



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 108893473 B

(45)授权公告日 2020.06.19

(21)申请号 201810830035.6

C12N 5/10(2006.01)

(22)申请日 2018.07.25

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108893473 A

CN 102643819 A, 2012.08.22,

CN 107619829 A, 2018.01.23,

CN 107619829 A, 2018.01.23,

(43)申请公布日 2018.11.27

NCBI.PREDICTED: Homo sapiens enhancer

(73)专利权人 浙江玉安康瑞生物科技有限公司

of zeste 2 polycomb repressive complex 2

地址 314113 浙江省嘉兴市嘉善县大云镇

subunit (EZH2), transcript variant X1,

创业路555号D8幢101室

mRNA.《NCBI XM_017011817.2》.2018,

(72)发明人 杨骏 朱成光

审查员 张丽玮

(74)专利代理机构 北京华仁联合知识产权代理

有限公司 11588

代理人 国红

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/90(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表4页 附图1页

(54)发明名称

表皮干细胞中采用CRISPR-Cas系统进行
Rab23基因敲除

(57)摘要

本发明提供了一种采用CRISPR-Cas系统针对表皮干细胞进行RAB23基因编辑,特别是涉及一种构建RAB23基因敲除的表皮干细胞细胞系的建立,用于皮肤鳞癌的后续研究。其中构建并获得了—个特异的gRNA,能够显著提高表皮干细胞内CRISPR/Cas9针对RAB23的基因编辑效率。本发明提供的表皮干细胞RAB23敲除质粒具有较好的遗传稳定性以及较高的打靶效率。

1. 一种提高CRISPR-Cas系统在离体的表皮干细胞中敲除RAB23基因的方法,包括向宿主细胞中引入增效蛋白,所述增效蛋白ESCS-higher是由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列编码的蛋白质;所述sgRNA,其序列如SEQ ID NO:3所示。

2. 一种在表皮干细胞中采用CRISPR/Cas9进行基因编辑的系统,其特征在于所述系统包括:(1)用于表达SEQ ID NO:1所述的ESCS-higher的质粒;(2) sgRNA已经插入的表达PX330的质粒,其可以表达sgRNA和cas9。

3. 如权利要求2所述的系统,其特征在于:(1)的质粒提前导入到基因编辑细胞中,筛选得到阳性细胞后,再转入(2)的质粒。

4. 权利要求2的系统在制备用于表皮干细胞基因编辑的试剂中的用途。

表皮干细胞中采用CRISPR-Cas系统进行Rab23基因敲除

技术领域

[0001] 本发明提供一种采用CRISPR-Cas系统针对表皮干细胞进行RAB23基因编辑,特别是涉及一种构建RAB23基因敲除的表皮干细胞细胞系的建立。

背景技术

[0002] 表皮干细胞(Epidermal stem cells,EpiSCs)是具有自我增殖和多向分化潜能的干细胞,它的正常增殖和分化是维持皮肤及其附属器(汗腺毛发、皮脂腺)结构和功能完整性的基本要求。在生理条件下,表皮干细胞通过不对称分裂方式分化为一个干细胞和一个短暂扩充细胞(transit amplifying cells,TA细胞),TA细胞再经过多次分裂后分化为有丝分裂后细胞(Post-mitotic cells)及终末分化细胞(terminally-differentiated cells),以补充表皮细胞不断更新的需要。研究表明表皮干细胞不仅能在体外长期传代培养,并保持其增殖分化潜能(Dunnwald et al,Exp Dermatol,2001,10:45-54.Papini et al.stem cells,2003,21:481-494),而且,在一定环境条件下还表现出与胚胎干细胞相似的分化潜能[Liang et al,stem cells,2002:20:21-31]。因此,获得纯化的表皮干细胞不仅可为构建有生理功能的人工皮肤提供种子细胞,而且可用于基因治疗和转基因动物的生产。

[0003] 人类多能干细胞(Human pluripotent stem cells,hPSCs)和基因组编辑技术结合所建立的细胞模型,为疾病研究提供了一个独特的实验平台。利用这个平台体系,研究人员可以研究特定基因突变甚至染色体结构变异对人类多种细胞类型和组织器官功能的影响及其详细的分子机制,并可建立携带不同遗传突变的“个性化”疾病模型用于大规模药物筛选。该模型体系的建立得益于基因组编辑技术,尤其是CRISPR/Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins9,CRISPR/Cas9)技术的飞速发展。

[0004] Rab23是RAS原癌基因成员,其编码的蛋白是小GTP酶超家族Rab家族成员,其突变可引起小鼠开脑综合征(open brain syndrome),因此又称为opb基因。2001年,Eggenschwile:等研究发现,Rab23是Sonic Hedgehog信号通路必要的负调控因子,而近几年,Rab23作为原癌基因的作用越来越被学者重视。研究发现,Rab23参与肝癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、和甲状腺癌的发生发展,并在胃癌中首次发现与肿瘤侵袭密切相关。

[0005] 其中特别是皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma,c SCC)是一种起源于表皮、皮肤附属器、以及复层扁平上皮角质形成细胞的恶性肿瘤,发病占皮肤恶性肿瘤的16%,仅次于基底细胞癌,光线性角化病、鲍温病及角化棘皮瘤均能导致角质形成细胞的恶性增殖。c SCC具有侵袭性,可发生早期转移。因此,鳞状细胞癌的高转移、易侵袭性是威胁全球人民的公共健康问题,进一步研究皮肤鳞癌侵袭机制,转移以及增值的分子机制,具有重要的价值和深远的意义。而Rab23在鳞癌中高表达,且与鳞癌分化负相关;Transwell实验证实Rab23显著促进鳞癌细胞侵袭,并调控侵袭关键分子Rac1的表达。

[0006] 基于表皮干细胞的多能性,为了研究敲除RAB23基因的表皮干细胞在皮肤鳞状细

胞癌治疗方面的功能,建立敲除RAB23基因的表皮干细胞细胞系变得尤为重要。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种敲除RAB23基因的表皮干细胞,有效克服了现有技术使用siRNA进行干扰不能稳定遗传的技术缺陷。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供一种CRISPR-Cas系统的靶标,根据RAB23的基因序列,设计的具体的sgRNA如下:

[0009] RAB23-sgRNA1:5' to 3' attacaaaggcctactatcg

[0010] RAB23-sgRNA2:5' to 3' agtcactccggtcagaattc。

[0011] 为实现上述目的,本发明提供一种提高CRISPR-Cas系统在表皮干细胞中敲除RAB23基因的方法,包括向宿主细胞中引入增效蛋白,所述增效蛋白ESCS-higher是由SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列编码的蛋白质。

[0012] 进一步地,所述增效蛋白包含a)或b):

[0013] a) SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列编码的蛋白质的多核苷酸序列;

[0014] b) SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0015] 更进一步地,提供一种在表皮干细胞中采用CRISPR/Cas9进行基因编辑的系统,其特征在于所述系统包括:(1)用于表达SEQ ID NO:1所述的ESCS-higher的质粒;(2)sgRNA已经插入的表达PX330的质粒(其可以表达sgRNA和Cas9)。

[0016] 更进一步地,所述sgRNA和Cas9表达载体也可以是本领域常用的其他表达载体。

[0017] 本发明提供了一种在表皮干细胞中采用CRISPR/Cas9基因编辑RAB23的方法,本发明具有以下优点:

[0018] 本发明提供了通过近百次的gRNA设计与优化,获得了在表皮干细胞中能够特异性的针对RAB23基因进行敲除的2个特异性的gRNA,具有较强的敲除效果,而且本发明在表皮干细胞中,构建了RAB23基因敲除的细胞系,筛选并优化获得了最佳的sgRNA,敲除效率高,传代稳定。

附图说明

[0019] 图1Western-blot检测RAB23蛋白表达结果图;4为表皮干细胞空白对照;3为未导入增效蛋白的gRNA2的效果;1为导入增效蛋白的gRNA1的效果;2为未导入增效蛋白的gRNA1的效果。

[0020] 下面通过实施例,对本发明的技术方案做进一步的详细描述。

具体实施方式

[0021] 下面通过具体实施例进一步说明本发明提高基因组编辑效率的方法的技术方案。

[0022] 实施例1、CRISPR表达载体的构建

[0023] gRNA的设计

[0024] 根据靶基因的基因序列,通过申请人前期从几十个gRNA中优化设计具体筛选得到具体的sgRNA的形式如下:

[0025] RAB23-sgRNA1:5' to 3' attacaaaggcctactatcg

[0041] (3) 冰上放置数分钟,用枪头轻轻吹打,使细胞充分裂解,再轻轻倾斜培养皿使裂解产物流向瓶皿的一边或一角,然后将之转移到1.5ml离心管,剧烈振荡30秒。

[0042] (4) $12,000 \times g$, 4°C 离心5分钟,取上清,即可进行后续的电泳、Western或免疫沉淀操作。

[0043] 组织块裂解

[0044] (1) 组织剪切成细小的碎片。每100毫克组织加入1ml RIPA裂解液。用玻璃匀浆器匀浆上下手动匀浆20次。

[0045] (2) 将匀浆物转移到1.5ml离心管。

[0046] (3) $12,000 \times g$, 4°C 离心5分钟,取上清,即可进行后续的电泳、Western或免疫沉淀操作。

[0047] 2. 蛋白浓度测定 (BCA测蛋白浓度)

[0048] 工作液的配制

[0049] (1) 测定前,按照BCA Reagent A:BCA Reagent B=100:1的比例混合后配制成工作液,例如配制30ml的工作液时,在30ml的BCA Reagent A中添加0.3ml的BCA Reagent B后,充分振荡混配制后的工作液可在 4°C 保存三天使用。

[0050] (2) 所需工作液量的计算方法如下:

[0051] 所需工作液总体积 (ml) = [(BSA标准溶液8份或7份+检测样品数) $\times$ 平行样本数 (n) +1] $\times$ 1个样品所需的工作液体积

[0052] 例) 标准操作流程【1ml反应体系】检测样品数为12个、平行样 (n=2) 时:

[0053] $[(8+12) \times 2+1] \times 1\text{ml} = 41\text{ml}$

[0054] 例) 标准操作流程【200 μl 反应体系】、检测样品数为20个、平行样 (n=2) 时:

[0055] $[(8+20) \times 2+1] \times 0.2\text{ml} = 11.4\text{ml}$

[0056] 例) 低浓度蛋白质样品测定的操作流程【1ml反应体系】、检测样品数为12个、平行样 (n=2) 时: $[(7+12) \times 2+1] \times 0.5\text{ml} = 19.5\text{ml}$

[0057] 3. 低浓度蛋白样品的标准操作流程 (定量范围: $0 \sim 200\mu\text{g/ml}$)

[0058] 【0.2ml反应体系. 使用微孔板测定】

[0059] 1) BSA标准品溶液的配制。

[0060] (1) 0.2mg/ml BSA标准品溶液的制备: 取120 μl BSA Standard Solution (2mg/ml), 加入1,080 μl 稀释液后充分混合。

[0061] (2) 按照不同的浓度稀释BSA标准品溶液, BSA标准品溶液和检测样品的稀释可使用去离子水、0.9%NaCl或PBS。

[0062] 2) BSA标准曲线的制备

[0063] (1) 分别取100 μl 稀释后的BSA标准品溶液加入到微孔板中, 每个浓度取2个平行样。

[0064] (2) 加入100 μl 工作液后, 立即混匀。

[0065] (3) 37°C 水浴槽中反应60分钟后, 冷却至室温。

[0066] (4) 使用分光光度计测定562nm处的吸光度值。测定时, 使用1mL比色皿, 用水校零。尽可能在20分钟内检测完毕所有样品。

[0067] (5) 各浓度BSA标准品溶液的吸光度值减去Blank值的平均值, 绘制BSA标准品溶液

的标准曲线。

[0068] 3) 检测样品的测定

[0069] 检测样品测定时,建议同BSA标准品溶液同时进行测定。

[0070] (1) 分别取100 μ l检测样品加入到微孔板中,每个样品取2个平行样进行测定。

[0071] (如果必要,也可选择与BSA标准品溶液相同的稀释方法稀释检测样品后测定)

[0072] (2) 加入100 μ l工作液后,立即混匀。

[0073] (3) 37℃水浴中反应60分钟后,冷却至室温。

[0074] (4) 酶标仪波长设定在562nm处进行测定。用水校零。尽可能在20分钟内检测完毕所有样品。

[0075] (5) 各样品溶液的吸光度值减去Blank值的平均值,根据标准曲线计算出检测样品的蛋白浓度。

[0076] 4. SDS—PAGE电泳

[0077] (1) 玻璃板对齐后放入夹中卡紧。然后垂直卡在架子上准备灌胶。

[0078] (2) 配制10%分离胶,加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。

[0079] (3) 当水和胶之间有一条折射线时,说明胶已凝了。再等3min使胶充分凝固就可倒去胶上层水并用吸水纸将水吸干。

[0080] (4) 配制4%的浓缩胶,加入TEMED后立即摇匀即可灌胶。将剩余空间灌满浓缩胶然后将梳子插入浓缩胶中。

[0081] (5) 用水冲洗一下浓缩胶,将其放入电泳槽中。(小玻璃板面向内,大玻璃板面向外。若只跑一块胶,那槽另一边要垫一块塑料板且有字的一面面向外。)

[0082] (6) 取出上样样品与5 $\times$ SDS上样缓冲液按4:1比例混合,混匀后沸水中煮5min使蛋白变性。

[0083] (7) 加足够的电泳液后按等量蛋白上样。

[0084] (8) 电泳,80V跑过浓缩胶后转换电压至120V,待溴酚兰跑到胶板底部刚好没有跑出即可。

[0085] (9) 将夹子打开使黑的一面保持水平,在上面依次垫海绵垫、滤纸、胶、PVDF膜(经甲醇活化)、滤纸、海绵垫;同时将电泳液换成转移液。

[0086] (10) 将电流调整到恒流200mA,转移约1小时。

[0087] (11) 取出膜,并做好正反面标记,在TBST中清洗1分钟,然后用封闭液封闭。

[0088] (12) 用封闭液将对应的一抗稀释成一定的浓度(1:500),内参一抗的稀释终浓度为1:3000,然后温育1.5小时或4℃孵育过夜。

[0089] (13) 用TBST清洗3次,每次5分钟。

[0090] (14) 用封闭液将二抗稀释成一定的浓度(1:3000),然后温育1.5小时。

[0091] (15) 用TBST清洗4次,每次5分钟。

[0092] 5. 化学发光,显影,定影

[0093] (1) 将A和B两种试剂在试管内等体积混合,然后加在PVDF膜的正面,温育大概2分钟。

[0094] (2) 进入暗室,PVDF膜上盖一层保鲜膜,擦去多余的发光剂。将胶片压在保鲜膜上,依照发光的强度选择不同的曝光时间。

[0095] (3) 将胶片放入显影液中,出现条带后,立即放入定影液中,流水冲洗胶片后晾干。

[0096] (4) 对胶片进行扫描,然后用UVP凝胶图象处理系统Labworks4.6软件分析目的条带的灰度值。

[0097] (5) 通过Western-blot对转染后表皮干细胞中RAB23蛋白质表达进行检测,结果如图1所示,表皮干细胞空白对照,蛋白表达没有受到影响;未导入增效蛋白的gRNA1能够敲除目的基因,蛋白表达能够较好的受到抑制,抑制率达到88.9%;而导入增效蛋白的gRNA1具有显著的提高基因敲除效果蛋白抑制率达到99.7%;未导入增效蛋白的gRNA2的蛋白表达抑制率达到33.2%,效果不显著。这充分说明,gRNA1作为申请人从几十个gRNA中选择病优化获得的较好的gRNA具有极好的应用前景和应用价值。

[0098] 最后所应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 洛阳轩智生物科技有限公司
 [0003] <120> 表皮干细胞中采用CRISPR-Cas系统进行RAB23基因敲除
 [0004] <160> 4
 [0005] <170> SIP0SequenceListing 1.0
 [0006] <210> 1
 [0007] <211> 2280
 [0008] <212> DNA
 [0009] <213> 人工序列 (2 *Ambystoma laterale* x *Ambystoma jeffersonianum*)
 [0010] <400> 1
 [0011] atgatataact ttattagaat aatcatgggc cagactggga agaaatctga gaagggacca 60
 [0012] gtttgttggc ggaagcgtgt aaaatcagag tacatgcgac tgagacagct caagaggttc 120
 [0013] agacgagctg atgaagtaaa gagtatgttt agttccaatc gtcagaaaat tttggaaaga 180
 [0014] acggaaatct taaaccaaga atggaaacag cgaaggatac agcctgtgca catcctgact 240
 [0015] tctgtgagct cattgcgcgg gactagggag tgttcgggtga ccagtgactt ggattttcca 300
 [0016] acacaagtca tcccattaaa gactctgaat gcagttgctt cagtacccat aatgtattct 360
 [0017] tggctctccc tacagcagaa ttttatgggtg gaagatgaaa ctgttttaca taacattcct 420
 [0018] tatatgggag atgaagtttt agatcaggat ggtactttca ttgaagaact aataaaaaat 480
 [0019] tatgatggga aagtacacgg ggatagagaa tgtgggttta taaatgatga aatttttgtg 540
 [0020] gaggttggta atgcccttgg tcaatataat gatgatgacg atgatgatga tggagacgat 600
 [0021] cctgaagaaa gagaagaaaa gcagaaagat ctggaggatc accgagatga taaagaaagc 660
 [0022] cgcccacctc ggaaatttcc ttctgataaa atttttgaag ccatttcctc aatgtttcca 720
 [0023] gataagggca cagcagaaga actaaaggaa aaatataaag aactcaccga acagcagctc 780
 [0024] ccaggcgcac ttctcctga atgtaccccc aacatagatg gaccaaatgc taaatctgtt 840
 [0025] cagagagagc aaagcttaca ctctttcat acgcttttct gtaggcgatg ttttaaatat 900
 [0026] gactgcttcc tacatcgtaa gtgcaattat tcttttcatg caacacccaa cacttataag 960
 [0027] cggaagaaca cagaaacagc tctagacaac aaacctgtg gaccacagtg ttaccagcat 1020
 [0028] ttggagggag caaaggagtt tgctgtgct ctcaccgtg agcggataaa gacccacca 1080
 [0029] aaacgtccag gaggccgag aagaggacgg cttccaata acagtagcag gccagcacc 1140
 [0030] cccaccatta atgtgctgga atcaaaggat acagacagtg atagggaagc agggactgaa 1200
 [0031] acggggggag agaacaatga taaagaagaa gaagagaaga aagatgaaac ttcgagctcc 1260
 [0032] tctgaagcaa attctcgggtg tcaaacacca ataaagatga agccaaatat tgaacctcct 1320
 [0033] gagaatgtgg agtggagtgg tgctgaagcc tcaatgttta gagtctcat tggcacttac 1380
 [0034] tatgacaatt tctgtgcat tgctagggtta attgggacca aaacatgtag acaggtgtat 1440
 [0035] gagttagag tcaaagaatc tagcatcata gctccagctc ccgctgagga tgtggatact 1500
 [0036] cctccaagga aaaagaagag gaaacaccgg ttgtgggctg cactactgcag aaagatacag 1560
 [0037] ctgaaaaagg acggctcctc taacctgtt tacaactatc aacctgtga tcatccacgg 1620
 [0038] cagccttgtg acagttcgtg cccttgtgtg atagcacaaa atttttgtga aaagttttgt 1680
 [0039] caatgtagtt cagagtgtca aaaccgcttt ccgggatgcc gctgcaaagc acagtgaac 1740
 [0040] accaagcagt gcccggtgta cctggctgtc cgagagtgtg accctgacct ctgtcttact 1800
 [0041] tgtggagccg ctgaccattg ggacagtaaa aatgtgtcct gcaagaactg cagtattcag 1860

[0042] cggggctcca aaaagcatct attgctggca ccatctgacg tggcaggctg ggggattttt 1920
 [0043] atcaaagatc ctgtgcagaa aaatgaattc atctcagaat actgtggaga gattattttct 1980
 [0044] caagatgaag ctgacagaag agggaaagtg tatgataaat acatgtgcag ctttctgttc 2040
 [0045] aacttgaaca atgattttgt ggtggatgca acccgcaagg gtaacaaaat tcgttttgc 2100
 [0046] aatcattcgg taaatccaaa ctgctatgca aaagttatga tggttaacgg tgatcacagg 2160
 [0047] ataggtattt ttgccaagag agccatccag actggcgaag agctgttttt tgattacaga 2220
 [0048] tacagccagg ctgatgccct gaagtatgtc ggcacgaaa gagaaatgga aatcccttga 2280
 [0049] <210> 2
 [0050] <211> 759
 [0051] <212> PRT
 [0052] <213> 人工序列(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)
 [0053] <400> 2
 [0054] Met Ile Tyr Phe Ile Arg Ile Ile Met Gly Gln Thr Gly Lys Lys Ser
 [0055] 1 5 10 15
 [0056] Glu Lys Gly Pro Val Cys Trp Arg Lys Arg Val Lys Ser Glu Tyr Met
 [0057] 20 25 30
 [0058] Arg Leu Arg Gln Leu Lys Arg Phe Arg Arg Ala Asp Glu Val Lys Ser
 [0059] 35 40 45
 [0060] Met Phe Ser Ser Asn Arg Gln Lys Ile Leu Glu Arg Thr Glu Ile Leu
 [0061] 50 55 60
 [0062] Asn Gln Glu Trp Lys Gln Arg Arg Ile Gln Pro Val His Ile Leu Thr
 [0063] 65 70 75 80
 [0064] Ser Val Ser Ser Leu Arg Gly Thr Arg Glu Cys Ser Val Thr Ser Asp
 [0065] 85 90 95
 [0066] Leu Asp Phe Pro Thr Gln Val Ile Pro Leu Lys Thr Leu Asn Ala Val
 [0067] 100 105 110
 [0068] Ala Ser Val Pro Ile Met Tyr Ser Trp Ser Pro Leu Gln Gln Asn Phe
 [0069] 115 120 125
 [0070] Met Val Glu Asp Glu Thr Val Leu His Asn Ile Pro Tyr Met Gly Asp
 [0071] 130 135 140
 [0072] Glu Val Leu Asp Gln Asp Gly Thr Phe Ile Glu Glu Leu Ile Lys Asn
 [0073] 145 150 155 160
 [0074] Tyr Asp Gly Lys Val His Gly Asp Arg Glu Cys Gly Phe Ile Asn Asp
 [0075] 165 170 175
 [0076] Glu Ile Phe Val Glu Leu Val Asn Ala Leu Gly Gln Tyr Asn Asp Asp
 [0077] 180 185 190
 [0078] Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp Pro Glu Glu Arg Glu Glu Lys Gln
 [0079] 195 200 205
 [0080] Lys Asp Leu Glu Asp His Arg Asp Asp Lys Glu Ser Arg Pro Pro Arg
 [0081] 210 215 220
 [0082] Lys Phe Pro Ser Asp Lys Ile Phe Glu Ala Ile Ser Ser Met Phe Pro
 [0083] 225 230 235 240

[0084]	Asp Lys Gly Thr Ala Glu Glu Leu Lys Glu Lys Tyr Lys Glu Leu Thr		
[0085]		245	250 255
[0086]	Glu Gln Gln Leu Pro Gly Ala Leu Pro Pro Glu Cys Thr Pro Asn Ile		
[0087]		260	265 270
[0088]	Asp Gly Pro Asn Ala Lys Ser Val Gln Arg Glu Gln Ser Leu His Ser		
[0089]		275	280 285
[0090]	Phe His Thr Leu Phe Cys Arg Arg Cys Phe Lys Tyr Asp Cys Phe Leu		
[0091]		290	295 300
[0092]	His Arg Lys Cys Asn Tyr Ser Phe His Ala Thr Pro Asn Thr Tyr Lys		
[0093]		305	310 315 320
[0094]	Arg Lys Asn Thr Glu Thr Ala Leu Asp Asn Lys Pro Cys Gly Pro Gln		
[0095]		325	330 335
[0096]	Cys Tyr Gln His Leu Glu Gly Ala Lys Glu Phe Ala Ala Ala Leu Thr		
[0097]		340	345 350
[0098]	Ala Glu Arg Ile Lys Thr Pro Pro Lys Arg Pro Gly Gly Arg Arg Arg		
[0099]		355	360 365
[0100]	Gly Arg Leu Pro Asn Asn Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro Thr Ile Asn		
[0101]		370	375 380
[0102]	Val Leu Glu Ser Lys Asp Thr Asp Ser Asp Arg Glu Ala Gly Thr Glu		
[0103]		385	390 395 400
[0104]	Thr Gly Gly Glu Asn Asn Asp Lys Glu Glu Glu Glu Lys Lys Asp Glu		
[0105]		405	410 415
[0106]	Thr Ser Ser Ser Ser Glu Ala Asn Ser Arg Cys Gln Thr Pro Ile Lys		
[0107]		420	425 430
[0108]	Met Lys Pro Asn Ile Glu Pro Pro Glu Asn Val Glu Trp Ser Gly Ala		
[0109]		435	440 445
[0110]	Glu Ala Ser Met Phe Arg Val Leu Ile Gly Thr Tyr Tyr Asp Asn Phe		
[0111]		450	455 460
[0112]	Cys Ala Ile Ala Arg Leu Ile Gly Thr Lys Thr Cys Arg Gln Val Tyr		
[0113]		465	470 475 480
[0114]	Glu Phe Arg Val Lys Glu Ser Ser Ile Ile Ala Pro Ala Pro Ala Glu		
[0115]		485	490 495
[0116]	Asp Val Asp Thr Pro Pro Arg Lys Lys Lys Arg Lys His Arg Leu Trp		
[0117]		500	505 510
[0118]	Ala Ala His Cys Arg Lys Ile Gln Leu Lys Lys Asp Gly Ser Ser Asn		
[0119]		515	520 525
[0120]	His Val Tyr Asn Tyr Gln Pro Cys Asp His Pro Arg Gln Pro Cys Asp		
[0121]		530	535 540
[0122]	Ser Ser Cys Pro Cys Val Ile Ala Gln Asn Phe Cys Glu Lys Phe Cys		
[0123]		545	550 555 560
[0124]	Gln Cys Ser Ser Glu Cys Gln Asn Arg Phe Pro Gly Cys Arg Cys Lys		
[0125]		565	570 575

[0126]	Ala Gln Cys Asn Thr Lys Gln Cys Pro Cys Tyr Leu Ala Val Arg Glu
[0127]	580 585 590
[0128]	Cys Asp Pro Asp Leu Cys Leu Thr Cys Gly Ala Ala Asp His Trp Asp
[0129]	595 600 605
[0130]	Ser Lys Asn Val Ser Cys Lys Asn Cys Ser Ile Gln Arg Gly Ser Lys
[0131]	610 615 620
[0132]	Lys His Leu Leu Leu Ala Pro Ser Asp Val Ala Gly Trp Gly Ile Phe
[0133]	625 630 635 640
[0134]	Ile Lys Asp Pro Val Gln Lys Asn Glu Phe Ile Ser Glu Tyr Cys Gly
[0135]	645 650 655
[0136]	Glu Ile Ile Ser Gln Asp Glu Ala Asp Arg Arg Gly Lys Val Tyr Asp
[0137]	660 665 670
[0138]	Lys Tyr Met Cys Ser Phe Leu Phe Asn Leu Asn Asn Asp Phe Val Val
[0139]	675 680 685
[0140]	Asp Ala Thr Arg Lys Gly Asn Lys Ile Arg Phe Ala Asn His Ser Val
[0141]	690 695 700
[0142]	Asn Pro Asn Cys Tyr Ala Lys Val Met Met Val Asn Gly Asp His Arg
[0143]	705 710 715 720
[0144]	Ile Gly Ile Phe Ala Lys Arg Ala Ile Gln Thr Gly Glu Glu Leu Phe
[0145]	725 730 735
[0146]	Phe Asp Tyr Arg Tyr Ser Gln Ala Asp Ala Leu Lys Tyr Val Gly Ile
[0147]	740 745 750
[0148]	Glu Arg Glu Met Glu Ile Pro
[0149]	755
[0150]	<210> 3
[0151]	<211> 20
[0152]	<212> DNA
[0153]	<213> 人工序列(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)
[0154]	<400> 3
[0155]	attacaaagg cctactatcg 20
[0156]	<210> 4
[0157]	<211> 20
[0158]	<212> DNA
[0159]	<213> 人工序列(2 Ambystoma laterale x Ambystoma jeffersonianum)
[0160]	<400> 4
[0161]	agtcactccg gtcagaattc 20

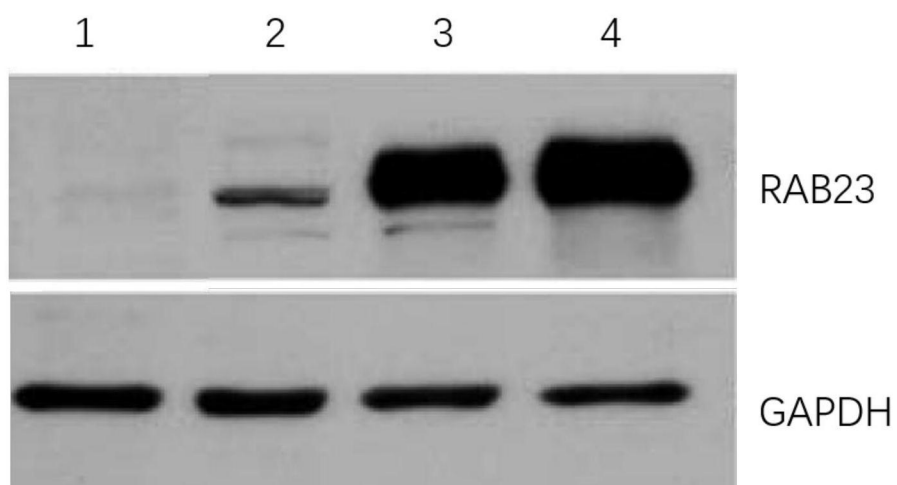


图1