

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/11

C12N 15/00

C12N 15/82

C12N 15/87

[21] 申请号 03816844.8

[43] 公开日 2005 年 9 月 14 日

[11] 公开号 CN 1668744A

[22] 申请日 2003.6.17 [21] 申请号 03816844.8

[30] 优先权

[32] 2002. 6. 22 [33] US [31] 60/390,562

[86] 国际申请 PCT/US2003/019212 2003. 6. 17

[87] 国际公布 WO2004/000006 英 2003. 12. 31

[85] 进入国家阶段日期 2005. 1. 14

[71] 申请人 辛根塔参与股份公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 R·柯翰

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

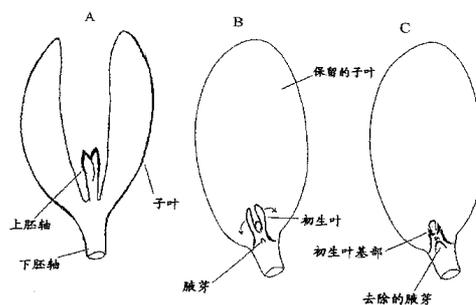
代理人 罗菊华

权利要求书 2 页 说明书 20 页 序列表 22 页
附图 4 页

[54] 发明名称 转化大豆的方法

[57] 摘要

本公开提供了农杆菌 (Agrobacterium) 介导的转化大豆细胞或组织以及将转化细胞和组织再生为转化植物的方法。 这些方法可用于转化许多种大豆栽培品种。



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

1. 一种转化大豆细胞或组织的方法，包括：
 - (a) 通过以下步骤从大豆种子制备外植体：
 - (i) 从所说的大豆种子中去除下胚轴；
 - (ii) 去除一个子叶及其邻近的腋芽，保留附于剩下子叶上的初生叶；以及
 - (iii) 从所说的保留子叶上去除一部分初生叶，由此产生初生叶基部；以及
 - (b) 将所说的外植体和含有至少一个待掺入到一个或多个大豆细胞的基因组中的目的核酸的农杆菌共培养。
2. 权利要求 1 的方法，还包括在含有选择剂的培养基中培养至少一个形成的芽。
3. 权利要求 2 的方法，其中所说的至少一个目的核酸包括选择标记基因。
4. 权利要求 3 的方法，其中所说的选择标记基因是磷酸甘露糖异构酶基因。
5. 权利要求 4 的方法，其中所说的选择剂是甘露糖。
6. 权利要求 4 的方法，其中与所说的农杆菌共培养是在甘露糖存在的情况下进行的。
7. 权利要求 2 的方法，还包括从所说的初生叶基部诱导芽形成。
8. 权利要求 7 的方法，其中芽形成是通过在含有芽诱导激素的培养基中培养所说的初生叶基部诱导的。
9. 权利要求 8 的方法，其中所说的芽诱导激素包括生长素、细胞分裂素和赤霉素中的至少一种。
10. 权利要求 9 的方法，其中所说的生长素选自由 IAA、NAA 和 IBA 组成的组。
11. 权利要求 9 的方法，其中所说的细胞分裂素选自由苜氨基嘌呤 (BAP)、thidiazuron、激动素和异戊烯基腺嘌呤组成的组。

12. 权利要求 7 的方法，其中芽形成诱导包括去除一个或多个附着于子叶上的初生分生组织、次生分生组织和腋生分生组织。
13. 权利要求 7 的方法，还包括选择转化的芽。
14. 权利要求 13 的方法，还包括将选择的转化芽再生为大豆植物。
15. 权利要求 1 的方法，其中所说的大豆种子是成熟种子。
16. 权利要求 1 的方法，其中所说的大豆种子是未成熟种子。
17. 权利要求 1 的方法，其中所说的大豆种子是已发芽种子。
18. 一种生产稳定转化的大豆植物的方法，包括：
 - (a) 通过以下步骤从大豆种子制备外植体：
 - (i) 从所说的大豆种子中去除下胚轴；
 - (ii) 去除一个子叶及其邻近的腋芽，保留附着在剩下子叶上的初生叶；以及
 - (iii) 从所说的保留子叶上去除每一个初生叶的一部分，从而产生一对初生叶基部；
 - (b) 将所说的外植体和含有待掺入到大豆细胞基因组中的目的核酸的农杆菌共培养；
 - (c) 从每个初生叶基部诱导芽的形成；
 - (d) 在含有选择剂的培养基中至少培养一个形成的芽。
 - (e) 选择转化的芽；以及
 - (f) 将选择的转化芽再生为大豆植物。
19. 从按照权利要求 1 的方法转化的大豆细胞或组织再生的转基因大豆植物。
20. 权利要求 19 的转基因植物生产的转基因种子。
21. 从按照权利要求 18 方法转化的大豆细胞或组织再生的转基因大豆植物。
22. 权利要求 21 的转基因植物生产的转基因种子。

转化大豆的方法

相关申请的交叉参考

本申请要求 2002 年 6 月 22 日提交的序列号 NO. 60/390,562 的美国临时申请的利益,该申请的全部内容以参考文献的方式并入本文。

发明领域

本发明一般涉及植物转化的方法,更具体地,涉及转化大豆细胞和组织的方法。本发明还涉及从转化的大豆细胞和组织再生转基因大豆植物的方法。本发明还涉及这些方法获得的转基因大豆植物和种子。

发明背景

大豆是一种主要的食物和饲料来源,其在全球种植的土地比任何其它的双子叶作物都多。据报导大豆种植超过 5000 万公顷面积。遗憾的是,在美国仅仅少数的植物引进产生了大豆主要的栽培变种,因而,这一窄的种质基础限制了大豆育种的潜能。栽培的大豆品种中这一有限的遗传基础限制了用传统育种方法开发具有改良或价值增值性状的变种的能力。

因此采用遗传工程技术修饰大豆可以以传统育种方法或组织培养诱导变异难以达到的方式促进新品种的开发,例如具有抗除草剂、抗病(例如抗病毒)和种子质量改良特性的新品种。

开发有效的转化系统对于植物中基因表达的分析是必须的。这种系统的要求包括合适的靶植物组织以允许有效的植物再生,基因传输工具以有效地传送外源 DNA 进入靶植物细胞,以及有效的方法以选择转化的细胞。在双子叶种类的遗传转化中,经常使用利用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 的转化系统作为基因传输工具。目前,用于农杆菌介导转化的优选靶组织包括子叶、叶组织和下胚轴。高速微粒轰击为基因传输入双子叶植物提供了可供选择的方法。

大豆中农杆菌介导的基因传输远非是常规的。在公众可获得的报

告中，经常提到分生组织和子叶组织作为用于农杆菌介导基因传输的靶子。不过，经常不能从这两个外植体资源达到可靠和有效的转化和再生。

Chee 等的美国专利号 NO. 5,169,770 和 5,376,543 讨论了转化大豆产生转基因植物的非组织培养方法，其中培养种子发芽，然后用细菌细胞特别是农杆菌菌株接种分生组织或中胚层的细胞组织，细菌细胞通过感染将 DNA 转移到外植体中。该方法依赖于预先形成的新芽的生长。

Parrot W. A. 等 (1989)， “大豆初级转化体的回收，” *Plant Cell Reports* 7: 615-617，报导了与农杆菌共培养后从未成熟的子叶组织中回收大豆转化体。不过，这些再生的植物是嵌合的，转移基因不能遗传给子代。

美国专利号 NO. 5,416,011 (Hinchee 等) 讨论了利用要求去除下胚轴、保留并分开子叶的子叶外植体，并用含有目的基因的根癌农杆菌载体接种该子叶外植体以插入嵌合基因。

Yan B. 等 (2000)， “利用未成熟合子子叶外植体根癌农杆菌介导的大豆转化，” *Plant Cell Reports* 19: 1090-1097，报导用未成熟子叶农杆菌介导的大豆转化中总的转化频率为 0.03 %。

Martinelli 等的美国专利号 NO. 6,384,301 描述了农杆菌介导基因传输分离的大豆胚轴分生组织细胞中。这些方法不包括愈伤组织期组织培养。

从以上描述的工作来看，显然地，当利用分生组织和子叶组织作为用于农杆菌介导的基因传输的资源外植体时，相关的工作者很少实现建立一个可靠的大豆转化系统的目标。因此，为了开发更有效的大豆转化系统，需要继续探索新的方法，包括新的资源外植体。

已经证明，在大豆组织培养中可以从上胚轴组织和初生叶组织获得植物再生。不过，至今为止，在大豆中用这两种外植体源作为基因传输的靶子还没有成功转化的报导。

Wright M. S. 等 (1987) “*Glycine max* L. Merr. 的起始和繁殖：

来自组织培养的上胚轴的植物，” *Plant Cell Reports* 8: 83-90，描述了芽从大豆上胚轴组织成功的起始和增殖。在含有 20 μM 细胞分裂素的 Schenk 和 Hildebrandt 培养基中培养 5 周诱导外植体上胚轴形成芽。在含有 2.1 nM picloram 和 0.1 μM 苄基腺嘌呤的培养基中芽保持增殖。

Wright M. S. 等 (1987) “大豆 (*Glycine max* L. Merr.) 从培养的初生叶组织中再生，” *Plant Cell Reports* 6: 83-89，描述了从 27 种大豆的初生叶组织中再生植物的可重复的方法。他们发现尽管已证明 2, 4, 5-三氯苯氧基乙酸对于再生是必须的，但发现苄基腺嘌呤 (BA) 能增强再生。

Rajasekaren K. 等 (1997) “培养的大豆 (*Glycine max* L. Merr) 上胚轴和初生叶的体细胞胚胎发生，” *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 33 (2): 88-91，描述了几种大豆通过体细胞胚胎发生从温室栽培植物的未成熟种子的培养上胚轴和初生叶组织的再生。他们发现当具有完整合子胚胎轴的半子叶在补充了 46.2 μM 2, 4-D 的 Murashige 和 Skoog (MS) 培养基上培养时，可从上胚轴和初生叶诱导体细胞胚胎发生。在没有与半子叶培养的情况下，从提取的胚轴、上胚轴或初生叶中没有观察到胚胎发生。在含有 11.3 μM 苄基腺嘌呤的 Cheng 氏基础培养基上，可从发芽体细胞胚胎获得芽尖的快速增殖。

发明概述

本发明提供了转化大豆细胞和将转化细胞再生为转化植物的方法。所述方法可用于转化多种大豆栽培品种。

本发明提供了一种新的大豆外植体，其使根癌农杆菌能高效地介导基因传输至大豆细胞中。

具体地，本发明提供了转化大豆细胞或组织的方法，所述方法包括：

(a) 通过以下步骤从大豆种子制备外植体：

(i) 从所说的种子中去除全部或部分下胚轴；
(ii) 从所说的种子中去除一个子叶及其邻近的腋芽 (axillary bud)，并且保留一个其上附有上胚轴和初生叶的子叶；
(iii) 去除保留子叶的部分初生叶，由此产生初生叶基部；
以及

(b) 将该外植体和含有待掺入到大豆细胞基因组中的目的核酸的农杆菌共培养。

在另外的实施方案中，所述方法还包括一个或多个下述内容：从初生叶基部及其邻近的上胚轴诱导芽形成；在含有选择剂的培养基中培养该芽；选择转化的芽；以及从转化的芽再生转化的植物。

在进一步的实施方案中，本发明提供了生产稳定转化的大豆植物的方法，所述方法包括：

(a) 通过以下步骤从大豆种子制备外植体：
(i) 从所说的种子中去除全部或部分下胚轴；
(ii) 从所说的种子中去除一个子叶及其邻近的腋芽，并且保留一个其上附有上胚轴和初生叶的子叶；
(iii) 从上胚轴中去除部分初生叶，由此产生至少一个初生叶基部；

(b) 共培养该外植体和含有待掺入到大豆细胞基因组的目的核酸的农杆菌；

(c) 从初生叶基部区诱导芽形成；
(d) 在含有选择剂的培养基中培养形成的芽；
(e) 选择转化的芽；以及
(f) 再生已选择的转化芽为大豆植物。

在另一个实施方案中，去除 (a) (ii) 中产生的外植体每个初生叶的一部分，从而产生一对初生叶基部。

本发明的方法可用于将任何目的核酸导入大豆细胞中。在本发明的一个实施方案中，所述核酸含有在大豆中表达所需农艺学性状的基因。

在本发明的另一实施方案中，所述核酸含有用作选择标记基因的磷酸甘露糖异构酶基因。

在本发明的另一实施方案中，外植体和农杆菌共转染是在有甘露糖存在的情况下进行的。

成熟和未成熟种子都可用于产生本发明所用的外植体。

附图简述

图 1 显示质粒 pNOV2105 的图谱。

图 2 显示质粒 pNOV2145 的图谱。

图 3 显示质粒 pNOV2147 的图谱。

图 4 显示制备大豆外植体的示范方法。图 A 描述了大豆种子胚胎，其中去除一部分下胚轴。图 B 描述了来自图 A 的大豆外植体，其中去除了一个子叶及其邻近的腋芽。图 C 描述了去除两个初生叶的图 B 的大豆外植体，在每个初生叶的基部产生断裂点。

图 5 显示质粒 pBSC11234 的图谱。

图 6 显示质粒 pBSC11369 的图谱。

发明详述

现在，将参考附图在下文中更加全面地描述本发明，其中描述了本发明的多种实施方案。不过，本发明可以以不同的方式体现，而不应该解释为限于这里所示的实施方案。相反，提供这些实施方案是为了使本公开更全面和完整，向本领域的技术人员全面地表达本发明的范围。这里用于本发明描述的术语仅仅是为了说明具体的实施方案而没有限制本发明之意。在本发明说明书和所附的权利要求中，除非文中另外清楚地指明外，单数形式“一个”和“这个”旨在也包括复数形式。

除非另外定义，本文所用技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的意思相同。

除非另外说明，可使用标准方法生产根据本发明的克隆基因、表

达盒子、载体（例如质粒）、蛋白和蛋白片段、以及转化的细胞和植物。除非另有说明，可使用标准方法生产根据本发明的克隆基因、表达盒子、载体（例如质粒）、蛋白和蛋白片段。这些技术对本领域技术人员是公知的，参见例如，J. Sambrook 等，分子克隆：实验室手册第二版（冷泉港实验室，Cold Spring Harbor, New York, 1989），和 F. M. Ausubel 等，当前分子生物学实验方案（Green Publishing Associates, Inc. 和 Wiley-Interscience, New York, 1991）；J. Draper 等编辑，植物遗传转化和基因表达：实验室手册，（Blackwell Scientific Publications, 1988）；和 S. B. Gelvin & R. A. Schilperoort 编辑，植物中基因产物的导入、表达和分析。

本发明描述了用目的核酸序列稳定转化大豆和再生转基因大豆植物的方法和组合物。

本发明的方法可用于在大豆植物中表达任何目的核酸。目的基因可以是，例如，除草剂性基因、抗病基因、或抗昆虫/害虫基因，或者是选择或评价标记，并含有植物可操作的启动子、编码区和 3'终止子区。除草剂性基因包括对咪唑啉酮或磺酰脲除草剂耐药的 AHAS 基因、对 bialaphos 或 glufosinate 耐药的 pat 或 bar 基因、对 glyphosate 耐药的 EPSP 合酶基因等。抗病基因包括抗生素合成酶基因，例如硝吡咯菌素合成酶基因，植物来源的抗性基因等等。昆虫抗性基因包括苏云金菌芽孢杆菌杀虫蛋白基因。目的基因也可以编码与生物化学途径有关的酶，该酶的表达可改变食物、饲料、营养药和/或药物生产中重要的性状。目的基因可以位于质粒上。适合本发明使用的质粒可以含有一个以上目的基因和/或农杆菌可含有带有不同目的基因的不同质粒。

本发明提供了大豆属各种类包括 *Glycine max*（大豆种）的转化方法。所述方法是以农杆菌介导的目的基因传输入大豆细胞、之后转化的细胞再生为转化的大豆植物为基础的。本发明的方法独立于栽培品种。

在本发明的一个实施方案中，外植体是通过将从温室栽培植物收

集的大豆成熟种子或未成熟种子在种子发芽培养基中萌发一段时间，从所说的成熟种子或未成熟种子去除种皮，之后去除子叶而制备的。在本发明一个优选实施方案中，然后去除一部分暴露的初生叶，从而在初生叶基部 (primary leaf base) 产生断裂点 (图 4)。将农杆菌介导的基因传输在初生叶基部或初生叶断裂点区的细胞上进行。从上胚轴的初生叶基部区诱导不定芽 (shoots) 形成。该诱导是通过去除先存在的分生组织 (即初生、次生和腋生的分生组织)，并将外植体在含有合适生长调节剂的芽诱导培养基中培养获得的。所述的芽诱导方法促进了来自靶向的初生叶基部细胞的转化芽的发育或再生。

在选择剂存在的情况下培养转化的大豆细胞。优选地，这些细胞用磷酸甘露糖异构酶 (PMI) 基因转化，并且转化的基因在甘露糖存在的情况下培养。在含有甘露糖为选择剂的培养基中，PMI 基因转化的大豆细胞比没有如此转化的大豆细胞有生长优势。

与文献报导的其它农杆菌介导的转化方法相比，用本发明所述方法再生转化的大豆植物所需时间显著地缩短了。从转化实验开始 8 到 12 周生根的转化大豆芽可以生成。待插入大豆基因组中的外源遗传构建体或转基因可通过常规的重组 DNA 操作技术在体外构建。该构建体可由任何异源核酸组成。该遗传构建体转化入农杆菌株中以便传输到大豆细胞中。所述农杆菌是非致癌的，几个这样的菌株目前可广泛地获得。所述农杆菌优选选自根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) 和毛根农杆菌 (*A. rhizogenes*)。

优选地，外源基因构建体含有选择标记基因。优选的选择标记基因是磷酸甘露糖异构酶基因。其它合适的选择标记基因包括，但不限于，编码下述物质的基因：新霉素磷酸转移酶 II (Fraley 等, *CRC Critical Reviews in Plant Science* 4, 1 (1986))；氰氨水合酶 (Maier-Greiner 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4250 (1991))；天冬氨酸激酶；二氢吡啶二羧酸合酶 (Perl 等, *BioTechnology* 11, 715 (1993))；bar 基因 (Toki 等, *Plant Physiol.* 100, 1503 (1992))；Meagher 等, *Crop Sci.* 36, 1367 (1996))；色氨酸脱羧酶 (Godijn

等, *Plant Mol. Biol.* 22, 907 (1993)); 新霉素磷酸转移酶 (NEO; Southern 等, *J. Mol. Appl Gen.* 1, 327 (1982)); 潮霉素磷酸转移酶 (HPT 或 HYG; Shimizu 等, *Mol. Cell. Biol.* 6, 1074 (1986)); 二氢叶酸还原酶 (DHFR); 磷丝菌素乙酰转移酶 (DeBlock 等, *EMBO J.* 6, 2513 (1987)); 2,2-二氯丙酸脱卤素酶 (Buchanan-Wollaston 等, *J. Cell. Biochem.* 13D, 330 (1989)); 乙酰羧基合酶 (Anderson 等, 美国专利号 No. 4,761,373; Haughn 等, *Mol. Gen. Genet.* 221, 266 (1988)); 5-烯醇丙酮酰-莽草酸-磷酸 (5-enolpyruvyl-shikimate-phosphate) 合酶 (*aroA*; Comai 等, *Nature* 317, 741 (1985)); 卤芳基腈水解酶 (Stalker 等, WO 87/04181); 乙酰辅酶 A 羧化酶 (Parker 等, *Plant Physiol.* 92, 1220 (1990)); 二氢蝶酸合酶 (*suI1*; Guerineau 等, *Plant Mol. Biol.* 15, 127 (1990)); 以及 32 kDa 的光系统 II 多肽 (*psbA*; Hirschberg 等, *Science* 222, 1346 (1983)) 。

还包括的基因有编码对以下药物耐药的基因: 氯霉素 (Herrera-Estrell 等, *EMBO J.* 2, 987 (1983)); 氯甲蝶呤 (Herrera-Estrella 等, *Nature* 303, 209 (1983); Meijer 等, *Plant Mol. Biol.* 16, 807 (1991)); 潮霉素 (Waldron 等, *Plant Mol. Biol.* 5, 103 (1985); Zhijian 等, *Plant Science* 108, 219 (1995); Meijer 等, *Plant Mol. Bio.* 16, 807 (1991)); 链霉素 (Jones 等, *Mol. Gen. Genet.* 210, 86 (1987)); 壮观霉素 (Bretagne-Sagnard 等, *Transgenic Res.* 5, 131 (1996)); 博来霉素 (Hille 等, *Plant Mol. Biol.* 7, 171 (1986)); 磺胺 (Guerineau 等, *Plant Mol. Bio.* 15, 127 (1990)); bromoxynil (Stalker 等, *Science* 242, 419 (1988)); 2,4-D (Streber 等, *Bio/Technology* 7, 811 (1989)); 磷丝菌素 (DeBlock 等, *EMBO J.* 6, 2513 (1987)); 壮观霉素 (Bretagne-Sagnard 和 Chupeau, *Transgenic Research* 5, 131 (1996)) 。

在一个实施方案中, 用于转化方法的起始材料是大豆成熟种子。在另一个实施方案中, 起始材料可以是栽培大豆植物的大豆未成熟种

子。所述种子置于发芽培养基中，允许其发芽 6-24 小时，优选地发芽大约 6-14 小时，更优选地大约 8-12 小时。如果需要的话，还可以允许种子发芽更长时间，例如 2 到 5 天。

去除发芽种子的种皮和下胚轴。再去除一个子叶及其邻近的腋芽。然后，将初生叶实质性地去除，从而产生一个含有初生叶基部、该初生叶基部附着的上胚轴以及该上胚轴附着的子叶的外植体。实质性地去除意思是去除了初生叶组织的主要部分。

对于农杆菌介导的基因转移，已知植物组织的创伤能促进基因转移。因此，优选但不是必需的，可在初生叶基部区域造成伤口。

然后，将如上文所述方法制备的外植体浸入农杆菌细胞悬浮液中几分钟到几小时，典型地大约 0.5-3 小时，优选地 1-2 小时。去除过多的农杆菌细胞悬浮液，允许剩下的农杆菌和外植体在大约 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的温度、16 小时光照/8 小时黑暗条件下在共培养培养基上共培养几天，典型地 2 到 5 天，优选地 3 到 4 天。

共培养后，将外植体转移到一个培养基（或一系列培养基）中培养 8-12 周，所述培养基有利于芽发育和转化细胞的选择。这样的培养基（或这些培养基）一般含有芽诱导激素以及选择剂。下面实施例中使用的再生培养基含有甘露糖作为选择剂，以及苜蓿基嘌呤作为芽诱导激素。术语激素还包括诱导芽形成的细胞生长调节化合物，包括但不限于植物生长素（例如 IAA、NAA 和吲哚丁酸（IBA））、细胞分裂素（cytokinins）（如 thidiazuron、激动素（kinetin）和玉米素），和/或赤霉素（ GA_3 ）。

当芽长到大约 2 cm 并有完全三叶形成时，将芽从外植体分出，并置于生根培养基上诱导根的形成。优选地，生根培养基也包括选择剂以进一步有助于鉴定可能转化的芽。根形成大约需要 1-2 周，之后可将该植物转移到土壤中并培养到完全成熟。

含有异源核酸（即含有按照本文描述方法转化的细胞或组织）的转基因植物以及通过该转基因植物产生的种子和后代是本发明的另一方面。将转化细胞培养成有用栽培品种的方法是本领域技术人员公知

的。植物组织体外培养技术和许多情况中整体植物再生技术是公知的。本发明的另一方面是含有上述核酸的转基因植物组织、植物或种子。在优选的实施方案中,使用本文所述方法产生的转化植物不是嵌合的,或仅仅有一小部分转化的植物是嵌合的。优选地,这通过延长高浓度细胞分裂素处理的时间或增加甘露糖选择的严紧性或两者皆用而实现。

因此,通过选择或筛选鉴定并在如本文所提供的支持再生的合适培养基中培养后,可以允许本发明的转化细胞成熟为植物。优选地,植物在栽培间或者温室中成熟。转化子鉴定后大约 2-6 周(依赖于初始的组织),植物得以再生。在再生期间,细胞可在组织培养容器中的固体培养基上培养。这些培养容器的示例实施方案是培养皿和植物 Con[®]s。再生中的植物长到芽和根发育阶段后,为进一步生长和试验可以将它们转移到温室中。如上文所提供的,再生植物的种子和后代植物是本发明的一个方面。相应地,术语“种子”意指包括这些转化植物的种子以及转化植物后代产生的种子。本发明的植物不仅包括转化和再生的植物,还包括通过本文所述方法产生的转化和再生植物的后代。

通过上文所描述的标准方法可以从所述方法产生的植物中筛选成功的转化植物。为了开发改良的植物和种子品系(这也是本发明的另一方面),可以持续地筛选和选择本发明再生植物的种子和子代植物以使转基因和整合的核酸序列持续存在。因此,可以将所需要的转基因核酸序列移入(即渐渗或近亲交配)其它的遗传品系如某些原种或商业上有用的品系或品种中。渐渗目的核苷酸序列进入遗传植物品系的方法可通过本领域公知的多种技术来实现,这些技术包括通过传统的育种、原生质体融合、细胞核转移以及染色体转移。育种方法和技术是本领域公知的,例如下列文献中所示的, J. R. Welsh, 植物遗传和育种基础(John Wiley 和 Sons, New York, (1981)); 农作物育种(D. R. Wood, 编辑, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, (1983)); O. Mayo, 植物育种理论, 第二版(Clarendon

Press, Oxford, England (1987); 以及 Wricke 和 Weber, 数量遗传学和选择植物育种 (Walter de Gruyter 和 Co., Berlin (1986))。使用这些以及本领域的其它技术, 根据本发明获得的转基因植物和近交系可用于生产商业上有价值的杂交植物和农作物, 杂交的品种也是本发明的一个方面。

上述内容是本发明各种实施方案的举例说明, 而不应看作是对其限制。

通过下面的实施例进一步描述本发明, 这些实施例并不以任何方式限制本发明的范围。

实施例 1

转化载体

质粒 pNOV2105 (图 1) 是对 WO 97/04112 公开和描述的 pVictor 的修改, 其中 35S 启动子由 SMAS 启动子代替, 35S 终止子由 Nos 终止子代替, 另一 SMAS 启动子插入到 GUS 内含子 GUS 序列的上游, GUS 内含子 GUS 序列 3' 末端侧翼是 Nos 终止子。用于本文所述方法中的 pNOV2105 不含有在 pVictor 中发现的多克隆位点。不过, 如果需要的话, 增加这样的克隆位点完全在本领域的技术之内。

pNOV2105 (图 1) 是用于农杆菌介导的植物转化的载体, 并含有来源于胭脂氨酸型 pTiT37 质粒 (Yadav 等, 1982 Proc Natl Acad Sci 79: 6322-6326) 的 Ti 右和左边界序列, 其位于磷酸甘露糖异构酶 (PMI) 和 β -葡糖醛酸酶 (GUS) 基因的侧翼。

为在大肠杆菌 (*E. coli*) 中复制和保持, 该质粒含有大肠杆菌质粒 pUC19 的复制原点 (pUC19ori) (Yanish-Perron 等, 1985 Gene 33: 103-119), 并且为了在根癌农杆菌中复制和保持, 该质粒还含有假单胞菌 (*Pseudomonas*) 质粒 pVS1 的复制原点 (pVS1ori) (Itoh 等 1984 Plasmid 11: 206-220; Itoh 和 Hass 1985 Gene 36: 27-36)。为在大肠杆菌和根癌农杆菌中筛选, 该质粒含有编码 3'' (9)-0-核苷酸转移酶的来自转座子 Tn7 的壮观霉素/链霉素抗性基因

(spec/strep) (Fling 等 1985 *Nucleic Acids Res* 19: 7095-7106)。为在细菌中有效的表达, spec/strep 抗性基因与 tac 启动子(参见如 Amann 等 1983 *Gene* 25 (203): 167-78) 融合。

在右和左边界之间的 T-DNA 片段含有下述基因, 这些基因是通过根癌农杆菌介导的转化转移到大豆植物中的仅有基因。

GUS 内含子 GUS

β -葡糖醛酸酶 (GUS): 该片段挨着右边界, 含有大肠杆菌的 β -葡糖醛酸酶基因, 在该编码区内有一内含子以阻止融合 SMAS 启动子和 Nos 终止子的农杆菌进行翻译。GUS 内含子 GUS 基因是从质粒 pBISN1 (Narasimhulu 等 1986 烟草和玉米中农杆菌 DNA 的早期转录, *Plant Cell* 8: 873-866) 分离的。

磷酸甘露糖异构酶 (PMI): 该片段挨着左边界, 是来自大肠杆菌的甘露糖-6-磷酸异构酶基因 (Miles 和 Guest 1984, *Gene* 32: 41-48), 与 SMAS 启动子 (Ni M, Cui D, Einstein J, Narasimhulu S, Vergara CE, Gelvin SB (1995)) 和 Nos 终止子融合。磷酸甘露糖异构酶基因作为选择标记以在含有 D-甘露糖为碳源的培养基上筛选转基因芽。

pNOV2145 (图 2) 的组成和序列如 SEQ ID NO: 1 所示。pNOV2147 (图 3) 的组成和序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

实施例 2

转化和再生

通过在干燥器中释放氯气对成熟干燥的大豆种子 (Var. S42 H1) 进行表面消毒。种子保存在 petri 培养皿中, 氯气通过在烧杯中倒入 100 ml Clorox[®] 并慢慢加入 8 ml 浓 HCL 产生。种子至少用两次氯气释放处理来消毒, 每次持续 8-18 小时。

然后, 将消毒的种子 (每皿大约 15-20 个种子) 置于含有 0.6% 琼脂凝固的 MS 基础培养基 (Murashige 和 Skoog (1962) 烟草愈伤组织培养物快速生长和生化鉴定的修改培养基。 *Physiol Plant* 15:

473-479) 和 2%蔗糖的发芽培养基上。pH 值保持 5.8。petri 培养皿置于 37℃ 房间使种子过夜生长或吸涨。去除种皮, 然后去除部分下胚轴, 保留大约 0.5 cm 的下胚轴。去除一个子叶连同其邻近的腋芽并丢弃。在剩下的子叶上, 用手术刀断开初生叶, 保留上胚轴上的初生叶基部 (图 4)。

将冻存的甘油储备液中保存的含有质粒 pNOV2145 (ZsGreen1 和 PMI, 如实施例 1 所述) 的农杆菌菌株 (LBA 4404) 划线在含有合适抗生素 (100 mg/L 壮观霉素) 的 YEP (酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 5 g/L, 氯化钠 5 g/L, 细菌培养用琼脂 15 g/L) 培养皿上。然后, 将农杆菌 27℃ 温育 1-2 天。从培养皿上取一勺农杆菌放入 100 ml 含有抗生素 (100 mg/L 壮观霉素) 的 YEP 液体培养基中在摇床上 27℃ 培养过夜。细菌悬液在大约 1500g 离心 15 分钟, 然后重悬在共培养液体培养基中达密度 $OD_{660} = 0.2$ 或 0.65 , 该培养基的组成为: B_5 盐 $0.05 \times$ (Sigma)、 B_5 维生素 ($0.05 \times$) (B_5 维生素组合物 ($1 \times$)): 肌醇 100 mg/L、烟酸 1 mg/L、盐酸吡哆醇 1 mg/L、盐酸硫胺素 10 mg/L、乙酰丁香酮 40 mg/L、蔗糖 20 g/L、BAP 2 mg/L、 GA_3 0.25 mg/L、MES (吗啉代乙烷磺酸) 3.9 g/L 及 pH 5.4。

将含有靶组织的外植体浸入农杆菌悬浮液中, 并孵育 1-2 小时。倒掉农杆菌悬液, 然后将处理的外植体置于共培养培养皿中的滤纸上。保持该外植体的近轴侧和滤纸接触。共培养固体培养基由 B_5 盐 (Sigma, $0.05 \times$)、 B_5 维生素 ($0.05 \times$)、40 mg/L 乙酰丁香酮、蔗糖 20 g/L、BAP 2 mg/L、 GA_3 0.25 mg/L、MES 3.9 g/L 及 pH 5.4 组成。该培养基用 0.5%精制琼脂 (Sigma) 固化。

将外植体和农杆菌在 16 小时光照/8 小时黑暗条件下在 20-30℃ 共培养 2-5 天。共培养后, 在含有 250 mg/L 氨噻肟头孢霉素的无菌水中漂洗外植体, 去除初生和次生分生组织, 然后将外植体转移到再生培养基 (即 REG-1 培养基) 中。在再生过程中, 还去除邻近子叶的腋生芽以促进初生叶基部区的生长。

REG-1 培养基含有 MS 盐 ($1 \times$)、 B_5 维生素 ($1 \times$)、 KNO_3 1 g/L、

BAP 1 mg/L、替卡西林 (ticarcillin) 300 mg/L、氨噻肟头孢霉素 100 mg/L、谷氨酰胺 250 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、甘露糖 15-30 g/L、蔗糖 0、0.25 和 1 g/L、pH 5.6 以及精制琼脂 10 g/L。在每个 petri 培养皿中以直立姿势放置五个外植体，以便外植体的上胚轴末端插入培养基中。将培养皿置于塑料容器内，并放在 22-25℃ 的培养间里，在每 18-20 小时光照/4-6 小时黑暗的周期、光强度 $60-100 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 的条件下培养。在 REG-1 培养基上生长 2 周后，将外植体转移到 REG-2 培养基上，REG-2 培养基含有 MS 盐 (1×) 以及 B₅ 维生素 (1×)、KNO₃ 1 g/L、BAP 0.5 mg/L、替卡西林 300 mg/L、氨噻肟头孢霉素 100 mg/L、谷氨酰胺 250 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、甘露糖 15 g/L 和蔗糖 1 g/L。培养基的 pH 值保持在 5.6，培养基用精制琼脂 10 g/L 固化。

在 4-6 周，将大豆培养物转移到 REG-3 培养基上继续选择和芽形成。REG-3 培养基含有 MS 盐 (1×)、B₅ 维生素 (1×)、KNO₃ 1 g/L、BAP 0.2 mg/L、GA₃ 0.5 mg/L、IBA 0.1 mg/L、替卡西林 300 mg/L、氨噻肟头孢霉素 100 mg/L、谷氨酰胺 250 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、甘露糖 15 g/L、蔗糖 1 g/L，pH 5.6，培养基用精制琼脂 10 g/L 固化。去除死的组织，带有再生芽的外植体每两周用新鲜 REG-3 培养基传代培养。当芽长到大约 2-4 cm 长的时候，连续从培养物上收获伸长的芽。同时，将芽转移到生根培养基中，生根培养基含有 MS 盐 (0.5×)、B₅ 维生素 (0.5×)、谷氨酰胺 250 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、KNO₃ 1 g/L、氨噻肟头孢霉素 100 mg/L、替卡西林 300 mg/L、蔗糖 15 g/L、IBA 0.5 mg/L，pH 5.6 以及精制琼脂 10 g/L。

将表达荧光蛋白基因 (ZsGreen1) 的生根转基因芽转移到含有湿润的 Fafard 发芽混合物 (Conrad Fafard Inc., MA, USA) 的 2¹¹ 培养罐中，并用塑料杯覆盖保湿继续培养大约 2 周。植物在白天温度 27-29℃、夜间温度 21℃、16 小时光照周期 (光强度 $20-40 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$) 的条件下驯化。当新叶开始长出，将植物转入含有土壤混合物的一加仑培养罐中，该土壤混合物由 50-55% 松树树皮堆肥、40-45% 泥炭、5-10% 珍珠岩 (Sungrow Horticultural Supply, Pine Bluff, Arkansas)

组成。驯化的大豆植物在温室中白天温度 27-29℃、夜间温度 21℃、光强度 400-600 $\mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 、相对湿度 70-95% 和 16 小时光照周期的条件下生长。这些植物在生长期用 osmocote (Scotts-Sierra Horticultural Products Company, Ohio; 17-6-12) 施肥两次 (5-8 g/加仑土壤)。通过 Taqman 分析在温室栽培植物叶子中有荧光蛋白基因以及 PMI 基因的存在证实有转化发生。通过使用荧光显微镜显现表达也证实了在转化的大豆组织中荧光蛋白基因的表达。

通过 Southern 印迹分析证实了用基因构建体 pNOV2145 获得了六个转基因植物。对一个事件的后代分析 PMI 基因或 ZsGreen1 基因揭示在转化大豆的基因组中有一个 T-DNA 整合位点。该子代在 T1 代中以 3:1 比例分离。

表 1 转化的表达荧光蛋白基因 (ZsGreen1) 的芽

实验编号	基因构建体	转化的芽/外植体	转化芽百分比
75	pNOV2145	5/45	11
89	pNOV2145	5/75	7

实施例 3

将大豆种子 (Var. S42 H1) 表面消毒, 并如实施例 2 所述制备外植体。

如实施例 1 所述制备含有质粒 pNOV2147 的农杆菌菌株 (LBA 4404)。用共培养液体培养基将细菌终浓度调整为 $\text{OD}_{660} = 0.60$ 。外植体制备、农杆菌接种以及共培养的条件与实施例 2 所述的相同。

在固体共培养培养基中共培养三天之后, 将过多的农杆菌漂洗掉, 去除初生和次生分生组织, 并将外植体转移到 REG-1 培养基中。将它们放在 28-30℃ 16 小时光/8 小时黑暗条件下培养。在 REG-1 培养基上培养 2 周后, 将培养物转移到 REG-2 培养基中。在该再生过程中, 仅保留从初生叶基部生出的芽。在大约第四周, 将芽培养物转移到 REG-3 培养基中。然后, 每 10-14 天转移到新鲜的 REG-3 培养基中。如在 REG-1 和 REG-2 培养基中一样, 仅保留从初生叶基部产生的芽而去除其余

芽。当延伸的芽长度达到约 2-4 cm 时，将它们与芽培养物的其它部分分开，并转移到生根培养基中。

从 35 个外植体中鉴定出五个表达蓝荧光蛋白基因的转基因芽(表 2)。

表 2 转化的表达蓝荧光蛋白 (cyano fluorescent protein) 基因的芽。

实验编号	基因构建体	转化的芽/外植体	%转化的芽
92	pNOV2147	5/35	14

实施例 4

共培养期间的甘露糖处理

在本实施例中所用的基因构建体是 pNOV2145 (其含有 ZsGreen1 和 PMI 基因, 如实施例 1 中所述)。制备外植体、农杆菌悬液以及细菌悬液接种外植体的方法如实施例 2 中所述的进行。细菌终浓度调整为 $OD_{660} = 0.55$ 或 0.85 。

接种步骤之后, 将外植体转移到含有 20 g/L 蔗糖或 15 g/L 甘露糖的共培养培养基中, 并保持在 20-23℃ 16 小时光/8 小时黑暗条件下培养。

共培养 3-5 天后, 使用荧光显微镜观察荧光蛋白基因的表达。在含有甘露糖的共培养培养基中接种农杆菌的外植体, 与含有蔗糖的共培养培养基中共培养的农杆菌接种的外植体相比, 显示至少两倍的荧光斑点数。之后的芽再生和选择步骤如实施例 2 中所述方法进行。

在共培养培养基含有甘露糖的实验中发现转化芽的产量显著地增加了(表 3)。从含有甘露糖的共培养培养基中有五个转化的芽生根, 并转移到了土壤中。之后 Taqman 和 Southern 印迹分析证实有转基因的整合。在 T1 子代中转基因的表达证实了这些转移基因的种系传递。

表 3 表达 ZsGreen1 荧光蛋白基因的转化芽, 其中外植体和农杆菌在甘露糖或蔗糖中共培养

实验编号	基因构建体	在甘露糖或蔗糖中共培养	转化的芽/外植体	% 转化
87	pNOV2145	蔗糖	0/60	0
		甘露糖	6/80	7.5
102	pNOV2145	蔗糖	1/20	5
		甘露糖	8/40	20

实施例 5

在本实施例中, 使用含有质粒 pNOV2105 (SMAS-PMI SMAS-GUS, 如实施例 1 中所述) 的农杆菌 EHA101 用于大豆转化。外植体的制备、农杆菌悬液以及农杆菌接种外植体与实施例 2 中所述的相同。细菌终浓度调整为 $OD_{660} = 0.45$ 或 0.6 。

农杆菌接种后, 将外植体转移到含有 20 g/L 蔗糖或 15 g/L 甘露糖的共培养培养基中。在 20-23°C 16 小时光/8 小时黑暗条件下进行共培养。共培养 3-5 天后, 用组织化学 gus 测定方法观察 GUS 基因的表达。在含有甘露糖的共培养培养基中共培养的外植体, 与在含有蔗糖的共培养培养基中共培养的外植体相比, 显示至少两倍的 GUS 斑点数。芽再生和选择如实施例 2 中所述方法进行。在共培养培养基中加入甘露糖的实验中观察到转化芽的产量显著增加 (表 4)。

表 4 表达 GUS 基因的转化芽

实验编号	基因构建体	在甘露糖或蔗糖中共培养	转化的芽/外植体	% 转化
63	pNOV2105	蔗糖	5/60	8
81	pNOV2105	蔗糖	2/30	7
		甘露糖	5/30	17

实施例 6

在本实施例中,使用含有质粒 pBSC11234(图5)的农杆菌 EHA101 用于大豆转化。pBSC11234 的组成和序列如 SEQ ID NO:3 所示。pBSC11234 含有 CMP-PMI: β -伴大豆球蛋白 (conglycinin)-半乳糖苷酶基因构建体。外植体的制备、农杆菌悬液以及农杆菌接种外植体与实施例2中所述的相同。细菌终浓度调整为 $OD_{660} = 0.6$ 。该共培养液体培养基含有 B_5 盐 ($0.1\times$)、 B_5 维生素 ($1\times$)、乙酰丁香酮 80 mg/L、蔗糖 20 g/L、BAP 2 mg/L、 GA_3 0.25 mg/L、MES 3.9 g/L 以及 pH 5.4。通过在液体共培养培养基中掺入 5 g/L 精制琼脂制备固体共培养培养基。

农杆菌接种后,将外植体转移到固体共培养培养基上,在 20-24 $^{\circ}C$ 16 小时光/8 小时黑暗条件下培养。共培养 3-5 天后,去掉初生和次生芽分生组织并丢弃,将所得到的外植体转移到 REG-4 培养基中。REG-4 培养基含有 B_5 盐 ($1\times$)、 B_5 维生素 ($1\times$)、BAP 1 mg/L、谷氨酰胺 50 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、氨噻肟头孢霉素 100 mg/L、替卡西林 300 mg/L、甘露糖 15-20 g/L、蔗糖 0、0.25 或 1 g/L、精制琼脂 10 g/L 以及 pH 5.6。5-7 天期间之后,去除从接近子叶的腋生分生组织长出的任何芽,然后将外植体转移到 REG-5 培养基中,REG-5 培养基含有 B_5 盐 ($1\times$)、 B_5 维生素 ($1\times$)、BAP 0.5 mg/L、谷氨酰胺 50 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、氨噻肟头孢霉素 100 mg/L、替卡西林 300 mg/L、甘露糖 15-20 g/L、蔗糖 1 g/L、精制琼脂 10 g/L 以及 pH 5.6。在四周时,将外植体转移到 REG-6 培养基中以便芽伸长。REG-6 培养基含有 MS 盐 ($1\times$)、MS 维生素 ($1\times$) (MS 维生素组合物:肌醇 100 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、盐酸吡哆醇 0.5 mg/L、盐酸硫胺素 0.1 mg/L、甘氨酸 2 mg/L)、肌醇 200 mg/L、BAP 0.2 mg/L、玉米素核糖核苷 0.5 mg/L、IBA 0.1 mg/L、 GA_3 1 mg/L、谷氨酰胺 50 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、替卡西林 300 mg/L、甘露糖 15 g/L、蔗糖 5 g/L、硝酸银 0.8 mg/L、精制琼脂 10 g/L、以及 pH 5.6。每两周将外植体转移到新鲜的 REG-6 培养基中。将伸长的芽 (2-4 cm 长) 移出,并在生根培养基中生根,然后转移到土壤中。生根培养基含有 MS 盐 ($1\times$)、

B₅ 维生素 (1×)、谷氨酰胺 100 mg/L、天冬酰胺 100 mg/L、IBA 0.7 mg/L、timentin 100 mg/L、以及蔗糖 15 g/L。Taqman 分析证实在两个事件的叶子样本中有转基因 (α 半乳糖苷酶和磷酸甘露糖异构酶) 的存在。

实施例 7

在本实施例中, 使用含有质粒 pBSC11369 (图 6) 的农杆菌 EHA101 用于大豆转化。pBSC11369 的组成和序列如 SEQ ID NO: 4 所示。pBSC11369 含有 CMP-HPT: CMP-ZsGreen1 基因构建体。外植体的制备、农杆菌悬液以及农杆菌接种外植体与实施例 2 中所述的相同。细菌终浓度调整为 OD₆₆₀ = 0.6。所述共培养液体培养基含有 B₅ 盐 (0.1×)、B₅ 维生素 (1×)、乙酰丁香酮 80 mg/L、蔗糖 20 g/L、BAP 2 mg/L、GA₃ 0.25 mg/L、MES 3.9 g/L 以及 pH 5.4。通过在液体共培养培养基中掺入 5 g/L 精制琼脂制备固体共培养培养基。

农杆菌接种后, 将外植体转移到固体共培养培养基上, 在 20-24 °C 16 小时光/8 小时黑暗条件下培养。共培养 3-5 天后, 为促进芽从初生叶基部区生长, 从外植体上去除初生和次生分生组织, 之后将外植体转移到 REG-7 培养基中。REG-7 培养基含有 B₅ 盐 (1×)、B₅ 维生素 (1×)、BAP 1 mg/L、谷氨酰胺 50 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、氨基噻吩头孢霉素 100 mg/L、替卡西林 300 mg/L、蔗糖 30 g/L、潮霉素 2-5 mg/L、精制琼脂 10 g/L 以及 pH 5.6。将外植体直立放置以便将外植体的上胚轴端插入培养基中。7-10 天期间之后, 去除从靠近子叶的腋生分生组织长出的所有芽。将外植体转移到新鲜 REG-8 培养基中, REG-8 培养基含有 B₅ 盐 (1×)、B₅ 维生素 (1×)、BAP 0.5 mg/L、谷氨酰胺 50 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、氨基噻吩头孢霉素 100 mg/L、替卡西林 300 mg/L、蔗糖 30 g/L、精制琼脂 10 g/L 以及 pH 在 5.6。再两周之后, 将外植体转移到 REG-9 培养基中, 然后每两周传代培养。REG-9 培养基含有 MS 盐 (1×)、MS 维生素 (1×)、肌醇 200 mg/L、BAP 0.2 mg/L、玉米素核糖核苷 0.5 mg/L、IBA 0.1 mg/L、GA₃ 1 mg/L、谷氨酰胺 50 mg/L、天冬酰胺 50 mg/L、硝酸银 0.8 mg/L、替卡西林 300 mg/L、蔗糖 30 g/L、潮霉素 0.1-0.2 mg/L、精制琼脂 10 g/L

以及 pH 5.6。将伸长的芽（2-4 cm 长）移出，在生根培养基中生根，然后转移到土壤中。生根培养基含有 MS 盐（1×）、B₅ 维生素（1×）、谷氨酰胺 100 mg/L、天冬酰胺 100 mg/L、IBA 0.7 mg/L、timentin 100 mg/L、以及蔗糖 15 g/L。Taqman 分析证实从五个事件获得的叶子样本中有转移基因（HPT 以及 ZsGreen1）的存在。通过在荧光显微镜下观察证实了在植物部分中有 ZsGreen1 基因的表达。

本文引用的所有出版物、专利及专利申请作为参考文献并入本文。尽管在前面的说明书中，描述了本发明有关的某些优选实施方案以及为了举例说明陈述了许多细节，但对于本领域的技术人员显而易见的是本发明可以有另外的实施方案以及本文所描述的某些细节可以有相当大的变化而不偏离本发明的基本原则。

<110> Syngenta Participations AG
 <120> 转化大豆的方法
 <130> 70094 USPS
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 9555
 <212> DNA
 <213> 人工
 <220>
 <223> pNOV2145
 <400> 1
 gatccaccgg tcgccacccat ggcccagtc aagcacggcc tgaccaagga gatgaccatg 60
 aagtaccgca tggagggctg cgtggacggc cacaagttcg tgatcaccgg cgagggcatc 120
 ggctaccctt tcaagggcaa gcaggccatc aacctgtgcg tggaggagg cgcccccttg 180
 cccttcgccc aggacatctt gtccgcccgc ttcattgtac gcaaccgcgt gttcaccgag 240
 taccaccagg acatcgtcga ctacttcaag aactcctgcc ccgccggcta cacctgggac 300
 cgctccttcc tgttcgagga cggcgcctg tgcattcga acgccgacat caccgtgagc 360
 gtggaggaga actgcatgta ccacgagtc aagttctac gcgtaactt ccccgcgac 420
 ggccccgtga tgaagaagat gaccgacaac tgggagccct cctgcgagaa gatcatcccc 480
 gtgcccaagc agggcatctt gaagggcgac gtgagcatgt acctgctgct gaaggacggt 540
 ggccgcttgc gctgccagtt cgacaccgtg tacaaggcca agtccgtgcc ccgcaagatg 600
 cccgactggc acttcatcca gcacaagctg acccgcgagg accgcagcga cgccaagaac 660
 cagaagtggc acctgaccga gcacgccatc gcctccggct ccgccttgcc ctgagcggcc 720
 ctctagatcc ccgaatttcc ccgatcgttc aaacatttgg caataaagtt tcttaagatt 780
 gaatcctggt gccggtcttg cgatgattat catataatt ctgttgaatt acgttaagca 840
 tgtaataatt aacatgtaat gcatgacggt atttatgaga tgggttttta tgattagagt 900
 cccgcaatta tacatttaac acgcgataga aaacaaaata tagcgcgcaa actaggataa 960
 attatcgcg cgggtgtcat ctatgttact agatcgggaa ttgggtaccg aattcactgg 1020
 ccgtcgtttt acaacgctcg gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgccttg 1080
 cagcacatcc ccttttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggccccacc gatcgcctt 1140
 cccaacagtt ggcgagcctg aatggcgaat ggcgcctgat gcggtatttt ctccttacgc 1200
 atctgtgagg tatttcacac cgcatatggt gcaactctag tacaatctgc tctgatgcc 1260

catagttaag	ccagccccga	cacccgcca	cacccgctga	cgcgccctga	cgggcttgtc	1320
tgctcccggc	atccgcttac	agacaagctg	tgaccgtctc	cgggagctgc	atgtgtcaga	1380
ggttttcacc	gtcatcaccg	aaacgcgcga	gacgaaaggg	cctcgtgata	cgctatttt	1440
tataggttaa	tgtcatgata	ataatggttt	cttagacgtc	agggtggcact	tttcggggaa	1500
atgtgcgcgg	aacccctatt	tgtttatttt	tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	1560
tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	ggcgcgccgg	taccagcttg	catgcctgca	1620
ggtcgactct	agaggatcct	ggcagacaaa	gtggcagaca	tactgtccca	caaatgaaga	1680
tggaaatctgt	aaaagaaaac	gcgatgaaata	atgcgtctga	caaaggttag	gtcggctgcc	1740
tttaatcaat	accaaagtgg	tccctaccac	gatggaaaaa	ctgtgcagtc	ggtttgctt	1800
tttctgacga	acaataaga	ttcgtggccg	acaggtgggg	gtccaccatg	tgaaggcatc	1860
ttcagactcc	aataatggag	caatgacgta	agggttacg	aaataagtaa	gggtagtttg	1920
ggaaatgtcc	actcacccgt	cagtctataa	atacttagcc	cctccctcat	tgtaaggga	1980
gcaaaatctc	agagagatag	tcctagagag	agaaagagag	caagtagcct	agaagtagga	2040
tccccgatca	tgcaaaaact	cattaactca	gtgcaaaaact	atgcctgggg	cagcaaaaacg	2100
gcggtgactg	aactttatgg	tatggaaaat	ccgtccagcc	agccgatggc	cgagctgtgg	2160
atgggvcac	atccgaaaag	cagttcacga	gtgcagaatg	ccgccggaga	tatcgtttca	2220
ctgcgtgatg	tgattgagag	tgataaatcg	actctgctcg	gagaggccgt	tgccaaacgc	2280
tttggcgaac	tgccittcct	gttcaaagta	ttatgvcag	cacagccact	ctccattcag	2340
gttcatcaa	acaacacaa	ttctgaaatc	ggttttgcca	aagaaaatgc	cgaggtatc	2400
ccgatggatg	ccgccgagcg	taactataaa	gatcctaacc	acaagccgga	gctggttttt	2460
gcgctgacgc	ctttccttgc	gatgaacgcg	ttcgtgaat	tttccgagat	tgtctcccta	2520
ctccagccgg	tcgaggtgc	acatccggcg	attgctcact	ttttacaaca	gcctgatgcc	2580
gaacgtttaa	gcgaactggt	cgccagcctg	ttgaatatgc	agggtgaaga	aaaatcccgc	2640
gcgctggcga	ttttaaatac	ggccctcgat	agccagcagg	gtgaaccgtg	gcaaacgatt	2700
cgtttaattt	ctgaatttta	cccggaagac	agcggctctgt	tctccccgct	attgctgaat	2760
gtggtgaaat	tgaaccctgg	cgaagcgatg	ttcctgttcg	ctgaaacacc	gcacgcttac	2820
ctgcaaggcg	tggcgtgga	agtgatggca	aactccgata	acgtgctgcg	tgcgggtctg	2880
acgcctaaat	acattgatat	tccggaactg	gttgccaatg	tgaattcga	agccaaaccg	2940
gctaaccagt	tgttgacca	gccggtgaaa	caaggtgcag	aactggactt	cccgattcca	3000
gtggatgatt	ttgccttctc	gctgcatgac	cttagtgata	aagaaaccac	cattagccag	3060
cagagtgccg	ccattttggt	ctgcgtcgaa	ggcgatgcaa	cgttgtggaa	aggttctcag	3120
cagttacagc	ttaaaccggg	tgaatcagcg	tttattgccc	ccaacgaatc	accggtgact	3180

gtcaaaggcc acggccgttt agcgcgtggt tacaacaagc tgtaagagct tactgaaaaa	3240
attaacatct cttgctaagc tgggagctct agatccccga atttccccga tcgttcaaac	3300
at ttggcaat aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcgat gattatcata	3360
taatttctgt tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttat	3420
atgagatggg tttttatgat tagagtcccg caattataca tttaatcgc gatagaaaac	3480
aaaatatagc gcgcaaacta ggataaatta tcgcgcgcgg tgtcatctat gttactagat	3540
cgggaattgg gtacatgcc cgggcggcca gcatggccgt atccgcaatg tgttattaag	3600
ttgtctaagc gtcaatttgt ttacaccaca atatatcctg ccaccagcca gccaacagct	3660
ccccgaccgg cagctcggca caaaatcacc actcgataca ggcagcccat caga <u>atta</u> at	3720
tctcatgttt gacagcttat catcgactgc acggtgcacc aatgcttctg gcgtcaggca	3780
gccatcggaa gctgtggtat ggctgtgcag gtcgtaaact actgcataat tcgtgtcgct	3840
caaggcgcac tcccgttctg gataatgttt tttgcgccga catcataacg gttctggcaa	3900
atattctgaa atgagctggt gacaattaat catccggctc gtataatgtg tggaattgtg	3960
agcggataac aatttcacac aggaaacaga ccatgagggg agcgttgatc gccgaagtat	4020
cgactcaact atcagaggta gttggcgta tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg	4080
ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt	4140
tgctggttac ggtgaccgta aggcttgatg aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc	4200
ttttggaaac ttcggcttcc cctggagaga gcgagattct ccgcgctgta gaagtcacca	4260
ttgttggtgca cgacgacatc attccgtggc gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg	4320
gagaatggca gcgcaatgac attcttgcag gtatcttcga gccagccacg atcgacattg	4380
atctggctat cttgctgaca aaagcaagag aacatagcgt tgccttgga ggtccagcgg	4440
cggaggaact cttgatccg gttcctgaac aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct	4500
taacgctatg gaactcgcg cccgactggg ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt	4560
tgtcccgcac ttggtacagc gcagtaaccg gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg	4620
actgggcaat ggagcgcctg ccggcccagt atcagcccgt catacttgaa gctaggcagg	4680
cttatcttgg acaagaagat cgcttggcct cgcgcgcaga tcagttggaa gaatttgttc	4740
actacgtgaa aggcgagatc accaaagtag tcggcaaata aagctctagt ggatctccgt	4800
acccccgggg gatctggctc gcggcggacg cacgacgccg gggcgagacc ataggcgatc	4860
tcctaaatca atagtagctg taacctcgaa gcgtttcact tgtaacaacg attgagaatt	4920
tttgtcataa aattgaaata cttggttcgc atttttgtca tccgcggtca gccgcaattc	4980
tgacgaactg cccatttagc tggagatgat tgtacatcct tcacgtgaaa atttctcaag	5040

cgctgtgaac aagggttcag attttagatt gaaaggtgag ccgttgaaac acgttcttct	5100
tgtcgatgac gacgtcgcta tgcggcatct tattattgaa taccttacga tccacgcctt	5160
caaagtgacc gcggtagccg acagcaccca gttcacaaga gtactctctt ccgcgacggt	5220
cgatgtcgtg gttgttgatc taaatttagg tcgtgaagat gggctcgaga tcggttcgtaa	5280
tctggcggca aagtctgata ttccaatcat aattatcagt ggcgaccgcc ttgaggagac	5340
ggataaagtt gttgcactcg agctaggagc aagtgatttt atcgctaagc cgttcagtat	5400
cagagagttt ctagcacgca ttcgggttgc cttgcgcgtg cgccccaacg ttgtccgctc	5460
caaagaccga cggctttttt gttttactga ctggacactt aatctcaggc aacgtcgtt	5520
gatgtccgaa gctggcggtg aggtgaaact tacggcaggt gagttcaatc ttctcctcgc	5580
gttttttagag aaaccccgcg acgttctatc ggcgagcaa cttctcattg ccagtcgagt	5640
acgcgacgag gaggtttatg acaggagtat agatgttctc attttgaggc tgcgccgcaa	5700
acttgaggca gatccgtcaa gccctcaact gataaaaaca gcaagaggtg ccggttattt	5760
ctttgacgcg gacgtgcagg tttcgacgg ggggacgatg gcagcctgag ccaattcca	5820
gatccccgag gaatcggcgt gagcggctgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg	5880
gcgctgggtg atgacctggt ggagaagttg aaggccgcgc aggccgcca gcggcaacgc	5940
atcgaggcag aagcacgcc cggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa	6000
gaatcccggc aaccgccggc agccggctgc ccgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac	6060
gagcaaccag attttttctg tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgca tagtcgcagc	6120
atcatggacg tggccgtttt ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggatc	6180
cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttccgag gcccgccgg catggccagt	6240
gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttccatc taaccgaatc catgaaccga	6300
taccgggaag ggaagggaga caagccggc gcgctgttcc gtccacacgt tgcggacgta	6360
ctcaagttct gccggcgagc cgatggcgga aagcagaaa acgacctggt agaaacctgc	6420
attcggttaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaaggcaa gaacggccgc	6480
ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa	6540
accgggcggc cggagtacat cgagatcgag cttagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca	6600
gaaggcaaga acccgacgt gctgacggtt caccgcgatt actttttgat cgatcccggc	6660
atcgccggtt ttctctaccg cctggcacgc cgcgccgag gcaaggcaga agccagatgg	6720
ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgcggag agttcaagaa gttctgtttc	6780
accgtgcgca agctgatcgg gtcaaatgac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg	6840
gggcaggctg gcccgatcct agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc	6900
gccggttcct aatgtacgga gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaaaaggt	6960

cgaaaaggtc tctttcctgt ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg	7020
aaccggaacc cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa	7080
gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat ttttccgcct aaaactcttt aaaacttatt	7140
aaaactctta aaacccgcct ggcctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag	7200
ctgcaaaaag cgcctaccct tcggtcgctg cgctccctac gccccgccgc ttcgcgtcgg	7260
cctatcgcgg ccgctggccg ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg	7320
cgcggaacaag ccgcgccgct gccactcgac cgccggcgct gaggtctgcc tcgtgaagaa	7380
ggtgttgctg actcatacca ggcctgaatc gccccatcat ccagccagaa agtgagggag	7440
ccacggttga tgagagcttt gttgtaggtg gaccagttgg tgattttgaa cttttgcttt	7500
gccacggaac ggtctgcggt gtcgggaaga tgcgtgatct gatccttcaa ctacgcaaaa	7560
gttcgattta ttcaacaag ccgccgtccc gtcaagtcag cgtaatgctc tgccagtgtt	7620
acaaccaatt aaccaattct gattagaaaa actcatcgag catcaaatga aactgcaatt	7680
tattcatatc aggattatca ataccatatt tttgaaaaag ccgtttctgt aatgaaggag	7740
aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg gtatcggctc gcgattccga	7800
ctcgtccaac atcaatacaa cctattaatt tccccctgct aaaaataagg ttatcaagtg	7860
agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg caaaagctct gcattaatga	7920
atcgccaac gcgcggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttccgc ttctcgcctc	7980
actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	8040
gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc	8100
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcggtgctgg cgtttttcca taggctccgc	8160
ccccctgacg agcatcaca aatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	8220
ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc	8280
ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	8340
agctcacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtcgctc gctccaagct gggctgtgtg	8400
cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc	8460
aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	8520
gcgaggatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact	8580
agaagaacag tttttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	8640
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag	8700
cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc cttgatctt ttctacgggg	8760
tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa	8820

```

aggatcttca cctagatcct tttgatccgg aattaattcc tgtggttggc atgcacatac 8880
aatggacga acggataaac cttttcacgc ccttttaaat atccgattat tctaataaac 8940
gctcttttct cttaggttta cccgccaaata tctcctgtca aacctgata gtttaaactg 9000
aaggcgggaa acgacaatct gatcatgagc ggagaattaa gggagtcacg ttatgacccc 9060
cgccgatgac gcgggacaag ccgttttacg tttggaactg acagaaccgc aacgctgcag 9120
gaattggccg cagcggccat ttaaatcaat tgggcgcgta cgtagcacta gtgcgcgatc 9180
gcttaattaa gcggcgcgcc taaagcttct ggcagacaaa gtggcagaca tactgtccca 9240
caaatgaaga tggaatctgt aaaagaaaac gcgtgaaata atgcgtctga caaaggttag 9300
gtcggctgcc tttaatcaat accaaagtgg tccctaccac gatggaaaaa ctgtgcagtc 9360
ggtttggtct tttctgacga acaataaga ttcgtggccg acagggtggg gtccaccatg 9420
tgaaggcatc ttcagactcc aataatggag caatgacgta agggcttacg aaataagtaa 9480
gggtagtttg ggaaatgtcc actcaccctg cagtctataa atacttagcc cctccctcat 9540
tgtaaggga gcaag 9555

```

```

<210> 2
<211> 9546
<212> DNA
<213> 人工

```

```

<220>
<223> pNOV2147

```

```

<400> 2
ggatccccga tcatgcaaaa actcattaac tcagtgc aaa actatgcctg gggcagcaaa 60
acggcgttga ctgaacttta tggatggaa aatccgtcca gccagccgat ggccgagctg 120
tggatgggag cacatccgaa aagcagttca cgagtgcaga atgccgccgg agatatacgtt 180
tactgctg atgtgattga gagtgataaa tcgactctgc tcggagaggc cgttgccaaa 240
cgctttggcg aactgccttt cctgttcaaa gtattatgcg cagcacagcc actctccatt 300
caggttcata caaacaaca caattctgaa atcggttttg ccaagaaaa tgccgcaggt 360
atcccgatgg atgccgccga gcgtaactat aaagatccta accacaagcc ggagctggtt 420
tttgcgctga gcctttcct tgcgatgaac gcgtttcgtg aattttccga gattgtctcc 480
ctactccagc cggtcgcagg tgcacatccg gcgattgctc actttttaca acagcctgat 540
gccgaacgtt taagcgaact gttcgccagc ctgttgataa tgcagggtga agaaaaatcc 600
cgcgcgctgg cgattttaaa atcggccctc gatagccagc aggggtgaacc gtggcaaacg 660
attcgtttaa tttctgaatt ttaccggaa gacagcggtc tgttctcccc gctattgctg 720
aatgtggtga aattgaacc tggcgaagcg atgttctctgt tcgctgaaac accgcacgct 780
tacctgcaag gcgtggcgct ggaagtgatg gcaaactccg ataactgtct gcgtgcgggt 840

```

ctgacgccta aatacattga tattccggaa ctggttgcca atgtgaaatt cgaagccaaa	900
ccggctaacc agttgttgac ccagccggtg aaacaagggtg cagaactgga cttcccgatt	960
ccagtggatg attttgccctt ctcgctgcat gaccttagtg ataaagaaac caccattagc	1020
cagcaglagtg ccgccattht gttctgctgc gaaggcgatg caacgtttgtg gaaaggttct	1080
cagcagttac agcttaaacc ggggtgaatca gcgtttattg ccgccaacga atcaccggtg	1140
actgtcaaag gccacggccg tttagcgcgt gtttacaaca agctgtaaga gcttactgaa	1200
aaaattaaca tctcttgcta agctgggagc tctagatccc cgaatttccc cgatcgttca	1260
aacatttggc aataaaagttt cttaagattg aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc	1320
atataatthc tgttgaatta cgtaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta	1380
tttatgagat gggthtttat gattagagtc ccgcaattat acatttaata cgcgatagaa	1440
aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgcatc tatgttacta	1500
gatcgggaat tgggtaccat gcccgggcgg ccagcatggc cgtatccgca atgtgttatt	1560
aagttgtcta agcgtcaatt tgtttacacc acaatatatc ctgccaccag ccagccaaca	1620
gctccccgac cggcagctcg gcacaaaatc accactcgat acaggcagcc catcagaatt	1680
aattctcatg tttgacagct tatcatcgac tgcacgggtc accaatgctt ctggcgtcag	1740
gcagccatcg gaagctgtgg tatggctgtg caggctgtaa atcactgcat aattcgtgtc	1800
gctcaaggcg cactcccgtt ctggataatg ttttttgcgc cgacatcata acggttctgg	1860
caaataattct gaaatgagct gttgacaatt aatcatccgg ctctgataat gtgtggaatt	1920
gtgagcggat aacaatttca cacaggaaac agaccatgag ggaagcgttg atcgccgaag	1980
tatcgactca actatcagag gtagttggcg tcatcgagcg ccatctcgaa ccgacgttgc	2040
tggccgtaca tttgtacggc tccgcagtgg atggcggcct gaagccacac agtgatattg	2100
atthtctggg tacggtgacc gtaaggcttg atgaaacaac gcggcgagct ttgatcaacg	2160
accttttggg aacttccggct tcccctggag agagcgagat tctccgcgct gtagaagtca	2220
ccattgttgt gcacgacgac atcattccgt ggcgttatcc agctaagcgc gaactgcaat	2280
ttggagaatg gcagcgcaat gacattcttg caggatatct cgagccagcc acgatcgaca	2340
ttgatctggc tatcttgctg acaaaagcaa gagaacatag cgttgccttg gtaggtccag	2400
cggcggagga actctttgat ccggttcctg aacaggatct atthtggcg ctaaataaaa	2460
ccttaacgct atggaactcg ccgcccgact gggctggcga tgagcgaat gtagtgctta	2520
cgttgcctcg catttggtac agcgcagtaa ccggcaaaat cgcgccgaag gatgtcgtg	2580
ccgactgggc aatggagcgc ctgccggccc agtatcagcc cgtcatactt gaagctaggc	2640
aggcttatct tggacaagaa gatcgttgg cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg	2700

ttcactacgt gaaaggcgag atcaccaaag tagtcggcaa ataaagctct agtggatctc	2760
cgtacccccg ggggatctgg ctgcggcgg acgcacgacg ccggggcgag accatagggc	2820
atctcctaaa tcaatagtag ctgtaacctc gaagcgtttc acttgtaaca acgattgaga	2880
atTTTTgtca taaaattgaa atacttggtt cgcattttttg tcatccgcgg tcagccgcaa	2940
ttctgacgaa ctgcccattt agctggagat gattgtacat ctttcacgtg aaaattttctc	3000
aagcgctgtg aacaaggggt cagatttttag attgaaaggt gagccgttga aacacgttct	3060
tcttgctgat gacgacgtcg ctatgcggca tcttattatt gaatacctta cgatccacgc	3120
cttcaaagtg accgcggtag ccgacagcac ccagttcaca agagtactct cttccgcgac	3180
ggtcgatgtc gtggttgttg atctaaattt aggtcgtgaa gatgggctcg agatcgttcg	3240
taatctggcg gcaaagtctg atattccaat cataattatc agtggcgacc gccttgagga	3300
gacggataaaa gttgttgac tcgagctagg agcaagtgat tttatcgcta agccgttcag	3360
tatcagagag tttctagcac gcattcgggt tgccttgcgc gtgcgccccca acgttgtccg	3420
ctccaaagac cgacggtctt tttgttttac tgactggaca cttaatctca ggcaacgtcg	3480
cttgatgtcc gaagctggcg gtgaggtgaa acttacggca ggtgagttca atcttctct	3540
cgcgTTTTta gagaaacccc gcgacgttct atcgcgcgag caacttctca ttgccagtcg	3600
agtacgcgac gaggaggttt atgacaggag tatagatggt ctcattttga ggctgcgccg	3660
caaacttgag gcagatccgt caagccctca actgataaaa acagcaagag gtgccggtta	3720
tttctttgac gcggacgtgc aggtttcgca cggggggacg atggcagcct gagccaattc	3780
ccagatcccc gaggaatcgg cgtgagcggc cgcaaaccat ccggcccggg acaaatcggc	3840
gcggcgctgg gtgatgacct ggtggagaag ttgaaggccg cgcaggccgc ccagcggcaa	3900
cgcacgcagg cagaagcacg ccccggtgaa tcgtggcaag cggccgctga tcgaatccgc	3960
aaagaatccc ggcaaccgcc ggcagccggg gcgccgtcga ttaggaagcc gcccaagggc	4020
gacgagcaac cagatttttt cgttccgatg ctctatgacg tgggcacccg cgatagtcgc	4080
agcatcatgg acgtggccgt tttccgtctg tcgaagcgtg accgacgagc tggcgaggtg	4140
atccgctacg agcttccaga cgggcacgta gaggtttccg cagggccggc cggcatggcc	4200
agtgtgtggg attacgacct ggtactgatg gcggtttccc atctaaccga atccatgaac	4260
cgataaccggg aagggaaagg agacaagccc ggccgcgtgt tccgtccaca cgttgcggac	4320
gtactcaagt tctgccggcg agccgatggc ggaaagcaga aagacgacct ggtagaaacc	4380
tgcattcggg taaacaccac gcacgttgcc atgcagcgtc cgaagaaggc caagaacggc	4440
cgcttgggtg cggtatccga ggggtgaagc ttgattagcc gctacaagat cgtaaagagc	4500
gaaaccgggc ggccggagta catcgagatc gagctagctg attggatgta ccgcgagatc	4560
acagaaggca agaaccggga cgtgctgacg gttcaccccc attacttttt gatcgatccc	4620

ggcatcggcc	gttttctcta	ccgcctggca	cgccgcgccg	caggcaaggc	agaagccaga	4680
tggttgttca	agacgatcta	cgaacgcagt	ggcagcgccg	gagagttcaa	gaagttctgt	4740
ttcaccgtgc	gcaagctgat	cgggtcaaat	gacctgccgg	agtacgattt	gaaggaggag	4800
gcggggcagg	ctggcccgat	cctagtcatg	cgctaccgca	acctgatcga	gggcgaagca	4860
tccgccgggt	cctaattgtac	ggagcagatg	ctagggcaaa	ttgccctagc	aggggaaaaa	4920
ggtcgaaaag	gtctctttcc	tgtggatagc	acgtacattg	ggaacccaaa	gccgtacatt	4980
gggaaccgga	acccgtacat	tgggaacca	aagccgtaca	ttgggaaccg	gtcacacatg	5040
taagtgactg	atataaaaga	gaaaaaaggc	gatttttccg	cctaaaactc	tttaaaactt	5100
attaaaactc	ttaaaacccg	cctggcctgt	gcataactgt	ctggccagcg	cacagccgaa	5160
gagctgcaaa	aagcgcctac	ccttcggctg	ctgcgctccc	tacgccccgc	cgcttcgcgt	5220
cggcctatcg	cggccgctgg	ccgctcaaaa	atggctggcc	tacggccagg	caatctacca	5280
gggcgcggac	aagccgcgcc	gtcgcctctc	gaccgccggc	gctgaggtct	gcctcgtgaa	5340
gaaggtgttg	ctgactcata	ccaggcctga	atcgccccat	catccagcca	gaaagtgagg	5400
gagccacggt	tgatgagagc	tttgttgtag	gtggaccagt	tggtgatfff	gaacttttgc	5460
tttgccacgg	aacggtctgc	gttgtcggga	agatgcgtga	tctgatcctt	caactcagca	5520
aaagttcgat	ttattcaaca	aagccgccgt	cccgtcaagt	cagcgtaatg	ctctgccagt	5580
gttacaacca	attaaccaat	tctgattaga	aaaactcatc	gagcatcaaa	tgaaactgca	5640
atttattcat	atcaggatta	tcaataccat	atffffgaaa	aagccgtttc	tgtaatgaag	5700
gagaaaactc	accgaggcag	ttccatagga	tggcaagatc	ctggtatcgg	tctgcgattc	5760
cgactcgtcc	aacatcaata	caacctatta	atttcccctc	gtcaaaaata	aggttatcaa	5820
gtgagaaatc	accatgagtg	acgactgaat	ccggtgagaa	tggcaaaagc	tctgcattaa	5880
tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagagggcgg	ttgcgtattg	ggcgcctctc	cgcttcctcg	5940
ctcactgact	cgctgcgctc	ggtcgttcgg	ctgcggcgag	cggtatcagc	tactcaaaag	6000
gcggtataac	ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	6060
ggccagcaaa	aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	tggcgttfff	ccataggctc	6120
cgccccctg	acgagcatca	caaaaatcga	cgctcaagtc	agaggtggcg	aaaccgcaca	6180
ggactataaa	gataaccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgctc	tcctgtttccg	6240
accctgccgc	ttaccggata	cctgtccgcc	tttctccctt	cgggaagcgt	ggcgctttct	6300
catagctcac	gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	ttcgtccaa	gctgggctgt	6360
gtgcacgaac	ccccgttca	gccccaccgc	tgcccttat	ccggtacta	tcgtcttgag	6420
tccaacccgg	taagacacga	cttatcgcca	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	6480

agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac	6540
actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga	6600
gttggtagct cttgatccgg caacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc	6660
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg	6720
gggtctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca cgttaaggga ttttggtcac gagattatca	6780
aaaaggatct tcacctagat ctttttgatc cggaattaat tcctgtgggt ggcatgcaca	6840
tacaaatgga cgaacggata aaccttttca cgccctttta aatatccgat tattctaata	6900
aacgctcttt tctcttaggt ttaccgcca atatatctg tcaaactg atagtttaaa	6960
ctgaaggcgg gaaacgacaa tctgatcatg agcggagaat taagggagtc acgttatgac	7020
ccccgccgat gacgcgggac aagccgtttt acgtttgaa ctgacagaac cgcaacgctg	7080
caggaattgg ccgcagcggc catttaaadc aattgggcgc gtacgtagca ctagtgcgcg	7140
atcgcttaat taagcggcgc gcctaaagct tctggcagac aaagtggcag acatactgtc	7200
ccacaaatga agatggaatc tgtaaaagaa aacgcgtgaa ataatgcgtc tgacaaagg	7260
taggtcggct gcctttaatc aataccaaag tggctcctac cacgatggaa aaactgtgca	7320
gtcggtttgg ctttttctga cgaacaaata agattcgtgg ccgacaggtg ggggtccacc	7380
atgtgaaggc atcttcagac tccaataatg gagcaatgac gtaagggtt acgaaataag	7440
taagggtagt ttgggaaatg tccactcacc cgtcagtcta taaatactta gccctcct	7500
cattgttaag ggagcaagga tccaccggtc gccaccatgg ccctgtccaa caagttcatc	7560
ggcgacgaca tgaagatgac ctaccacatg gacggctgcg tgaacggcca ctacttcacc	7620
gtgaagggcg agggcagcgg caagccctac gagggcacc agacctccac cttcaagggtg	7680
accatggcca acggcggccc cctggccttc tccttcgaca tcctgtccac cgtgttcatg	7740
tacggcaacc gctgcttcac cgctacccc accagcatgc ccgactactt caagcaggcc	7800
ttccccgacg gcatgtccta cgagagaacc ttacactagc aggacggcgg cgtggccacc	7860
gccagctggg agatcagcct gaagggaac tgcttcgagc acaagtccac cttccacggc	7920
gtgaacttcc ccgccgacgg ccccgatg gccaagaaga ccaccggctg ggaccctcc	7980
ttcgagaaga tgaccgtgtg cgacggcatc ttgaagggcg acgtgaccgc cttcctgatg	8040
ctgcagggcg gcggcaacta cagatgccag ttccacacct cctacaagac caagaagccc	8100
gtgaccatgc ccccaacca cgtggtggag caccgcatcg ccagaaccga cctggacaag	8160
ggcggcaaca gcgtgcagct gaccgagcac gccgtggccc acatcacctc cgtggtgccc	8220
ttctgagagc tctagatccc cgaatttccc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt	8280
cttaagattg aatcctgttg ccgtcttgc gatgattatc atataattc tgttgaatta	8340
cgttaagcat gtaataatta acatgtaatg catgacgtta tttatgagat gggttttat	8400

gattagagtc cgcgaattat acatttaata cgcgatagaa aacaaaatat agcgcgcaaa	8460
ctaggataaa ttatcgcgcg cgggtgcatc tatgttacta gatcgggaat tgggtaccga	8520
attcactggc cgtcgtttta caacgctgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta	8580
atcgccctgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg	8640
atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg ggcctgatg cggtattttc	8700
tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc gcatatgggtg cactctcagt acaatctgct	8760
ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgcccctgac	8820
gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca	8880
tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac	8940
gcctattttt ataggttaat gtcattgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt	9000
ttcggggaaa tgtgvcgga acccctattt gtttattttt ctaaatacat tcaaataatgt	9060
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaatg gcgvcgctgt accagcttgc	9120
atgcctgcag gtcgactcta gaggatcctg gcagacaaag tggcagacat actgtcccac	9180
aatgaagat ggaatctgta aaagaaaacg cgtgaaataa tgcgtctgac aaaggttagg	9240
tcggctgcct ttaatcaata ccaaagtggc ccctaccacg atggaaaaac tgtgcagtcg	9300
gtttggcttt ttctgacgaa caaataagat tcgtggccga caggtggggg tccaccatgt	9360
gaaggcatct tcgactcca ataattggagc aatgacgtaa gggcttacga aataagtaag	9420
ggtagtttgg gaaatgtcca ctccaccgct agtctataaa tacttagccc ctccctcatt	9480
gttaagggag caaaatctca gagagatagt cctagagaga gaaagagagc aagtagccta	9540
gaagta	9546

<210> 3
 <211> 10604
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> pBSC11234

<400> 3	
cgccctaaa gcttgcattg ctgcaggtcg actctagagg atcctggcag acaaagtggc	60
agacatactg tcccacaaat gaagatggaa tctgtaaaag aaaacgcgtg aaataatgcg	120
tctgacaaag gttaggtcgg ctgcctttaa tcaataccaa agtggtcctt accacgatgg	180
aaaaactgtg cagtcggttt ggctttttct gacgaacaaa taagattcgt ggccgacagg	240
tgggggtcca ccatgtgaag gcattctcag actccaataa tggagcaatg acgtaagggc	300
ttacgaaata agtaagggta gtttgggaaa tgtccactca cccgtcagtc tataaatact	360

tagcccctcc	ctcattgtta	agggagcaaa	atctcagaga	gatagtccta	gagagagaaa	420
gagagcaagt	agcctagaag	taggatcccc	gatcatgcaa	aaactcatta	actcagtgca	480
aaactatgcc	tggggcagca	aaacggcggt	gactgaactt	tatggatgg	aaaatccgtc	540
cagccagccg	atggccgagc	tgtggatggg	cgacatccg	aaaagcagtt	cacgagtgca	600
gaatgccgcc	ggagatatcg	tttactgcg	tgatgtgatt	gagagtgata	aatcgactct	660
gctcggagag	gccgttgcca	aacgctttgg	cgaactgcct	ttcctgttca	aagtattatg	720
cgcagcacag	ccactctcca	ttcaggttca	tccaaacaaa	cacaattctg	aaatcggttt	780
tgccaaagaa	aatgccgcag	gtatcccgat	ggatgccgcc	gagcgtaact	ataaagatcc	840
taaccacaag	ccggagctgg	ttttgcgct	gacgcctttc	cttgcgatga	acgcgtttcg	900
tgaattttcc	gagattgtct	ccctactcca	gccggtcgca	ggtgcacatc	cggcgattgc	960
tcacttttta	caacagcctg	atgccgaacg	tttaagcgaa	ctgttcgcca	gcctgttgaa	1020
tatgcagggt	gaagaaaaat	cccgcgcgct	ggcgatttta	aaatcgcccc	tcgatagcca	1080
gcagggtgaa	ccgtggcaaa	cgattcgttt	aatttctgaa	ttttaccggg	aagacagcgg	1140
tctgttctcc	ccgctattgc	tgaatgtggt	gaaattgaac	cctggcgaag	cgatgttctt	1200
gttcgctgaa	acaccgcacg	cttacctgca	aggcgtggcg	ctggaagtga	tggcaaaactc	1260
cgataacgtg	ctgcgtgcbg	gtctgacgcc	taaatacatt	gatattccgg	aactggttgc	1320
caatgtgaaa	ttcgaagcca	aaccggctaa	ccagttgttg	accagccggg	tgaaacaagg	1380
tgcagaactg	gacttcccga	ttccagtgga	tgattttgcc	ttctcgctgc	atgaccttag	1440
tgataaagaa	accaccatta	gccagcagag	tgccgccatt	ttgttctgcg	tcgaaggcga	1500
tgcaacgttg	tggaaagggt	ctcagcagtt	acagcttaaa	ccgggtgaat	cagcgtttat	1560
tgccgccaac	gaatcaccgg	tgactgtcaa	aggccacggc	cgtttagcgc	gtgtttacaa	1620
caagctgtaa	gagcttactg	aaaaaattaa	catctcttgc	taagctggga	gctctagatc	1680
cccgaatttc	cccgatcggt	caaacatttg	gcaataaagt	ttcttaagat	tgaatcctgt	1740
tgccggctct	gcgatgatta	tcatataatt	tctgttgaat	tacgttaagc	atgtaataat	1800
taacatgtaa	tgcatgacgt	tatttatgag	atgggttttt	atgattagag	tcccgaatt	1860
atacatttaa	tacgcgatag	aaaacaaaat	atagcgcgca	aactaggata	aattatcgcg	1920
cgcggtgtca	tctatgttac	tagatcggga	attgggtacc	atgccggggc	ggccagcatg	1980
gccgtatccg	caatgtgtta	ttaagttgtc	taagcgtcaa	tttgtttaca	ccacaatata	2040
tcctgccacc	agccagccaa	cagctccccg	accggcagct	cggcacaaaa	tcaccactcg	2100
atacaggcag	cccatcagaa	ttaattctca	tgtttgacag	cttatcatcg	actgcacggt	2160
gcaccaatgc	ttctggcgtc	aggcagccat	cggaagctgt	ggtatggctg	tgcaggtcgt	2220
aaatcactgc	ataattcgtg	tcgctcaagg	cgcactcccc	ttctggataa	tgttttttgc	2280

gccgacatca taacggttct ggcaaatatt ctgaaatgag ctgttgacaa ttaatcatcc	2340
ggctcgtata atgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaatth cacacaggaa acagaccatg	2400
aggggaagcgt tgatcgccga agtatcgact caactatcag aggtagttgg cgtcatcgag	2460
cgccatctcg aaccgacggt gctggccgta catttgtagc gctccgcagt ggatggcggc	2520
ctgaagccac acagtgatat tgatttgctg gttacgggtga ccgtaaggct tgatgaaaca	2580
acgcggcgag ctttgatcaa cgaccttttg gaaacttcgg cttcccctgg agagagcgag	2640
attctccgcg ctgtagaagt caccattggt gtgcacgacg acatcattcc gtggcgttat	2700
ccagctaagc gcgaactgca atttggagaa tggcagcgca atgacattct tgcaggtatc	2760
ttcgagccag ccacgatcga cattgatctg gctatcttgc tgacaaaagc aagagaacat	2820
agcgttgccct tggtaggtcc agcggcggag gaactctttg atccggttcc tgaacaggat	2880
ctatttgagg cgctaaatga aaccttaacg ctatggaact cgccgcccga ctgggctggc	2940
gatgagcgaa atgtagtgct tacgtttgctc cgcatthggt acagcgcagt aaccggcaaa	3000
atcgcgccga aggatgtcgc tgccgactgg gcaatggagc gcctgccggc ccagtatcag	3060
cccgtcatac ttgaagctag gcaggcttat cttggacaag aagatcgctt ggcctcgcgc	3120
gcagatcagt tgggaagaatt tgttcactac gtgaaaggcg agatcaccaa agtagtcggc	3180
aaataaagct ctagtggatc tccgtacccc cgggggatct ggctcgcggc ggacgcacga	3240
cgccggggcg agaccatagg cgatctccta aatcaatagt agctgtaacc tcgaagcgtt	3300
tcacttgtaa caacgattga gaaththtgt cataaaattg aaatacttgg ttcgcathth	3360
tgtcatccgc ggtcagccgc aattctgacg aactgcccac ttagctggag atgattgtac	3420
atccttcacg tgaaaatttc tcaagcgtg tgaacaaggg ttcagathth agattgaaag	3480
gtgagccgtt gaaacacgth cttcttgctg atgacgacgt cgctatgcgg catcttatta	3540
ttgaatacct tacgatccac gccttcaaag tgaccgcggt agccgacagc acccagttca	3600
caagagtact ctcttccgcg acggtcgtg tctgtgthtgt tgatctaaat ttaggtcgtg	3660
aagatgggct cgagatcgtt cgtaatctgg cggcaaagtc tgatattcca atcataatta	3720
tcagtggcga ccgccttgag gagacggata aagttgthtgc actcgagcta ggagcaagtg	3780
aththtatcgc taagccgthc agtatcagag agththctagc acgcattcgg gthtgccttgc	3840
gcgtgcgcc caacgthtgc cgctccaaag accgacgthc thththgthth actgactgga	3900
cacttaatct caggcaacgt cgcttgatgt ccgaagctgg cggtgaggtg aaacttacgg	3960
caggtgagth caatcttctc ctgcgththt tagagaaacc ccgcgacgth ctatcgcgcg	4020
agcaacttct cattgccagt cgagtacgcg acgaggaggt ttatgacagg agtatagatg	4080
thctcathth gaggtcgcgc cgcaaacttg aggcagatcc gtcaagccct caactgataa	4140

aaacagcaag aggtgcccgt tatttctttg acgcggacgt gcaggtttcg cacgggggga	4200
cgatggcagc ctgagccaat tcccagatcc ccgaggaatc ggcgtgagcg gtcgcaaacc	4260
atccggcccc gtacaaatcg gcgcggcgct gggatgatgac ctggtggaga agttgaaggc	4320
cgcgcaggcc gccagcggc aacgcatacga ggcagaagca cgccccggtg aatcgtggca	4380
agcggccgct gatcgaatcc gcaaagaatc ccggcaaccg ccggcagccg gtgcgccgtc	4440
gattaggaag ccgccaagg gcgacgagca accagatatt ttcgttccga tgctctatga	4500
cgtgggcacc cgcgatagtc gcagcatcat ggacgtggcc gttttccgtc tgctgaagcg	4560
tgaccgacga gctggcgagg tgatccgcta cgagcttcca gacgggcacg tagaggtttc	4620
cgcagggccg gccggcatgg ccagtgtgtg ggattacgac ctggtactga tggcggtttc	4680
ccatctaacc gaatccatga accgataccg ggaagggag ggagacaagc ccggccgct	4740
gttccgtcca cacgttgagg acgtactcaa gttctgcccg cgagccgatg gcggaaagca	4800
gaaagacgac ctggtagaaa cctgcattcg gttaaacacc acgcacgctg ccatgcagcg	4860
tacgaagaag gccaaagacg gccgcctggg gacggtatcc gaggggaag ccttgattag	4920
ccgctacaag atcgtaaaga gcgaaaccgg gcggccggag tacatcgaga tcgagctagc	4980
tgattggatg taccgagaga tcacagaagg caagaaccgg gacgtgctga cggttcacc	5040
cgattacttt ttgatcgatc ccggcatcgg ccgttttctc taccgcctgg cacgccgcgc	5100
cgcaggcaag gcagaagcca gatggttgtt caagacgac tacgaacgca gtggcagcgc	5160
cggagagttc aagaagttct gtttcaccgt gcgcaagctg atcgggtcaa atgacctgcc	5220
ggagtacgat ttgaaggagg aggcggggca ggctggcccg atcctagtca tgcgctaccg	5280
caacctgatc gagggcgaag catccgccgg ttctaatgt acggagcaga tgctagggca	5340
aattgcccta gcaggggaaa aaggtcgaaa aggtctcttt cctgtggata gcacgtacat	5400
tgggaacca aagccgtaca ttgggaaccg gaaccgctac attgggaacc caaagccgta	5460
cattgggaac cggtcacaca tgtaagtgac tgatataaaa gagaaaaaag gcgatttttc	5520
cgctaaaac tctttaaacc ttattaaaac tctttaaacc cgctggcct gtgcataact	5580
gtctggccag gcacagccg aagagctgca aaaagcgctt acccttcggt cgctgcgctc	5640
cctacgccc gccgcttcgc gtcggcctat cgcgccgct gccgctcaa aatggctgg	5700
cctacggcca ggcaatctac cagggcgcgg acaagccgcg ccgtcgccac tcgaccgccg	5760
gcgctgaggt ctgcctcgtg aagaaggtgt tgctgactca taccaggcct gaatcgcccc	5820
atcatccagc cagaaagtga gggagccacg gttgatgaga gctttgttgt aggtggacca	5880
gttggtgatt ttgaactttt gctttgccac ggaacggtct gcgttgctcg gaagatgcgt	5940
gatctgatcc ttcaactcag caaaagtctg atttattcaa caaagccgcc gtccccgtaa	6000
gtcagcgtaa tgctctgcca gtgttacaac caattaacca attctgatta gaaaaactca	6060

tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc atatttttga	6120
aaaagccggt tctgtaatga aggagaaaac tcaccgaggc agttccatag gatggcaaga	6180
tcctgggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat taatttcccc	6240
tcgtcaaaaa taaggttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga atccggtgag	6300
aatggcaaaa gctctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat	6360
tgggcgctct tccgcttccct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg	6420
agcgggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc	6480
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcggt	6540
gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag	6600
tcagaggtgg cgaaaccgga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc	6660
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc	6720
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cggtgtaggt	6780
cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt	6840
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccg ggtgaacac gacttatcgc cactggcagc	6900
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa	6960
gtggtggcct aactacggct aactagaag aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa	7020
gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg	7080
tagcgtggtt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga	7140
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg	7200
gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttga tccggaatta	7260
attcctgtgg ttggcatgca catacaaatg gacgaacgga taaacctttt cacgcccttt	7320
taaataatccg attattctaa taaacgctct tttctcttag gtttaccgc caatatatcc	7380
tgtcaaacac tgatagttta aactgaaggc gggaaacgac aatctgatca tgagcggaga	7440
attaagggag tcacgttatg acccccgcg atgacgcggg acaagccggt ttacgtttgg	7500
aactgacaga accgcaacgc tgaggaatt ggccgcagcg gccatttaaa tcaattgggc	7560
gcgtacgtag cactagtgcg cgatcgctta attaagcggc gcgcctgcag gcggccgcac	7620
aattattata tcaaatggc aaaaacattt aatacgtatt atttaagaaa aaaatatgta	7680
ataatatatt tatattttta tatctattct tatgtatttt ttaaaaatct attatatatt	7740
gatcaactaa aatattttta tatctacact tattttgcat ttttatcaat tttcttgcgt	7800
tttttggcat atttaataat gactattctt taataatcga tcattattct tacatggtac	7860
atattgttgg aaccatatga agtgtccatt gcatttgact atgtggatag tgttttgatc	7920

caggccctcca	tttgccgctt	attaattaat	ttggtaacag	tccgtactaa	tcagttactt	7980
atccttccctc	catcataatt	aatcttggta	gtctcgaatg	ccacaacact	gactagtctc	8040
ttggatcata	agaaaaagcc	aaggaacaaa	agaagacaaa	acacaatggg	agtatccttt	8100
gcatagcaat	gtctaagttc	ataaaattca	aacaaaaacg	caatcacaca	cagtggacat	8160
cacttatcca	ctagctgatc	aggatcgccg	cgtaagaaa	aaaaactgg	accccaaaag	8220
ccatgcacaa	caacacgtac	tcacaaaggt	gtcaatcgag	cagcccaaaa	cattcaccaa	8280
ctcaacccat	catgagccca	cacatttggt	gtttctaac	caacctcaa	ctcgtattct	8340
cttccgccac	ctcatttttg	tttatttcaa	caccctcaa	actgcatgcc	acccctggc	8400
caaatgtcca	tgcattgtaa	caagacctat	gactataaat	atctgcaatc	tcggcccagg	8460
ttttcatcat	caagaaccag	ttcaatatcc	tagtacaccg	tattaaagaa	tttaagatat	8520
actccaccgg	atccaccatg	gccaaagctag	ttttttccct	ttgtttctg	cttttcagtg	8580
gctgctgctt	cgctgagatt	ttcggcaaga	ccttccgcga	gggccgcttc	gtgctcaagg	8640
agaagaactt	caccgtggag	ttcggcgtgg	agaagatcca	cctcggctgg	aagatatcgg	8700
gccgcgtgaa	gggctcgccg	ggccgcctcg	aggtgctccg	caccaaggcc	ccggagaagg	8760
tgctcgtgaa	caactggcag	tcctggggcc	cgtagccgct	ggtggacgcc	ttctccttca	8820
agccgccgga	gatcgacccg	aactggcgct	acaccgcctc	cgtggtgccg	gacgtgctcg	8880
agcgcaacct	gcagtccgac	tacttcgtgg	ccgaggaggg	caagggtgtac	ggcttcctct	8940
cctccaagat	cgcccacccg	ttcttcgcgg	tggaggacgg	cgagctggtg	gcctacctcg	9000
agtacttcga	cgtggagttc	gacgacttcg	tgccgctgga	gccgctcgtg	gtgctcgagg	9060
acccgaacac	cccgtcctc	ctcgagaagt	acgccgagct	ggtgggcatg	gagaacaacg	9120
cccgggtgcc	gaagcacacg	ccgaccggct	ggtgctcctg	gtatcactac	ttcctcgacc	9180
tcacctggga	ggagaccctc	aagaacctca	agctcgccaa	gaacttcccg	ttcgagggtg	9240
tccagatcga	cgacgcctac	gagaaggaca	tcggcgactg	gctcgtgacc	cgcggcgact	9300
tcccgtccgt	ggaggagatg	gccaaaggtga	tcgccgagaa	cggcttcctc	cccggcatct	9360
ggaccgcccc	gttctccgtg	tccgagacta	gtgacgtggt	caacgagcac	ccggactggg	9420
tggtgaagga	gaacggcgag	ccgaagatgg	cctaccgcaa	ctggaacaag	aagatttacg	9480
ccctcgacct	ctccaaggac	gaggtgetca	actggctctt	cgacctctc	tcctccctcc	9540
gcaagatggg	ctaccgctac	ttcaagatcg	acttctctct	cgcgggcgcc	gtgccggggg	9600
agcgcaagaa	gaacatcacc	ccgatccagg	ccttccgcaa	gggcatcgag	accatccgca	9660
aggccgtggg	ggaggactcc	ttcatcctcg	gctgcggtc	ccccctcctc	ccggccgtgg	9720
gctgcgtgga	tggcatgcgc	atcgccccg	acaccgcccc	gttctgggga	gagcacatcg	9780
aggacaaagg	cgccccggcg	gcccgtggg	ccctccgcaa	cgccatcacc	cgctacttca	9840

tgcacgaccg	cttctggctc	aacgaccg	actgcctcat	cctccgag	gagaagaccg	9900
acctcaccca	gaaggagaag	gagctgtact	cctacacctg	cggcgttcta	gacaacatga	9960
tcatcgagtc	cgacgacctc	tccctcgtgc	gcgaccacgg	caagaagggtg	ctcaaggaga	10020
ccctcgagct	gctcgggggc	aggccgcg	tgagaacat	catgtccgag	gacctccgct	10080
acgagatcgt	gtcctcgggc	accctctccg	gcaacgtgaa	gatcgtggtg	gacctcaact	10140
cccgcgagta	ccacctcgag	aaggaggcca	agtcctccct	caagaagcgc	gtggtgaagc	10200
gggaggacgg	caggaacttc	tacttctacg	aggagggcga	gcgcgagtga	aagcttgacg	10260
tcactagtgc	gatcgcgcta	gccatggccg	gcctaggcgc	ccgggagatc	cccgaatttc	10320
cccgatcgtt	caaacatttg	gcaataaagt	ttcttaagat	tgaatcctgt	tgccggtctt	10380
gcgatgatta	tcatataatt	tctgttgaat	tacgttaagc	atgtaataat	taacatgtaa	10440
tgcatgacgt	tatttatgag	atgggttttt	atgattagag	tcccgcatt	atacatttaa	10500
tacgcgatag	aaaacaaaat	atagcgcgca	aactaggata	aattatcgcg	cgcggtgtca	10560
tctatgttac	tagatcggga	attcctcgag	tctagacctg	cagg		10604

<210> 4
 <211> 8757
 <212> DNA
 <213> 人工

<220>
 <223> pBSC11369

<400> 4						
aagcttctgg	cagacaaagt	ggcagacata	ctgtcccaca	aatgaagatg	gaatctgtaa	60
aagaaaacgc	gtgaaataat	gcgtctgaca	aaggttaggt	cggtgcctt	taatcaatac	120
caaagtggtc	cctaccacga	tggaaaact	gtgcagtcgg	tttggctttt	tctgacgaac	180
aaataagatt	cgtggccgac	aggtgggggt	ccaccatgtg	aaggcatctt	cagactccaa	240
taatggagca	atgacgtaag	ggcttacgaa	ataagtaagg	gtagtttggg	aaatgtccac	300
tcacccgtca	gtctataaat	acttagcccc	tccctcattg	ttaagggagc	aaggatccac	360
cggtcgccac	catggcccag	tccaagcacg	gcctgaccaa	ggagatgacc	atgaagtacc	420
gcatggaggg	ctgcgtggac	ggccacaagt	tcgtgatcac	cggcgagggc	atcggctacc	480
ccttcaaggg	caagcaggcc	atcaacctgt	gcgtggtgga	ggcgggccc	ttgcccttcg	540
ccgaggacat	cttgtccgcc	gccttcatgt	acggcaaccg	cgtgttcacc	gagtaccccc	600
aggacatcgt	cgactacttc	aagaactcct	gccccgccgg	ctacacctgg	gaccgctcct	660
tcctgttcga	ggacggcgcc	gtgtgcatct	gcaacgccga	catcaccgtg	agcgtggagg	720
agaactgcat	gtaccacgag	tccaagttct	acggcgtgaa	cttccccgcc	gacggccccg	780

tgatgaagaa	gatgaccgac	aactgggagc	cctcctgcga	gaagatcatc	cccgtgcca	840
agcagggcat	cttgaagggc	gacgtgagca	tgtacctgct	gctgaaggac	ggtagggcgt	900
tgcgctgcca	gttcgacacc	gtgtacaagg	ccaagtccgt	gccccgcaag	atgccccgact	960
ggcacttcat	ccagcacaag	ctgacccgcg	aggaccgcag	cgacgccaag	aaccagaagt	1020
ggcacctgac	cgagcacgcc	atcgectccg	gctccgcctt	gccctgctct	agatcccga	1080
tttccccgat	cgttcaaaca	tttggcaata	aagtittcta	agattgaatc	ctgttgccgg	1140
tcttgcgatg	attatcatat	aatttctggt	gaattacggt	aagcatgtaa	taattaacat	1200
gtaatgcatg	acgttattta	tgagatgggt	ttttatgatt	agagtcccgc	aattatacat	1260
ttaatacgcg	atagaaaaca	aaatatagcg	cgcaaactag	gataaattat	cgcgcgcggt	1320
gtcatctatg	ttactagatc	gggaattggg	gaaatttacc	ggtgccgaat	ttccccgatc	1380
cagcttctgg	cagacaaagt	ggcagacata	ctgtcccaca	aatgaagatg	gaatctgtaa	1440
aagaaaacgc	gtgaaataat	gcgtctgaca	aaggttaggt	cggtgcctt	taatcaatac	1500
caaagtggtc	cctaccacga	tggaaaaact	gtgcagtcgg	tttggctttt	tctgacgaac	1560
aaataagatt	cgtggccgac	aggtgggggt	ccaccatgtg	aaggcatctt	cagactccaa	1620
taatggagca	atgacgtaag	ggcttacgaa	ataagtaagg	gtagtttggg	aaatgtccac	1680
tcacccgtca	gtctataaat	acttagcccc	tccctcattg	ttaagggagc	aaggatccat	1740
gaaaaagcct	gaactcaccg	cgacgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	agttcgacag	1800
cgtctccgac	ctgatgcagc	tctcggaggg	cgaagaatct	cgtgctttca	gcttcgatgt	1860
aggagggcgt	ggatatgtcc	tgcgggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	acaagatcg	1920
ttatgtttat	cggcactttg	catcggccgc	gctccccgatt	ccggaagtgc	ttgacattgg	1980
ggaattcagc	gagagcctga	cctattgcat	ctcccgcctg	gcacagggtg	tcacgttgca	2040
agacctgcct	gaaaccgaac	tgcccgctgt	tctgcagccg	gtcgcggagg	ccatggatgc	2100
gatcgctcgc	gccgatctta	gccagacgag	cgggttcggc	ccattcggac	cgcaaggaat	2160
cggtaatac	actacatggc	gtgatttcat	atgcgcgatt	gctgatcccc	atgtgtatca	2220
ctggcaaact	gtgatggacg	acaccgtcag	tgcgtccgtc	gcgaggctc	tcgatgagct	2280
gatgctttgg	gccgaggact	gccccgaagt	ccggcacctc	gtgcacgcgg	atctcggctc	2340
caacaatgtc	ctgacggaca	atggccgcat	aacagcggtc	attgactgga	gagaggcgat	2400
gttcggggat	tccaatacag	aggtcgccaa	catcttcttc	tggaggccgt	ggttggcttg	2460
tatggagcag	cagacgcgct	acttcgagcg	gaggcatccg	gagcttgacg	gatcgccgcg	2520
gctccggggc	tatatgctcc	gcattggtct	tgaccaactc	tatcagagct	tggttgacgg	2580
caatttcgat	gatgcagctt	gggcgcaggg	tcgatgcgac	gcaatcgtcc	gatccggagc	2640
cgggactgtc	gggcgtacac	aaatcgcccc	cagaagcgcg	gccgtctgga	ccgatggctg	2700

tgtagaagta	ctcgccgata	gtggaaaccg	acgccccagc	actcgtccga	gggcaaagga	2760
atagggatcc	cccgaatttc	cccgatcggt	caaacatttg	gcaataaagt	ttcttaagat	2820
tgaatcctgt	tgccggtcct	gcgatgatta	tcatataatt	tctgttgaat	tacgttaagc	2880
atgtaataat	taacatgtaa	tgcattgacgt	tatttatgag	atgggttttt	atgattagag	2940
tcccgcaatt	atacatttaa	tacgcgatag	aaaacaaaat	atagcgcgca	aactaggata	3000
aattatcgcg	cgcggtgtca	tctatgttac	tagatcggga	attagcggcc	cgaattcact	3060
ggccgctcgt	ttacaacgtc	gtgactggga	aaaccctggc	gttaccacaac	ttaatcgctt	3120
tgcagcacat	cccccttcg	ccaggggagg	ccagcatggc	cgtatccgca	atgtgttatt	3180
aagttgtcta	agcgtcaatt	tgtttacacc	acaatatatc	ctgccaccag	ccagccaaca	3240
gctccccgac	cggcagctcg	gcacaaaatc	accactcgat	acaggcagcc	catcagaatt	3300
aattctcatg	tttgacagct	tatcatcgac	tgcacggtgc	accaatgctt	ctggcgctag	3360
gcagccatcg	gaagctgtgg	tatggctgtg	caggtcgtaa	atcactgcat	aattcgtgtc	3420
gctcaaggcg	cactcccgtt	ctggataatg	ttttttgctc	cgacatcata	acggttctgg	3480
caaataattt	gaaatgagct	gttgacaatt	aatcatccgg	ctcgtataat	gtgtggaatt	3540
gtgagcggat	aacaatttca	cacaggaaac	agaccatgag	ggaagcgttg	atcgccgaag	3600
tatcgactca	actatcagag	gtagttggcg	tcatcgagcg	ccatctcgaa	ccgacgttgc	3660
tggccgtaca	tttgtacggc	tccgcagtgg	atggcggcct	gaagccacac	agtgatattg	3720
atgtgctggt	tacgggtgacc	gtaaggcttg	atgaaacaac	gcggcgagct	ttgatcaacg	3780
accttttggg	aacttcggct	tcccctggag	agagcgagat	tctccgcgct	gtagaagtca	3840
ccattgttgt	gcacgacgac	atcattccgt	ggcgttatcc	agctaagcgc	gaactgcaat	3900
ttggagaatg	gcagcgcaat	gacattcttg	caggtatctt	cgagccagcc	acgatcgaca	3960
ttgatctggc	tatcttgctg	acaaaagcaa	gagaacatag	cgttgccttg	gtaggtccag	4020
cggcggagga	actctttgat	ccggttcttg	aacaggatct	atgtgaggcg	ctaaatgaaa	4080
ccttaacgct	atggaactcg	ccgcccgact	gggctggcga	tgagcgaat	gtagtgcctt	4140
cgttgtcccg	catttggtac	agcgcagtaa	ccggcaaaat	cgcgccgaag	gatgtcgtcg	4200
ccgactgggc	aatggagcgc	ctgccggccc	agtatcagcc	cgtcatactt	gaagctaggc	4260
aggcttatct	tggacaagaa	gatcgccttg	cctcgcgcgc	agatcagttg	gaagaatttg	4320
ttcactacgt	gaaaggcgag	atcaccaaag	tagtcggcaa	ataaagctct	agtggatctc	4380
cgtacccggg	gatctggctc	gcgccggacg	cacgacgccg	ggcgagacc	ataggggatc	4440
tcctaaatca	atagtagctg	taacctcgaa	gcgtttcact	tgtacaacg	attgagaatt	4500
tttgtcataa	aattgaaata	cttggttcgc	atTTTTgtca	tccgcggtca	gccgcaattc	4560

tgacgaactg cccatttagc tggagatgat tgtacatcct tcacgtgaaa atttctcaag	4620
cgctgtgaac aagggttcag attttagatt gaaaggtgag ccggtgaaac acgttcttct	4680
tgtcgatgac gacgtcgcta tgcggcatct tattattgaa taccttacga tccacgcctt	4740
caaagtgacc gcggtagccg acagcaccca gttcacaaga gtactctctt ccgcgacggt	4800
cgatgtcgtg gttgttgatc tagatthagg tctgtaagat gggctcgaga tctttcgtaa	4860
tctggcggca aagtctgata ttccaatcat aattatcagt ggcgaccgcc ttgaggagac	4920
ggataaagtt gttgcactcg agctaggagc aagtgatttt atcgctaagc cgttcagtat	4980
cagagagttt ctagcacgca ttcgggttgc cttgcgcgtg cgccccaacg ttgtccgctc	5040
caaagaccga cggctttttt gttttactga ctggacactt aatctcaggc aacgtcgtt	5100
gatgtccgaa gctggcgggtg aggtgaaact tacggcaggt gagttcaatc ttctcctcgc	5160
gttttttagag aaaccccgcg acgttctatc gcgcgagcaa cttctcattg ccagtcgagt	5220
acgcgacgag gaggtttatg acaggagtat agatgttctc attttgaggc tgcgccgcaa	5280
acttgaggca gatccgtcaa gccctcaact gataaaaaca gcaagaggtg ccggttattt	5340
ctttgacgcg gacgtgcagg tttgcacgag ggggacgatg gcagcctgag ccaattcca	5400
gatccccgag gaatcggcgt gagcggtcgc aaaccatccg gcccggtaca aatcggcgcg	5460
gcgctgggtg atgacctggt ggagaagttg aaggccgcg caggcccca gcggcaacgc	5520
atcgaggcag aagcacgcc cggatgaatc tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgcaaa	5580
gaatcccggc aaccgccggc agccggtgcg ccgtcgatta ggaagccgcc caagggcgac	5640
gagcaaccag atttttcgt tccgatgctc tatgacgtgg gcacccgca tagtcgcagc	5700
atcatggacg tggccgtttt ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc	5760
cgctacgagc ttccagacgg gcacgtagag gtttccgag ggccggccgg catggccagt	5820
gtgtgggatt acgacctggt actgatggcg gtttccatc taaccgaatc catgaaccga	5880
taccgggaag ggaagggaga caagcccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta	5940
ctcaagttct gccggcgagc cgatggcggg aagcagaaag acgacctggt agaaacctgc	6000
attcggttaa acaccacgca cgttgccatg cagcgtacga agaaggcca gaacggccgc	6060
ctggtgacgg tatccgaggg tgaagccttg attagccgct acaagatcgt aaagagcgaa	6120
accgggcggc cggagtacat cgagatcgag ctagctgatt ggatgtaccg cgagatcaca	6180
gaaggcaaga acccggacgt gctgacggtt caccgccatt actttttgat cgatcccggc	6240
atcggccgtt ttctctaccg cctggcacgc cgcgccgag gcaaggcaga agccagatgg	6300
ttgttcaaga cgatctacga acgcagtggc agcgcggag agttcaagaa gttctgtttc	6360
accgtgcgca agctgatcgg gtcaaatac ctgccggagt acgatttgaa ggaggaggcg	6420
gggcaggctg gcccgatcct agtcatgccc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc	6480

gccggttcct aatgtacgga gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaaaaaggt	6540
cgaaaaggtc tctttcctgt ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg	6600
aaccggaacc cgtacattgg gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa	6660
gtgactgata taaaagagaa aaaaggcgat ttttccgctt aaaactcttt aaaacttatt	6720
aaaactctta aaaccgcctt ggcctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag	6780
ctgcaaaaag cgcctaccct tcggtcgctg cgctccctac gccccgccgc ttcgctcgg	6840
cctatcgcgg ccgctggccg ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg	6900
cgcggaacaag ccgcccgtc gccactcgac cgccggcgct gaggtctgcc tcgtgaagaa	6960
gggtgtgctg actcatacca ggcctgaatc gcccctcat ccagccagaa agtgagggag	7020
ccacggttga tgagagcttt gttgtagggtg gaccagttgg tgattttgaa cttttgcttt	7080
gccacggaac ggtctgcgtt gtcgggaaga tgcgtgatct gatccttcaa ctacgaaaa	7140
gttcgattta ttcaacaaag ccgccgtccc gtcaagtcag cgtaatgctc tgccagtgtt	7200
acaaccaatt aaccaattct gattagaaaa actcatcgag catcaaatga aactgcaatt	7260
tattcatatc aggattatca ataccatatt tttgaaaaag ccgtttctgt aatgaaggag	7320
aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg gtatcggctc gcgattccga	7380
ctcgtccaac atcaatacaa cctattaatt tccccctgct aaaaataagg ttatcaagtg	7440
agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg caaaagctct gcattaatga	7500
atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctcgcctc	7560
actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	7620
gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc	7680
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgttttcca taggctccgc	7740
ccccctgacg agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	7800
ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc	7860
ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	7920
agctcacgct gtaggtatct cagttcgggtg taggtcgctc gctccaagct gggctgtgtg	7980
cacgaacccc ccgctcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc	8040
aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	8100
gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact	8160
agaagaacag tatttggat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	8220
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag	8280
cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacggg	8340

tctgacgctc agtggAACGA aaactCACGT taagggattt tggTCATGAG attatcaaaa	8400
aggatcttca cctagatcct tttgatccgg aattaattcc tgtggttggc atgcacatac	8460
aaatggacga acggataaac cttttcacgc ctttttaaat atccgattat tctaataaac	8520
gctcttttct cttaggttta cccgccaata tatcctgtca aacctgata gtttaaactg	8580
aaggcgggaa acgacaatct gatcatgagc ggagaattaa gggagtcacg ttatgacccc	8640
cgccgatgac gcgggacaag ccgttttacg tttggaactg acagaaccgc aacgctgcag	8700
gaattggccg cagcggccat ttaaataaat tgggcgcgcc gaattcgagc tcggtac	8757

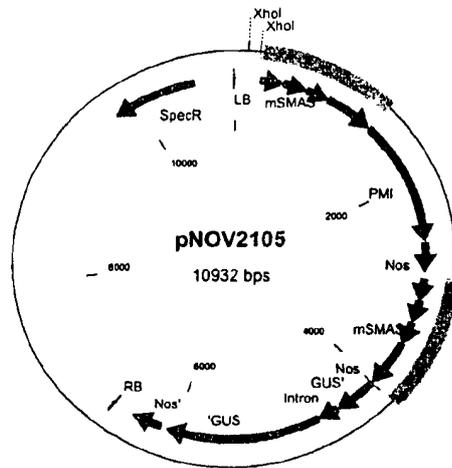


图1

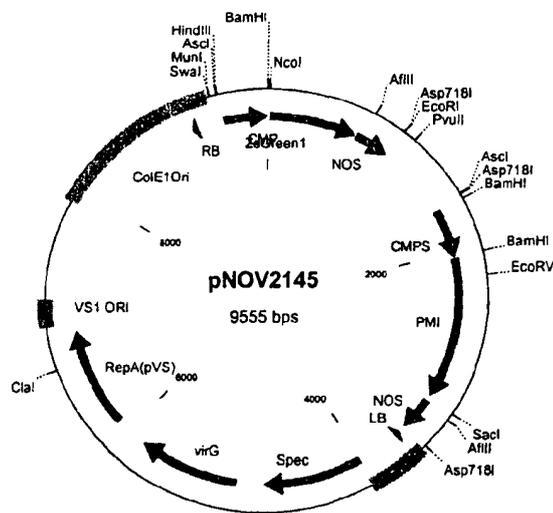


图2

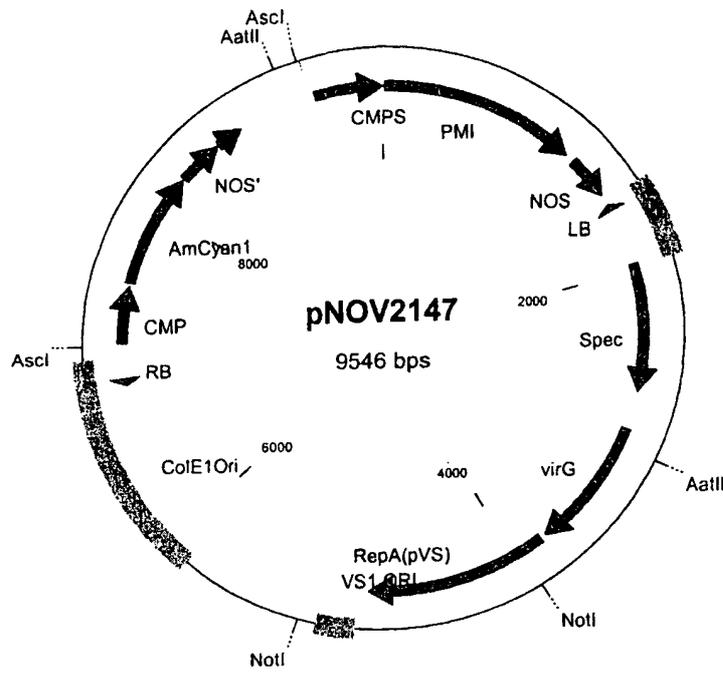


图 3

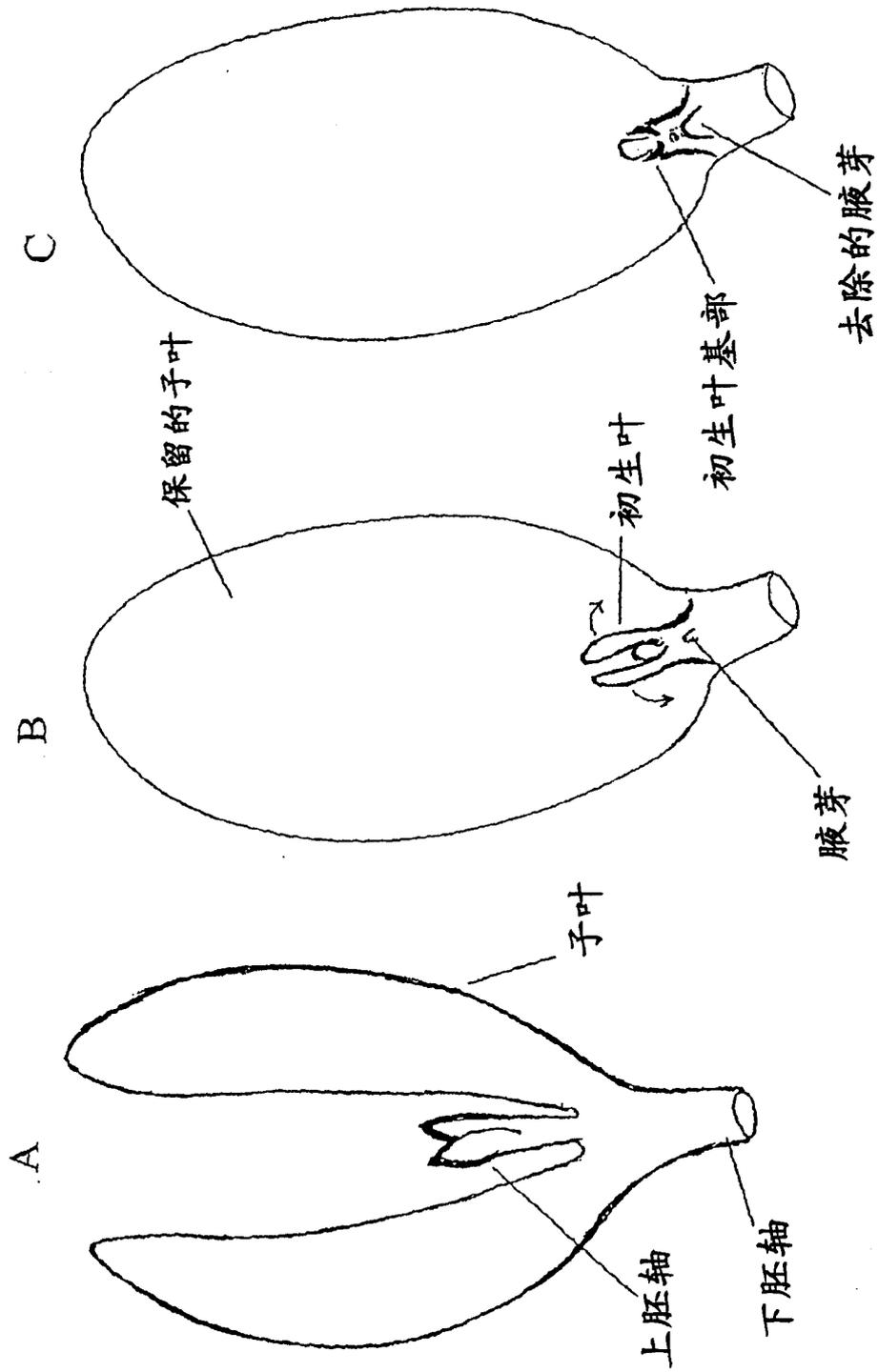


图4

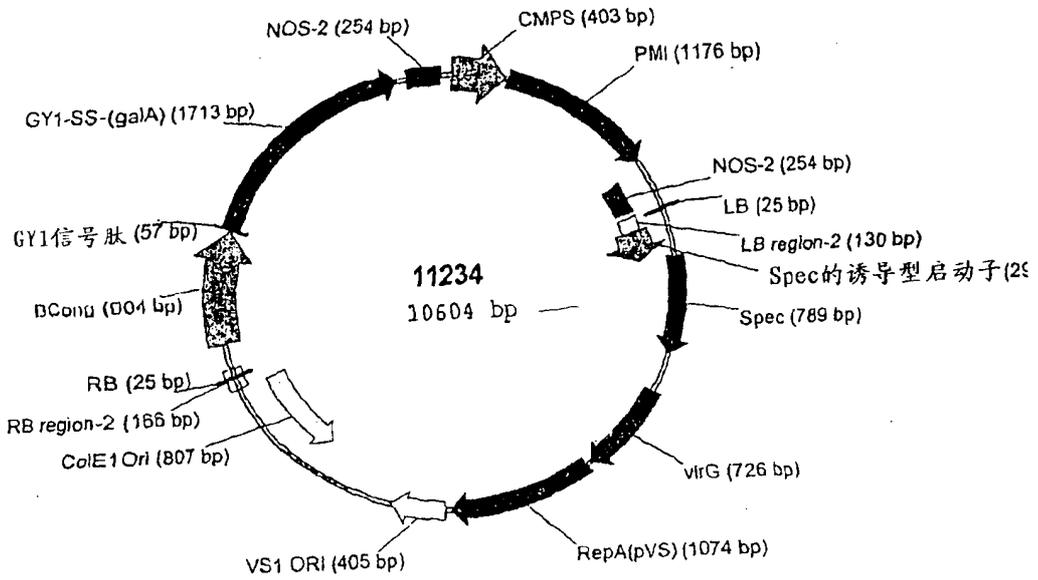


图 5

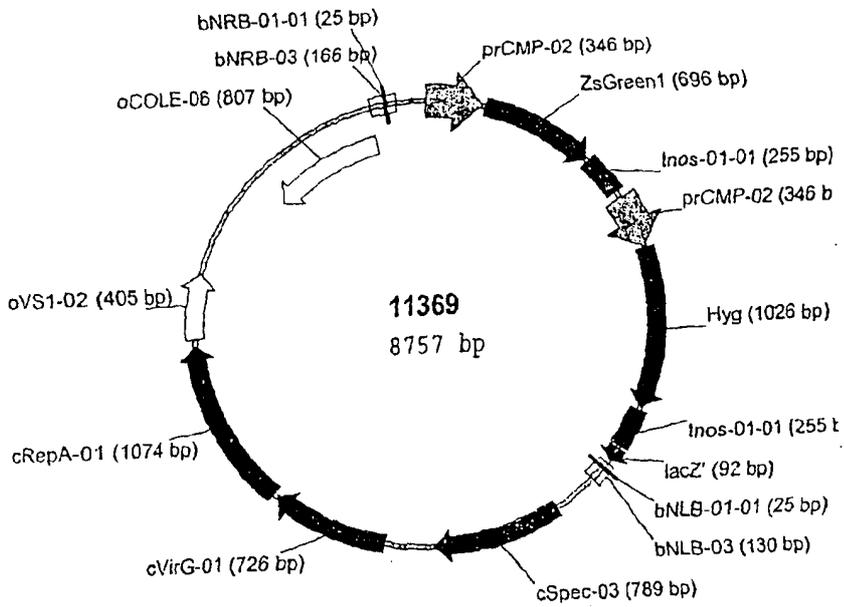


图 6