



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103194447 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 10

(21) 申请号 201210006614. 1

(22) 申请日 2012. 01. 09

(71) 申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街
1 号

(72) 发明人 徐芳森 杨广哲

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 张红兵

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010. 01)

A01H 5/00 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一个甘蓝型油菜缺磷诱导表达启动子

(57) 摘要

本发明属于植物基因工程技术领域。从甘蓝型油菜中克隆得到一个缺磷诱导表达启动子,它的核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO. 1 中第 1-1459 碱基所示。将该启动子与报告基因 GUS 融合转化拟南芥, GUS 组织化学分析表明该启动子只在缺磷条件下具有活性,在正常、缺氮、缺钾、缺硫以及缺铁条件下都不具有活性。该启动子除了应用于耐低磷或磷高效作物的培育外,还可以用于缺磷诱导表达基因调控机制研究。

1. 一个甘蓝型油菜缺磷诱导表达的启动子,其核苷酸序列如序列表 SEQ ID NO. 1所示。
2. 权利要求 1 所述的启动子在培育耐低磷或磷高效植物中的应用。
3. 权利要求 2 的应用,其中包括在培育耐低磷或磷高效甘蓝型油菜品种中的应用。

一个甘蓝型油菜缺磷诱导表达启动子

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种油菜 BnPR2 基因启动子及其应用,本发明提供了一个油菜缺磷诱导表达启动子及应用。

背景技术

[0002] 磷是植物生长发育必需的大量营养元素,它不仅是植物体内核酸、磷脂、ATP 等重要分子的组成成分,而且在能量传递和代谢途径调控中发挥着一系列重要作用。植物主要利用根以磷酸根的形式吸收磷。虽然土壤中磷的总量非常丰富,但由于磷酸根很容易被土壤颗粒以及金属离子吸附固定,所以土壤中磷的生物有效性非常低,缺磷经常成为限制作物产量的因素。施用磷肥成为目前保障作物产量的重要栽培措施。然而,施入土壤的磷肥当季利用率很低,往往随水土淋失而进入水体,造成了潜在的水体富营养化等环境问题。另外,磷矿属不可再生资源,估计 60-90 年后,易于开采的磷矿将被耗竭。为了实现农业的可持续发展,必须提高磷肥的利用效率,减少磷肥的施用量。培育耐低磷或磷高效的作物品种是一项经济有效且环境友好的办法。Gao 等 (Gao N, Su Y, Min J, Shen W, Shi W. Transgenic tomato overexpressing ath-miR399d has enhanced phosphorus accumulation through increased acid phosphatase and proton secretion as well as phosphate transporters. *Plant and Soil*, 2010, 334 :123-136) 将拟南芥 miR399d 在番茄中超表达。转基因植株提高了磷转运子的表达,磷酸酶的活性和质子的分泌,最终表现出较高的磷吸收和叶片磷浓度。Lü 等 (Lü J, Gao X, Dong Z, Yi J, An, L. Improved phosphorus acquisition by tobacco through transgenic expression of mitochondrial malate dehydrogenase from *Penicillium oxalicum*. *Plant Cell Reports*, 2012, 31 :49-56) 的研究表明,超表达线粒体苹果酸脱氢酶 (MDH) 的转基因烟草提高了对铝磷、铁磷和钙磷的利用能力,增加了对的磷吸收,累积了更多的生物量。

[0003] 现有的植物基因工程通常采用 CaMV 35S、Ubi 和 Act1 等组成型启动子。由于组成型启动子在不同组织和不同环境条件下都能驱动下游基因的表达。这不仅浪费能量,而且影响植物正常的生理代谢。因此通过诱导型启动子或组织特异型启动子控制实现导入基因的环境诱导表达或组织特异表达具有重要意义。

[0004] 诱导型启动子 (inducible promoter) 在正常生长条件下不驱动下游基因的转录或者转录水平很低,而在某些物理、化学或生物信号的刺激下,可以大幅度地提高基因的转录水平。诱导型启动子的优势在于可根据需要在植物特定的发育阶段或生长环境,让其接受外界信号而激活下游基因表达;也可以去除诱导信号,停止目的基因表达。诱导型启动子在基础研究和生产实践中均具有重要的应用价值。

[0005] 本发明人通过研究甘蓝型油菜缺磷诱导表达基因,获得了一个缺磷诱导表达启动子,该启动子能够用于耐低磷或磷高效作物的培育,也可以用于缺磷诱导表达基因调控机制研究。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,提供一个缺磷诱导表达启动子,该启动子来源于甘蓝型油菜 (*Brassica napus*),其位于基因 BnPR2 的上游。

[0007] 本发明所涉及的技术方案是:利用甘蓝型油菜缺磷诱导表达基因 BnPR2 的基因组序列在芸薹属序列数据库中进行 BLAST 分析,获得与 BnPR2 序列一致的白菜 BAC。根据 BAC 序列设计引物,扩增 BnPR2 的上游序列。然后将该序列与报告基因 GUS 融合,构建重组表达载体 P_{BnPR2}:GUS,通过农杆菌介导转化拟南芥,经过抗生素筛选,PCR 鉴定获得含有 BnPR2 启动子的转基因植株。在正常和缺磷、缺氮、缺钾、缺硫、缺铁条件下培养转基因植株,检测不同缺素植株的 GUS 活性,结果只有缺磷植株显蓝色,正常和其它元素缺乏植株没有蓝色显现,说明 BnPR2 启动子具有缺磷诱导性。

[0008] 更详细的技术方案见《具体实施方式》所述。

附图说明

[0009] 序列表 SEQ ID NO :1 是本发明克隆的甘蓝型油菜缺磷诱导表达启动子的核苷酸序列,其中 1-1459bp 是本发明的启动子序列,第 1460-1501 是基因 BnPR2 的部分核苷酸序列。

[0010] 图 1 是重组表达载体 P_{BnPR2}:GUS 的 T-DNA 区示意图。该载体含卡那霉素 (Kna) 抗性筛选基因。

[0011] 图 2 是 P_{BnPR2}:GUS 表达载体的酶切鉴定图。

[0012] 图 3 是不同元素缺乏条件下 P_{BnPR2}:GUS 转基因拟南芥的 GUS 染色结果。其中 A,为缺氮处理 ;B 为缺磷处理 ;C 为缺钾处理 ;D 为缺硫处理 ;E 为缺铁处理 ;F 为对照。

具体实施方式

[0013] 下面结合具体实施例对本发明作进一步说明,但不是限制本发明。

[0014] 下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法,例如参见《分子克隆实验指南》(第三版,科学出版社,北京)。引物合成由北京奥科生物技术有限责任公司完成,序列测定由华大基因科技股份有限公司武汉测序部完成。

[0015] 实施例 1BnPR2 启动子的克隆

[0016] (1) 基因 BnPR2 是发明人从甘蓝型油菜 (*Brassica napus*,鄂油长荚;刘定富等,甘蓝型油菜特长荚突变体的发现和鉴定.湖北农学院学报,1994,14(2):1-5) 中分离到的一个缺磷诱导表达基因。正常条件下在油菜根中检测到该基因微弱表达,在叶片中没有检测到表达;缺磷条件下该基因在根和叶中表达量急剧上升。通过对 BnPR2 的基因序列进行 BLAST 分析 (http://brassica.bbsrc.ac.uk/BrassicaDB/blast_form.html),在 BrassicaDB 数据库中找到与 BnPR2 序列一致的白菜 BAC(登录号为 CU695313)。根据该 BAC 序列设计下列引物对:

[0017] PF :5' -CCTGCAGGAATTTTAGAATGTTGTGTCG-3',

[0018] PR :5' -TCTAGATCTTTTGATTTGTGGTGTGTC-3'。

[0019] 其中带下划线的碱基为添加的限制性内切酶位点,引物 PF 添加了一个 Sda I 酶切位点,引物 PR 添加了一个 Xba I 酶切位点。以甘蓝型油菜(鄂油长荚)基因组 DNA 为模板,利用高保真 DNA 聚合酶 KOD plus 扩增基因 BnPR2 的上游序列。PCR 反应体系

为 :DNA (50ng/ μ L) 4.0 μ L, ddH₂O 9.0 μ L, 10X PCR 缓冲液 2.0 μ L, MgSO₄ (25mM) 1.0 μ L, dNTP (2.0mM) 2.0 μ L, 引物 PF (10 μ M) 0.8 μ L, 引物 PR (10 μ M) 0.8 μ L, KOD-plus (1U/ μ L) 0.4 μ L。PCR 缓冲液, MgSO₄, dNTP, KOD-plus DNA 聚合酶均来自东洋纺 (上海) 生物科技有限公司。PCR 反应条件为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟 ;94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒, 68 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟, 35 个循环 ;最后 68 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟。PCR 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳, 得到大小为 1500bp 左右的单一条带。

[0020] (2) 利用道普公司的 PCR 产物回收试剂盒对扩增产物进行纯化回收, 具体方法参见道普公司该试剂盒的说明书。随后对 PCR 产物末端加“dA”, 与 pGEM[®] T Easy 载体 (购自武汉洁洋盛生物科技有限公司) 连接。载体试剂盒来自 Promega 公司, 具体方法参见该公司试剂盒说明书。然后转化大肠杆菌 DH5 α , 挑阳性克隆送华大基因科技股份有限公司武汉测序部测序, 其核苷酸序列如序列 SEQ ID NO :1 所示, 序列长度为 1501bp。与已获得的 BnPR2 基因组 DNA 序列相比较, 显示该序列与基因 BnPR2 的 5' 端有 42 个碱基重叠, 所以认为克隆到的长 1501bp DNA 片段是基因 BnPR2 的候选启动子。测序结果显示, 该启动子的序列如 SEQ ID NO :1 中第 1-1459bp 所示, 在该启动子的下游是基因 BnPR2 的部分核苷酸序列 (5' 端 42 个碱基), SEQ ID NO :1 中的第 1460 位碱基“G”为转录起始位点。BnPR2 启动子属于典型的 TATA 盒型启动子, 第 1428 位碱基为 TATA 框。利用 PLACE 数据库 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 对 BnPR2 启动子序列进行顺式作用元件分析, 显示其中含有响应不同环境信号或控制组织特异表达的顺式作用元件, 其中与磷营养有关的是 3 个 P1BS 元件。

[0021] 实施例 2 植物表达载体的构建

[0022] 为确定 BnPR2 启动子的表达特性, 构建含有 BnPR2 启动子和报告基因 GUS 的植物表达载体。具体方法是 :

[0023] (1) 选择实施例 1 中启动子序列完全正确的克隆, 在含有 50 μ g/mL 氨苄的 LB 培养基中大量摇菌, 利用道普公司的小量质粒提取试剂盒提取质粒, 具体方法参见道普公司该试剂盒的说明书。随后用限制性内切酶 Sda I 和 Xba I 双酶切含有 BnPR2 启动子的质粒和 pBI121 载体 (华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室代书桃惠赠, 在以前华中农业大学的专利申请中已提及该载体)。酶切体系如下 :含 BnPR2 启动子的质粒或 pBI121 载体 32.4 μ L, 10X Sda I 缓冲液 4.0 μ L, 内切酶 Sda I 1.2 μ L, 内切酶 Xba I 2.4 μ L。限制性内切酶及缓冲液来自 MBI 公司。37 $^{\circ}$ C 酶切 10 小时。酶切产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳, 用手术刀片切下目标条带, 用道普公司的凝胶回收试剂盒予以回收, 具体方法参见道普公司该试剂盒的说明书。

[0024] (2) 连接回收产物, 连接体系如下 :BnPR2 启动子片段 (序列如表 SEQ ID NO :1 所示, 长 1501bp) 8.0 μ L, pBI121 片段 (具有除 CaMV 35S 启动子外的其它所有元件和序列, 长 13923bp) 8.0 μ L, 10X T4 缓冲液 2.0 μ L, T4 连接酶 2.0 μ L。连接酶及缓冲液来自 MBI 公司。混匀连接体系, 4 $^{\circ}$ C 连接 16 小时。

[0025] (3) 将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 中。将转化产物涂布在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 小时。挑单克隆于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养 10 小时。用引物对 PF 和 PR (序列见实施例 1) 来检测菌液。PCR 反应体系为 :菌液 2.0 μ L, ddH₂O 13.9 μ L, 10X PCR 缓冲液 2.0 μ L, dNTP (10mM) 0.4 μ L, 引物

PF(10 μ M)0.8 μ L,引物 PR(10 μ M)0.8 μ L,rTaq(5U/ μ L)0.1 μ L。其中 rTaq 聚合酶,PCR 缓冲液购自宝生物工程大连有限公司,dNTP 购自 Roche 公司。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟;94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟。PCR 产物在 1.0%的琼脂糖凝胶中电泳,片段大小与 BnPR2 启动子相同,且呈单一条带的克隆被认为是阳性克隆。挑选该阳性克隆,摇菌,提质粒,进一步用 Sda I 和 XbaI 双酶切鉴定插入片段大小是否与 BnPR2 启动子符合,结果见图 2。酶切体系及方法同实施例 2 中的步骤 (1)。将构建好的植物表达载体命名为 P_{BnPR2}:GUS。

[0026] 实施例 3 利用植物表达载体 P_{BnPR2}:GUS 转化拟南芥

[0027] (1) 农杆菌感受态的制备:接种农杆菌 GV3101(华中农业大学园艺林学学院张金智惠赠)单菌落于 50mLYEB 培养液中(牛肉浸膏 5.0g/L,胰蛋白胨 5.0g/L,酵母提取物 1.0g/L,蔗糖 5.0g/L,硫酸镁 0.5g/L,用 NaOH 调 pH 至 7.0)。28 $^{\circ}$ C,200 转/分钟振荡培养至 OD₂₆₀ 为 0.5 左右,冰浴 30 分钟。5000 转/分钟离心 5 分钟收集菌体,倒掉上清液,然后用 10mL 0.5mol/L NaCl 悬浮菌体。再次离心,菌体悬浮于 1mL 20mmol/L CaCl₂ 溶液中。取 100 μ L 菌液分装到冰冻的 1.5mL 离心管中,液氮速冻,并保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

[0028] (2) 冻融法转化农杆菌 GV3101:取 1.0 μ g 实施例 2 构建的植物表达载体 P_{BnPR2}:GUS,加入 100 μ L 冰上解冻的感受态农杆菌中,轻轻混合,冰浴 30 分钟。然后在液氮中迅速冻 1 分钟,37 $^{\circ}$ C 水浴融化 5 分钟,冰浴 2 分钟,加入 1mL YEB 培养液(成分同上)。28 $^{\circ}$ C,100 转/分钟摇动培养 3 小时。5000 转/分钟离心 3 分钟,倒去大部分上清液,剩下 100 μ L 左右重悬菌体。涂在含有 50 μ g/mL 利福平和 50 μ g/mL 卡那霉素的 YEB 固体培养基(成分同上,只是按常规计量添加琼脂,其他成分同 YEB 培养液)上,28 $^{\circ}$ C 培养 2 天。挑取单菌落于含有 50 μ g/mL 利福平和 50 μ g/mL 卡那霉素的 YEB 培养液中,28 $^{\circ}$ C,200 转/分钟摇菌。用实施例 1 中的引物对 PF 和 PR 来确定 BnPR2 启动子的存在。PCR 反应条件参见实施例 2 中的步骤 (3)。

[0029] (3) 转化拟南芥。拟南芥的转化采用花序浸润法(floral dip),参照 Clough 和 Bent(Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. The Plant Journal, 1998, 16 :735-743) 报道的方法并略作修改进行。挑取含有 P_{BnPR2}:GUS 重组表达载体的农杆菌单菌落接入 3mL YEB 液体培养基中(含有 50 μ g/mL 利福平和 50 μ g/mL 卡那霉素)。28 $^{\circ}$ C,200 转每分钟摇菌 1 天,再将得到的菌液按 2% (体积比) 接入 150mLYEB 液体培养基(含有 50 μ g/mL 利福平和 50 μ g/mL 卡那霉素)中,28 $^{\circ}$ C,200 转每分钟振摇使农杆菌的浓度达到 OD₆₀₀ 约为 1.8。在 4 $^{\circ}$ C 下 5000g 离心 15 分钟,倒掉上清液,菌体重悬于含有 0.02% Silwet-77(购自 LEHEL SEEDS 公司)的 5%蔗糖溶液中,溶液最终的 OD₆₀₀ 约为 0.8。将生长良好的拟南芥花序浸泡在菌液中 5-10 秒,直立并用黑色塑料袋包裹,保湿 24 小时。除去塑料袋,恢复正常培养植株,约一个月后收获 T1 代种子。

[0030] 实施例 4 转基因拟南芥的筛选与鉴定

[0031] (1) 阳性苗的筛选将收获的 T1 代拟南芥种子用 70% (体积比) 乙醇消毒 1 分钟,50% (体积比) 的 84 消毒液(市售产品)消毒 5 分钟,再用灭菌去离子水清洗 5 次,均匀铺在 0.6%琼脂的 1/2MS 培养基(附加 50mg/L 卡那霉素)上进行筛选。约 10 天可区分出阳性苗(转化苗)和野生型苗(非转化苗)。可见阳性苗根正常生长,叶片呈绿色;而野生

型苗根几乎不能生长,叶片呈黄白色,逐渐死亡。将筛选到的阳性苗移栽到营养土(蛭石和泥炭按体积比 1 : 1 混合而成)中生长。

[0032] (2) 阳性苗的 PCR 鉴定待阳性苗长出数片莲座叶,取其叶片,提取基因组 DNA(方法见 Doyle JJ, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1990, 12 : 13-15)。用实施例 1 中的引物对 PF 和 PR 来确定 BnPR2 启动子的存在(PCR 反应条件参见实施例 2)。利用引物对 GU1F(5' GCGTTTCGATGCGGTCAC 3') 和 GU1R(5' GCGAGGTACGGTAGGAGTTGG 3') 来检测报告基因 GUS 是否存在。PCR 反应体系为:转化苗的 DNA(50ng/ μ L) 2.0 μ L, ddH₂O 13.9 μ L, 10X PCR 缓冲液 2.0 μ L, dNTP(10mM) 0.4 μ L, 引物 GU1F(10 μ M) 0.8 μ L, 引物 GU1R(10 μ M) 0.8 μ L, rTaq(5U/ μ L) 0.1 μ L。其中 rTaq 聚合酶, PCR 缓冲液购自宝生物工程大连有限公司, dNTP 购自 Roche 公司。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟;94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒,60 $^{\circ}$ C 退火 30 秒,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 保温 5 分钟。只有 BnPR2 启动子和报告基因 GUS 都存在的植株才被认为是真正的转基因植株,然后正常培养,至收获 T2 代种子。T2 代种子经过卡那霉素筛选阳性苗和营养土培养(方法同实施例 4),获得 T3 代种子。T3 代种子经过卡那霉素筛选没有分离,全部显绿色的被认为是纯合转基因植株,将用于进一步的 GUS 组织化学分析。

[0033] 实施例 5P_{BnPR2}:GUS 转基因拟南芥的 GUS 组织化学分析

[0034] 将获得的纯合 T3 代转基因拟南芥先在 1/4 营养液中培养 15 天(营养液配方见后)。营养液配方采用改良的 Hoagland 和 Arnon 营养液配方,该营养液(又称标准营养液)的成分及浓度如下:Ca(NO₃)₂ 4.5mM, KNO₃ 4.0mM, KH₂PO₄ 1.0mM, MgSO₄ 2.0mM, H₃BO₃ 46.0 μ M, MnCl₂ 9.0 μ M, CuCl₂ 0.3 μ M, ZnCl₂ 0.8 μ M, Na₂MoO₄ 0.1 μ M 和 EDTA-Fe 50.0 μ M。然后转移到 1/2 的上述标准营养液中培养 10 天。培养期间每 5 天更换一次新鲜标准营养液(成分同上)。随后将一部分植株转移到缺磷,缺氮,缺钾,缺硫或缺铁营养液中培养,另一部分植株仍旧在标准营养液(成分及浓度同上)中培养,作为对照。在缺氮营养液用 4.5mM CaSO₄ 代替 Ca(NO₃)₂,用 2.0mM K₂SO₄ 代替 KNO₃,其它成分及浓度同上;在缺磷营养液用 0.5mM K₂SO₄ 代替 KH₂PO₄,其它成分及浓度同标准营养液;在缺钾营养液用 1.0mM NaH₂PO₄ 代替 KH₂PO₄,用 4.0mM NaNO₃ 代替 KNO₃,其它成分及浓度同标准营养液;在缺硫营养液用 2.0mM MgCl₂ 代替 MgSO₄,其它成分及浓度同标准营养液;在缺铁营养液中直接去掉 EDTA-Fe,其它成分及浓度同标准营养液。每种缺素处理采用 3 个独立的转基因株系,每个株系包括 2 单株。所有植株都生长在温室中,每天 14h 光照 / 10h 黑暗,光强约为 200 μ mol photonsm⁻²s⁻¹,温度为 18-23 $^{\circ}$ C,相对湿度 60-80%。

[0035] 缺素处理 3 天后对植株进行 GUS 染色(按照常用方法)。方法是,首先将植株放入含有 10mL 常用染色液的离心管中,保证整个植株全部浸入溶液中。染色液的成分及浓度如下:1mg/mL 的 X-Gluc(5-溴-4-氯-3-吡啶- β -葡萄糖苷酸),100mmol/L 的磷酸盐缓冲液(0.61 体积的 200mmol/LNa₂HPO₄ 与 0.39 体积的 200mmol/LNaH₂PO₄ 混合而成, pH 7.0), 10mmol/L 的 Na₂EDTA, 0.5mmol/L 的 K₃[Fe(CN)₆] 和 K₄[Fe(CN)₆], 20% 的甲醇, 0.1% 的 Triton X-100。然后 37 $^{\circ}$ C 避光染色 10 小时。染色结束后用 70% (体积比) 乙醇对植株脱色 3 次,再用无水乙醇脱色数次,至叶片绿色褪去。结果显示只有缺磷处理拟南芥呈现蓝色(见图 3, B), 正常培养以及缺氮、缺钾、缺硫和缺铁处理的拟南芥都没有蓝色显现(见图 3 中除图 3, B 外其他图像),结果表明本发明分离克隆的 BnPR2 启动子受缺磷特异性诱导表达。

[0001]

序列表

<110> 华中农业大学
 <120> 一个甘蓝型油菜缺磷诱导表达启动子
 <130>
 <141> 2012-01-06
 <160> 1
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 1501
 <212> DNA
 <213> 甘蓝型油菜 (Brassica napus)
 <220>
 <221> gene
 <222> (1).. (1501)
 <223>
 <220>
 <221> promoter
 <222> (1).. (1459)
 <223>
 <400> 1
 aattttagaa tgttgtgtcg gatataaaat ttgtttcaga ttaatagatt tgaatggctt 60
 ctcgttgagc atctatataa agatgcgaat aaatgcctaa tcgtcttcta caactgagat 120
 atcagctact gatctctagt cttctttaat cttttgccgt aatccttgtg tctattctgc 180
 tatctccatg gcctttaaca ctattcaaag acctccatcc aattaatgta ctgeatattgt 240
 atagagtttt aatttttaat ttttaataga taagataactt atttttaatt tttcgagtat 300
 ttttaatttt agctctcaat attcagttaa attttaagtt tctgaaatag tcaaagaaaa 360
 tatacaagaa attaattagt tataatttcg ttagaataaa ttataaacta taactacatt 420

[0002]

at ttgtatct caagtaataa tcatttataa aattaatgtg tacattcctg ctgaggtagg	480
ttacacatac ctgattaagt atataggecc tgttcggcaa cggaacgctg cgtcagcgac	540
cagcttttaa aatacgcct aat tttacgc ttcttgaagc ttaagtttgt ggcggatatg	600
tcgcagcgac acccgcgttt gattacaaca ctattccgat gatcgtggt tttttcagcg	660
atacaatcaa caccggaaac tcctaataaa ttaaccgcag cgacaccttt tcagttttgc	720
gttctattat ttgcgctcat taacgttcaa tttcagtcgc tcgccgctga cgcagcgaca	780
ccttaaagaa cagggcata ataaaaagta acatgatttg tgtggatgtc agcatatgaa	840
ttagaatata ttttgtgaa aaaggcaatt tgggtaaagc gcatattcca tgggatgatc	900
caaaatgcca agcatattca ggtaagactc cccttgttc catcatcacc tgettccact	960
tccacttaat aattgtttta aattactttc acactctctt tacaccatta atatacttat	1020
ctttttttat cttctgcaaa ttttattgta aaatccttta aagaaattcc cccagagcgt	1080
atatgaatct ttagcctaaa cttgtacagt atagaatttt tcatattggt atgtattgtg	1140
taattcagca tgcgatatct aataaatacg tgtatatgat aacaaagcat aaatcttgca	1200
tagatctata atacggaaag gaatatcctt tgtaaagaac attaacaaac atgaaatata	1260
ttggttcatt gttacaaaaa gttatttcta aacaattaaa aagaattgag aaaaaagtgg	1320
aaagaacact atagcttatg taagatgggt ttttagtgta ttttttaaaa atgtcttcat	1380
gaccatagac aaacaaaaaa acacaaatgc aaagaaaaaa taaaagctat atataacccc	1440
ctagcaagcc tccatggttg aaaccttctc ttaatctggc acaacaccac aaatcaaaag	1500
a	1501

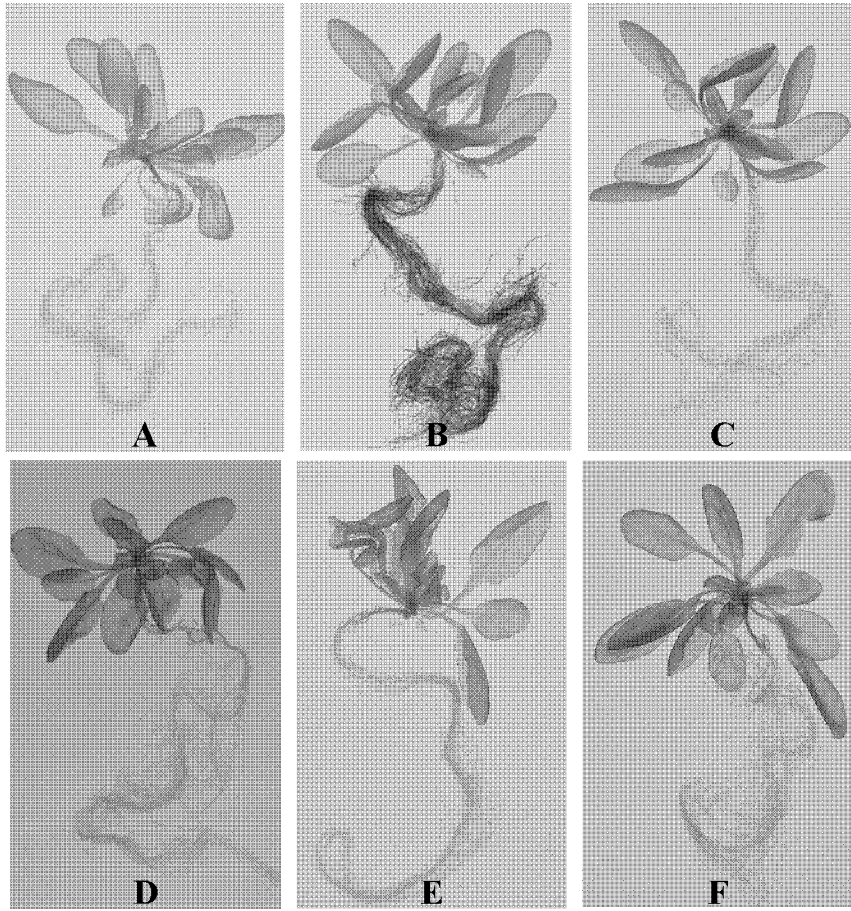


图 3