



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 87105764.6

[45]授权公告日 1998 年 11 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1040772C

[22]申请日 87.8.22 [24]颁证日 98.9.26

[21]申请号 87105764.6

[30]优先权

[32]86.8.23 [33]DE[31]P3628747.4

[32]86.11.3 [33]DE[31]P3637307.9

[32]86.12.16[33]DE[31]P3642829.9

[32]87.1.8 [33]DE[31]P3700313.5

[73]专利权人 赫彻斯特股份公司

地址 联邦德国法兰克福

[72]发明人 埃克哈德·斯特罗克

沃夫冈·霍勒本 沃特·阿诺德

里纳特·阿利亚 阿里德·普勒

格哈德·沃纳 鲁迪格·马奎特

苏三尼·格拉布利 迪特·布罗尔

克劳斯·巴彻

[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 李 瑛 顾柏棣

审查员 47 08

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 获得2-氨基-4-甲磷酰丁酸基因的方法

[57]摘要

通过在绿色产色链霉菌 DSM4112 中选择 2-氨基-4-甲磷酰-丙氨酰-丙氨酸 (PTT) 抗性而产生 PTT 抗性的选择体。用 BamHI 酶切这些选择体的总 DNA 得到携有 Phosphinothricin(PTC)抗性基因的 DNA 片段,克隆 4.0Kb 大小的片段并选择 PTT 抗性。此基因适用于生产 PTC 抗性的植物, 以及作为抗性标记用于 L 型外消旋 PTC 的选择性 N-乙酰化作用。



## 权 利 要 求 书

1.一种获得 2 - 氨基 - 4 - 甲脞酰丁酸 ( PTC ) 抗性基因的方法, 该基因编码以下所示的氨基酸序列,

ValSerProGluArgArgProValGluIleArgProAlaThrAla  
AlaAspMetAlaAlaValCysAspIleValAsnHisTyrIleGluThrSerThrValAsnPheArgThrGluPro  
GlnThrProGlnGluTrpIleAspAspLeuGluArgLeuGlnAspArgTyrProTrpLeuValAlaGluValGlu  
GlyValValAlaGlyIleAlaTyrAlaGlyProTrpLysAlaArgAsnAlaTyrAspTrpThrValGluSerThr  
ValTyrValSerHisArgHisGlnArgLeuGlyLeuGlySerThrLeuTyrThrHisLeuLeuLysSerMetGlu  
AlaGlnGlyPheLysSerValValAlaValIleGlyLeuProAsnAspProSerValArgLeuHisGluAlaLeu  
GlyTyrThrAlaArgGlyThrLeuArgAlaAlaGlyTyrLysHisGlyGlyTrpHisAspValGlyPheTrpGln  
ArgAspPheGluLeuProAlaProProArgProValArgProValThrGlnIle

该方法包括选择抗 2 - 氨基 - 4 - 甲脞酰 - 丙氨酰 - 丙氨酸(PTT) 的绿色产色链霉菌 DSM4112, 从抗性菌株中分离总 DNA, 用 BamHI 切割此 DNA, 分离大小为 4.0Kb 的片段, 该片段携带 PTC 抗性基因, 以含有该抗性基因的完整或亚片段形式克隆此片段, 并选择 PTT 抗性, 从而得到携带 PTC 抗性基因的选择体。

2.根据权利要求 1 的方法, 其中被克隆的是位于 4.0Kb BamHI 片段中的 0.8Kb BglII 片段。

# 说 明 书

## 获得 2 - 氨基 - 4 - 甲磷酰丁酸基因的方法

Phosphinothricin ( P T C, 2-氨基-4- 甲磷酰丁酸) 是谷氨酰胺合成酶的抑制剂。 P T C是抗生素2-氨基-4- 甲磷酰- 丙氨酰- 丙氨酸的“结构单位”。此三肽 ( P T T) 具有抗革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌以及抗真菌灰葡萄孢 ( *Botrytis cinerea*) 的活性 ( Bayer 等人, *Helv. Chim. Acta* 55:224, 1972) 。 P T T是由绿色产色链霉菌 ( *Streptomyces viridochromogenes* ) Tu 494 菌株 ( D SM40736, D SM4112) 产生的。

德国专利2,717,440 号公开了 P T C可起全除莠剂 (total herbicide) 的作用。已公开的 P C T申请W O86/02097号描述了植物对 P T C的抗性是归因于谷氨酰胺合成酶的过量生成。这种类型的过量生成 (如从基因扩增所导致的) 易遭受不稳定的风险。因此, 这样一种不稳定性将带来谷氨酰胺合成酶过量生成的下降, 将致使重新出现 P T C的竞争性抑制作用。

与之相反, 在权利要求中所限定的本发明涉及一种获得 P T C抗性基因的方法, 该基因适用于生产 P T C抗性植物。此外, 该基因还可作为抗性标记使用。而且, 该基因可适于 L型外消旋 P T C的选择性 N - 乙酰化作用。

本发明的 P T C抗性基因能由下述步骤得到: 用 BamH I酶切以 P T T抗性选择出来的绿色产色链霉菌 D SM4112菌株的总 DNA, 克隆大小为 4.0 Kb 的片段, 然后选择 P T T抗性。限制性图谱 (图1)详细描绘了该 4.0 Kb 片段的特征。

对该 4 Kb 片段部分进行克隆实验, 以更精确地确定编码区的位置。此实验结果表明, 抗性基因位于 1.6 Kb 的 Sst II - Sst I 片段上 (图1中位置 0.55至 2.15) 。用 Bgl II 消化产生 0.8 Kb 大小的片段, 此片段掺

入质粒中并转化变铅青链霉菌 (*S. lividans*) 后赋予 P T T 抗性。此抗性是由 P T C 的 N-乙酰化产生的。

对此 0.8 Kb 片段进行 Maxam 和 Gilbert 序列分析得到 DNA 序列 I (见附页)。抗性基因的位置可从这一序列的开放读码 (open reading frame) 确定 (从位置 258 起)。此基因读码终点位于图示的倒数第二个核苷酸 (位置 806), 即最后一个核苷酸 (位置 807) 是终止密码子的第一个核苷酸。

用下加线条强调标明了 DNA 序列 I 中的 Shine-Dalgarno 序列, 作为起始密码子的 G T G 也用线条标出。而且, 顶部线条标出了确定的读码。

DNA 序列 II 显示已确定了序列的基因中的限制性切点。没有标出切断此序列六次以上的酶。

抗生素 P T T 由细菌摄取并被降解为 P T C。后者也抑制细菌中的谷氨酰胺合成酶, 致使细菌因缺乏谷氨酰胺而死亡。因此, 产生 P T T 的细菌应当具有保护自身不受 P T T 影响的机理, 也就是说, 防止再度摄取已生产的 P T T, 或者对已降解的产物 P T C 进行修饰。但令人吃惊的是, P T T 生产菌绿色产色链霉菌 D SM4112 对其自身的抗生素敏感。但出人意料地证实, 通过选择 P T T 抗性, 有可能以  $10^5$  的极高频率发现抗 P T T 的选择体, 而且, 此选择体还能抑制相邻菌落的本底生长。

通过分离此 DNA、用 BamH I 切断并连接到链霉菌载体中建立了这些选择体 DNA 的基因库。将连接混合物转化到市售的变铅青链霉菌 T K23 菌株中, 每  $1 \mu\text{g}$  连接混合物产生大约 5000 至 10000 个含有大约 1 至 5 Kb 插入段的转化体。在这些转化体中有 P T T 抗性变铅青链霉菌株。有可能通过质粒分离并重新转化到变铅青链霉菌中, 证明该抗性是由质粒编码的。负责此抗性的基因位于 4 Kb BamH I 片段上 (图 1)。编码区位于 0.8 Kb Bgl II 片段上。BamH I 片段中不含下列酶的切点: Cla I、

Eco R I、Eco R V、Hind III、Hpa I、Kpn I、Pvu I、Pvu II 和 Xho I。

将抗性基因的限制性图谱（还没有详细确定其特征）与吸水链霉菌（*S. hygroscopicus*）FERM B P-130/ A T C C21705（欧洲专利申请，公开号0,173,327,图7）相比较表明，本发明的抗性基因不同于已知基因，其为寻找 P T T 生物合成基因过程中发现的。

一方面使绿色产色链霉菌 D S M 4112 和变铅青链霉菌 T K 23 的细胞提取物与 P T C 和乙酰辅酶 A 保温，另一方面使 P T T 抗性的绿色产色链霉菌选择体和携有质粒的变铅青链霉菌转化体与 P T C 和乙酰辅酶 A 保温，有可能表明后面的细胞将具有乙酰化活性。层析分析表明乙酰化发生在氨基上。

由于大肠杆菌中也已发现了 P T T 抗性，而且抗性机理也在革兰氏阴性细菌中起作用，因此，有可能基于运送现象排除抗性。这样，与植物启动子偶联并使用合适的载体后，本发明的抗性基因可转化到植物中，从而可产生 P T C 抗性植物。

P T C 的 N- 乙酰化还可用于合成的 D, L- P T C 的外消旋体拆开，因为只有 L 型发生选择性乙酰化作用。

因此，本发明还涉及使用抗性基因选择性地使外消旋 P T C 的 L 型发生 N- 乙酰化。

因此，本发明的抗性基因编码的 P T C 乙酰转移酶可用于分离外消旋 P T C，例如，使外消旋体经受此酶的乙酰化作用。可使由德国专利 2,717,440 的方法所得到的外消旋 P T C 成为光学对映体，因为此酶只选择性地攻击 L 型，而 D 型则保持不变。然后，根据二者性质的差别，通过已知方法可将这样得到的混合物分离开。

已公开了这样一种方法：使 N- 酰基- D, L- 氨基酸与固定在适当载体上的酰基转移酶接触，选择性地释放 L- 氨基酸，它可以在酸化以后

用不与水混溶的溶剂从与 N- 酰基- D- 氨基酸的混合物中萃取出来 (见英国专利 1,369,462 号)。已经公开了 N- 酰基- D, L- P T C 的相应的分离方法, 如见于德国专利公开 2,939,269 号或美国专利 4,226,941 号。

根据本发明保持不变的 D- P T C 可通过已知方法外消旋 (见公开号为 E P- A-0,137,371 的欧洲专利申请, 实例 8), 然后回到流程中。

有可能但并不一定要分离出酶, 这里及下文中所说的“酶”总是意指具有酶促活性的部分。如果酶被分离出来, 它可以以游离形式或在载体上的固定化形式使用。合适载体的例子已在欧洲专利- A 0,141,223 号中描述了。但方便的作法是不分离酶, 而是使用任何预期可表达本发明之酶的 P T C 抗性细胞。因此, 有可能方便地使用绿色产色链霉菌 D S M 4112 的 P T T 抗性选择体。而且, 有可能有利地使用任何用本发明之基因转化的预期细胞, 并使之能够表达 P T C 乙酰转移酶。就此而论, 本发明的基因 (也是指其活性部分) 可以以质粒整合形式或利用其它常规的基因操作方法, 例如通过转染引入到宿主细胞中。例如, 掺入大肠杆菌的表达质粒中并用这样的质粒转化大肠杆菌是方便可行的, 例如可通过欧洲专利- A U,163,249 号和 0,171,024 号中介绍的已知方法进行。

对于外消旋体中的 L- P T C 的 N- 乙酰化, 根据本发明, 可以游离或固定化形式使用表达 P T C 乙酰转移酶的细胞, 使用常规的固定化技术进行固定 (例如德国专利公开 3,237,341 及其中引用的文献)。

本发明中 L- P T C 的酶促乙酰化以常规的酶促反应方式进行, 方法中的条件由所用生物的性质来确定。从原则上讲, 适用于此的方法与上述选择性脱酰作用的方法相同。

下述实例进一步阐明了本发明。除非特别指出者外, 其中的份数和百分数数据均是指重量。

#### 实例 1 P T T 抗性选择体

在基本培养基中 (Hopwood等人, 《链霉菌的基因操作: 实验室手册》, The John Innes Foundation Norwich, England, p.233, 1985)培养绿色产色链霉菌 D SM4112菌株, 加入渐增浓度的 P T T。在 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的浓度下, 大约在每 $10^5$ 个菌落中发现一个抗性菌落。

### 实例2 载体的制备

用 Bgl II 切割质粒 p S V H I (欧洲专利0,070,522号, 美国专利4,673,642号), 分离大小约7.1 Kb 的片段并与1.1 Kb 具有硫链丝菌素抗性的 Bcl I 片段连接 (欧洲专利申请, 公开号0,158,201)。得到大小约为8.15 Kb 的质粒 p E B2(图2)。

### 实例3 抗性基因的分离

从实例1 得到的选择体中分离总 DNA, 并用 BamH I 酶切。同样用 BamH I 打开质粒 p E B2, 使两种混合物结合并连接。将连接混合物转化到变铅青链霉菌 T K23 (可从 The John Innes Foundation 得到) 中, 每1 微克连接混合物得到5000至10000 个具有大约1 ~5 Kb 插入段的转化体。选择 P T T 抗性产生两个具抗性的变铅青链霉菌菌落。从抗性菌落中分离出质粒并用 BamH I 酶切。发现一个携有负责抗性的基因的 4Kb BamH I 片段。此质粒被称为 p P R I (图3)。

将其再转化到变铅青链霉菌 T K23 中, 证明 P T T 抗性是由质粒编码的, 因为转化体能在含有100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  P T T 的基体培养上生长。

### 实例4 证明 N- 乙酰化使 P T C 失活

检查下列菌株以证实克隆片段的乙酰化活性: 绿色产色链霉菌 D SM 40736, 绿色产色链霉菌 (P T T 抗性突变株)、变铅青链霉菌 T K23 和变铅青链霉菌 T K23 (p P R I)。

这需将菌株接种到溶解培养基 A (欧洲专利申请, 公开号 0,158,872 第 6 页) 中, 并在轨道式震荡培养器中于 30℃ 保温 2 天。收获细胞后, 取 1mg 菌丝体在合适的缓冲液 (如 R S 缓冲液: C. J. Thompson 等人, J. Bacteriol 151:678-685, 1982) 中用超声波破碎。测定 P T C 降解的典型试验程序如下:

在 250  $\mu$ l 粗提物中, 加入 100  $\mu$ l P T C 溶液 (250  $\mu$ g/ml) 和 50  $\mu$ l 乙酰辅酶 A (4mg/ml), 将混合物于 30℃ 下保温 2 小时。此时间过后, 用 H P L C 测定仍然存在的 P T C 量。此实验基结果如下:

菌株	未反应的 P T C ----- 加入的 P T C
变铅青链霉菌 T K 23	100 %
绿色产色链霉菌 (D S M 40736)	72 %
绿色产色链霉菌选择体	7 %
变铅青链霉菌 T K 23 (p P R I)	31 %

在薄层层析上 (没有茚三酮显色) 与参考物质相比表明, 已经发生了 P T C 的 N- 乙酰化。

DNA序列 I

IleTrpSerAspValLeuGlyAlaGlyProValLeuProGlyAspAspPhePheSerLeuGlyGlyThrSerIle  
AspLeuGluArgArgProGlyGlyArgSerGlyAlaAlaArgGlyArgLeuLeuLeuProArgArgHisLeuHis  
ArgSerGlyAlaThrSerTrpGlyProValArgCysCysProGlyThrThrSerSerProSerAlaAlaProPro  
AGATCTGGAGCGACGTCTG6GGGCGGCTCCGGTGCTGCCCCGGGACGACTTCTTCTCCCTC6GC6GCACCTCCA 75  
TCTAGACCTCGCTGCAGGACCCCCG6CCAGGCCACGACGGGCCCCCTGCTGAAGAAAG666AGCC6CCGT66AGGT  
SerArgSerArgArgGlyProProArgAspProAlaAlaArgProArgSerArgArgGlyArgArgCysArgTrp  
AspProAlaValAspGlnProGlyThrArgHisGlnGlyProValValGluGluGlyGluAlaAlaGlyGlyAsp  
IleGlnLeuSerThrArgProAlaProGlyThrSerGlyProSerSerLysLysGluArgProProValGluMet

SerAlaLeuArgValValSerArgIleArgLysGluLeuGlyValProLeuArgLeuAlaValIlePheGluThr  
LeuGlyValAlaGlyGlyLeuAlaHisProGlnGlyThrArgArgAlaThrProAlaArgArgAspLeuArgAsp  
SerArgArgCysGlyTrpSerArgAlaSerAlaArgAsnSerAlaCysHisSerGlySerProOP SerSerArg  
TCTCGGCGTGGCG6GTGGTCTCGCGCATCCGCAAGGAACTCGGCGTGCCACTCCGGCTCGCCGTGATCTTCGAGA 150  
AGAGCCGCAACGCCACCCAGAGCGCGTATG6CGTTCCTTGAGCCGACGGTGAGGCCGAGCGGCACTAGAAGCTCT  
ArgProThrAlaProProArgAlaCysGlyCysProValArgArgAlaValGlyAlaArgArgSerArgArgSer  
ArgArgGlnProHisAspArgAlaAspAlaLeuPheGluAlaHisTrpGluProGluGlyHisAspGluLeuArg  
GluAlaAsnArgThrThrGluArgMetArgLeuSerSerProThrGlySerArgSerAlaThrIleLysSerVal

ProSerLeuGluAlaValAlaGluSerValLeuArgGluLeuLysGlyThrAM DC ArgGlyAlaArgHisPro  
AlaValProGlySerGlyGlyArgIleArgThrProArgThrGluGlyAspValValLysArgCysProProPro  
ArgArgProTrpLysArgTrpProAsnProTyrSerAlaAsnOP ArgGlyArgSerLysGluValProAlaThr  
CGCCGTCCCTGGAAGCGGTGGCCGAATCCGTACTCCGCGAAGTGAAG666AC6TAGTAAAGAGGTGCCCGCCACC 225  
GCG6CAGGGACCTTCGCCACCGGCTTAGGCATGAGGCGCTTGACTTCCCCTGCATCATTCTCCACGGGCGGTGG  
AlaThrGlyProLeuProProArgIleArgValGlyArgValSerProSerThrThrPheLeuHisGlyGlyGly  
ArgGlyGlnPheArgHisGlyPheGlyTyrGluAlaPheGlnLeuProArgLeuLeuSerThrGlyAlaValArg  
GlyAspArgSerAlaThrAlaSerAspThrSerArgSerSerPheProValTyrTyrLeuProAlaArgTrpGly

LeuSerGlnAsnThrGluGlyArgProHisValSerProGluArgArgProValGluIleArgProAlaThrAla  
AlaPheAlaGluHisArgArgLysThrThrArgGluProArgThrThrProGlyArgAspProSerArgHisArg  
ArgPheArgArgThrProLysGluAspHisThrOP AlaGlnAsnAspAlaArgSerArgSerValProProPro  
CGCTTTCGCAAGACCCGAGGAAAGACCACACGTGAGCCGAGAACGACGCCCGGTCGAGATCC6TCCCGCCACCG 300  
GCGAAAGCGTCTTGTGGCTTCTTCT66TGTGCACTCG66TCTT6CTG6GGGCCAGCTCTAGGCAG66CGGTGGC  
AlaLysAlaSerCysArgLeuPheValValArgSerGlyLeuValValGlyProArgSerGlyAspArgTrpArg  
LysArgLeuValGlyPheSerSerTrpValHisAlaTrpPheSerAlaArgAspLeuAspThrGlyGlyGlyGly  
SerGluCysPheValSerProLeuGlyCysThrLeuGlySerArgArgGlyThrSerIleArgGlyAlaValAla

AlaAspMetAlaAlaValCysAspIleValAsnHisTyrIleGluThrSerThrValAsnPheArgThrGluPro  
ArgArgHisGlyGlyGlyLeuArgHisArgGlnSerLeuHisArgAspGluHisGlyGlnLeuProTyrGlyAla  
ProProThrTrpArgArgSerAlaThrSerSerIleThrThrSerArgArgAlaArgSerThrSerValArgSer  
CCGCCGACATGGCGGCGGTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAG6CACGGTCAACTTCCGTACGGAGC 375  
GGCGGCTGTACCGCCGCCAGACGCTGTAG6CAGTTAGTGTAGCTCT6CTCGT6CCAGTT6AAGGCAT6CCTCG  
ArgArgCysProProProArgArgCysArgOP AspSerCysArgSerSerCysProOP SerGlyTyrProAla  
GlyValHisArgArgAspAlaValAspAspIleValValAspLeuArgAlaArgAspValGluThrArgLeuArg  
AlaSerMetAlaAlaThrGlnSerMetThrLeuOP AM MetSerValLeuValThrLeuLysArgValSerGly

GlnThrProGlnGluTrpIleAspAspLeuGluArgLeuGlnAspArgTyrProTrpLeuValAlaGluValGlu  
AlaAspSerAlaGlyValAspArgArgProGlyAlaProProGlyProLeuProLeuAlaArgArgArgGlyGly  
ArgArgLeuArgArgSerGlySerThrThrTrpSerAlaSerArgThrAlaThrProGlySerSerProArgTrp  
CGCAGACTCCGCAAGGAGTGGATCGACGACCTGGAGCGCCTCCAGGACCGCTACCCCT66CTCGTCCGAGGTGG 450  
GC6TCT6AGGCGTCTCACCTAGCTGCTGGACCTCGCGGAGGTTCTG66BAT66GGACCBAGCAGCG6CTCCACC  
AlaSerGluAlaProThrSerArgArgGlyProAlaGlyGlyProGlySerGlyArgAlaArgArgArgProPro  
LeuSerArgLeuLeuProAspValValGlnLeuAlaGluLeuValAlaValGlyProGluAspGlyLeuHisLeu  
CysValGlyCysSerHisIleSerSerArgSerArgArgTrpSerArgAM GlyGlnSerThrAlaSerThrSer

DNA序列 I (续前页)

GlyValValAlaGlyIleAlaTyrAlaGlyProTrpLysAlaArgAsnAlaTyrAspTrpThrValGluSerThr  
GlyArgArgArgArgHisArgLeuArgArgProLeuGluGlyProGlnArgLeuArgLeuAspArgArgValAsp  
ArgAlaSerSerProAlaSerProThrProAlaProGlyArgProAlaThrProThrThrGlyProSerSerArg  
AGGGCGTCTGTCGCCGGCATCGCCTACGCCGGCCCTGGAAGGCCCGCAACGCCTACGACTGGACCGTCTGAGTCTGA 525  
TCCCGCAGCAGCGGCCGTAGCGGATGCGGGCCGGGGACCTTCCGGGGCGTTGCGGATGCTGACCTGGCAGCTCAGCT  
ProArgArgArgArgCysArgArgArgArgGlyArgSerProGlyCysArgArgArgSerSerArgArgThrSer  
AlaAspAspGlyAlaAspGlyValGlyAlaGlyProLeuGlyAlaValGlyValValProGlyAspLeuArgArg  
ProThrThrAlaProMetAlaAM AlaProGlyGlnPheAlaArgLeuAlaAM SerGlnValThrSerAspVal

ValTyrValSerHisArgHisGlnArgLeuGlyLeuGlySerThrLeuTyrThrHisLeuLeuLysSerMetGlu  
GlyValArgLeuProProAlaProAlaAlaArgThrGlyLeuHisProLeuHisProProAlaGluValHisGly  
ArgCysThrSerProThrGlyThrSerGlySerAspTrpAlaProProSerThrProThrCysOP SerProTrp  
CGGTGTACGTCTCCACCGGCCACCGCGGCTCGGACTGGGCTCCACCCTCTACCCACCTGCTGAAGTCCATGG 600  
GCCACATGCAGAGGGTGGCCGTGGTCCGCCAGCCTGACCCGAGGTGGGAATGTGGGTGGACGACTTCAGGTACC  
ProThrArgArgGlyGlyAlaGlyAlaAlaArgValProSerTrpGlyArgCysGlyGlyAlaSerThrTrpPro  
HisValAspGlyValProValLeuProGluSerGlnAlaGlyGlyGluValGlyValGlnGlnLeuGlyHisLeu  
ThrTyrThrGluTrpArgCysTrpArgSerProSerProGluValArgAM ValTrpArgSerPheAspMetSer

AlaGlnGlyPheLysSerValValAlaValIleGlyLeuProAsnAspProSerValArgLeuHisGluAlaLeu  
GlyProGlyLeuGlnGluArgGlyArgArgHisArgThrAlaGlnArgProGluArgAlaProAlaArgGlyAla  
ArgProArgAlaSerArgAlaTrpSerProSerSerAspCysProThrThrArgAlaCysAlaCysThrArgArg  
AGGCCAGGGCTTCAAGAGCGTGGTCCGCCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCGTGGCCCTGCACGAGGCCG 675  
TCCGGGTCCCGAAGTTCTCGCACCAAGCGGCCAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGGCTCGCACGCGGACGTGCTCCGCG  
ProGlyProSerOP SerArgProArgArgOP ArgValAlaTrpArgGlySerArgAlaGlyAlaArgProAla  
GlyLeuAlaGluLeuAlaHisAspGlyAspAspSerGlnGlyValValArgAlaHisAlaGlnValLeuArgGlu  
AlaTrpProLysLeuLeuThrThrAlaThrMetProSerGlyLeuSerGlyLeuThrArgArgCysSerAlaSer

GlyTyrThrAlaArgGlyThrLeuArgAlaAlaGlyTyrLysHisGlyGlyTrpHisAspValGlyPheTrpGln  
ArgIleHisArgAlaArgAspAlaAlaGlySerArgLeuGlnAlaArgGlyLeuAlaArgArgGlyValLeuAla  
SerAspThrProArgAlaGlyArgCysGlyGlnProAlaThrSerThrGlyAlaGlyThrThrTrpGlySerGly  
TCGGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCAAGCGGCTACAAGCACGGGGGCTGGCACGACGTGGGGTTCTGGC 750  
AGCCTATGTGGCGCGCGCCCTGCGACGCCCGTCCGGCCGATGTTCTGTCGCCCGACCGTGTGACCCCAAGACCG  
ArgIleCysArgAlaArgSerAlaAlaProLeuArgSerCysAlaArgProSerAlaArgArgProThrArgAla  
SerValGlyArgAlaProArgGlnProCysGlyAlaValLeuValProAlaProValValHisProGluProLeu  
ProTyrValAlaArgProValSerArgAlaAlaProAM LeuCysProProGlnCysSerThrProAsnGlnCys

ArgAspPheGluLeuProAlaProProArgProValArgProValThrGlnIle  
AlaArgLeuArgAlaAlaGlyProAlaProProArgProAlaArgHisThrAsp  
SerAlaThrSerSerCysArgProArgProAlaProSerGlyProSerHisArgSer  
AGCBCGACTTCGAGCTGCCGGCCCGGCCCGCCCGTCCGGCCCGTCCACACAGATCT 807  
TCGGCTGAAGCTCGACGGCCGGGGCGGGGGCAGGCCGGGCAATGTGTCTAGA  
AlaArgSerArgAlaAlaProGlyAlaGlyGlyArgGlyAlaArgOP ValSerArg  
AlaValGluLeuGlnArgGlyArgGlyAlaGlyAspProGlyAspCysLeuAsp  
ArgSerLysSerSerGlyAlaGlyGlyArgGlyThrArgGlyThrValCysIle

## DNA序列 II

- 1 AGATCTGGAGCGACGTCTCTGGGGGCCGGTCCGGTGTCTGCCCAGGACGACTTCTTCTCCC  
TCTAGACCTCCTGCAAGACCCCGGCCAGGCCACGACGGGCCCTGCTGAAGAAGAGGGG  
1 BGLII XHOII, 2 DPNI SAU3A, 5 GSUI, 12 AATII ACYI, 13 MAEII  
, 17 APYI ECORII, 26 RSRII, 27 AVAII, 35 BBUI, 39 AVAI NCII  
SMAI, 40 NCII, 52 MBOII, 59 MNLI,
- 61 TCGGCGGCACCTCCATCTCGGCCTTGGGGTGGTCTCGCGCATCCGCAAGGAACTCGGCG  
AGCCGCGCTGGAGGTAGAGCCCAACGCCACCAAGAGCGCGTAGGCGTTCTTGAAGCCGC  
66 HGICI, 70 MNLI, 97 FNUDII, 100 SFANI, 101 FOKI,
- 121 TGCCACTCCGGCTCGCCGTGATCTTCAAGACGCCGTCCCTGGAGCGGTGGCCGAATCCG  
ACGGTGAAGCCGAGCGGCACTAGAACTCTGCGGAGGGACCTTCGCCACCGGCTTAGGG  
122 BGLI, 140 DPNI SAU3A, 142 MBOII, 149 ACYI HGAI TTH1111,  
158 APYI ECORII, 169 CFRI GDIII, 174 HINFI, 180 RSAI,
- 181 TACTCCGCGAAGTGAAGGGGACGTAGTAAAGAGGTGCCCGCCACCCGCTTTCGCAAGACA  
ATGAGGCGCTTACTTCCCTGCATCATTTCTCCACGGGCGGTGGGCGAAAGCGTCTTGT  
186 FNUDII, 201 MAEII, 211 MNLI, 213 HGICI, 214 SDUI,
- 241 CCGAAGGAAGACCACACGTGAGCCCAAGACGACGCCCGGTGAGATCCGTCCCGCCACCG  
GGCTTCTTCTGGTGTGCACTCGGGTCTTGTCTGCGGGCCAGCTCTAGGCAAGGGCGGTGG  
247 MBOII, 254 AFLIII, 255 PMACI, 256 MAEII, 260 HGIIII SDUI  
, 271 ACYI HGAI, 275 NCII, 283 XHOII, 284 BINI DPNI SAU3A,
- 301 CCGCCGACATGGCGGGGCTCTGCGACATCGTCAATCACTACATCGAGACGAGCAGGCTCA  
GGCGGCTGTACCGCCCGCAGACGCTGTAGCAGTTAGTGTAGTGTAGCTCTGCTCGTCCAGT  
303 BGLI, 308 NLAIII, 324 TTH1111, 350 HGIAI SDUI, 357 HINCI  
I,
- 361 ACTTCCGTACGGAGCCGAGACTCCGCAAGGAGTGGATCGACGACCTGGAGCGCCTCCAGG  
TGAAGGCATGCCTCGGCGTCTGAGGCGTCCCTCACCTAGCTGCTGGACCTCGCGAGGTTCC  
367 RSAI, 380 HINFI, 394 BINI, 395 DPNI SAU3A, 404 APYI ECOR  
II, 405 GSUI, 409 MAEII, 413 MNLI, 414 GSUI, 416 APYI ECORII  
, 419 AVAII,
- 421 ACCGCTACCCCTGGCTCGTGGCCGAGGTGGAGGGCGTCTGCGCCGGCATCGCCTACGCCG  
TGGCGATGGGGACCGAGCAGCGGCTCCACCTCCCGCAGCAGCGGCCGTAGCGGATGGCGG  
430 APYI ECORII, 444 MNLI, 450 MNLI, 453 ACYI, 454 HGAI, 462  
NAEI, 466 SFANI, 477 NAEI,
- 481 GCCCCTGGAGGGCCCGCAACGCTACGACTGGACCGTGGAGTGGAGGGTGTAGCTCTCCC  
CGGGGACCTTCCGGGCTTGGGATGCTGACCTGGCAGCTCAGCTGCCACATGCAAGAGG  
484 APYI ECORII, 511 AVAII, 519 HINFI, 521 ACCI HINCI SALI,  
530 RSAI, 532 MAEII,

DNA序列Ⅱ (续前页)

- 541 ACCGGCACCAGCGGCTCGGACTGGGCTCCACCCTCTACACCCACCTGCTGAAATCC,  
TGGCCGTGGTCCCGAGCCTGACCCGAGGTGGGAGATGTGGGTGGACGACTTCAGGT,  
544 HGICJ, 549 NSPBII, 553 HGIIJII SDUI, 572 MNLI, 578 TAQII,  
583 BSPMI, 595 NCOI STYI, 596 NLAI111, 600 MNLI,
- 601 AGGCCAGGGCTTCAAGAGCGTGGTGGCGTCATCGGACTGCCCAACGACCCGAGCGTGC  
TCCGGGTCCCAGAGTTCTCGCACCAGCGGCAGTAGCCTGACGGGTTGCTGGGCTCGCACG  
605 APYI EDR11, 650 AVAI,
- 661 GCCTGCACGAGGCGCTCGGATACACCGCGCGCGGGACGCTGCGGGCAGCCGGCTACAAGC  
CGGACGTGCTCCGCGAGCCTATGTGGCGCGCGCCCTGCGACGCCCCGTCGGCCGATGTTCC  
669 MNLI, 671 HAEII, 686 FNUDII, 687 BSSHII, 688 FNUDII, 690  
FNUDII, 695 HGA1, 698 BBVI, 705 BBVI, 708 NAEI, 716 TTHI111  
I,
- 721 ACGGGGGCTGGCAGGACGTGGGGTTCTGGCAGCGGACTTCGAGCTGCCGGCCCCGCCCC  
TGGCCCCGACCGTGTGTCACCCCAAGACCGTGGCGCTGAAAGCTCGACGGCCGGGGCGGGG  
732 DRAI11, 736 MAEII, 749 BBVI, 753 FNUDII, 753 ALU1, 754 B  
BVI, 757 NAEI,
- 781 GCCCCGTCCGGCCCGTCACACAGATCT  
CGGGGCAGGCCGGGCAATGTGTCTAGA  
795 MAEIII, 802 BGLII XHOII, 803 DPNI SAU3A,