



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104788552 B

(45)授权公告日 2017. 11. 03

(21)申请号 201410022567.9

C12N 15/29(2006.01)

(22)申请日 2014.01.17

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104788552 A

(43)申请公布日 2015.07.22

(73)专利权人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院2号

(72)发明人 张相岐 巩彩艳 范仁春 曹双河 卫波 王献平

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 陈晓庆

(51)Int.Cl.

C07K 14/415(2006.01)

(56)对比文件

CN 102586268 A,2012.07.18,

Gong C等.Identification and

phylogenetic analysis of a CC-NBS-LRR

encoding gene assigned on chromosome 7B

of wheat.《Int J Mol Sci》.2013,第14卷(第8

期),第15330-47页.

张文俊等.黑麦6R抗白粉病基因向小麦的渗透与鉴定.《遗传学报》.1999,第26卷(第5期),第563-570页.

审查员 夏颖

权利要求书1页 说明书8页

序列表10页 附图3页

(54)发明名称

ScRGA-6RL2及其编码基因与应用

(57)摘要

本发明公开了一种ScRGA-6RL2及其编码基因与应用。本发明公开的一种蛋白,为如下(1)或(2)所示:(1)SEQ ID No.2所示的蛋白;(2)将SEQ ID No.2所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且功能相同的蛋白质。在植物中过表达ScRGA-6RL2可以提高植物对小麦白粉病的抗性,在培育优良的小麦抗白粉病品种方面具有良好的应用前景。

1. 一种蛋白,为SEQ ID No.2所示的蛋白。
2. 权利要求1所述蛋白的编码基因。
3. 根据权利要求2所述的编码基因,其特征在于:所述编码基因为如下中至少一种:
 - 1) SEQ ID No.1所示的DNA分子;
 - 2) SEQ ID No.1中自5'末端起第126位至第3935位核苷酸所示的DNA分子;
 - 3) SEQ ID No.1中自5'末端起第119位至第3941位核苷酸所示的DNA分子。
4. 含有权利要求2或3所述编码基因的重组载体、表达盒或重组菌。
5. 一种制备小麦白粉病抗性增强的转基因植物的方法,包括如下步骤:将权利要求2或3所述的编码基因导入出发植物中,得到转基因植物;与出发植物相比,转基因植物的小麦白粉病抗性增强。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述编码基因是通过重组表达载体导入的,所述重组表达载体是将所述编码基因插入出发载体pJIT166的多克隆位点得到的。
7. 一种制备小麦白粉病抗性下降的转基因植物的方法,包括如下步骤:将大麦条纹花叶病毒的 γ -ScRGA-6RL2 RNA链导入出发植物中,得到转基因植物;与出发植物相比,转基因植物的小麦白粉病抗性下降;

所述 γ -ScRGA-6RL2 RNA链是通过MluI酶切得到线性化的 γ -ScRGA-6RL2重组质粒再经过体外转录得到的;

所述 γ -ScRGA-6RL2重组质粒是将SEQ ID No.1中自5'末端起第3396位至第4103位所示的DNA分子反向插入BSMV-VIGS系统载体中 γ 质粒的NheI位点得到的。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述大麦条纹花叶病毒的 α RNA链是通过MluI酶切得到线性化的BSMV-VIGS系统载体中 α 质粒再经过体外转录得到的;

所述大麦条纹花叶病毒的 β RNA链是通过SpeI酶切得到线性化的BSMV-VIGS系统载体中 β 质粒再经过体外转录得到的。
9. 根据权利要求5-8任一所述的方法,其特征在于:所述植物为小麦。
10. 权利要求1所述的蛋白在提高植物小麦白粉病抗性中的应用;所述植物为小麦。
11. 权利要求2或3所述的编码基因在提高植物小麦白粉病抗性中的应用;

所述植物为小麦。

ScRGA-6RL2及其编码基因与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种ScRGA-6RL2及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 小麦白粉病是一种真菌性气传病害,由专性寄生菌禾布氏白粉病菌 (*Blumeria graminis* f.sp.*tritici*) 引起。小麦白粉病具有生理小种多、变异速度快等特点,严重危害小麦生产。小麦被白粉病菌浸染后,可导致叶片早枯、分蘖减少、成穗率降低、千粒重下降等,一般可减产5%-10%,在严重流行年份,减产达30%以上 (Johnson, J.W., Baenziger, P.S., Yamazaki, W.T., Smith, R.T. Effects of powdery mildew on yield and quality of isogenic lines of 'Chancellor' wheat. *Crop Science*, 1979, 19 (3) :349-352)。近年来,我国小麦白粉病的常年发病面积都在600万公顷以上,严重威胁我国的小麦生产和粮食安全 (中国农业年鉴主编委员会. 2006. 中国农业年鉴)。

[0003] 对于小麦白粉病的防治,通过增加农药施用量和加强田间管理可在一定程度上减轻白粉病的危害,然而这势必增加小麦的生产成本,降低利润,同时也会引起环境污染等问题。因此培育和推广抗病品种是防治小麦白粉病最为经济、安全和有效的措施 (Dodds, P.N. and Rathjen, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews: Genetics*, 2010, 11 (8) :539-548)。实际上,人们利用抗病品种已经有一百多年的历史。自1930年澳大利亚学者Waterhouse首次报道小麦品种Thew携带一对显性抗白粉病基因以来,各国科学家先后在普通小麦及其近缘种属中发现了数十个抗白粉病基因,并利用经典遗传学、细胞学、分子生物学和生物信息学等方法,对小麦抗白粉病基因进行了抗性鉴定、遗传和物理的定位、基因克隆、编码蛋白结构分析、进化分析、信号传导途径以及在育种中的应用价值等方面的广泛研究。

[0004] 黑麦 (*Secale cereale* L.) 属于禾本科,小麦族,黑麦属。黑麦是小麦育种中抗白粉病的重要抗源之一。在已鉴定和命名的50多个抗小麦白粉病基因中有4个来自黑麦,即Pm7、Pm8、Pm17和Pm20,它们分别位于黑麦的2R、1R、1R和6R染色体上。因此,深入开发和利用黑麦其它优异基因资源将是进一步拓宽小麦遗传基础的有效途径之一 (王林生, 宋鹏. 黑麦属植物的遗传学研究与应用. *生物学通报*, 2010, 45 (8) :4-7)。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种ScRGA-6RL2及其编码基因与应用。

[0006] 本发明提供一种蛋白,为如下(1)或(2)所示:

[0007] (1) SEQ ID No. 2所示的蛋白;

[0008] (2) 将SEQ ID No. 2所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且功能相同的蛋白质。

[0009] 上述蛋白的编码基因也属于本发明的保护范围。

[0010] 上述编码基因中,所述编码基因为如下中至少一种:

- [0011] 1) SEQ ID No.1所示的DNA分子;
- [0012] 2) SEQ ID No.1中自5'末端起第126位至第3935位核苷酸所示的DNA分子;
- [0013] 3) SEQ ID No.1中自5'末端起第119位至第3941位核苷酸所示的DNA分子;
- [0014] 4) 在严格条件下与1)或2)或3)限定的DNA分子杂交且编码所述蛋白质的DNA分子;
- [0015] 5) 与1)或2)或3)或4)限定的DNA分子具有90%以上的同一性且编码所述蛋白质的DNA分子。
- [0016] 含有上述任一所述编码基因的重组载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌也属于本发明的保护范围。
- [0017] 一种制备小麦白粉病抗性增强的转基因植物的方法也属于本发明的保护范围,包括如下步骤:将上述任一所述的编码基因导入出发植物中,得到转基因植物;与出发植物相比,转基因植物的小麦白粉病抗性增强。
- [0018] 上述方法中,所述编码基因是通过重组表达载体导入的,所述重组表达载体是将所述编码基因插入出发载体pJIT166的多克隆位点得到的。
- [0019] 一种制备小麦白粉病抗性下降的转基因植物的方法也属于本发明的保护范围,包括如下步骤:将大麦条纹花叶病毒的 α , β 和 γ -ScRGA-6RL2三种RNA链导入出发植物中,得到转基因植物;与出发植物相比,转基因植物的小麦白粉病抗性下降;
- [0020] 所述 γ -ScRGA-6RL2RNA链是通过Mlu I酶切得到线性化的 γ -ScRGA-6RL2重组质粒再经过体外转录得到的;
- [0021] 所述 γ -ScRGA-6RL2重组质粒是将SEQ ID No.1中自5'末端起第3396位至第4103位所示的DNA分子反向插入BSMV-VIGS系统载体中 γ 质粒的Nhe I位点得到的;
- [0022] 所述反向为SEQ ID No.1中自5'末端起第3396位至第4103位所示的DNA分子的表达方向与所述 γ 质粒的表达方向相反。
- [0023] 上述方法中,所述大麦条纹花叶病毒的 α RNA链是通过Mlu I酶切得到线性化的BSMV-VIGS系统载体中 α 质粒再经过体外转录得到的;
- [0024] 所述大麦条纹花叶病毒的 β RNA链是通过Spe I酶切得到线性化的BSMV-VIGS系统载体中 β 质粒再经过体外转录得到的。
- [0025] 上述任一所述的方法中,所述植物为小麦。
- [0026] 上述蛋白在提高植物小麦白粉病抗性中的应用也属于本发明的保护范围;
- [0027] 和/或,
- [0028] 上述任一所述的编码基因在提高植物小麦白粉病抗性中的应用也属于本发明的保护范围;
- [0029] 所述植物具体为小麦。
- [0030] 在感病品种Chancellor叶片细胞中过表达ScRGA-6RL2基因,接种白粉病菌系E18,吸器指数由58.95%下降到37.80%,在另一个对白粉病菌系E18敏感的不含有Pm20基因的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104S中过表达ScRGA-6RL2基因,吸器指数由30.31%下降到19.52%。由此证明,ScRGA-6RL2基因具有抗小麦白粉病的功能。
- [0031] 小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104R的ScRGA-6RL2基因的表达抑制,使其对白粉病菌系E18的抗性丧失,反应型由0;级变为3-4级。
- [0032] 因此,在植物中过表达ScRGA-6RL2可以提高植物对小麦白粉病的抗性,在培育优

良的抗小麦白粉病品种方面具有良好的应用前景。

附图说明

- [0033] 图1为大麦条纹花叶病毒(BSMV)载体结构示意图。
- [0034] 图2为ScRGA-6RL2基因的表达情况分析。
- [0035] 图3为转BSMV植株、Mock植株和转BSMV:ScRGA-6RL2植株接种白粉病菌系E18的叶片表型。
- [0036] 图4为pJIT166-GUS结构图。
- [0037] 图5为小麦叶片细胞瞬时表达系统表型示意图。
- [0038] 图6为瞬时过表达ScRGA-6RL2基因的Chancellor和TAM104S叶片细胞接种白粉病菌系E18后吸器指数变化。

具体实施方式

- [0039] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0040] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。
- [0041] 下述实施例中的百分含量,如无特别说明,均为质量百分含量。
- [0042] pMD19-T Vector购自TaKaRa公司。
- [0043] 小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104R(*Triticum aestivum*) 在文献“万平,令利军,周文娟,张文俊,凌宏清,朱立煌,张相岐.小麦锌指蛋白基因的克隆、序列与表达分析.遗传学报,2004,9:895-900”中公开过,公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。
- [0044] BSMV-VIGS系统载体(包括 α 、 β 和 γ 质粒)在文献“Holzberg S.,Brosio P.,Gross C.,Pogue G.Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant.Plant J.,2002,30:315-327”中公开过,公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。
- [0045] 白粉病菌系E18(*Blumeria graminis* f.sp.*tritici*) 在文献“张海泉,马淑琴.(2008).34份粗山羊草抗白粉病性鉴定及遗传分析,植物保护,34(2):37-40”中公开过,公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。
- [0046] pJIT166质粒和pJIT166-GUS质粒在文献“Frederic A.,Carole L.T.,Carsten L.,Niu Y.,Wang D.W.,Andrew J.M.Virus Induction of Heat Shock Protein70Reflectsa General Response to Protein Accumulation inthe Plant Cytosol.Plant Physiology,2005,138:529-536”中公开过,公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。
- [0047] 小麦品种Chancellor(*Triticum aestivum*) 在文献“翟雯雯,段霞瑜,周益林,马慧乾.我国小麦地方品种蚂蚱麦、小白冬麦、游白兰、红卷芒抗白粉病性遗传分析.植物保护,2008,1:37-40”中公开过,公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。
- [0048] 不含有Pm20基因的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104S(*Triticum aestivum*) 在文献“万平,令利军,周文娟,张文俊,凌宏清,朱立煌,张相岐.小麦锌指蛋白基因的克隆、序列与表达分析.遗传学报,2004,9:895-900”中公开过,公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。

[0049] 实施例1、抗白粉病相关基因ScRGA-6RL2的获得及其功能验证

[0050] 一、取生长7天的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104R的叶片,洗净后放入经DEPC处理、灭菌后的研钵中研磨粉碎,加入TRIzol(购自Invitrogen)充分混匀,室温放置5分钟,经氯仿抽提2次,取上清,用异丙醇沉淀总RNA,空气干燥后,溶于适量DEPC水。以Oligo dT-引物(购自TaKaRa)进行反转录获得cDNA。

[0051] 反转录反应条件如下:

[0052] DEPC水2.0ul,总RNA3.0ul (1.0μg),Oligo dT-引物1.0ul (10mM),总体积为6.0ul。

[0053] 70℃保温10分钟,立刻置于冰上2分钟,再在上述体系中加入dNTP0.5ul (dATP, dGTP, dTTP, dCTP分别为10mM),RNase抑制剂0.25ul (1.0个单位),10×反转录缓冲液1.0ul, M-MLV反转录酶0.25ul (1.0个单位),DEPC水2.0ul,整个体系总体积为10.0ul。

[0054] 42℃保温60分钟,70℃保温15分钟,反应完成后置于4℃。

[0055] 取上述反转录产物用以下引物进行扩增。

[0056] 正向引物:ScRGA-6RL2-LF:5'-CCCAGAAAGTCAATGCTC-3';

[0057] 反向引物:ScRGA-6RL2-LR:5'-CGTCGTGGTTACTCCTAC-3'。

[0058] PCR反应条件:94℃1min;然后94℃15s,57℃15s,72℃4min,30个循环;最后72℃5min。

[0059] 将PCR扩增产物连接到pMD19-T载体上,经测序得到4374bp的产物,将其命名为ScRGA-6RL2,将ScRGA-6RL2连接到pMD19-T上,得到重组质粒,将其命名为pMD19-T-ScRGA-6RL2。

[0060] ScRGA-6RL2基因的cDNA序列如SEQ ID No.1所示,其编码框为SEQ ID No.1中自5'末端起第126位至第3935位核苷酸所示,其编码的ScRGA-6RL2蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.2所示。

[0061] 二、通过病毒介导的基因沉默实验验证ScRGA-6RL2基因的抗白粉病功能

[0062] (一)诱导ScRGA-6RL2基因沉默的BSMV-VIGS载体系统BSMV:ScRGA-6RL2的构建

[0063] 以步骤一获得的重组质粒pMD19-T-ScRGA-6RL2为模板,以如下引物对为引物进行PCR扩增,得到PCR扩增产物。

[0064] ScRGA-6RL2-VIGS-F:5'-TCAGCTAGCGGTGTAAGTCTATGTGC-3';

[0065] ScRGA-6RL2-VIGS-R:5'-CAAGCTAGCGAGCCTCTTCATAACAGGAC-3'。

[0066] (下划线所示序列为NheI酶切识别位点)

[0067] PCR扩增产物的核苷酸序列如SEQ ID No.1中自5'末端起第3396位至第4103位核苷酸所示。

[0068] Nhe I酶切PCR扩增产物,得到基因片段;Nhe I酶切BSMV-VIGS系统载体γ质粒的Nhe I位点(RNA γ链γb基因后),得到载体大片段;将基因片段与载体大片段连接,得到重组质粒。

[0069] 以引物ScRGA-6RL2-VIGS-F以及引物γ-strain-p5'-CAACTGCCAATCGTGAGTAGG-3'对重组质粒进行PCR扩增鉴定,阳性克隆为SEQ ID No.1中自5'末端起第3396位至第4103位基因片段按基因表达方向的反向插入γ质粒的Nhe I位点,将该重组质粒命名为γ-ScRGA-6RL2重组质粒。

[0070] γ-ScRGA-6RL2与α和β质粒共同构成了可沉默ScRGA-6RL2基因的完整重组病毒载

体系统BSMV:ScRG-6RL2。

[0071] 图1为大麦条纹花叶病毒 (BSMV) 载体结构示意图,图中分别为 α , β 和 γ 链的结构。

[0072] (二) BSMV-VIGS实验

[0073] 1、重组病毒载体的制备

[0074] 具体制备程序如下:

[0075] 按照GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) 说明书分别抽提BSMV病毒载体 α 、 β 、 γ 、 γ -ScRG-6RL2质粒,其中 α 、 γ 、 γ -ScRG-6RL2用MluI, β 用SpeI分别进行线性化酶切。体外转录反应按照RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) 说明书进行操作:

[0076] 线性化质粒6.5 μ l,5 $\times$ Transcription Buffer4.0 μ l,Cap1.5 μ l,rNTP PreMix6.0 μ l,Enzyme Mix2.0 μ l,反应总体积20.0 μ l,37℃反应4小时,转录产物置-70℃保存备用。

[0077] α 、 β 和 γ (三个质粒构成BSMV病毒空载体) 及 α 、 β 和 γ -ScRG-6RL2 (三个质粒构成BSMV:ScRG-6RL2重组病毒载体) 三链转录物均用DEPC处理过的水稀释3倍后等体积混合,加入等体积的2 $\times$ GKP Buffer (GKP Buffer含有50mM甘氨酸 (glycine),30mM K₂HP0₄,pH9.2,1%膨润土 (bentonite),1%硅藻土 (celite)),分别得到BSMV病毒空载体溶液以及BSMV:ScRG-6RL2重组病毒载体溶液。

[0078] 2、实验植物材料的培养及接种

[0079] 将小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104R播种于营养土中,待生长至二叶期,取8-10 μ l BSMV:ScRG-6RL2重组病毒载体溶液涂抹接种于小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104R平展的第二叶上,10分钟后用灭菌超纯水喷施叶面,覆保鲜膜保湿24小时,之后转为22℃正常条件培养,得到转BSMV:ScRG-6RL2植株。将小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104R接种BSMV病毒空载体溶液,得到转BSMV植株作为阴性对照 (CK),将小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104R涂抹1 $\times$ GKP (buffer模拟接种),得到Mock植株作为空白对照 (Mock)。

[0080] 3、病毒诱导ScRG-6RL2基因沉默的RT-PCR验证

[0081] BSMV-VIGS系统沉默ScRG-6RL2基因效果的具体检测方法如下所述:

[0082] 将步骤2获得的转BSMV:ScRG-6RL2植株、转BSMV植株及Mock植株正常条件下培养10天后,取第三叶按照实施例1中的方法提取总RNA,反转录后通过定量PCR检测ScRG-6RL2基因的表达。设置Actin为内参。

[0083] 检测检测ScRG-6RL2的引物如下:

[0084] ScRG-6RL2-Q-F:5'-ATGAAGAGGCTCCCTACATG-3';

[0085] ScRG-6RL2-Q-R:5'-CTAATCTCCGAGAAGGCAT-3'。

[0086] 检测Actin的引物如下:

[0087] Actin-F:5'-CAACGAGCTCCGTGTCGCA-3';

[0088] Actin-R:5'-GAGGAAGCGTGTATCCCTCATAG-3'。

[0089] ScRG-6RL2基因的相对表达量的检测结果如图2所示。

[0090] 图2中,MOCK为Mock植株;CK为转BSMV植株;BSMV:ScRG-6RL2为转BSMV:ScRG-6RL2植株。

[0091] 图2表明,与转BSMV植株以及Mock植株相比,转BSMV:ScRG-6RL2植株的ScRG-

6RL2转录水平显著下降。(图中的相对表达量通过 $\Delta\Delta C_T$ 法计算得到,ABI7500型荧光定量PCR仪自带计算公式)。

[0092] 4、小麦叶片白粉病菌接种及观察

[0093] 以上接种成功的材料10天后,在转BSMV:ScRGA-6RL2植株和转BSMV植株上可以观察到明显的病毒斑。

[0094] Mock植株、转BSMV植株以及转BSMV:ScRGA-6RL2植株在第四叶平展后(约16天)接种白粉病菌系E18,接种14天后观察第四叶发病情况。结果没有接种病毒的Mock植株的叶片产生过敏性坏死斑,表现典型的过敏反应(HR),反应型为0级。转BSMV植株的叶片除了产生褪绿病毒条斑外,也出现了HR反应。相反,ScRGA-6RL2基因沉默效果明显的转BSMV:ScRGA-6RL2植株的HR反应丧失,出现明显的白粉病孢子堆,反应型为3-4级,结果如图3所示。

[0095] 图3中,MOCK为Mock植株;CK为转BSMV植株;BSMV:ScRGA-6RL2为转BSMV:ScRGA-6RL2植株。

[0096] 以上结果表明,ScRGA-6RL2基因表达量的降低使得小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104R对白粉病菌系E18由抗病转为感病,说明ScRGA-6RL2基因是TAM104R抗白粉病过程中的一个重要基因。

[0097] 三、利用表皮细胞瞬时表达验证ScRGA-6RL2的功能

[0098] 小麦抗白粉病功能的发挥是单细胞的自主行为,并且白粉病菌只侵染寄主叶片的表皮细胞。因此,表皮细胞瞬时表达是验证小麦抗白粉病基因功能的一项有效技术。将目标基因通过基因枪随机导入到离体小麦叶片表皮细胞中,并同时共转化一种报告基因来标记阳性转化细胞,转化后高密度接种白粉菌孢子,在单细胞基础上分析阳性细胞内抗病相关基因表达对白粉菌侵染的影响。这种方法是研究小麦抗白粉病基因功能最快捷的方法。

[0099] (一)表皮细胞瞬时表达载体构建

[0100] 以pMD19-T-ScRGA-6RL2为模板,以如下引物对进行PCR扩增,得到PCR扩增产物。

[0101] ScRGA-6RL2-166-HindIII-F:5'-ATTCAAGCTTCATTCCAATGGCAGAGC-3';

[0102] ScRGA-6RL2-166-EcoRI-R:5'-CCTGCGAATTCATGGCACTAACAAATG-3'。

[0103] (下划线所示序列分别为HindIII和EcoRI酶切识别位点)

[0104] PCR扩增产物为3844bp的片段,该片段含有的核苷酸序列如SEQ ID No.1中自5'末端起第119位至第3941位所示。

[0105] HindIII和EcoRI双酶切PCR扩增产物,得到基因片段;HindIII和EcoRI双酶切载体pJIT166,得到载体大片段;将基因片段与载体大片段连接,得到重组质粒,将其命名为pJIT166-ScRGA-6RL2,将pJIT166-ScRGA-6RL2送测序,结果正确。

[0106] (二)基因枪介导的表皮细胞瞬时表达转化

[0107] 1、在普通营养土中种植感病小麦品种Chancellor和不含有Pm20基因的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104S,一周后分别取两品种的幼苗第一片叶尖部,平铺于苯板(1%琼脂,灭菌,加入经过无菌过滤的苯并咪唑,至终浓度为85 μ M)中央,每板放5-7片叶子。

[0108] 2、称取8.5毫克金粉(1.0 μ m,Bio-Rad公司)于1.5毫升的离心管中,65℃烘干4小时。加入体积百分含量为70%的乙醇水溶液,震荡5分钟,静置15分钟,离心2秒,弃上清;加入1.0毫升灭菌去离子水,震荡2分钟,静置1分钟,离心2秒,弃上清。重复3次;加入1.0毫升体积百分含量为50%甘油的水溶液,震荡充分混匀。-20℃保存备用。

[0109] 3、取出金粉震荡5分钟,取等摩尔的pJIT166-GUS质粒(结构如图4所示)和pJIT166-ScRGA-6RL2质粒,共 ≤ 1.0 微克,补水至5.0微升;取50.0微升金粉,加入混好的质粒,震荡3分钟;边震荡边逐滴加入50.0微升2.5M CaCl_2 ,再迅速加入20.0微升0.1M亚精胺,震荡3分钟;静置1分钟,离心2秒,弃上清;加入140.0微升70%乙醇,震荡混匀,离心2秒,弃上清;加入140.0微升100%乙醇,震荡混匀,离心2秒,弃上清;加入15.0微升100%乙醇,震荡混匀,置冰上备用。

[0110] 4、利用基因枪转化(PDS-100/He delivery system Bio-Red)进行转化,将载体盘置于载体盘holder(购自Bio-Rad公司)中,再次震荡混合上述金粉质粒混合物,轻轻涂于载体盘(购自Bio-Rad公司)上;将900psi可裂盘(购自Bio-Rad公司)放入螺旋头上,旋紧,滴加异丙醇密封;将终止屏放入终止屏holder(购自Bio-Rad公司)上,倒置放入载体盘,旋紧固定旋钮,置于基因枪内最上一层;将载有叶片的苯板放入托盘上,放在载体盘的下两层;抽取真空度到27inch,轰击叶片;将轰击过的叶片排列整齐,用3M透气胶带封口,放入培养箱培养,得到转ScRGA-6RL2基因的Chancellor和转ScRGA-6RL2基因的不含有Pm20基因的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104S的叶片。

[0111] 5、白粉病接种及表型观察

[0112] 将上述叶片在苯板上培养4小时后,高密度接种白粉病菌系E18,继续放入培养箱培养。培养44小时后,将叶片放入15毫升离心管中,倒入X-gluc染液(0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 10mM Na-EDTA, 5mM $\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}_6]$, 5mM $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}_6]$, 0.1% Triton X-100 (v/v), 20% 甲醇 (v/v), 1g/L X-gluc, 调至pH7.0), 抽真空3次,每次5分钟,37℃放置24小时。倒去染色液,尽量控干染液。加入脱色液(3倍储液:50%甘油,25%乳酸,25%的ddH₂O,使用前加入两倍体积的乙醇),室温放置两天。将叶片放入大量水中,浸泡清洗1小时;用考马斯亮蓝(0.6% (w/v) 考马斯亮蓝(Serva Blue R)溶于甲醇或者乙醇中)染色几秒钟,清水冲洗两次;将叶片置于载玻片上,用体积百分含量50%的甘油水溶液固定,盖上盖玻片,镜检。

[0113] 利用空载体pJIT166按照上述步骤1-4,得到转空载体pJIT166的Chancellor和转空载体pJIT166的不含有Pm20基因的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104S的叶片,分别作为转ScRGA-6RL2基因的感病小麦品种Chancellor和转ScRGA-6RL2基因的不含有Pm20基因的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104S的对照,同时进行步骤5的白粉病接种及表型观察。

[0114] 只统计被X-gluc染蓝的细胞,对于有孢子附着,但是没有吸器形成的细胞,记为抗病细胞;有明显手指状吸器形成的细胞记为感病细胞,结果如图5所示。

[0115] 图5中,图A中箭头表示白粉菌形成的吸器,图B箭头表示附着于细胞的白粉菌孢子。

[0116] 按下列公式计算吸器指数:吸器指数=感病细胞/(感病细胞+抗病细胞)×100%。

[0117] 吸器指数统计结果如图6所示。

[0118] 图6表明,与转空载体pJIT166的感病小麦品种Chancellor相比,在感病品种Chancellor叶片细胞中过表达ScRGA-6RL2基因,吸器指数由58.95%下降到37.80%,与转空载体pJIT166的不含有Pm20基因的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104S相比,在不含有Pm20基因的小麦/黑麦6RL/6BS易位系TAM104S中过表达ScRGA-6RL2基因,吸器指数由30.31%下降到19.52%。

[0119] 由此可见,在感病小麦品种叶片细胞中过表达ScRGA-6RL2基因对白粉病菌的吸器

形成均有明显的抑制作用,说明ScRGA-6RL2基因具有提高小麦抗白粉病的功能。

序列表

<110>中国科学院遗传与发育生物学研究所

<120> ScRGA-6RL2 及其编码基因与应用

<160>2

<210>1

<211>4374

<212>DNA

<213>小麦/黑麦 6RL/6BS 易位系 TAM104R (*Triticum aestivum*)

<400>1

[0001]

```

cccagaaagt caatgctcag aagatctcgg cgtctagctt gctcgcacca cegttctctt      60
ctccatcctg gactgcaaet gggattccct gtgttctgag tgtgcctga gctcttagca      120
ttccaatggc agagccggtg gtcaccatgg tggtcgggac gctgctgtcc actgtgaagg      180
agaaggcgct cagctacctc ctggaccagt acaagggtgat ggaggccatg gaggagcagc      240
aaagggtcct caagtgcagg ctaccaggca tcttggangt caccaccgac gggcagcatg      300
ccgcgtccca cagcgaaggg gccaaaggtt ggctcgagga ggtcaagagg gtggcctacg      360
aggcgaatga gatctttgat gagttcaagt acgaggcgct cegtcgtgag gccaaagatta      420
atgggcacta cagcaagctc ggcctcgatg cagtaagatt ctctgccacc cacaaccgtt      480
ttgcttccg ttacaaatg gagaagaagc tatgcagaat ctgcaggcc attgaggctc      540
ttgtggctga gatgaacgcc tttgacttta tatacagca gcaagcacca atatccatgc      600
actggcagca gatggatcat gttatctctg ctccaaagaa aatcattagc agatcgagaa      660
gccaaagatac taagaataat gtttaataac tattttgtca agctagcagt gcaactctca      720
cagttgttcc catcgttggc ataggggggc taggcaagac cacottagcg caactcattt      780
acaatgaacc tgaagttcag aagcatttcg agttgctgat atgggtttgt gtctctgaca      840
gctttgatgt ggattccctg gctcgaagaa ttgttgactt tcatctttaa aatagtataa      900
ttcaagcacc ttttaagaag ggccatttg atagcctcca aattgttcta agcggggcgt      960
gatacctcct tgtcttggt gatgtggga accgagagag cgataagtgg aaaaagctcg      1020
aggctccgct taccatggg ctaagggca gtgtgggttt ggtaaactac cgtgatgaag      1080
gagtcgcgaa aatgatggg acagttaaag cctataatct cgcagctttg gaggataact      1140
ttattgagga aattatcgag tcaagagcat tcagtctgca gaaggaagaa gaaaggccgg      1200
ccatgctagt taatatggtt ggtgagatcg cgaagagatg tegtggctct cctttgctg      1260
cagccgcact gggctctatg ctgcgtacaa agaccagcaa agaagaatgg aaggtatata      1320
cgagaagaag caacatttgc actgaggagt ctggaaattht accgatactc aagctcagct      1380
acaalgacat gtcactccag atgaagcaat gttttcttt ctgtgctgtg ttcccaagg      1440
attacgacat tgacgtggac aaactgatcc aactatggat cgcacatggc ttatcatagg      1500

```

	accaaaaaga agttagtcct gaaaccattg gccaatggat ttccaatgag ctgacctcaa	1560
	ggttattctt tgtagatgtg aagcaagtcg gactctcaca atatgaatac gctcgcccg	1620
	tgggtgggtga ttatcccaaa catacatgta aaatccaaga tcttatgcat gatgttgcat	1680
	tgtctacaat ggaaaaagaa tgtgctcttg cactaagga accatgtcag attgagtggc	1740
	ttccagatac agctcgccac ttatttttgt cttgtggaca accagaagct attttgaatg	1800
	aatctgtggc gaaaagatct ctggctatcc agacactaat atgtgcttgt tatatagaaa	1860
	tgggagttcg gttgcagcat ttatcaaaat acaactcttt gaaggcatta cggtccttt	1920
	taatttggg tggacattc catttgaaac caaagcatct gcataccta aggtacctg	1980
	atctctcaag aagtatatc gaactacttc ctgagatst aagcatttta tacagcctgc	2040
	aaacattgaa catatcttgc tgcctactca ttcgtcggt tccaagacaa atgaagtatt	2100
	tgcgcgcct ccgtcaccta tacactcatt gttgtccgaa gttgaggagc atgcctgggtg	2160
	gtctccgaaa actcgtgtcc ttgcagacac ttacatgctt tatagcaggt cctactggct	2220
	ctaagtgcag tgccattgga gagttgcaac atttaaatct tgggtgtcag ctagagctaa	2280
	ctcaactaga gaatgtgaca gaagaagatg caaagcggc aaatatcggc aataagaagg	2340
	aactgcagg cttgacatta aaatggagcg ttggttgctc tgatgatgct agagtgctga	2400
	agagtctgaa acctcatgat ggaactgtgg gtgtaaggst agaatcctac ggaggtaaca	2460
	colltccgac atggatggct atgtcgagaa acatggttga gatccaactt lccagtggtg	2520
	aaaaactgca atggctattc ggttgtgata ccactctcc ttttccaaat atgacggagc	2580
	llacactaca agatctgcat tgttgggaca gatggggga aaaaagtaac gaggtacaag	2640
	gacaagagat aatgtttctt cggtttgaga agttatctat tgttagctgt gcaaagttaa	2700
	cagcgttgcc ggacacacaa ctgcttggag aaactcatgg tacaatggca cggtcagcat	2760
	ttccagcatt gaaggacctc tacttggatt tcttggacsa cttttggaaa tgggaggcaa	2820
[0002]	ccgagggaa acagagagga cccatggtat ttctaaact tgagaaactt acaattatga	2880
	attgttctat cctgacagca ttaccggaag caccgggtga tggagattgt agtatggcac	2940
	tgtcagcatt tctgcattg aaagtctga aattgaaatg cttgagcaga tttgagagtt	3000
	ggcatgcagt cgaaggatct atgcgagaaa agttaatgtt tcccagctt gagcaattgg	3060
	ttgttataca ctgtgaaaac atgacaacat tatgtggaca accgaccttc cctagccttc	3120
	aggagatccg tatcgagttt tgtccaaagc tgacaacaaa agctaaatca ccaaagctca	3180
	gatgtttaca catggaggga aatgagggaag agatgttctt gtgggtagct agacatatga	3240
	cgtcactgac aaatatgaaa ctgaagaacc ttgagaaac qgaatcaaca ttggaggcgg	3300
	ctgatcatag tttgacacga gtggtggacg ccattggaas agggaaatga gatgatttcc	3360
	ccatggcaat tatgcactta agtggcttta agtctggtgt aaotgagcta tgtgcattgt	3420
	ttgtacggct tgaatgggtg tacatcaatg attgtgctgc gcttgtacac tggccagaga	3480
	aagagttcca aggccttgta tcttgcagga gcttagagat ttcttactgc aagcaactag	3540
	ttgataccg acaagctctt cctgctgagc catcagcaac attagaatcc tggattcagc	3600
	tcttgccaag cctcgagtat ctcaagatat ttcaatgtaa aagcatgcta gaggtattca	3660
	aactccctgc atccctgagg aaaaaggaaa ttcttgattg ttctaagctc aagtcctat	3720
	ttggtaggag gctgcagcag gaacatgcag cagcatcgaa tcttcaaggg ccatcactg	3780
	tatatccaga gttgtcatca tcatcagctg tatccagggc agagcattct ctctttccat	3840
	gtttagaatc aatatacata cgggggtgtc atagcttacc agggatcctt gatcttccc	3900
	cgctgcctaa ggaaattaaa attaccattt gttagtgcga tgagttgaga tcagtggaa	3960
	ctcactcggg agagatgcca tcttcttgg agaaactcga gaccggagga tgcgaacct	4020
	tctcaccctt accggatggg ccgcaagcat gctcgtctct ccaaaactct tacattcgaa	4080
	actgtcctgt tatgaagagg ctccctacat gctgcagca gcatatgagc agcattgaga	4140
	agaaatgtct agatgcccat cttgaagggc ctagtgtact gaagcccaag acatggagaa	4200
	atgccttctg cggagattag tgagctgtca gtatgcaaca ccataccat gggaaacatt	4260

```
gttggttaggc tctctgtaat gctttgctac tgcttggttc sagactccat ttctccaagg 4320
aaatggggg ccacgtggga agctaccaag cagcatgtag gagtaccac gacg 4374
```

<210>2

<211>1269

<212> PRT

<213>小麦/黑麦 6RL/6BS 易位系 TAM104R (*Triticum aestivum*)

<400>2

Met Ala Glu Pro Val Val Thr Met Val Val Gly Pro Leu Leu Ser Thr

1 5 10 15

Val Lys Glu Lys Ala Ser Ser Tyr Leu Leu Asp Gln Tyr Lys Val Met

20 25 30

Glu Gly Met Glu Glu Gln Gln Arg Val Leu Lys Cys Lys Leu Gln Ala

[0003]

35 40 45

Ile Leu Asp Val Ile Thr Asp Gly Glu His Ala Ala Ser His Ser Glu

50 55 60

Gly Ala Lys Ala Trp Leu Glu Glu Val Lys Arg Val Ala Tyr Glu Ala

65 70 75 80

Asn Glu Ile Phe Asp Glu Phe Lys Tyr Glu Ala Leu Arg Arg Glu Ala

85 90 95

Lys Ile Asn Gly His Tyr Ser Lys Leu Gly Ile Asp Ala Val Arg Phe

100 105 110

Phe Ala Thr His Asn Arg Phe Ala Phe Arg Tyr Lys Met Glu Lys Lys

115 120 125

Leu Cys Arg Ile Leu Gln Ala Ile Glu Val Leu Val Ala Glu Met Asn

	130	135	140	
	Ala Phe Asp Phe Ile Tyr Gln Gln Gln Ala Pro Ile Ser Met His Trp			
	145	150	155	160
	Gln Gln Met Asp His Val Ile Ser Asp Pro Lys Lys Ile Ile Ser Arg			
	165	170	175	
	Ser Arg Ser Gln Asp Thr Lys Asn Ile Val Asn Thr Leu Phe Cys Gln			
	180	185	190	
	Ala Ser Ser Ala Asn Leu Thr Val Val Pro Ile Val Gly Ile Gly Gly			
	195	200	205	
	Leu Gly Lys Thr Thr Leu Ala Gln Leu Ile Tyr Asn Glu Pro Glu Val			
	210	215	220	
[0004]	Gln Lys His Phe Glu Leu Leu Ile Trp Val Cys Val Ser Asp Ser Phe			
	225	230	235	240
	Asp Val Asp Ser Leu Ala Arg Arg Ile Val Asp Phe His Leu Lys Asn			
	245	250	255	
	Ser Ile Ile Gln Ala Pro Phe Lys Lys Gly Pro Leu Asp Ser Leu Gln			
	260	265	270	
	Ile Val Leu Ser Gly Arg Arg Tyr Leu Leu Val Leu Asp Asp Val Arg			
	275	280	285	
	Asn Arg Glu Ser Asp Lys Trp Lys Lys Leu Glu Val Arg Leu Thr His			
	290	295	300	
	Gly Ala Lys Gly Ser Val Val Leu Val Thr Thr Arg Asp Glu Gly Val			
	305	310	315	320

Ala Lys Ile Met Gly Thr Val Lys Ala Tyr Asn Leu Ala Ala Leu Glu
325 330 335

Asp Asn Phe Ile Glu Glu Ile Ile Glu Ser Arg Ala Phe Ser Leu Gln
340 345 350

Lys Glu Glu Glu Arg Pro Ala Met Leu Val Asn Met Val Gly Glu Ile
355 360 365

Ala Lys Arg Cys Arg Gly Ser Pro Leu Ala Ala Ala Ala Leu Gly Ser
370 375 380

Met Leu Arg Thr Lys Thr Ser Lys Glu Glu Trp Lys Ala Ile Ser Arg
385 390 395 400

Arg Ser Asn Ile Cys Thr Glu Glu Ser Gly Ile Leu Pro Ile Leu Lys
[0005] 405 410 415

Leu Ser Tyr Asn Asp Met Ser Ser Gln Met Lys Gln Cys Phe Ser Phe
420 425 430

Cys Ala Val Phe Pro Lys Asp Tyr Asp Ile Asp Val Asp Lys Leu Ile
435 440 445

Gln Leu Trp Ile Ala His Gly Phe Ile Met Asp Gln Lys Glu Val Ser
450 455 460

Pro Glu Thr Ile Gly Gln Trp Ile Phe Asn Glu Leu Thr Ser Arg Leu
465 470 475 480

Phe Phe Val Asp Val Lys Gln Val Arg Val Ser Gln Tyr Glu Tyr Ala
485 490 495

Arg Pro Val Val Gly Asp Tyr Pro Lys His Thr Cys Lys Ile Gln Asp

	500	505	510	
	Leu Met His Asp Val Ala Leu Ser Thr Met Glu Lys Glu Cys Ala Leu			
	515	520	525	
	Ala Pro Lys Glu Pro Cys Gln Ile Glu Trp Leu Pro Asp Thr Ala Arg			
	530	535	540	
	His Leu Phe Leu Ser Cys Gly Gln Pro Glu Ala Ile Leu Asn Glu Ser			
	545	550	555	560
	Val Ala Lys Arg Ser Leu Ala Ile Gln Thr Leu Ile Cys Ala Cys Tyr			
	565	570	575	
	Ile Glu Met Gly Val Arg Leu Gln His Leu Ser Lys Tyr Asn Ser Leu			
	580	585	590	
[0006]	Lys Ala Leu Arg Leu Leu Leu Asn Trp Gly Gly Gln Phe His Leu Lys			
	595	600	605	
	Pro Lys His Leu His His Leu Arg Tyr Leu Asp Leu Ser Arg Ser Tyr			
	610	615	620	
	Ile Glu Ser Leu Pro Glu Asp Ile Ser Ile Leu Tyr Ser Leu Gln Thr			
	625	630	635	640
	Leu Asn Ile Ser Cys Cys Tyr Ser Leu Arg Arg Leu Pro Arg Gln Met			
	645	650	655	
	Lys Tyr Leu Thr Ala Leu Arg His Leu Tyr Thr His Cys Cys Pro Lys			
	660	665	670	
	Leu Arg Ser Met Pro Gly Gly Leu Arg Lys Leu Val Ser Leu Gln Thr			
	675	680	685	

Leu Thr Cys Phe Ile Ala Gly Pro Thr Gly Ser Lys Cys Ser Ala Ile			
690	695	700	
Gly Glu Leu Gln His Leu Asn Leu Gly Gly Gln Leu Glu Leu Thr Gln			
705	710	715	720
Leu Glu Asn Val Thr Glu Glu Asp Ala Lys Ala Ala Asn Ile Gly Asn			
725	730	735	
Lys Lys Glu Leu Arg Gly Leu Thr Leu Lys Trp Ser Val Gly Cys Ala			
740	745	750	
Asp Asp Ala Arg Val Leu Lys Ser Leu Lys Pro His Asp Gly Leu Leu			
755	760	765	
Gly Val Arg Ile Glu Ser Tyr Gly Gly Thr Thr Phe Pro Thr Trp Met			
[0007] 770	775	780	
Ala Met Ser Arg Asn Met Val Glu Ile Gln Leu Phe Gln Cys Glu Lys			
785	790	795	800
Leu Gln Trp Leu Phe Gly Cys Asp Thr Thr Phe Thr Phe Pro Asn Met			
805	810	815	
Thr Glu Leu Thr Leu Gln Asp Leu His Cys Leu Asp Arg Trp Trp Glu			
820	825	830	
Thr Ser Asn Glu Val Gln Gly Gln Glu Ile Met Phe Pro Arg Leu Glu			
835	840	845	
Lys Leu Ser Ile Val Ser Cys Ala Lys Leu Thr Ala Leu Pro Asp Thr			
850	855	860	
Thr Leu Leu Gly Glu Pro His Gly Thr Met Ala Arg Ser Ala Phe Pro			

865	870	875	880
Ala Leu Lys Glu Leu Tyr Leu Asp Phe Leu Asp Asn Phe Trp Lys Trp			
	885	890	895
Glu Ala Thr Glu Gly Thr Gln Arg Gly His Met Val Phe Pro Lys Leu			
900	905	910	
Glu Lys Leu Thr Ile Met Asn Cys Ser Ile Leu Thr Ala Leu Pro Glu			
915	920	925	
Ala Pro Val Asp Gly Asp Cys Ser Met Ala Leu Ser Ala Phe Pro Ala			
930	935	940	
Leu Lys Val Leu Lys Leu Lys Cys Leu Ser Arg Phe Glu Ser Trp His			
945	950	955	960
[0008] Ala Val Glu Gly Ser Met Arg Glu Lys Leu Met Phe Pro Gln Leu Glu			
	965	970	975
Gln Leu Val Val Ile His Cys Glu Asn Met Thr Thr Leu Cys Gly Gln			
980	985	990	
Arg Thr Phe Pro Ser Leu Gln Glu Ile Arg Ile Glu Phe Cys Pro Lys			
995	1000	1005	
Leu Thr Thr Lys Ala Lys Ser Pro Lys Leu Ser Met Leu His Met			
1010	1015	1020	
Glu Gly Asn Glu Glu Glu Met Phe Leu Trp Val Ala Arg His Met			
1025	1030	1035	
Thr Ser Leu Thr Asn Met Lys Leu Lys Asn Leu Glu Glu Thr Glu			
1040	1045	1050	

	Ser Thr	Leu Glu	Ala Ala	Asp His	Ser Leu	Thr Arg	Val Val	Asp
	1055			1060			1065	
	Ala Met	Glu Lys	Gly Asn	Arg Asp	Asp Phe	Pro Met	Ala Ile	Met
	1070			1075			1080	
	His Leu	Ser Gly	Phe Lys	Ser Gly	Val Thr	Glu Leu	Cys Ala	Cys
	1085			1090			1095	
	Phe Val	Arg Leu	Glu Trp	Leu Tyr	Ile Asn	Asp Cys	Ala Ala	Leu
	1100			1105			1110	
	Val His	Trp Pro	Glu Lys	Glu Phe	Gln Gly	Leu Val	Ser Leu	Arg
	1115			1120			1125	
	Ser Leu	Glu Ile	Ser Tyr	Cys Lys	Gln Leu	Val Gly	Tyr Ala	Gln
[0009]	1130			1135			1140	
	Ala Pro	Pro Ala	Glu Pro	Ser Ala	Thr Leu	Glu Ser	Ser Ile	Gln
	1145			1150			1155	
	Leu Leu	Pro Ser	Leu Glu	Tyr Leu	Lys Ile	Phe Gln	Cys Lys	Ser
	1160			1165			1170	
	Met Val	Glu Val	Phe Lys	Leu Pro	Ala Ser	Leu Arg	Lys Met	Glu
	1175			1180			1185	
	Ile Leu	Asp Cys	Ser Lys	Leu Lys	Ser Ile	Phe Gly	Arg Arg	Leu
	1190			1195			1200	
	Gln Gln	Glu His	Ala Ala	Ala Ser	Asn Leu	Gln Gly	Arg Ser	Pro
	1205			1210			1215	
	Val Tyr	Ser Glu	Leu Ser	Ser Ser	Ser Ala	Val Ser	Arg Ala	Glu

	1220		1225		1230
	His Ser Leu Phe Pro Cys Leu Glu Ser Ile Tyr Ile Arg Gly Cys				
	1235		1240		1245
[0010]	His Ser Leu Thr Gly Ile Leu Asp Leu Pro Pro Ser Leu Lys Glu				
	1250		1255		1260
	Ile Lys Ile Thr Ile Cys				
	1265				

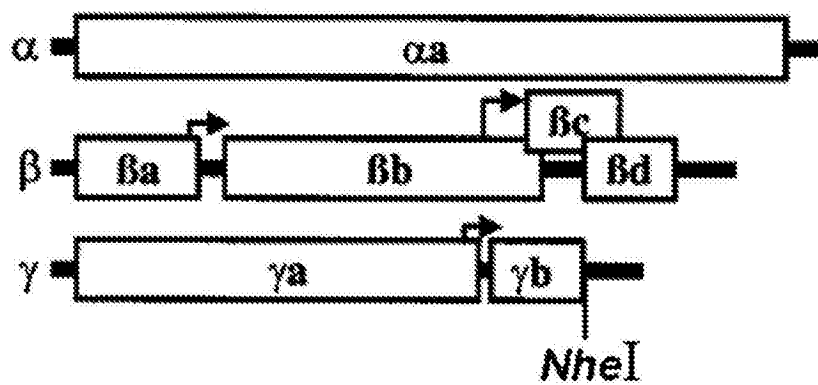


图1

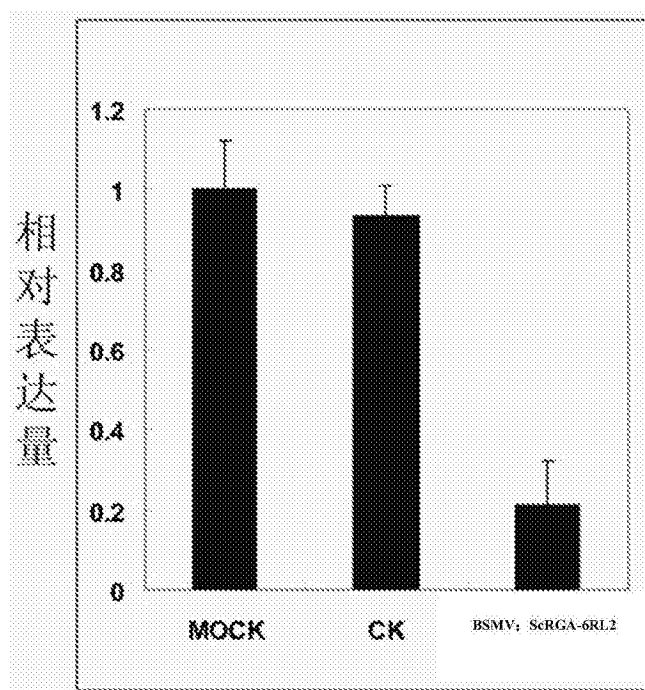


图2

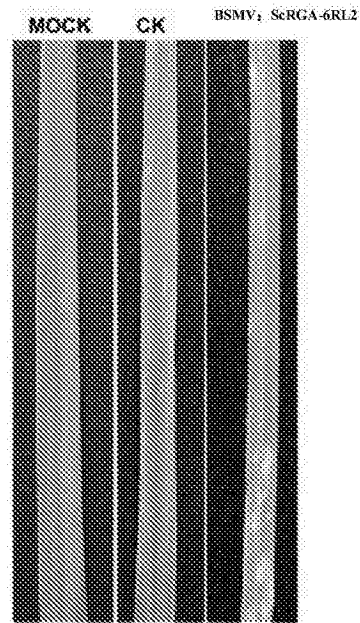


图3

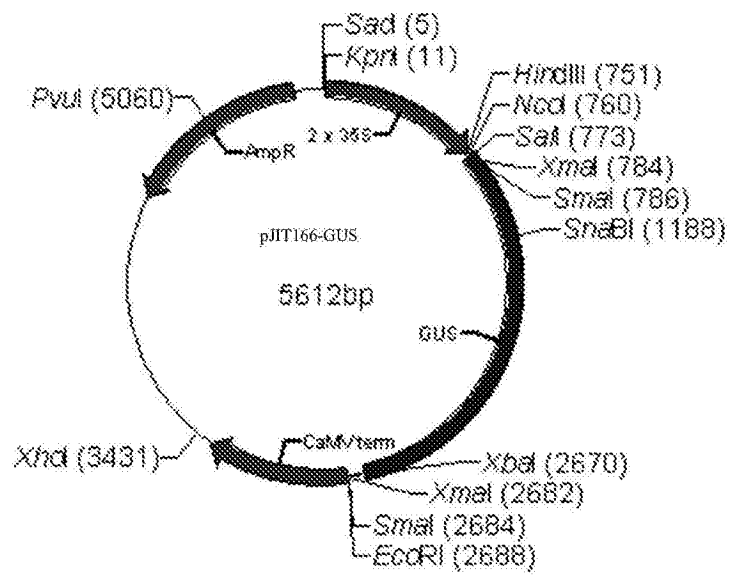


图4

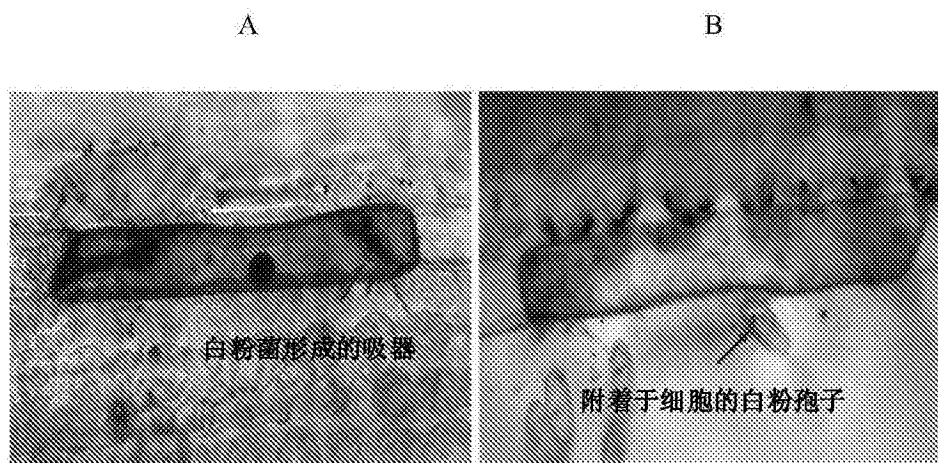


图5

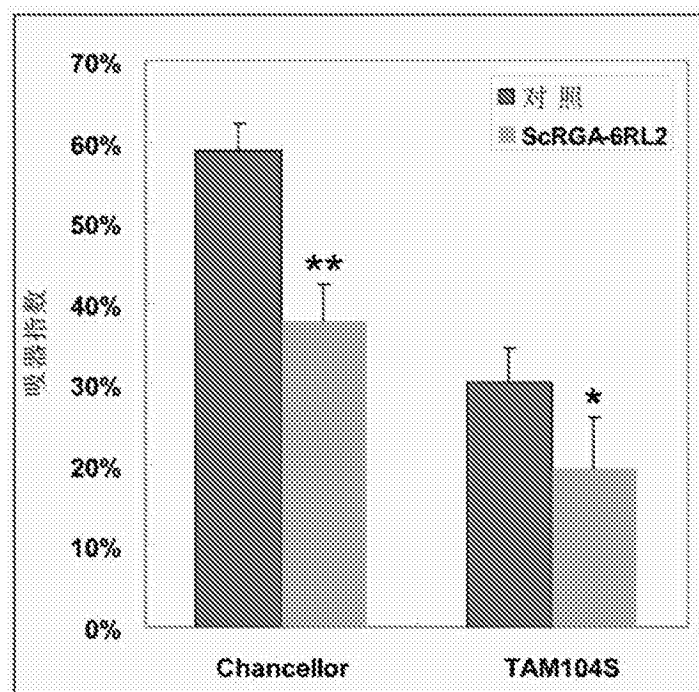


图6