



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112813074 A

(43) 申请公布日 2021.05.18

(21) 申请号 202110184539.7

(22) 申请日 2021.02.10

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38号

(72) 发明人 张先文 项雅琴 于小星 林朝阳
沈志成

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务所有限公
司 33201

代理人 黄美娟 李世玉

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/46 (2018.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表7页 附图1页

(54) 发明名称

一种特异性调控水稻CYP78A11基因表达的
方法及植物转化载体

(57) 摘要

本发明公开了一种一种特异性调控水稻
CYP78A11基因表达的方法及植物转化载体,所述
方法是通过增强子和启动子共同调控CYP78A11
基因表达,从而提高作物产量;所述增强子核苷
酸序列包括SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示;所
述启动子为CYP78A11基因自身启动子或者具有
相似功能的启动子。本发明提供一种全新的
CYP78A11基因表达调控方法及其在玉米上的应
用,通过在玉米中合适的过表达CYP78A11基因,
提高玉米的株高和生长势,进而提高玉米的生物
量达到5%-50%,并最终实现玉米增产5%-
30%,为提高玉米产量提供了新的思路和方法。

1. 一种特异性调控CYP78A11基因表达的方法,其特征在于所述方法是通过增强子和启动子共同特异性调控CYP78A11基因表达;所述增强子核苷酸序列包括SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示;所述启动子为CYP78A11基因自身启动子或者具有相似功能的启动子。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于所述启动子核苷酸序列为SEQ ID NO:1所示。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于所述CYP78A11基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:2所示。

4. 如权利要求1-3之一所述的方法,其特征在于调控CYP78A11基因表达的方法是将CYP78A11基因核苷酸序列与增强子、启动子和终止子形成功能性连接,构建CYP78A11基因表达框;将CYP78A11基因表达框导入到作物植株中,并获得表达。

5. 如权利要求4所述的方法,其特征在于所述终止子核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

6. 如权利要求4所述的方法,其特征在于所述作物包括玉米、小麦、大麦、高粱、水稻、甘蔗、大豆、胡萝卜、马铃薯、棉花、向日葵、油菜、橡树、草坪草、牧草。

7. 一种用于权利要求1所述CYP78A11基因表达的植物转化载体,其特征在于所述植物转化载体为包含CYP78A11基因表达框的双元载体。

8. 如权利要求7所述的植物转化载体,其特征在于所述双元载体中含有筛选标记基因表达框,所述筛选标记基因表达框由启动子、EPSPS前导肽、筛选标记基因和终止子构建而成。

9. 如权利要求8所述的植物转化载体,其特征在于所述启动子为玉米pUBI启动子,其核苷酸序列如SEQ ID NO:7中1bp-2026bp所示;所述的EPSPS前导肽的核苷酸序列如SEQ ID NO:7中2027bp-2248bp所示;所述的筛选标记基因为g10evo,其核苷酸序列如SEQ ID NO:7中2249bp-3536bp所示;所述的终止子为花椰菜花叶病毒的CaMV 35S终止子,核苷酸序列如pCambia1300载体中2120bp-2310bp所示。

一种特异性调控水稻CYP78A11基因表达的方法及植物转化载体

(一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种特异性调控水稻CYP78A11基因表达的方法,该方法可以应用于提高玉米产量,特别涉及一种利用特异性调控CYP78A11基因表达提高玉米产量的方法,利用该方法可以合理调控玉米的株高、粒重、生长势等产量相关性状,达到增加产量的目的。

(二) 背景技术

[0002] 基因表达的调控对植物的生长发育和农艺性状非常重要。基因其表达量、表达时间及其表达的位置改变都会对植物的生长发育造成影响。而人们可以通过研究来选择某一个功能基因的适合的表达调控方法,达到改良植物性状,提高产量的目的。例如有研究者从16个棉花纤维或胚珠相关启动子中筛选出5个待选启动子,通过构建植物表达载体和后期的性状分析,筛选到启动子FBP7,通过利用FBP7介导IAA合成酶在棉花胚珠中表达,可以使棉花产量提高15%以上(Zhang M et al..(2011)Nat Biotechnol 29,453-458)。

[0003] 植物基因表达调控是一个非常复杂的过程,表达调控的方式也很多,包括转录调控、转录后调控和翻译调控等。启动子是位于结构基因5'端上游的DNA序列,能活化RNA聚合酶,使之与模板DNA准确的结合并具有转录起始的特异性,是调控基因表达的重要元件。Potenza等的综述详细介绍和总结了有关启动子的研究(Potenza et al(2004)In Vitro Cell Dev Biol-Plant,40:1-22)。启动子主要包括组成型表达的启动子、组织特别表达启动子、可以诱导表达的启动子等。组成型启动子,如花椰菜花叶病毒的CaMV 35S启动子(Terada and Shimamoto,(1990)Molecular&General Genetics,220:389-392),水稻的actin 1启动子(Mcelroy et al.,(1990)The Plant Cell,2:163-171);组织特异的启动子,例如STM特异启动子(U.S.Pat.No.5880330),ARSK1根特异表达启动子(United States Patent Application 20040067506),AP1花分生组织启动子(Sasaki,Katsutomo,et al.(2011)Plant biotechnology,28:181-188);诱导型启动子,如RBCS1启动子和拟南芥rd29A启动子(张春晓等.(2004).植物基因启动子研究进展.遗传学报,031(012),1455-1464.)。增强子是调控基因表达的另外一个重要元件。增强子是DNA上一小段可与蛋白质结合的区域,与蛋白质结合之后,基因的转录作用将会加强。但是不同增强子的增强效果也有非常大的差异,从增加几倍到增强几千倍不等。

[0004] CYP78A是P450家族的一个亚族,具有重要的功能(Bak et al.,(2011)The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists,9:e0144)。植物CYP78A基因中,功能研究展开的比较早的是玉米中的CYP78A基因CYP78A1。该基因主要在发育的花序中表达,可能参与脂肪酸的代谢,但由于没有对应的突变体,CYP78A1在玉米中的具体功能尚不清楚(Imaishi et al.(2000)Biosci Biotech Bioch,64:1696-1701)。Kazumaru等的研究表明,水稻中的CYP78A基因CYP78A11具有调控水稻叶原基生长发育和营养生长期长短的功能(Miyoshi,K.et al.(2004)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,101(3),875-880.)。

[0005] 本发明意外发现通过增强子和CYP78A11基因启动子相结合调控CYP78A11基因在

玉米种表达,可以提高玉米生物量、增加玉米粒重和产量。

(三) 发明内容

[0006] 本发明目的是提供一种利用增强子和启动子特异性调控水稻CYP78A11基因表达的方法,进而提高作物产量,特别为用于改良玉米的株形、生长势和提高产量。

[0007] 本发明采用的技术方案是:

[0008] 本发明提供一种特异性调控水稻CYP78A11基因表达的方法,所述方法是通过增强子和启动子共同调控CYP78A11基因表达,从而提高作物产量;所述增强子核苷酸序列包括SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示;所述启动子为CYP78A11基因自身启动子或者具有相似功能的启动子,核苷酸序列优选SEQ ID NO:1所示。

[0009] 本发明提供的CYP78A11基因来源于水稻,但是本领域的一般技术人员可以根据本发明提供的方法和现有技术测定它们是否具有改良玉米株形、生长势和提高产量的功能。这些基因包括与SEQ ID NO:2所示的核苷酸序列的同源性在95%,90%,85%,80%的编码基因。本发明所述CYP78A11基因的多核苷酸序列,本领域的一般技术人员通常可以利用PCR方法、DNA杂交方法等从一种植物中克隆到相应的同源基因。根据本发明提供的多核苷酸序列设计引物,可以通过PCR方法获得同源基因的部分或者全部序列。而一旦获得该基因的部分序列,就可以通过不同的方法克隆到全长基因。另一方面,利用本发明提供的多核苷酸制备探针,可以通过DNA杂交方法从一种植物的DNA文库中克隆获得其同源基因。

[0010] 进一步,优选所述CYP78A11基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:2所示,氨基酸序列为SEQ ID NO:3所示。

[0011] 本发明启动子的区域可以通过试验得到确定。一般启动子可以是编码蛋白质的阅读框5'端外面至少0.25kb、0.5kb、1.0kb、2.0kb或3.0kb的DNA片段。CYP78A11或其同源基因的天然启动子除了可以用来控制其本身基因的表达以外,也可以与其他植物的同源基因功能性地连接,在其他植物中控制这些基因的表达,以获得改良的转基因植物。同时,CYP78A11基因启动子经过人工修饰后,核苷酸同源性在98%,95%,90%,85%以上的具有CYP78A11基因启动子类似表达模式的启动子也可以用于本发明CYP78A11基因的表达调控。

[0012] 本发明提供的增强子还包括其他与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示的增强子增强效果类似的增强子。

[0013] 本发明所述特异性调控水稻CYP78A11基因表达的方法是将CYP78A11基因核苷酸序列与增强子、启动子和终止子形成功能性连接,构建CYP78A11基因表达框;将CYP78A11基因表达框导入到作物(优选玉米)植株中,并获得表达,改良作物的株形、生长势,提高产量。

[0014] 控制基因表达的终止子可以是提供基因的天然终止子,也可以是同种植物的其他基因或者其他植物基因的终止子。常用的终止子包括来源于农杆菌的Octopine合成酶终止子和nopaline合成酶终止子等。参考文献包括:Guerineau et al. (1991) Mol.Gen.Genet., 262:141-144;Proudfoot (1991) Cell, 64:671-674;Sanfacon et al. (1991) Genes Dev., 5:141-149;Mogen et al. (1990) Plant Cell, 2:1261-1272;Munroe et al. (1990) Gene, 91:151-158;Ballas et al. (1989) Nucleic Acids Res., 17:7891-7903;and Joshi et al. (1987) Nucleic Acids Res., 15:9627-9639。优选所述终止子核苷酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0015] 本发明还提供一种用于所述CYP78A11基因表达的植物转化载体,所述植物转化载体是将CYP78A11基因表达框转入双元载体制成,其中双元载体可以通过修改pCambia1300载体获得(NCBI数据库序列号为:AF234296),具体的,通过人工合成包含pZmUBI启动子和g10evo基因的核苷酸序列(如SEQ ID NO:7所示),通过限制性内切酶连接的方法连入酶切后的pCambia1300载体中,获得pCambia1300-pZmUBI-g10evo的双元载体。

[0016] 本发明所述植物转化载体包含CYP78A11基因表达框和筛选标记基因表达框。这个筛选标记基因可以用来选择转化了的细胞,常用的基因包括抗生素抗性基因,如neomycin phosphotransferase II (NEO)和hygromycin phosphotransferase (HPT)、抗除草剂基因,如抗草甘膦基因EPSPS等。其他选择标记基因同样可以用作本发明转化的选择基因。

[0017] 本发明所述的CYP78A11基因表达框是由CYP78A11基因启动子、CYP78A11基因核苷酸序列、CYP78A11基因终止子以及具有增强子效果的DNA片段构成;所述的CYP78A11基因启动子核苷酸序列为SEQ ID NO:1所示,所述的CYP78A11基因核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示,所述的CYP78A11基因终止子序列如SEQ ID NO:6所示,所述的具有增强子效果的DNA片段如SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5所示。

[0018] 本发明所述筛选标记基因表达框由启动子、EPSPS前导肽、筛选标记基因和终止子构建而成。所述的筛选标记基因启动子为玉米pUBI启动子,其核苷酸序列如SEQ ID NO:7中1bp-2026bp所示;所述的EPSPS前导肽的核苷酸序列如SEQ ID NO:7中2027bp-2248bp所示;所述的筛选标记基因为g10evo,其核苷酸序列如SEQ ID NO:7中2249bp-3536bp所示;所述的终止子为花椰菜花叶病毒的CaMV 35S终止子,核苷酸序列如pCambia1300载体(NCBI数据库序列号为:AF234296)中2120bp-2310bp所示。

[0019] 编码本发明CYP78A11蛋白的多核苷酸序列可以有多种不同的变异,多核苷酸序列的变异包括但不限于:1)由于编码同一个氨基酸的密码子不同而获得不同的多核苷酸序列,这些序列编码具有相同活性的蛋白质多肽;2)来源于生物的遗传多态性(Genetic Polymorphism),即同一种植物的不同个体或者群体之间的多样性;3)通过人工操作导入多核苷酸序列的变异。人工导入的这种变异可以是随机的变异,也可以是针对性的定向变异。本领域的一般技术人员就能通过分子生物学的方法产生点突变,插入或者缺失变异等。通过人工操作导入多核苷酸序列的变异也包括通过Gene Shuffling等方法获得仍然具有正常功能的杂合基因。例如U.S.Pat.No.2002/0058249; Stemmer (1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:10747-10751;Stemmer (1994) Nature,370:389-391;Cramer et al. (1997) Nature Biotech.,15:436-438;Moore et al. (1997) J.Mol.Biol.,272:336-347;Zhang et al. (1997) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:4504-4509;Cramer et al. (1998) Nature,391:288-291;and U.S.Pat.NOs.5,605,793and 5,837,458。

[0020] 本发明进一步提供了获得的转CYP78A11基因玉米的鉴定方法,包括观察植株表型、喷洒除草剂、分子生物学方法等,当然,在实际应用中可以多种方法一起使用。由于本发明提供的转CYP78A11玉米植株和对照植株有比较明显的表型差异,可以通过肉眼辨别。转CYP78A11玉米植株表现为株高增加、或生长势增加、或叶片变宽、或生物量增加、或单株产量增加、或同时具备上述两种或两种以上的表型变化。如果标记基因和目的基因紧密连锁,可以用喷洒除草剂的方法来鉴定目的基因。例如,将CYP78A11基因构建在以抗草甘膦基因(EPSPS)为筛选标记的载体上,抗草甘膦的植株很可能就是CYP78A1或其同源基因过表达了

的植株。鉴定转CYP78A11玉米植株还可以用分子生物学方法,这些方法主要包括Southern杂交法和PCR等技术,检测目标基因的DNA;荧光定量PCR或者定量PCR等技术,检测目标基因mRNA的水平;Western杂交法和酶联免疫吸附实验(ELISA)等技术,检测目标基因的蛋白水平。

[0021] 本发明提供的CYP78A11基因的表达调控方法还有其他的实现方法,比如找到这个基因在基因组中的位置,然后通过DNA定点插入技术,将基因表达的调控序列,如CaMV的35S增强子,插入到可以增强本发明基因表达的位点上。一个增强子往往能够影响附近基因的表达,有的增强子可以提高相距20kb或更远的基因的表达。目前植物的DNA定点插入技术已经很成熟(Townsend, Jeffrey A., et al. (2009) *Nature*, 459:442-445; Jiang, W., et al. (2013) *Nat. Biotechnol.*, 31:233-239; Cong, L. et al. (2013) *Science*, 339:819-823)。因此,利用定点插入的方法,将增强子插入CYP78A基因附近就可能提高这个基因的表达。

[0022] 本发明提供的基因可以导入植物从而获得转基因的高产植物,这些植物包括但不限于玉米、小麦、大麦、高粱、水稻、甘蔗、大豆、胡萝卜、马铃薯、棉花、向日葵、油菜、橡树、草坪草、牧草。

[0023] 目前本领域的一般技术人员能够利用现有技术将本发明提供的多核苷酸导入到植物中进行表达。比较常用的方法是基因枪方法(Klein et al, 1987, *Nature (London)*, 327:70-73; U.S. Pat. No. 4,945,050)或农杆菌介导方法((De Blaere et al, 1987, *Meth. Enzymol.*, 143:277)。但是本发明不限于这种方法。

[0024] 不同植物的转化方法和步骤有所不同。通常使用较广的方法是通过农杆菌或基因枪导入植物的未成熟胚、成熟胚、未分化的愈伤组织或原生质体。然后用相应的筛选培养基进行筛选培养。再进行分化而获得转化芽,通过生根培养基培养就可以获得可以种植的转基因苗。进一步,抗除草剂转基因植物可以通过喷施除草剂筛选,例如喷施烟嘧磺隆可以杀灭非转基因的水稻。

[0025] 与现有技术相比,本发明的有益效果主要体现在:本发明提供一种全新的CYP78A11基因特异性表达调控方法及其在玉米上的应用,通过在玉米中合适的过表达CYP78A11基因,提高玉米的株高和生长势,进而提高玉米的生物量达到5%-50%,并最终实现玉米增产5%-30%,为提高玉米产量提供了新的思路和方法。

(四)附图说明

[0026] 图1:植物转化载体1300-pZmUbi-g10evo-p35S-CYP78A11的T-DNA结构示意图。p35S为人工合成的CaMV的35S启动子,CYP78A11为包含CYP78A11基因编码区和终止子的DNA片段,pUBI为人工合成的玉米UBI-1基因的启动子,g10evo为人工合成的EPSPS合成酶基因和pCambia1300载体上的CaMV的35S终止子。

[0027] 图2:植物转化载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11的T-DNA结构示意图。pCYP78A11为通过PCR获得的水稻CYP78A11基因自身的启动子,CYP78A11为包含CYP78A11基因编码区和终止子的DNA片段,pUBI为人工合成的玉米UBI-1基因的启动子,g10evo为人工合成的EPSPS合成酶基因和pCambia1300载体上的CaMV的35S终止子。

[0028] 图3:植物转化载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-p35S或1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-E2的T-DNA结构示意图。pCYP78A11为通过PCR获得的

水稻CYP78A11基因自身的启动子,CYP78A11为包含CYP78A11基因编码区和终止子的DNA片段,pUBI为人工合成的玉米UBI-1基因的启动子,g10evo为人工合成的EPSPS合成酶基因和pCambia1300载体上的CaMV的35S终止子,En为人工合成的增强子。

(五) 具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0030] 本发明以下实施例所使用的分子生物学和生物化学方法均为已知的技术。在Ausubel编写的John Wiley and Sons公司出版的Current Protocols in Molecular Biology和J.Sambrook等编写Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)出版的Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd ED.等文献均有详细的说明。

[0031] 实施例1、水稻CYP78A11基因过量表达载体的构建

[0032] 1、水稻CYP78A11基因片段

[0033] 水稻CYP78A11基因编码区域(核苷酸序列为SEQ ID NO.2所示,氨基酸序列为SEQ ID NO.3所示)和终止子DNA片段(核苷酸序列为SEQ ID NO.6所示)通过PCR获得。PCR的2个引物分别是:CYP78A11-F1(5'-GGATCCAACAATGGCAATGGCCACCGCCAC-3')和CYP78A11-R1(5'-GGTACCCATCTCACAAGCTCACACGGC-3')。

[0034] 以浙江主栽水稻品种秀水134基因组为模板,采用引物CYP78A11-F1和CYP78A11-R1,PCR获得的大约2.2kb的DNA片段克隆到pMD-18-T-Vector载体(TaKaRa)中,测定序列,获得如“5'-SEQ ID NO.2-SEQ ID NO.6-3'”的DNA片段,这个DNA片段除了编码水稻CYP78A11氨基酸的DNA序列(核苷酸序列为SEQ ID NO.2所示)以外,还包含了一个内含子和终止子,终止子核苷酸序列为SEQ ID NO.6所示。PCR的反应体系为:5x PrimeSTAR™ Buffer (Mg²⁺ plus) (购自TaKaRa公司),10μl;dNTP Mixture (各2.5mM),4μl;引物CYP78A11-F1 (10μM),1μl;引物CYP78A11-R1 (10μM),1μl;模板DNA100 ng;PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (2.5U/μl),0.5μl;灭菌蒸馏水,加至最终体积为50μl。PCR的条件为:95℃预变性2min;94℃变性30sec,62℃退火30sec,72℃延伸140sec,32个循环;72℃延伸10min。

[0035] 2、水稻CYP78A11基因的启动子片段

[0036] 水稻CYP78A11基因的启动子片段pCYP78A11通过PCR获得。PCR的2个引物分别是:pCYP78A11-F1(5'-GGTACCGATTAGATAAAGCCACTTCCAC-3')和pCYP78A11-R1(5'-GGATCCAGGTGTTTGTGGTTTGTCTGTG-3')。引物中分别设计了KpnI和BamHI酶切位点。以浙江主栽水稻品种秀水134的基因组CYP78A11基因为模板,PCR获得的大约1.9kb的的DNA片段(即CYP78A11基因的启动子片段pCYP78A11)克隆到pMD-18-T-Vector载体(TaKaRa)中,测定序列,获得如SEQ ID NO.1所示的启动子序列。PCR的反应体系为:5x PrimeSTAR™ Buffer (Mg²⁺ plus) (购自TaKaRa公司),10μl;dNTP Mixture (各2.5mM),4μl;引物pCYP78A11-F1 (10μM),1μl;引物pCYP78A11-R1 (10μM),1μl;模板DNA100 ng;PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase (2.5U/μl),0.5μl;灭菌蒸馏水,加至最终体积为50μl。PCR的条件为:95℃预变性2min;94℃变性30sec,62℃退火30sec,72℃延伸2min,32个循环;72℃延伸10min。

[0037] 3、人工合成增强子E2

[0038] 人工合成含有增强子的p35S启动子,序列如SEQ ID NO:4所示,人工合成增强子

E2,序列如SEQ ID NO:5所示。

[0039] 4、双元载体

[0040] 为了获得含有耐草甘膦基因g10evo作为筛选标记的双元载体,人工合成含有玉米UBI-1启动子pUBI、水稻EPSPS前导肽序列和g10evo基因的DNA序列pUBI-g10evo,如SEQ ID NO:7所示。利用KpnI和XhoI酶切双元载体pCambia1300,回收酶切后的载体;利用KpnI和XhoI对合成片段pUBI-g10evo进行双酶切,分别回收酶切后的片段;将上述回收后的2个片段进行连接后获得双元载体1300-pZmUbi-g10evo。

[0041] 5、载体1300-pZmUbi-g10evo-p35S-CYP78A11载体的构建

[0042] 利用HindIII和KpnI对载体1300-pZmUbi-g10evo进行双酶切,回收载体;利用HindIII和BamHI对人工合成的p35S启动子片段(如SEQ ID NO:4所示)进行双酶切,回收启动子片段;利用BamHI和KpnI对PCR获得的水稻CYP78A11基因和终止子片段(如“5'-SEQ ID NO.2-SEQ ID NO.6-3'”所示)进行双酶切,回收该片段;将上述3个酶切片段进行三段连接后获得终载体1300-pZmUbi-g10evo-p35S-CYP78A11,载体T-DNA结构示意图如图1。

[0043] 6、载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11载体的构建

[0044] 利用KpnI对载体1300-pZmUbi-g10evo进行单酶切,并用FastAP对酶切载体进行去磷酸化(防止自连),之后回收酶切载体回收载体;利用KpnI和BamHI对PCR获得的水稻CYP78A11基因的启动子(如SEQ ID NO:1所示)片段进行双酶切,回收启动子片段;利用BamHI和KpnI对PCR获得的水稻CYP78A11基因和终止子片段(如“5'-SEQ ID NO.2-SEQ ID NO.6-3'”所示)进行双酶切,回收该片段;将上述3个酶切片段进行三段连接后获得终载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11,载体T-DNA结构示意图如图1。

[0045] 7、载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-p35S载体的构建

[0046] 用SacI对载体1300-pZmUbi-g10evo进行单酶切,并用FastAP对酶切载体进行去磷酸化,防止自连,之后回收酶切载体;用SacI对人工合成的p35S启动子(如SEQ ID NO:4所示)进行酶切后回收酶切片段,将上述载体和片段连接后,筛选到载体结构如1300-p35S-pZmUbi-g10evo的过渡载体。利用KpnI对过渡载体1300-p35S-pZmUbi-g10evo进行单酶切,并用FastAP对酶切载体进行去磷酸化(防止自连),之后回收酶切载体回收载体;利用KpnI对载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11进行单酶切,回收包含CYP78A11启动子,编码区和终止子的pCYP78A11-CYP78A11片段;将上述2个片段进行连接后获得终载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-p35S,载体T-DNA结构示意图如图3。

[0047] 8、载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-E2载体的构建

[0048] 用SacI对载体1300-pZmUbi-g10evo进行单酶切,并用FastAP对酶切载体进行去磷酸化,防止自连,之后回收酶切载体;用SacI对人工合成的E2(如SEQ ID NO:5所示)进行酶切后回收酶切片段,将上述载体和片段连接后,筛选到载体结构如1300-E2-pZmUbi-g10evo的过渡载体。利用KpnI对过渡载体1300-E2-pZmUbi-g10evo进行单酶切,并用FastAP对酶切载体进行去磷酸化(防止自连),之后回收酶切载体回收载体;利用KpnI对载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11进行单酶切,回收包含CYP78A11启动子,编码区和终止子的pCYP78A11-CYP78A11片段;将上述2个片段进行连接后获得终载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-E2,载体T-DNA结构示意图如图3。

[0049] 最后,通过电转的方法把上述4个T-DNA质粒分别转入农杆菌LB4404中,通过含有

15 μ g/ml四环素和50 μ g/mL的卡那霉素的YEP固体培养基筛选出阳性克隆,并保菌,用于接下来的植物转化。

[0050] 实施例2、玉米转化

[0051] 玉米的转化方法已经比较成熟,例如Frame等描述了利用农杆菌转化玉米的方法(Frame et al., (2002) Plant Physiol, 129:13-22)。分别取含载体1300-pZmUbi-g10evo-p35S-CYP78A11、

[0052] 1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11、1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-p35S和1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-E2的农杆菌(即含T-DNA载体的农杆菌)划线,挑单菌落接种,准备转化用农杆菌。

[0053] 取授粉后8-10天的Hi-II玉米穗。收集所有的未成熟胚(大小为1.0-1.5mm)。将含有T-DNA载体的农杆菌与未成熟胚共培养2-3天(22 $^{\circ}$ C)。转移未成熟胚到愈伤诱导培养基上(培养基中含有200mg/L的Timentin,用于杀灭农杆菌,参照(Frame et al., (2002) Plant Physiol, 129:13-22)), 28 $^{\circ}$ C暗培养10-14天。将所有的愈伤转到带有终浓度2mM草甘膦的筛选培养基上(Frame et al., (2002) Plant Physiol, 129:13-22), 28 $^{\circ}$ C暗培养2-3周。

[0054] 转移所有的组织到新鲜含终浓度2mM草甘膦的筛选培养基上, 28 $^{\circ}$ C暗培养2-3周。然后,转移所有筛选后成活的胚性组织到再生培养基上(Frame et al., (2002) Plant Physiol, 129:13-22), 28 $^{\circ}$ C暗培养10-14天,每皿一个株系。转移胚性组织到新鲜的再生培养基上, 26 $^{\circ}$ C光照培养10-14天。转移所有发育完全的植株到生根培养基上(Frame et al., (2002) Plant Physiol, 129:13-22), 26 $^{\circ}$ C光照培养直到根发育完全,然后移植到温室中单株培养,检测转基因玉米的抗除草剂能力。用稀释300倍的孟山都的41%的草甘膦水剂喷洒,7天后叶片发黄,枯死的为阴性;和喷清水对照长势一样的为阳性植株。

[0055] 实施例3、载体1300-pZmUbi-g10evo-p35S-CYP78A11转基因玉米与非转基因对照相比株高和叶片宽度显著增加,但是单株产量没有显著增加。

[0056] 为了研究在玉米中过表达水稻CYP78A11基因对玉米的生长发育的影响,通过实施例1的方法构建了用组成型启动子p35S介导CYP78A11基因表达的载体1300-pZmUbi-g10evo-p35S-CYP78A11,并通过实施例2的方法获得了该载体的转基因玉米品系34个(命名为TS)。将T0代植株移栽到温室中,对成熟期的含转基因玉米植株和非转基因对照植株的生长势和株高进行比较分析。我们获得的34个CYP78A1过表达植株中有21个植株生长势和对照相比显著增强,株高和对照相比显著增加,叶片显著变宽。其中两个典型品系成熟期的株高、叶片宽度和单株产量如表1。

[0057] 表1:

品系	株高 (cm)	叶片宽度 (cm)	单株产量 (g)
CK	214.6 \pm 8.7	15.1 \pm 3.9	132 \pm 2.3
TS5	267.4 \pm 9.9	23.7 \pm 5.5	135 \pm 2.8
TS7	272.1 \pm 9.5	25.1 \pm 6.2	133 \pm 2.9

[0059] *CK为非转基因对照玉米植株,为转基因受体玉米;TS为载体1300-pZmUbi-g10evo-p35S-CYP78A11的T-DNA转化植株,其中TS后面的编号(5,7)是对不同品系随机编号,以便于区分不同的转化事件。

[0060] 从表1可以看出,转基因玉米植株与非转基因对照相比株高和叶片宽度都显著增

加,株高增加最多打26.8%,叶片宽度增加最多达66%,但是单株产量却没有显著差异。我们分析可能是由于我们使用的组成型启动子,使得CYP78A11过表达的幅度太大,表达的时间、空间、量都不合适,从而导致了生物量显著增加,但是玉米产量没有增加的结果。因此,我们考虑能否通过其他基因表达调控方式来调控CYP78A11基因的表达水平来改良玉米。

[0061] 实施例4.载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11转基因玉米在株高、叶宽和单株产量等性状上与非转基因对照没有显著差异。

[0062] 由于利用组成型启动子p35S介导水稻CYP78A11基因在玉米中表达可以显著提高玉米生物量、叶片宽度,但是没有显著提高玉米产量,为了优化CYP78A11基因的表达调控方式,我们通过实施例1的方法构建了利用CYP78A11基因自身启动子介导CYP78A11基因过表达的表达载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11,并通过实施例2的方法获得了该载体的转基因玉米品系45个(命名为TC)。将T0代植株移栽到温室中,对成熟期的含转基因玉米植株和非转基因对照植株的生长势和株高进行比较分析。我们获得的45个CYP78A11过表达植株生长势、株高、叶片宽度和单株产量与非转基因对照相比没有显著差异。其中两个典型品系成熟期的株高、叶片宽度和单株产量如表2。

[0063] 表2:

品系	株高 (cm)	叶片宽度 (cm)	单株产量 (g)
CK	214.6±8.7	15.1±3.9	132±2.3
TC12	216.1±9.1	16.4±4.3	131±2.5
TC23	219.7±9.2	15.7±3.8	135±2.8

[0065] *CK为非转基因对照玉米植株,为转基因受体玉米;TC为载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11的T-DNA转化植株,其中TS后面的编号(12,23)是对不同品系随机编号,以便于区分不同的转化事件。

[0066] 从表2可以看出,转基因玉米植株与非转基因对照相比株高、叶片宽度和单株产量都没有显著差异。我们分析可能是由于我们使用的CYP78A11自身的启动子pCYP78A11,过表达的幅度太小,以至于还不能促使转基因玉米植株在生物量、株高和单株产量等性状上发生改变。因此,我们考虑能否通过更合适的基因表达调控方式来调控CYP78A11基因的表达水平来改良玉米。

[0067] 实施例5.载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-p35S和1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-E2转基因玉米与对照相比,单株产量显著增加。

[0068] 由于利用组成型启动子p35S或CYP78A11自身的组织特异性启动子pCYP78A11介导水稻CYP78A11基因在玉米中表达都没能显著提高转基因玉米植株的单株产量,为了优化CYP78A11基因的表达调控方式,我们通过实施例1的方法构建了利用CYP78A11基因自身启动子和增强子共同介导CYP78A11基因过表达的表达载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-p35S和1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-E2,并通过实施例2的方法分别获得了上述载体的转基因玉米品系31个(命名为TE1)和37个(命名为TE2)。将T0代植株移栽到温室中,对成熟期的含转基因玉米植株和非转基因对照植株的生长势和株高进行比较分析。我们获得的31个TE1植株中,有18个植株在生长势、株高、叶片宽度和单株产量与非转基因对照相比有显著差异;获得的37个TE2植株中,有22个植株在生长势、株高、叶片宽度和单株产量与非转基因对照相比有显著差异。其中四个典型品系成熟期的株高、叶片宽度和

单株产量如表3。

[0069] 表3:

[0070]

品系	株高 (cm)	叶片宽度 (cm)	单株产量 (g)
CK	214.6±8.7	15.1±3.9	132±2.3
TE1-9	234.1±9.0	19.3±4.1	143±2.9
TE1-18	242.1±9.2	18.6±4.2	141±2.5
TE2-22	239.4±8.9	19.2±4.3	148±2.9
TE2-31	234.9±9.1	19.5±4.5	141±2.7

[0071] *CK为非转基因对照玉米植株,为转基因受体玉米;TE1为载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-p35S的T-DNA转化植株,其中TE1后面的编号(9,18)是对不同品系随机编号,以便于区分不同的转化事件;TE2为载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-E2的T-DNA转化植株,其中TE2后面的编号(22,31)是对不同品系随机编号,以便于区分不同的转化事件。

[0072] 从表3可以看出,转基因玉米植株与非转基因对照相比株高、叶片宽度和单株产量都有显著差异。载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-p35S转基因玉米与对照相比株高最多增加达12.8%,叶宽增加最多达27.8%,单株产量增加最多达8.3%;载体1300-pZmUbi-g10evo-pCYP78A11-CYP78A11-E2转基因玉米与对照相比株高最多增加达9.1%,叶宽增加最多达29.1%,单株产量增加最多达12.1%。因此,我们认为通过本发明的启动子和增强子联合调控CYP78A11基因表达的方法可以用于改良玉米产量相关性状,进而提高玉米单株产量。

序列表

<110> 浙江大学

<120> 一种特异性调控水稻CYP78A11基因表达的方法及植物转化载体

<160> 7

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1936

<212> DNA

<213> 未知(Unknown)

<400> 1

```

ggtagcgatt agataaagcc acttccacga caggccttct cctgtaacca aatatgaggt 60
cttgcgagac gggttgctct aacctatcac acgtgaccgc tcaccacaat atctagtttt 120
atagtagtag gcgtctttct cgaacaacgc ggggtaaacg tttaaaataa ccctataatt 180
atagtccgta cgtatatttt ttgagatccg agcaatgagt aaaagtttta aatacttagc 240
tacaatataa cgttcaccag taaaattaca ccaacatgta atcaaacac aaagcaaaat 300
gtggtcagat taaatcaggt gagtattatc ggtggcccga gtaacgcaag tagggcgtgg 360
ggagctatcc agacaagcaa acaaacact atattgggtcc cggcttaaaa catgtagggt 420
aggcaagtgt actctctctg ttctctcgag tagcaatcaa agctaact tgttctctct 480
taatgttttt tttcttgaca ttaatcctac ctagtatatt ttaaataaaa tgatgagatt 540
ggtttttaac catttgtttt tctcaaaaaa tagtgtatat ataaataata tataaaaatc 600
acttcggtag aaaccattta atagaagaag cttaagaaa aaacaagtaa acatattttt 660
aaaattttat aataattaat actccctccg tttttaata gatgacgcca ttgacttttt 720
ctcacatatt tgaccattcg tcttattaga aaaatttaca taattacaat ttattttggt 780
atgagttggt ttatcactca tagtacttta agtgtgattt atatcatata tatttgcata 840
aaatttttga ataagacgaa tggtaacaca tgtgacaaaa agtcaacggc gttatctatt 900
aaaaaacgga gtagtaatt aattaatcat aaacaaatgt cttatctcgt tttactttca 960
acggagcgga gttaccacac gtccacccc aaaacgaact ctgcctaat gtagtactac 1020
ctccattata aaatataagc atttttgtc tagatttaa gctaaaaatg cttatatttt 1080
tgggacggag ggagtatata gcaactatagg cctatttaga tcctagtaa aattttacac 1140
cctgtcacat cgagtgtttg gacacaaaca taaagtatta aatataaaaa aataactaat 1200
tatacagatt gcgtgtaaat tgcgagacaa atcttttaag cctaattaca tcatgatttg 1260
acaatgttgt gctacagtaa acatttacta ataataagatt aattaggctt aataaattta 1320
tctcgcggtt tacaggtgga ttctgtaatt tattttgta ttagactata tttaatattt 1380
caaatgtgtg cctgtatata tgatgtggca cgcaaaaact ttacacttct ggatctaaat 1440
acaagtcgaa aatgatgaa taattatata ccgttgtttt caaatgtta aatggtatat 1500
tactactccc tccgtactcg taaagtaagt tgttttgac agcgacatgg tctctaaaat 1560
acaactttga cttcttattt ctataaaaat atttaataaa aagtgatata tgtatatttt 1620
tatgaaagta tttttcaaga caaatctatt catataattt tacattttca aattcaacaa 1680

```

cttgagagtg atttatgatt tatatttgta aagtttgatt taaacattat acgaaacaac 1740
 tttctttacg agtagtacgg agggagtaca cgtgacatat ccacattttc atcatccttt 1800
 tatttttaggc cattctggtc acccctataa ataccacctc cacccaatcc ttcccacccc 1860
 acttcatcac aagccaaaca gcccaactcc cgagctcgag ccacacaagc aaaaccacaa 1920
 acacctggat ccaaca 1936
 <210> 2
 <211> 1754
 <212> DNA
 <213> 未知(Unknown)
 <400> 2
 atggcaatgg ccaccgccac cgctctctcc tgcgtcgacg ccacgtggtg ggcgtacgcc 60
 ctcccggcgc tctcggcgc cgacacctc tgcgccacc cggcgtgct cgccggcgc 120
 gtctctctgg ccttcgccac cgcccggtg ctgcctggg ccgctcccc cggcgggccc 180
 gcgtggggcgc acggccgcgg ccgctcggc gcgacgccc tcgaggggccc ccgggggctc 240
 cccgtgttcg gcagcatctt cgcgtctctc cggggcctcc cgcaccgcgc gctcgacgcg 300
 atgtcgcgcg acgcccggc gccacgggcg agggagctca tggcgttctc cgtcggggag 360
 acgccggcgg tgggtcgtc gtgccggcg acggcgaggg aggtgctcgc gcacctcgcg 420
 ttgccgacc gcccgctgaa gcgctcggcg cgggagctgc tgttcgcgcg cgccatcggg 480
 ttgccccca gcggcgagta ctggcgctc ctccgccga tcgctccac ccacctctc 540
 tcccctcgc gcgtcggc gcacgagccg gggcgccagg ccgacgccac ggcgatgctg 600
 tccgcatgg ccgcccagca gtccgccacc ggcgccgctc tgcctccc ccacctccag 660
 gccgccgcgc tcaacaacat catgggcagc gtgttcggcc ggcgctacga cgtctctctc 720
 tctccggcgc ccgcccga cgaggccgag cagctcaaga gcatggtgcg cgaggggttc 780
 gagctcctcg gcgcgttaa ctggtccgac cacctccat ggctgccc cctctacgac 840
 cccaaccacg tcgcccgcg ctgcgccgc ctgctcccc gcgtccaggc gttcgtccgc 900
 ggcgtcatcc gcgaccacc cctccgccg gactctctct ccaccgccgc cgacaatgcc 960
 gacttcgctc acgtctctct ctccctcgag gccacgaga acctcgcca ggacgacatg 1020
 gtcgccgtcc tctgggtaaa aaaaaaaaa aaaaaacaaa ttctactcaa acatttcaa 1080
 ctcaaatgtt tttttaaaaa tgtttttgtg tattttggca ggagatgata tttcgtggga 1140
 cggacacgac ggcgttggg acggagtggg gcatggcgga ggtggtgagg aaccggcgcg 1200
 tgcaggcgag gctgagggcg gaggtggac cggcgggtgg cggcgacggg tgtcccagcg 1260
 acggcgacgt ggcgcggat ccgtacctgc aggcgggtgg gaaggagacg ctgagggcgc 1320
 acccgccggg gccgctgctg agctgggcgc ggctggccac cgccgacgtg gggctcgcca 1380
 acggcatggt ggtgccggcg ggcacgacgg cgatggtgaa catgtgggccc atcaccacg 1440
 acggcgaggt gtgggccgac ccggaggcgt tcgcccga gcggttcac ccgtcggagg 1500
 gcggcgccga cgtcgacgtc cgcggcggcg acctccgctt ggcgccgttc ggcgccgggc 1560
 gccgcgtctg ccccggcaag aacctcgcc tcgccacct caccctctgg gtcgccgcc 1620
 tcgtccacgc cttcgactgg ttctcccc acggtcgcg gccggtgtcc ctcgacgagg 1680
 tctcaagct ctccctcgag atgaagacc ctctcgcgc cgccgccacc ccccgccgc 1740

```

gccgcgccgc ctga 1754
<210> 3
<211> 555
<212> PRT
<213> 未知(Unknown)
<400> 3
Met Ala Met Ala Thr Ala Thr Ala Ser Ser Cys Val Asp Ala Thr Trp
1           5           10           15
Trp Ala Tyr Ala Leu Pro Ala Leu Leu Gly Ala Asp Thr Leu Cys Ala
          20           25           30
His Pro Ala Leu Leu Ala Gly Ala Val Leu Leu Ala Phe Ala Thr Ala
          35           40           45
Ala Val Leu Ala Trp Ala Ala Ser Pro Gly Gly Pro Ala Trp Ala His
          50           55           60
Gly Arg Gly Arg Leu Gly Ala Thr Pro Ile Glu Gly Pro Arg Gly Leu
65           70           75           80
Pro Val Phe Gly Ser Ile Phe Ala Leu Ser Arg Gly Leu Pro His Arg
          85           90           95
Ala Leu Asp Ala Met Ser Arg Asp Ala Ala Ala Pro Arg Ala Arg Glu
          100          105          110
Leu Met Ala Phe Ser Val Gly Glu Thr Pro Ala Val Val Ser Ser Cys
          115          120          125
Pro Ala Thr Ala Arg Glu Val Leu Ala His Pro Ser Phe Ala Asp Arg
          130          135          140
Pro Leu Lys Arg Ser Ala Arg Glu Leu Leu Phe Ala Arg Ala Ile Gly
145          150          155          160
Phe Ala Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Arg Leu Leu Arg Arg Ile Ala Ser
          165          170          175
Thr His Leu Phe Ser Pro Arg Arg Val Ala Ala His Glu Pro Gly Arg
          180          185          190
Gln Ala Asp Ala Thr Ala Met Leu Ser Ala Met Ala Ala Glu Gln Ser
          195          200          205
Ala Thr Gly Ala Val Val Leu Arg Pro His Leu Gln Ala Ala Ala Leu
          210          215          220
Asn Asn Ile Met Gly Ser Val Phe Gly Arg Arg Tyr Asp Val Ser Ser
225          230          235          240
Ser Ser Gly Ala Ala Ala Asp Glu Ala Glu Gln Leu Lys Ser Met Val
          245          250          255
Arg Glu Gly Phe Glu Leu Leu Gly Ala Phe Asn Trp Ser Asp His Leu

```

260	265	270
Pro Trp Leu Ala His Leu Tyr Asp	Pro Asn His Val Ala Arg Arg Cys	
275	280	285
Ala Ala Leu Val Pro Arg Val Gln Ala Phe Val Arg Gly Val Ile Arg		
290	295	300
Asp His Arg Leu Arg Arg Asp Ser Ser Ser Thr Ala Ala Asp Asn Ala		
305	310	315
Asp Phe Val Asp Val Leu Leu Ser Leu Glu Ala His Glu Asn Leu Ala		
325	330	335
Glu Asp Asp Met Val Ala Val Leu Trp Glu Met Ile Phe Arg Gly Thr		
340	345	350
Asp Thr Thr Ala Leu Val Thr Glu Trp Cys Met Ala Glu Val Val Arg		
355	360	365
Asn Pro Ala Val Gln Ala Arg Leu Arg Ala Glu Val Asp Ala Ala Val		
370	375	380
Gly Gly Asp Gly Cys Pro Ser Asp Gly Asp Val Ala Arg Met Pro Tyr		
385	390	395
Leu Gln Ala Val Val Lys Glu Thr Leu Arg Ala His Pro Pro Gly Pro		
405	410	415
Leu Leu Ser Trp Ala Arg Leu Ala Thr Ala Asp Val Gly Leu Ala Asn		
420	425	430
Gly Met Val Val Pro Ala Gly Thr Thr Ala Met Val Asn Met Trp Ala		
435	440	445
Ile Thr His Asp Gly Glu Val Trp Ala Asp Pro Glu Ala Phe Ala Pro		
450	455	460
Glu Arg Phe Ile Pro Ser Glu Gly Gly Ala Asp Val Asp Val Arg Gly		
465	470	475
Gly Asp Leu Arg Leu Ala Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Val Cys Pro		
485	490	495
Gly Lys Asn Leu Gly Leu Ala Thr Val Thr Leu Trp Val Ala Arg Leu		
500	505	510
Val His Ala Phe Asp Trp Phe Leu Pro Asp Gly Ser Pro Pro Val Ser		
515	520	525
Leu Asp Glu Val Leu Lys Leu Ser Leu Glu Met Lys Thr Pro Leu Ala		
530	535	540
Ala Ala Ala Thr Pro Arg Arg Arg Arg Ala Ala		
545	550	555
<210> 4		
<211> 805		

<212> DNA

<213> 未知 (Unknown)

<400> 4

```

aatcttgagc tcatggtgga gcacgacact ctcgtctact ccaagaatat caaagataca 60
gtctcagaag accaaagggc tattgagact tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc 120
ctcggattcc attgcccagc tatctgtcac ttcatcaaaa ggacagtaga aaaggaaggt 180
ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta tcgttcaaga tgcctctgcc 240
gacagtggtc ccaaagatgg acccccacc acgaggagca tcgtggaaaa agaagacgtt 300
ccaaccacgt cttcaaagca agtggattga tgtgataaca tggaggagca cgacactctc 360
gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc aaagggtat tgagactttt 420
caacaaaagg taatatcggg aaacctctc ggattccatt gccagctat ctgtcacttc 480
atcaaaaagga cagtagaaaa ggaaggtggc acctacaaat gccatcattg cgataaagga 540
aaggctatcg ttcaagatgc ctctgccgac agtgggtccca aagatggacc cccaccacg 600
aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt ggattgatgt 660
gatatactcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact atccttcgca agaccttct 720
ctatataagg aagttcattt catttggaga ggacacgctg aatcaccag tctctctcta 780
caaatctatc tctggatccg agctc 805

```

<210> 5

<211> 341

<212> DNA

<213> 未知 (Unknown)

<400> 5

```

gagctccatg gtggagcacg acactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc 60
agaagaccaa agggctattg agacttttca acaaaggta atategggaa acctcctcgg 120
attccattgc ccagctatct gtcacttcat caaaaggaca gtagaaaagg aaggtggcac 180
ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcgtt caagatgcct ctgccgacag 240
tggtcccaaaa gatggacccc caccacgag gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac 300
cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga taacagagct c 341

```

<210> 6

<211> 429

<212> DNA

<213> 未知 (Unknown)

<400> 6

```

tctcgccgac cacgtcttac ctacgetaat taagcttcgt tttagtctcg tcttctctct 60
tgagcttgca agagactagg gtttgatgac gtcacccgat gatcgtgctt agttccaatt 120
ttggcagctg cgtgtgtgga gctaagccac gaacagatat ataattaatc tcatatatat 180
atatgtagat gattaattat gtatgtatgt atgaatgaat gtaattaggg cttgatttgt 240
gtgacgaaca tgtcgcgctc tcacatcttt gataaatggc tggctgtagc tagctacctc 300
gccccccatt atatttgtac cagttgatgt aacgtgacgt aacgtaatgt aatgtaatgt 360

```


aatgtaatgt aatgtttgat catggattaa ttaattatta ctaatcatgc cgtgtgagct 420
tgtgagatg 429
<210> 7
<211> 3571
<212> DNA
<213> 未知(Unknown)
<400> 7
ggtagcagc tcgcatgcct acagtgcagc gtgacccggt cgtgccccctc tctagagata 60
atgagcattg catgtctaag ttataaaaaa ttaccacata tttttttgt cacacttggt 120
tgaagtgcag tttatctatc tttatacata tatttaaact ttactctacg aataatataa 180
tctatagtac tacaataata tcagtgtttt agagaatcat ataaatgaac agttagacat 240
ggctaaaagg acaattgagt attttgacaa caggactcta cagttttatc tttttagtgt 300
gcatgtgttc tccttttttt ttgcaaatag cttcacctat ataatacttc atccatttta 360
ttagtacatc catttagggt ttagggttaa tggttttat agactaattt ttttagtaca 420
tctattttat tctattttag cctctaaatt aagaaaacta aaactctatt ttagtttttt 480
tatttaataa tttagatata aaatagaata aaataaagtg actaaaaatt aaacaaatac 540
cctttaagaa attaaaaaaa ctaaggaaac atttttcttg tttcgagtag ataatgccag 600
cctgttaaac gccgtcgacg agtctaacgg acaccaacca gcgaaccagc agcgtcgcgt 660
cgggccaagc gaagcagacg gcacggcatc tctgtcgtg cctctggacc cctctcgaga 720
gttccgctcc accgttgac ttgctccgct gtcggcatcc agaaattgcg tggcggagcg 780
gcagacgtga gccggcacgg caggcggcct cctcctctc tcacggcacg gcagctacgg 840
gggattcctt tcccaccgct ccttcgctt ccttcctcg cccgccgtaa taaatagaca 900
ccccctccac accctcttc cccaacctcg tgtgttcgg agcgcacaca cacacaacca 960
gatctcccc aaatccacc gtcggcacct ccgcttcaag gtacgccgct cgtcctcccc 1020
ccccccccct ctctacctc tctagatcgg cgttccggtc catggttagg gcccggtagt 1080
tctacttctg ttcatgtttg tgtagatcc gtgtttgtg tagatccgtg ctgctagcgt 1140
tcgtacacgg atgcgacctg tacgtcagac acgttctgat tgctaacttg ccagtgtttc 1200
tctttgggga atcctgggat ggctctagcc gttccgcaga cgggatcgat ttcatgattt 1260
tttttgtttc gttgcatagg gtttggtttg ccttttctt ttatttcaat atatgccgtg 1320
cacttgtttg tcgggtcatc ttttcatgct ttttttgtc ttggttgatga tgatgtggtc 1380
tggttgggcg gtcgttctag atcggagtag aattctgttt caaactacct ggtggattta 1440
ttaatttttg atctgtatgt gtgtgccata catattcata gttacgaatt gaagatgatg 1500
gatggaaaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgc gggttttact gatgcatata 1560
cagagatgct tttgttcgc ttggttgatga tgatgtggtg tggttgggcg gtcgttcatt 1620
cgttctagat cggagtagaa tactgtttca aactacctgg tgtatttatt aattttggaa 1680
ctgtatgtgt gtgtcataca tcttcatagt tacgagttta agatggatgg aaatatcgat 1740
ctaggatagg tatacatggt gatgtgggtt ttactgatgc atatacatga tggcatatgc 1800
agcatctatt catatgctct aaccttgagt acctatctat tataataaac aagtatgttt 1860
tataattatt ttgatcttga tatacttggga tgatggcata tgcagcagct atatgtggat 1920

tttttagcc ctgccttcat acgctattta tttgcttggc actgtttctt ttgtcgaatg 1980
tcaccctggt gtttgggtgtt acttctgcag gtcgactcta gaaacaatgg cggcgaccat 2040
ggcgtccaac gctgcggctg cggctgcggt gtccctggac caggccgtgg ctgcgtcggc 2100
agcgttctcg tcgcggaagc agctgcggct gcctgccgca gcgcgcggag ggatgcgggt 2160
gcgggtgcgg gcgcggggtc ggcgggaggc ggtggtgggt gcgtccgctg cgtcgtcgtc 2220
ggtggcagcg ccggcggcga aggctgagat gtccgacgcc ctgcccacca ccttcgacgt 2280
gatcgtgcat ccagctcgcg aactccgctg cgagcttcgc gctcagccat ccaagaacta 2340
caccactcgc tacctcctcg ccgctgcctt cgctgagggc gagaccgctg tggtagggct 2400
ggctacctct gaggacgccc aggccatgct ccgctgcctc cgcgactggg gcgctggcgt 2460
ggagcttgtg ggcgatgacg ccgtgatccg cggtttcggc gctcgcaccac aggccggtgt 2520
gacctcaac ccaggcaacg ctgccgctg ggcccgcctc ctcatggggc tggccgctct 2580
cacctctggc accactttcg tgaccgaacta cccgactcc ctcggcaagc gccctcaggg 2640
cgacctcctt gaggccctcg aacgcctcgg tgctgggtg tctccaacg acggctcctt 2700
cccgatctcc gtgtccggcc cagtgcgcgg tggcaccgtg gaggtgtccg ccgagcctc 2760
ctcccagtac gcctccgccc tcatgttctt cggcctctc ctcccggacg gactcgaact 2820
ccgcctcacc ggcgacatca agtcccacgc tccgctccgc cagacactcg acacctctc 2880
tgacttcggc gtgcgcgcca ctgcctccga cgacctccg cgcacttcca tcccgggtgg 2940
ccagaagtac cggccaggcc gcgtgctcgt gccgggcgac taccgggct ccgctgccat 3000
cctcaccgcc gctgccctc tcccaggcga ggtgcgcctc tetaacctc gcgagcacga 3060
cctccagggc gagaaggagg ccgtgaacgt gctccgcgag atgggcgctg acatcgtgcg 3120
cgagggcgat acctcaccg tgcgcgggtg ccgcccctc cagccctga ctcgcgacgg 3180
cgattccttc accgacgccc tgcaagcctt caccgcccgt gctgccttcg ccgagggcga 3240
caccacctgg gagaacgtgg cactctccg cctcaaggag tgcgaccgca tctctgacac 3300
ccgcgctgag cttgagcgcc tcggcctccg cgcacgcgag accgcccact ctctctccgt 3360
gactggctct gctcacctc ctggtggcat caccgcccgc ggccacggcg accaccgcat 3420
gatcatgctc ctaccctcc tcggcctccg cgcagacgct cactccgca tcaccggcgc 3480
acaccacatc cgcaagtcc accctcagtt cttcgtctac ctcgaagccc tcggcgtcgc 3540
cttcgagtac gctgaggcca ccgcccctga g 3571

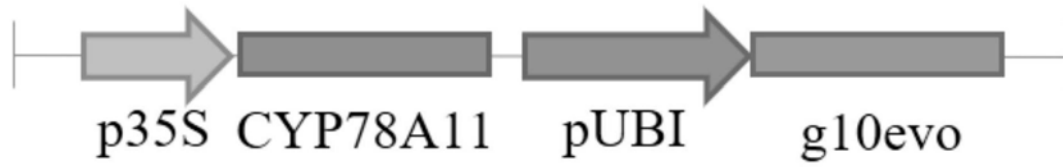


图1



图2

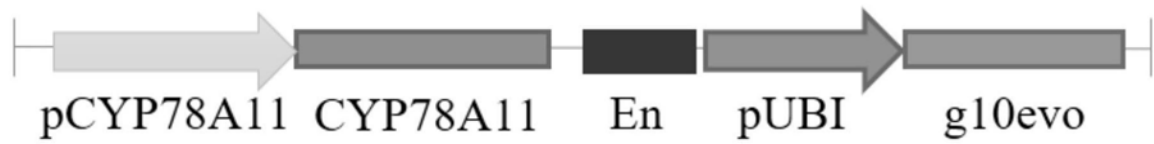


图3