



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113509552 B

(45) 授权公告日 2022.02.18

(21) 申请号 202110428037.4

(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 113509552 A

(43) 申请公布日 2021.10.19

(73) 专利权人 华中农业大学  
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72) 发明人 张淑君 上官爱哨 蒋金河  
孙玉梅 李国亮 周傲 王云龙  
王凯 王金玉 吴俊静

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所(普通合伙) 42001  
代理人 龚莹莹

(51) Int.Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

审查员 赵陆海

权利要求书1页 说明书8页  
序列表8页 附图2页

(54) 发明名称

敲除或沉默猪的Kxd1基因在提高猪抗猪繁殖与呼吸综合征病毒中的应用

(57) 摘要

本发明属于基因工程及生物医药领域,公开了敲除或沉默猪的Kxd1基因在提高猪抗猪繁殖与呼吸综合征病毒中的应用,所述的Kxd1基因包括猪中的NCBI登录号为NC\_010444.4的Kxd1基因或猪中与该基因同源的Kxd1基因。本发明发现该基因无论是在PK15-CD163细胞中被敲除还是在Marc-145细胞中被敲低之后都能够抑制PRRSV的增殖,故本基因可作为抑制PRRSV复制的疫苗药物的开发与抗病育种研究的新型靶点。

1. 抑制Kxd1基因表达的制剂在制备抗PRRSV感染药物中的应用,所述的Kxd1基因为猪中的NCBI登录号为NC\_010444.4的Kxd1基因或编码氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示的绿猴Kxd1基因;抑制猪中的NCBI登录号为NC\_010444.4的Kxd1基因的制剂为gRNA5'-CCCCACAGGACACTGAAA-3',抑制编码氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示的绿猴Kxd1基因的制剂为siRNA:5'-GGACCCUGGUAGAGAUGAAUU-3'。

2. 敲除或者沉默Kxd1基因制备的抗PRRSV感染的细胞模型,所述的Kxd1基因为猪中的NCBI登录号为NC\_010444.4的Kxd1基因或编码氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示的绿猴Kxd1基因。

## 敲除或沉默猪的Kxd1基因在提高猪抗猪繁殖与呼吸综合征病毒中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程及生物医药领域,具体涉及敲除或沉默猪的Kxd1基因在提高猪抗猪繁殖与呼吸综合征病毒中的应用。

### 背景技术

[0002] 猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome,简称PRRS)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus,简称PRRSV)引起的以母猪繁殖障碍、仔猪呼吸系统疾病和高死亡率为主要临床特征的重大病毒性传染病(Chand et al 2012;Van 1997)。自1987年首次在美国爆发以来,已成为影响全球养猪业发展的重要疾病(Keffaber et al 1989)。虽然目前已培育出PRRSV受体CD163基因缺失的抗PRRS的基因编辑猪(Burkard et al 2017;Whitworth et al 2015;Yang et al 2018),但仍存在基因编辑动物的生物安全、PRRSV变异较快、病毒与宿主(猪)交互机理不完全清楚以及可用于抗病育种的靶基因缺乏等问题,严重制约了靶向药物的开发及抗病育种的进程。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供了敲除或沉默猪的Kxd1基因在提高猪抗猪繁殖与呼吸综合征病毒中的应用,所述的Kxd1基因包括猪中的NCBI登录号为NC\_010444.4的Kxd1基因或猪中与该基因同源的基因。

[0004] 为了达到上述目的,本发明采取以下技术措施:

[0005] 抑制猪Kxd1基因表达的制剂在制备抗PRRSV感染药物中的应用;所述的Kxd1基因包括猪中的NCBI登录号为NC\_010444.4的Kxd1基因或猪中与该基因同源的Kxd1基因,例如绿猴的Kxd1基因,绿猴Kxd1基因编码的氨基酸序列为SEQ ID NO.4所示。

[0006] 以上所述的应用中,优选的,所述的抑制方法包括但不限于针对猪Kxd1基因的CRISPR/Cas9敲除技术、siRNA干扰技术。

[0007] 本发明的保护内容还包括:通过敲除或者沉默猪Kxd1基因来制备抗PRRSV感染的细胞模型。

[0008] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0009] 申请人分别通过CRISPR敲除及基因干扰技术在PK15-CD163、Marc-145细胞中靶向敲除/抑制Kxd1的表达,首次发现敲除/抑制Kxd1的表达的细胞可以通过影响PRRSV的复制从而抵抗PRRSV的感染,该基因可作为PRRSV的新型抗病靶点。本发明为研制有效安全防治PRRS的新型疫苗药物提供了新的靶标,也为抗PRRS育种研究提供了新型候选基因,具有广泛的应用前景。

### 附图说明

[0010] 图1:PK15-Cas9-CD163单克隆细胞系的构建及验证;

[0011] 其中:(A) 扩增猪CD163基因的CDS序列;

[0012] (B) Western Blot检测PK15-Cas9-CD163细胞中CD163蛋白的表达;

[0013] (C) RT-PCR检测NSP2在PRRSV感染48h后的转录,泳道1:Marc145细胞 (PRRSV感染); 2:Marc45细胞 (未感染PRRSV); 3:PK15-Cas9-CD163细胞 (PRRSV感染); 4:PK15-Cas9-CD163细胞 (未感染PRRSV);

[0014] (D) qPCR检测PK15-Cas9-CD163细胞被PRRSV感染后ORF7不同时间点的相对表达量, $\beta$ -actin为内参基因。

[0015] 图2:KO-Kxd1单克隆细胞系的构建;

[0016] 其中:(A) Western Blot检测CD163和Kxd1基因在KO-NC细胞和KO-Kxd1单克隆敲除细胞中的蛋白表达;

[0017] (B) MTT检测KO-NC细胞和KO-Kxd1细胞的活性。(ns,t-test)。

[0018] 图3:PK15-CD163细胞敲除Kxd1后,qPCR检测感染12、24和48h PRRSV ORF7 mRNA的表达水平。

[0019] ns  $P > 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,t-test。

[0020] 图4:Marc-145细胞干扰Kxd1后,抑制PRRSV增殖;

[0021] 其中(A) 转染Kxd1干扰片段到Marc-145细胞48h后,qPCR检测Kxd1的相对表达量;

[0022] (B) 敲低Kxd1基因后,PRRSV (MOI=1) 感染48h,q-PCR检测检测ORF7的相对表达;

[0023] (C) 敲低Kxd1基因后,PRRSV (MOI=1) 感染48h,TCID<sub>50</sub>检测PRRSV滴度>(\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,t-test)。

### 具体实施方式

[0024] 本发明所述技术方案,如未特别说明,均为本领域的常规方案;所述试剂或材料,如未特别说明,均来源于商业渠道。

[0025] 实施例1:

[0026] 可用于PRRSV感染的猪PK15-Cas9-CD163细胞的构建和验证

[0027] 1.PK15-Cas9-CD163细胞的构建

[0028] (1) 按照Omega公司总RNA提取试剂盒 (R6834-01) 的操作说明书提取PK15-CD163细胞 (该细胞是在PK15细胞中稳定表达猪源CD163蛋白的细胞系,对PRRSV感染敏感,由华中农业大学肖少波老师馈赠,Wang et al,2018) RNA并利用反转录试剂盒 (Thermo Scientific, 00238582) 将RNA反转录成第一链cDNA。

[0029] (2) 以适量cDNA为模版,引物CD163-F:ctagtctagaATGGTGCTACTTGAAGACTCTG和CD163-R:cgcggatccTCATTGTACTTCAGAGTGGTCTCC,使用Q5超保真扩增酶 (NEB,E0555S) 将猪CD163基因CDS区域全长扩增,并在两端加上XbaI和BamHI限制性酶切位点。PCR结果经凝胶电泳检测成功后 (图1中A),使用凝胶回收试剂盒 (Sangon Biotech,B110092) 回收纯化猪CD163基因的CDS片段。

[0030] (3) 将猪CD163基因的CDS片段和pCDH-EF1-copGFP-T2A-Puro质粒 (Addgene, 72263) 使用XbaI (Thermo fisher,FD0684) 和BamHI (Thermo fisher,FD0054) 限制性内切酶

双酶切,使用凝胶回收试剂盒(Sangon Biotech,B110092)回收纯化。

[0031] (4) 使用T4连接酶(Thermo fisher,15224041)将猪CD163基因CDS区连入pCDH-EF1-copGFP-T2A-Puro。转化入DH5 $\alpha$ 菌株(全式金,CD201-01),涂LB(含AMP)平板。37 $^{\circ}$ C培养16h后,挑单克隆并测序。

[0032] (5) 按NEOFECT公司的DNA转染试剂(TF201201)的操作说明书以辅助质粒psPax2(Addgene,12260)、pMD2.G(Addgene,12259),核心质粒pCDH-EF1-copGFP-T2A-Puro(步骤4中测序验证CD163已成功连入的质粒)包装慢病毒。

[0033] (6) 使用适量此慢病毒感染PK15-Cas9细胞系(该细胞是在PK15细胞中稳定表达Cas9蛋白的细胞系,可用于转入gRNA后构建基因敲除细胞,由华中农业大学赵书红老师馈赠,Zhao et al,2020)。感染48h后,细胞经过流式细胞分选GFP阳性细胞后扩大培养。

[0034] (7) 经流式分选仪分选的细胞经过有限梯度法分选出稳定表达猪CD163蛋白和Cas9蛋白的单克隆细胞系PK15-Cas9-CD163。

[0035] 2. PK15-Cas9-CD163单克隆细胞系的验证

[0036] (1) 利用Western Blot方法检测PK15-Cas9-CD163细胞中CD163的表达

[0037] 1) 蛋白样品的制备

[0038] a) PK15-Cas9-CD163单克隆细胞及野生型PK15细胞长满后,吸出培养液,用预冷的PBS洗1-2次。

[0039] b) 每个30mm平皿中加入200 $\mu$ L蛋白裂解液(每100 $\mu$ L RIPA裂解液中,加入1 $\mu$ L蛋白酶抑制剂蛋白酶抑制剂Cocktail(Sigma,P8340)、磷酸化蛋白酶抑制剂PPEi(Sigma,G2007),在冰上裂解,并用细胞刮板刮取细胞。

[0040] c) 吸取裂解产物至1.5mL离心管中,反复吹打至清亮。

[0041] d) 加入相应体积的5 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液,沸水煮10min,-80 $^{\circ}$ C储存。

[0042] 2) SDS-PAGE电泳

[0043] 3) Western Blot检测分析:

[0044] a) 一抗分别为CD163兔多克隆抗体(博士德公司,A00812-1), $\beta$ -actin鼠单克隆抗体(Proteintech,66009-1-Ig)

[0045] b) 二抗孵育:HRP偶联抗鼠IgG(Proteintech,SA00001-1),HRP偶联抗兔IgG(Proteintech,SA00001-2);

[0046] c) 蛋白检测:采用ECL发光法。

[0047] Western Blot分别检测PK15-Cas9-CD163细胞和野生型PK15细胞中CD163基因表达。PK15-Cas9-CD163细胞中表达猪源CD163蛋白(图1中B右边泳道),而阴性对照PK15细胞则没有CD163基因的表达(图1中B左边泳道),说明PK15-Cas9-CD163细胞系构建成功。

[0048] (2) PK15-Cas9-CD163细胞系可被PRRSV感染的验证

[0049] 1) 利用RT-PCR技术检测PRRSV基因NSP2在感染后的转录

[0050] a) 将相同数量及适量的实验组细胞(PK15-Cas9-CD163)和对照组细胞(Marc-145)接种到6孔板中,5%CO $_2$ 、37 $^{\circ}$ C培养箱培养。24h后弃培养基并用DMEM洗2遍,加入PRRSV(MOI=1,WUH3毒株,GenBank accession NO.HM853673)混匀,37 $^{\circ}$ C孵育1h后,再加入1mL DMEM+10%FBS完全培养基,继续培养。

[0051] b) 感染后48h收集细胞并提取细胞总RNA。提取RNA方法按Omega公司总RNA提取试

剂盒(R6834-01)的操作说明书操作。

[0052] c) 测得RNA浓度后,利用反转录试剂盒(Thermo Scientific,00238582)将RNA反转录成第一链cDNA。反转录反应体系见表1。

[0053] d) PCR扩增cDNA,扩增使用宝生物工程(大连)有限公司“LA Taq”(RR02MQ),所用引物为NSP2-F: TGATGGGCGACAATGTCC和NSP2-R: CGCAGACAAATCCAGAGG。

[0054] e) PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳检测。

[0055] 结果如图1中C所示,从图1中C可以看出,PRRSV感染的PK15-Cas9-CD163细胞和阳性对照Marc145细胞中检测到230bp的NSP2特异片段,而阴性对照并没有检测到,说明PRRSV可以感染PK15-Cas9-CD163细胞系。

[0056] 2) 利用qPCR检测PRRSV可以在PK15-Cas9-CD163细胞中增殖

[0057] a) 将相同数量及适量的PK15-Cas9-CD163细胞接种到6孔板中,5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱培养。24h后弃培养基并用DMEM洗2遍,加入PRRSV(MOI=0.5,WUH3毒株,GenBank accession NO.HM853673)混匀,37℃孵育1h后,再加入1mL DMEM+10%FBS完全培养基,继续培养。

[0058] b) 感染后不同时间点收集细胞并提取细胞总RNA。提取RNA方法按Omega公司总RNA提取试剂盒(R6834-01)的操作说明书操作。

[0059] c) 测得RNA浓度后,利用反转录试剂盒(Thermo Scientific,00238582)将RNA反转录成第一链cDNA。

[0060] d) cDNA经RNase Free H<sub>2</sub>O 5倍稀释。

[0061] e) qPCR检测PRRSV保守基因ORF7 mRNA表达水平。

[0062] cDNA样本通过Bio-Rad CFX96荧光定量PCR仪进行扩增,检测不同样本中特定基因表达的差异,同时设置内参基因,每个样本设置3个复孔。三步法的扩增反应条件为:预变性95℃4min,循环反应为变性95℃5sec,退火60℃20sec,延伸72℃20sec,并收集荧光信号,共进行40个循环,最后延伸72℃2min。65℃-95℃升温,升温速度0.5℃/5sec以检测融解曲线。目的基因的相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算,所使用的体系和引物如下表所示。

[0063] SYBR扩增体系

成分	体积
RNase Free H <sub>2</sub> O	3.6μL
2×SYBR Mix	5μL
Forward-Primer	0.2μL
Reverse-Primer	0.2μL
cDNA	1μL

[0065] qPCR引物

基因名称	引物名称	引物序列 (5'-3')
[0066] ORF7	F	TCAGCTGTGCCAAATGCTGG
	R	AAATGGGGCTTC TCCGGGTTTT
β-actin(pig)	F	TGGCACCACACCTTCTACA
	R	ATCTTCTCACGGTTGGCTTTG

[0067] 从图1中D可见,随PRRSV感染时间的增加,ORF7相对表达量也随之升高,表明PK15-Cas9-CD163细胞可以被PRRSV感染并使其在细胞内增殖。

[0068] 实施例2:

[0069] Kxd1敲除细胞系的构建及验证:

[0070] 目的基因Kxd1基因序列的NCBI号为NC\_010444.4,具体为SEQ ID NO.1所示。

[0071] 1.gRNA设计及表达载体的构建

[0072] (1) gRNA的设计:选择需要gRNA靶向基因位置的部分序列,使用<http://crispr.mit.edu/>,<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html>和<http://www.rgenome.net/cas-database/>网站进行设计。敲除gRNA的序列为5'-CCCCACAGGACACTGAAA-3'。

[0073] (2) 将公司合成的oligo gRNA稀释为100nM后,互补序列各取5μL混合。

[0074] (3) 将混合液上PCR仪器,退火得到双链gRNA。程序如下:95°C,10min,65°C,40min,10°C,10min。

[0075] (4) 将pLH-sgRNA1载体(Addgene,75388)使用BbsI或BsmBI酶切回收后,使用T4连接酶将gRNA与载体连接。

[0076] (5) 转化载体到DH5α,涂平板,挑单克隆菌落送往测序验证。

[0077] (6) 阳性菌落测序鉴定正确后,扩繁菌液提取质粒。

[0078] 2.质粒提取,按TIANGEN公司的质粒小提试剂盒(DP103)的操作说明书操作。

[0079] 3.慢病毒gRNA包装,按NEOFECT公司的DNA转染试剂(TF201201)的操作说明书操作。

[0080] 4.构建Kxd1敲除单克隆细胞系

[0081] 慢病毒gRNA感染PK15-Cas9-CD163细胞

[0082] 1) 将PK15-Cas9-CD163细胞接种到6孔细胞培养板的2个孔,一孔作为实验组,另一孔作为对照组,用含有10%FBS,1%双抗的DMEM高糖培养基培养。

[0083] 2) 待细胞汇合度达到60%~70%时,进行感染(MOI~1)。用含有10%FBS,1%双抗的DMEM高糖培养基稀释步骤3制备的慢病毒,并加入终浓度为8μg/mL的polybrene。

[0084] 3) 感染1d后,细胞传代至10cm细胞培养皿,继续培养。

[0085] 4) 培养2d后,加含有潮霉素的培养基(10%FBS,1%双抗的DMEM高糖培养基),潮霉素在该培养基中的终浓度为300μg/mL(以下简称潮霉素培养基)。

[0086] 5) 每天更换新鲜的潮霉素培养基,待对照组细胞全部死完,实验组有细胞存活时,将实验组细胞接种到10cm细胞培养皿,使其形成单个细胞,加入潮霉素培养基,终浓度为300μg/mL。

[0087] 6) 继续培养7d左右,待单个细胞长成单克隆细胞团,用玻璃针刮下来放置24孔培养板中,加入潮霉素培养基获得KO-Kxd1单克隆细胞系。

[0088] 5. 验证KO-Kxd1细胞系中的Kxd1的表达和细胞活性

[0089] (1) 利用Western Blot方法检测KO-Kxd1细胞中Kxd1和CD163的表达;以KO-NC细胞(即PK15-Cas9-CD163)为对照;

[0090] 1) 蛋白样品的制备

[0091] a) KO-Kxd1单克隆细胞系长满后,吸出培养液,用预冷的PBS洗1-2次。

[0092] b) 每个30mm平皿中加入200 $\mu$ L蛋白裂解液(每100 $\mu$ L RIPA裂解液中,加入1 $\mu$ L蛋白酶抑制剂蛋白酶抑制剂Cocktail (Sigma, P8340)、磷酸化蛋白酶抑制剂PPEi (Sigma, G2007),在冰上裂解,并用细胞刮板刮取细胞。

[0093] c) 吸取裂解产物至1.5mL离心管中,反复吹打至清亮。

[0094] d) 加入相应体积的5 $\times$ SDS-PAGE上样缓冲液,沸水煮10min, -80 $^{\circ}$ C储存。

[0095] 2) SDS-PAGE电泳

[0096] 3) Western Blot检测分析:

[0097] 一抗分别为CD163兔多克隆抗体(博士德公司, A00812-1), Kxd1兔多克隆抗体(US Biological, 032800), GAPDH鼠单克隆抗体(Proteintech, 60004-1-Ig);

[0098] e) 二抗孵育: HRP偶联抗鼠IgG (Proteintech, SA00001-1), HRP偶联抗兔IgG (Proteintech, SA00001-2);

[0099] f) 蛋白检测: 采用ECL发光法。

[0100] Western Blot检测发现KO-Kxd1单克隆细胞系不表达KXD1蛋白,同时检测了CD163蛋白的表达以确保该细胞系能够感染PRRSV(图2中A),结果发现CD163蛋白能够表达,说明该细胞系已成功敲除Kxd1基因且并未影响CD163的表达,若后期验证发现该细胞系能够抑制PRRSV的增殖,那么不是CD163丢失引起的,而是Kxd1基因被敲除发挥了抗PRRSV的作用。

[0101] (2) 扩增Kxd1基因敲除位点附近序列,测序确认敲除情况

[0102] 1) Kxd1敲除单克隆细胞系及对照组PK15-Cas9-CD163细胞(简称KO-NC细胞)DNA的提取,按TIANGEN公司的血液/细胞/组织基因组DNA提取试剂盒(DP304)的操作说明书操作。

[0103] 2) PCR扩增Kxd1基因敲除位点附近序列并送公司测序,扩增使用宝生物工程(大连)有限公司“LA Taq”(RR02MQ),引物为:Kxd1(pig)-F: TCCTGGAAGGCTGTCCTGGTA和Kxd1(pig)-R: CAATGCTGGGATCTTTGACCTG。

[0104] 设定PCR程序如下:预变性95 $^{\circ}$ C 10min,循环反应为变性95 $^{\circ}$ C 30sec,退火60 $^{\circ}$ C 30sec,延伸72 $^{\circ}$ C 1min,共进行35个循环,最后延伸72 $^{\circ}$ C 5min。PCR产物送公司进行测序。

[0105] 测序发现由于KO-Kxd1单克隆细胞系缺失10对碱基而导致了Kxd1基因的移码突变,从而不产生KXD1蛋白(图2中A)。敲除前的KO-NC细胞(即PK15-Cas9-CD163)扩增序列是SEQ ID NO.2所示;而在敲除后的KO-Kxd1单克隆细胞系中的扩增序列为SEQ ID NO.3所示。

[0106] (3) 利用MTT法检测KO-Kxd1单克隆细胞系活性

[0107] 1) 将相同数量及适量的实验组细胞和对照组细胞接种到96孔板中,每组3个技术重复。5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C培养箱继续培养48h。

[0108] 2) 取出96孔板,每孔加入20 $\mu$ L MTT溶液,避光继续培养4h。

[0109] 3) 吸弃MTT溶液,每孔加入150 $\mu$ L DMSO。避光反应5-10min。

[0110] 4) 使用酶标仪测每孔450nm的吸光值。

[0111] 利用MTT实验检测Kxd1基因敲除后对细胞活性的影响,结果发现Kxd1敲除前后,细胞的MTT值并无显著差异,说明敲除Kxd1基因后对细胞活性并无显著影响(图2中B)。

[0112] 实施例3:

[0113] 利用qPCR检测PK15-CD163细胞敲除KXD1对PRRSV ORF7 mRNA的抑制效果。

[0114] 将相同数量及适量的实验组细胞(KO-Kxd1)和对照组细胞(KO-NC)接种到6孔板中,5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱培养。24h后弃培养基并用DMEM洗2遍,加入PRRSV(MOI=1,WUH3毒株,GenBank accession NO.HM853673)混匀,37℃孵育1h后,再加入1mL DMEM+10%FBS完全培养基,继续培养。随后的收样及qPCR操作步骤与实施例1相同。

[0115] 结果发现,在12h和24h时,对照组和实验组的ORF7表达并无显著差异,但在48h时,ORF7在两组间的相对表达出现极显著差异(图3)。说明在PK15-CD163细胞中敲除Kxd1基因后显著抑制了PRRSV的增殖。

[0116] 实施例4:

[0117] 利用qPCR及TCID<sub>50</sub>检测Marc-145细胞干扰Kxd1表达对PRRSV的抑制效果。

[0118] 1. 干扰片段的转染及干扰效率的检测

[0119] (1) 绿猴的KXD1蛋白(UniProtKB-A0A0D9QZ58)如SEQ ID NO.4所示,根据其mRNA序列选择特异干扰片段,该干扰片段序列(5'-GGACCCUGGUAGAGAUGAAUU-3')由苏州吉玛公司合成。

[0120] (2) 转染前一天将生长良好的Marc145细胞以1×10<sup>5</sup>个/孔的量加入6孔细胞培养板,在37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,待细胞汇合度达到50%-60%时准备转染;具体细胞转染步骤参考见Lipofectamine) 3000(ThermoFisher scientific,USA)转染试剂盒上说明书。

[0121] (3) 利用qPCR方法检测siKxd1的干扰效率,具体操作步骤与实施例1相同,所用引物如下表所示。

	基因名称	引物名称	引物序列(5'-3')
[0122]	Kxd1(green monkey)	F	TGCAGCAGATGAGCGAGCG
		R	CCCGTGCTCTGTTCTGAGG
	β-actin(green monkey)	F	AGCAAGCAGGAGTATGACGAGT
		R	CAAGAAAGGGTGTAACGCAACT

[0123] 结果如图4中A所示,siKxd1的干扰效率超过80%。

[0124] 2. 利用qPCR检测干扰Kxd1对PRRSV ORF7 mRNA的抑制效果。

[0125] 转染方法同步骤1,检测在Marc-145细胞中干扰Kxd1对PRRSV ORF7 mRNA的抑制效果,PRRSV基因ORF7的引物如实施例1所述,Marc-145细胞基因β-actin的引物序列如上表所示。

[0126] 结果如图4中B所示,Marc-145细胞中敲低Kxd1后,PRRSVORF7相对表达量显著下降,说明在Marc-145细胞中干扰该基因表达可抑制PRRSV增殖。

[0127] 3. 利用TCID<sub>50</sub>检测干扰Kxd1对PRRSV的抑制效果。

[0128] 按本实施例步骤1转染干扰片段,24h后感染PRRSV(MOI=1)。感染48h后,TCID<sub>50</sub>检

测PRRSV滴度,具体方法如下:

[0129] (1) 将病毒作10倍连续稀释,从 $10^{-1}$ 到 $10^{-10}$ 。

[0130] (2) 将长满单层的Marc145细胞消化后加入细胞生长液,制备成细胞悬液。然后按照每孔加入100 $\mu$ L细胞悬液铺满96孔板。

[0131] (3) 按每孔100 $\mu$ L的量将稀释好的病毒液加入96孔培养板中,每一个稀释度有8个孔。另外有16孔细胞中加入100 $\mu$ L的细胞生长液,作为空白对照。

[0132] (4) 将96孔板放在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,每天进行观察,3d-5d后统计出现CPE的孔数。

[0133] (5) 按Reed-Muench两氏法计算,具体方法如下:距离比例=(高于50%病变率的百分数-50%)/(高于病变率的百分数-低于病变率的百分数), $\lg\text{TCID}_{50}$ =距离比例 $\times$ 稀释度对数之间的差+高于50%病变率的稀释度的对数。

[0134] 结果如图4中C所示,Marc-145细胞中敲低Kxd1后,病毒滴度显著下降,同样说明在Marc-145细胞中干扰该基因表达可抑制PRRSV增殖。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 华中农业大学	
[0003]	<120> 敲除或沉默猪的Kxd1基因在提高猪抗猪繁殖与呼吸综合征病毒中的应用	
[0004]	<160> 20	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 8593	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0010]	<400> 1	
[0011]	aaacagtaac tgcgtctaag tcccacctct tcctgccgcg cctccacgca cgcaagtcgg	60
[0012]	ccccgggcac gttgcggaca cgcgcgctag cactcatggt acgtgatgac gttgaggcgg	120
[0013]	cactggcgcc atcccggaag cgcgagcaag gccgccagat gtgcaggtgc tgctgccacc	180
[0014]	gacgccgggg ccgagttcag ggtggggctg gggacgcagg ggcttctggg cagctgggcc	240
[0015]	gggcgggagc agtccccggg ctgtcgcggg gtggggcgcg ccgctggcaa catctggaca	300
[0016]	ccctgcgcac aggcctcagt ttccccgct gcgcagtgga cgcgcggacg gcgccgtggg	360
[0017]	ctggatccgg atccggggcg ccagagttgg gggcgtctat gttgaagctg tgctatatca	420
[0018]	cccagaaccg ggcttttccc tgcttaggcc tcagtttccc ggcttcacag gggcggggct	480
[0019]	tgaggggctt tgtgagcccc gccgcactgg ggggttttgc agagctgggg tagcccagtt	540
[0020]	aaattctgtt aatgatcta ggtggagtcg cggcgtctct ctgcctaggt gtgtgacctt	600
[0021]	gggcaactga gccacctct ctageccttg ttgccttcgg aatgatagt gtcagtctat	660
[0022]	ctgcctctca ggggtgatta gggattaaat gaagtgtttt acaagtgttc gtttgtattc	720
[0023]	ttggaagcac tggggagacc ctattagaa tagtgattct tggcccagtc ctaggttttc	780
[0024]	ttaacactcc cctcggagaa actgcctgct accagtccac tgtctcatca ctattggtt	840
[0025]	cattacccaa agatagtgtt gtgagattct gattctttgt tattcctagc ttctggatga	900
[0026]	gaaggacca ggaggtgagg tgactttcct aaggtcacgg agcctccctc tctgcgtgtt	960
[0027]	tccccataa atatatgtg agctgggact agtgctata ctggatcatt tttcacctg	1020
[0028]	tatatgggtc agaccgatac ttagtcaggg aaggcttccc gtgagaagca gctggtgagg	1080
[0029]	gagtatgcat tgaatctctc agccctcaca tctgggagcc agagacagga aagagcctta	1140
[0030]	ctttgaagca gaaccattc ccgggtcca aatgttttgc cctccaggcc tagttgtggg	1200
[0031]	gttctgcca catgcctctg tcctttgaga gcccaagat cctctttata tatgatcttt	1260
[0032]	ggaaatgtgg aggctgtgag cgtccatacc tggcacacag tcagaacaaa ataaacatgg	1320
[0033]	tgattattgg gggcggggga ggggggttcc atcaggtgtg gcagttcatc tccagaaggc	1380
[0034]	acataaggtc gcagacccta gctagattca gagcacaat agatatgtac tctcagctc	1440
[0035]	tatagctttg gggaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagtgttagt tgctaacatt tgtaaatgag	1500
[0036]	gcgatttcat aaggggaaaa atatatgttt cagtttgttt gttttggcca tgctgcagca	1560
[0037]	tccgaaagct cccaggccag ggatcaagct gctgcaatga caacacagat ccttaaccta	1620
[0038]	ctgtgccact aaagaactca gcttttttcc tggaaaaaat cagaagtctg gcaggaatca	1680
[0039]	gctgctgtaa gaagcagttg ttctgtcaca ggtggatact gaacatctgt ccagagtttg	1740
[0040]	tggatcctgt ggaccgtggc atttaagttg tgactcaagt tcaactggcta tgtgacagtg	1800
[0041]	gctcagttct tcagtgctg agactcagtt ttgtcatata gaaataagga tgataacaat	1860

[0042]	tgccagtgtt tgaagttggt gtcctgttta gcatacagta ggtaacaaag aggggagtag	1920
[0043]	agttagcagg ctctgaaagc ctttctgat cctgtgtgtg aatataatca attgcatgtg	1980
[0044]	ggcctttctg tgggccatta aatgtgcagt ccctagagcc aagctgtgtc aggattctgg	2040
[0045]	gtttttctcg aacccctca ggaagtcag tcctgaagct gtggccccct cctgccttg	2100
[0046]	catggtccag gaagtcttca ctcctggga tggcatctgt gtgtcaagga agctggaggc	2160
[0047]	taccaagcca tctgagttgc tgggaccac agcctggctg ccagtcccc aagttcttg	2220
[0048]	ctttaacttc ttttttttt ttttttttaa attttatttt attttattgt tattattatt	2280
[0049]	ttttgtctt tttgccattt ttagggccac tcccgtggca tatggaggtt cccaggctag	2340
[0050]	gggtgtaatc ggagctgtag cactggcct acaccagagc catagcaact cagaatccga	2400
[0051]	gccatgtctg caacctacac cacagctcac ggcaacgccc gattgttaac cactgagca	2460
[0052]	aggccaggga tcgaaccgc aacctcatgg ttctagtcg gattcgtaa cactgagcc	2520
[0053]	atgaaggaa ctcccgtct tgccttaac ttctaacca gcttcagagc tgggtttgaa	2580
[0054]	agggtccgtt tgcctccacc aaactaattt tccaatcct tgggtgtaac caggttctg	2640
[0055]	gccagctct ggagacagag cagtgagcac aaacaacatg cctctgctct gttgcagctg	2700
[0056]	acgttgctat aggggtgaca ggcaaatggg tcgactgata acttcagaaa gagatgtgc	2760
[0057]	agtgcagcag ttaaaacaag gtgaagtgat aagagtgact agagtagggg tagctatcag	2820
[0058]	aaacctctg ggcgagaagg cattggaggg ggccataatt tgagggtcag ccatgtatgt	2880
[0059]	tctaccagtg gggacagcag gtgcaaaggc cccgtggtgg caaaggcagg gggatgtggg	2940
[0060]	aggaggcac atggacgggg gagctgtgca ggtgggagaa atgagagtct gatgtgctg	3000
[0061]	ggtacaagtt aaaaatatga atcctgtag ttctcaaac attcctgaat tctgggatg	3060
[0062]	acaagctta ggctcagggt ccttgacca tttatgttc tgcagggtc ccagcccctc	3120
[0063]	ctctccactt cccccactc ctggtacaga ctgaagactc tttcttctg cctgtttcag	3180
[0064]	gcagcggagg aggaggaaga gatggacccc ccgactcgg cctcgagggt cttctgcagc	3240
[0065]	cgcctcctga gtatggtgaa tgcagacgat gtcaatgcca ttatcctggc ccagaaaaac	3300
[0066]	atgtgagtga tggccaaggc ctgggccctt ggcgtgggaa ggaatccact tgctggccag	3360
[0067]	cattcttgcc ctgcccgcct ctacctggg ccacactgg tgataaaatg aaggaaatga	3420
[0068]	gcaaatccgc tggctggctc caaagtaaat tccttctgg cccggaggcg aggccttggc	3480
[0069]	acaggaagcg gggctctggg actgttttgc agctgcgggc agtttggcgg gggcagcagc	3540
[0070]	agctcctgtt ctgagacctg gattggggag actcgggata aggaaagggc tctaaggga	3600
[0071]	tttaaggag ccagtctgct cacttccgat tgggaacctg ttctcttaga gccttggctg	3660
[0072]	tctccacagg gcaattgtgg tcatttgaa ggataggaa agagggttt tgccctcctt	3720
[0073]	gggcttggc actgtggcca ctgcagctc accttaaate tggcctgcc tgtggggagt	3780
[0074]	aacagctgac acaatcttgg gtggaaggaa gcatagtctc ttggggcttc tttttatggc	3840
[0075]	tgcacctgtg gcatatggaa gttcttggac caagggtga attggagctg tggctgaggt	3900
[0076]	ctacaccata gcctcgcaa caccatata gagctatac tatgaactgc cctgcagctt	3960
[0077]	gcaccaacac cggatcgta cccactgag caagaccaga accacatcc tctctaagac	4020
[0078]	aacactgggt ccttaacctg ctgagccaca acaggaactc ctctggggc tttatttttg	4080
[0079]	tgactttaag cccaaagctc ttcttactt cttgctttat aacatagcac aaaccttgta	4140
[0080]	tcttaccttt cttgcctgt gacaggggtg ctggatatct ttaggtctca gcaatacaca	4200
[0081]	tctcccttct aattctttaa gtcagattca cacttggccc tggggaactc ccagactgag	4260
[0082]	aggaggcaaa atcagacttg aaccttctg gcctcatgat gtcaggtctg ggctagagaa	4320
[0083]	acaacctggg agctacagga atcagaagaa tcaagaatc tgcttgagga gttccattg	4380

[0084]	tggcgcagcg	gaaatgaatc	cgactagtaa	ccatgaggtt	gcggttttga	tccttgccct	4440
[0085]	cactctgtag	gctaaggatc	cagtgttgtc	atgggctgtg	gtgtaggtca	cagacttggc	4500
[0086]	ttggatccag	tgttggctgt	ggcgtaggca	ggcagctatt	gctctgattg	gacccttagc	4560
[0087]	ctgggaatct	ccatatactg	caggtgcagc	cctaaaaagc	aaaaaaaaaa	aagaatctgc	4620
[0088]	ttgagggaga	gaatgaaggc	taccaagaa	gggcacacat	gattagggtt	ttgaaagttg	4680
[0089]	aataggagtt	tgctaggttg	ctcaaacc	aggtggagct	ccataggaca	agggaatggt	4740
[0090]	ccctggaggc	tgaacagagg	agttggtgtc	ctctttctgc	cccaggctgg	accgctttga	4800
[0091]	gaagaccaat	gagatgctat	tgaactcaa	caacttgtca	agtgccctgc	tgcaacagat	4860
[0092]	gagtgagcgc	ttctgcacc	acacaaggac	cctggtggaa	atgaaacggg	acctggacag	4920
[0093]	catctttcgc	aggatcaggt	gggtgcttgg	ccctccaact	tctgcctccc	catccaagcc	4980
[0094]	tcaggttact	ctctcttca	acgagggcca	ttctctcac	ataacagggc	agtaggggga	5040
[0095]	tttagctcat	ttgttttatg	agtcttcaat	gtatacttag	tattggagaa	gatctgaaaa	5100
[0096]	ctttagactt	actgaattta	aattttactt	ctttttttaa	aatatagcat	agcaccagac	5160
[0097]	ccaggatgca	tcaggcaggc	tggtgcagac	aatgaaagc	tagcctcctg	tcctccttgg	5220
[0098]	cccttgccca	ggtcttttgt	caggaggcaa	atgagaatgc	caggttttgg	gggtactttt	5280
[0099]	ttttttttt	ttttttggtc	ctttgagggc	cgccccacg	gcatatggag	gttcccaggc	5340
[0100]	taggggtcta	atcggagctg	ttgctgccag	cctacgccag	agccacagca	atgccagatc	5400
[0101]	tgagccatgt	ttgccacct	ccccacagct	tgaggcaacg	ccagatcctt	aactcactga	5460
[0102]	gtgaagccag	ggatcgaacc	tgcaacctca	tggttttttag	attcgtttcc	gctgcgccac	5520
[0103]	aacaggaact	ccaggggtac	ttcttaagtt	gggtccctg	aggacaggga	cagatgatgt	5580
[0104]	ccaatccgca	gctacacaga	gtcttgaca	gtacctggag	ctcgcacat	cactgctgcc	5640
[0105]	gttaacaact	gctgctgggg	caccaggtc	tggaacaagc	tggcactgca	gctgtatttc	5700
[0106]	tgcccacttg	tgccacttcc	tctgttccag	gggcagctgc	acctgctggc	agtgcaggtg	5760
[0107]	ccacaaattg	aaggcacctt	gtttccttga	ccaagctgtg	tgcaaaaatc	acaagacaag	5820
[0108]	agttcccgtt	gtggctcagc	agcagtgaac	ctgactagta	tccatgagga	tgtagtttca	5880
[0109]	atccctggcc	tcatccagtg	ggttaaggat	ctggcattgc	tgtgggttgt	ggtgtaggtt	5940
[0110]	gcagacacag	cttgatcctt	gcattgctgt	ggctgtggct	gtgagggcgg	caagtggcag	6000
[0111]	cactggtact	tcagggccgg	gggtgggggtg	gggggtgggg	tgctggttgc	ccatagtcag	6060
[0112]	gggtgagaga	ttgctctgag	gaccttttg	tacttatttg	taaacagaac	tggtttactt	6120
[0113]	caggtaaaa	ggaaaaacac	cagcaggttc	aagatggaag	caggtgcttc	tgtttctgtg	6180
[0114]	gtgcccata	tcatatttg	gggtttggac	agtcagcaact	cttggccaca	cacagacatc	6240
[0115]	ctccccatag	ggatggagag	acagtctggg	acgaaagtca	ccccaggag	aacttattga	6300
[0116]	agaggggca	agggaggctt	cctggaaggc	tgtcctggta	gaagagggat	agacataagg	6360
[0117]	cactgtgggc	agaaccagtg	ctgagggcac	tcagaagcca	cgtgacagct	gggtagctgc	6420
[0118]	caccatcct	gggggtggga	ggtccgcagg	gctgagtgcc	tgggcctccc	tcctgcctgg	6480
[0119]	agcagagtgt	ggcaagcagt	cagggggagg	tctgccact	cctacctgcc	cagagctggg	6540
[0120]	agcaggggtt	catggcctgc	accaggtgca	gccagtccac	tcagcaggtt	cagccctgtg	6600
[0121]	tgcttccct	tccccacag	gacactgaaa	gggaagctgg	ccaggcagca	cccggaggcc	6660
[0122]	ttcagccgta	agtgtcacc	agagctcttg	catcctgctt	ctgggctctg	cgcccttggg	6720
[0123]	tgctgatgcc	ctcagcccag	ggctggcttc	cagaaggtca	ccgcaggctg	acaccaagcc	6780
[0124]	caggccctgg	tgggcagtg	gtccagagaa	gctgggggca	ggggcggggg	tgccggcctg	6840
[0125]	gtctcagcaa	cctgctgaac	aggtgttggg	accagagtct	cctccctcat	gggaggtcac	6900

[0126]	atgaggggat gaggacaaga atgatgacag tcctgggagt gccctggtgg ctcagcaggt	6960
[0127]	caaagatccc agcattgtca ctgctgtggc tcaggtagat ccctggcctg agaatttctg	7020
[0128]	catgccacgg gtgtggccaa aaaagaagaa tgatgatagt ccttacccca gtgaatgtca	7080
[0129]	tgtacttcta ggggccaggc tatgaggtgt aggctgtgcc cagaggagca gtgacttgtc	7140
[0130]	agagggaggg cagcatctc catgctgagc ctctgtccac cagtctgctg aatgggcca	7200
[0131]	cagctcccca cccagggcc acaaaggcca caggcacaaa taaccatagg aacataacca	7260
[0132]	caggcatgaa agcaatgcca tcattcccag ttccctagagc agggagctga ggcatgggca	7320
[0133]	ggggaggagc agaccaggt gacacagtca agagggcaga gccaggccca gatactttac	7380
[0134]	cccagggccc atctaggcct gaccccagag aacctgagtc cttaacctca cttgaagag	7440
[0135]	ggacctctca tgcaactcagg cctctataaa atgaaccagg tcccatgggg ttgggggagc	7500
[0136]	catcaggggt catgggcca gttaatcct aatcacagtg acttagcatg gtgactaagc	7560
[0137]	caattcctgg gcctcctcc cccagacatc cgggagcgt ccctcctgga agacgaggat	7620
[0138]	gaagaccca tcctcccag caccacaaca accattgcca cctcgaaca gagcacaggc	7680
[0139]	tcatgtgaca ccagccctga cacagtctcg ccctccctca gccctggctt cgaggacctg	7740
[0140]	tcccatgtcc ggctggctc ccctgccatc aatggccaca gccatacaga tgacgaggag	7800
[0141]	acaccaggcg agtagctctc ctctgggag ctccaagggg tctcagagca gcggcagcac	7860
[0142]	caaccccaca tgtctgaggt ggcagcagat agccctgcc catgatggtc agctctgcct	7920
[0143]	ccctattctg tcatttgggg cccctgggg gacaaggctc cctctctgga atatggaatt	7980
[0144]	cctggggatc tttcattccc acccctcct cactgagaat atctctctc tgtagacccc	8040
[0145]	tctgccaggc caggggacaa gcagcccagc tggagtcat gggttgggt caaggaaact	8100
[0146]	tccagagcca ggctgtgat ctgttctgaa caaactcag attcccagag accagatcca	8160
[0147]	gatgtccct gcccagcac cctggtcagg acctctcaa ggcggccaag cactgtcatg	8220
[0148]	tctgagttca tcctagccca tcctgcatc tacaattct tgtctcctg ctctctcctc	8280
[0149]	caatgaaagt attcagtact ttcttcaatc attagctcaa ggtttctgag acagttgtgg	8340
[0150]	aaggttcgag acagttgtgg aaggttcaag gcagagatta gccatccact tggcctcga	8400
[0151]	cctggtaagg ccatgtttc tctgaccaga ggtgtggact ctgaggggc agcagggctc	8460
[0152]	tttcggggcc tctgtggagc aagccgagcc accatggaaa acagagttaa gcagaatatt	8520
[0153]	tttgatcccg atgtttacag atgctgttg gaagttatca ataaaaagac tctgtttaca	8580
[0154]	agggaagact gta	8593
[0155]	<210>	2
[0156]	<211>	658
[0157]	<212>	DNA
[0158]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[0159]	<400>	2
[0160]	tcctggaagg ctgtcctggt agaagagga tagacataag gcaactgtgg cagaaccagt	60
[0161]	gctgagggca ctcagaagcc acgtgacagc tgggtagctg ccacccatcc tgggggtggg	120
[0162]	aggtccgcag ggctgagtgc ctgggcctcc ctctgctg gagcagagtg tggcaagcag	180
[0163]	tcagggggag gtctgcccac tctacctgc ccagagctgg gagcaggggt tcatggcctg	240
[0164]	caccaggtgc agccagtcca ctacagcaggt tcagccctgt gtgccttccc ttccccaca	300
[0165]	ggacactgaa agggaagctg gccaggcagc acccgaggc cttcagccgt aagtgtcacc	360
[0166]	cagagctctt gcatctgct tctgggctct gcgcccttg atgctgatgc cctcagccca	420
[0167]	gggctggctt ccagaagtc accgcaggct gacaccaagc ccaggccctg gtgggcagt	480

[0168] ggtccagaga agctgggggc aggggcgggg gtgccgcct ggtctcagca acctgctgaa 540  
 [0169] caggtgttgg gaccagagtc tcctccctca tgggaggtca catgagggga tgaggacaag 600  
 [0170] aatgatgaca gtctggggag tgccctggtg gctcagcagg tcaaagatcc cagcattg 658  
 [0171] <210> 3  
 [0172] <211> 648  
 [0173] <212> DNA  
 [0174] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0175] <400> 3  
 [0176] tcctggaagg ctgtcctggt agaagagga tagacataag gcactgtggg cagaaccagt 60  
 [0177] gctgagggca ctcagaagcc acgtgacagc tgggtagctg ccacccatcc tgggggtggg 120  
 [0178] aggtccgcag ggctgagtgc ctgggcctcc ctctgctg gagcagagtg tggcaagcag 180  
 [0179] tcagggggag gtctgcccac tcctacctgc ccagagctgg gagcaggggt tcatggcctg 240  
 [0180] caccaggtgc agccagtcca ctcagcaggt tcagccctgt gtgccttccc ttccccctt 300  
 [0181] cgggaagctg gccaggcagc acccggaggc cttcagccgt aagtgtcacc cagagctctt 360  
 [0182] gcatctgct tctgggctct gcgcccttg atgctgatgc cctcagccca gggctggctt 420  
 [0183] ccagaaggtc accgcaggct gacaccaagc ccaggccctg gtgggcagtg ggtccagaga 480  
 [0184] agctgggggc aggggcgggg gtgccgcct ggtctcagca acctgctgaa caggtgttgg 540  
 [0185] gaccagagtc tcctccctca tgggaggtca catgagggga tgaggacaag aatgatgaca 600  
 [0186] gtctggggag tgccctggtg gctcagcagg tcaaagatcc cagcattg 648  
 [0187] <210> 4  
 [0188] <211> 176  
 [0189] <212> PRT  
 [0190] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 [0191] <400> 4  
 [0192] Met Asp Leu Pro Asp Ser Ala Ser Arg Val Phe Cys Gly Arg Ile Leu  
 [0193] 1 5 10 15  
 [0194] Ser Met Val Asn Thr Asp Asp Val Asn Ala Ile Ile Leu Ala Gln Lys  
 [0195] 20 25 30  
 [0196] Asn Met Leu Asp Arg Phe Glu Lys Thr Asn Glu Met Leu Leu Asn Phe  
 [0197] 35 40 45  
 [0198] Asn Asn Leu Ser Ser Ala Arg Leu Gln Gln Met Ser Glu Arg Phe Leu  
 [0199] 50 55 60  
 [0200] His His Thr Arg Thr Leu Val Glu Met Lys Arg Asp Leu Asp Ser Ile  
 [0201] 65 70 75 80  
 [0202] Phe Arg Arg Ile Arg Thr Leu Lys Gly Lys Leu Ala Arg Gln His Pro  
 [0203] 85 90 95  
 [0204] Glu Ala Phe Ser His Ile Pro Glu Ala Ser Phe Leu Glu Glu Glu Asp  
 [0205] 100 105 110  
 [0206] Glu Asp Pro Ile Pro Pro Ser Thr Thr Thr Thr Ile Ala Thr Ser Glu  
 [0207] 115 120 125  
 [0208] Gln Ser Thr Gly Ser Cys Asp Thr Ser Pro Asp Thr Val Ser Pro Ser  
 [0209] 130 135 140



- [0252] <212> DNA  
[0253] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0254] <400> 11  
[0255] tggcaccaca cttctaca 19  
[0256] <210> 12  
[0257] <211> 21  
[0258] <212> DNA  
[0259] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0260] <400> 12  
[0261] atcttctcac gtttgcttt g 21  
[0262] <210> 13  
[0263] <211> 19  
[0264] <212> DNA  
[0265] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0266] <400> 13  
[0267] cccccacagg aactgaaa 19  
[0268] <210> 14  
[0269] <211> 21  
[0270] <212> DNA  
[0271] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0272] <400> 14  
[0273] tcctggaagg ctgtcctggt a 21  
[0274] <210> 15  
[0275] <211> 22  
[0276] <212> DNA  
[0277] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0278] <400> 15  
[0279] caatgctggg atctttgacc tg 22  
[0280] <210> 16  
[0281] <211> 21  
[0282] <212> RNA  
[0283] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0284] <400> 16  
[0285] ggaccuggu agaugaau u 21  
[0286] <210> 17  
[0287] <211> 19  
[0288] <212> DNA  
[0289] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
[0290] <400> 17  
[0291] tgcagcagat gagcagcg 19  
[0292] <210> 18  
[0293] <211> 19

- 
- [0294] <212> DNA  
[0295] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0296] <400> 18  
[0297] cccgtgctct gttctgagg 19  
[0298] <210> 19  
[0299] <211> 22  
[0300] <212> DNA  
[0301] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0302] <400> 19  
[0303] agcaagcagg agtatgacga gt 22  
[0304] <210> 20  
[0305] <211> 22  
[0306] <212> DNA  
[0307] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0308] <400> 20  
[0309] caagaaagg tgtaacgcaa ct 22

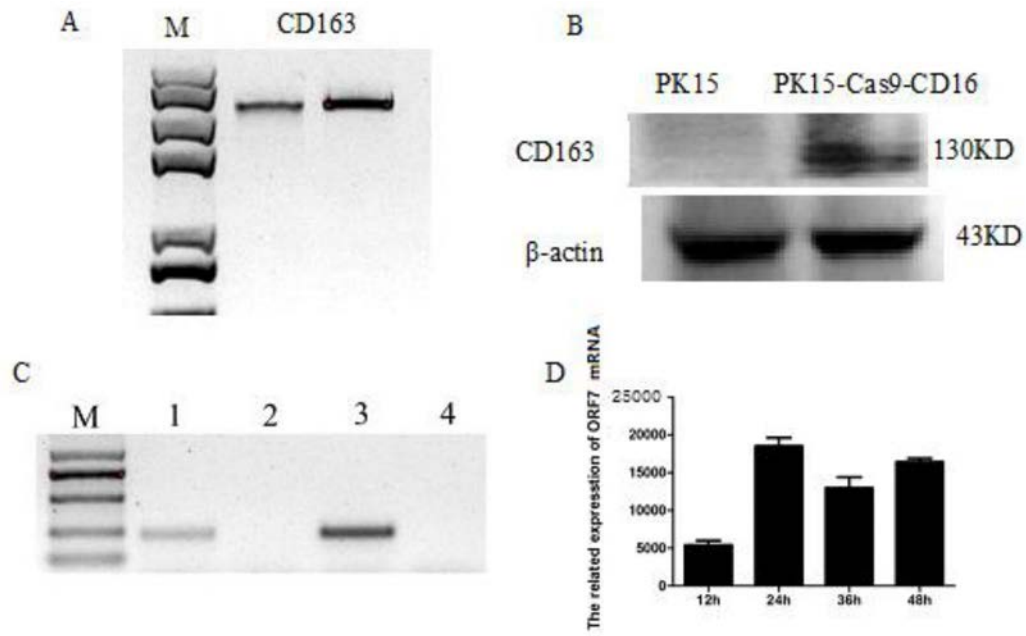


图1

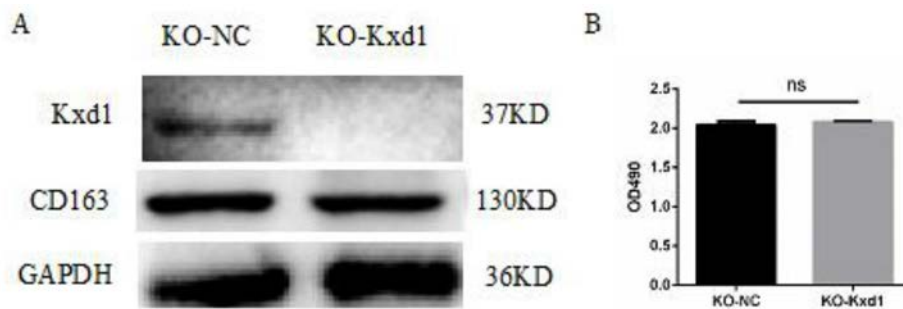


图2

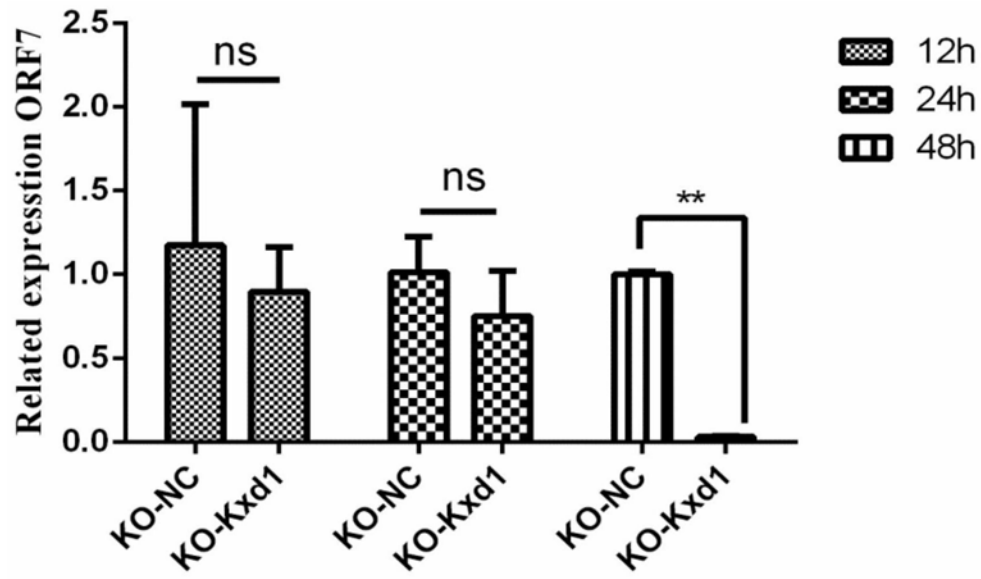


图3

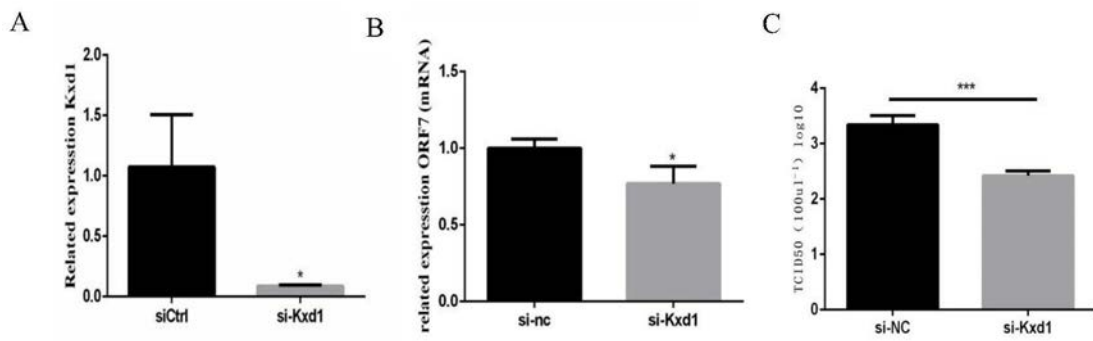


图4