



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102766611 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 12

(21) 申请号 201210240789. 9

审查员 奚静

(22) 申请日 2012. 07. 12

(73) 专利权人 昆明理工大学

地址 650093 云南省昆明市五华区学府路
253 号

(72) 发明人 林连兵 陈美杉 朱国东 魏云林
季秀玲 张琦

(51) Int. Cl.

C12N 9/16(2006. 01)

C12N 15/55(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5491086 A, 1996. 02. 13, 全文.

CN 1906292 A, 2007. 01. 31, 全文.

She Q. et al. .GI :27734269.

《NCBI》. 2012, 1.

招丽婵等. 病毒 dUTPase 研究进展. 《生命科学》. 2008, 第 20 卷 (第 02 期), 304-308.

权利要求书1页 说明书6页
序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

硫化叶菌病毒脱氧尿苷焦磷酸酶和编码这种酶的多核苷酸

(57) 摘要

本发明公开了一种硫化叶菌病毒 STSV2 脱氧尿苷焦磷酸酶和编码这种酶的多核苷酸, 该脱氧尿苷焦磷酸酶由嗜酸热硫化叶菌病毒 STSV2 基因组 DNA 所编码, 该脱氧尿苷焦磷酸酶在 55-80℃ 具有较高的催化活性。脱氧尿苷焦磷酸酶 (dUTPase) 是一种重要的 DNA 修饰酶, 能够降低细胞中的 dUTP / dTTP 比例, 防止 DNA 复制过程中 dUTP 浓度过高而引起错误掺入, 提高 DNA 复制的稳定性, 可以应用于 PCR 扩增技术中提高 DNA 扩增的效率和保真度。

1. 硫化叶菌病毒脱氧尿苷焦磷酸酶,其特征在于:其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。
2. 一种编码权利要求 1 所述脱氧尿苷焦磷酸酶的多核苷酸,其特征在于:其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

硫化叶菌病毒脱氧尿苷焦磷酸酶和编码这种酶的多核苷酸

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种来源于硫化叶菌病毒的脱氧尿苷焦磷酸酶,以及编码此酶的多核苷酸。

技术背景

[0002] 脱氧尿苷焦磷酸酶(dUTPase)是一种重要的DNA修饰酶,广泛存在于各种生物有机体中,可特意水解dUTP产生dUMP和ppi,dUMP经甲基化变为胸腺嘧啶脱氧核糖核苷三磷酸(dTTP),而dTTP又是合成DNA的主要成分之一。因此,dUTPase在生物体中具有双重基本功能:(1)降低细胞中的dUTP/dTTP比例,防止DNA复制过程中dUTP浓度过高而引起错误掺入,提供DNA复制的稳定性;(2)为DNA的合成提供必需病毒编码的原料dTTP。dUTPase具有种属特异性,且与病毒的毒力和高效复制密切相关。

[0003] 英国学者McGeoch在比较了不同来源的脱氧尿苷焦磷酸酶(dUTPase)的氨基酸序列后发现,来源于任何物种的dUTPase,虽然分子量大小不一,但其氨基酸序列中都有含有dUTPase的5个典型的高度保守的基序,分别为motif 1(AGFDL)、motif 2(GKSS)、motif 3(GIIDFGYTG)、motif 4(GQKFAQL)和motif 5(RGDKGFGS)。其中motif 3被认为是dUTPase的酶活性催化中心。McGeehan根据dUTPase的性质、结构可将其分为三个亚类:I型包括除大多数疱疹病毒外几乎所有来源的dUTPase(包括细菌、真菌、植物和后生动物以及一系列的病毒:痘病毒、逆转录病毒,腺病毒以及无脊椎动物、鱼类和两栖动物的疱疹病毒);II型则包括哺乳动物和禽类的疱疹病毒所编码的dUTPase。I型和II型虽然都有5个相似的保守motif,特异性底物都为dUTP,但它们在基因长度、motif排列、空间结构上有较大的差别。I型dUTPase通常为150个氨基酸残基,天然晶体结构由三个亚单位构成的同源三聚体(homotrimer)组成,五个保守motif排列顺序为1. 2. 3. 4. 5;而II型dUTPase氨基酸残基数则是I型的两倍,天然晶体结构为单体(monomer),并且其motif排列顺序为3. 1. 2. 4. 5。此外,研究表明,线虫等少数生物上编码的dUTPase在结构上与前两者有很大的不同,没有5个明显的保守motif,而且其水解底物除了dUTP还包括dUDP,暂归属于III型。分析和了解dUTPase的分类及结构特性有助于通过分类及结构特点实现结构蛋白到功能蛋白的研究的深入。

[0004] 所有生物都有相当数量的基因编码脱氧尿苷焦磷酸酶,主要是由于此酶是一种重要的DNA修饰酶,降低细胞中的dUTP/dTTP比例,防止DNA复制过程中dUTP浓度过高而引起错误掺入,提供DNA复制的稳定性,因此脱氧尿苷焦磷酸酶具有基础和应用研究价值。

发明内容

[0005] 本发明旨在提供一种嗜酸热硫化叶菌STSV2病毒的脱氧尿苷焦磷酸酶,该脱氧尿苷焦磷酸酶由分离自腾冲热海的嗜酸热硫化叶菌病毒STSV2所编码,其是含有SEQ ID NO. 1所示的氨基酸序列的多肽、多肽类似物或衍生物。

[0006] 本发明中所述多肽类似物或衍生物的氨基酸序列具有与SEQ ID NO. 1所示的氨基

酸序列至少 90% 的相同性。

[0007] 本发明的另一个目的是提供一种编码权利要求 1 所述脱氧尿苷焦磷酸酶的多核苷酸, 其具有 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列或其互补序列、或与 SEQ ID NO. 2 所示核苷酸序列具有至少 80% 相同性的多核苷酸及其互补序列。

[0008] 本发明的另一个目的是提供编码脱氧尿苷焦磷酸酶的多核苷酸的表达载体及其表达方法。

[0009] 本发明的有益效果如下:

[0010] 此酶是一种重要的 DNA 修饰酶, 能防止 DNA 复制过程中 dUTP 浓度过高而引起错误掺入, 提供 DNA 复制的稳定性, 因此脱氧尿苷焦磷酸酶可以作为 DNA 扩增体系的添加物, 以提高 DNA 扩增效率和保真性。

附图说明

[0011] 图 1 是本发明脱氧尿苷焦磷酸酶基因保守结构域分析示意图。

[0012] 图 2 是本发明脱氧尿苷焦磷酸酶基因的 PCR 产物, 其中 :M 是 Marker ;泳道 1 是脱氧尿苷焦磷酸酶基因 PCR 产物, 其大小为 516bp ;泳道 2 为阴性对照。

[0013] 图 3 是本发明的脱氧尿苷焦磷酸酶基因 PCR 产物、重组质粒、及质粒酶切电泳示意图, 其中 :M 为 Marker ;泳道 1 为脱氧尿苷焦磷酸酶 基因 PCR 产物, 其大小为 516bp ;泳道 2 为脱氧尿苷焦磷酸酶重组质粒经 Nco I 酶和 Hind III 酶双酶切电泳结果 ;泳道 3 为脱氧尿苷焦磷酸酶重组质粒 Nco I 酶切电泳结果 ;泳道 4 为脱氧尿苷焦磷酸酶重组质粒 Hind III 酶切电泳结果 ;泳道 5 为脱氧尿苷焦磷酸酶重组质粒电泳结果 ;泳道 6 为 pET32a 质粒电泳结果。

[0014] 图 4 是本发明脱氧尿苷焦磷酸酶纯化示意图, 其中 M 为 Marker ;泳道 1, 2, 3, 4 分别脱氧尿苷焦磷酸酶从镍柱上依次洗脱下来的洗脱液电泳分析图。

具体实施方式

[0015] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细说明, 但本发明保护范围不局限于所述内容, 实施例中使用的试剂和方法, 如无特殊说明, 均采用常规试剂和使用常规方法。

[0016] 实施例 1 :STSV2 病毒脱氧尿苷焦磷酸酶的克隆和表达

[0017] 1、STSV2 病毒脱氧尿苷焦磷酸酶基因的扩增, (以病毒 STSV2 DNA 为模板)

[0018] (1) STSV2 病毒脱氧尿苷焦磷酸酶基因的扩增所用引物序列如下:

[0019] 正向引物 :5' - CATGCCATGGACATGATTTTCAGTGATAGAG -3'

[0020] 反向引物 :5' - CCCAAGCTTTGAGAGCTTGGCCGGCGTCAC -3'

[0021] (2) 扩增体系如下:

[0022] 表 1 :扩增反应体系组分

[0023]

模板	10ng
EasypfuDNA polymerase	1 μ l
引物	各 1 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
10 \times Buffer Easypfu	5 μ l

双蒸水 ddH ₂ O	补充至 50μl
------------------------	----------

[0024] (3) 扩增条件如下：

[0025] 将反应体系混匀，先在 94℃ 预变性 4min，然后在 94℃ 变性 45s，55℃ 退火 45 s，72℃ 延伸 90 s，30 个循环后，72℃ 延伸 10min。反应完后取产物 3 μ l，在 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳分析(见图 2)。

[0026] 2、PCR 产物的胶回收纯化

[0027] (1) 在电泳仪中灌制 1.0% 琼脂糖凝胶；

[0028] (2) 将待分离纯化的 PCR 产物点样电泳，于适当位置停止电泳；

[0029] (3) 在紫外灯下切下含该目的片断的凝胶，转移到 1.5ml 的 Ep 管中；

[0030] (4) 用天根生物公司胶回收试剂盒进行目的片段的回收，回收方法按说明书操作进行。

[0031] 将基因序列提交 NCBI 数据库 Conserved Domain Database 蛋白质保守序列分析软件进行分析，STSV2-60 分析结果(见图 1)，图中显示脱氧尿苷焦磷酸酶的重要 Motif，包括活性位点、和一些 Trimer interface。

[0032] 3、重组表达载体的构建

[0033] 为了把目的基因片断连接到表达载体 pET32a，就需要使目的片断带有粘性末端的片断，即带有酶切位点。

[0034] (1) 脱氧尿苷焦磷酸酶基因片段的酶切鉴定

[0035] ① 酶切体系如下：

[0036] 表 2：反应体系组分

[0037]

dUTPase 基因片段	5μl (约 200ng)
10×H 缓冲液	1μl
<i>Nco</i> I	0.3μl
<i>Hind</i> III	0.3μl
双蒸水	3.4μl
总量	10μl

[0038] ② 酶切条件：37℃，过夜，回收脱氧尿苷焦磷酸酶基因片段。

[0039] (2) 带有粘性末端线性载体 pET32a 的制备

[0040] 为了将目的基因片断连接到表达载体 pET32a 上，就需要使目的片断带有粘性末端的片断，即带有酶切位点。同样，为了使目的片断能插入载体中，也需要使载体带有粘性末端，并且使它们的酶切位点相同。

[0041] A、质粒抽提：用质粒提取试剂盒(博亚)，操作步骤如下：

[0042] ① 菌种活化：无菌接种环蘸取 -80℃ 冻存的菌种保存液，三线法接种于氨苄 LB 平板，37℃ 培养 12-16 小时；

[0043] ② 增菌并收集菌体：取氨苄青霉素 5μl (终浓度 100μg/ml) 加入 5ml LB 培养基中；用接种环挑取阳性克隆，接种于 Amp⁺-LB 培养基中；然后放入 37℃ 培养箱中，摇床培养，过夜。并将培养的菌液加入到 5 ml 的离心管中，室温离心 5 min，5000 rpm，使菌体沉淀，弃上清液；

[0044] ③ 在离心管中加溶液 S1 (含 RNA 酶) 250 μl，振荡至菌体彻底悬浮，转入 1.5ml 的

EP 管中；

[0045] ④在 EP 管加入溶液 S2 250 μ l, 轻轻颠倒几次, 室温放置 5 min, 使溶液 I 的 RNA 酶把其中的 RNA 降解后, 加溶液 S3 400 μ l, 室温离心, 13000 rpm, 10 min;

[0046] ⑤将离心后所得的上清液转入 DNA 吸附柱中, 室温离心, 5000 rpm, 1 min, 回收两次, 弃下清;

[0047] ⑥在吸附柱中加入 500 μ l 漂洗液 (W1 溶液), 室温离心, 5000 rpm, 1 min;

[0048] ⑦然后加 750 μ l 漂洗液 (W2 溶液), 室温离心, 5000rpm, 1min, 弃下清 (重复一次); 再室温离心一次, 13000 rpm, 2 min;

[0049] ⑧将吸附柱移入新的 1.5 ml 的离心管中, 在吸附膜中央加入 70 μ l ddH₂O 水, 放置 1 min, 然后室温离心, 13000 rpm, 2 min, 弃上清, 得到质粒。

[0050] ⑨将所得的质粒取 1 μ l 进行电泳检测, 并定量。

[0051] B、质粒 pET32a 酶切鉴定。

[0052] ①酶切体系如下:

[0053] 表 3: 反应体系组分

[0054]

质粒	50 μ l (约 2000ng)
10 \times H 缓冲液	10 μ l
<i>Nco</i> I	3 μ l
<i>Hind</i> III	3 μ l
双蒸水	34 μ l
总量	100 μ l

[0055] ②反应条件: 37 $^{\circ}$ C, 过夜。

[0056] (3) 重组表达载体的构建、STSV2 病毒蛋白的诱导表达和纯化

[0057] ①将前面实验得到的带有粘性末端的线性载体 pET32a 和 STSV2 病毒脱氧尿苷焦磷酸酶基因片段, 通过连接转化并用菌落 PCR、酶切鉴定 (见图 3) 及测序验证, 即可得到重组表达载体。

[0058] ② STSV2 病毒脱氧尿苷焦磷酸酶蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

[0059] 将构建好的重组载体转化大肠杆菌 BL21, 含重组质粒的菌株经培养过夜, 菌液按 1% 比例接种到 30 ml Amp⁺-LB (氨苄青霉素终浓度 100 μ g/ml) 培养液中, 放入 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至其 OD 值为 1.0; 取出 4ml 菌液用作对照实验; 其余菌液加入诱导剂 IPTG (终浓度 100 μ g/ml) 放入 37 $^{\circ}$ C, 80 rpm 摇床培养诱导表达 9 小时 (诱导 3h 后开始取样, 每次取 4ml 菌液, 以后每两个小时取一次样, 诱导后菌体共取 4 次样)。

[0060] 4、STSV2 病毒脱氧尿苷焦磷酸酶蛋白 SDS-PAGE 检测

[0061] 从步骤 3(2)②中的样品中取出少量诱导后菌液测 OD 值, 根据菌液 OD 值不同取不同的菌液量, 使其菌体量相等, 5000rpm, 离心 10min, 弃上清; 加入 80 μ l 双蒸水, 20 μ l 5 \times 上样缓冲液, 振荡使菌体散开后; 在 98 $^{\circ}$ C 下放置 10min, 使菌体裂解, 释放蛋白质; 取诱导表达后的菌液, 制备样品; 将样品上样于电泳仪中在 120V, 70mA, 电泳 2h 后, 加入 100ml R250 考马斯亮蓝染色液染色, 摇床振荡, 100 rpm, 30min 后; 将染色液倒出, 用清水漂洗, 再加入适量脱色液 100 rpm, 10h, 最后用扫描仪扫描凝胶, 检测蛋白表达情况。

[0062] 5、脱氧尿苷焦磷酸酶蛋白的纯化

[0063] 利用上述方法大量诱导含重组质粒的 BL21 菌株,菌液经离心收集大肠杆菌菌体(4°C, 5,000x g, 10 min)。菌体悬浮于适量(使菌悬液的 OD₆₀₀ 达到 20)缓冲液 A[20 mM 磷酸钠, 500 mM NaCl, 30 mM 咪唑, pH 7.4] 中,冰上超声破碎细胞,4°C, 20,000x g 离心 10 min,上清用镍柱进行手工纯化,先用 10 倍柱体积 ddH₂O 清洗柱子,再用 10 倍柱体积 30mM 咪唑平衡柱子,样品上柱,用 10 倍柱体积 30mM 咪唑洗脱柱子,然后用 10 倍柱体积 150mM 咪唑洗脱柱子,再用 10 倍柱体积 500mM 咪唑洗脱柱子,用 10 倍柱体积 ddH₂O 清洗柱子,最后用 20% 无水乙醇填充柱子。用缓冲液(50 mM Tris-HCl, pH7.4)透析过夜,纯化的重组蛋白组分进行 SDS-PAGE (如图 4 所示),结果表明,脱氧尿苷焦磷酸酶蛋白分子量约为 38KD,表达正确。

[0064] 实施例 2:脱氧尿苷焦磷酸酶活性的检测

[0065] 1、实验试剂如下:

[0066] (1) 焦磷酸 (PPi) 储存液:称取 4.46g 焦磷酸钠结晶 (Na₄P₂O₇·10H₂O) 溶于 100ml 双蒸水中,

[0067] 配成 100 倍储存液。4°C 保存, 1:100 稀释使用。

[0068] (2) 硫酸溶液(10N):在 73ml 双蒸水中缓慢加入 27ml 浓硫酸,由于浓硫酸稀释是剧烈的放热反应,所以操作一定要缓慢并及时进行混匀。

[0069] (3) 钼酸试剂:将 2.5g 钼酸铵(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 溶于 100ml 硫酸溶液(10N H₂SO₄), 4°C 保存备用。

[0070] (4) 亚硫酸铵盐试剂:A 溶液,将 10g 亚硫酸氢钠 (NaHSO₃) 和 0.5g 亚硫酸钠 (Na₂SO₃) 溶于 100ml 双蒸水中,B 溶液:将 A 溶液用双蒸水 1:15 稀释。

[0071] (5) 巯基试剂:10ml β-巯基乙醇加入 90ml 双蒸水中,使用时新鲜配制,在 24 小时内用完。

[0072] 2、PPi 标准曲线的绘制

[0073] 测定不同浓度 PPi 标准溶液在 575nm 的光吸收值,并绘制 OD 值与焦磷酸的量,具体内容如下:

[0074] (1) 将焦磷酸 (PPi) 储存液 1:100 稀释成工作溶液;

[0075] (2) 取 10 个 Ep 管,分别加入焦磷酸工作液 (1mmol/L), 0、10、20...70 μl,每管再补加双蒸水至 800 μl,混匀;

[0076] (3) 每管依次加入 50ul 钼酸试剂,混匀;

[0077] (4) 每管再依次加亚硫酸试剂(A)试剂,混匀;

[0078] (5) 每管依次加入 50ul 巯基试剂,混匀;

[0079] (6) 室温静置显色 10min;

[0080] (7) 每管加入 100ul 亚硫酸试剂(B),混匀;

[0081] (8) 每管依次加入 50ul 巯基试剂,混匀;

[0082] (9) 每管依次再加入 100ul 无水乙醇,混匀;

[0083] (10) 每管分别取 10ul 进行 575nmPPi 光吸收度的测定;

[0084] (11) 所得结果用 Excel 进行系统分析,计算相关系数,绘制回归曲线。

[0085] 3、检测脱氧尿苷焦磷酸酶 dUTPase 的底物特异性

[0086] 测定 dUTPase 对 dUTP、dATP、dGTP、dCTP 或 dTTP 不同底物的催化能力,同时设各

种阴性对照,具体内容如下:

[0087] (1) 将 dUTPase 60℃ 预热 5min, 加入不同的底物溶液中, 同时设阴性对照;

[0088] (2) 取 24 个 Eppendorf 管, 分别加入各种不同组合的底物(3.5ul) 和 dUTPase (5ul), 其中 12 个 Eppendorf 管加 3ul Mg^{2+} 另外 12 管不加 Mg^{2+} , 酶促反应的具体组成见下表;

[0089] (3) 用 Tris-HCl (0.05 mol/L, pH8.0) 补齐反应总体积至 60ul, 混匀;

[0090] (4) 60℃ 水浴 15min, 再加双蒸水至 700ul 并混匀;

[0091] (5) 测定 575nmOD 值, 计算 PPi 的产量, (如表 4) 所示。

[0092] 表 4 :dUTPase 的底物特异性反应

[0093] Specificity of the recombined dUTPase for different Nucleotides

[0094]

Tube number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
dUTPase	0	5	5	0	5	5	5	5	0	0	0	0
dUTP	0	3.5	0	3.5	0	0	0	0	0	0	0	0
dATP	0	0	0	0	3.5	0	0	0	3.5	0	0	0
dGTP	0	0	0	0	0	3.5	0	0	0	3.5	0	0
dCTP	0	0	0	0	0	0	3.5	0	0	0	3.5	0
dTTP	0	0	0	0	0	0	0	3.5	0	0	0	3.5
(加入 Mg^{2+})	0.047	0.714	0.074	0.082	0.075	0.085	0.084	0.086	0.079	0.077	0.078	0.078
(没加 Mg^{2+})	0.051	0.088	0.072	0.083	0.077	0.084	0.081	0.083	0.080	0.077	0.075	0.077

[0095] 结果表明, 脱氧尿苷焦磷酸酶能以 dUTP 为底物水解 dUTP 产生磷酸根, 且 Mg^{2+} 对此酶的催化起促进作用, 同时证明了本发明的重组脱氧尿苷焦磷酸酶具有生物学活性。

[0096] 4、温度对 dUTPase 活性的影响

[0097] 纯化的 dUTPase 浓度为 0.143mg/ml, 将加入 Mg^{2+} 的 dUTPase 分别在 37℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、93℃ 预热 5min, 分别加入 3.5ul dUTP, 用 0.05mol/L pH 值为 7 的 Tris-HCl 补齐至 60ul, 在相应的水浴锅内反应 15min, 然后进行酶活的检测, 所得结果(如表 5) 所示;

[0098] dUTPase 活性单位定义为: 在 60℃ (最适温度) 每分钟水解 1umol dUTP 所需要的酶量为 1 个酶活力单位; 酶的比活性为每毫克蛋白中所含酶单位的数量(U/mg)。

[0099] 表 5: 温度对 dUTPase 的影响

[0100]

温度(℃)	37	45	50	55	60	65	70	75	80	93
OD (575nm)	0.0391	0.168	0.286	0.566	0.645	0.633	0.574	0.482	0.402	0.095
PPi (umol)	1.975	11.05	20.88	44.22	50.8	49.8	44.88	37.22	30.55	4.97
比活力	414.4	2320.2	4386	9276.4	10893	10672	9615.4	8000	6544.5	1065

[0101] 结果表明, 重组脱氧尿苷焦磷酸酶在 55-75℃ 具有较高的催化活性。

序列表

<110> 昆明理工大学

<120> 硫化叶菌病毒脱氧尿苷焦磷酸酶和编码这种酶的多核苷酸

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> 硫化叶菌病毒

<400> 1

Met Ile Phe Ser Asp Arg Asp Leu Lys Tyr Tyr Leu Glu Lys Gly Trp Ile Lys Ile Glu
1 10 20

Pro Leu Arg Glu Asp Thr Ile Arg Glu Asn Gly Val Asp Leu Arg Ile Gly Asn Glu Ile
21 30 40

Ala Arg Phe Lys Lys Asn Arg Ile Phe Asp Pro Asp Lys Asp Ser Ile Asp Asp Phe Ile
41 50 60

Glu Lys Glu Val Gly Asn Glu Phe Ile Ile Asn Pro His Glu His Ala Leu Leu Thr Thr
61 70 80

Glu Glu Tyr Val Arg Leu Pro Asn Asp Val Met Ala Phe Val Asn Leu Arg Ser Thr Phe
81 90 100

Ala Arg Leu Gly Leu Phe Ile Pro Pro Thr Ile Val Asp Ala Gly Phe Glu Gly Gln Leu
101 110 120

Thr Ile Glu Leu Val Gly Ser Glu Phe Pro Ile Lys Leu Lys Tyr Gly Met Arg Phe Ile
121 130 140

His Leu Ile Phe Ala Lys Thr Leu Thr Pro Val Glu Lys Pro Tyr Asn Gly Lys Tyr Gln

141	150	160
Lys Gln Met Gly Val Thr Pro Ala Lys Leu Ser Ser		
161	170	172

<210> 2

<211> 516

<212> DNA

<213> 硫化叶菌病毒

<400> 2

atgattttca	gtgatagaga	tttaaaatat	tacctggaaa	agggatggat	50
aaagattgag	ccattaagag	aagacactat	tagggaaaat	ggggtagatt	100
taaggattgg	taacgagatt	gctagattca	agaaaaatag	gattttttgat	150
cctgacaaag	attccataga	tgattttata	gagaaagagg	tggggaatga	200
gtttataata	aatceccatg	agcatgcatt	attaactaca	gaagaatatg	250
taagattgcc	taatgatgta	atggcattcg	taaactcttag	atcaacattt	300
gctaggtttag	gtcttttcat	tcctccaact	atcgtagatg	caggatttga	350
agggcaatta	actatagagt	tagtaggatac	agaattccca	ataaaaactaa	400
aatatggaat	gagattttatc	cacctaattct	tcgcaaaaac	actaacacca	450
gttgaaaagc	catataatgg	aaaatatcag	aaacaaatgg	gtgtgacgcc	500
ggccaagctc	tcaagt				516

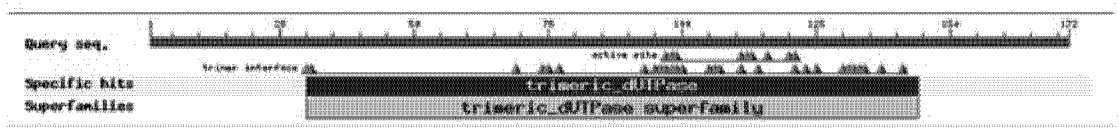


图 1

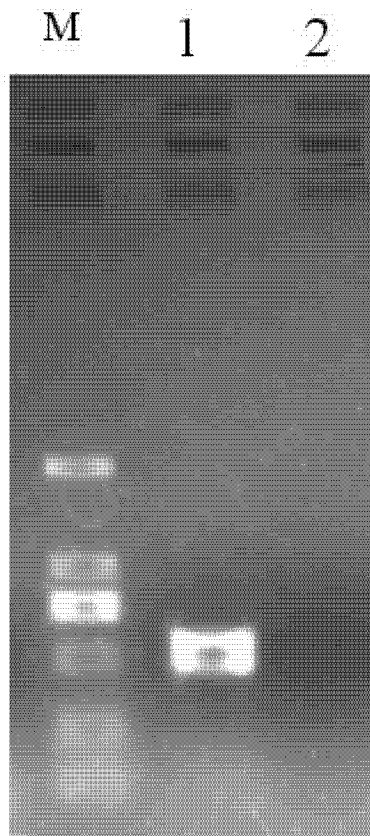


图 2

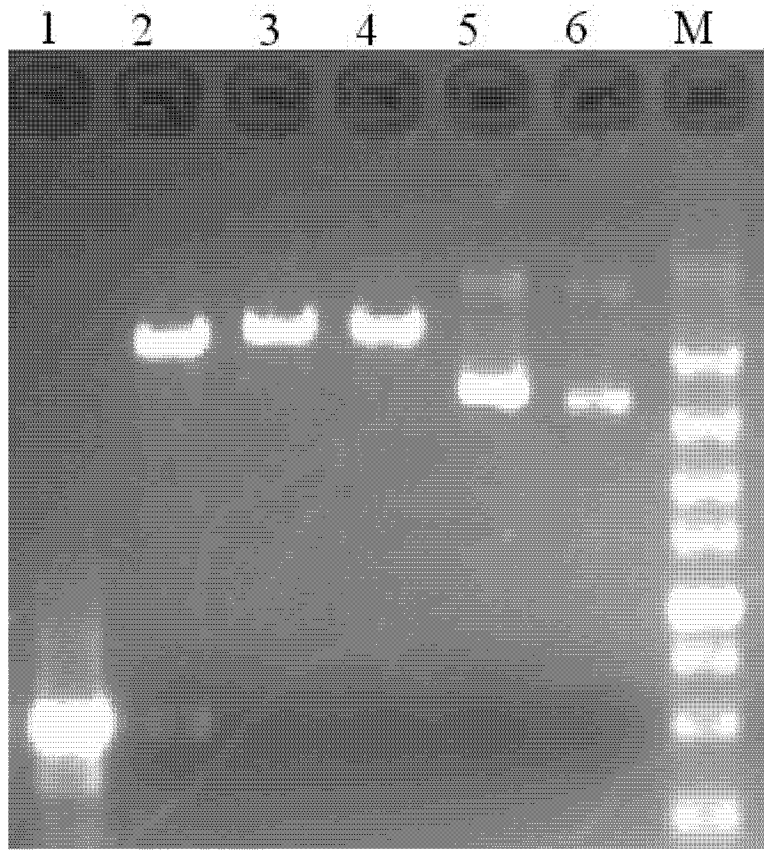


图 3

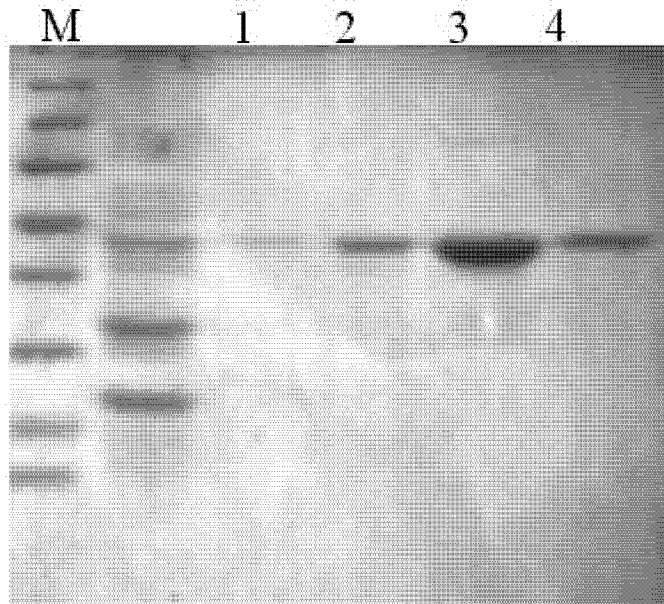


图 4