



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112279902 A

(43) 申请公布日 2021.01.29

(21) 申请号 202010040781.2 *A01H 5/00* (2018.01)
(22) 申请日 2020.01.15 *A01H 6/60* (2018.01)
(71) 申请人 四川农业大学 *A01H 6/46* (2018.01)
地址 610000 四川省成都市温江区惠民路 *A01N 47/44* (2006.01)
211号 *A01P 7/04* (2006.01)
(72) 发明人 郑爱萍 李平 孙宏伟 邓其明
王世全 李双成 朱军 梁越洋
(74) 专利代理机构 成都正华专利代理事务所
(普通合伙) 51229
代理人 李蕊
(51) Int. Cl.
C07K 14/325 (2006.01)
C12N 15/32 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表7页 附图2页

(54) 发明名称

一种Bt蛋白Cry1A-like及其编码基因和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种Bt蛋白Cry1A-like及其编码基因和应用。该蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,或如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸且具有同等活性的氨基酸序列。本发明提供Cry1A-like蛋白具有较好的杀虫活性,将其用于制备转基因植物,能够特异性杀灭害虫,并降低农药的使用量,降低成本,减少环境污染。同时,未发现害虫对该蛋白产生抗性的情况。因此,其具有重要的经济价值和应用前景,适合大规模应用于提高植物的抗虫性。

1. 一种Bt蛋白Cry1A-like,其特征在于,所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,或如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸且具有同等活性的氨基酸序列。

2. 一种编码权利要求1所述蛋白的基因,其特征在于,所述基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,或如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且具有同等活性的核苷酸序列。

3. 一种含有权利要求2所述基因的重组表达载体。

4. 一种含有权利要求4所述重组表达载体的宿主细胞。

5. 根据权利要求5所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为植物细胞。

6. 一种杀虫剂,其特征在于,以权利要求1所述蛋白为活性成分,以及其在药学上可接受的辅助成分。

7. 权利要求1所述蛋白在提高植物抗虫性能中的应用。

8. 权利要求2所述基因在培育转基因植物、制备杀虫剂或提高植物抗虫性能中的应用。

一种Bt蛋白Cry1A-like及其编码基因和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种Bt蛋白Cry1A-like及其编码基因和应用。

背景技术

[0002] 在人类生产过程中,虫害是造成农业生产损失及影响人类健康的重要因素。据FAO统计,全世界农业生产每年因虫害造成的经济损失高达14%,病害损失达12%,草害损失达11%。损失额高达1260亿美元,相当于中国农业总产值的一半,英国的4倍多。为了减少这些损失,多年来,对农作物害虫及蚊虫普遍采用化学防治手段进行防治,但由于化学农药的长期、大量使用,造成了对环境的污染,农副产品中农药残留量增加,给人类的生存和健康带来了危害。此外,化学农药在杀灭害虫的同时,也杀伤了天敌及其它有益物,破坏了生态平衡。与化学防治相比,生物防治具有安全、有效、持久的特点。并且避免了化学防治带来的一系列问题。因此,生物防治技术成了人们研究的热点。在生物杀虫剂中,苏云金芽孢杆菌是目前世界上用途最广、产量最大的一类微生物杀虫剂。

[0003] 苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称Bt)是一种革兰氏阳性细菌,它的分布极为广泛,在芽孢形成的同时可形成具有杀虫活性的由蛋白质组成的伴胞晶体,又名杀虫晶体蛋白(*Insecticidal crystal proteins*,简称ICPs),ICPs是由cry基因编码的,对敏感昆虫有强烈毒性,而对高等动物和人无毒性。目前在农田害虫、森林害虫及卫生害虫的防治中Bt已成为化学合成农药的有力替代品,Bt还是转基因抗虫工程植物重要的基因来源。

[0004] 自1981年Schnepf从菌株HD-1中克隆了第一个能表达杀虫活性的基因以来,人们已经分离克隆了500多种编码杀虫晶体蛋白的基因,根据编码的氨基酸序列同源性它们被分别确定为不同的群、亚群、类和亚类。一般而言,Cry1,Cry2和Cry9等毒蛋白对鳞翅目害虫有效;其中研究的最多的是Cry1和Cry9类蛋白,它们编码的杀虫晶体蛋白分子量为130-140kD,许多基因目前已被广泛应用于植物的鳞翅目害虫的防治。苏云金芽孢杆菌以色列亚种(*B. thuringiensis subsp. israelensis*,简称Bti)产生的毒素蛋白对蚊虫具有很好杀虫活性,被广泛用于蚊虫的防治。同时,Cyt蛋白具有溶细胞性,对某些Cry蛋白具有增效作用及延缓昆虫的抗性。

[0005] 以Bt杀虫晶体蛋白为基础的杀虫剂的使用已有50多年的历史,最初一直没有检测到昆虫对Bt的抗性,但是,上世纪80年中期开始,抗性不断在实验室及田间试验中得到证实(McGaughey, W.H. 1985. *Science*. 229:193-195),原因主要是持续使用单品种及亚致剂量的Bt以及Bt转基因抗虫植物的应用造成昆虫种群长期受到杀虫剂的选择压力。1985年,McGaughey报道仓库谷物害虫印度谷螟(*Plodia interpunctella*) 在Dipel (Bt subsp. kurstai HD-1的商品制剂)的选择压力下,繁殖15代后,抗性增加97倍;在高剂量选择压力下,抗性可增加250倍。1990年,在夏威夷首次证实大田中的小菜蛾对Bt杀虫剂产生了明显的抗性(Tabashnik, B.E., et al. 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:4120-4124),

上世纪90年代以来,在我国应用Bt杀虫剂时间较长的深圳、广州、上海等地,发现Bt杀虫剂对小菜蛾防治效果明显下降,意味着抗性已经形成(冯夏.1996.昆虫学报,39(3):238-244; Hofte,H.,1988.Appl.Environ.Microbiol.54:2010-2017)。目前发现在实验室及田间至少有十几种昆虫对Bt及其杀虫晶体蛋白产生了抗性,用选择压力数学模型预测到,在Bt转基因抗虫植物选择压力的条件下,昆虫将会产生抗性(Schnepf,E.,etal.1998.Mol.Biol.Rev.65(3):775-806)。另外,有研究证明Bti在大田的使用中尚未发现抗性,但是蚊虫对其抗性不断在实验室中得到证实,这种情况也可能在大田中出现(Georghiou G P,1997.Applied and Environmental Microbiology,63:1095-1101.)。

[0006] 为避免抗性昆虫所造成的损失,寻找新的高毒力Bt基因资源是解决这个问题的有效途径,这对我国的生物防治有着十分重要的意义。

发明内容

[0007] 针对现有技术中的上述不足,本发明提供一种Bt蛋白Cry1A-like及其编码基因和应用,能够提供一种新的Bt毒力蛋白资源。

[0008] 为实现上述目的,本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0009] 一种Bt蛋白Cry1A-like,该蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,或如SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸且具有同等活性的氨基酸序列。

[0010] 一种编码上述蛋白的基因,该基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,或如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且具有同等活性的核苷酸序列。

[0011] 本发明从四川省成都市地区土壤中分离得到的苏云金芽孢杆菌新菌株BN23-5,该菌株已于2014年7月14日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101)保藏,分类命名为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),保藏号为CGMCC No.9448。

[0012] 通过对BN23-5的毒力测试表明,BN23-5对鳞翅目害虫等具有极高的毒力。根据cry1类基因保守序列设计一对特异引物,扩增其基因组DNA,结果表明该菌株中存在cryI类基因,进一步设计其全长基因引物,克隆得到Cry1A-like基因,其核苷酸序列如序列表SEQ ID No.1所示,全长为3543bp,分析表明,GC含量为39.20%,编码1181个氨基酸组成的蛋白,Cry1A-like蛋白的氨基酸组成如表1。

[0013] 表1 Cry1A-like蛋白的氨基酸组成

[0014]

氨基酸	百分比%	氨基酸	百分比%	氨基酸	百分比%
Ala (A)	6.17	Gly (G)	6.51	Pro (P)	4.37
Arg (R)	6.86	His (H)	2.14	Ser (S)	7.03
Asn (N)	6.00	Ile (I)	6.68	Ter (.)	0.09
Asp (D)	5.57	Leu (L)	9.43	Thr (T)	5.66
Cys (C)	1.54	Lys (K)	3.00	Trp (W)	1.37
Gln (Q)	3.26	Met (M)	0.51	Tyr (Y)	4.88

Glu (E)	8.48	Phe (F)	3.86	Val (V)	6.60
---------	------	---------	------	---------	------

[0015] 本发明的基因和蛋白质可以从Bt菌株BN23-5中克隆或分离得到,或者通过DNA或肽合成的方法得到。

[0016] 可将本发明基因与表达载体可操作地连接,得到能够表达本发明蛋白的重组表达载体,进而可以通过诸如农杆菌介导法、基因枪法、花粉管通道法等转基因方法,将所述表达载体导入宿主,得到转Cry1A-like基因的转化体,例如农作物或者果树等植物,使其具备抗虫活性。

[0017] 应当理解,本领域技术人员可根据本发明公开的蛋白Cry1A-like的氨基酸序列(SEQ ID No.2),在不影响其活性的前提下,取代、缺失和/或增加一个或几个氨基酸,得到所述蛋白的突变序列。例如在非活性区段,将第48位的Lys替换为Arg,或者将第717位的Leu替换为Ile,而不影响其活性。因此,本发明的Bt蛋白Cry1A-like还包括SEQ ID No.2所示氨基酸序列经取代、替换和/或增加一个或几个氨基酸,具有与Bt蛋白Cry1同等活性的由Cry1A-like衍生得到的蛋白质。

[0018] 在本发明的一个实施例中,Bt蛋白Cry1A-like重组表达载体的获得是通过将Cry1A-like基因插入到表达载体pET-28a(+)上构建得到重组表达载体pET-11。

[0019] 此外,还可以通过发酵本发明菌株BN23-5,得到含有Cry1A-like蛋白的发酵液,将其制备成杀虫剂,用于农作物害虫的防治。本领域技术人员还可以将上述基因转化细菌或真菌,通过大规模发酵生产本发明Bt蛋白。

[0020] 一种含有上述基因的重组表达载体。

[0021] 一种含有上述重组表达载体的宿主细胞。

[0022] 进一步地,宿主细胞为植物细胞。

[0023] 一种杀虫剂,该杀虫剂以上述蛋白为活性成分,以及其在药学上可接受的辅助成分。

[0024] 上述蛋白在提高植物抗虫性能中的应用。

[0025] 上述基因在培育转基因植物、制备杀虫剂或提高植物抗虫性能中的应用。

[0026] 本领域技术人员还可以根据本发明公开的Cry1A-like基因,将其转化棉花、玉米、水稻、蔬菜等农作物,使其具备相应的抗虫活性。例如:利用密码子的简并性,将Cry1A-like基因设计具有水稻偏好密码子的基因序列,再将合成的Cry1A-like基因序列与载体pCAMBIA1300连接,通过农杆菌介导转入到玉米基因组中,从而得到具有抗虫活性的转基因玉米品种。

[0027] 本发明的有益效果为:

[0028] 本发明提供Cry1A-like蛋白是一种Bt蛋白,具有较好的杀虫活性,将其用于制备转基因植物,能够特异性杀灭害虫,并降低农药的使用量,降低成本,减少环境污染。同时,未发现害虫对该蛋白产生抗性的情况。因此,本发明的Bt蛋白Cry1A-like具有重要的经济价值和应用前景,适合大规模应用于提高植物的抗虫性。

附图说明

[0029] 图1为克隆得到的Cry1A-like全长基因的凝胶电泳图;

[0030] 图2为重组质粒pET-11的酶切鉴定图谱;

[0031] 图3为Cry1A-like基因在E.coli BL21 (DE3) 中表达的SDS-PAGE检测图。

具体实施方式

[0032] 下面对本发明的具体实施方式进行了描述,以便于本技术领域的技术人员理解本发明,但应该清楚,本发明不限于具体实施方式的范围,对本技术领域的普通技术人员来讲,只要各种变化在所附的权利要求限定和确定的本发明的精神和范围内,这些变化是显而易见的,一切利用本发明构思的发明创造均在保护之列。

[0033] 实施例1Cry1A-like基因的克隆

[0034] 1、从四川省成都市地区土壤中分离得到的苏云金芽孢杆菌新菌株BN23-5,该菌株已于2014年7月14日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101)保藏,分类命名为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),保藏号为CGMCC No.9448。通过对BN23-5的毒力测试表明,BN23-5对鳞翅目害虫等具有极高的毒力。

[0035] 2、然后采用基因组DNA纯化试剂盒(购自赛百盛公司)提取菌株BN23-5的总DNA作为扩增Cry1A-like基因的模板,设计的引物序列具体如下所示,扩增体系见表2:

[0036] P1:5' -ATGGAAGTGAATAATCAAAATC-3'; (SEQ ID No.3)

[0037] P2:5' -CTATTCCTCCATAAGGAG-3' ; (SEQ ID No.4)

[0038] 表2PCR反应体系

	试剂	用量
	10×Buffer	2.5μL
	MgCl ₂ (25mM)	1.5μL
	模板 DNA	5μL
[0039]	dNTPs (2.5mM)	2μL
	<i>Taq plus</i> 聚合酶	0.2μL
	引物 P1	1μL
	引物 P2	1μL
	ddH ₂ O	Up to 25μL

[0040] 扩增程序为:94℃预变性5min;94℃变性50s,54℃50s,72℃延伸2min,30个循环;72℃延伸10min;4℃停止反应。

[0041] 扩增反应产物在1%琼脂糖凝胶上电泳,置凝胶成像系统中观察PCR扩增结果。结果如图1所示,其中,条带M为DNA marker;条带1为Cry1A-like基因。

[0042] 根据图1的检测结果可知,通过扩增得到了约为3543bp的序列,将该序列进行测序,其核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,与目的序列一致。

[0043] 实施例2Cry1A-like蛋白的获得

[0044] 根据Cry1A-like基因开放阅读框两端序列,设计并合成一对特异引物

[0045] 1ITF:5' -GCCGATCCATGGAGATAGTGAATAATCAGAAT-3' ; (SEQ ID No.5)

[0046] 1ITR:5' -GGGGTCGACCTAAAATTCTGCCTCAAAGGTTA-3' ; (SEQ ID No.6)

[0047] 5'端引物下划线部分碱基分别为BamH I和Sal I酶切位点。以BN23-5总DNA为模板进行扩增,酶切产物与同样进行双酶切后的载体pET-28a (+)连接,转化E.coli DH5α感受态

细胞,提取其质粒进行酶切电泳,其结果见图2,图2中条带1为重组质粒pET-1I的BamH I/SaI I双酶切产物;条带2为载体pET-28a;条带3为重组质粒pET-1I;条带4为插入的DNA;条带M为DNA marker。根据图2的电泳检测结果可知,插入的片断大小符合预期目的片段后。

[0048] 然后再转入受体菌*E.coli*.BL21 (DE3) (购买于北京全式金生物技术有限公司)。将重组质粒命名为pET-1I,含重组质粒的重组子命名为*E.coli*.BL21 (2L)。将阳性转化子于LB培养基中,在200r/min、37℃过夜培养,再将培养液按照1:100的比例转接到含有400mL LB培养液的1L三角瓶中,200r/min、37℃培养,当培养液的OD=600值达到0.6-0.8时,加入0.6mmol/L IPTG进行诱导表达12h,离心培养液收集菌体,弃上清,加入30mL 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 超声波破碎,用SDS-PAGE对表达蛋白进行检测,其结果见图3,其中,条带M为蛋白marker (分子量从上到下:120,100,80,65,50,40,25KDa);

[0049] 条带1为含有重组质粒pET-1I的*E.coli* BL21 (DE3) 未经IPTG诱导后菌体裂解液上清液;条带2为含有重组质粒pET-1I的*E.coli* BL21 (DE3) 经IPTG诱导后菌体裂解液沉淀;条带3为含有载体pET-28a的*E.coli* BL21 (DE3) 表达蛋白 (阴性对照)。

[0050] 根据图3的检测图谱可知,SDS-PAGE分析表明基因的表达产物在菌体超声破碎后的沉淀和上清液中,Cry1A-like分子量约为134.3kDa左右,与预测的蛋白分子量相符。

[0051] 实施例3Cry1A-like蛋白杀虫活性测定

[0052] 采用实施例2获得的Cry1A-like蛋白对小菜蛾、玉米螟和棉铃虫进行杀虫活性测定,其具体过程如下。

[0053] 1、小菜蛾的生测:将Cry1A-like蛋白配制成4,2,1,0.5,0.25,0.01μg/mL等6个不同的浓度梯度;选老嫩适中的卷心菜叶片洗净,晾干;紫外灯下照射15min,剪成2×2cm²大小,分放在不同浓度菌液中,浸泡5min后;取出沥去多余的液体,放在消毒的培养皿中晾干,并以*E.coli*.BL21 (DE3) 作为阴性对照,清水为空白对照,每个培养皿放4片叶片;选放健康的2-3龄小菜蛾20头;每处理重复3次,置室内,于3d后调查幼虫死亡情况。

[0054] 2、玉米螟的生测:将Cry1A-like蛋白配制成200,100,50,25,12.5,0.1μg/mL等6个不同的浓度梯度,将蛋白加入饲养玉米螟的饲料中混匀,以*E.coli*.BL21 (DE3) 作为阴性对照,清水为空白对照,然后每处理投入20头2-3龄的玉米螟,每个处理3次重复,7d后统计结果。

[0055] 3、棉铃虫的生测:将Cry1A-like蛋白配制成200,100,50,25,12.5,0.1μg/mL等6个不同的浓度梯度,将蛋白加入饲养棉铃虫的饲料中混匀,以*E.coli*.BL21 (DE3) 作为阴性对照,清水为空白对照,然后每处理投入20头2-3龄棉铃虫,每处理3次重复,3d后统计结果。最后用SPSS 10.0软件计算LC₅₀,其结果见表3。

[0056] 表3Cry1A-like的杀虫活性

	供试昆虫	LC ₅₀ /(μg/mL)	95%置信限/(μg/mL)
[0057]	小菜蛾	0.17	0.004-0.333
	玉米螟	1.66	1.064-2.450
	棉铃虫	26.31	15.086-36.413

[0058] 根据表3的检测结果可知,表达产物对小菜蛾、玉米螟和棉铃虫具有较高的杀虫活性,LC₅₀分别为0.17μg/mL、1.66μg/mL和26.31μg/mL;生测结果表明,*E.coli*.BL21 (DE3) 和空

白对照对小菜蛾、玉米螟和棉铃虫不具杀虫活性。表明本发明开发的Cry1A-like蛋白具有优异的杀虫活性,能够用于提升植物的抗虫性能、杀虫剂的制备等。

序列表

<110> 四川农业大学

<120> 一种Bt蛋白Cry1A-like及其编码基因和应用

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 3543

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

atggagatag tgaataatca gaatcaatgc gtgccttata attgtttgaa taatcctgaa 60
atcgaaatat tagaaggcga aagaatatca gttggtaaca ccccgatcga tatttctctg 120
tcgctggtgg aacttcttat tagtgaattt gttccaggcg gtggaattat aacgggattg 180
ttgaacattg tatggggatt tntaggtcct tcccaatggg acgcatttct tgctcaagtg 240
gaacagttaa ttaaccaaag aatagctgaa gctgtaagaa atacagcaat tcaggaatta 300
gagggaatgg cacgagtta tagaacctat gctactgctt ttgctgagtg ggaaaaagct 360
cctgatgacc cagagctaa ggaagcacta cgtacacaat ttacagcaac tgagacttat 420
ataagtggaa gaatatccgt tttaaaaatt caaaattttg agtacagct gttatcgggtg 480
tttgcccaag ctgcaaattt acatttatct ttattaagag acgtttgtgtt ttttgggcaa 540
agatgggggtg tttcaacgac aaccgtaa at aattactaca atgatttaac agaagagatt 600
agtacctata cagattatgc tgtacgctgg tacaatacgg gattagaacg tgtatgggga 660
ccggattcta gagactgggt aagatataat caatttagaa gagaattaac actaactgta 720
ttagatatcg tttctctatt tccgaactat gatagtagaa ggtatccaat tcgaacagtt 780
tcccaattaa caagagaaat ttatacaaac ccagtattag aaaattttga tggtagtttt 840
cgtggaatgg ctgagagaat agaacagaat attaggcaac cacatcttat ggatatcctt 900
aatacaataa ccatttatac tgatgtgcat agaggcttta attattggtc aggacatcaa 960
ataactgctt ctctcttagg gttttcagga ccagaattta cattcccttt atttggtaat 1020
gcagggaaacg cagctccacc cgtacttgtc tcattaacgg gtttggggat ttttagaaca 1080
ttatcttcac ctttttacag aagaattata ctcggttcag gtccaataa tcaggaactg 1140
tttgtccttg atggaacgga attttctttt gcttcctaa caactaatat accttctact 1200
atatacagac aaagaggaaac ggtcgattca ctagatttaa taccaccaca agataatagt 1260
gtgcccgcctc gtgcgggatt tagtcatcga ttaagccatg ttacaatgct gagccaagca 1320
gccggagcag tttacacctt gagagctcca acgttttctt ggcagcatcg tagtgctgaa 1380
tttaataata taattccttc atcacaattt acacaatac ctttaacaaa atctactaat 1440
cttggctctg gaactactgt cgttaaagga ccaggattta caggaggaga tattctacga 1500
agaacttcac ctggccagat ttcaacctta agagtaaata ttactgcacc attatcaca 1560
agatatcgcg taagaattcg ttatgcctct actacaaatt tacaattcca tacatcaatt 1620
gatggaagac ctattaatca ggggaatttt tcagcaacta tgagtagtgg gggttaattta 1680

```

cagtcgga gctttaggac tttaggtttt actactccgt ttaacttttc aaatggatca 1740
 agtgtattta cgtaagtgc tcaggtcttc aattcaggca atgaagtta tatagataga 1800
 attgaatttg ttccggcaga agtaaccttt gaggcagaat ttgatttaga aagagcccaa 1860
 gaggcggtga atgcgctgtt tacttctccc aatcaaactc ggttaaaaac agatataacg 1920
 gattatcata ttgatcaagt atccaatcta gttgagtgtt tatcagatga attttgtctg 1980
 gatgaaaaga gagaattatc cgaaaaagtc aaacatgcga agcgactcag tgatgagcgg 2040
 aatttacttc aagatccaaa ctttagaggc atcaatagac aaccagaccg tggttggaga 2100
 ggaagtacgg atattacat ccaaggtgga gatgacgtat tcaaagagaa ttacgtcaca 2160
 ctaccgggca cttttgatga gtgctatcca acgtatttgt atcaaaaaat agatgaatca 2220
 aaatataaag cctacactcg ttaccgatta agagggtaca tcgaggatag tcaagactta 2280
 gaaatctatt taatccgcta caatgcaaaa cacgaaaccg taaatgtacc aggtaccggg 2340
 ggggtatggc cactttctgt agaaaattca attggacctt gtggcgaacc gaatcgatgc 2400
 gcgccacacc ttgaatggaa tcctaatacta gagtgttctc gcagagacgg ggaaaaatgt 2460
 gcacaccatt cgcacattt ctcttggac attgatgttg gatgtacaga cttaaagag 2520
 gacttaggtg tatgggtgat attcaagatt aagacgcaag atggccatgc aagactagga 2580
 aatctagagt ttctcgaaga gaaaccatta ttaggggaag cactagctcg tgtgaaaaga 2640
 gcggagaaaa aatggagaga caaatgtgaa aaattggaat tggaaacaaa tattgtttat 2700
 aaagaggcaa aaaaatctgt agatgcttta tttgtgaact ctcaatatga tagattacag 2760
 gcggatacga atattgcat gattcatgcg gcagataaac gtgttcatag aatccgagaa 2820
 gcgtatcttc cagagttatc tgtgattccg ggtgtaaag cagacatttt cgaagaatta 2880
 gaagggcgta ttttcacagc ctactctcta tatgatgcga gaaatgtcat taaaacggt 2940
 aatttcaata atggcttacc atgttggaa gtgaaagggc atgtagatgt agaagaaca 3000
 aacaaccacc gttcagtcct tgtggtcca gaatgggaag cagaagtgtc ccaagaagtt 3060
 cgtgtctgtc caggacgtgg ctatatcctt cgcgttacag cgtacaaaga aggatatgga 3120
 gagggctgcg taacgatcca tgagattgaa gacaatacag acgaactgaa attcagcaac 3180
 tgtgtagaag aggaagtata tccaataaac acgtaactg gtaatgatta tactgagact 3240
 caagaagaat acgggggtgt atacacttcc cgtaactcgt gatatgacga aacttatgga 3300
 agcaattctt ccgtatcagc agattatgcg tcagtctatg aagcaaaagc gtatacagat 3360
 ggacgaagag agaatccttg tgaatttaac agaggatag gggattacac accactacca 3420
 gctggctatg tgacaaaaga attagagtac ttcccagaaa ccgataaggt atggattgag 3480
 atcggagaaa cagaaggaac attcatcgtg gacagcgtgg aattactcct tatggaggaa 3540

tag 3543

<210> 2

<211> 1180

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Met Glu Ile Val Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu

1

5

10

15

Asn Asn Pro Glu Ile Glu Ile Leu Glu Gly Glu Arg Ile Ser Val Gly
 20 25 30
 Asn Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Val Glu Leu Leu Ile Ser
 35 40 45
 Glu Phe Val Pro Gly Gly Gly Ile Ile Thr Gly Leu Leu Asn Ile Val
 50 55 60
 Trp Gly Phe Val Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Ala Gln Val
 65 70 75 80
 Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Ala Glu Ala Val Arg Asn Thr Ala
 85 90 95
 Ile Gln Glu Leu Glu Gly Met Ala Arg Val Tyr Arg Thr Tyr Ala Thr
 100 105 110
 Ala Phe Ala Glu Trp Glu Lys Ala Pro Asp Asp Pro Glu Leu Arg Glu
 115 120 125
 Ala Leu Arg Thr Gln Phe Thr Ala Thr Glu Thr Tyr Ile Ser Gly Arg
 130 135 140
 Ile Ser Val Leu Lys Ile Gln Asn Phe Glu Val Gln Leu Leu Ser Val
 145 150 155 160
 Phe Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Leu Leu Arg Asp Val Val
 165 170 175
 Phe Phe Gly Gln Arg Trp Gly Val Ser Thr Thr Thr Val Asn Asn Tyr
 180 185 190
 Tyr Asn Asp Leu Thr Glu Glu Ile Ser Thr Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
 195 200 205
 Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
 210 215 220
 Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
 225 230 235 240
 Leu Asp Ile Val Ser Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
 245 250 255
 Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
 260 265 270
 Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Met Ala Gln Arg Ile Glu
 275 280 285
 Gln Asn Ile Arg Gln Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Thr Ile Thr
 290 295 300
 Ile Tyr Thr Asp Val His Arg Gly Phe Asn Tyr Trp Ser Gly His Gln
 305 310 315 320
 Ile Thr Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro

	325		330		335
Leu Phe Gly Asn Ala Gly Asn Ala Ala Pro Pro Val Leu Val Ser Leu					
	340		345		350
Thr Gly Leu Gly Ile Phe Arg His Leu Ser Ser Pro Phe Tyr Arg Arg					
	355		360		365
Ile Ile Leu Gly Ser Gly Pro Asn Asn Gln Glu Leu Phe Val Leu Asp					
	370		375		380
Gly Thr Glu Phe Ser Phe Ala Ser Leu Thr Thr Asn Ile Pro Ser Thr					
385		390		395	400
Ile Tyr Arg Gln Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Leu Ile Pro Pro					
	405		410		415
Gln Asp Asn Ser Val Pro Ala Arg Ala Gly Phe Ser His Arg Leu Ser					
	420		425		430
His Val Thr Met Leu Ser Gln Ala Ala Gly Ala Val Tyr Thr Leu Arg					
	435		440		445
Ala Pro Thr Phe Ser Trp Gln His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn Ile					
	450		455		460
Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr Asn					
465		470		475	480
Leu Gly Ser Gly Ala Ala Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly					
	485		490		495
Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg Val					
	500		505		510
Asn Ile Ala Ala Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr					
	515		520		525
Ala Ser Thr Thr Asn Leu Gln Phe His Thr Ser Ile Asp Gly Arg Pro					
	530		535		540
Ile Asn Gln Gly Asn Phe Ser Ala Thr Met Ser Ser Gly Gly Ile Leu					
545		550		555	560
Gln Ser Gly Ser Phe Arg Thr Leu Gly Phe Thr Thr Pro Phe Asn Phe					
	565		570		575
Ser Ile Gly Ser Ser Val Phe Thr Leu Ser Ala Gln Val Phe Ile Ser					
	580		585		590
Gly Asn Gly Val Tyr Ile Asp Arg Ile Gly Phe Val Pro Ala Gly Val					
	595		600		605
Thr Phe Glu Ala Gly Phe Asp Leu Gly Arg Ala Gln Glu Ala Val Ile					
	610		615		620
Ala Leu Phe Thr Ser Pro Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Ile Thr					
625		630		635	640

Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp
 645 650 655
 Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His
 660 665 670
 Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe
 675 680 685
 Arg Gly Ile Asn Arg Gln Pro Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp
 690 695 700
 Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr
 705 710 715 720
 Leu Pro Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys
 725 730 735
 Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Arg Leu Arg Gly
 740 745 750
 Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn
 755 760 765
 Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Gly Val Trp Pro
 770 775 780
 Leu Ser Val Glu Asn Ser Ile Gly Pro Cys Gly Glu Pro Asn Arg Cys
 785 790 795 800
 Ala Pro His Leu Glu Trp Asn Pro Asn Leu Glu Cys Ser Cys Arg Asp
 805 810 815
 Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp
 820 825 830
 Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe
 835 840 845
 Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe
 850 855 860
 Leu Glu Glu Lys Pro Leu Leu Gly Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg
 865 870 875 880
 Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Cys Glu Lys Leu Glu Leu Glu Thr
 885 890 895
 Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Lys Ser Val Asp Ala Leu Phe Val
 900 905 910
 Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile
 915 920 925
 His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Arg Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro
 930 935 940
 Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Asp Ile Phe Glu Glu Leu

945	950	955	960
Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Tyr Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val			
	965	970	975
Ile Lys Asn Gly Asn Phe Asn Asn Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys			
	980	985	990
Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val			
	995	1000	1005
Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro			
	1010	1015	1020
Glu Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Glu			
1025	1030	1035	1040
Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asp Asn Thr Asp Glu Leu			
	1045	1050	1055
Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val			
	1060	1065	1070
Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Gly Gly Val Tyr			
	1075	1080	1085
Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Glu Thr Tyr Gly Ser Asn Ser Ser			
	1090	1095	1100
Val Ser Ala Asp Tyr Ala Ser Val Tyr Glu Ala Lys Ala Tyr Thr Asp			
1105	1110	1115	1120
Gly Arg Arg Glu Asn Pro Cys Glu Phe Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr			
	1125	1130	1135
Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro			
	1140	1145	1150
Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Gly Thr Glu Gly Thr Phe			
	1155	1160	1165
Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Ser Leu Met Glu Glu Ter			
	1170	1175	1180

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

atggaagtga ataatacaaaa tc 22

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4
ctattcctcc ataaggag 18
<210> 5
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 5
gccggatcca tggagatagt gaataatcag aat 33
<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 6
ggggtcgacc taaaattctg cctcaaaggt ta 32

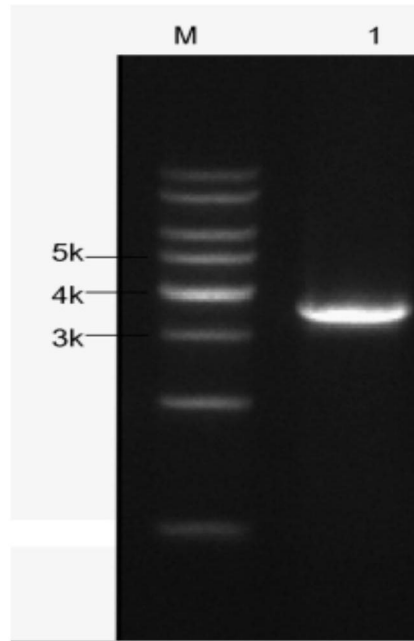


图1

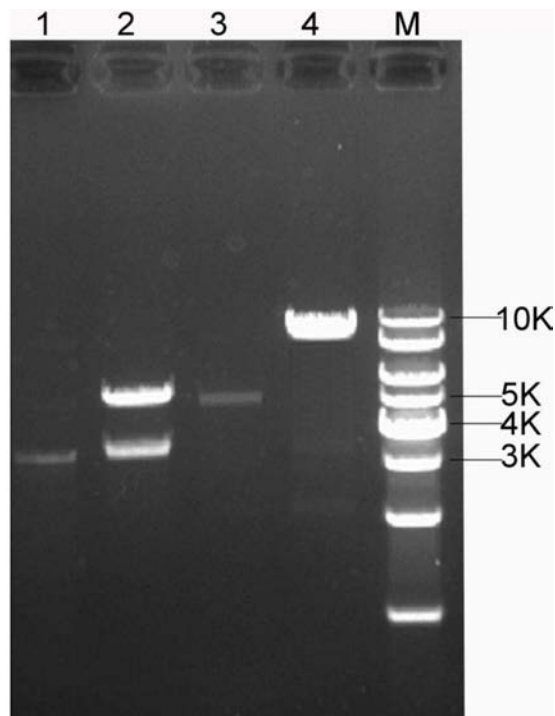


图2

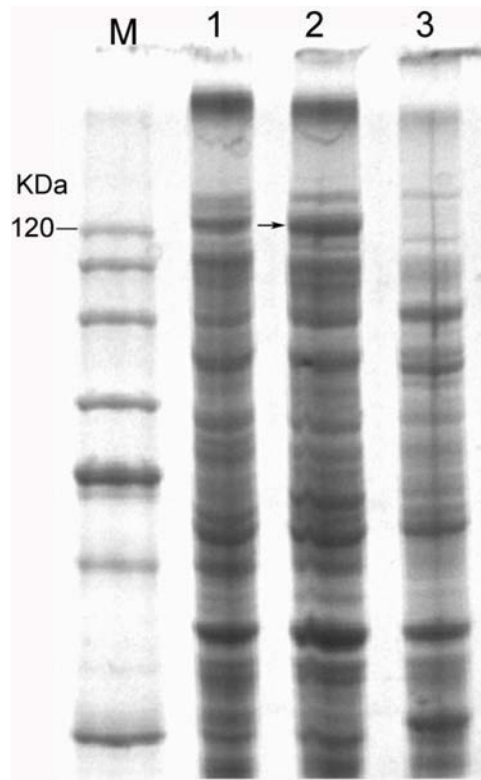


图3