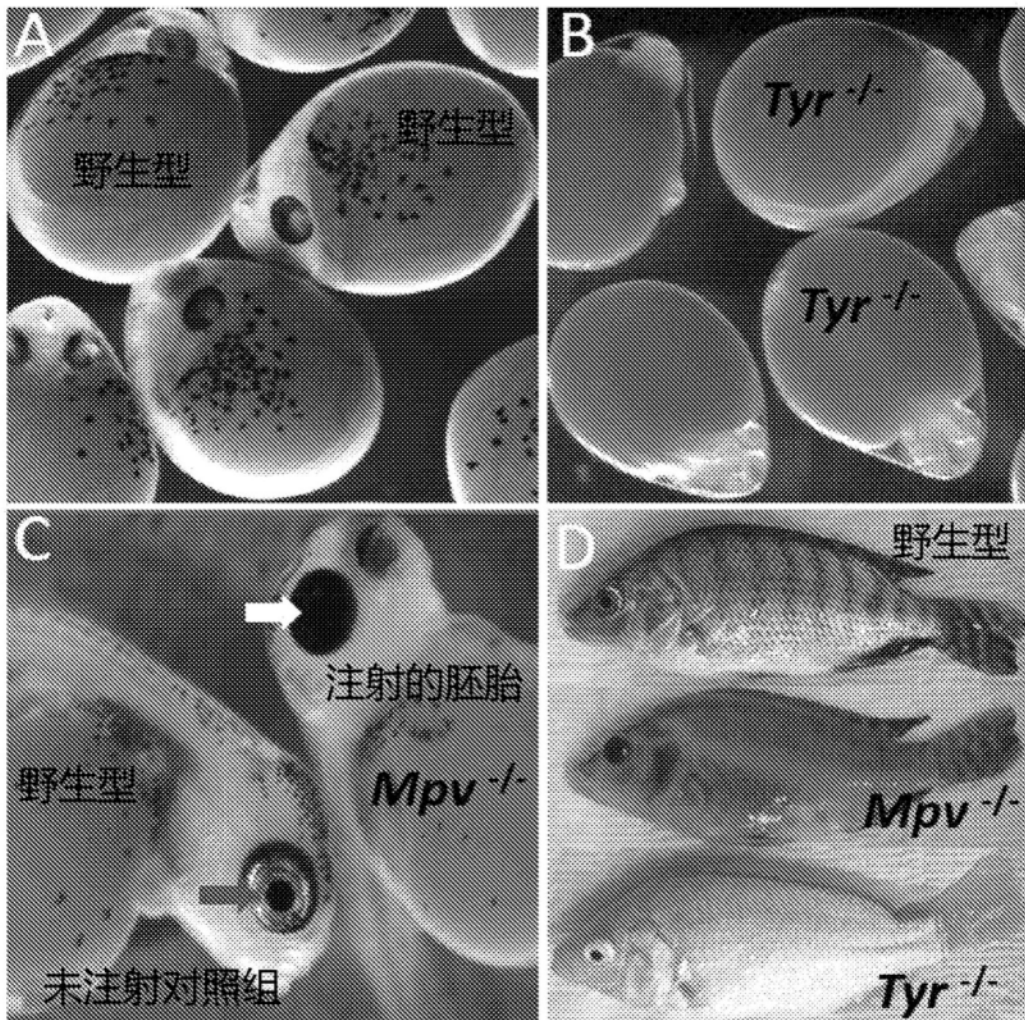


图4

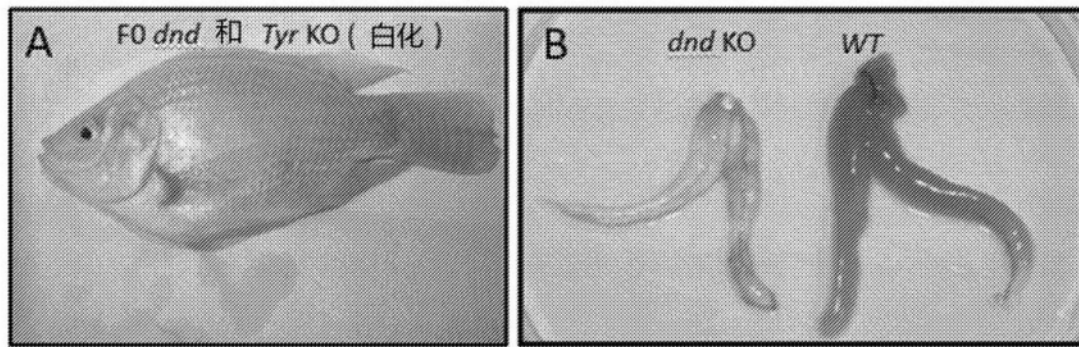


图5

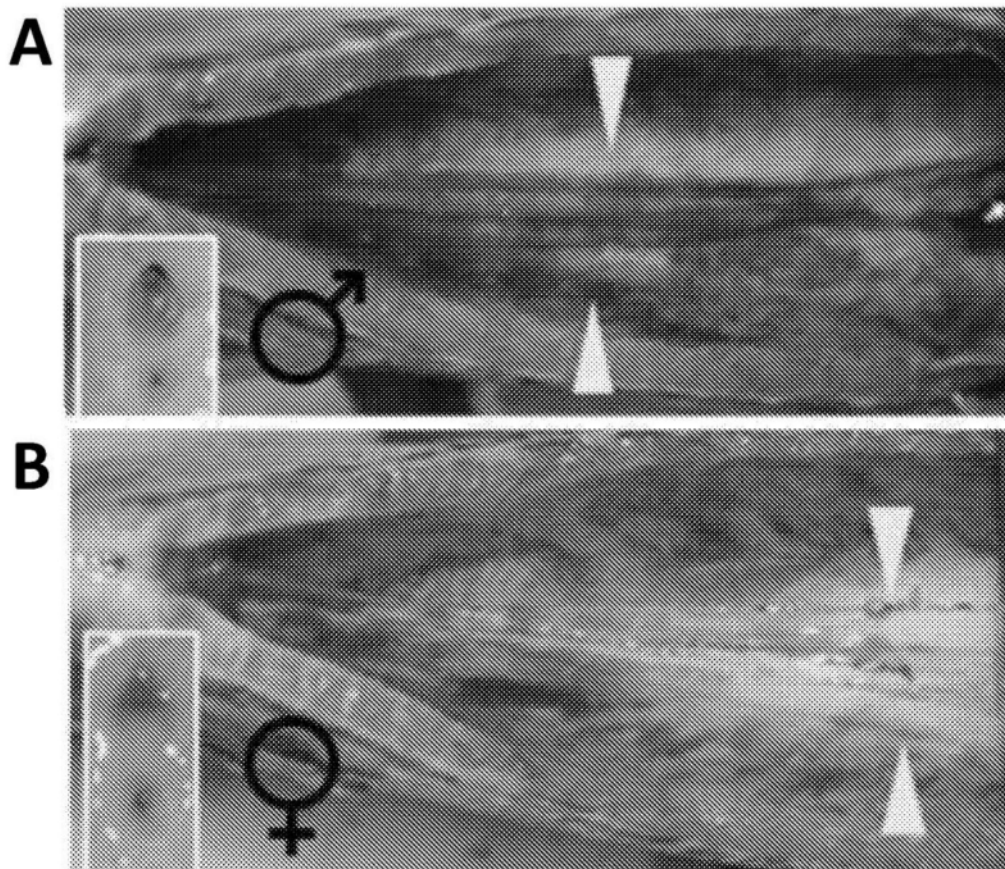


图6

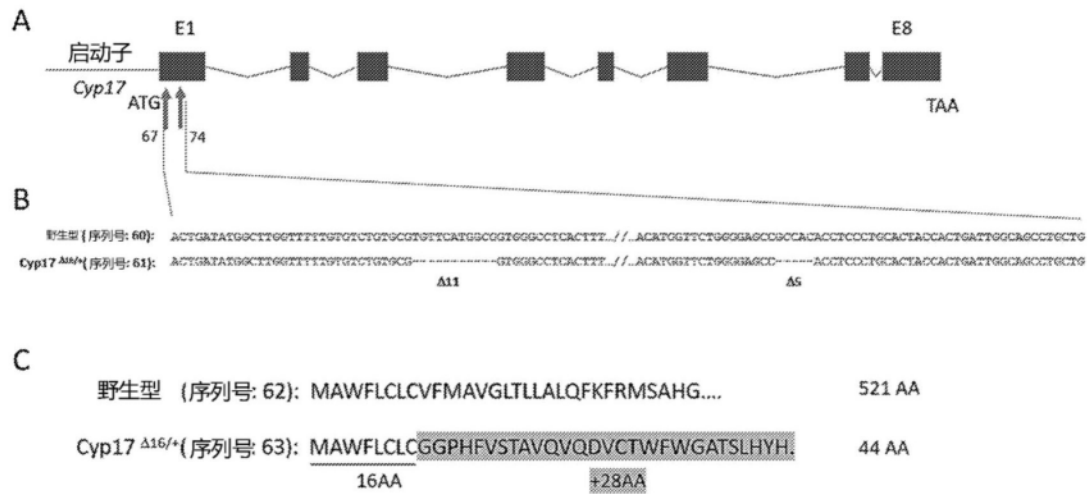


图7

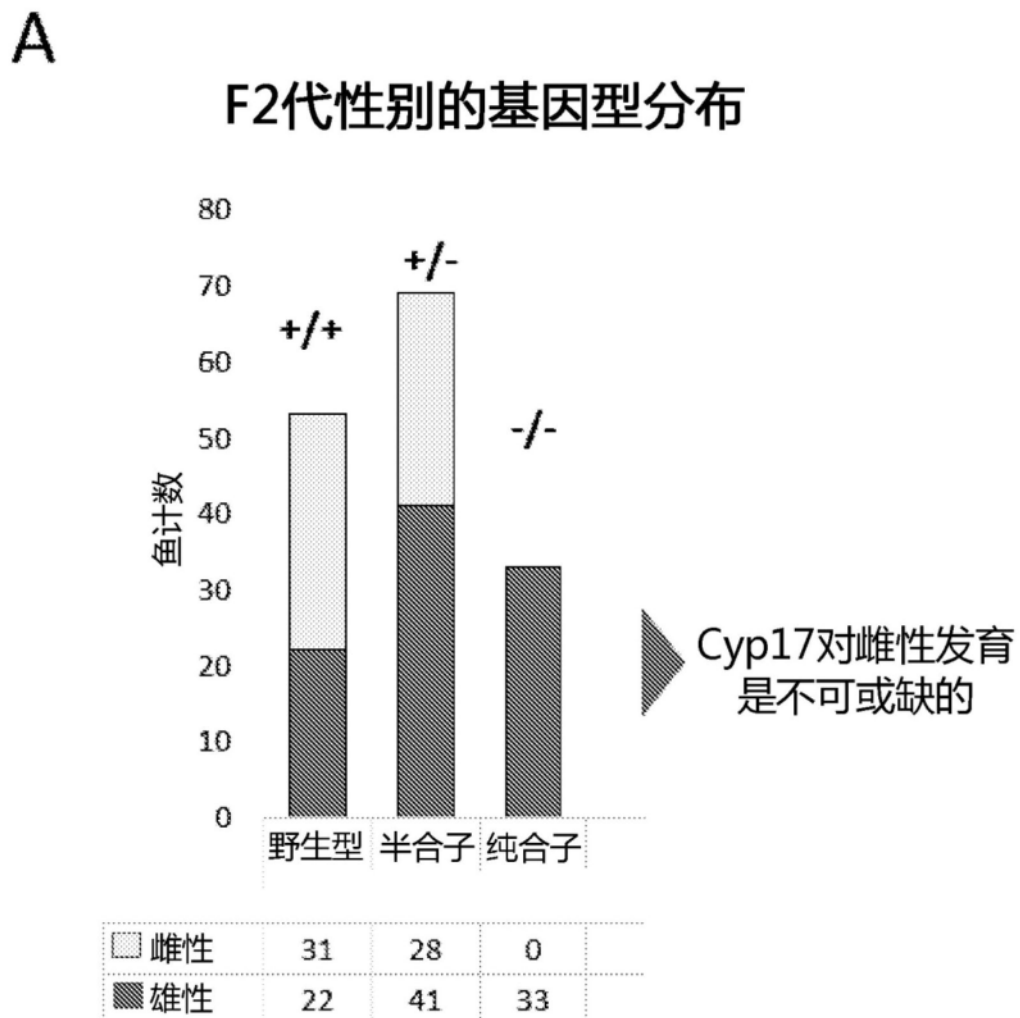


图8

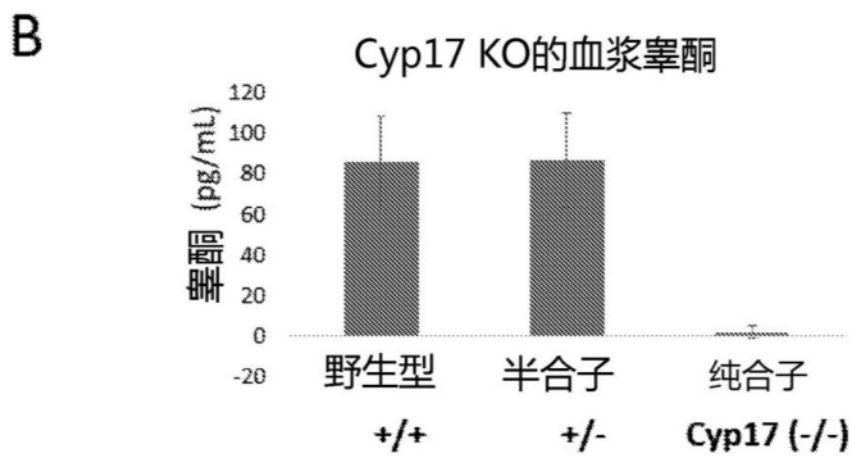


图8续

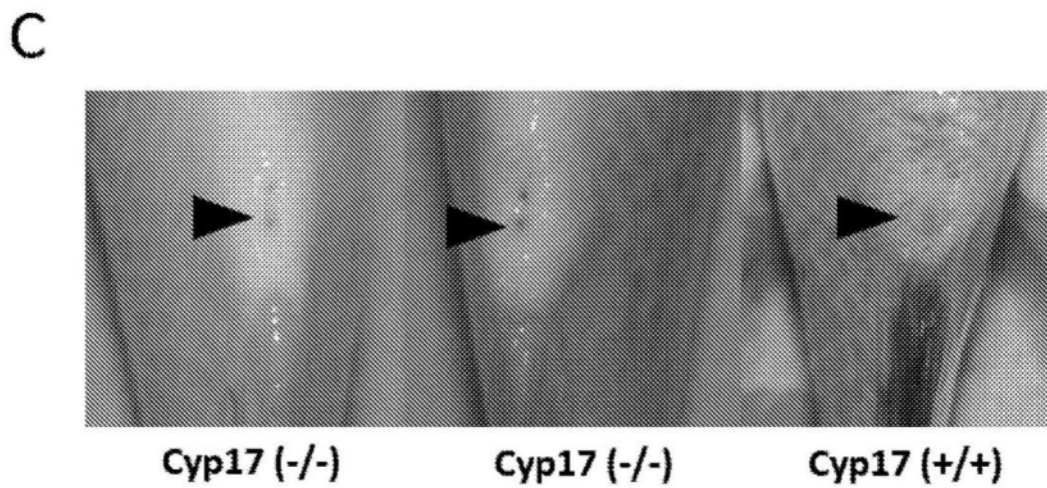


图8续

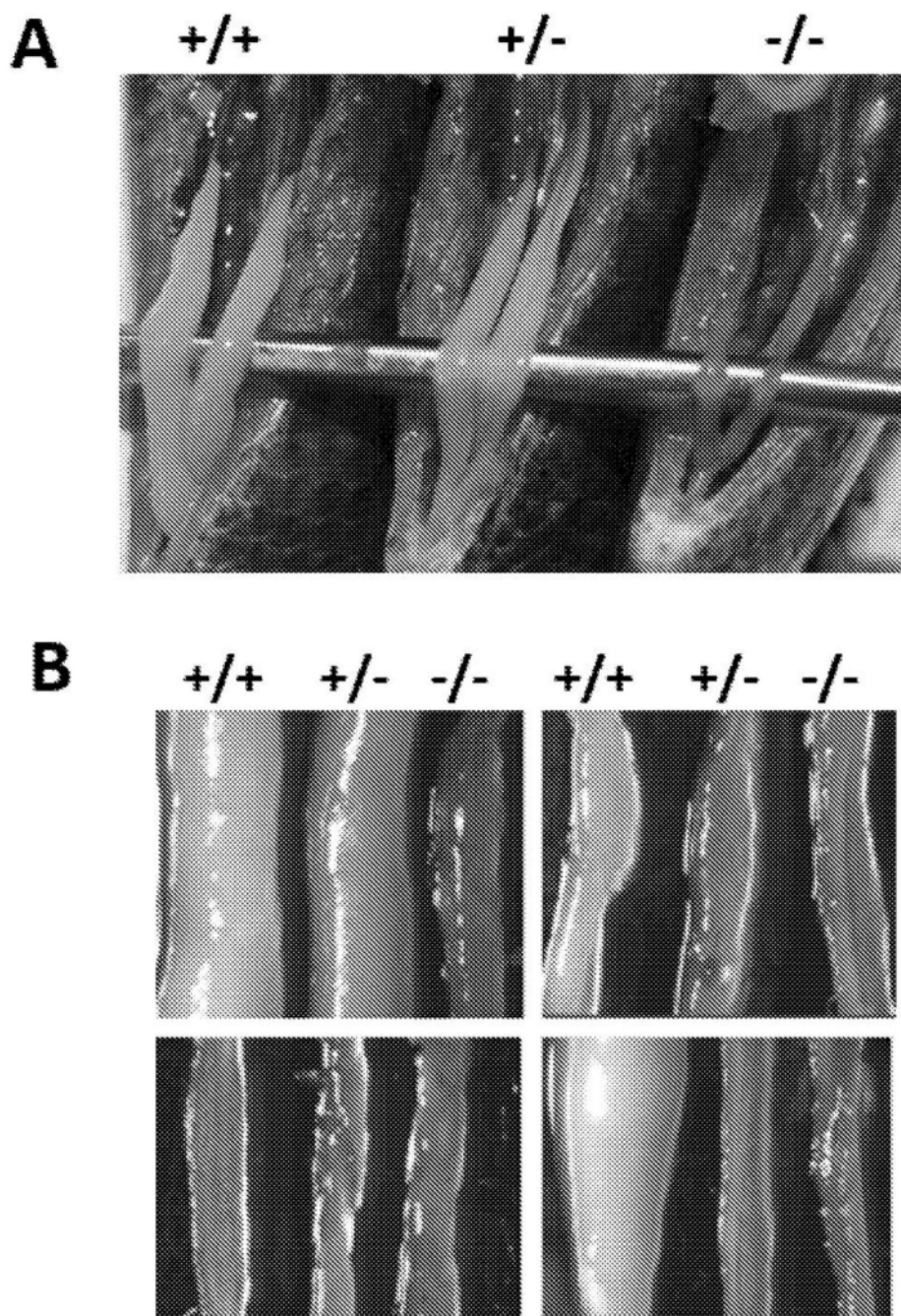


图9

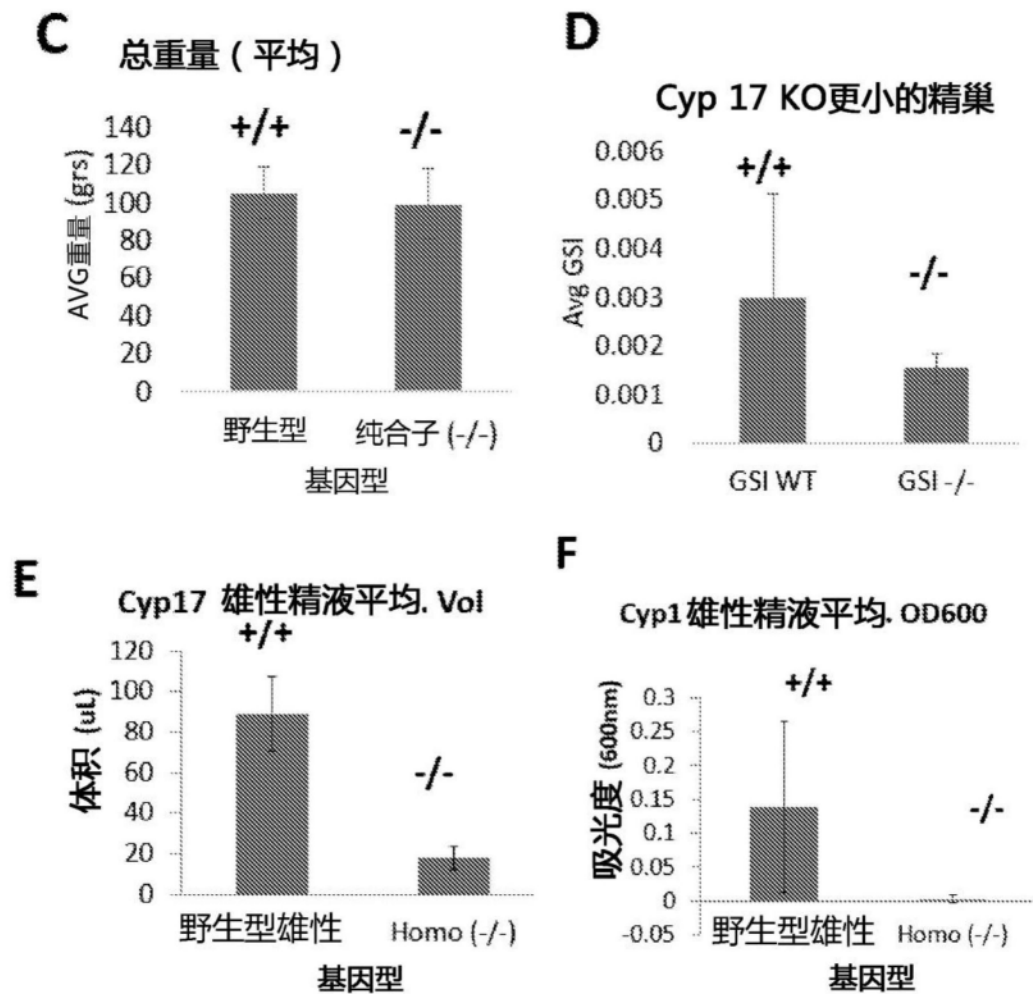


图9续

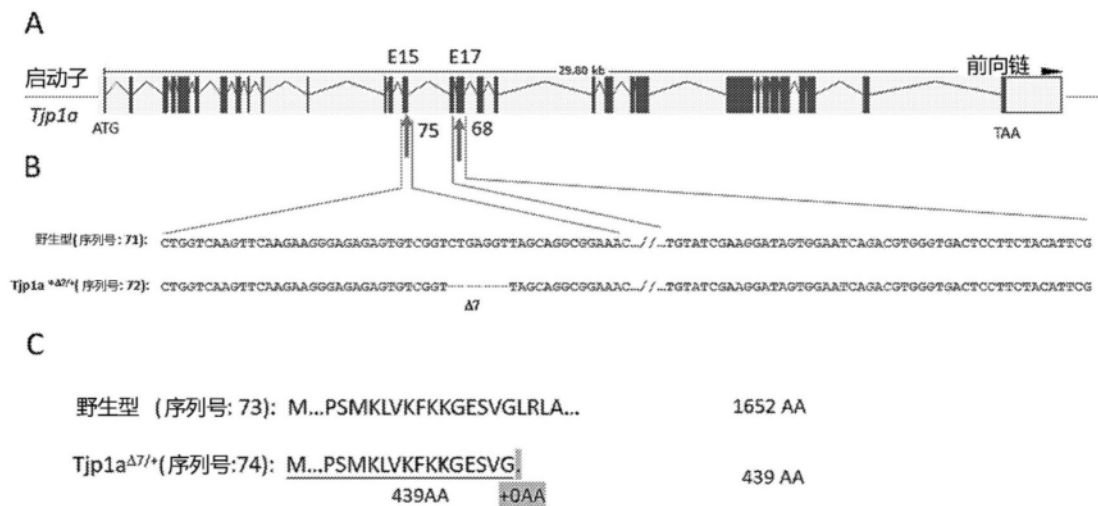


图10

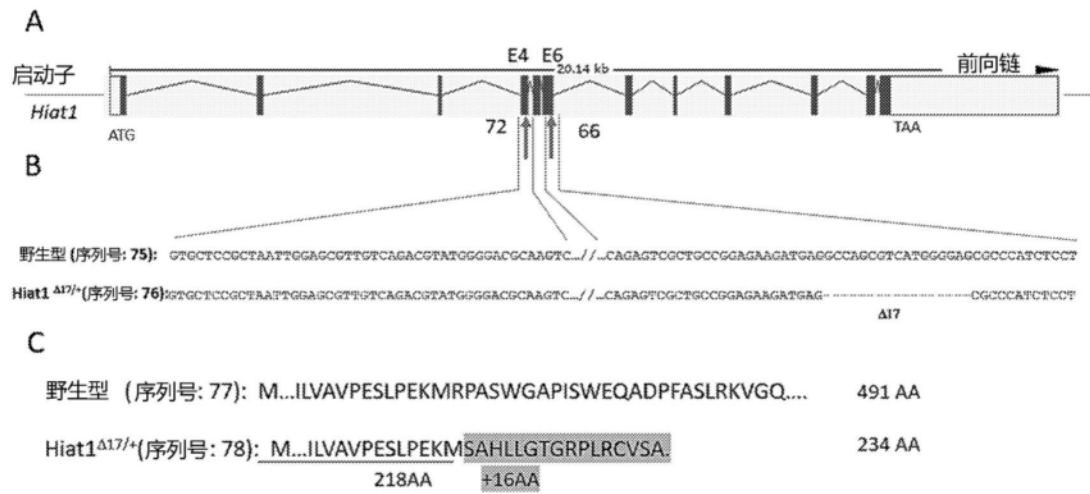


图11

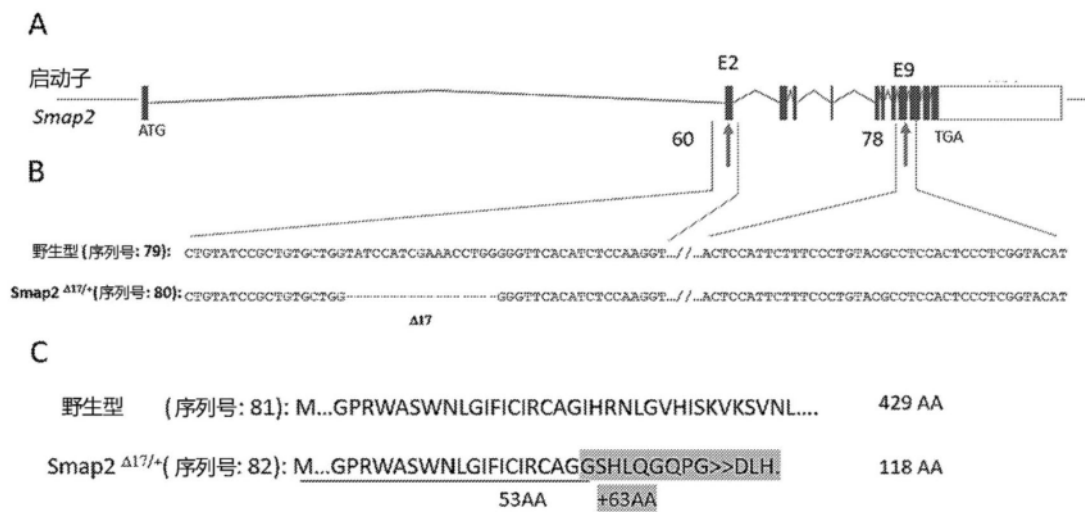


图12

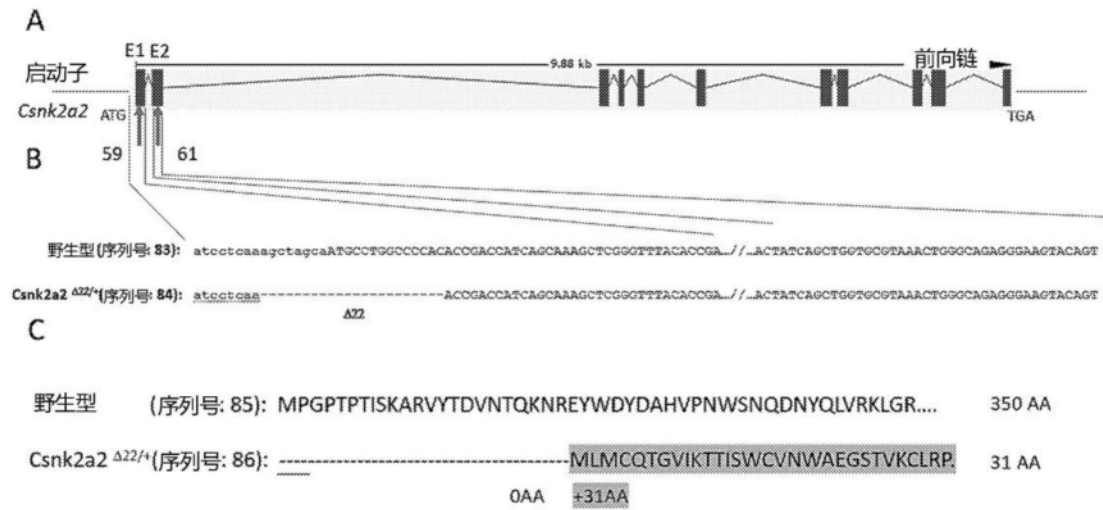


图13



图14

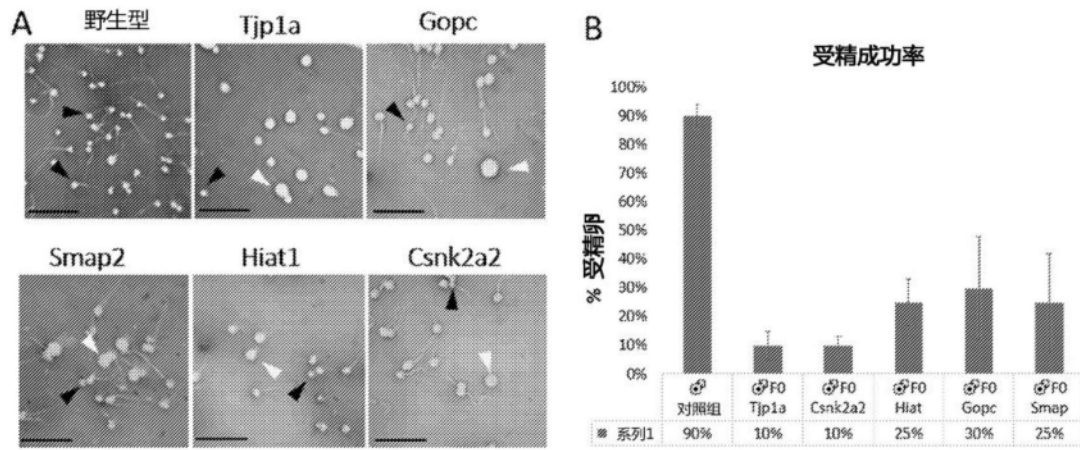


图15

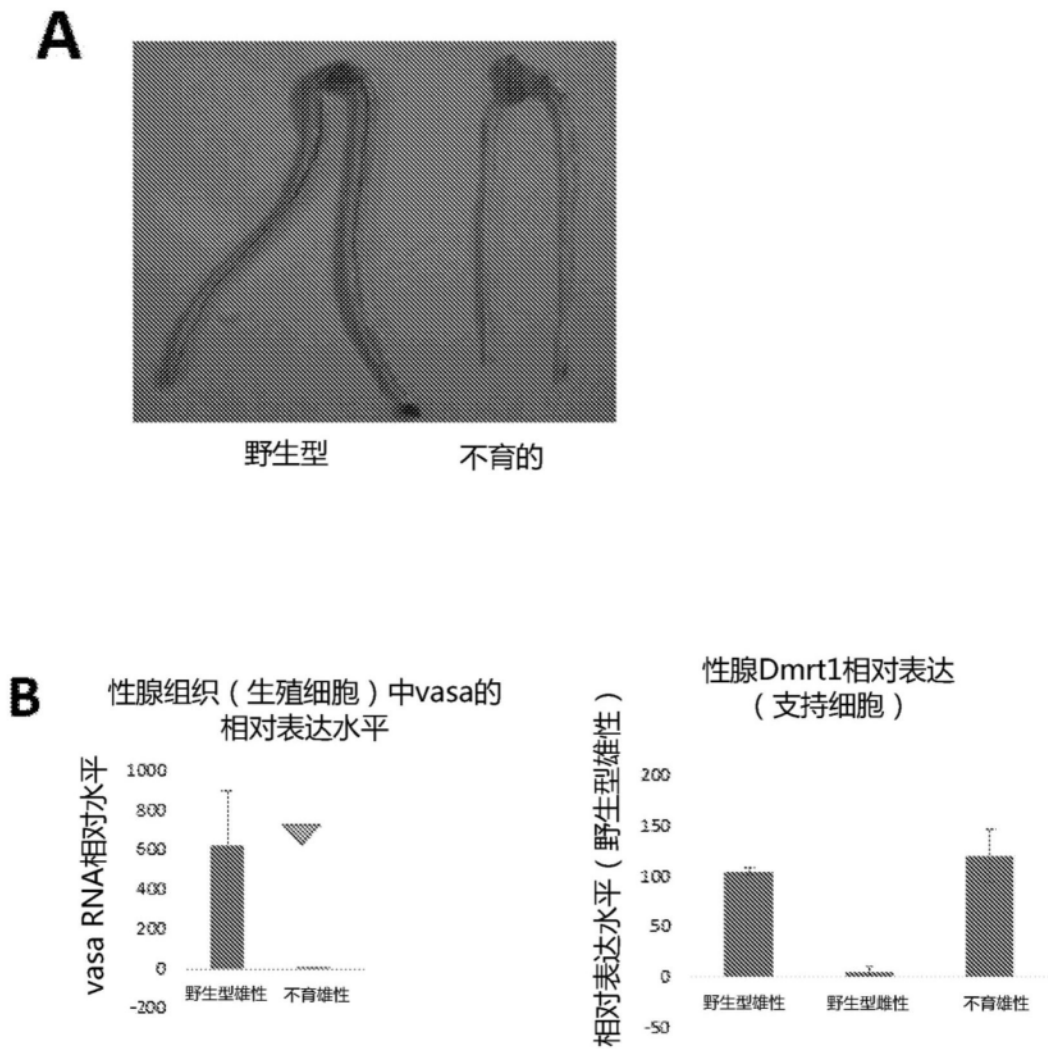


图16

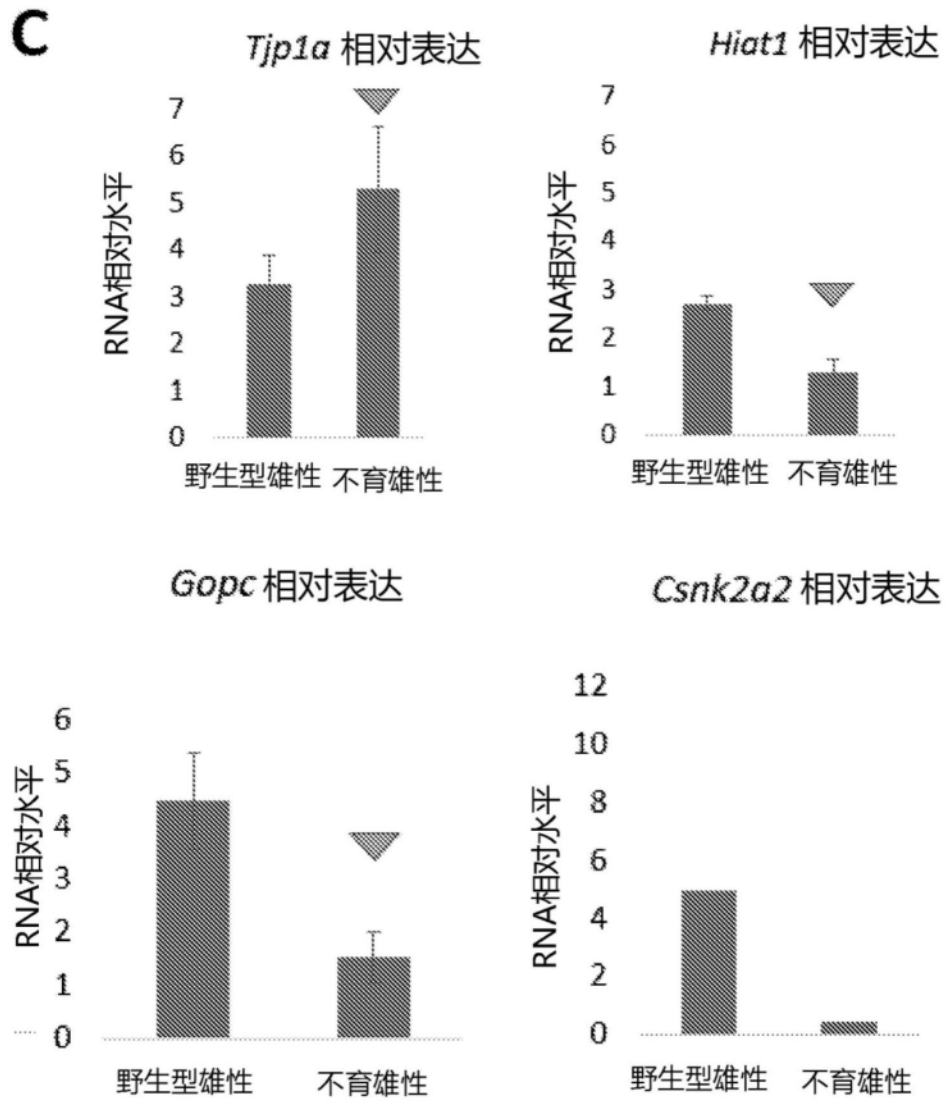


图16续

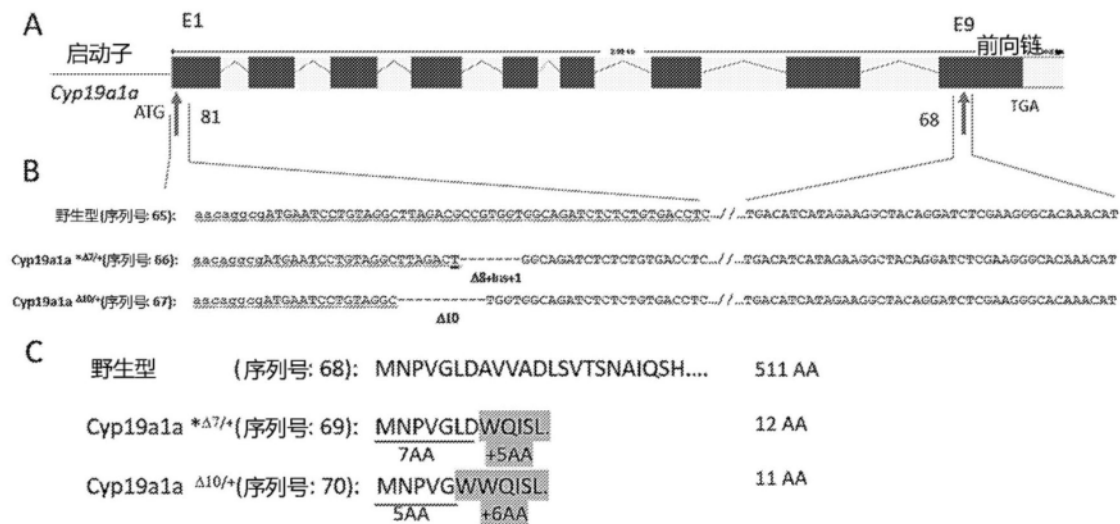


图17

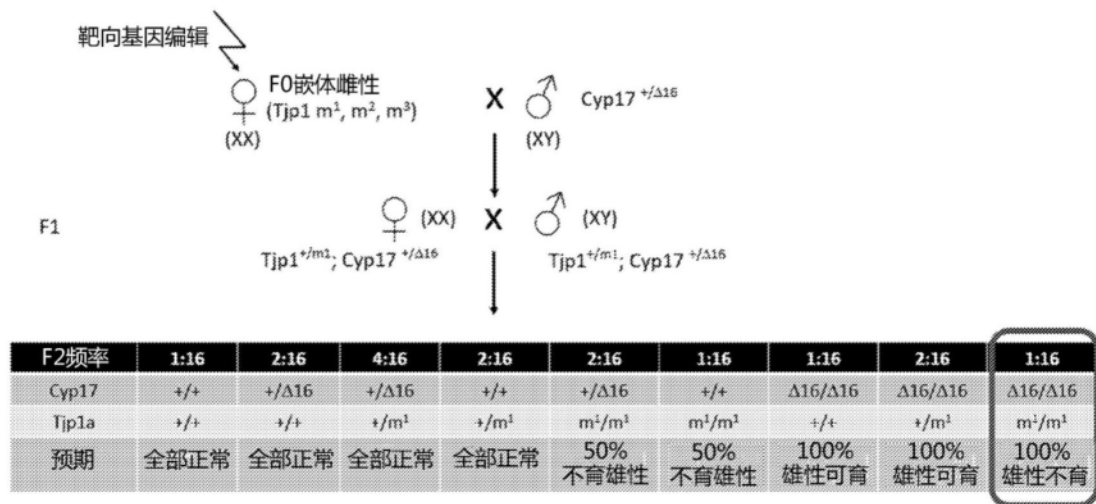


图18

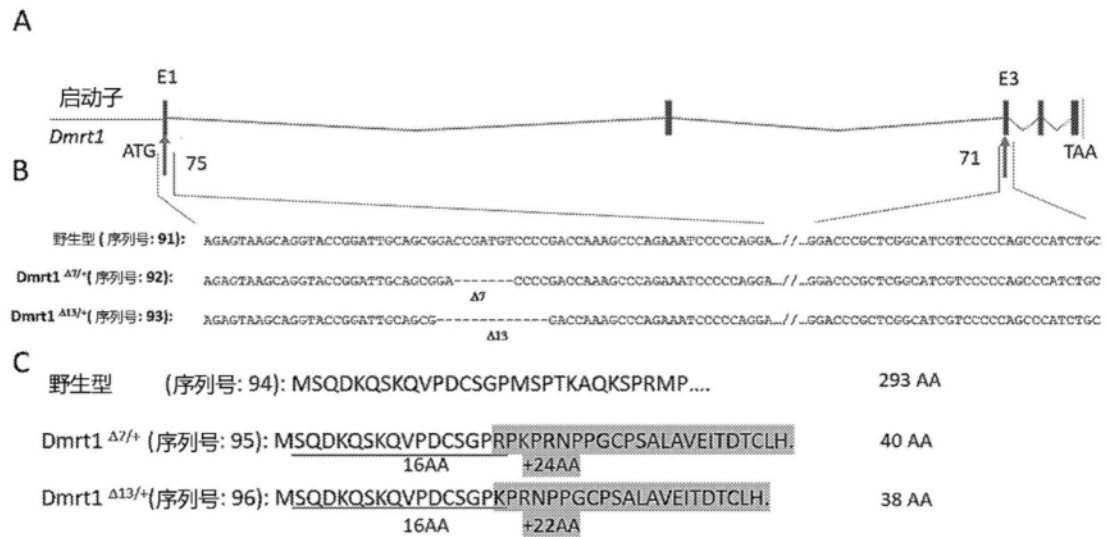


图19

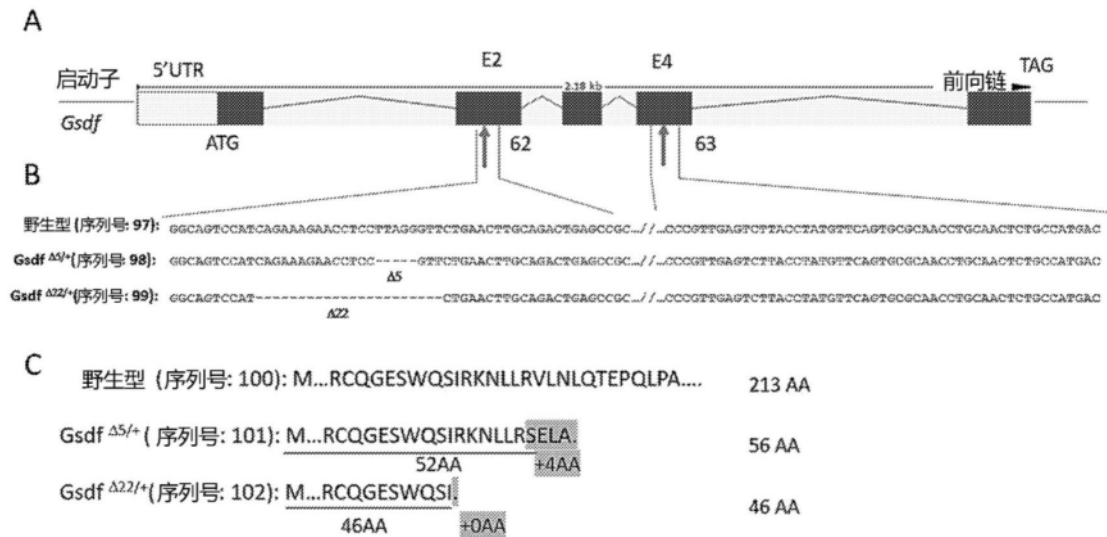


图20

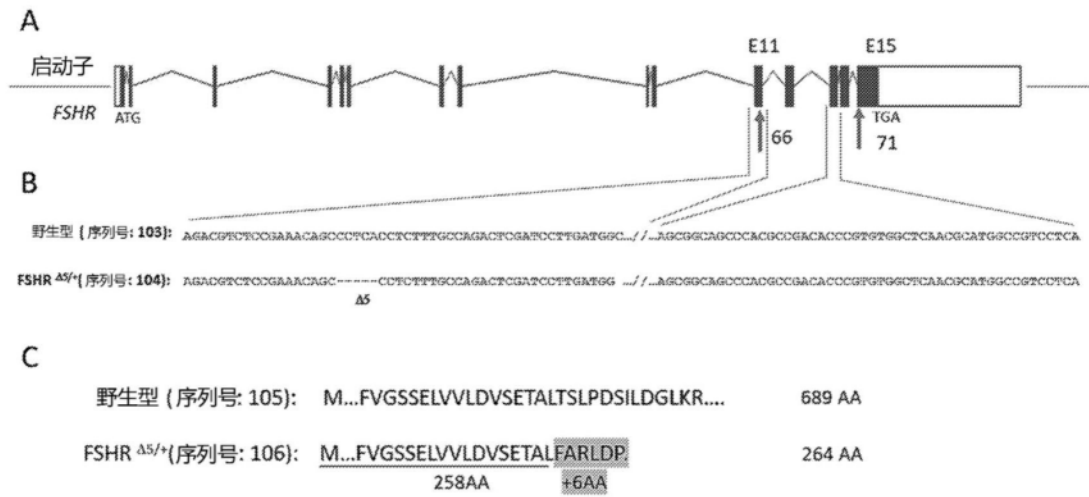


图21



图22

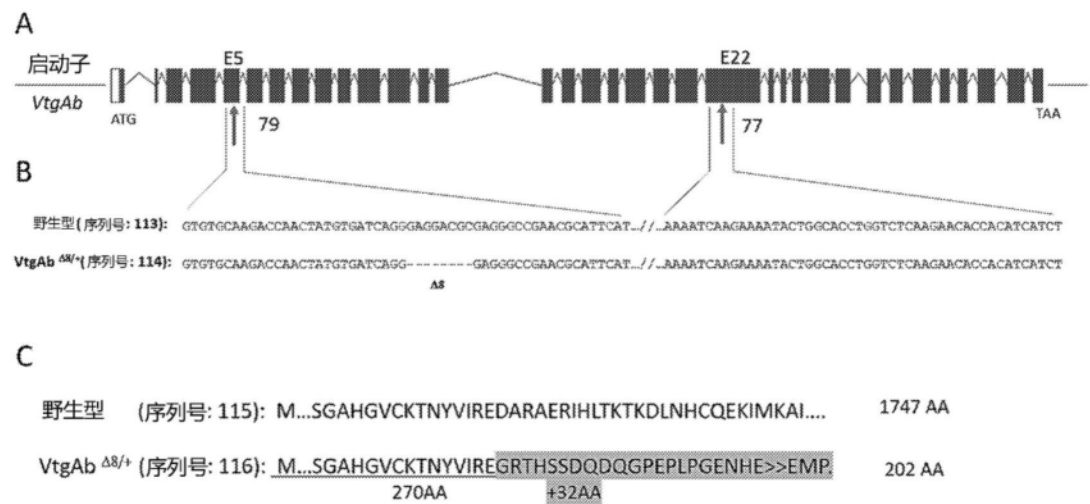


图23

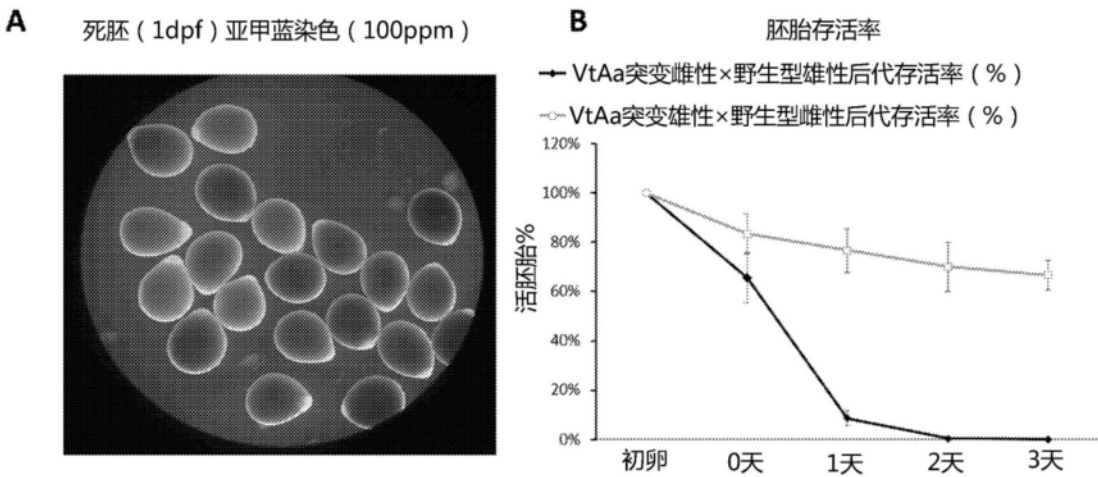


图24

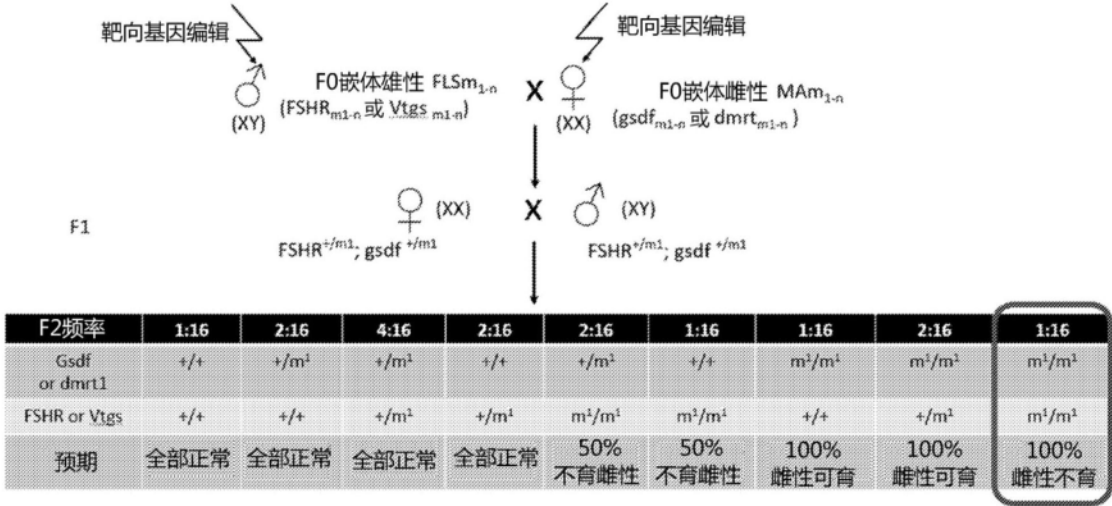


图25

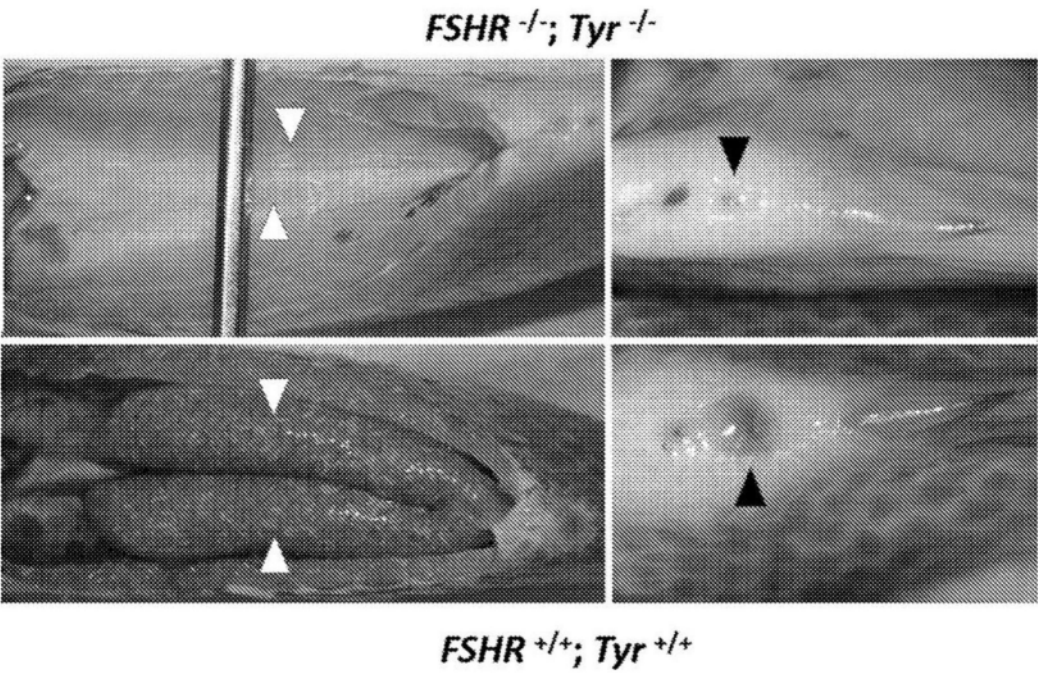


图26

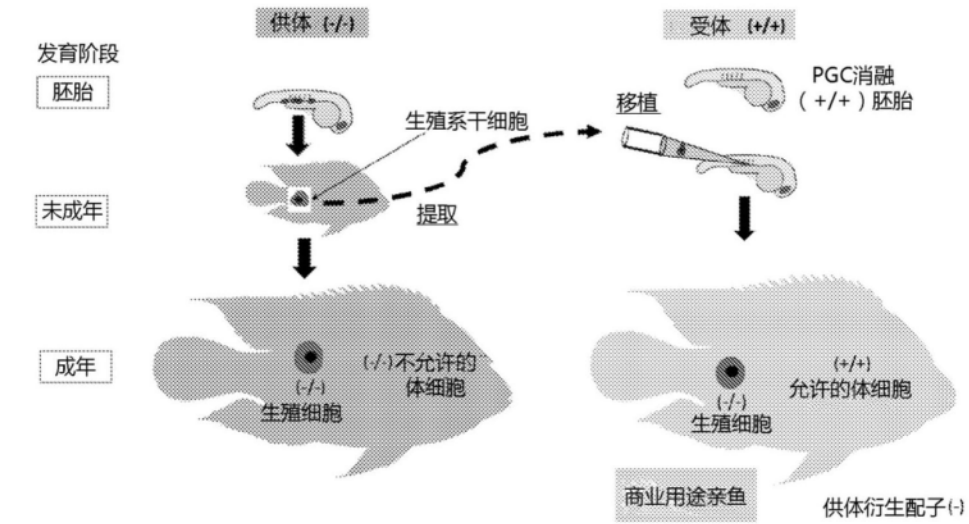


图27

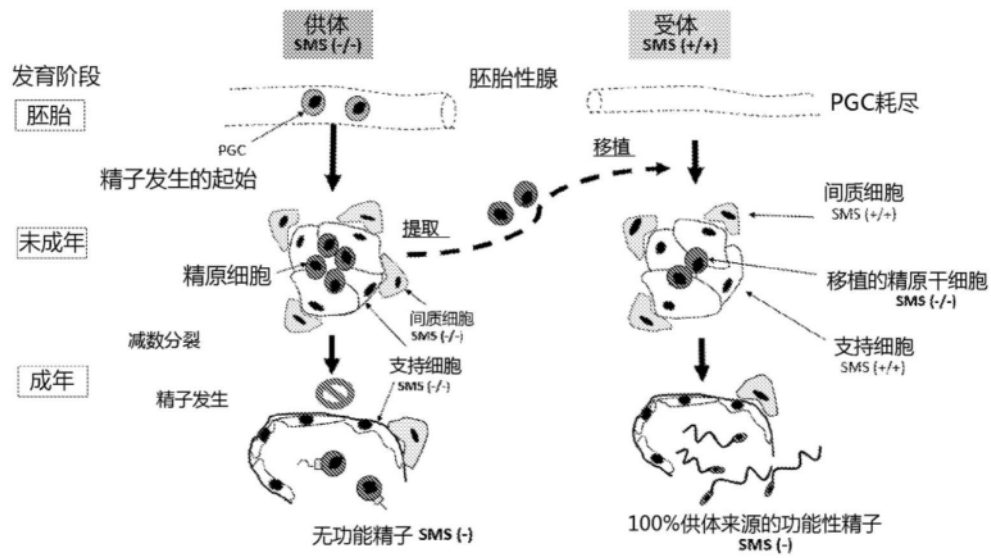


图28

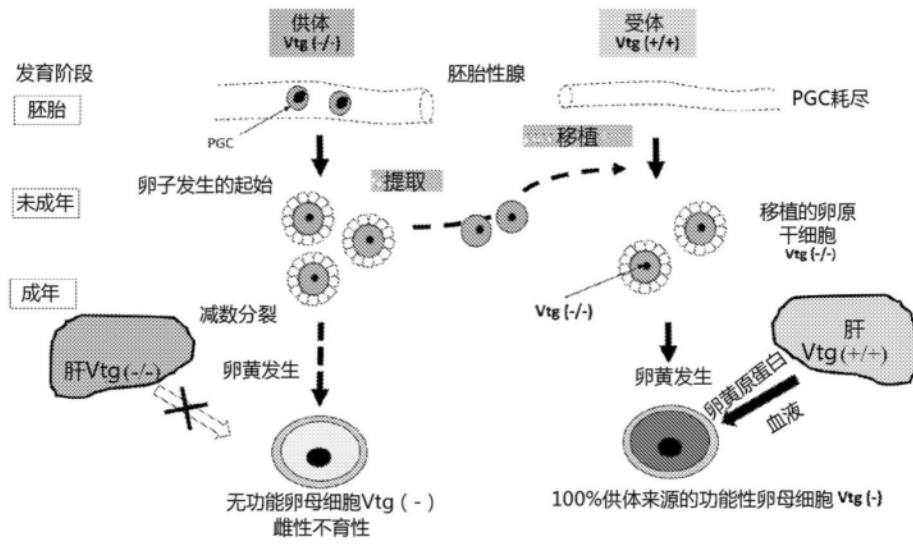


图29

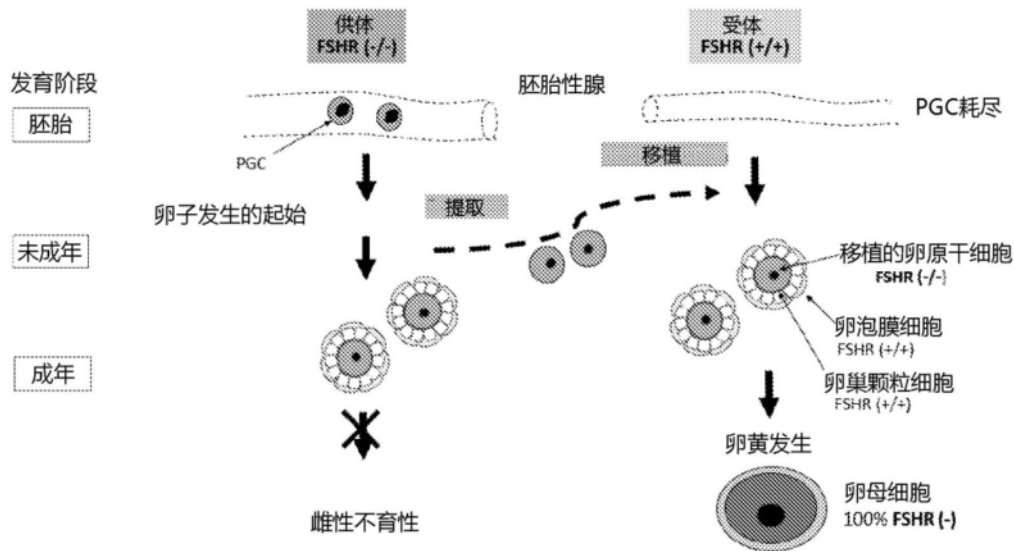


图30

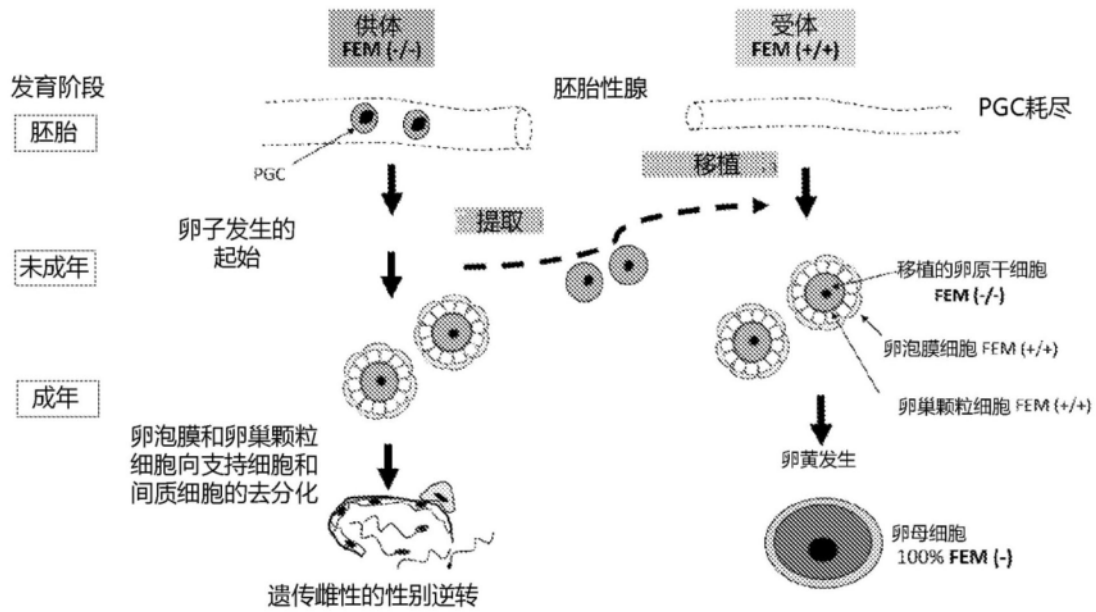


图31

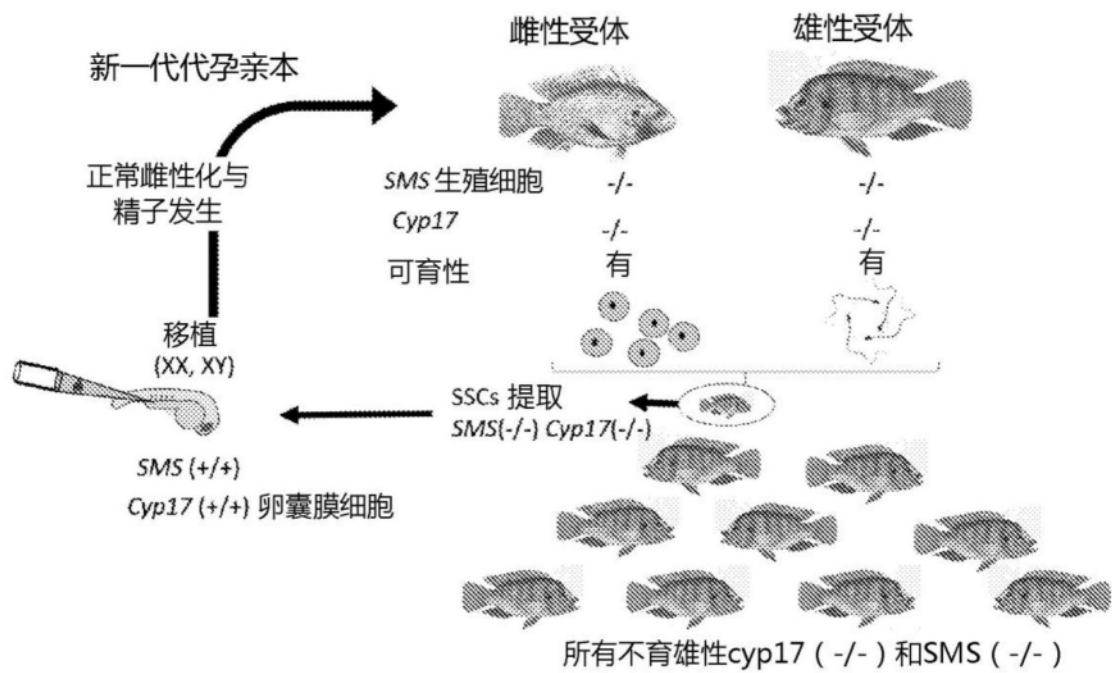


图32

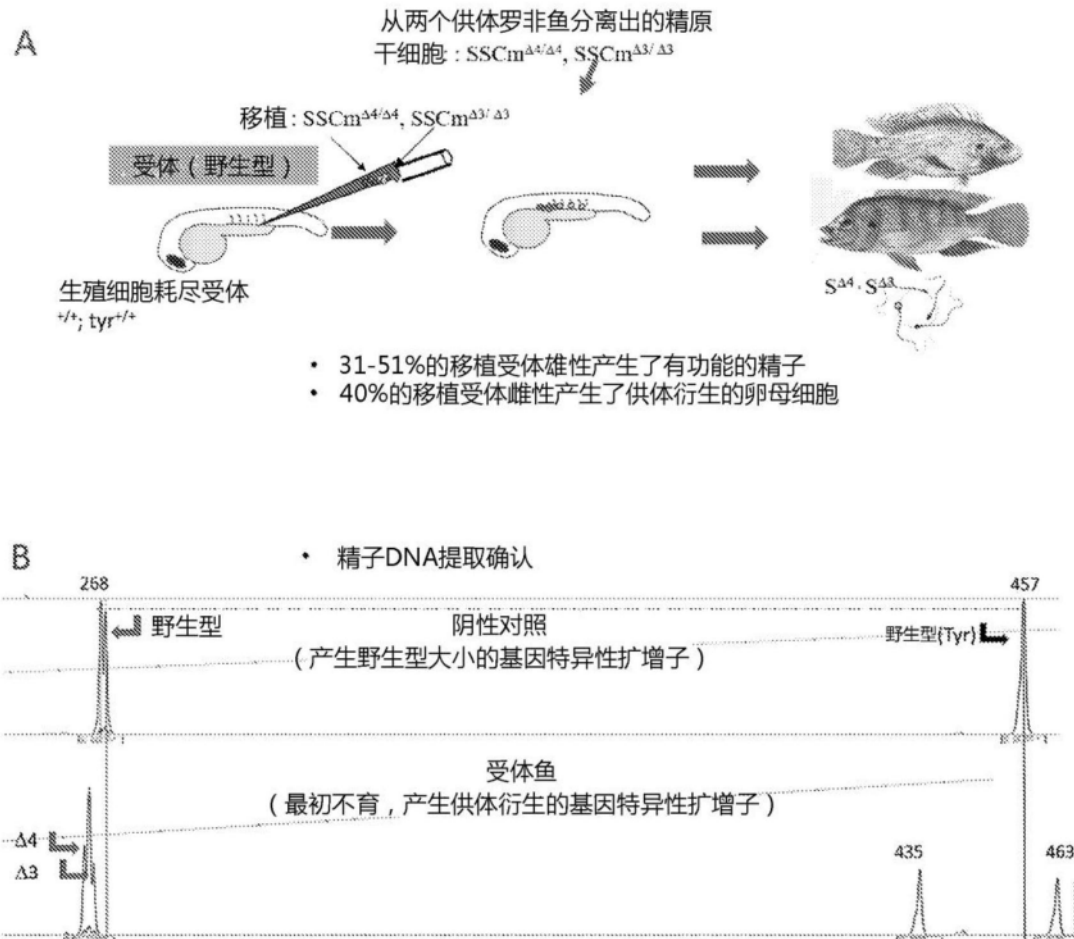


图33

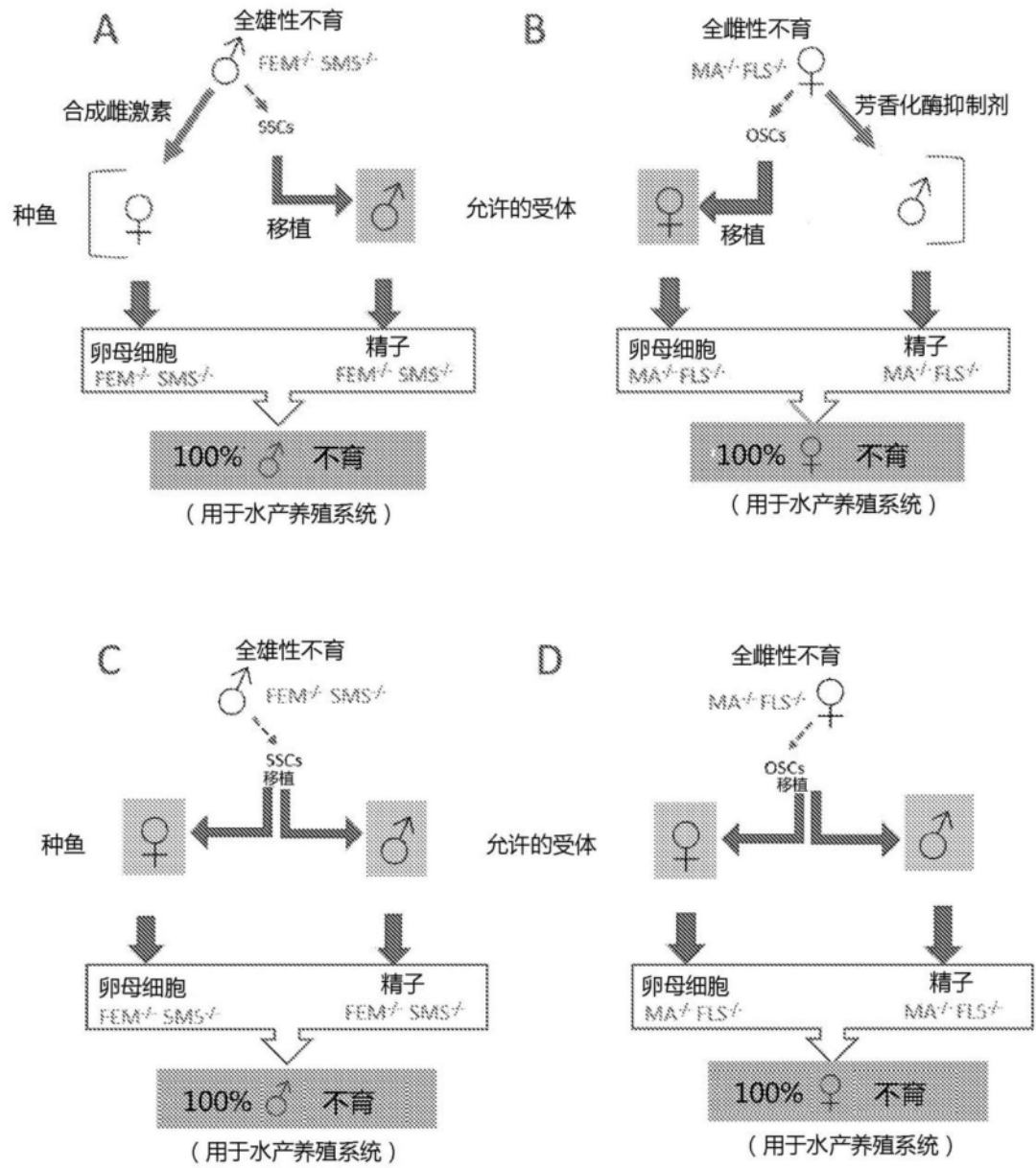


图34