



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103149111 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(21) 申请号 201310060405.X

(22) 申请日 2013.02.26

(71) 申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号

(72) 发明人 杜立萍 吴春生 邹玲 王平

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 周烽

(51) Int. Cl.

G01N 5/02 (2006.01)

权利要求书2页 说明书8页
序列表12页 附图5页

(54) 发明名称

一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法,首先在 HEK-293 细胞表面表达了带有 His₆-tag 标签的嗅觉受体蛋白 ODR-10,并提取出来将其利用适配体有效地固定在石英晶体微天平表面构建成嗅觉受体传感器;通过测试一系列确定浓度气味物质丁二酮,得到丁二酮浓度-谐振频率改变量标准曲线;然后测试未知浓度待测气体,根据石英晶体微天平谐振频率的改变量和丁二酮浓度-谐振频率改变量标准曲线得到待测气体中气味物质丁二酮的浓度。本发明方法所需仪器简单、操作方便,解决了敏感元件嗅觉受体蛋白 ODR-10 与石英晶体微天平的稳定耦合,实现了快速、特异地检测气味物质丁二酮。

1. 一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

(1) 制备嗅觉受体蛋白 ODR-10;

(2) 固定嗅觉受体蛋白 ODR-10 在石英晶体微天平表面构建嗅觉受体传感器;

(3) 将洁净空气以 1mL/s 的流速泵入检测腔内,待石英晶体微天平传感器的谐振频率达到一个稳定的状态后,再将浓度确定的含有气味物质丁二酮的待测气体泵入检测腔,待石英晶体微天平传感器的谐振频率再次稳定后,谐振频率的改变量即为嗅觉受体传感器对此浓度下的气体物质丁二酮的响应值;最后再将洁净空气泵入检测腔内,清洗气体检测腔,即完成一次检测过程;至少间隔 10min 后,待石英晶体微天平传感器的谐振频率稳定后可泵入另一浓度待测气体到检测腔进行下一次检测;重复上述步骤,得到一系列浓度的气体物质丁二酮引起的传感器谐振频率改变量,得到丁二酮浓度 - 谐振频率改变量曲线;

(4) 对于未知浓度的气体物质丁二酮的检测,首先将洁净空气以 1mL/s 的流速泵入检测腔内,待石英晶体微天平传感器的谐振频率达到一个稳定的状态 F_0 后,再将浓度未知的待测气体泵入检测腔,待石英晶体微天平传感器的谐振频率再次稳定到 F_1 后,得到谐振频率改变量 $F_1 - F_0$,根据上述步骤 3 得到的丁二酮浓度 - 谐振频率改变量曲线获得待测气体物质丁二酮的浓度,实现对丁二酮的浓度测定。

2. 根据权利要求 1 所述一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法,其特征在于,所述步骤 1 包括以下子步骤:

(1.1) 构建表达载体:首先采用基因工程技术对含有嗅觉受体蛋白 ODR-10 基因和 rho-tag 信号肽序列全长 cDNA 的质粒 *PEGFP-N1/rho-tag/odr-10* (其基因序列如 SEQ ID NO. 1 所示)进行适当改造,构建适用于嗅觉受体传感器使用的嗅觉受体蛋白的表达载体,使其 N 末端带有融合表达的 His₆-tag 标签;首先,设计相应的引物,获取和扩增嗅觉受体蛋白 ODR-10 基因和 rho-tag 信号肽序列全长 cDNA,并在 N 末端添加融合表达的 His₆-tag 标签,上游引物序列 SEQ ID NO. 2;下游引物序列如 SEQ ID NO. 3 所示;聚合酶链式反应在 50 μ L 反应体系中进行,温度循环首先是 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟,接着进行 30 循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒、60 $^{\circ}$ C 退火 30 秒、72 $^{\circ}$ C 延伸 70 秒,最后是 10 $^{\circ}$ C 降温 10 秒;扩增后获得的产物 *his₆-tag/rho-tag/odr-10* 通过限制性内切酶的双酶切反应亚克隆到表达载体 *pcDNA3.1(+)* 的多克隆位点 *Kpn I* 和 *BamH I* 之间,完成嗅觉受体蛋白的表达载体 *pcDNA3.1(+)/his₆-tag/rho-tag/odr-10* 的构建,其基因序列如 SEQ ID NO. 4 通过测序进行鉴定;

(1.2) 转染人胚胎肾细胞 HEK-293:HEK-293 细胞培养液为添加了体积百分比为 10% 的胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μ g/mL)的 DMEM 高糖培养基,培养条件为 37 $^{\circ}$ C、体积百分比为 5% CO₂ 的培养箱;转染之前一天,HEK-293 细胞被接种于六孔培养皿中,每孔接种 500 μ L 浓度为 0.5 ~ 2 \times 10⁵ cells/mL 的细胞,在不含抗生素的 DMEM 高糖培养基里生长至融合度约为 80-90%,待转染;转染试剂为 lipofectamin 2000,使用步骤 1.1 构建好的表达载体 *pcDNA3.1(+)/his₆-tag/rho-tag/odr-10* 转染 HEK-293 细胞;用无血清 DMEM 培养液把 4 μ g 表达载体稀释至 50 μ L,混匀;再用无血清 DMEM 培养液稀释 10 μ L 的脂质体转染试剂 lipofectamin 2000 至 50 μ L,在室温下孵育 5 分钟;接着把稀释后的表达载体和 lipofectamin 2000 混合至总体积为 100 μ L,摇匀,室温孵育 20 分钟;六孔板的每个孔中加入 100 μ L 表达载体和 lipofectamin 2000 的混合液,前后摇板混匀后,在 37 $^{\circ}$ C、

体积百分比为 5% CO₂ 的培养箱孵育 24-48 小时后,嗅觉受体蛋白即表达在 HEK-293 细胞膜表面,以备用作嗅觉受体传感器的敏感材料;

(1.3) 提取嗅觉受体蛋白 ODR-10:为将步骤 1.2 中制备的嗅觉受体蛋白 ODR-10 用作嗅觉受体传感器的敏感材料,使用膜蛋白提取试剂盒从转染后的 HEK-293 细胞中提取嗅觉受体蛋白 ODR-10;先收集转染 48 小时的 HEK-293 细胞,用 4℃ 的去离子水离心洗 3 次,每次 5 分钟;然后加入 1mL 蛋白提取缓冲液、1 μL 蛋白酶抑制剂、1 μL DDT,超声破碎 4 次,然后 4℃ 14000g 离心 10 分钟,弃沉淀,上清液转至一新的离心管中水浴 10 分钟,室温下 13000 离心 5 分钟,样品分为上下两层,下层含有细胞膜蛋白;取下层样品,加入 500 μL 4℃ 灭菌水,4℃ 放置 5 分钟,然后 37℃ 水浴 10 分钟,室温下 13000 离心 5 分钟,样品分为上下两层,重复此步骤 5 次;最终得到的下层样品即为膜蛋白混合物,其中包含带有融合 His₆-tag 标签的嗅觉受体蛋白 ODR-10;-70℃ 保存待用。

3. 根据权利要求 1 所述一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法,其特征在于,所述步骤 2 具体为:将石英晶体微天平置于乙醇中浸泡 10 分钟,氮气干燥;然后 1M NaOH 水溶液中浸泡 20 分钟,去离子水清洗;1M HCl 溶液中浸泡 5 分钟;浓 H₂SO₄ 与 H₂O₂ 按体积比 2:3 组成的混合液中浸泡 1 分钟,氮气干燥,以完成石英晶体微天平的彻底清洁;利用金硫键自组装反应在石英晶体微天平的金电极上共价固定一层可以特异性识别融合表达的 His₆-tag 标签的巯基化单链 DNA 适配体,该适配体由 5' 末端共价修饰了 HS-(CH₂)₆ 基团的 SEQ ID NO. 5 所示的基因序列组成,室温下反应 21 小时;然后封闭分子 11-MUA 封闭石英晶体微天平传感器的金电极表面未反应的位点,封闭条件为室温下 1 小时;把步骤 1.5 制备的含有嗅觉受体蛋白的细胞膜蛋白混合液均匀孵育在石英晶体微天平传感器的金电极表面,并放在室温孵育过夜,使嗅觉受体蛋白通过融合表达的 His₆-tag 标签与适配体发生特异性的结合反应,实现嗅觉受体蛋白在石英晶体微天平传感器的金电极表面特异性固定和纯化。

一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测技术,尤其涉及一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法。

背景技术

[0002] 生物嗅觉系统能够快速、灵敏地感受并分辨出空气中的气味物质,这得益于嗅觉受体能够与空气中气味分子特异性地结合。传统气体传感器设计中,敏感材料多采用导电聚合物、高分子材料等,缺点是特异性差。气味分子种类繁多,多是结构各异的小分子量挥发性有机气体,尤其当检测环境中的空气中含有多种气味时,特异性地检测某种气味变得相对困难。新兴的生物传感器拟从仿生的角度解决这一问题,模仿生物嗅觉系统利用嗅觉受体对气味分子的特异性识别,为特异性检测气体提供了新的技术途径。因此,如何获得高度特异的气体敏感材料,并将其与二级传感器的有效稳定耦合,实现气味分子的特异性检测是目前气体传感器进一步发展亟需解决的难题。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种利用嗅觉受体蛋白作为敏感材料结合石英晶体微天平构建嗅觉受体传感器进行气体特异性检测的方法。

[0004] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法,该方法包括以下步骤:

(1) 制备嗅觉受体蛋白 ODR-10;

(2) 固定嗅觉受体蛋白 ODR-10 在石英晶体微天平表面构建嗅觉受体传感器;

(3) 将洁净空气以 1mL/s 的流速泵入检测腔内,待石英晶体微天平传感器的谐振频率达到一个稳定的状态后,再将浓度确定的含有气味物质丁二酮的待测气体泵入检测腔,待石英晶体微天平传感器的谐振频率再次稳定后,谐振频率的改变量即为嗅觉受体传感器对此浓度下的气体物质丁二酮的响应值;最后再将洁净空气泵入检测腔内,清洗检测腔,即完成一次检测过程;至少间隔 10min 后,待石英晶体微天平传感器的谐振频率稳定后可泵入另一浓度待测气体到检测腔进行下一次检测;重复上述步骤,得到一系列浓度的气体物质丁二酮引起的传感器谐振频率改变量,得到丁二酮浓度-谐振频率改变量曲线;

(4) 对于未知浓度的气体物质丁二酮的检测,首先将洁净空气以 1mL/s 的流速泵入检测腔内,待石英晶体微天平传感器的谐振频率达到一个稳定的状态 F_0 后,再将浓度未知的待测气体泵入检测腔,待石英晶体微天平传感器的谐振频率再次稳定到 F_1 后,得到谐振频率改变量 $F_1 - F_0$,根据上述步骤得到的丁二酮浓度-谐振频率改变量曲线推算出待测气体物质丁二酮的浓度,实现对丁二酮的浓度测定。

[0005] 进一步地,所述步骤(1)包括以下子步骤:

(1.1) 构建表达载体:首先采用基因工程技术对含有嗅觉受体蛋白 ODR-10 基因和 rho-tag 信号肽序列全长 cDNA 的质粒 *PEGFP-N1/rho-tag/odr-10* (其基因序列如 SEQ ID

NO. 1 所示)进行适当改造,构建适用于嗅觉受体传感器使用的嗅觉受体蛋白的表达载体,使其N末端带有融合表达的His₆-tag 标签;首先,设计相应的引物,获取和扩增嗅觉受体蛋白ODR-10 基因和rho-tag 信号肽序列全长cDNA,并在N末端添加融合表达的His₆-tag 标签,上游引物序列SEQ ID NO. 2;下游引物序列如SEQ ID NO. 3 所示;聚合酶链式反应(PCR)在50 μL 反应体系中进行,包括1 μL PEGFP-N1/rho-tag/odr-10质粒,1 μL 上游引物,1 μL 下游引物,4 μL 浓度为10mM的dNTP 混合物,0.5 μL 高保真聚合酶STAR™ (Takara, 日本),10 μL PCR 缓冲液(含Mg²⁺)和32.5 μL 去离子水,温度循环首先是95℃预变性3分钟,接着进行30循环的94℃ 变性30秒、60℃退火30秒、72℃延伸70秒,最后是10℃降温10秒。扩增后获得的产物his₆-tag/rho-tag/odr-10 通过限制性内切酶的双酶切反应亚克隆到表达载体pcDNA3.1(+)的多克隆位点Kpn I 和BamH I 之间,完成嗅觉受体蛋白的表达载体pcDNA3.1(+)/his₆-tag/rho-tag/odr-10 的构建,其基因序列如SEQ ID NO. 4 通过测序进行鉴定;

(1.2) 转染人胚胎肾细胞HEK-293:HEK-293 细胞培养液为添加了体积百分比为10% 的胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 μg/mL)的DMEM 高糖培养基,培养条件为37℃、体积百分比为5% CO₂ 的培养箱。转染之前一天,HEK-293 细胞被接种于六孔培养皿中,每孔接种500 μL 浓度为0.5~2×10⁵ cells/mL的细胞,在不含抗生素的DMEM 高糖培养基里生长至融合度约为80-90%,待转染;转染试剂为lipofectamin 2000,使用步骤1.1 构建好的表达载体pcDNA3.1(+)/his₆-tag/rho-tag/odr-10 转染HEK-293 细胞;用无血清DMEM 培养液把4 μg 表达载体稀释至50 μL,混匀;再用无血清DMEM 培养液稀释10 μL 的脂质体转染试剂lipofectamin 2000至50 μL,在室温下孵育5分钟;接着把稀释后的表达载体和lipofectamin 2000 混合至总体积为100 μL,摇匀,室温孵育20分钟;六孔板的每个孔中加入100 μL 表达载体和lipofectamin 2000 的混合液,前后摇板混匀后,在37℃、体积百分比为5% CO₂ 的培养箱孵育24-48小时后,嗅觉受体蛋白即表达在HEK-293 细胞膜表面,以备用作嗅觉受体传感器的敏感材料;

(1.3) 提取嗅觉受体蛋白ODR-10:为将步骤1.2 中制备的嗅觉受体蛋白ODR-10 用作嗅觉受体传感器的敏感材料,使用膜蛋白提取试剂盒从转染后的HEK-293 细胞中提取嗅觉受体蛋白ODR-10;先收集转染48小时的HEK-293 细胞,用4℃的去离子水离心洗3次,每次5分钟;然后加入1mL 蛋白提取缓冲液、1 μL 蛋白酶抑制剂、1 μL DDT,超声破碎4次,然后4℃ 14000g 离心10分钟,弃沉淀,上清液转至一新的离心管中水浴10分钟,室温下13000 离心5分钟,样品分为上下两层,下层含有细胞膜蛋白;取下层样品,加入500 μL 4℃ 灭菌水,4℃ 放置5分钟,然后37℃水浴10分钟,室温下13000 离心5分钟,样品分为上下两层,重复此步骤5次;最终得到的下层样品即为膜蛋白混合物,其中包含带有融合His₆-tag 标签的嗅觉受体蛋白ODR-10;-70℃ 保存待用。

[0006] 所述步骤(2) 具体为:本发明的嗅觉受体传感器制备过程如下:将石英晶体微天平置于乙醇中浸泡10分钟,氮气干燥;然后1M NaOH 水溶液中浸泡20分钟,去离子水清洗;1M HCl 溶液中浸泡5分钟;新配置的浓H₂SO₄ 与H₂O₂ (体积比2:3)混合液浸泡1分钟,氮气干燥,以完成石英晶体微天平的彻底清洁;利用金硫键自组装反应在石英晶体微天平的金电极上共价固定一层可以特异性识别融合表达的His₆-tag 标签的巯基化单链DNA 适配体,该适配体由5' 末端共价修饰了HS-(CH₂)₆ 基团的SEQ ID NO. 5 所示的基因序列组成,室温

下反应 21 小时 ;然后封闭分子(11-MUA) 封闭石英晶体微天平传感器的金电极表面未反应的位点,封闭条件为室温下 1 小时 ;把步骤 1.5 制备的含有嗅觉受体蛋白的细胞膜蛋白混合液均匀孵育在石英晶体微天平传感器的金电极表面,并放在室温孵育过夜,使嗅觉受体蛋白通过融合表达的 His₆-tag 标签与适配体发生特异性的结合反应,实现嗅觉受体蛋白在石英晶体微天平传感器的金电极表面特异性固定和纯化 ;细胞膜的磷脂双分子层有利于保持嗅觉受体蛋白 ODR-10 的天然构象 ;N₂ 吹干后将表面固定有嗅觉受体蛋白的石英晶体微天平安装在检测系统中,完成嗅觉受体传感器的构建,以用于气味物质的检测。

[0007] 本发明的有益效果,本发明采用现代分子克隆技术,制备出能特异性结合气味分子丁二酮的嗅觉受体蛋白 ODR-10,用作气体传感器的敏感材料,克服了传统的气体检测中敏感材料特异差、灵敏度低的缺点。采用适配体自组装固定技术实现嗅觉受体在二级传感器表面的有效耦合固定,不仅可以提高传感器的稳定性,而且适配体特异有效结合嗅觉受体蛋白的能力实现嗅觉受体蛋白在传感器芯片上的一步纯化,其它无关膜蛋白由于缺乏与适配体的亲和力不能被固定在传感器表面,进而提高了嗅觉受体蛋白在传感器表面的固定效率和分布密度,克服了传统敏感材料不能有效与二级传感器耦合的问题,最终有助于提高传感器的灵敏度、特异性和稳定性。该检测方法采用有效固定了嗅觉受体蛋白的石英晶体微天平作为嗅觉受体传感器,可以实现对气味分子丁二酮的实时、快速、特异性检测,克服了传统检测技术流程复杂、特异性低、敏感性差、无法实现现场检测的缺点,适用于复杂气体环境中气体的实时特异性监测。该嗅觉受体作为敏感材料特异性检测气体的这些优点和功能可以满足复杂气体环境中气味分子的特异性实时快速检测,可广泛用于生物医学、环境保护和食品行业等相关领域。

附图说明

[0008] 图 1 是本发明制备嗅觉受体蛋白 ODR-10 的基因结构图 ;

图 2 是本发明将固定嗅觉受体蛋白 ODR-10 在石英晶体微天平上的示意图 ;

图 3 是本发明嗅觉受体传感器检测系统结构图 ;

图 4 是本发明制备嗅觉受体蛋白 ODR-10 的 RT-PCR 结果图 ;

图 5 是本发明制备嗅觉受体蛋白 ODR-10 的 Western blot 结果图 ;

图 6 是本发明嗅觉受体传感器检测几种气味物质的结果图 ;

图 7 是本发明嗅觉受体传感器检测不同浓度丁二酮的结果图 ;

图中,融合表达的 His₆-tag 基因 1、rho-tag 信号肽基因 2、嗅觉受体蛋白 ODR-10 基因 3、脂质双分子层 4、嗅觉受体蛋白 5、融合表达的 His₆-tag 标签 6、封闭分子 7、适配体 8、金电极 9、石英晶体 10、第一气阀 11、注射泵 12、废气气袋 13、气体管路 14、检测腔的盖子 15、检测腔体 16、橡胶密封圈 17,石英晶体微天平 18、信号输出电极 19、QCM200 检测系统 20、洁净空气气袋 21、待测气体气袋 22、第二气阀 23。

具体实施方式

[0009] 下面详细介绍以嗅觉受体蛋白 ODR-10 作为敏感元件结合石英晶体微天平传感器制备嗅觉受体传感器检测气体的基本原理以及具体步骤。

[0010] 本发明基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法,包括以下步骤 :

1、制备嗅觉受体蛋白 ODR-10

1.1 表达载体的构建

首先采用基因工程技术对含有嗅觉受体蛋白 ODR-10 基因 3 和 rho-tag 信号肽 2 序列全长 cDNA 的质粒 *PEGFP-N1/rho-tag/odr-10* (其基因序列如 SEQ ID NO. 1 所示) 进行适当改造, 构建适用于嗅觉受体传感器使用的嗅觉受体蛋白 5 的表达载体, 使其 N 末端带有融合表达的 His₆-tag 标签 6; 首先, 设计相应的引物, 获取和扩增嗅觉受体蛋白 ODR-10 基因 3 和 rho-tag 信号肽 2 序列全长 cDNA, 并在 N 末端添加融合表达的 His₆-tag 标签, 上游引物序列 SEQ ID NO. 2 :5' -AGAGGTACCGATGCACCACCACCACCACATGAACGGGACCGAGGGCCCAA-3', 其中下划线部分为 *Kpn* I 酶切位点, 虚线部分为融合表达的 His₆-tag 基因 1 序列, 以便使后续表达的嗅觉受体蛋白 5 的 N 末端含有融合表达的 His₆-tag 标签 6, 有助于嗅觉受体蛋白 5 在传感器表面的有效固定; 下游引物序列如 SEQ ID NO. 3 所示 :5' - cgcgatcctcacgtcggaaacttg agacaaat-3', 其中下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点; 聚合酶链式反应 (PCR) 在 50 μL 反应体系中进行, 包括 1 μL *PEGFP-N1/rho-tag/odr-10* 质粒, 1 μL 上游引物, 1 μL 下游引物, 4 μL 浓度为 10mM 的 dNTP 混合物, 0.5 μL 高保真聚合酶 STAR™, 10 μL 的 PCR 缓冲液 (含 Mg²⁺) 和 32.5 μL 去离子水, 温度循环首先是 95℃ 预变性 3 分钟, 接着进行 30 循环的 94℃ 变性 30 秒、60℃ 退火 30 秒、72℃ 延伸 70 秒, 最后是 10℃ 降温 10 秒。扩增后获得的产物 *his₆-tag/rho-tag/odr-10* 通过限制性内切酶的双酶切反应亚克隆到表达载体 *pcDNA3.1(+)* 的多克隆位点 *Kpn* I 和 *Bam*H I 之间, 完成嗅觉受体蛋白 5 的表达载体 *pcDNA3.1(+)/his₆-tag/rho-tag/odr-10* 的构建, 其基因序列如 SEQ ID NO. 4 通过测序进行鉴定。

[0011] 1.2 转染人胚胎肾细胞 HEK-293

HEK-293 细胞培养液为添加了体积百分比为 10% 的胎牛血清、青霉素 (100 U/mL) 和链霉素 (100 μg/mL) 的 DMEM 高糖培养基, 培养条件为 37℃、体积百分比为 5% CO₂ 的培养箱。转染之前一天, HEK-293 细胞被接种于六孔培养皿中, 每孔接种 500 μL 浓度为 0.5 ~ 2×10⁵ cells/mL 的细胞, 在不含抗生素的 DMEM 高糖培养基里生长至融合度约为 80-90%, 待转染; 转染试剂为 lipofectamin 2000, 使用步骤 1.1 构建好的表达载体 *pcDNA3.1(+)/his₆-tag/rho-tag/odr-10* 转染 HEK-293 细胞; 用无血清 DMEM 培养液把 4 μg 表达载体稀释至 50 μL, 混匀; 再用无血清 DMEM 培养液稀释 10 μL 的脂质体转染试剂 lipofectamin 2000 至 50 μL, 在室温下孵育 5 分钟; 接着把稀释后的表达载体和 lipofectamin 2000 混合至总体积为 100 μL, 摇匀, 室温孵育 20 分钟; 六孔板的每个孔中加入 100 μL 表达载体和 lipofectamin 2000 的混合液, 前后摇板混匀后, 在 37℃、体积百分比为 5% CO₂ 的培养箱孵育 24-48 小时后, 嗅觉受体蛋白 5 即表达在 HEK-293 细胞膜表面, 以用作嗅觉受体传感器的敏感材料。

[0012] 1.3 逆转录 - 聚合酶链式反应 (RT-PCR)

采用 RT-PCR 的方法检测嗅觉受体蛋白 5 在细胞内 mRNA 水平的表达水平以验证其成功表达制备; HEK-293 细胞在转染 48 小时后, 按 Trizol 一步法提取细胞的总 RNA; 先取出六孔板细胞至灭好菌的超净工作台, 吸弃培养基, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 轻轻地洗一遍; 然后向每孔加入 0.5 mL Trizol 试剂, 用移液器吹打细胞使之脱落、裂解; 再将上述 Trizol 裂解后细胞液转入 1.5 mL EP 管中, 在室温 (15℃ ~ 30℃) 下放置 5 分钟; 向上述 EP 管中按照每 1 mL Trizol 加 0.2 mL 氯仿的比例加入氯仿, 盖上盖子, 在手中用力震荡 15

秒,室温下(15℃~30℃)放置2~3分钟后,12000 g(2℃~8℃)离心18分钟;从离心机中取出EP管后样品分为三层,底层的黄色有机相、中间层和上层的水相;将上层水相取出至一新的1.5 mL EP管中,按照每1 mL Trizol加0.5 mL 异丙醇的比例加入异丙醇,在室温下(15℃~30℃)放置10分钟,12000 g(2℃~8℃)离心10分钟,然后弃去上清液;再按照每1 mL Trizol加1 mL 75%乙醇的比例进行涡旋混合洗涤,之后7500 g(2℃~8℃)离心5分钟,弃去上清液;沉淀物即为细胞的总RNA,使之室温下自然干燥;用不含RNA酶的去离子水溶解RNA沉淀,置于-70℃冰箱保存待用;然后取5 μL RNA溶液,通过检测260 nm及280 nm波长下紫外吸光度,估算其纯度,并计算核酸含量(RNA在260 nm波长下吸光度为1时,浓度相当于40 μg/mL)。

[0013] 将RNA溶液稀释至浓度为0.2 μg/μL,然后从中取5 μL至PCR小管,再加入1 μL随机六聚引物、1 μL浓度均为10 mM的dNTP混合物、3 μL不含RNA酶的去离子水混匀,短暂离心数秒,在PCR仪上70℃反应5分钟进行变性;于冰浴下冷却退火;再依次加入4 μL 5倍浓度PrimerScript®缓冲液、0.5 μL浓度为40 U/μL的RNA酶抑制剂、1 μL浓度为200 U/μL的PrimeScript®RTase和4.5 μL不含RNA酶的去离子水,混匀为20 μL的逆转录反应液;于PCR仪上进行逆转录反应,反应条件为:30℃反应10分钟、42℃反应45分钟、95℃反应5分钟;停止反应后,取出逆转录反应产物立即置于冰上;产物放在-20℃保存。

[0014] 之后以上述获得的逆转录产物作为模板进行PCR扩增,上游引物基因序列如SEQ ID NO. 2:5'-AGAGGTACCGATGCACCACCACCACCACATGAACGGGACCGAGGGCCCAA-3';下游引物基因序列如SEQ ID NO. 3所示:5'-cgcgggatcctcagctcggaacttgagacaaat-3';冰浴下,1 μL逆转录合成的cDNA模板、1 μL上游引物、1 μL下游引物、4 μL浓度为10mM的dNTP混合物、0.5 μL高保真聚合酶STAR™、10 μL PCR缓冲液(含Mg²⁺)和32.5 μL去离子水混合为总量为50 μL的反应体系,95℃预变性3分钟,接着进行30循环的94℃变性30秒、60℃退火30秒、72℃延伸70秒,最后是10℃降温10秒;PCR产物电泳后通过紫外成像系统观察电泳条带确定嗅觉受体蛋白ODR-10基因3在细胞内mRNA水平的表达。

[0015] 1.4 Western blot 鉴定

采用Western blot技术从蛋白水平鉴定嗅觉受体5在HEK-293细胞内的表达情况;首先在RIPA强裂解液加入PMSF,使PMSF终浓度为1mM待用;取出转染后48小时的HEK-293细胞至超净工作台,吸弃培养基,磷酸盐缓冲液洗一次,弃掉废液,置于冰上;向六孔板的每个孔中加入200 μL裂解液,反复吹打细胞,使裂解液与细胞充分接触30分钟;细胞充分裂解后,14000g离心5分钟,取上清至离心管中即获得嗅觉受体蛋白样品;取50 μL样品至1.5mL的EP管中,加入12.5 μL 5倍loading缓冲液混匀,100℃煮沸10分钟,12000g室温离心1分钟,上清液加入蛋白SDS-PAGE凝胶,120V电压下进行蛋白电泳;然后转至PVDF膜,浸于质量百分比为2.5%的牛血清白蛋白溶液中,室温摇床孵育1小时,完成封闭;然后用TBST溶液洗3遍,每次10分钟,加入一抗(抗His₆-tag鼠IgG),4℃孵育过夜;取出PVDF膜用TBST溶液洗3遍,每次10分钟,加入1:500的二抗(DyLight680标记山羊抗小鼠IgG)室温避光摇床孵育1小时;置于Odyssey双色红外激光成像系统下扫描分析;预计目标蛋白大小为45kD;通过Western blot蛋白电泳条带的位置鉴定嗅觉受体蛋白5是否在HEK-293细胞内成功表达。

[0016] 1.5 提取嗅觉受体蛋白 ODR-10

为将步骤 1.2 中制备的嗅觉受体蛋白 5 用作嗅觉受体传感器的敏感材料,使用膜蛋白提取试剂盒从转染后的 HEK-293 细胞中提取嗅觉受体蛋白 ODR-10;先收集转染 48 小时的 HEK-293 细胞,用 4℃ 的去离子水离心洗 3 次,每次 5 分钟;然后加入 1mL 蛋白提取缓冲液、1 μ L 蛋白酶抑制剂、1 μ L DDT,超声破碎 4 次,然后 4℃ 14000g 离心 10 分钟,弃沉淀,上清液转至一新的离心管中水浴 10 分钟,室温下 13000 离心 5 分钟,样品分为上下两层,下层含有细胞膜蛋白;取下层样品,加入 500 μ L 4℃ 灭菌水,4℃ 放置 5 分钟,然后 37℃ 水浴 10 分钟,室温下 13000 离心 5 分钟,样品分为上下两层,重复此步骤 5 次;最终得到的下层样品即为膜蛋白混合物,其中包含带有融合 His₆-tag 标签的嗅觉受体蛋白 ODR-10;-70℃ 保存待用。

[0017] 本步骤 1 中,子步骤 1.3 和 1.4 用于验证嗅觉受体蛋白已成功表达在细胞膜表面,并非本步骤 1 的必要子步骤。

[0018] 2、固定嗅觉受体蛋白 ODR-10 在石英晶体微天平表面构建嗅觉受体传感器

本发明中嗅觉受体传感器以嗅觉受体蛋白 ODR-10 为敏感材料,固定在石英晶体微天平表面,具体构建过程如下;将石英晶体微天平 18 置于乙醇中浸泡 10 分钟,氮气干燥;然后 1M NaOH 水溶液中浸泡 20 分钟,去离子水清洗;1M HCl 溶液中浸泡 5 分钟;新配置的浓 H₂SO₄ 与 H₂O₂ (体积比 2:3)混合液浸泡 1 分钟,氮气干燥,以完成石英晶体微天平 18 的彻底清洁;利用金硫键自组装反应在石英晶体微天平 18 的金电极 9 上共价固定一层可以特异性识别融合表达的 His₆-tag 标签 6 的巯基化单链 DNA 适配体 8,该适配体 8 由 5' 末端共价修饰了 HS-(CH₂)₆ 基团的 SEQ ID NO. 5 所示的基因序列组成(5'-HS-(CH₂)₆-GCTATGGGTGGTC TGGTTGGGATTGGCCCCGGGAGCTGGC-3'),室温下反应 21 小时;然后封闭分子 7 (11-MUA)封闭石英晶体微天平传感器的金电极 17 表面未反应的位点,封闭条件为室温下 1 小时;把步骤 1.5 制备的含有嗅觉受体蛋白 5 的细胞膜蛋白混合液均匀孵育在石英晶体微天平传感器的金电极 9 表面,并放在室温孵育过夜,使嗅觉受体蛋白 5 通过融合表达的 His₆-tag 标签 6 与适配体 8 发生特异性的结合反应,实现嗅觉受体蛋白 5 在石英晶体微天平传感器的金电极 9 表面特异性固定和纯化;细胞膜的磷脂双分子层 4 有利于保持嗅觉受体蛋白 ODR-10 的天然构象;N₂ 吹干后将表面固定有嗅觉受体蛋白 5 的石英晶体微天平 18 安装在检测系统中,完成嗅觉受体传感器的构建,以用于气味物质的检测。

[0019] 3、气味物质丁二酮的检测

3.1 石英晶体微天平传感器原理

本发明中使用石英晶体微天平作为嗅觉受体传感器的二级传感器,石英晶体微天平是一种质量敏感型传感器,基本原理是石英晶体的谐振频率与其表面的表面微小的压力改变相关,通过记录石英晶体谐振频率的改变监测石英晶体表面微小的压力变化。基于此原理,也可以通过监测石英晶体谐振频率的变化来检测石英晶体表面微小的质量变化。利用这个原理将石英晶体微天平与嗅觉受体蛋白结合构建嗅觉受体传感器,嗅觉受体蛋白作为敏感元件固定在石英晶体微天平敏感电极表面,与待测物质发生特异性吸附作用后,石英晶体微天平可以到检测这一过程。当气味物质被固定于石英晶体表面的嗅觉受体蛋白所吸附时,石英晶体微天平表面的质量也发生变化,引起石英晶体谐振频率的改变,而且频率的改变与石英晶体表面质量的改变成正比,满足公式: $\Delta F=K\Delta m$,其中 ΔF 为石英晶体谐振频率

的变化(Hz), Δm 为石英晶体表面的质量变化(g), K 为相关系数, $K=-F/(Art)$, F 为石英晶体的初始频率(MHz), A 为电极总的表面积(cm^2), r 为晶体的密度(g/cm^3), t 为晶体的厚度(cm)。因此, 通过监测石英晶体谐振频率的变化可以计算出其表面的质量变化, 获得气味物质与表面嗅觉受体蛋白相互作用信息, 间接计算出气味物质的浓度, 最终实现对气味物质的特异性检测。

[0020] 3.2 嗅觉受体传感器检测气体的过程

石英晶体微天平传感器 18 谐振频率的信号通过传感器电极接口 19 传送到 QCM200 检测系统 20 (Stanford Research Systems, Inc., USA), 以记录气味物质与嗅觉受体蛋白 5 相互作用引起的石英晶体微天平传感器 18 谐振频率的改变量; 首先打开第一气阀 11 并关闭第二气阀 23, 由注射泵 12 通过气体管路 14 将洁净空气气袋 21 中的空气以 $1\text{mL}/\text{s}$ 的流速泵入检测腔内, 待石英晶体微天平传感器 18 的谐振频率达到一个稳定的状态后, 再打开第二气阀 23 并关闭第一气阀 11 将浓度确定的含有气味物质丁二酮的待测气体从待测气体气袋 22 泵入检测腔, 待石英晶体微天平传感器 18 的谐振频率再次稳定后, 谐振频率的改变量即为传感器对此浓度下的气体物质丁二酮的响应值; 最后再打开第一气阀 11 并关闭第二气阀 23, 将洁净空气泵入检测腔内, 清洗气体检测腔, 即完成一次检测过程; 至少间隔 10min 后, 待石英晶体微天平传感器 18 的谐振频率稳定后可泵入另一待测气体到检测腔进行下一次检测; 重复上述步骤, 得到一系列浓度的气体物质丁二酮引起的传感器谐振频率改变量, 得到丁二酮浓度 - 谐振频率改变量曲线。

[0021] 对于未知浓度的气体物质丁二酮的检测, 首先打开第一气阀 11 并关闭第二气阀 23, 由注射泵 12 通过气体管路 14 将洁净空气气袋 21 中的空气以 $1\text{mL}/\text{s}$ 的流速泵入检测腔内, 待石英晶体微天平传感器 18 的谐振频率达到一个稳定的状态 F_0 后, 再打开第二气阀 23 并关闭第一气阀 11 将浓度未知的待测气体从待测气体气袋 22 泵入检测腔, 待石英晶体微天平传感器 18 的谐振频率再次稳定到 F_1 后, 得到谐振频率改变量 $F_1 - F_0$, 根据上述步骤得到的丁二酮浓度 - 谐振频率改变量曲线推算出待测气体物质丁二酮的浓度, 实现对丁二酮的浓度测定。

[0022] 下面结合附图和实施例进一步说明本发明, 本发明的目的和效果将变得更加明显。

[0023] 如图 1 所示, 本发明制备的嗅觉受体蛋白 ODR-10 的基因结构图, 图中, 融合表达的 His_6 -tag 基因 1、rho-tag 信号肽基因 2、嗅觉受体蛋白 ODR-10 基因 3, 这种基因结构设计表达的嗅觉受体蛋白 ODR-10 在 N 末端带有融合表达的 His_6 -tag 标签和 rho-tag 信号肽, 融合表达的 His_6 -tag 标签有助于将嗅觉受体蛋白 ODR-10 有效地固定在石英晶体微天平的金电极, rho-tag 信号肽有利于嗅觉受体蛋白 ODR-10 在细胞膜的正确定位; 图 2 所示为本发明中嗅觉受体蛋白 ODR-10 固定在石英晶体微天平表面上的示意图, N 末端融合表达有 His_6 -tag 标签 6 的嗅觉受体蛋白 5, 通过 His_6 -tag 标签 6 与适配体 8 之间的特异性相互结合被固定在石英晶体 10 表面的金电极 9 上, 细胞膜成分的脂质双分子层 4 有利于保持嗅觉受体蛋白 5 的天然构象, 封闭分子 7 用于封闭金电极表面的裸露位点; 图 3 所示为嗅觉受体传感器检测系统结构图, 其中石英晶体微天平 18 的表面即图 2 所示, 表面已经成功固定好嗅觉受体蛋白 ODR-10, 通过控制第一气阀 11 和第二气阀 23 将洁净空气气袋 21 和待测气体气袋 22 由注射泵 12 泵入检测腔体 16 中, 检测腔的盖子 15 通过螺纹旋在检测腔体 16 上

方,废气通过气体管路 14 进入废气气袋 13,橡胶密封圈 17 用于将石英晶体微天平 18 固定在检测腔体 16 中,信号输出电极 19 将石英晶体微天平 18 的谐振频率信号连接至 QCM200 检测系统 20 内进行信号的实时记录;图 4 是本发明制备嗅觉受体蛋白 ODR-10 的 RT-PCR 结果图,目标条带大约在 1.1kb,提示嗅觉受体蛋白 5 在细胞内 mRNA 水平上显著表达;图 5 本发明制备嗅觉受体蛋白 ODR-10 的 Western blot 结果图,目标条带大约在 45KD,表明在蛋白质水平已经将嗅觉受体蛋白 5 成功表达在 HEK-293 细胞内;图 6 是本发明嗅觉受体传感器检测几种气味物质的结果图,该结果说明采用嗅觉受体蛋白 ODR-10 作为敏感材料的嗅觉受体传感器对气味物质丁二酮最敏感,其他几种气体引起的响应相对较小,因此该嗅觉受体传感器具有良好的特异性;图 7 是本发明制备的嗅觉受体传感器检测不同浓度丁二酮的结果图,最低检测下限大约为 1.5ppm,检测灵敏度大约为 0.55 ± 0.024 Hz/ppm,综上所述此嗅觉受体传感器能够灵敏、特异地检测气味物质丁二酮。

<110>	浙江大学	
<120>	一种基于嗅觉受体传感器检测气味物质丁二酮的方法	
<160>	5	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	5778	
<212>	DNA	
<213>	Caenorhabditis elegans	
<400>	1	
	tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
	cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt	120
	gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
	atgggtggag tattttacggt aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
	aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta	300
	catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
	catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
	atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
	ggactttcca aatgctcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
	acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta	600
	ccggactcag atctcgagat gaacgggacc gagggcccaa acttctacgt gcctttctcc	660
	aacaagacgg gcgtggtgga attcatgtcg ggagaattgt ggattaccct agttgacaca	720

gcggacattg tcggcgteac cctcaccctt tgtgtcaaca ttgttcttct cggacttctg	780
aaaacacgtg gaaaaaactt gggcacttat aaatatctca tggcgttttt ctcagtattc	840
tcgatttttt acgcatcat cgagttcata ttacgaccta taatgcata tgagaacacc	900
actttctttt tgatctcaag gaaaagatte aactactcca ccaaacttgg aaaaatcaac	960
tctgcgtttt actgtgcttg ttttgccacc agttttgttg tctcaggagt tcactttggt	1020
tatcgatatt ttgcaacttg caaacccaat ctacttcggt tgttcaactt gccactctt	1080
ctactttggc cacttggttg cagtgtacce gtgacaatgt gggctagtgt ctcataat	1140
ttgtatccag ataccgagta cacggaagcg gctgtcacca atgtactaaa taaccactat	1200
aactggatca aaaaggagaa tgtatcgtac attgcatacg tctattacca atacgaaaac	1260
ggagtaagcg atatctacct caaaaacttg cttggatgct ttgttcatta ctttgcctg	1320
tcgatgacgt ttgttggat gttctactgc ggatatgcca cgtggaaaac tatgaatgaa	1380
cacaaggatg tatctgatag aactcgagcg ctacagaaac aacttttcaa agctttagtt	1440
cttcagacac tcateccaac tatcttcctg tacgccccaa ctggagtcct gttcctcga	1500
ccgttttttg acgtgaattt gaatgcaaac gccaatctca ttgtgttttg ctcatttctg	1560
taccgggac tcgatccact cattctgatt ttgatcttc gtgatttccg aagaacaata	1620
ttcaatttct tgtgtggaaa gaaaaacagt gttgatgaat cccgctcgac aacaagagcc	1680
aatttgcctc aagtccgac gtgaggatcc accggctgcc accatggtga gcaagggcga	1740
ggagctgttc accggggtgg tgccccctt ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca	1800
caagttcage gtgtccggcg agggcgaggg cgatgccacc tacggcaage tgacctgaa	1860
gttcactctg accaccgca agctgcccgt gccctggccc accctcgtga ccacctgac	1920

ctacggcgtg cagtgettca gcegetacce cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa	1980
gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga ggcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa	2040
ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttega gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct	2100
gaagggcacg gacttcaagg aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta	2160
caacagccac aacgtctata tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt	2220
caagatccgc cacaacatcg aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa	2280
cacccccatc ggcgacggcc ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gcaccagtc	2340
cgccctgagc aaagaccca acgagaagcg cgatcacatg gtcctgctgg agttcgtgac	2400
cgccgccggg atcactctcg gcatggacga gctgtacaag taaagcggcc gcgactctag	2460
atcataatca gccataccac atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac	2520
ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca	2580
gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt	2640
tcaactgcatt ctagtgtggt tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttaagg cgtaaattgt	2700
aagcgtaat attttgtaa aattegcgtt aaatTTTTgt taaatcagct cattttttaa	2760
ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt	2820
gagtgttggt ccagtttgga acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa	2880
agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag	2940
TTTTTTgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gccccgatt	3000
tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg	3060

agcgggcgct agggcgctgg caagtgtage ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc	3120
cgcgcttaat gcgccgctac agggcgcgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcg	3180
aaccctatt tgtttatfff tetaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata	3240
accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt cctgaggcgg aaagaaccag	3300
ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga aagtccccag gctccccagc aggcagaagt	3360
atgcaaagca tgcattctca ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggtccccca	3420
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta	3480
actccgcca tcccgcct aactccgcc agttccgcc attctccgc ccatggctga	3540
ctaattffff ttatttatgc agaggccgag gccgcctcgg cctctgagct attccagaag	3600
tagtgaggag gctfffftg aggcctagc ttttgcaaag atcgatcaag agacaggatg	3660
aggatcgttt cgcattgatt aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt	3720
ggagaggcta ttcggctatg actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt	3780
gttccggctg tcagcgcagg ggcgcccgt tctffffgtc aagaccgacc tgtccggctc	3840
cctgaatgaa ctgcaagacg aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc	3900
ttgcgcagct gtgctcgac ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga	3960
agtccgggg caggatctcc tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaag tatccatcat	4020
ggctgatgca atgcggcggc tgcatacgt tgatccgct acctgcccac tcgaccacca	4080
agcgaaacat cgcattcgac gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgattcagga	4140
tgattctggac gaagagcacc aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggtcaaggc	4200
gagcattccc gacggcgagg atctcgtcgt gaccattggc gatgcctgct tgccgaatat	4260

catggtggaa aatggccgct tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga	4320
ccgctatcag gacatagegt ttgctaccgg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg	4380
ggctgaccgc ttctctgtgc tttacggtat cgccgctccc gattcgcage gcatcgcctt	4440
ctatcgcctt cttgacgagt tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa	4500
gcgacgccca acctgccatc acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaggttg	4560
ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg	4620
ctggagttct tcgcccacc tagggggagg ctaactgaaa cacggaagga gacaataaccg	4680
gaaggaacc gcgctatgac ggcaataaaa agacagaata aaacgcacgg tgttgggtcg	4740
tttgttcata aacgcggggt tcggctccag ggctggcact ctgtcgatac cccaccgaga	4800
ccccattggg gccaatagc ccgcgtttct tccttttccc caccaccacc cccaagtctg	4860
ggtgaaggcc cagggtctgc agccaacgtc ggggcggcag gccctgccat agcctcaggt	4920
tactcatata tacttttagat tgatttaaaa ctccattttt aatttaaaag gatctaggtg	4980
aagatccttt ttgataatct catgaccaa atccctaac gtgagttttc gttccactga	5040
gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta	5100
atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa	5160
gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact	5220
gtccttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca	5280
tacctgctc tgctaatect gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt	5340
accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggctcggg ctgaacgggg	5400

ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 5460

cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggccggacag gtatccggta 5520

agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat 5580

ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 5640

tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc 5700

ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac 5760

cgtattaccg ccatgcat 5778

<210> 2

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工设计

<400> 2

agaggtaccg atgcaccacc accaccacca catgaacggg accgagggcc caa 53

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工设计

<400> 3

cgcgatcct cacgtcggaa cttgagacaa at 32

<210> 4

<211> 6322

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<400> 4

gacggatcgg gagatctccc gateccctat ggtgcactct cagtacaate tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctage	900
gtttaaactt aagcttggta ccgatgcacc accaccacca ccacatgaac gggaccgagg	960
gccc aaactt ctacgtgcct ttctccaaca agacgggcgt ggtggaattc atgtcgggag	1020
aattgtggat taccctagtt gacacagcgg acattgtcgg cgtcaccctc accttctgtg	1080
tcaacattgt tcttctcgga cttctgaaaa cacgtggaaa aaacttgggc acttataaat	1140
atctcatggc gtttttctca gtattctega ttttttacgc catcatcgag ttcataattac	1200

gacctataat gcatattgag aacaccactt tctttttgat ctcaaggaaa agattcaact	1260
actccaccaa acttggaaaa atcaactctg cgttttactg tgcttgtttt gccaccagtt	1320
ttgttgcttc aggagttcac tttgtttate gatattttgc aacttgcaaa ccgaatctac	1380
ttcgtttggt caacttgcca actettctac tttggccact tggttgcagt gtaccctga	1440
caatgtgggc tagtgtctca tattttttgt atccagatac cgagtacacg gaagcggctg	1500
tcaccaatgt actaaataac cactataact ggatcaaaaa ggagaatgta tcgtacattg	1560
catacgtcta ttaccaatac gaaaacggag taaggcatat ctacctcaaa aacttgcttg	1620
gatgctttgt tcattacttt gtcatgtcga tgacgtttgt tgtgatgttc tactgcggat	1680
atgccacgtg gaaaactatg aatgaacaca aggatgtatc tgatagaact cgagcgtac	1740
agaaacaact tttcaaagct ttagttcttc agacactcat cccaactatc ttcattgtacg	1800
ccccaactgg agtcatgttc atcgcaccgt tttttgacgt gaatttgaat gcaaacgcca	1860
atttcattgt gttttgctca tttctgtacc cgggactcga tccactcatt ctgattttga	1920
tcattcgtga tttccgaaga acaatattca atttcttgtg tggaaagaaa aacagtgttg	1980
atgaatcccg ctcgacaaca agagccaatt tgtctcaagt tccgacgtga ggatccacta	2040
gtccagtgtg gtggaattct gcagatatcc agcacagtgg cggccgctcg agtctagagg	2100
gcccgtttaa acccgctgat cagcctcgac tgtgccttct agttgccage catctgttgt	2160
ttgcccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta	2220
ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt cattctatc tggggggtgg	2280
ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc	2340

ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg ggctctaggg ggtatcccca	2400
cgcgccctgt agcggcgcac taagecgggc ggggtgtggg gttacgcgca gcgtgaccgc	2460
tacacttgcc agegcacctag cgcccgetcc tttegettcc ttccttccct ttctcgccac	2520
gttcgccggc tttecccgtc aagetctaaa tggggggctc cctttagggt tccgatttag	2580
tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgattagggt gatggttcac gtagtgggcc	2640
atcgccctga tagacggttt ttgcacctt gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg	2700
actcttgttc caaactggaa caaactcaa ccctatctcg gtctattctt ttgatttata	2760
agggattttg ccgatttcgg cctattgggt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa	2820
cgcgaattaa ttctgtggaa tgtgtgtcag ttaggggtgt gaaagtcacc aggcctccca	2880
gcaggcagaa gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccagggt tgaaagtcc	2940
ccaggctccc cagcaggcag aagtatgcaa agcatgcac tcaattagtc agcaaccata	3000
gtcccgcacc taactecgcc caccgccccc ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg	3060
ccccatggct gactaatttt ttttatttat gcagaggccg aggccgcctc tgctctgag	3120
ctattccaga agtagtgagg aggctttttt ggaggcctag gcttttgcaa aaagctcccg	3180
ggagcttgta tatccatttt cggatctgat caagagacag gatgaggatc gtttcgcatg	3240
attgaacaag atggattgca cgcaggttct ccggccgctt ggggtggagag gctattcggc	3300
tatgactggg cacaacagac aatcggctgc tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg	3360
caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcag	3420
gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc	3480
gacgttgcca ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat	3540

ctcctgtcat ctcaccttgc tectgcegag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg	3600
cggtgcata cgcttgatcc ggctacctgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcac	3660
gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag	3720
catcaggggc tcgcgccage cgaactgttc gccaggctca aggcgcgcat gcccgcggc	3780
gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc	3840
cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata	3900
gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc	3960
gtgctttacg gtatcgccgc tcccgatteg cagcgcacgc ccttctatcg ccttcttgac	4020
gagttcttct gagcgggact ctggggttcg aaatgaccga ccaagcgacg cccaacctgc	4080
catcacgaga tttegattcc accgccgctt tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt	4140
tccgggacgc cggttgatg atcctccage gcggggatct catgctggag ttcttcgccc	4200
acccaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcaciaaatt	4260
tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg	4320
tatcttatca tgtctgtata ccgtcgacct ctagctagag cttggcgtaa tcatggctcat	4380
agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatecgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa	4440
gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc	4500
gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc tgctgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc	4560
aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctcaactgact	4620
cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggtatcage tcaactcaaag gcggtaatac	4680

ggttatccac	agaatcaggg	gataacgcag	gaaagaacat	gtgagcaaaa	ggccagcaaa	4740
aggccaggaa	ccgtaaaaag	gccgcgttgc	tggcgTTTTT	ccataggctc	cgccccctg	4800
acgagcatca	caaaaatega	cgctcaagtc	agaggtggcg	aaacccgaca	ggactataaa	4860
gataccaggc	gtttccccct	ggaagctccc	tcgtgcgctc	tctgttccg	accctgccgc	4920
ttaccgata	cctgtccgcc	tttctccctt	cgggaagcgt	ggcgctttct	catagctcac	4980
gctgtaggta	tctcagttcg	gtgtaggtcg	ttcgctccaa	gctgggctgt	gtgcacgaac	5040
ccccgttca	gcccgaccgc	tgcgccttat	ccggtaacta	tcgtcttgag	tccaacccgg	5100
taagacacga	cttategccca	ctggcagcag	ccactggtaa	caggattagc	agagcgaggt	5160
atgtaggcgg	tgctacagag	ttcttgaagt	ggtggcctaa	ctacggctac	actagaagaa	5220
cagtatttgg	tatctgcgct	ctgctgaagc	cagttacctt	cggaaaaaga	gttggtagct	5280
cttgatccgg	caaacaaacc	accgctggta	gcggtTTTTT	tgtttgcaag	cagcagatta	5340
cgcgcaaaa	aaaaggatct	caagaagatc	ctttgatctt	ttctacgggg	tctgacgctc	5400
agtggaacga	aaactcacgt	taagggattt	tggatcatgag	attatcaaaa	aggatcttca	5460
cctagatcct	tttaaattaa	aatgaagtt	ttaaataaat	ctaaagtata	tatgagtaaa	5520
cttggcttga	cagttaccaa	tgcttaatca	gtgaggcacc	tatctcagcg	atctgtctat	5580
ttcgttcate	catagttgcc	tgactccccg	tcgtgtagat	aactacgata	cgggagggct	5640
taccatctgg	cccagtgct	gcaatgatac	cgcgagaccc	acgctcaccg	gtccagatt	5700
tatcagcaat	aaaccagcca	gccggaaggg	ccgagcgcag	aagtggctct	gcaactttat	5760
ccgcctccat	ccagtctatt	aattgttgcc	gggaagctag	agtaagtagt	tcgccagtta	5820
atagtttgcg	caacgttggt	gccattgcta	caggcatcgt	ggtgtcacgc	tcgtcgtttg	5880

gtatggcttc attcagctcc ggtteccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt 5940
 tgtgcaaaaa agcggttage tcctteggte ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg 6000
 cagtgttate actcatggtt atggcagcac tgcataatte tcttactgtc atgcatccg 6060
 taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc 6120
 ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa 6180
 ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac 6240
 cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt 6300
 ttactttcac cagcgtttct gg 6322

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工设计

<400> 5

gctatgggtg gtctggttgg gattggcccc gggagctggc 40

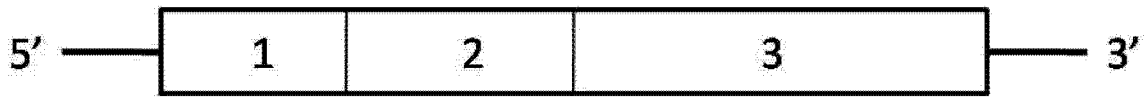


图 1

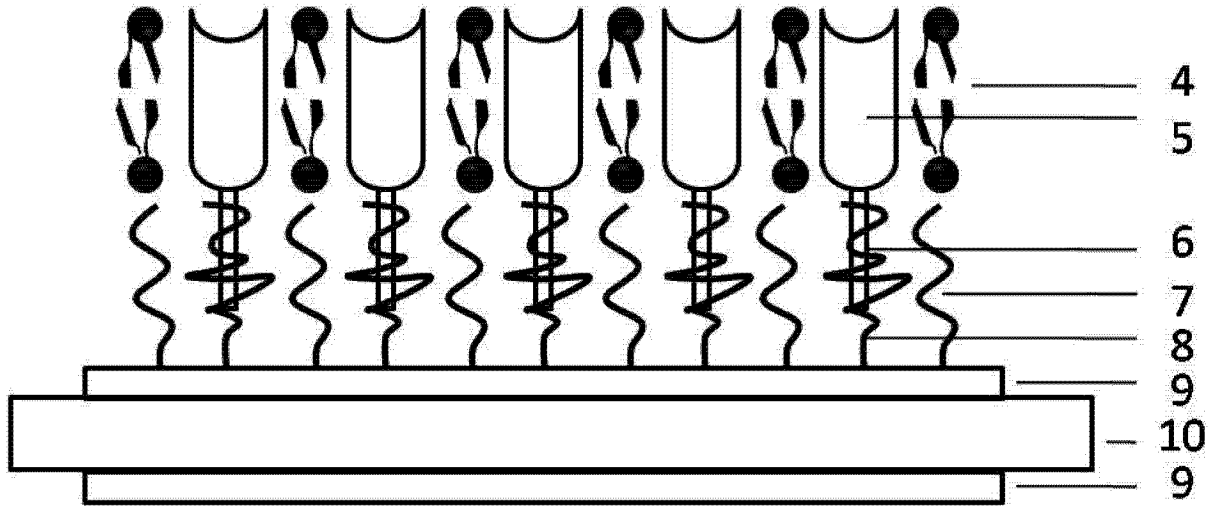


图 2

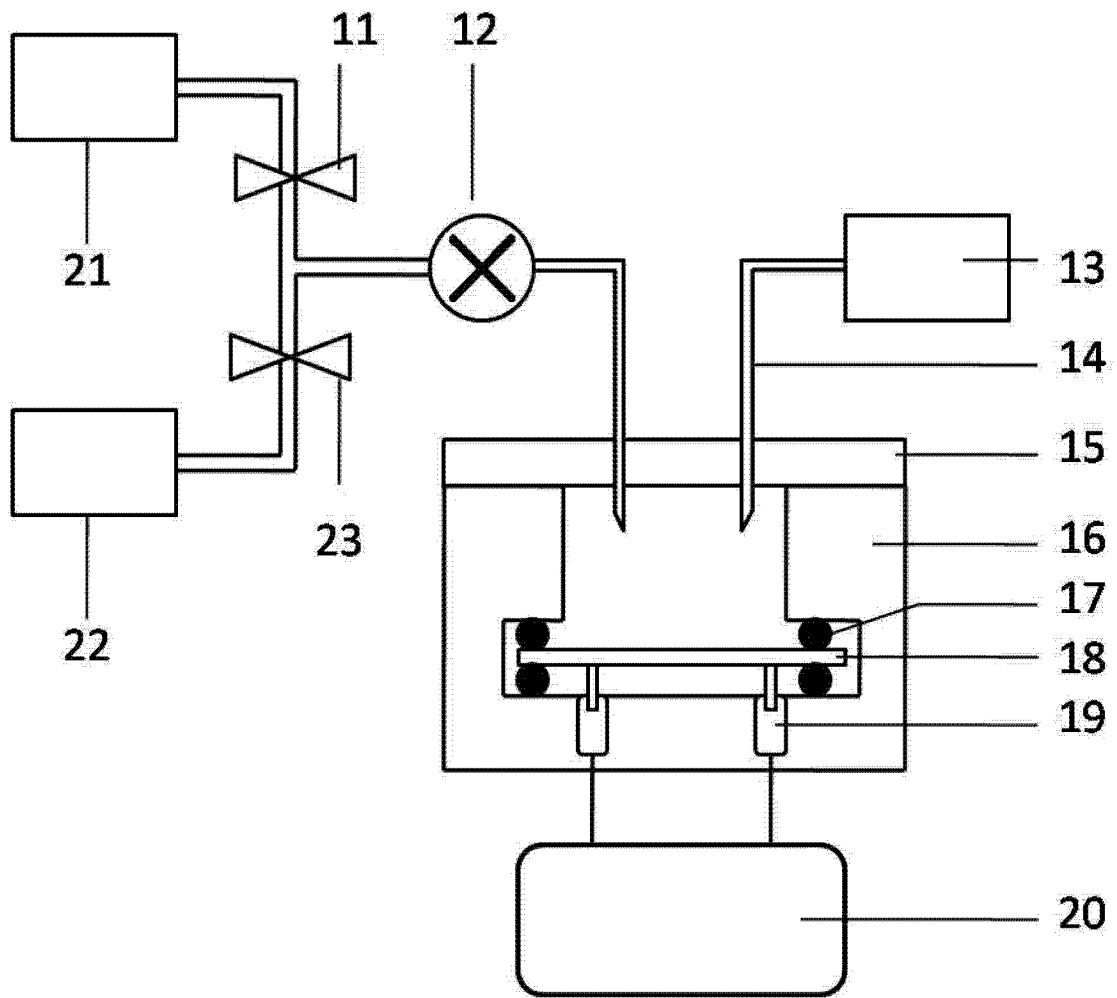


图 3

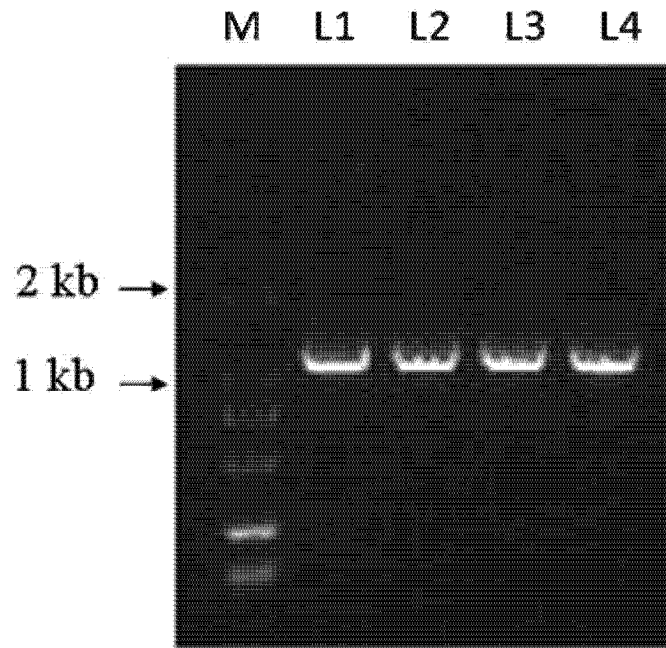


图 4

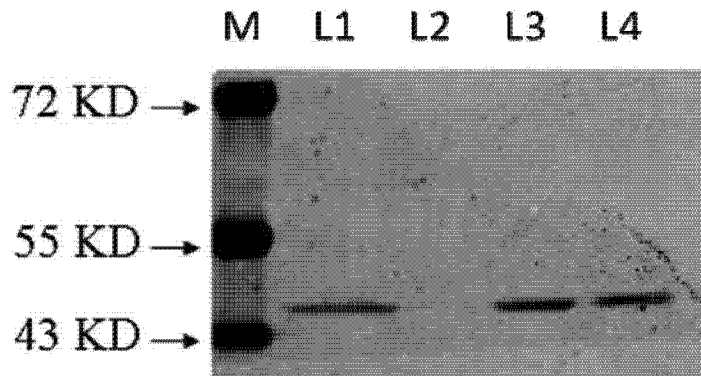


图 5

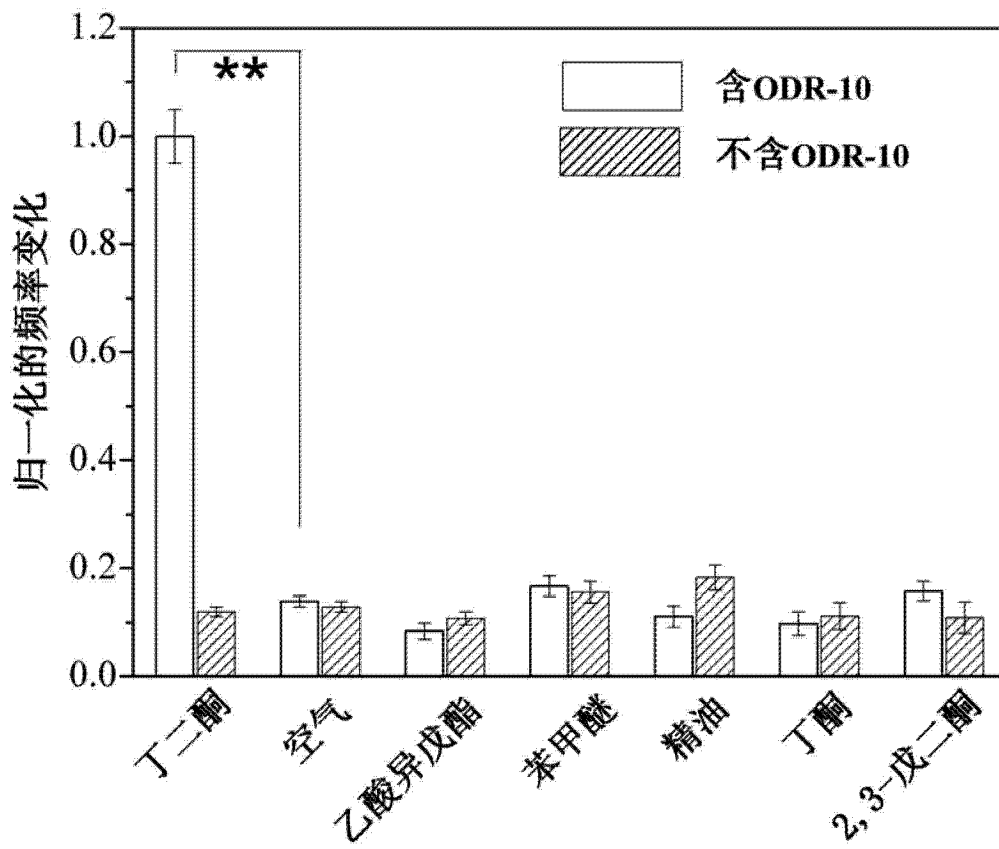


图 6

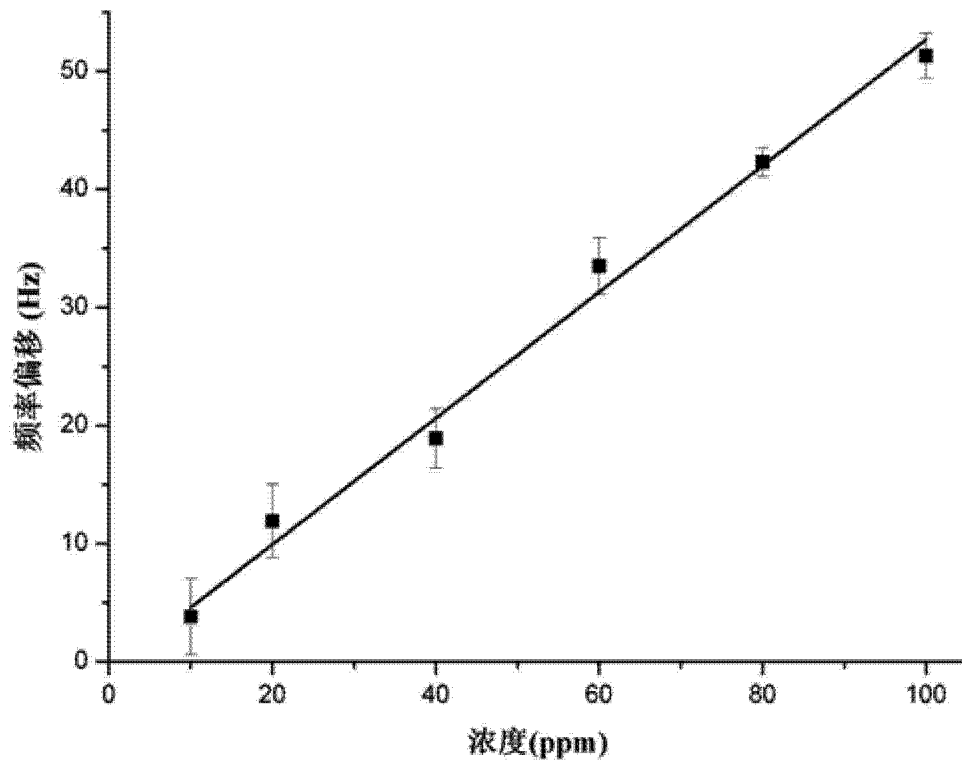


图 7