



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 113201052 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202110428657.8

(22) 申请日 2021.04.21

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113201052 A

(43) 申请公布日 2021.08.03

(73) 专利权人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

专利权人 宁夏中宁枸杞产业创新研究院有
限公司

(72) 发明人 孙爱友 蔡增英

(74) 专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限
公司 31225

专利代理师 褚明伟

(51) Int. Cl.

C07K 14/27 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 5/08 (2018.01)

A01H 6/46 (2018.01)

A01H 6/82 (2018.01)

A01N 47/44 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 1858209 A, 2006.11.08

CN 111850096 A, 2020.10.30

Zengying Cai等.Efficient expression
and purification of soluble Harpin_{Ea}
protein by translation initiation region
codon optimization.Protein Expr Purif.
.2021,全文.

(续)

审查员 陈彦闯

权利要求书1页 说明书9页

序列表4页 附图4页

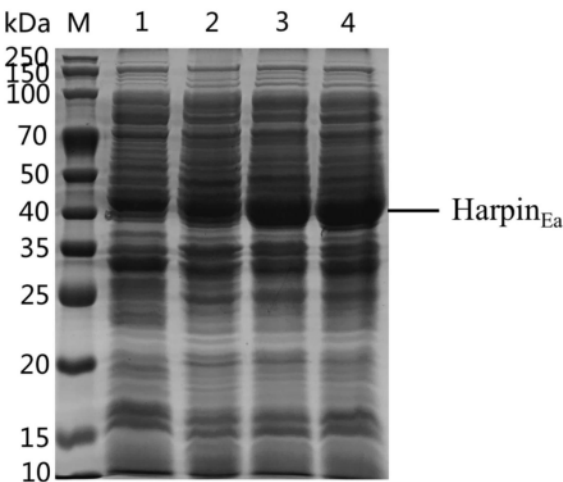
(54) 发明名称

Harpin_{Ea}的高效可溶性表达及生产方法和
应用

(57) 摘要

本发明涉及Harpin_{Ea}蛋白及高效可溶性表
达及生产方法和应用,具体涉及到免疫蛋白
Harpin_{Ea}的mRNA TIR优化方法,mRNA TIR优化后
的Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白,
Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白
编码基因,含有Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、
Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的表达盒、重组载体或
重组菌,以及免疫蛋白Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、
Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白的高效可溶性表达及
生产方法,和Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或
Harpin_{Ea}3蛋白在促进植物生长和提高植物抗性
中的应用.通过本发明的方案,Harpin_{Ea}蛋白占
可溶性蛋白的总量从12.9%提升至46.7%,提高

了约3.6倍,大大促进了Harpin_{Ea}蛋白的可溶性
表达.在此基础上,通过Ni-NTA一步纯化的方法,
获得了纯度超过90%的高纯度Harpin_{Ea}蛋白。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Y. Chen等.Soluble expression and purification of a functional harpin protein in Escherichia coli.Process Biochemistry.2017,第57卷200-206.

J. Yin等.Quantitative relationship

between the mRNA secondary structure of translational initiation region and the expression level of heterologous protein in Escherichia coli.J Ind Microbiol Biotechnol.2016,第43卷(第1期),97-102.

1. Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白的核酸分子,其特征在于,
所述Harpin_{Ea}1编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;
所述Harpin_{Ea}2编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;
所述Harpin_{Ea}3编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。
2. 含有Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的表达盒、重组载体或重组菌,其特征在于,
所述Harpin_{Ea}1编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;
所述Harpin_{Ea}2编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;
所述Harpin_{Ea}3编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。
3. 根据权利要求2所述含有Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的表达盒、重组载体或重组菌,其特征在于,含有Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的重组菌的构建方法是:将Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3的编码基因与表达载体进行无缝克隆连接后转化入宿主细胞所得。
4. Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白的制备方法,其特征在于,将含有Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的重组菌接种至发酵培养基中,待OD₆₀₀达到0.6-1.8,添加IPTG诱导表达,离心收获菌体,破碎,取破碎液上清液,经Ni-NTA亲和层析纯化,得到Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3;
所述Harpin_{Ea}1编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;
所述Harpin_{Ea}2编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;
所述Harpin_{Ea}3编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。
5. 根据权利要求4所述Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白的制备方法,其特征在于,培养条件为:以1-10%的接种量接种发酵培养基,待OD₆₀₀达到0.6-1.8,添加IPTG至终浓度0.1-0.6mM,15-20 °C,低温诱导16-20 h;所述发酵培养基为含卡那霉素的LB培养基;IPTG的添加量为终浓度0.2-0.4mM。

Harpin_{Ea}的高效可溶性表达及生产方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及mRNATIR优化后的Harpin_{Ea}蛋白及高效可溶性表达及生产方法和应用,具体涉及到免疫蛋白Harpin_{Ea}的mRNA TIR优化方法,mRNA TIR优化后的Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白,Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白编码基因,含有Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的表达盒、重组载体或重组菌,以及免疫蛋白Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白的高效可溶性表达及生产方法,和Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白在促进植物生长和提高植物抗性中的应用。

背景技术

[0002] 超敏蛋白Harpin_{Ea}是HrpN基因编码的,由魏忠民等人于1992年首次从梨火疫病病菌(Erwinia.amylovora)中分离出来的一种能够激发植物产生超敏反应(Hypersensitive response,HR)的蛋白。Harpin_{Ea}作为Harpins家族的一员,具有Harpins的一般特征。已有研究表明,对植物外源施用Harpin蛋白可以激发植物细胞活性氧(ROS)的爆发、离子通道的开放以及HR的发生。HR是植物抵御病原体以产生抗病性的现象,这是一个高度敏感的反应,会引起植物细胞快速、局部死亡。Harpin可通过调节不同的质膜离子通道来改变植物细胞的信号传导、转录调控、光合作用等,从而引发防御反应和程序化细胞死亡来提高植物的免疫抗性并促进植物生长。Harpin通过激活乙烯途径可以提高拟南芥的抗虫性并促进拟南芥的生长。水杨酸(Salicylic acid,SA)介导的SAR通路是植物防卫反应的重要路径。而SAR的激活一定程度上会抑制植物中茉莉酸(JA)介导的系统抗性。拟南芥中,阻断SA的积累可以大大提高JA含量。总而言之,Harpin作用于植物可大大提高植物的抗病、抗虫及生长能力。另外,由于Harpin是蛋白制剂,所以在对植物进行喷施后不会产生化学残留或对环境造成污染。因此,Harpin蛋白在农业生产中具有极高的应用价值,这就意味着以低成本生产高产量的Harpin蛋白是非常有必要的。

[0003] 由此可见,Harpin_{Ea}蛋白在农业生产中具有良好的应用前景,因此提高Harpin_{Ea}蛋白的产量及纯度对工业生产有很大的意义。

发明内容

[0004] 为了提高Harpin_{Ea}蛋白的产量,本发明提供mRNA TIR优化后的Harpin_{Ea}蛋白及其高效可溶性表达及生产方法与应用。具体而言,本发明涉及免疫蛋白Harpin_{Ea}的mRNA TIR优化方法,mRNA TIR优化后的Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白,Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白编码基因,含有Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的表达盒、重组载体或重组菌,以及免疫蛋白Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白的高效可溶性表达及生产方法,和Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白在促进植物生长和提高植物抗性中的应用。

[0005] 本发明通过优化Harpin_{Ea}的mRNA TIR来降低最小折叠自由能 ΔG ,从而提高

Harpin_{Ea}蛋白可溶性表达及纯化方法,对Harpin_{Ea}蛋白的mRNA TIR进行了三轮同义密码子优化来提高其最小折叠自由能。

[0006] 本发明的目的可以通过以下技术方案来实现:

[0007] 本发明所述Harpin_{Ea}蛋白具体为:

[0008] (1)SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;或,

[0009] (2)SEQ ID NO.1同源性75%以上的氨基酸序列;或,

[0010] (3)在SEQ ID NO.1的基础上进行一个或多个氨基酸替换,和/或缺失,和/或添加后获得的具有SEQ ID NO.1相同功能的氨基酸序列。

[0011] 本发明还保护编码所述Harpin_{Ea}蛋白的核酸分子,所述核酸分子可以是DNA,如cDNA、基因组DNA或重组DNA;所述核酸分子也可以是RNA,如mRNA或 hnRNA;

[0012] 进一步地,所述Harpin_{Ea}蛋白的编码基因如序列SEQ ID NO.2所示;

[0013] 本发明的另一目的是提供所述Harpin_{Ea}蛋白mRNA TIR经三轮优化后所获得的Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白;

[0014] 所述Harpin_{Ea}1编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

[0015] 所述Harpin_{Ea}2编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;

[0016] 所述Harpin_{Ea}3编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0017] 优选地,对Harpin_{Ea}的mRNA TIR同义密码子优化的方法为:

[0018] 一轮优化将Harpin_{Ea}基因+24位的G改为了T,+30位的G改为了A,使得 ΔG 的值从-13.03kcal/mol提升到-9.64kcal/mol。在此基础上,二轮优化将Harpin_{Ea}基因+6位的G改为了T,+15位的C改为了T,+36位的C改为了T,+45位的G改为了A,使得 ΔG 的值提升到-7.60kcal/mol。在此基础上,三轮优化将Harpin_{Ea}基因+51位的C改为了T,将 ΔG 的值提升到了-4.44kcal/mol。

[0019] 本发明还提供Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白的核酸分子,即,所述Harpin_{Ea}1编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

[0020] 所述Harpin_{Ea}2编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;

[0021] 所述Harpin_{Ea}3编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0022] 本发明中,Harpin_{Ea}蛋白的编码基因是未经过mRNA TIR密码子优化的,而Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白的编码基因是经过mRNA TIR密码子优化的。

[0023] 本发明还提供含有Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的表达盒、重组载体或重组菌。

[0024] 进一步地,所述重组载体的表达载体可以是pET28a质粒、pET30a质粒或 pBV222质粒等;

[0025] 优选地,所述重组载体的表达载体为含有T7强启动子的pET28a(+)质粒;

[0026] 进一步地,所述重组菌的宿主可以是大肠杆菌DH5 α 、BL21或C802等;

[0027] 优选地,所述重组菌的宿主为E.coli BL21(DE3);

[0028] 本发明还提供含有Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的重组菌的构建方法,优选的是将Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3的编码基因与表达载体进行无缝克隆连接后转化入宿主细胞所得。

[0029] 进一步地,所述重组菌以含有T7强启动子的pET28a(+)质粒为载体,以E.coli

BL21 (DE3) 为宿主, 获得基因工程菌 *E. coli*/pET28a (+) -Harpin_{Ea}、*E. coli*/pET28a (+) -Harpin_{Ea}1、*E. coli*/pET28a (+) -Harpin_{Ea}2、*E. coli*/pET28a (+) -Harpin_{Ea}3;

[0030] 本发明还提供免疫蛋白 Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3 蛋白的生产方法, 具体如下:

[0031] 将构建成功的 *E. coli*/pET28a (+) -Harpin_{Ea}、*E. coli*/pET28a (+) -Harpin_{Ea}1、*E. coli*/pET28a (+) -Harpin_{Ea}2、*E. coli*/pET28a (+) -Harpin_{Ea}3 基因工程菌接种至发酵培养基中, 待 OD₆₀₀ 达到 0.6-1.8, 添加 IPTG 诱导表达, 离心收获菌体, 破碎, 取破碎液上清液, 经 Ni-NTA 亲和层析纯化, 得到 Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2 或 Harpin_{Ea}3。

[0032] 采用上述方法, Harpin_{Ea}3 蛋白的纯度超过 90%。

[0033] 进一步地, 培养条件为: 以 1-10% 的接种量接种发酵培养基, 待 OD₆₀₀ 达到 0.6-1.8, 添加 IPTG 至终浓度 0.1-0.6mM, 15-20℃, 200rpm 低温诱导 16-20h; 经 16-20h 诱导后, Harpin_{Ea}3 蛋白的得率可以达到 0.2-1.5g/L 发酵液;

[0034] 进一步地, 所述发酵培养基为含 50μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基;

[0035] 进一步地, IPTG 的添加量为终浓度 0.3mM;

[0036] 本发明还提供所述 Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2 或 Harpin_{Ea}3 蛋白在促进植物生长中的应用。

[0037] 优选地, 所述 Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2 或 Harpin_{Ea}3 蛋白在促进植物生长中的应用方法如下:

[0038] 将 Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2 或 Harpin_{Ea}3 蛋白配比成终浓度为 0.125-50 μg/mL 的溶液, 单独或与化学农药混合、与其他农药/微生物菌肥/土壤调理剂/植物刺激剂/植物提取物等混合后, 进行叶面喷施或灌根, 可以有效激发植物的免疫反应。

[0039] 优选地, Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2 或 Harpin_{Ea}3 蛋白浓度为 15μg/mL;

[0040] 优选地, 施用方法为叶面喷施;

[0041] 本发明还提供所述 Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2 或 Harpin_{Ea}3 蛋白在制备植物促生长剂中的应用。

[0042] 本发明还提供所述 Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2 或 Harpin_{Ea}3 蛋白的编码基因, 或含有所述编码基因的表达盒、重组载体或重组菌在促进植物生长及提高植物抗性, 或制备植物促生长和提高抗性的制剂中的应用。

[0043] 进一步地, 所述植物可以为小麦、水稻、烟草、辣椒、番茄等。

[0044] 上述应用可快速激发植物的免疫反应, 提高植物抗病能力, 促进植物生长, 增加果实产量。

[0045] 翻译效率受翻译起始区域 (translation initiation region, TIR) 二级结构的影响, 稳定的 TIR 二级结构会削弱核糖体与 mRNA 特定位点的结合, 因此 TIR 二级结构越稳定翻译效率越低。TIR 的二级结构稳定性往往与 GC 含量相关, GC 含量的增加会使 TIR 的二级结构稳定性增加, 从而降低翻译效率。而 TIR 的二级结构稳定性又可以通过最小折叠自由能来体现, 蛋白表达水平与最小折叠自由能呈线性相关, 自由能越低蛋白表达效率也越低。

[0046] 由于 mRNA 的 TIR 对蛋白的表达效率起到关键作用, 因此本发明通过提高 Harpin_{Ea} 的 TIR 最小折叠自由能来提高蛋白的表达水平。

[0047] 与现有技术相比, 本发明具有以下优点及有益效果:

[0048] 通过本发明的方案, Harpin_{Ea}蛋白占可溶性蛋白的总量从12.9%提升至46.7%, 提高了约3.6倍, 大大促进了Harpin_{Ea}蛋白的可溶性表达。在此基础上, 通过Ni-NTA 一步纯化的方法, 获得了纯度超过90%的高纯度Harpin_{Ea}蛋白。

[0049] 通过在烟草上进行HR反应, 确定了本发明制备的Harpin_{Ea}蛋白具备Harpin 蛋白特有的生物学活性, 且12.5 μ g/mL Harpin_{Ea}蛋白便能引起肉眼可见的HR反应。此外, 本发明制备的Harpin_{Ea}蛋白还同时具备促进植物生长及提高植物抗性的能力。

附图说明

[0050] 图1: 未优化及优化后Harpin_{Ea}蛋白的mRNA TIR二级结构图;

[0051] 其中, A, 没有经过优化的mRNA TIR的二级结构; B, 经过一轮优化的mRNA TIR的二级结构; C, 经过二轮优化的mRNA TIR的二级结构; D, 经过三轮优化的mRNA TIR的二级结构。

[0052] 图2: Harpin_{Ea}基因的PCR验证图;

[0053] 其中, M, DNA marker; 1, Harpin_{Ea}。

[0054] 图3: mRNA TIR未优化及优化后Harpin_{Ea}蛋白的表达情况图;

[0055] 其中, M, 蛋白maker; 1, $\Delta G = -13.03\text{kcal/mol}$ 时Harpin_{Ea}蛋白的可溶性表达; 2, $\Delta G = -9.64\text{kcal/mol}$ 时Harpin_{Ea}1蛋白的可溶性表达; 3, $\Delta G = -7.60\text{kcal/mol}$ 时 Harpin_{Ea}2蛋白的可溶性表达; 4, $\Delta G = -4.44\text{kcal/mol}$ 时Harpin_{Ea}3蛋白的可溶性表达。

[0056] 图4: Harpin_{Ea}3蛋白Ni-NTA亲和层析图;

[0057] 其中, (A) M, 蛋白marker; 1, 全菌破碎液; 2, 破碎液上清; 3, 破碎液沉淀。(B) 1, 破碎液上清; 2, 50mM咪唑洗脱液; 3, 300mM咪唑洗脱液。

[0058] 图5: 纯化后的Harpin_{Ea}3蛋白对烟草叶片的HR反应图;

[0059] 其中, 1, 12.5 μ g/mL Harpin_{Ea}3蛋白; 2, 325 μ g/mL Harpin_{Ea}3蛋白; 3, 50 μ g/mL Harpin_{Ea}3蛋白; 4, 100 μ g/mL Harpin_{Ea}3蛋白; 5, 水; 6, PBS缓冲液; 7, EVP; 8, Protein K处理1h的Harpin_{Ea}3蛋白; 9, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热10min后的100 μ g/mL Harpin_{Ea}3蛋白。

[0060] 图6: Harpin_{Ea}3浸种处理后小麦的湿重、干重、根长、株高图;

[0061] 其中, A, 浸种处理后的小麦湿重; B, 浸种处理后的小麦干重; C, 浸种处理后的小麦根长; D, 浸种处理后的小麦株高。横坐标分别表示EVP, 0.5 μ g/mL、2.5 μ g/mL、5 μ g/mL、25 μ g/mL、50 μ g/mL Harpin_{Ea}蛋白处理(从左向右)。

具体实施方式

[0062] 为了使本专利的目的、技术方案及优点更加清楚明白, 以下结合具体实施例, 对本专利进行进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本专利, 并不用于限定本发明。

[0063] 下述实施例的实验方法如无特别说明, 均为常规方法; 下述实施例中所使用的实验材料及试剂, 如无特别说明, 均可通过商业途径购买获得。

[0064] 本发明提供的Harpin_{Ea}蛋白可根据氨基酸序列进行人工合成, 也可通过对编码基因进行生物表达获得。

[0065] 本发明所述Harpin_{Ea}蛋白具体为:

[0066] (1) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列; 或,

[0067] (2)SEQ ID NO.1同源性75%以上的氨基酸序列;或,

[0068] (3)在SEQ ID NO.1的基础上进行一个或多个氨基酸替换,和/或缺失,和/或添加后获得的具有SEQ ID NO.1相同功能的氨基酸序列。

[0069] 本发明还保护编码所述Harpin_{Ea}蛋白的核酸分子,所述核酸分子可以是DNA,如cDNA、基因组DNA或重组DNA;所述核酸分子也可以是RNA,如mRNA或hnRNA;

[0070] 进一步地,所述Harpin_{Ea}蛋白的编码基因如序列表SEQ ID NO.2所示;

[0071] 本发明的另一目的是提供所述HarpinEa蛋白mRNA TIR经三轮优化后所获得的Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白;

[0072] 所述Harpin_{Ea}1编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

[0073] 所述Harpin_{Ea}2编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;

[0074] 所述Harpin_{Ea}3编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0075] 优选地,对Harpin_{Ea}的mRNA TIR同义密码子优化的方法为:

[0076] 一轮优化将Harpin_{Ea}基因+24位的G改为了T,+30位的G改为了A,使得 ΔG 的值从-13.03kcal/mol提升到-9.64kcal/mol。在此基础上,二轮优化将Harpin_{Ea}基因+6位的G改为了T,+15位的C改为了T,+36位的C改为了T,+45位的G改为了A,使得 ΔG 的值提升到-7.60kcal/mol。在此基础上,三轮优化将Harpin_{Ea}基因+51位的C改为了T,将 ΔG 的值提升到了-4.44kcal/mol。

[0077] 本发明还提供Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白的核酸分子,即,所述Harpin_{Ea}1编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示;

[0078] 所述Harpin_{Ea}2编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示;

[0079] 所述Harpin_{Ea}3编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示。

[0080] 本发明中,Harpin_{Ea}蛋白的编码基因是未经过mRNA TIR密码子优化的,而Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白的编码基因是经过mRNA TIR密码子优化的。

[0081] 本发明还提供含有Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的表达盒、重组载体或重组菌。

[0082] 进一步地,所述重组载体的表达载体可以是pET28a质粒、pET30a质粒或pBV222质粒等;

[0083] 优选地,所述重组载体的表达载体为含有T7强启动子的pET28a(+)质粒;

[0084] 进一步地,所述重组菌的宿主可以是大肠杆菌DH5 α 、BL21或C802等;

[0085] 优选地,所述重组菌的宿主为E.coli BL21(DE3);

[0086] 本发明还提供含有Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白编码基因的重组菌的构建方法,优选的是将Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3的编码基因与表达载体进行无缝克隆连接后转化入宿主细胞所得。

[0087] 进一步地,所述重组菌以含有T7强启动子的pET28a(+)质粒为载体,以E.coli BL21(DE3)为宿主,获得基因工程菌E.coli/pET28a(+)-Harpin_{Ea}、E.coli/pET28a(+)-Harpin_{Ea}1、E.coli/pET28a(+)-Harpin_{Ea}2、E.coli/pET28a(+)-Harpin_{Ea}3;

[0088] 本发明还提供免疫蛋白Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3蛋白的生产方法,具体如下:

[0089] 将构建成功的E.coli/pET28a(+)-Harpin_{Ea}、E.coli/pET28a(+)-Harpin_{Ea}1、E.

coli/pET28a(+)-Harpin_{Ea}2、E.coli/pET28a(+)-Harpin_{Ea}3基因工程菌接种至发酵培养基中,待OD₆₀₀达到0.6-1.8,添加IPTG诱导表达,离心收获菌体,破碎,取破碎液上清液,经Ni-NTA亲和层析纯化,得到Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3。

[0090] 采用上述方法,Harpin_{Ea}3蛋白的纯度超过90%。

[0091] 进一步地,培养条件为:以1-10%的接种量接种发酵培养基,待OD₆₀₀达到0.6-1.8,添加IPTG至终浓度0.1-0.6mM,15-20℃,200rpm低温诱导16-20h;经16-20h诱导后,Harpin_{Ea}3蛋白的得率可以达到0.2-1.5g/L发酵液;

[0092] 进一步地,所述发酵培养基为含50μg/mL卡那霉素的LB培养基;

[0093] 进一步地,IPTG的添加量为终浓度0.3mM;

[0094] 本发明还提供所述Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白在促进植物生长中的应用。

[0095] 优选地,所述Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白在促进植物生长中的应用方法如下:

[0096] 将Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白配比成终浓度为0.125-50 μg/mL的溶液,单独或与化学农药混合、与其他农药/微生物菌肥/土壤调理剂/植物刺激剂/植物提取物等混合后,进行叶面喷施或灌根,可以有效激发植物的免疫反应。

[0097] 优选地,Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白浓度为15μg/mL;

[0098] 优选地,施用方法为叶面喷施;

[0099] 本发明还提供所述Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白在制备植物促生长剂中的应用。

[0100] 本发明还提供所述Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2或Harpin_{Ea}3蛋白的编码基因,或含有所述编码基因的表达盒、重组载体或重组菌在促进植物生长中的应用。

[0101] 进一步地,所述植物可以为小麦、水稻、烟草、辣椒、番茄等。

[0102] 上述应用可快速激发植物的免疫反应,提高植物抗病能力,促进植物生长,增加果实产量。

[0103] 以下将结合附图及具体实施例对本发明做进一步地解释说明。

[0104] 实施例1:Harpin_{Ea}的mRNA TIR同义密码子优化

[0105] 对Harpin_{Ea}基因的翻译起始区域(-36至+53位)进行了同义密码子优化,利用Mfold Web计算最小折叠自由能ΔG。在原始序列的基础上,对局部的密码子手动进行了同义优化,以合理地减少GC的含量。一轮优化将Harpin_{Ea}基因+24位的G改为了T,+30位的G改为了A,使得ΔG的值从-13.03kcal/mol提升到-9.64 kcal/mol。在此基础上,二轮优化将Harpin_{Ea}基因+6位的G改为了T,+15位的C改为了T,+36位的C改为了T,+45位的G改为了A,使得ΔG的值提升到-7.60 kcal/mol。在此基础上,三轮优化将Harpin_{Ea}基因+51位的C改为了T,将ΔG的值提升到了-4.44kcal/mol,未优化及优化后的Harpin_{Ea}蛋白mRNA TIR二级结构及自由能如图1所示。

[0106] 实施例2:基因工程菌构建

[0107] 本发明提供的Harpin_{Ea}蛋白可根据氨基酸序列进行人工合成,也可通过对编码基因进行生物表达获得,本实施例将以基因表达的形式为例进行解释说明。

[0108] (1)基因扩增

[0109] ①引物序列

[0110] Harpin_{Ea} (SEQ ID NO.2所示)、Harpin_{Ea}1 (SEQ ID NO.3所示)、Harpin_{Ea}2 (SEQ ID NO.4所示)、Harpin_{Ea}3 (SEQ ID NO.5所示) 基因扩增所采用的引物为 P1、P2、P3、P4、P5, 引物序列如下表所示:

名称	引物序列 (5'-3')	备注
P1	GTGGTGGTGGTGGTGGTGGT <u>CTCGAG</u> TGCTGCGCCCAG TTTGCCCAAGTGCC	斜体下划线 部分为 <i>Xho</i> I 酶切位点
P2	CTTTAAGAAGGAGATATA <u>CCATG</u> GGGAGCCTGAACA CGAGCGGGCTGGGGGCGAGCACGATGCAGATTAGCA TTGGTGG	斜体下划线 部分为 <i>Nco</i> I 酶切位点
P3	CTTTAAGAAGGAGATATA <u>CCATG</u> GGGAGCCTGAACA CGAGCGG <u>T</u> CTGGG <u>A</u> GCGAGCACGATGCAGATTAGCA TTGGTGG	斜体下划线 部分为 <i>Nco</i> I 酶切位点
P4	CTTTAAGAAGGAGATATA <u>CCATG</u> GGT <u>T</u> AGCCTGAATA CGAGCGG <u>T</u> CTGGG <u>A</u> GCGAG <u>T</u> ACGATGCA <u>A</u> ATTAGCA TTGGTGG	斜体下划线 部分为 <i>Nco</i> I 酶切位点
P5	CTTTAAGAAGGAGATATA <u>CCATG</u> GGT <u>T</u> AGCCTGAATA CGAGCGG <u>T</u> CTGGG <u>A</u> GCGAG <u>T</u> ACGATGCA <u>A</u> ATTAG <u>T</u> A TTGGTGG	斜体下划线 部分为 <i>Nco</i> I 酶切位点

[0113] 加粗并同时下划线的字体部分为每轮同义密码子优化的碱基。

[0114] ②基因扩增

[0115] 以Harpin_{Ea}基因序列为模板, 用引物P1与P2、P3、P4、P5分别进行PCR扩增获得 Harpin_{Ea}、Harpin_{Ea}1、Harpin_{Ea}2、Harpin_{Ea}3基因。反应体系50μL, 包含 18μL的水, 3μL的目的基因, 2μL的前引物, 2μL的后引物, 25μL的2×PFU。94℃预变性90s, 94℃下变性20s, 55℃退火20s, 72℃下延伸40s, 变性、退火、延伸三个步骤循环30轮, 延伸5min。

[0116] (2) 工程菌构建

[0117] 表达载体为含有T7强启动子的pET28a(+) 质粒, 宿主为大肠杆菌BL21 (DE3), 通过 *Nco* I/*Xho* I 两个酶切位点利用无缝克隆的方法将基因连接至质粒并转化进 BL21 (DE3), 经PCR验证和基因测序确定, 阳性克隆即为构建成功的重组基因工程菌, PCR验证结果如图2所示。

[0118] 实施例3: Harpin_{Ea}蛋白的诱导表达及纯化

[0119] 将未优化及优化后的重组菌株接种至含50μg/mL卡那霉素的LB培养基中, 37℃,

200rpm过夜培养12h制备成种子液。按5%的接种量将种子液接种到含50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养,待 OD_{600} 达到1.0,添加IPTG至终浓度0.3mM,18 $^{\circ}\text{C}$,200rpm低温诱导18h。诱导结束后,8000rpm离心10min,收集菌体,破碎,8000rpm离心30min。通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳发现(图3),Harpin_{Ea}蛋白在上清液中有表达,表观分子量约为40kD,这与理论分子量相符。随着翻译起始区域最小折叠自由能 ΔG 的增大,Harpin_{Ea}蛋白的表达水平也随之提高,Harpin_{Ea}蛋白在可溶性蛋白中的占比从12.9%提高至46.7%,提高了约3.6倍。

[0120] 收集Harpin_{Ea}3菌株菌体,超声破碎后取上清,将上清液滤膜过滤,进样Ni-NTA亲和层析柱,管中蛋白样减少一个柱体积后即取穿透样,用4个柱体积的裂解缓冲液洗涤镍柱,然后分别用50mM和300mM的咪唑洗脱,收集洗脱液。结果显示,300mM的咪唑可以将Harpin_{Ea}蛋白完全洗脱下来,蛋白纯度约为90%。将蛋白样品进行SDS-PAGE检测,结果如图4B所示,泳道3可以看到清晰的Harpin_{Ea}蛋白,条带大小约为40kD。经Bradford法测定蛋白浓度后换算可知Harpin_{Ea}蛋白的得率可以达到1.5g/L发酵液。

[0121] 实施例4:Harpin_{Ea}蛋白对烟草叶片HR反应的检测

[0122] 将Harpin_{Ea}蛋白产品用PBS缓冲液稀释,配置如下样品:

[0123] 样品1:12.5 $\mu\text{g/mL}$ Harpin_{Ea}蛋白;

[0124] 样品2:25 $\mu\text{g/mL}$ Harpin_{Ea}蛋白;

[0125] 样品3:50 $\mu\text{g/mL}$ Harpin_{Ea}蛋白;

[0126] 样品4:100 $\mu\text{g/mL}$ Harpin_{Ea}蛋白;

[0127] 样品5:100 $\mu\text{g/mL}$ Harpin_{Ea}蛋白,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热10min;

[0128] 阴性对照1:水;

[0129] 阴性对照2:PBS缓冲液;

[0130] 阴性对照3:EVP;

[0131] 阴性对照4:100 $\mu\text{g/mL}$ Harpin_{Ea}蛋白,Protein K处理1h;

[0132] 取上述蛋白样品和对照样品,对处于生长期的烟草叶片进行注射,每孔的注射计量均为100 μL 。将注射后的烟草放置在植物培养箱中,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养3天,观察叶片中的枯斑大小。

[0133] 结果如图5所示,样品组在烟草叶片上均产生了肉眼可见的HR反应,且12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的Harpin_{Ea}蛋白便能引起烟草叶片的HR反应。另外,蛋白酶K处理后的蛋白未能激发烟草HR反应,而100 $^{\circ}\text{C}$ 处理后的蛋白能够激发反应。这也与以往报道的Harpin蛋白家族的典型特征:对蛋白酶敏感、具有热稳定性相符,进一步证明了本研究纯化获得的Harpin_{Ea}蛋白具备以往报道过的生物学活性。

[0134] 实施例5:Harpin_{Ea}促进小麦生长实验

[0135] 消毒后的小麦种子用无菌水漂洗3次,然后将它们分为6份,每份20粒。分别将每份小麦种子浸泡在0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 经过0.22 μm 滤膜过滤后的Harpin_{Ea}蛋白液中,在室温下浸泡12h。空载体制剂(EVP)作为对照做同样处理。浸泡后的小麦种子分别播种于96孔培养盒中,水培7d后测量小麦根系长度、植株高度、湿重,并拍照记录,新鲜小麦苗置于75 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱4天后测量干重。

[0136] 结果如图6所示,不同浓度Harpin_{Ea}蛋白处理相较于EVP处理的小麦生长均有明显

增强。 $\text{Harpin}_{\text{Ea}}$ 蛋白处理的小麦湿重为EVP处理的1.35-1.65倍,干重为EVP处理的1.22-1.65倍,根长为EVP处理的1.53-1.71倍,株高为EVP处理的1.5-2.05倍。 $\text{Harpin}_{\text{Ea}}$ 蛋白对小麦生长的促进能力随蛋白浓度的提高有一个上升再下降的趋势,综合来看,5 $\mu\text{g/mL}$ 蛋白处理的小麦促生长能力最强。

[0137] 上述的对实施例的描述是为便于该技术领域的普通技术人员能理解和使用发明。熟悉本领域技术的人员显然可以容易地对这些实施例做出各种修改,并把在此说明的一般原理应用到其他实施例中而不必经过创造性的劳动。因此,本发明不限于上述实施例,本领域技术人员根据本发明的揭示,不脱离本发明范畴所做出的改进和修改都应该在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表			
[0002]	<110> 华东理工大学;宁夏中宁枸杞产业创新研究院有限公司			
[0003]	<120> HarpinEa 的高效可溶性表达及生产方法和应用			
[0004]	<160> 5			
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0			
[0006]	<210> 1			
[0007]	<211> 412			
[0008]	<212> PRT			
[0009]	<213> 梨火疫病菌(Erwinia.amylovora)			
[0010]	<400> 1			
[0011]	Met	Gly	Ser	Leu
[0012]	1	5	10	15
[0013]	Ser	Ile	Gly	Gly
[0014]	20	25	30	
[0015]	Gln	Asn	Ala	Gly
[0016]	35	40	45	
[0017]	Asn	Gln	Asn	Asp
[0018]	50	55	60	
[0019]	Met	Met	Met	Met
[0020]	65	70	75	80
[0021]	Leu	Gly	Gly	Gly
[0022]	85	90	95	
[0023]	Glu	Gly	Leu	Ser
[0024]	100	105	110	
[0025]	Thr	Leu	Gly	Ser
[0026]	115	120	125	
[0027]	Pro	Leu	Asp	Gln
[0028]	130	135	140	
[0029]	Ser	Thr	Ser	Gly
[0030]	145	150	155	160
[0031]	Gln	Leu	Leu	Lys
[0032]	165	170	175	
[0033]	Gly	Gln	Asp	Gly
[0034]	180	185	190	
[0035]	Glu	Gly	Glu	Gln
[0036]	195	200	205	
[0037]	Gly	Leu	Met	Gly
[0038]	210	215	220	
[0039]	Gly	Gly	Gly	Gln
[0040]	225	230	235	240
[0041]	Leu	Gly	Gly	Lys

[0042]	245	250	255
[0043]	Gln Leu Gly Asn Ala Val Gly Thr Gly Ile Gly Met Lys Ala Gly Ile		
[0044]	260	265	270
[0045]	Gln Ala Leu Asn Asp Ile Gly Thr His Ser Asp Ser Ser Thr Arg Ser		
[0046]	275	280	285
[0047]	Phe Val Asn Lys Gly Asp Arg Ala Met Ala Lys Glu Ile Gly Gln Phe		
[0048]	290	295	300
[0049]	Met Asp Gln Tyr Pro Glu Val Phe Gly Lys Pro Gln Tyr Gln Lys Gly		
[0050]	305	310	315
[0051]	Pro Gly Gln Glu Val Lys Thr Asp Asp Lys Ser Trp Ala Lys Ala Leu		
[0052]	325	330	335
[0053]	Ser Lys Pro Asp Asp Asp Gly Met Thr Pro Ala Ser Met Glu Gln Phe		
[0054]	340	345	350
[0055]	Asn Lys Ala Lys Gly Met Ile Lys Ser Ala Met Ala Gly Asp Thr Gly		
[0056]	355	360	365
[0057]	Asn Gly Asn Leu Gln Ala Arg Gly Ala Gly Gly Ser Ser Leu Gly Ile		
[0058]	370	375	380
[0059]	Asp Ala Met Met Ala Gly Asp Ala Ile Asn Asn Met Ala Leu Gly Lys		
[0060]	385	390	395
[0061]	Leu Gly Ala Ala Leu Glu His His His His His His		
[0062]	405	410	
[0063]	<210> 2		
[0064]	<211> 1236		
[0065]	<212> DNA		
[0066]	<213> 梨火疫病菌(Erwinia.amylovora)		
[0067]	<400> 2		
[0068]	atggggagcc tgaacacgag cgggctgggg gcgagcacga tgcagattag cattggtggg	60	
[0069]	gcggggggga ataacgggct gctgggtacc agcagacaga acgccgggct gggggggaac	120	
[0070]	agcgactggt gtctgggagg aggaaatcag aatgacaccg ttaaccagct ggcaggtctg	180	
[0071]	ctgacgggca tgatgatgat gatgagcatg atgggaggag gtggtctgat gggaggcgga	240	
[0072]	ctgggagggg gtctgggaaa tggcttagga ggaagcgggg gactgggtga aggtctgagc	300	
[0073]	aatgcactga atgatatgct gggtgggagt ttaaataccc tgggaagcaa aggttgtaat	360	
[0074]	aatacaacaa gcacaacaaa tagcccctg gatcaggctt taggtataaa tagcacatcg	420	
[0075]	cagaatgacg atagcaccag cggtaccgac agcacctccg atagcagcga tccgatgcag	480	
[0076]	caactgctga aaatgttttc agaaattatg caatccctgt ttggcgacgg acaagatggt	540	
[0077]	acgcagggga gcagcagcgg gggcaaacag ccaaccgaag gagaacagaa tgcctataaa	600	
[0078]	aaggagtgca ccgatgcact gagcgggctg atgggtaatg gtttaagcca gctgctgggc	660	
[0079]	aacggtggac tgggaggagg gcaagtggt aacgcaggaa caggtctgga tggtagcagc	720	
[0080]	ctgggaggca aaggtttaca gaatctgtcg ggtccggtg attatcagca attaggtaat	780	
[0081]	gcagttggta cgggtatagg tatgaaagca ggtattcagg cactgaatga catcggaacc	840	
[0082]	catagtgaca gtagcaccog gagctttgtt aataaaggag accgtgcaat ggcaaaagaa	900	
[0083]	ataggtcagt ttatggatca gtaccgggaa gtttttggaa aaccgcaata tcagaaaggt	960	

[0084]	ccgggacagg aagtgaac cgatgataaa agctgggcaa aagcattaag taaaccggac	1020
[0085]	gatgatggca tgaccccagc aagcatggaa cagtttaata aagcaaaagg tatgatcaag	1080
[0086]	agcgcaatgg caggcgacac cggaaatgga aatctgcagg cagcggggc aggtggaagc	1140
[0087]	agcttaggca ttgatgcaat gatggcaggt gatgcaataa ataatatggc actgggcaaa	1200
[0088]	ctgggcgcag cactcgagca ccaccaccac caccac	1236
[0089]	<210> 3	
[0090]	<211> 1236	
[0091]	<212> DNA	
[0092]	<213> 梨火疫病菌(Erwinia.amylovora)	
[0093]	<400> 3	
[0094]	atggggagcc tgaacacgag cggctctgga gcgagcacga tgcagattag catttggtggg	60
[0095]	gcggggggga ataacgggct gctgggtacc agcagacaga acgccgggct gggggggaac	120
[0096]	agcgactgg gtctgggagg aggaaatcag aatgacaccg ttaaccagct ggcaggtctg	180
[0097]	ctgacgggca tgatgatgat gatgagcatg atgggaggag gtggtctgat gggaggcgga	240
[0098]	ctgggagggg gtctgggaaa tggcttagga ggaagcggg gactgggtga aggtctgagc	300
[0099]	aatgcactga atgatatgct ggggtgggagt ttaaataccc tgggaagcaa aggttgtaat	360
[0100]	aatacaacaa gcacaacaaa tagcccgtg gatcaggctt taggtataaa tagcacatcg	420
[0101]	cagaatgacg atagcaccag cggtagcgac agcacctcg atagcagca tccgatgcag	480
[0102]	caactgctga aaatgttttc agaaattatg caatccctgt ttggcgacgg acaagatggt	540
[0103]	acgcagggga gcagcagcg gggcaaacag ccaaccgaag gagaacagaa tgcctataaa	600
[0104]	aaggagtgca ccgatgact gagcgggctg atgggtaatg gtttaagcca gctgctgggc	660
[0105]	aacggtggac tgggaggagg gcaaggtggt aacgcaggaa caggtctgga tggtagcagc	720
[0106]	ctgggaggca aaggtttaca gaatctgtcg ggtccggtt attatcagca attagtaat	780
[0107]	gcagttagta cgggtatagg tatgaaagca ggtattcagg cactgaatga catcggaacc	840
[0108]	catagtaca gtagcaccg gagctttgtt aataaaggag accgtgcaat ggcaaaagaa	900
[0109]	atagtcagt ttatggatca gtaccggaa gtttttgaa aaccgcaata tcagaaaggt	960
[0110]	ccgggacagg aagtgaac cgatgataaa agctgggcaa aagcattaag taaaccggac	1020
[0111]	gatgatggca tgaccccagc aagcatggaa cagtttaata aagcaaaagg tatgatcaag	1080
[0112]	agcgcaatgg caggcgacac cggaaatgga aatctgcagg cagcggggc aggtggaagc	1140
[0113]	agcttaggca ttgatgcaat gatggcaggt gatgcaataa ataatatggc actgggcaaa	1200
[0114]	ctgggcgcag cactcgagca ccaccaccac caccac	1236
[0115]	<210> 4	
[0116]	<211> 1236	
[0117]	<212> DNA	
[0118]	<213> 梨火疫病菌(Erwinia.amylovora)	
[0119]	<400> 4	
[0120]	atgggtagcc tgaatacag cggctctgga gcgagtacga tgcaaattag catttggtggg	60
[0121]	gcggggggga ataacgggct gctgggtacc agcagacaga acgccgggct gggggggaac	120
[0122]	agcgactgg gtctgggagg aggaaatcag aatgacaccg ttaaccagct ggcaggtctg	180
[0123]	ctgacgggca tgatgatgat gatgagcatg atgggaggag gtggtctgat gggaggcgga	240
[0124]	ctgggagggg gtctgggaaa tggcttagga ggaagcggg gactgggtga aggtctgagc	300
[0125]	aatgcactga atgatatgct ggggtgggagt ttaaataccc tgggaagcaa aggttgtaat	360

[0126]	aatacaacaa gcacaacaaa tagcccgtg gatcaggctt taggtataaa tagcacatcg	420
[0127]	cagaatgacg atagcaccag cggtagcgac agcacctccg atagcagcga tccgatgcag	480
[0128]	caactgctga aaatgttttc agaaattatg caatccctgt ttggcgacgg acaagatggt	540
[0129]	acgcagggga gcagcagcgg gggcaaacag ccaaccgaag gagaacagaa tgcctataaa	600
[0130]	aagggagtca ccatgact gagcgggctg atgggtaatg gtttaagcca gctgctgggc	660
[0131]	aacggtggac tgggaggagg gcaaggtggt aacgcaggaa caggtctgga tggtagcagc	720
[0132]	ctgggaggca aaggtttaca gaatctgtcg ggtccggtg attatcagca attaggtaat	780
[0133]	gcagttggtg cgggtatagg tatgaaagca ggtattcagg cactgaatga catcggaacc	840
[0134]	catagtaca gtagcaccg gagctttgtt aataaaggag accgtgcaat ggcaaaagaa	900
[0135]	ataggtcagt ttatggatca gtaccggaa gtttttgaa aaccgcaata tcagaaaggt	960
[0136]	ccgggacagg aagtgtttac cgatgataaa agctgggcaa aagcattaag taaaccggac	1020
[0137]	gatgatggca tgacccagc aagcatggaa cagtttaata aagcaaaagg tatgatcaag	1080
[0138]	agcgcaatgg caggcgacac cggaatgga aatctgcagg cagcggggc aggtggaagc	1140
[0139]	agcttaggca ttgatgcaat gatggcagg gatgcaataa ataatatggc actgggcaaa	1200
[0140]	ctgggcgcag cactcgagca ccaccaccac caccac	1236
[0141]	<210>	5
[0142]	<211>	1236
[0143]	<212>	DNA
[0144]	<213>	梨火疫病菌(Erwinia.amylovora)
[0145]	<400>	5
[0146]	atgggtagcc tgaatacag cggctctggga gcgagtacga tgcaaattag tattggtggg	60
[0147]	gcggggggga ataacgggct gctgggtacc agcagacaga acgccgggct gggggggaac	120
[0148]	agcgactggt gtctgggagg aggaaatcag aatgacaccg ttaaccagct ggcaggtctg	180
[0149]	ctgacgggca tgatgatgat gatgagcatg atgggaggag gtggtctgat gggaggcgga	240
[0150]	ctgggagggg gtctgggaaa tggcttagga ggaagcggg gactgggtga aggtctgagc	300
[0151]	aatgcactga atgatatgct ggggtggagt ttaaataccc tgggaagcaa aggtggtaat	360
[0152]	aatacaacaa gcacaacaaa tagcccgtg gatcaggctt taggtataaa tagcacatcg	420
[0153]	cagaatgacg atagcaccag cggtagcgac agcacctccg atagcagcga tccgatgcag	480
[0154]	caactgctga aaatgttttc agaaattatg caatccctgt ttggcgacgg acaagatggt	540
[0155]	acgcagggga gcagcagcgg gggcaaacag ccaaccgaag gagaacagaa tgcctataaa	600
[0156]	aagggagtca ccatgact gagcgggctg atgggtaatg gtttaagcca gctgctgggc	660
[0157]	aacggtggac tgggaggagg gcaaggtggt aacgcaggaa caggtctgga tggtagcagc	720
[0158]	ctgggaggca aaggtttaca gaatctgtcg ggtccggtg attatcagca attaggtaat	780
[0159]	gcagttggtg cgggtatagg tatgaaagca ggtattcagg cactgaatga catcggaacc	840
[0160]	catagtaca gtagcaccg gagctttgtt aataaaggag accgtgcaat ggcaaaagaa	900
[0161]	ataggtcagt ttatggatca gtaccggaa gtttttgaa aaccgcaata tcagaaaggt	960
[0162]	ccgggacagg aagtgtttac cgatgataaa agctgggcaa aagcattaag taaaccggac	1020
[0163]	gatgatggca tgacccagc aagcatggaa cagtttaata aagcaaaagg tatgatcaag	1080
[0164]	agcgcaatgg caggcgacac cggaatgga aatctgcagg cagcggggc aggtggaagc	1140
[0165]	agcttaggca ttgatgcaat gatggcagg gatgcaataa ataatatggc actgggcaaa	1200
[0166]	ctgggcgcag cactcgagca ccaccaccac caccac	1236

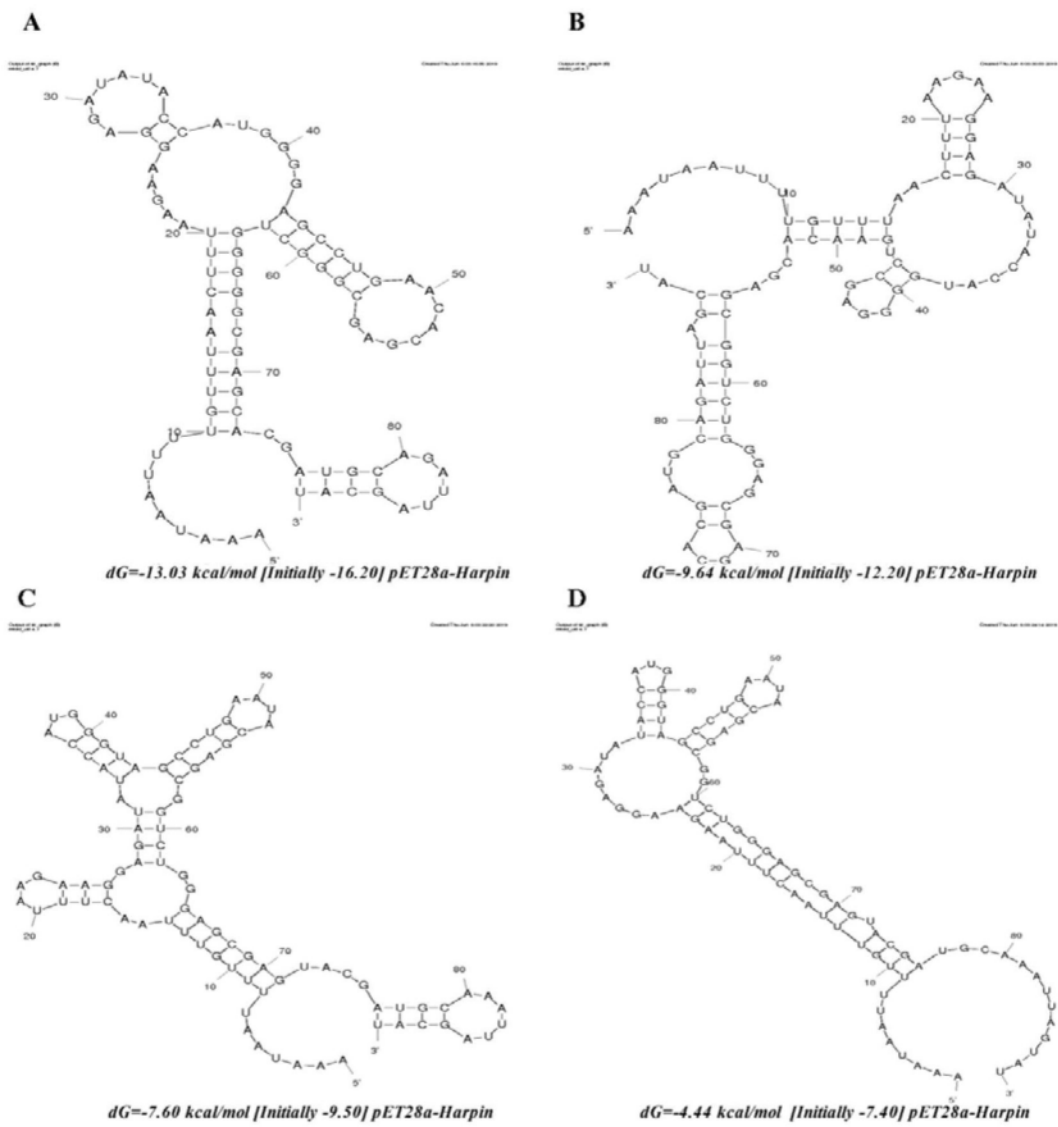


图1

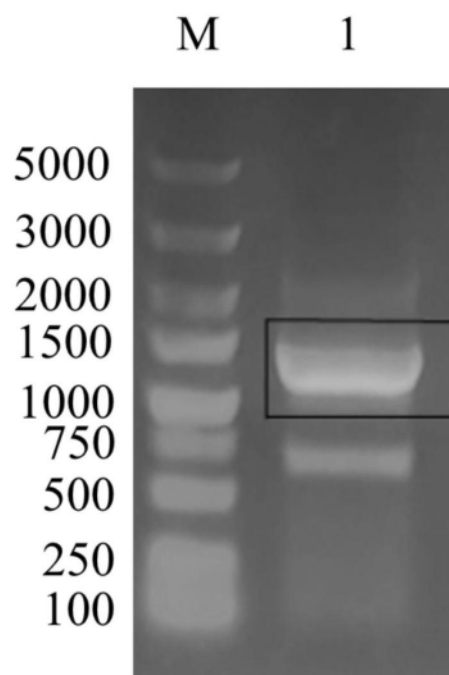


图2

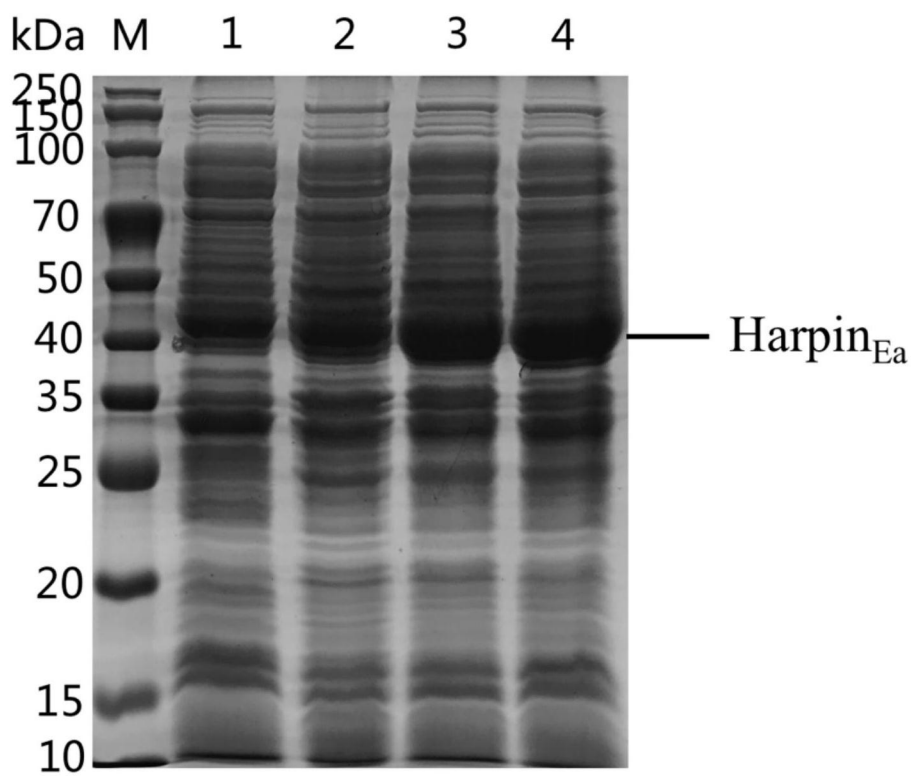


图3

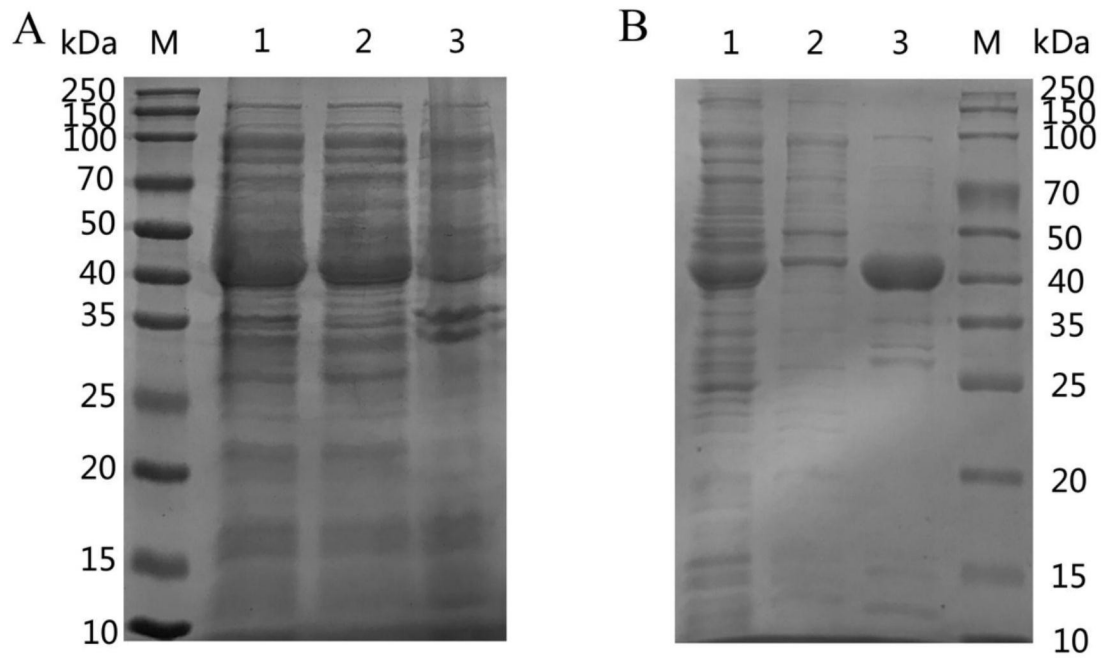


图4

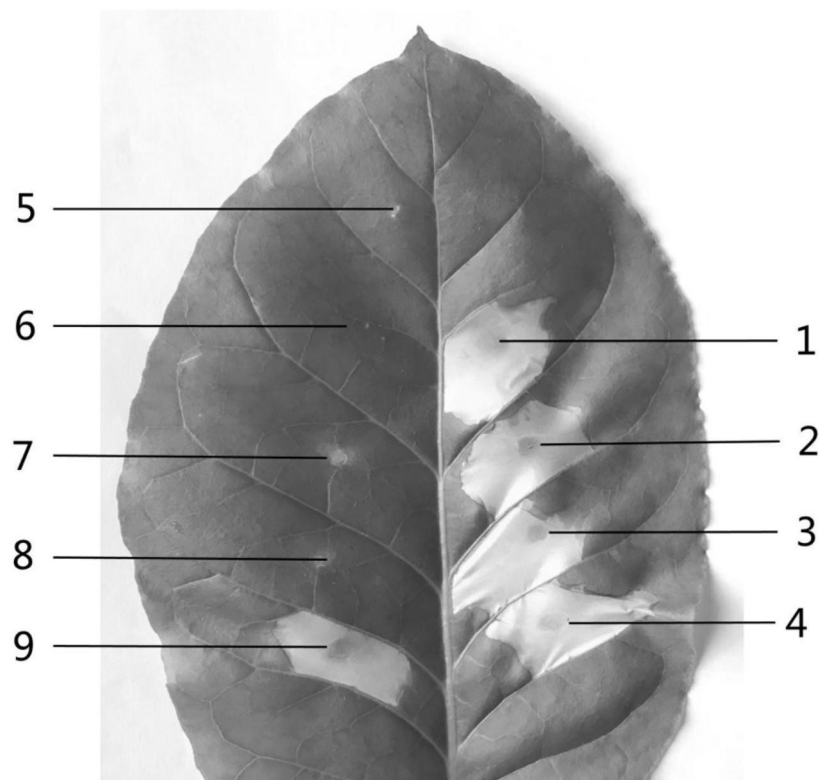


图5

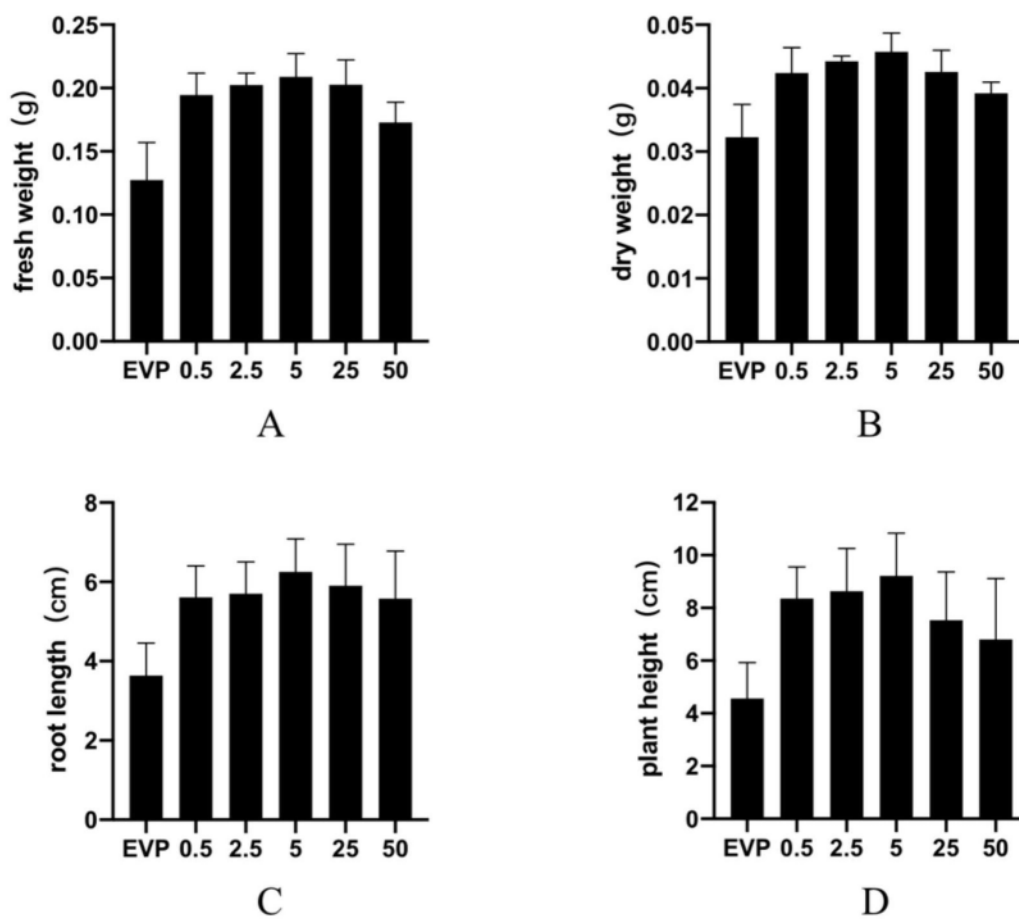


图6