



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107151670 B

(45)授权公告日 2020.08.18

(21)申请号 201710343293.7

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2017.05.16

C12N 15/82(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C12N 15/70(2006.01)

申请公布号 CN 107151670 A

C12N 15/66(2006.01)

(43)申请公布日 2017.09.12

(56)对比文件

(73)专利权人 深圳大学

CN 104726476 A, 2015.06.24

地址 518000 广东省深圳市南山区南海大道3688号

无.XM_003527114.《GeneBank》.2015,

余玉雯等.大豆耐盐相关基因的分离及其功能鉴定.《深圳大学学报》.2004,

(72)发明人 刘昀 谭芳美 郑易之 吴佳辉
程华 孙楠

审查员 刘新蕾

(74)专利代理机构 深圳市恒申知识产权事务所
(普通合伙) 44312

代理人 王利彬

(51)Int.Cl.

C12N 15/29(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

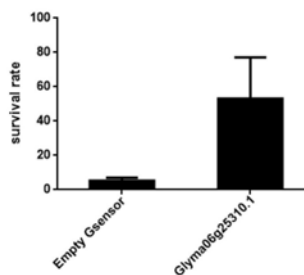
序列表5页 附图2页

(54)发明名称

大豆蛋白及其编码基因的应用及引物、表达载体和制备方法

(57)摘要

本发明公开一种大豆蛋白及其编码基因的应用及引物、表达载体和制备方法,将所述大豆蛋白或其编码基因用于提高植物或大肠杆菌的耐盐性。其中,所述大豆蛋白的基因编码为 Glyma06g25310.1。该大豆蛋白可增强大肠杆菌的耐盐性,由于很多抗逆基因在大肠杆菌和植物体系具有相似的抗逆功能,因此,该大豆蛋白及其编码基因在植物抗逆领域具有潜在的应用前景。



1. 一种大豆蛋白的应用,其特征在于,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma06g25310.1,将所述大豆蛋白用于提高大肠杆菌的耐盐性。

2. 一种大豆蛋白的编码基因的应用,其特征在于,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma06g25310.1,将所述大豆蛋白的编码基因用于提高大肠杆菌的耐盐性。

3. 根据权利要求2所述的大豆蛋白的编码基因的应用,其特征在于,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma06g25310.1,引物的序列如下所示:

F:3'-ATGGCGAGCGCAGTGGAGAAG (Nde I)-5' ;

R:3'-TCAGCTCTCGTGAGTGCCATTC (Xho I)-5' 。

4. 根据权利要求2所述的大豆蛋白的编码基因的应用,其特征在于,表达载体为携带有SEQ ID NO.4所示的大豆蛋白基因,用于表达基因编码为Glyma06g25310.1的大豆蛋白。

5. 根据权利要求4所述大豆蛋白的编码基因的应用,其特征在于,所述表达载体用PET-28a蛋白表达载体重组得到,该大豆蛋白基因通过酶切位点Nde I和Xho I连接在表达载体上。

6. 根据权利要求2所述的大豆蛋白的编码基因的应用,其特征在于,所述表达载体的制备方法包括以下步骤:

扩增目的基因:以F:3'-ATGGCGAGCGCAGTGGAGAAG-5' ;R:3'-TCAGCTCTCGTGAGTGCCATTC-5' 作为引物,以大豆R0期胚根cDNA为模板,进行PCR扩增,得到目的基因片段,目的基因片段的基因序列如SEQ ID NO.4所示;

构建重组质粒:将目的基因片段与经Nde I和Xho I双酶切的蛋白表达载体PET-28a,通过T4连接酶连接酶切产物,构建pET-28a重组质粒。

7. 根据权利要求6所述的大豆蛋白的基因编码的应用,其特征在于,构建重组质粒过程中,包括以下步骤:

将目的基因片段和经过双酶切的PET-28a蛋白表达载体按照摩尔比10:1混合,加入0.5 μL T4连接酶,1μL 10×Buffer,用水补齐至10μL,16℃连接过夜。

大豆蛋白及其编码基因的应用及引物、表达载体和制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,主要涉及一种大豆蛋白及其编码基因的应用及引物、表达载体和制备方法。

背景技术

[0002] 盐碱、干旱等非生物胁迫是限制植物生长发育的主要环境因子。这些环境因子导致植物体内发生一系列的生理代谢反应,表现为代谢和生长的可逆性抑制,严重时甚至引起不可逆伤害,导致整个植株死亡。因此,如何提高植物的抗逆功能,一直是人们研究的课题。

[0003] 因此,现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

[0004] 鉴于上述现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种大豆蛋白及其编码基因的应用及引物、表达载体和制备方法,该大豆蛋白的基因编码为Glyma06g25310.1,本发明中旨在提供一种该大豆蛋白在提高植物耐盐性中应用。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 一种大豆蛋白的应用,其中,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma06g25310.1,将所述大豆蛋白用于提高植物或大肠杆菌的耐盐性。

[0007] 一种大豆蛋白的编码基因的应用,其中,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma06g25310.1,将所述大豆蛋白的编码基因用于提高植物或大肠杆菌的耐盐性。

[0008] 一种用于制备大豆蛋白或其编码基因的引物,其中,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma06g25310.1,引物的序列如下所示:

[0009] F:3'-ATGGCGAGCGCAGTGGAGAAG(Nde I)-5';

[0010] R:3'-TCAGCTCTCGTGAGTGCCATTC(Xho I)-5'。

[0011] 一种用于提高耐盐性的表达载体,其中,所述表达载体为携带有SEQ ID NO.4所示的大豆蛋白基因,用于表达基因编码为Glyma06g25310.1的大豆蛋白。

[0012] 所述的用于提高耐盐性的表达载体,其中,所述表达载体用PET-28a蛋白表达载体重组得到,该大豆蛋白基因通过酶切位点Nde I和Xho I连接在表达载体上。

[0013] 一种用于提高耐盐性的表达载体的制备方法,其中,其制备方法包括以下步骤:

[0014] 扩增目的基因:以F:3'-ATGGCGAGCGCAGTGGAGAAG-5';R:3'-TCAGCTCTCGTGAGTGCCATTC-5'作为引物,以大豆R0期胚根cDNA为模板,进行PCR扩增,得到目的基因片段,目的基因片段的基因序列如SEQ ID NO.4所示;

[0015] 构建重组质粒:将目的基因片段与经Nde I和Xho I双酶切的蛋白表达载体PET-28a,通过T4连接酶连接酶切产物,构建pET-28a重组质粒。

[0016] 所述的用于提高耐盐性的表达载体的制备方法,其中,构建重组质粒过程中,包括以下步骤:

[0017] 将目的基因片段和经过双酶切的PET-28a蛋白表达载体按照摩尔比10:1混合,加入0.5μL T4连接酶,1μL 10×Buffer,用水补齐至10μL,16℃连接过夜。

[0018] 有益效果:本发明中首次发现该蛋白可以提高大肠杆菌的耐盐性,对于其在植物抗逆工程上的应用具有指导意义。该大豆蛋白可增强大肠杆菌的耐盐性,由于很多抗逆基因在大肠杆菌和植物体系具有相似的抗逆功能,因此,该基因在植物抗逆领域具有潜在的应用前景。

附图说明

[0019] 图1为本发明实施例1中利用PCR扩增大豆基因片段的电泳结果图(M为DL2000Marker)。

[0020] 图2为本发明实施例1中利用菌落PCR验证重组菌的电泳结果图(M为DL2000Marker)。

[0021] 图3为本发明实施例5中17号蛋白的诱导表达的电泳结果图。

[0022] 图4为本发明实施例6中空载体转化菌在不同浓度的高盐LB固体培养基和正常固体培养基的生长结果图。

[0023] 图5本发明实施例6中重组质粒转化菌在不同浓度的高盐LB固体培养基和正常固体培养基的生长结果图。

[0024] 图6本发明实施例6中空载体转化菌和重组质粒转化菌的存活率柱形图。

具体实施方式

[0025] 本发明提供一种大豆蛋白及其编码基因的应用及引物、表达载体和制备方法,为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0026] 本发明所提供的一种大豆蛋白及其编码基因的应用,是将所述大豆蛋白或其编码基因用于提高植物或大肠杆菌的耐盐性。其中,所述大豆蛋白的基因编码为Glyma06g25310.1。该大豆蛋白可增强大肠杆菌的耐盐性,由于很多抗逆基因在大肠杆菌和植物体系具有相似的抗逆功能,因此,该大豆蛋白及其编码基因在植物抗逆领域具有潜在的应用前景。

[0027] 所述大豆蛋白的基因序列(SEQ ID NO.1)如下所示:

[0028] ATCGAATCGACCTGAACTGCTTCTTCAAATTTTTTCTGGTGATTCTACAACCTGTCCTAACTCTCAACCTCTTCTCTTAATTAATCTATTCCTCTTTATCCTCCTCTGAACCTCAAACACCAAAACAAAGCATTACAATTC TCAATTTACATAAACACCAGAATTGATAAAAACACATAACAAAAAAAAAAGTGAAAAATGGCGAGCGCAGTGGA GAAGGAGGGTGGCGCGAGCGAGGAACTTTGTCTTTGGAGCTTCTGCTCCACCTGGTTGGAAGAAGCAGTTCATT CCAAAGAAAGCTGGTACCCCAAAGAAAAACGAGATTGTGTTCACTGCACCAACAGGAGAGGAGATCAATAACAGGA AGCAGCTGGAAAAATATTTGAAAGCACACCCTGGAGGCCAGCTGTATCAGAATTTGACTGGGGCACTGGTGAGAC CCCAAGAAGATCTACAAGAATCAGTGAGAAGGCCAAGGCAGCTCCTCCAACACAGAGGGAGCCCCCAAAGAAGCGT ACTAAAAGATCATCAGCTTCACAAAAGGAAATTTCCAGGAAGAAAAAGAAGAGGAGACCAAGGAAGCAGAGATGC AAGAAGCTGATGACACCACTAAGGGTGATAATGATATAGAGAAGGAAAAGGTTGTTGTAAACGAAAATCATGACAA GAGTGTGGAAGATACAGATGTCAACAAATCCACTCGTTATGGAGAAGAAGCTAAAGCTGGAGAAAACGTTGAGGTA

CCTATTGAAGAGGAAAAATCCAATGCTGCTGATGGAGAACTACCTGCATTAAGATAAGCTGATGACAAAGTAACTGAGGGCTCTGAAGTTTTCTGAGAAAGGATGAAGAAAAGATTGAGCAACCACAGGAAGAGACAAAAGAATATAGTGGATTTGGGGAGCCAGAGAAATTGGAAACATGCACTACTGCAGACAAAACGGTTGAAGTGAAGGAGTGAATAAAGAGATCACGTCAAAAGTACTCATGAATTTGAAGTTGGGGAAATAGAAGGAACAAAAGTGAACGGTGAAGAACATCACAAAGCTTGATGAGATAACAAGGCCGAAGCAGAGTTGACTGTGAATGGCACTCACGAGAGCTGAAGTGGTGAAGTCAAAAGCCTGGAGCAGGGAATAGATTAATAAGCTCTCCGCTTCCCTCCTCTCATTCTGACCCCTTTAGATCTGTTTGAAATGACTGTAGTTTTTGTAAATGTTATTTCTCTGATTGTTTATTGAAATAACAATATACAATTATAGAGCATAGCCGTATCATGTACCACCCTTGGGTGTATTGGACAGACGTGTAGCTTCTAGTTGCTTTTGTAACATTATGTTGTAAGATGTGATATGGACCTGTAATCATATATGTAAGGAAGTGATCCTATATA。

[0029] 本发明中,以R0期和R15期大豆胚根作为实验材料,采用100℃热处理10min后离心获得上清,富集得到的可溶性蛋白即为热稳定蛋白。根据蛋白组学和结构预测结果,在R0期高表达蛋白中挑选了1个蛋白进行结构和功能分析,该蛋白即本发明所述大豆蛋白。本发明中还提供用于扩增该大豆蛋白基因序列的引物,根据PMD19-T载体和基因的序列特点引入相应酶切位点的同源序列,在基因的上下游引物的5'端分别引入核酸内切酶(Nde I)和(Xho I)两端的同源序列。引物的序列如下所示:

[0030] F:3'-ATGGCGAGCGCAGTGGAGAAG(Nde I)-5'(SEQ ID NO.2);

[0031] R:3'-TCAGCTCTCGTGAGTGCCATTC(Xho I)-5'(SEQ ID NO.3)。

[0032] 本发明中还提供一种用于提高耐盐性的表达载体,所述表达载体用PET-28a蛋白表达载体重组得到,该大豆蛋白基因通过酶切位点Nde I和Xho I连接在表达载体上。

[0033] 本发明中还提供一种用于提高耐盐性的表达载体的制备方法,其制备方法包括以下步骤:

[0034] 扩增目的基因:根据PMD19-T载体和基因的序列特点引入相应酶切位点的同源序列,在基因的上下游引物的5'端分别引入核酸内切酶(Nde I)和(Xho I),以F:3'-ATGGCGAGCGCAGTGGAGAAG-5';R:3'-TCAGCTCTCGTGAGTGCCATTC-5'作为引物,以大豆R0期胚根cDNA为模板,进行PCR扩增,得到目的基因片段;目的基因片段的基因序列(SEQ ID NO.4)如下所示:

[0035] ATGGCGAGCGCAGTGGAGAAGGAGGGTGGCGCGAGCGAGGAACTTTGTCTTTGGAGCTTCCTGCTCCACCTGGTTGGAAGAAGCAGTTCATTCCAAAGAAAGCTGGTACCCCAAGAAAAACGAGATTGTGTTCACTGCACCAACAGGAGAGGAGATCAATAACAGGAAGCAGCTGGAAAAATATTTGAAAGCACACCCTGGAGGCCAGCTGTATCAGAAATTTGACTGGGGCACTGGTGAGACCCCAAGAAGATCTACAAGAATCAGTGAGAAGGCCAAGGCAGCTCCTCCAACACAGAGGGAGCCCCCAAAGAAGCGTACTAAAAGATCATCAGCTTCACAAAAGGAAATTTCCCAGGAAGAAAAAGGAGAGACCAAGGAAGCAGAGATGCAAGAAGCTGATGACACCACTAAGGGTGATAATGATATAGAGAAGGAAAAGGTTGTTGTAAACGAAAATCATGACAAGAGTGTGGAAGATACAGATGTCAACAAATCCACTCGTTATGGAGAAGAAGCTAAAGCTGGAGAAAACGTTGAGGTACCTATTGAAGAGGAAAAATCCAATGCTGCTGATGGAGAACTACCTGCATTAAGATAAAGCTGATGACAAAGTAACTGAGGGCTCTGAAGTTTTTCTGAGAAAGGATGAAGAAAAGATTGAGCAACACAGGAAGAGACAAAAGAATATAGTGGATTTGGGGAGCCAGAGAAATTGAAACATGCACTACTGCAGACAAAACGGTTGAAGTGAAGGAGTGAATAAAGAGGATCACGTCAAAAGTACTCATGAATTTGAAGTTGGGGAAATAGAAGGAACAAAAGTGAACGGTGAAGAACATACAAGCTTGATGAGATAACAAGGCCGAAGCAGAGTTGACTGTGAATGGCACTCACGAGAGCTGA。

6

ATGCCCTTGAGAGCCTTCAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCATGACTATCGTCGCCGCACTTATGA
CTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTGGGTCAATTTTCGGCGAGGACCGCTTTCG
CTGGAGCGCGACGATGATCGGCCTGTCGCTTGCAGTATTTCGAATCTTGCACGCCCTCGCTCAAGCCTTCGTCACT
GGTCCCGCCACCAACGTTTCGGCGAGAAGCAGGCCATTATCGCCGGCATGGCGGCCCCACGGGTGCGCATGATCG
TGCTCCTGTCGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGA
GCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTCCGTGTT
TCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGC
TACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCG
CATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTG
AGCATCCTCTCTCGTTTTCATCGGTATCATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCA
AACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGA
GCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTC
GCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGG
ATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCCAGTC
ACGTAGCGATAGCGGAGTGATACTGGCTTAACATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATAT
GCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGAC
TCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAT
CAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCT
GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCG
ACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTA
CCGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTC
GGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGT
AACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCA
GAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATT
TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACC
GCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGA
TCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAACAATAAACTGT
CTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGTGTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGCTTGTCTTAGGCCGCGATT
AAATTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATC
TATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTA
CAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCC
TGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGGAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCA
GGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTGATTCTGTTTGTAAATTGTCCTTTTA
ACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGA
TGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAACTTTGCCATTCTCACCGGATTCA
GTCGTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTG
GACGAGTCGGAATCGCAGACCGATAACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATT
ACAGAAACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTTCATTTGATGCTCGAT
GAGTTTTTCTAAGAATTAATTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGG

CGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGG
GTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACC
GTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCAC
TAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGG
GAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCC
GCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCA。

[0038] 构件重组质粒过程中,可以包括以下步骤:

[0039] 将目的基因片段和经过双酶切的PET-28a蛋白表达载体按照摩尔比10:1混合,加入0.5 μ L T4连接酶,1 μ L 10 $\times$ Buffer,用水补齐至10 μ L,16 $^{\circ}$ C连接过夜。

[0040] 以下通过实施例对本发明作进一步说明。

[0041] 实施例1:基因的克隆

[0042] 根据PMD19-T载体和基因的序列特点引入相应酶切位点的同源序列,在基因的上下游引物的5'端分别引入核酸内切酶(Nde I)和(Xho I)两端的同源序列。

[0043] 引物:F:3'-ATGGCGAGCGCAGTGGAGAAG(Nde I)-5' ;

[0044] R:3'-TCAGCTCTCGTGAGTGCCATTC(Xho I)-5' 。

[0045] 以基因的F和R作为引物,以大豆R0期胚根cDNA为模板,进行PCR扩增。反应体系为5 $\times$ Phusion HF Buffer 4 μ L,2.5mM dNTP1.6 μ L,上下游引物各10mM,cDNA模板1 μ L,DMSO 0.6 μ L,用水补齐至20 μ L。在PCR仪上98 $^{\circ}$ C预反应30s,98 $^{\circ}$ C反应5s,退火温度依据引物Tm值而定,72 $^{\circ}$ C延伸反应时间依据基因长度而定,72 $^{\circ}$ C10min,将反应产物在1%的琼脂糖凝胶电泳上分离PCR产物,用紫外灯检测,并按照核酸回收试剂盒的说明书操作收集特异性扩增产物。将扩增回收产物与TaKaRa的PMD19-T simple载体按照摩尔比10:1的比例混合,加入等体积的Solution I反应缓冲液,混匀后,轻微离心,置于16 $^{\circ}$ C下水浴连接过夜。

[0046] 本实施例中,是根据NCBI数据库中的核酸序列设计引物,以大豆胚根总cDNA为模板,利用PCR方法扩增挑选出来的基因的序列,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,拟扩增基因得到有效扩增,基因的分子量大小与预期分子量大小相近(如图1所示),连接T载后进行测序。将测序成功的克隆载体与蛋白表达载体PET-28a经双酶切后,通过T4连接酶连接酶切产物,构建pET-28a/重组质粒,然后将重组质粒转化大肠杆菌BL21Star,利用菌落PCR法对重组菌进行验证(如图2所示)。结果显示构建成功的重组菌能扩增到目的片段,表明成功构建含目的基因的原核表达载体。

[0047] 实施例2:超级感受态的制备及转化

[0048] 按照上海生工提供的超级感受态试剂盒提供的方法制备大肠杆菌TOP10和BL21Star感受态,在超净工作台中挑取划线培养的大肠杆菌单克隆菌株于5mL的LB液体培养基中,在37 $^{\circ}$ C,180rpm恒温摇床中培养12h后,按照1:50比例接种到50mL新鲜配制的LB培养基中,至OD600值约为0.6。将用50mL离心管收集菌体,8,000g离心3min。弃上清后将菌体冰上放置10min,4 $^{\circ}$ C,5,000rpm离心5min,用试剂盒提供的Buffer A将菌体重悬后于冰上放置30min,4 $^{\circ}$ C,5,000rpm离心5min,弃上清液,用试剂盒提供的Buffer B(用前-20 $^{\circ}$ C预冷)重悬菌体,用灭菌的1.5mL EP管分装,每管100 μ L。在-80 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

[0049] 将10 μ L连接产物加入到含有100 μ L大肠杆菌感受态中,轻微混匀。将大肠杆菌感受

态细胞放置于冰上30min,42℃热激90s,冰上5min,加入900μL新鲜配制的LB液体培养基。在37℃,180rpm恒温摇床中培养1h,取300μL菌液涂布于含有相应抗生素的LB固体培养基中,37℃下倒置培养15h。

[0050] 实施例3:质粒提取

[0051] 利用OMEGA公司提供的质粒提取试剂盒操作,取1mL菌液于1.5mL的EP管中,8,000rpm,离心1min,重复3次,弃上清。向装有菌体的EP管中加入Buffer I 200μL,用移液器充分吹打混匀后加入200μL Buffer II,轻微颠倒混匀2次,室温静置1min,加入Buffer III 300μL,颠倒混匀3次,整个过程不要超过5min。室温,12,000rpm离心15min,吸取上清500μL,加入平衡好的核酸收集柱中,室温,12,000rpm离心1min,弃废液后向核酸收集柱中加入500μL HB Buffer,室温12,000rpm离心1min,弃废液,加入试剂盒中的600μL WB Buffer(预先加入800mL无水乙醇),室温12,000rpm离心1min重复2次,将核酸收集柱空转,15,000rpm离心2min除去残留的WB Buffer。向核酸收集柱内加入30μL无菌水,用一个新EP管收集质粒,室温12,000rpm离心2min。

[0052] 实施例4:蛋白表达载体的构建

[0053] 将含目的基因的PMD19-T载体按照基因引物设计的酶切位点做双酶切反应,反应体系为限制性内切酶各1μL,质粒1μg,反应Buffer 2μL,用水补齐至10μL,反应5h,将反应产物在1%的琼脂糖凝胶电泳上分离酶切产物,在紫外灯下检测。回收目的基因片段,将目的基因片段和经过双酶切的PET-28a蛋白表达载体按照摩尔比10:1混合,加入0.5μL T4连接酶,1μL 10×Buffer,用水补齐至10μL,16℃连接过夜。

[0054] 实施例5:重组子的菌落PCR验证

[0055] 将连接产物转化大肠杆菌BL21Star感受态细胞,挑取少量长有转化子的菌斑为模板,以引物来验证重组子,PCR反应体系与过程同基因克隆。

[0056] 在本实施例中,将构建成功的pET-28a/蛋白重组菌扩大培养,加入0.1mM IPTG在16℃下诱导12小时,离心收集菌并用Balance Buffer重悬菌体,通过超声破碎重组菌的细胞膜离心取上清液即为重组菌的总可溶性蛋白,以pET-28a空载体诱导前后为对照,如图3所示,其中,1-4分别为BL21诱导前,BL21诱导后,17号蛋白诱导前,17号蛋白诱导后(理论分子量为12.3KDa)。从结果可以看出经过SDS-PAGE电泳检测重组菌得到表达。

[0057] 实施例6:500mM盐胁迫下重组菌的存活率的测定

[0058] 将重组质粒转化菌和空载体转化菌接入含1‰卡钠(10mg/ml)的5ml LB液体培养基中,在200rpm/min 37℃的摇床中过夜培养;第二天转接至含1‰卡钠(10mg/ml)的5ml LB液体培养基中,在200r/min 37℃的摇床中扩培;将菌液浓度扩培至OD600=0.6—0.8之间后(重组质粒转化菌和空载体转化菌的OD600需调至一致),以1‰的比例加入浓度为4.8mg/ml IPTG,在200r/min 30℃的摇床中诱导4h,再测其OD600(将重组质粒转化菌和空载体转化菌的OD600需调至一致)并记录。

[0059] 将诱导后的菌液稀释10、100、1000倍后,分别取100ul涂布在有500mMNaCl的高盐LB固体培养基(含1‰的卡钠(10μg/ml,1‰的比例),含IPTG(4.8mg/ml,1‰的比例))和正常LB固体培养基(含1‰的卡钠(10μg/ml)和IPTG(4.8mg/ml));正常LB固体培养基在37℃培养箱中培养15h后,记录能够进行计数的平板上的菌斑数目(平板菌落数在30—300个之间为有效数据),高盐培养基在37℃培养箱中培养48h后记录菌斑数目(平板菌落数在30—300个之

间为有效数据),最后计算存活率,绘制存活率柱形图。

[0060] 图4和图5分别为空载体转化菌和重组质粒转化菌在不同浓度的高盐LB固体培养基和正常固体培养基的生长结果图,其中, 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 分别表示稀释倍数1、10、100、1000。图6为空载体转化菌和重组质粒转化菌的存活率柱形图,其中,P值为为0.0261、Glyma06g25310.1蛋白的标准差为0.1961、空载的标准差为0.0143。

[0061] 本实施例中将重组菌诱导后稀释分别涂布在正常和高盐的平板上,对菌斑数目进行计数(平板菌落数在30-300个之间为有效数据);以空载重组菌作为对照,计算重组菌的存活率。结果显示,与空载重组菌的存活率对比,可证明重组菌中的对应蛋白是否具有耐盐性。表达Glyma 06g 25310.1蛋白的重组菌的存活率明显高于空载重组菌(如图6),另外还进行了点板,更直观的显示了Glyma06g25310.1蛋白的重组菌的存活率比空载重组菌的存活率更高(如图4和5),证明该蛋白是具有一定的耐盐性。

[0062] 应当理解的是,本发明的应用不限于上述的举例,对本领域普通技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 深圳大学
- [0003] <120> 大豆蛋白及其编码基因的应用及引物、表达载体和制备方法
- [0004] <130> 5
- [0005] <160> 5
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 1408
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 大豆(Glycine max (Linn.) Merr.)
- [0011] <223> 基因编码为Glyma06g25310.1的大豆蛋白基因序列
- [0012] <400> 1
- [0013] atcgaatcga cctgaactgc ttcttcaaatt ttttttctgg tgattctaca acctgtccta 60
- [0014] actctcaacc ctcttctctet taattaatct attcctcttt atcctcctct gaacctcaaa 120
- [0015] caccaaaaca aagcattaca attctcaatt tcacataaac accagaattg ataaaaacac 180
- [0016] ataacaaaaa aaaaaagtga aaaatggcga gcgcagtga gaaggagggt ggcgcgagcg 240
- [0017] aggaaacttt gtctttggag cttcctgctc cacctggttg gaagaagcag ttcattccaa 300
- [0018] agaaagctgg taccccaaag aaaaacgaga ttgtgttcac tgcaccaaca ggagaggaga 360
- [0019] tcaataacag gaagcagctg gaaaaatatt tgaaagcaca ccctggaggc ccagctgtat 420
- [0020] cagaatttga ctggggcact ggtgagaccc caagaagatc tacaagaatc agtgagaagg 480
- [0021] ccaaggcagc tcctccaaca cagagggagc ccccaaagaa gcgtactaaa agatcatcag 540
- [0022] cttcacaaaa ggaaatttcc caggaagaaa aagaagagga gaccaaggaa gcagagatgc 600
- [0023] aagaagctga tgacaccact aagggtgata atgatataga gaaggaaaag gttgttgtaa 660
- [0024] acgaaaatca tgacaagagt gtggaagata cagatgtcaa caaatccact cgttatggag 720
- [0025] aagaagctaa agctggagaa aacgttgagg tacctattga agaggaaaaa tccaatgctg 780
- [0026] ctgatggaga actacctgca ttaaaagata aagctgatga caaagtaact gagggctctg 840
- [0027] aagtttttct gagaaaggat gaagaaaaga ttgagcaacc acaggaagag acaaaaagaat 900
- [0028] atagtggatt tggggagcca gagaaattgg aaacatgcac tactgcagac aaaacggttg 960
- [0029] aagtgaagg agtgaataaa gaggatcacg tcaaaagtac tcatgaattt gaagttgggg 1020
- [0030] aaatagaagg aacaaaagtg aacggtgaag aacatcaca gcttgatgag ataaacaagg 1080
- [0031] ccgaagcaga gttgactgtg aatggcactc acgagagctg aactggtgag gtcaaaaagcc 1140
- [0032] tggagcaggg aatagattaa taagctctcc gcttcctcc tctcattctg accccttag 1200
- [0033] atctgtttga aatgactgta gtttttgta atgttatttc tctgattgtt tattgaaata 1260
- [0034] acaatataca attatagagc atagcgtat catgtaccac ccttggtgtg attggacaga 1320
- [0035] cgtgtagctt ctagttgctt ttgtaacatt atgttgtaag atgtgatatg gacctgtaat 1380
- [0036] catatatgta aggaagtgat cctatata 1408
- [0037] <210> 2
- [0038] <211> 21

[0039]	<212> DNA
[0040]	<213> 人工序列
[0041]	<223> 引物序列
[0042]	<400> 2
[0043]	atggcgagcg cagtggagaa g 21
[0044]	<210> 3
[0045]	<211> 22
[0046]	<212> DNA
[0047]	<213> 人工序列
[0048]	<223> 引物序列
[0049]	<400> 3
[0050]	tcagctctcg tgagtgccat tc 22
[0051]	<210> 4
[0052]	<211> 918
[0053]	<212> DNA
[0054]	<213> 人工序列
[0055]	<223> 目的基因片段的基因序列
[0056]	<400> 4
[0057]	atggcgagcg cagtggagaa ggagggtggc gcgagcgagg aaactttgtc tttggagctt 60
[0058]	cctgctccac ctggttggaa gaagcagttc attccaaaga aagctggtac cccaaagaaa 120
[0059]	aacgagattg tgttctactgc accaacagga gaggagatca ataacaggaa gcagctggaa 180
[0060]	aaatatattga aagcacaccc tggaggccca gctgtatcag aatttgactg gggcactggg 240
[0061]	gagaccccaa gaagatctac aagaatcagt gagaaggcca aggcagctcc tccaacacag 300
[0062]	agggagcccc caaagaagcg tactaaaaga tcatcagctt cacaaaagga aatttcccag 360
[0063]	gaagaaaaag aagaggagac caaggaagca gagatgcaag aagctgatga caccactaag 420
[0064]	ggtgataatg atatagagaa ggaaaagggtt gttgtaaacg aaaatcatga caagagtgtg 480
[0065]	gaagatacag atgtcaacaa atccactcgt tatggagaag aagctaaagc tggagaaaac 540
[0066]	gttgaggtac ctattgaaga ggaaaaatcc aatgctgctg atggagaact acctgcatta 600
[0067]	aaagataaag ctgatgacaa agtaactgag ggctctgaag tttttctgag aaaggatgaa 660
[0068]	gaaaagattg agcaaccaca ggaagagaca aaagaatata gtggatttgg ggagccagag 720
[0069]	aaattggaaa catgcactac tgcagacaaa acggttgaag tggaaggagt gaataaagag 780
[0070]	gatcacgtca aaagtactca tgaatttgaa gttggggaaa tagaaggaaac aaaagtgaac 840
[0071]	ggtgaagaac atcacaagct tgatgagata aacaaggccg aagcagagtt gactgtgaat 900
[0072]	ggcactcacg agagctga 918
[0073]	<210> 5
[0074]	<211> 6177
[0075]	<212> DNA
[0076]	<213> 人工序列
[0077]	<223> pET-28a重组质粒基因序列

[0078]	<400> 5	
[0079]	atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gacccttta gaggcccaa	60
[0080]	ggggttatgc tagttattgc tcagcgggtg cagcagccaa ctacagcttc tttcgggctt	120
[0081]	tgtagcagc cggatctcag tgggtgggtg ggtgggtgctc gaggttcgg ccttggttat	180
[0082]	ctcatcaagc ttgtgatgtt cttaccgtt cacttttgtt cttctatatt cccaacttc	240
[0083]	aaattcatga gtacttttga cgtgatcctc tttattcact cttccactt caaccgtttt	300
[0084]	gtctgcagta gtgcatgttt ccaatttctc tggtcccca aatccactat attcttttgt	360
[0085]	ctcttctgt ggttgctcaa tcttttcttc atcctttctc agaaaaactt cagagccctc	420
[0086]	agttactttg tcatcagctt tatcttttaa tgcaggtagt tctccatcag cagcattgga	480
[0087]	tttttctct tcaataggta cctcaacgtt ttctccagct ttagcttctt ctccataacg	540
[0088]	agtggatttg ttgacatctg tatcttccac actcttgctc tgattttcgt ttacaacaac	600
[0089]	cttttcttc tctatatcat tatcaccctt agtgggtgctc tcagcttctt gcattctctg	660
[0090]	ttccttggtc tctcttctt ttttctctg ggaaatttcc ttttgtaag ctgatgatct	720
[0091]	tttagtacgc ttctttgggg gctccctctg tgttgaggga gctgccttg ccttctcact	780
[0092]	gattcttgta gatcttctg gggctctacc agtgcccag tcaaattctg atacagctgg	840
[0093]	gcctccaggg tgtgctttca aatatcttcc cagctgctc ctgttattga tctctctcc	900
[0094]	tgttggtgca gtgaacacaa tctcgtttt ctttgggta ccagcttctt ttggaatgaa	960
[0095]	ctgcttcttc caaccagggt gagcaggaag ctcaaagac aaagtttctt cgctcgcgc	1020
[0096]	accctcttc tccactgcgc tcgcatatg gctgccgcgc ggcaccaggc cgctgctgtg	1080
[0097]	atgatgatga tgatggctgc tgcccatggt atatctcctt cttaaagtta aaaaaatta	1140
[0098]	tttctagagg ggaattgtta tccgctcaca attcccctat agtgagtcgt attaatctg	1200
[0099]	cgggatcgag atctcgatcc tctacgccg acgcatcgtg gccggcatca ccggcgccac	1260
[0100]	aggtgcggtt gctggcgctt atatcgccga catcacgat ggggaagatc gggctcgcca	1320
[0101]	cttcgggctc atgagcgtt gtttcggcgt gggtaggtg gcaggccccg tggccggggg	1380
[0102]	actgttgggc gccatctctt tgcatgcacc attccttgcg gcggcggtgc tcaacggcct	1440
[0103]	caacctacta ctgggctgct tcctaattgca ggagtcgcat aaggagagc gtcgagatcc	1500
[0104]	cggacaccat cgaatggcgc aaaaccttct gcggtatggc atgatatgcgc ccggaagaga	1560
[0105]	gtcaattcag ggtggatgaat gtgaaaccag taacgttata cgatgtcgca gagtatgccg	1620
[0106]	gtgtctctta tcagaccgtt tcccgcgtg tgaaccaggc cagccacgtt tctgcgaaaa	1680
[0107]	cgcgggaaaa agtgaagcg gcgatggcgg agctgaatta cattcccaac cgcgtggcac	1740
[0108]	aacaactggc gggcaaacag tcgttgctga ttggcgttgc cacctccagt ctggccctgc	1800
[0109]	acgcgccgtc gcaaatgtc gcggcgatta aatctcgcg cgatcaactg ggtgccagcg	1860
[0110]	tgggtggtgc gatggtagaa cgaagcggcg tcgaagcctg taaagcggcg gtgcacaatc	1920
[0111]	ttctcgcga acgcgtcagt gggctgatca ttaactatcc gctggatgac caggatgcca	1980
[0112]	ttgctgtgga agctgcctgc actaatgttc cgcgcttatt tcttgatgtc tctgaccaga	2040
[0113]	cacctatcaa cagtattatt ttctccatg aagacgttac gcgactgggc gtggagcatc	2100
[0114]	tggtgcatt gggtcaccag caaatcgcg tgtagcggg cccattaagt tctgtctcgg	2160
[0115]	cgcgtctgcg tctggctggc tggcataaat atctcactcg caatcaaatt cagccgatag	2220
[0116]	cggaacggga aggcgactgg agtgccatgt ccggttttca acaaacatg caaatgctga	2280

[0117]	atgagggcat	cgttcccact	gcgatgctgg	ttgccaacga	tcagatggcg	ctgggcgcaa	2340
[0118]	tgcgcgccat	taccgagtcc	gggctgcgcg	ttggtgcgga	tatctcggtg	gtgggatacg	2400
[0119]	acgataccga	agacagctca	tgttatatcc	cgccgttaac	caccatcaaa	caggattttc	2460
[0120]	gcctgctggg	gcaaaccagc	gtggaccgct	tgctgcaact	ctctcagggc	caggcggtga	2520
[0121]	agggcaatca	gctgttgccc	gtctcactgg	tgaagaaaa	aaccaccctg	gcgcccata	2580
[0122]	cgcaaaccgc	ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	gcagctggca	cgacaggttt	2640
[0123]	cccactgga	aagcgggcag	tgagcgcaac	gcaattaatg	taagttagct	cactcattag	2700
[0124]	gcaccgggat	ctcgaccgat	gcccttgaga	gccttcaacc	cagtcagctc	cttccggttg	2760
[0125]	gcgcggggca	tgactatcgt	cgccgcactt	atgactgtct	tctttatcat	gcaactcgta	2820
[0126]	ggacaggatg	cggcagcgct	ctgggtcatt	ttcggcgagg	accgctttcg	ctggagcgcg	2880
[0127]	acgatgatcg	gcctgtcgct	tgcggtattc	ggaatcttgc	acgccctcgc	tcaagccttc	2940
[0128]	gtcactggtc	ccgccaccaa	acgtttcggc	gagaagcagg	ccattatcgc	cggcatggcg	3000
[0129]	gccccacggg	tgcgcatgat	cgtgtctctg	tcgttagga	cccggctagg	ctggcggggt	3060
[0130]	tgcttactg	gtagcagaa	tgaatcaccg	atacgcgagc	gaacgtgaag	cgactgctgc	3120
[0131]	tgcaaacgt	ctcgacctg	agcaacaaca	tgaatgtct	tcggtttccg	tgtttcgtaa	3180
[0132]	agtctggaag	cgcggaagtc	agcgccctgc	accattatgt	tccgatctg	catcgagga	3240
[0133]	tgctgctggc	tacctgtgg	aacacctaca	tctgtattaa	cgaagcgctg	gcattgacct	3300
[0134]	tgagtgattt	ttctctggtc	ccgccgcac	cataccgcca	gttgtttacc	ctcacaacgt	3360
[0135]	tccagtaacc	gggcatgttc	atcatcagta	accgctatcg	tgagcatcct	ctctcgtttc	3420
[0136]	atcggtatca	ttacccccat	gaacagaaat	cccccttaca	cggaggcatc	agtgacaaa	3480
[0137]	caggaaaaaa	ccgcccttaa	catggcccgc	tttatcagaa	gccagacatt	aacgcttctg	3540
[0138]	gagaaactca	acgagctgga	cgcggatgaa	caggcagaca	tctgtgaatc	gcttcacgac	3600
[0139]	cacgctgatg	agctttaccg	cagctgcctc	gcgcgtttcg	gtgatgacgg	tgaagacctc	3660
[0140]	tgacacatgc	agctcccgga	gacggtcaca	gcttgctgt	aagcggatgc	cgggagcaga	3720
[0141]	caagcccgtc	agggcgcgtc	agcgggtgtt	ggcgggtgtc	ggggcgccgc	catgaccag	3780
[0142]	tcacgtagcg	atagcggagt	gtatactggc	ttaactatgc	ggcatcagag	cagattgtac	3840
[0143]	tgagagtga	ccatataatg	ggtgtgaaat	accgcacaga	tgcgtaagga	gaaaataaccg	3900
[0144]	catcaggcgc	tcttccgctt	cctcgctcac	tgactcgctg	cgctcggtcg	ttcggtgcg	3960
[0145]	gcgagcggta	tcagctcact	caaaggcggg	aatacgggta	tccacagaat	caggggataa	4020
[0146]	cgcaggaaag	aacatgtgag	caaaaggcca	gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	4080
[0147]	gttgctggcg	ttttccata	ggctccgccc	ccctgacgag	catcacaaaa	atcgacgctc	4140
[0148]	aagtcagagg	tggcgaaacc	cgacaggact	ataaagatac	caggcggttc	cccctggaag	4200
[0149]	ctccctcgtg	cgtctcctg	ttccgacct	gccgttacc	ggatacctgt	ccgcctttct	4260
[0150]	cccttcggga	agcgtggcgc	tttctcatag	ctcacgtgt	aggtatctca	gttcggtgta	4320
[0151]	ggctcgttcg	tccaagctgg	gctgtgtgca	cgaaccccc	gttcagcccc	accgctgcgc	4380
[0152]	cttatccggt	aactatcgtc	ttgagtccaa	cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	4440
[0153]	agcagccact	ggtaacagga	ttagcagagc	gaggtatgta	ggcggtgcta	cagagttctt	4500
[0154]	gaagtgtggt	cctaactacg	gctacactag	aaggacagta	tttggtatct	gcgctctgct	4560
[0155]	gaagccagtt	accttcggaa	aaagagttgg	tagctcttga	tccggcaaac	aaaccaccgc	4620

[0156] tggtagcggg ggtttttttg ttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca 4680
[0157] agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta 4740
[0158] agggattttg gtcataaaca ataaaactgt ctgcttacat aaacagtaat acaagggggtg 4800
[0159] ttatgagcca tattcaacgg gaaacgtctt gctctaggcc gcgattaaat tccaacatgg 4860
[0160] atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt cgggcaatca ggtgcgacaa 4920
[0161] tctatcgatt gtatgggaag cccgatgcgc cagagttggt tctgaaacat ggcaaaggta 4980
[0162] gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa ctggctgacg gaatttatgc 5040
[0163] ctcttcgcac catcaagcat tttatccgta ctctgatga tgcattggtta ctcaccactg 5100
[0164] cgatccccgg gaaaacagca ttccaggtat tagaagaata tcctgattca ggtgaaaata 5160
[0165] ttgttgatgc gctggcagtg ttcctgcgcc ggttgcatc gattcctggt tgtaattgtc 5220
[0166] cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg ctacggcgca atcacgaatg aataacggtt 5280
[0167] tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga 5340
[0168] aagaaatgca taaacttttg ccattctcac cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct 5400
[0169] cacttgataa ccttattttt gacgagggga aattaatagg ttgtattgat gttggacgag 5460
[0170] tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccctctatg gaactgcctc ggtgagtttt 5520
[0171] ctcttcattt acagaaacgg ctttttcaaa aatatggtat tgataatcct gatatgaata 5580
[0172] aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaaga attaatcat gagcggatac 5640
[0173] atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa 5700
[0174] gtgccacctg aaattgtaaa cgtaaatatt ttgttaaaat tcgcgttaaa tttttgttaa 5760
[0175] atcagctcat tttttaacca ataggccgaa atcggcaaaa tcccttataa atcaaaagaa 5820
[0176] tagaccgaga tagggttgag tgttgttcca gtttggaaca agagtccact attaaagaac 5880
[0177] gtggactcca acgtcaaagg gcgaaaaacc gtctatcagg gcgatggccc actacgtgaa 5940
[0178] ccatcaccct aatcaagttt ttggggtcgc aggtgccgta aagcactaaa tcggaaccct 6000
[0179] aaaggagacc cccgatttag agcttgacgg ggaaagccgg cgaacgtggc gagaaaggaa 6060
[0180] gggaagaaag cgaaaggagc gggcgctagg gcgctggcaa gtgtagcggg cacgctgcgc 6120
[0181] gtaaccacca caccgcgcgc gcttaatgcg ccgctacagg gcgcgtccca ttcgcca 6177



图1

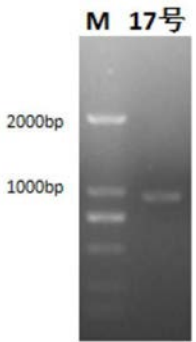


图2

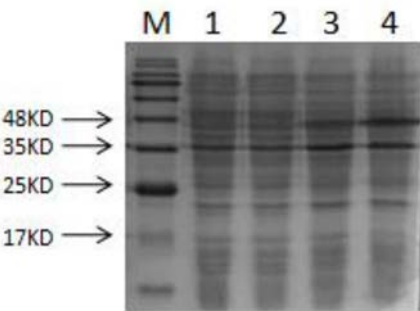


图3

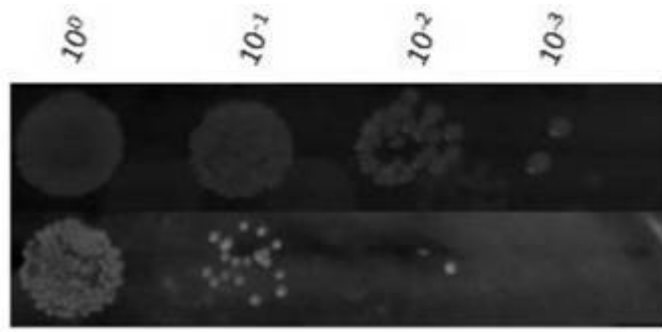


图4

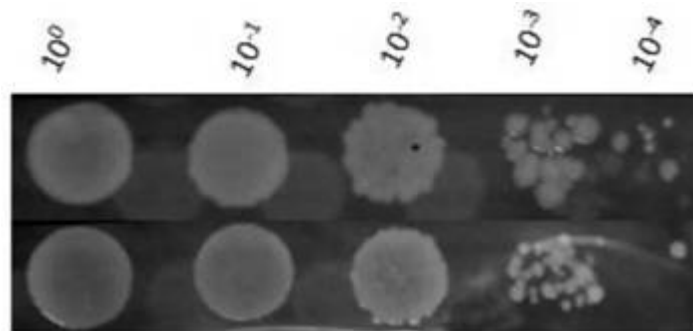


图5

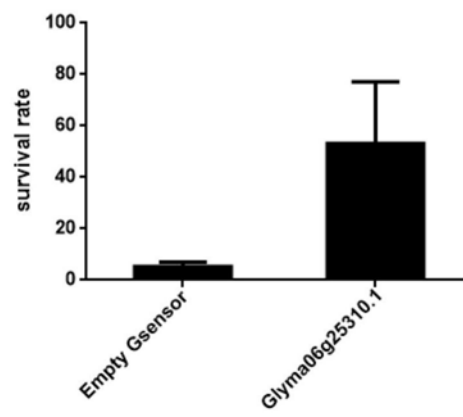


图6