



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105585624 B

(45)授权公告日 2019.02.19

(21)申请号 201610141719.6

(22)申请日 2016.03.14

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105585624 A

(43)申请公布日 2016.05.18

(73)专利权人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路800号

(72)发明人 唐克轩 付雪晴 石璞 刘萌

陈明慧 马亚男 郝小龙 黎凌

(续)

(74)专利代理机构 上海旭诚知识产权代理有限公司

公司 31220

代理人 郑立

(51)Int.Cl.

C07K 14/415(2006.01)

(续)

(56)对比文件

US 4992561, 1991.02.12,

CN 102558325 A, 2012.07.11,

CN 104152463 A, 2014.11.19,

CN 105132423 A, 2015.12.09,

龚苏晓. 黄花蒿中青蒿素及其生物合成前体的分离及含量变化.《国外医学中医中药分册》

.2001,第23卷(第4期),第211-212页.

NCBI.Predicted: pleiotropic drug resistance protein 1-like [Solanum pennellii].《GenBank Database》.2015, Accession No. XP-015076369.

Arkadiusz Nawrocki 等.The effects of transcription regulating genes PDR1, pdr1-3 and PDR3 in pleiotropic drug resistance.《Proteomics》.2001,第1卷(第8期),第1022-1032页.

朱建华 等.青蒿酸和二氢青蒿酸生物合成青蒿素研究.《第八届全国天然有机化学学术研讨会论文集》.2010,第235页.

Lorenzo Borghi 等.The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport.《Biochemical Society Transactions》.2015,第43卷(第5期),第924-930页.

(续)

审查员 李梦华

权利要求书2页 说明书8页

序列表15页 附图3页

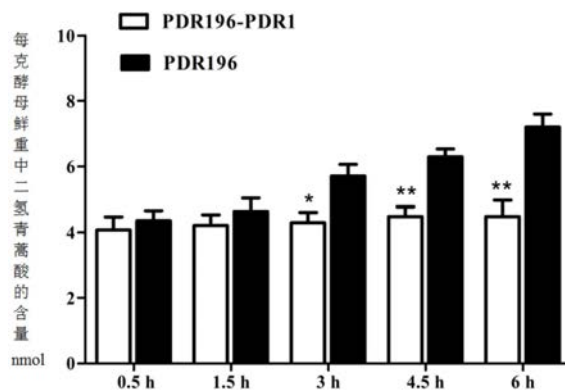
(54)发明名称

一种青蒿PDR亚家族转运蛋白及其功能验证方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种青蒿PDR亚家族转运蛋白,该蛋白的氨基酸序列包括SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列,或者如SEQ ID NO:2所示;或者该蛋白由在高严谨条件与编码氨基酸序列为SEQ ID NO:2所示的蛋白质的核酸的互补链杂交的核酸编码。进一步地,发明人将该蛋白命名为AaPDR1,为青蒿分泌型腺毛特异表达的转运蛋白,酵母转运实验和青蒿中干扰该转运蛋白证明AaPDR1参与青蒿中青蒿素合成途径中间产物二氢青蒿酸的转运。该发明对于为青蒿素的规模化

生产提供高产、稳定新药源具有重要意义。



CN 105585624 B

[接上页]

(72)发明人 刘品 孙小芬

(51)Int.Cl.

C12N 15/29(2006.01)

C12Q 1/68(2018.01)

A01H 5/00(2018.01)

A01H 6/14(2018.01)

(56)对比文件

HIROKO MIZOGUCHI 等.Different

Missense Mutations in PDR1 and PDR3 Genes from Clotrimazole-Resistant Sake Yeast are Responsible for Pleiotropic Drug Resistance and Improved Fermentative Activity.《JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING》.2002,第93卷(第2期),第221-227页.

1. 一种青蒿PDR亚家族转运蛋白的功能验证方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 从青蒿cDNA文库中克隆到所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的核酸序列SEQ ID NO:1所示,即AaPDR1基因;

(2) 把AaPDR1基因可操作性地连接于酵母表达调控序列,形成含AaPDR1基因的酵母表达载体;

(3) 将含所述AaPDR1基因的酵母表达载体转入酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) AD12345678,得到转基因酵母菌,所述转基因酵母菌获得了二氢青蒿酸外排的功能,从而验证了所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有外排二氢青蒿酸的功能。

2. 一种青蒿PDR亚家族转运蛋白的功能验证方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 从青蒿cDNA文库中克隆到所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的核酸序列,如SEQ ID NO:1所示,即AaPDR1基因;

(2) 把AaPDR1基因可操作性地连接于表达调控序列,形成含AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体;

(3) 将含所述AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体转化根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EH105,获得具有所述干扰表达载体的根癌农杆菌菌株;

(4) 利用所述步骤3构建的根癌农杆菌菌株转化青蒿,经卡那霉素筛选得到抗性苗,再经PCR检测为阳性的植株即为转基因青蒿;

(5) 对获得的所述转基因青蒿进行青蒿素、二氢青蒿酸和青蒿酸含量测定,进而获得青蒿素合成受抑制的青蒿植株,从而验证了所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有影响青蒿素合成的功能。

3. 一种青蒿PDR亚家族转运蛋白的功能验证方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 从青蒿cDNA文库中克隆到所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的核酸序列,如SEQ ID NO:1所示,即AaPDR1基因;

(2) 把AaPDR1基因可操作性地连接于酵母表达调控序列,形成含AaPDR1基因的酵母表达载体;

(3) 将含所述AaPDR1基因的酵母表达载体转入酿酒酵母AD12345678,得到转基因酵母菌,所述转基因酵母菌获得了二氢青蒿酸外排的功能,从而验证了所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有外排二氢青蒿酸的功能;

(4) 把AaPDR1基因可操作性地连接于表达调控序列,形成含AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体;

(5) 将含所述AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体转化根癌农杆菌EH105,获得具有所述干扰表达载体的根癌农杆菌菌株;

(6) 利用所述步骤5构建的根癌农杆菌菌株转化青蒿,经卡那霉素筛选得到抗性苗,再经PCR检测为阳性的植株即为转基因青蒿;

(7) 对获得的所述转基因青蒿进行青蒿素、二氢青蒿酸和青蒿酸含量测定,进而获得青蒿素合成受抑制的青蒿植株,从而验证了所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有影响青蒿素合成的功能。

4. 一种如权利要求2或3任一项所述的青蒿PDR亚家族转运蛋白的功能验证方法,其特征在于,所述转化根癌农杆菌EH105的具体方法是采用冻融法进行转化。

5. 一种青蒿PDR亚家族转运蛋白在提高青蒿素含量的青蒿育种中的应用,其特征在於,所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有以下特征:所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

6. 一种青蒿PDR亚家族转运蛋白在制备抗疟疾药物中的应用,其特征在於,所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有以下特征:所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

一种青蒿PDR亚家族转运蛋白及其功能验证方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,具体涉及一种青蒿PDR亚家族转运蛋白及其功能验证方法和应用。

背景技术

[0002] 青蒿(*Artemisia annua* L.)是菊科蒿属的一年生草本植物。其地上部分所提取的含有过氧桥的倍半萜内酯氧化物——青蒿素,是目前应用最广泛,疗效最好的抗疟疾药物,特别是对脑型疟疾和抗氯喹疟疾更加有效。目前,青蒿素联合疗法(ACTs)是世界卫生组织推荐的最有效的治疗疟疾的方法。但其青蒿素在植物青蒿中的含量低,尚无法完全满足全球的市场需求。青蒿具有分泌型腺毛(glandular trichomes)和非分泌型腺毛(nonglandular trichomes)。在青蒿叶片的正面和背面、茎秆、花上都大量存在分泌型腺毛,这里是大量次生代谢物的累积场所,青蒿素也被认为储存于此处。

[0003] ATP结合盒式(ATP binding cassette,ABC)转运蛋白是一大类非常多样化非常特殊的超级家族。大部分ABC转运蛋白直接参与到各种分子的跨膜运输。此转运蛋白利用水解ATP释放能量对细胞质内多种生物分子进行跨膜运输,转运底物包括:脂类、氨基酸、生物碱、萜类物质等。根据对于细胞质的转运方向可以粗略分为摄取转运蛋白(importer)和外排转运蛋白(exporter)。ABC转运蛋白的特征是具有ATP结合区域(ATP-binding cassette),也被称为核酸结合区域(nucleotide-binding domain,NBD),具有一些非常保守的模序(motif),包括Walker A和Walker B序列、ABC signature motif、H loop和Q loop。植物中有大量的ABC转运蛋白,近年来的研究表明植物ABC转运蛋白不仅仅涉及到植物激素、酯类、金属离子、次生代谢物、外源化学物质的转运有关,而且对于植物和病原体互作以及离子通道的建成都有重要作用。多向耐药性(pleiotropic drug resistance,PDR)转运蛋白属于ABC转运蛋白家族G亚家族,包含反向的核酸结合区域-跨膜结合区域(NBD-TMD)类型的转运蛋白。

发明内容

[0004] 针对青蒿素在植物青蒿中的含量低,无法有效满足市场需求的问题,发明人考虑到如果通过对青蒿分泌型腺毛转录组数据库分析,筛选出参与青蒿素合成途径相关转运蛋白,并且验证其功能,那么就可以利用基因工程手段提高转运蛋白的转运效率,从而提高青蒿中青蒿素的含量。AaPDR1是发明人从青蒿中克隆得到的一种ABC转运蛋白,属于青蒿PDR转运蛋白亚家族,因此是一种青蒿PDR亚家族转运蛋白,命名为AaPDR1。为了验证AaPDR1的功能,发明人利用酵母突变体AD12345678体外转运实验证明AaPDR1是青蒿素直接前体物质二氢青蒿酸的从胞内到胞外的外排转运蛋白。并且采用基因工程手段,将该AaPDR1转运蛋白反义干扰载体转化青蒿,可以显著抑制青蒿素的合成。因此,克隆AaPDR1基因及其外排功能的研究对于提高青蒿素含量和生产代谢产物的基因工程育种具有重要意义。经对现有技术文献的检索发现,尚未发现有与本发明的AaPDR1基因序列相关的报道。

[0005] 本发明提供一种青蒿PDR亚家族转运蛋白,所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有以下一种或者两种特征:

[0006] 1) 所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的氨基酸序列包括SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列;或者所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示;

[0007] 2) 所述青蒿PDR亚家族转运蛋白由在高严谨条件与编码氨基酸序列为SEQ ID NO:2所示的蛋白质的核酸的互补链杂交的核酸编码。

[0008] 进一步地,所述青蒿PDR亚家族转运蛋白由如SEQ ID NO:1所示的核酸编码。

[0009] 进一步地,所述青蒿PDR亚家族转运蛋白存在于植物青蒿(*Artemisia annua* L.)中,所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有转运二氢青蒿酸的功能。“高严谨条件”的核酸杂交一般是指本领域技术人员认可的低盐、高温条件下的核酸杂交,是本领域的公知常识。

[0010] 本发明实际上是提供了一种多肽或者一种蛋白质,该多肽或者蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0011] 本发明还提供如上所述的青蒿PDR亚家族转运蛋白的功能验证方法,包括以下步骤:

[0012] (1) 从青蒿cDNA文库中克隆到所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的核酸序列,如SEQ ID NO:1所示,即AaPDR1基因;

[0013] (2) 把AaPDR1基因可操作性地连接于酵母表达调控序列,形成含AaPDR1基因的酵母表达载体;

[0014] (3) 将含所述AaPDR1基因的酵母表达载体转入酵母菌AD12345678,得到转基因酵母菌,所述转基因酵母菌获得了二氢青蒿酸外排的功能,从而验证了所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有外排二氢青蒿酸的功能。

[0015] 本发明还提供验证如上所述的青蒿PDR亚家族转运蛋白功能的另一种方法,包括以下步骤:

[0016] (1) 从青蒿cDNA文库中克隆到所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的核酸序列,如SEQ ID NO:1所示,即AaPDR1基因;

[0017] (2) 把AaPDR1基因可操作性地连接于表达调控序列,形成含AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体;

[0018] (3) 将含所述AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体转化根癌农杆菌EH105,获得具有所述干扰表达载体的根癌农杆菌菌株;

[0019] (4) 利用所述步骤3构建的根癌农杆菌菌株转化青蒿,经卡那霉素筛选得到抗性苗,再经PCR检测为阳性的植株即为转基因青蒿;

[0020] (5) 对获得的所述转基因青蒿进行青蒿素、二氢青蒿酸和青蒿酸含量测定,进而获得青蒿素合成受抑制的青蒿植株,从而验证了所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有影响青蒿素合成的功能。

[0021] 进一步地,可以将上面两种验证方法合并,即包括以下步骤:

[0022] (1) 从青蒿cDNA文库中克隆到所述青蒿PDR亚家族转运蛋白的核酸序列,如SEQ ID NO:1所示,即AaPDR1基因;

[0023] (2) 把AaPDR1基因可操作性地连接于酵母表达调控序列,形成含AaPDR1基因的酵母表达载体;

[0024] (3) 将含所述AaPDR1基因的酵母表达载体转入酵母菌AD12345678,得到转基因酵母菌,所述转基因酵母菌获得了二氢青蒿酸外排的功能,从而验证了所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有外排二氢青蒿酸的功能;

[0025] (4) 把AaPDR1基因可操作性地连接于表达调控序列,形成含AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体;

[0026] (5) 将含所述AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体转化根癌农杆菌EH105,获得具有所述干扰表达载体的根癌农杆菌菌株;

[0027] (6) 利用所述步骤5构建的根癌农杆菌菌株转化青蒿,经卡那霉素筛选得到抗性苗,再经PCR检测为阳性的植株即为转基因青蒿;

[0028] (7) 对获得的所述转基因青蒿进行青蒿素、二氢青蒿酸和青蒿酸含量测定,进而获得青蒿素合成受抑制的青蒿植株,从而验证了所述青蒿PDR亚家族转运蛋白具有影响青蒿素合成的功能。

[0029] 优选地,采用引物AaPDR1-FP1(如SEQ ID NO:3所示):AAACCCTTTTTGCTTTCTAATTGATTCA和AaPDR1-RP1(如SEQ ID NO:4所示):TTATCTCTTCTGGAAATTAAGGA对进行AaPDR1基因克隆。

[0030] 优选地,将AaPDR1基因构建在酵母表达载体上,为了方便表达载体的构建,正向引物中引入了SpeI的酶切位点,反向引物中引入了PstI的酶切位点,引物为:Spe I-AaPDR1-FP(如SEQ ID NO:5所示):TATACCCAGCCTCGACTAGTATGGT GAGCAAGGGCGAGGA和AaPDR1-PstI-RP(如SEQ ID NO:6所示):CTTGATATCGAATTCCTGCAGTTATCTCTTCTGGAAATTA。

[0031] 优选地,将AaPDR1基因部分序列构建在植物反义表达载体上,为了方便表达载体的构建,正向引物中引入了BamHI的酶切位点,反向引物中引入了SacI的酶切位点,引物为:Anti-PDR1-SacI-FP(如SEQ ID NO:7所示):CGAGCTCATGGAAGGAAGTGATATACACAA和Anti-PDR1-BamHI-RP(如SEQ ID NO:8所示):CGGGATCCCCATTGTACGTCACCTTTCCAG。

[0032] 优选地,通过AaPDR1基因所在表达盒上游的35S启动子区域和AaPDR1分别设计正向引物(35SFP:GAAGATGCCTCTGCCGACAGTG,如SEQ ID NO:9所示)和反向引物(AaPDR1-BamHI-RP:CGGGATCCCCATTGTACGTCACCTTTCCAG,如SEQ ID NO:8所示)对转基因青蒿的AaPDR1基因进行检测。

[0033] 进一步地,上述转化根癌农杆菌EH105的具体方法是采用冻融法进行转化。

[0034] 进一步地,青蒿素含量采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)进行测定。

[0035] 本发明还保护含有如上所述的青蒿PDR亚家族转运蛋白的核酸序列的表达载体或宿主细胞。优选地,所述表达载体包括含AaPDR1基因的酵母表达载体;所述宿主细胞包括含AaPDR1基因的酵母表达载体的酵母菌AD12345678。

[0036] 本发明还保护如上所述的青蒿PDR亚家族转运蛋白在提高青蒿素含量的青蒿育种中的应用,或者在制备抗疟疾药物中的应用。进一步地,本发明涉及如上所述的青蒿PDR亚家族转运蛋白在酵母菌中参与二氢青蒿酸从胞内向胞外外排转运,其二氢青蒿酸外排功能在青蒿素合成途径和积累的应用。

[0037] 本发明提供了一种青蒿PDR亚家族转运蛋白,并以AaPDR1为例提供了其氨基酸序列(如SEQ ID NO:2所示)和核苷酸序列(如SEQ ID NO:1所示),同时验证了AaPDR1参与二氢

青蒿酸的从胞内向胞外转运。AaPDR1基因序列为发明人首次克隆,该蛋白的功能也是首次验证。

[0038] AaPDR1在叶片发育初期及不同组织部位中的表达谱与青蒿素合成途径中分泌型腺毛特异性表达的基因ADS、CYP71AV1、DBR2和ALDH1的表达谱基本一致,说明AaPDR1很可能参与青蒿素合成。其启动子融合GUS转青蒿证明AaPDR1为青蒿分泌型腺毛特异表达转运蛋白;烟草和酵母亚细胞定位证明AaPDR1定位于细胞膜上。酵母突变体AD12345678体外转运实验证明,AaPDR1转运蛋白对二氢青蒿酸具有外排功能(图1)。利用转基因技术将青蒿AaPDR1转运蛋白反义干扰载体转化青蒿,可以显著抑制青蒿素合成。克隆AaPDR1基因及其外排功能的研究对于提高青蒿素含量和生产代谢产物的基因工程育种具有重要意义。

附图说明

[0039] 图1是相同时间不同浓度下三种酵母AD12345678转化株体内分别的二氢青蒿酸的含量柱状图。

[0040] 图2是不同时间相同浓度下两种酵母AD12345678转化株体内分别的二氢青蒿酸的含量柱状图。

[0041] 图3是AaPDR1反义干扰转基因植株AaPDR1基因表达量的柱状图。

[0042] 图4是AaPDR1反义干扰转基因植株青蒿素含量的柱状图。

[0043] 图5是AaPDR1反义干扰转基因植株二氢青蒿酸含量的柱状图。

[0044] 图6是AaPDR1反义干扰转基因植株青蒿酸含量的柱状图。

具体实施方式

[0045] 下面结合实施例对本发明的技术内容做进一步的说明:下述实施例是说明性的,不是限定性的,不能以下述实施例来限定本发明的保护范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等分子克隆:实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0046] 本发明中所涉及的农杆菌为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株EH105,该菌株可以从市场上公开购买(来源于澳大利亚CAMBIA公司,菌株编号为Gambar 1)。本发明中所涉及的酵母突变体AD12345678是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)改造的突变株,基因型为MAT α ,PDR1-3,ura3,his1, Δ yor1::hisG, Δ snq2::hisG, Δ pdr5::hisG, Δ pdr10::hisG, Δ pdr11::hisG, Δ ycf1::hisG, Δ pdr3::hisG, Δ pdr15::hisG,用于验证转运蛋白的功能。对AD12345678的报道可见1998年Anabelle Decottignies等人发表的文章(ATPase and Multidrug Transport Activities of the Overexpressed Yeast ABC Protein Yor1p.The Journal of Biological Chemistry,1998,Vol.273,No.20:12612-22)。该菌株是现有技术中可以获得的菌株。本发明省略了对该菌株的构建,而是直接获赠于奥塔哥大学Masakazu Niimi教授和天主教鲁汶大学AndréGoffeau教授。该菌株的另一个编号名称是MGY260。

[0047] 本发明通过对青蒿分泌型腺毛转录组数据分析,从青蒿中克隆AaPDR1基因,构建含AaPDR1基因的酵母表达载体,转入酵母突变体AD12345678,验证酵母体外外排二氢青蒿

酸的功能。构建含AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体,用根癌农杆菌EH105介导,采用叶盘法将AaPDR1基因干扰表达载体转化青蒿;PCR检测外源目的基因AaPDR1的整合情况,通过HPLC-ELSD测定青蒿中青蒿素含量,表明获得转基因青蒿的青蒿素含量也显著被抑制。

[0048] 在本发明中,可选用本领域已知的各种载体,如市售的载体,包括质粒,粘粒等。在生产本发明的青蒿AaPDR1蛋白多肽时,可以将青蒿AaPDR1蛋白编码序列可操作地连于表达调控序列,从而形成青蒿AaPDR1蛋白表达载体。

[0049] 如本文所用,“可操作地连于”指这样一种状况,即线性DNA序列的某些部分能够影响同一线性DNA序列其他部分的活性。例如,如果信号肽DNA作为前体表达并参与多肽的分泌,那么信号肽(分泌前导序列)DNA就是可操作地连于多肽DNA;如果启动子控制序列的转录,那么它是可操作地连于编码序列;如果核糖体结合位点被置于能使其翻译的位置时,那么它是可操作地连于编码序列。一般,“可操作地连于”意味着相邻,而对于分泌前导序列则意味着在阅读框中相邻。

[0050] 实施例1、青蒿AaPDR1基因的克隆

[0051] 1. 青蒿基因组总RNA的提取

[0052] 取青蒿叶片组织,置于液氮中研碎,加入盛有裂解液的1.5mL Eppendorf (EP) 离心管中,充分振荡后,按照TIANGEN试剂盒的说明书抽提总RNA。用琼脂糖胶电泳鉴定总RNA质量,然后在分光光度计上测定RNA含量。

[0053] 2. 青蒿AaPDR1基因的克隆

[0054] 以所提取的总RNA为模板,在PowerScript反转录酶的作用下合成cDNA;根据AaPDR1基因的序列设计基因特异性引物,通过PCR从总cDNA中扩增AaPDR1基因,并测序。发明人对青蒿完成的全基因组测序和转录组测序,AaPDR1基因的序列来自发明人实验室的数据库。

[0055] 通过上述步骤,获得了青蒿中该转录蛋白的全长4278bp,编码序列(SEQ ID NO:1)并推导出其蛋白编码序列(SEQ ID NO:2),其中,起始密码子为ATG,终止密码子为TAA。

[0056] 表1 PCR引物

[0057]

引物名称	引物序列(5' →3')
AaPDR1-FP1	AAACCCTTTTTGCTTTCTAATTGATTCA
AaPDR1-RP1	TTATCTCTCTGGAAATTAAAGGA

[0058] 表2 PCR的反应体系

[0059]

青蒿cDNA	1μL
10×KOD Plus Buffer	5μL
dNTP	5μL
MgSO ₄	2μL
AaPDR1-FP1	1μL
AaPDR1-RP1	1μL
KOD Plus	1μL
ddH ₂ O	34μL

总体积	50 μ L
-----	------------

[0060] 实施例2、含AaPDR1基因的酵母表达载体的构建

[0061] 将AaPDR1基因构建在酵母表达载体上,为了方便表达载体的构建,正向引物中引入了SpeI的酶切位点,反向引物中引入了PstI的酶切位点,引物如表3所示;

[0062] 表3 AaPDR1-PDR196载体构建的PCR引物

引物名称	引物序列 (5'→3')
[0063] Spe I-AaPDR1-FP	TATACCCAGCCTCGACTAGTATGGTGAGC AAGGGCGAGGA
AaPDR1-PstI-RP	CTTGATATCGAATTCCTGCAGTTATCTCTTC TGGAAATTAA

[0064] 实施例3、AaPDR1转运蛋白酵母突变体AD12345678转运实验

[0065] 1、酵母AD12345678转化

[0066] 1.1感受态制备

[0067] -70℃取出AD12345678菌株在YPD培养基上划线,28℃培养三天,挑取生长较快的克隆于10mL的YPD液体培养基中能中过夜培养(28℃,220rpm),第二天测OD600后将菌液稀释至浓度为0.4,继续摇菌2-4h,室温2500rpm离心10min,去上清,然后用40mL 1×TE(或灭菌水)悬浮,再室温2500rpm离心10min,小心去上清,用2mL 1×LiAc/0.5×TE悬浮,室温放置10min,即为酵母感受态细胞。

[0068] 1.2酵母转化

[0069] 将1.5 μ L质粒加入无菌的1.5mL离心管中,再加入10 μ L 10mg/mL的鲑鱼精DNA(鲑鱼精DNA需100℃煮沸5min,再放在冰上冷却备用),100 μ L感受态,轻轻混匀后,加入700 μ L 1×LiAc/40%PEG3350/1×TE,震荡混匀后放在30℃金属水浴锅30min,期间颠倒3次。然后加入88 μ L DMSO,42℃,热击7min,转化后的菌13200rpm离心15s,吸掉上清后加入1mL 1×TE悬浮菌,然后再离心,弃上清后加入100 μ L的1×TE,悬浮菌后全部涂板。

[0070] 2、二氢青蒿酸体外转运实验

[0071] 从在30℃培养箱中培养三天的平板上挑取较大的斑于50mL U缺SD液体培养基中过夜培养(28℃,180rpm)至OD600=1.0,然后离心用50mL含有二氢青蒿酸的U缺SD液体培养基悬浮,继续培养(28℃,180rpm)。培养0.5h,1.5h,3h,4.5h和6h取样,离心用蒸馏水洗两次,加入甲醇超声提取,HPLC测定酵母菌体内各时间样品二氢青蒿酸的含量。

[0072] 实施例4、含AaPDR1基因的植物反义干扰表达载体的构建

[0073] 将AaPDR1基因部分序列构建在植物反义表达载体上,为了方便表达载体的构建,正向引物中引入了BamHI的酶切位点,反向引物中引入了SacI的酶切位点,引物如表4所示;

[0074] 表4 pCAMBIA2300-anti-AaPDR1体构建的PCR引物

[0075]

引物名称	引物序列 (5'→3')
Anti-PDR1-SacI-FP	CGAGCTCATGGAAGGAAGTGATATACACAA
Anti-PDR1-BamHI-RP	CGGGATCCCCATTGTACGTCACCTTTCCAG

[0076] 实施例5、根癌农杆菌介导的AaPDR1反义干扰载体遗传转化青蒿获得转基因青蒿

植株

[0077] 1. 含AaPDR1反义干扰表达载体的根癌农杆菌工程菌的获得

[0078] 将实施例4中含AaPDR1的植物反义干扰表达载体采用冻融法转入根癌农杆菌(如EHA105,为市场有公开出售的生物材料,可以从澳大利亚CAMBIA公司购得,菌株编号为Gambar 1),并进行PCR验证。结果表明,含AaPDR1的植物反义干扰表达载体已成功构建到根癌农杆菌菌株中。

[0079] 2. 根癌农杆菌介导AaPDR1基因转化青蒿

[0080] 2.1. 外植体的预培养

[0081] 青蒿种子用75%乙醇浸泡1min,再用20%NaClO浸泡20min,无菌水冲洗3-4次,用无菌吸水纸吸干表面水分,接种于无激素的MS(Murashige and Skoog,1962)固体培养基中,25℃、16h/8h(light/dark)光照培养,即可获得青蒿无菌苗。待苗长至5cm左右后,剪取无菌苗叶片外植体用于转化。

[0082] 2.2. 农杆菌与外植体的共培养

[0083] 将所述的叶片外植体,转到共培养培养基(1/2MS+AS 100μmol/L)中,滴加含活化好的所述含AaPDR1植物反义干扰表达载体的根癌农杆菌工程菌的1/2MS悬液,使外植体与菌液充分接触,28℃暗培养3d。以滴加在不带有目的基因的根癌农杆菌的1/2MS液体培养基悬液的叶片外植体为对照。

[0084] 2.3. 抗性再生植株的筛选

[0085] 将所述的共培养3d的青蒿外植体转入到发芽筛选培养基(MS+6-BA 0.5mg/L+NAA 0.05mg/L+Kan50mg/L+Cb 500mg/L)上于25℃、16h/8h光照培养,每两周继代培养一次,经过2-3次继代后即可获得Kan抗性丛生芽。将生长良好的抗性丛生芽剪下转入生根培养基(1/2MS+Cb 125mg/L)上培养至生根,从而获得Kan抗性再生青蒿植株。

[0086] 3. 转基因青蒿植株的PCR检测

[0087] 根据目的基因所在表达盒上游的35S启动子区域和AaPDR1分别设计正向引物(35SFP:GAAGATGCCTCTGCCGACAGTG)和反向引物(AaPDR1-BamHI-RP:CGGGATCCCCATTGTACGTCACCTTCCAG)对目的基因进行检测。结果表明,利用所设计的PCR特异引物,能扩增出特异DNA片段。而以非转化青蒿基因组DNA为模板时,没有扩增出任何片段。

[0088] 本实施例将所述的植物表达载体转化根癌农杆菌,获得用于转化青蒿的含AaPDR1植物反义干扰表达载体的根癌农杆菌菌株,利用所构建的根癌农杆菌菌株转化青蒿,获得经PCR检测的转基因青蒿植株。

[0089] 实施例6、利用HPLC测定转基因青蒿和转基因酵母中青蒿素和二氢青蒿酸含量

[0090] 1. HPLC条件及系统适用性以及标准溶液的配制

[0091] HPLC:采用water alliance 2695系统,使用Waters C18柱,青蒿素测定流动相使用甲醇:水体积比60%:40%,二氢青蒿酸测定流动相适用乙腈:0.1%冰醋酸(pH 3.2)体积比60%:40%;流速为1.0mL/min;ELSD检测系统为wateralliance 2420,蒸发光散射检测器漂移管温度为40℃,载气压力5bar;青蒿素出峰时间为7min左右,二氢青蒿酸出峰时间为13min左右。青蒿素进样体积为20uL,二氢青蒿酸进样体积为40uL。根据标准品的浓度和峰面积计算出样品中的青蒿素及二氢青蒿酸含量,再除以青蒿粉末干重,从而计算出青蒿素

和二氢青蒿酸占样品干重的含量。精密称取青蒿素标准品 (Sigma公司) 2.0mg用1mL甲醇完全溶解,得到2mg/mL青蒿素标准品溶液,保存于-20℃备用。

[0092] 2. 样品的制备

[0093] 在青蒿植株的上,中和下部共取新鲜的青蒿叶片,于45℃烘箱中烘至恒重。然后从烘干的枝条上敲下叶片,磨成粉末。称取约0.1g干粉于2mL Eppendorf管中,加入2mL乙醇,用40W超声波处理30min,5000rpm离心10min,取上清用0.22μm滤膜过滤,即可用于HPLC测定。

[0094] 对于二氢青蒿酸处理的转基因酵母菌二氢青蒿酸测定,结果如图1-2所示,10μM二氢青蒿酸添加到酵母培养基中,培养6个小时后,结果表明,转AaPDR1基因的酵母(图中表示为PDR196-PDR1)体内二氢青蒿酸含量小于5nmol(每克酵母鲜重),而对照组酵母(图中表示为PDR196)体内二氢青蒿酸含量接近于8nmol(每克酵母鲜重),这说明AaPDR1转运蛋白对于二氢青蒿酸具有外排功能。图1中,不同浓度(5μM,10μM和25μM)二氢青蒿酸添加到酵母培养基中,培养相同时间(6个小时)HPLC测定酵母体内二氢青蒿酸的含量,PDR196-PDR1是酵母AD12345678转PDR196-PDR1载体的转化株,PDR196-△PDR1是酵母AD12345678转PDR196-△PDR1载体(△PDR1是指去掉PDR1的ATP区域的结构域)的转化株,PDR196是指酵母AD12345678转PDR196空载体的转化株。图2中,10μM二氢青蒿酸添加到酵母培养基中,培养一段时间后HPLC测定酵母体内二氢青蒿酸的含量,PDR196-PDR1是酵母AD12345678转PDR196-PDR1载体的转化株,PDR196是指酵母AD12345678转PDR196空载体的转化株。

[0095] 本发明获得的转基因青蒿中的青蒿素含量与对照相比降低了80%,结果如图3-6所示,青蒿素的合成明显受到抑制,由此可见,AaPDR1基因的表达抑制影响了青蒿中二氢青蒿酸的转运,从而降低了青蒿素的含量。图中,CK表示对照组,AaPDR1-anti-1、3、10表示转基因基因青蒿的不同株系。

[0096] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

序列表

<110>	上海交通大学	
<120>	一种青蒿 PDR 亚家族转运蛋白及其功能验证方法和应用	
<130>	01335-16029PIX	
<160>	9	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	4278	
<212>	DNA	
<213>	青蒿 (Artemisia annua L.)	
[0001]	<400> 1	
	atggaaggaa gtgatafaca caaagcaagt actagtagta ttaggttagg gaggtaagg	60
	gcaagcagtg gaccggcaag aagtattcga gctgcaagta cctcgtatg gagaaattca	120
	ggtatggatg tgtttcaaa atcatcccgt gaagaaaatg acgaagaagc tcttaaatgg	180
	gctgctcttg agaagctgcc aacgtttgat cgttataaaa agggactttt gtttggatca	240
	accggacctt ctaatgaagt tgatattgat aatcttggag accaagaccg caaacgattg	300
	gttgataggc ttgcaatgc cgcagatgaa gataatgaga agttcttgtt aaagctaaga	360
	aatagaattg atagggttg gattgattg ccaacaattg aagtcaaatt tgagcatttg	420
	actgttgagg cagatgtaa tacaggaagc agagctttgc ccagtttct caatttctac	480
	cttggtttt ttgagggtat ctggaacatt ttccatttgc ttccgaataa gaaaaagcat	540

	ataaccatcc ttgatgatgt tagcggcata gtcaaaccgg gcaaaatgac attgcttttg	600
	ggctctccaa gttcggggaa aacaacgctg ttattggcat tggcagatgg tcttgctaag	660
	gagcttcaga aatctggaaa ggtgacgtac aatgggcatg agttacatga gttgtacca	720
	aagaaaactt ctgcttatat cagtcaaaat gatgttcata ttggggaaat gaccgttcgg	780
	gaaactttgg ctttctctgc ccgatgccaa ggggttgat cacgttatga gatgctggct	840
	gagttgcaa gaagagagaa aaatgcaaac attaagcctg atcctgatat tgatgtctac	900
	atgaaggctg ctgcttcaga aggtcaagaa gctagtgttg tcacagatta tacactaaag	960
	atattggggt tagacgtgtg tgcagacacc ttgtagggg atcgcgatgat aagaggata	1020
[0002]	tctggcgggc aaaaaaacg tgttacaaca ggggaaatga tagttggacc atcaaaggtt	1080
	cttctcatgg acgagatatac tacgggttta gatagtctca ccacattcca aattgtgaat	1140
	tcatttaage aatatgttca tattcttgaa gggacagtaa tgatatctct tctccagcct	1200
	gcaccagaaa catataattt atttgatgaa atttactcc tgagtgatgg caaaattgct	1260
	tatgagggtc cacgcgaaaa tgtgctcgag tttttgaat ctatgggatt taaatgceca	1320
	gagaggaaag gagttgcaga cttcttgcga gaagtacat caaagaaaga tcaaaaacaa	1380
	tattggatga gaacagatga accgtacaga tttgtgacct ccaaggaatt tgccaaggcg	1440
	tacgaatcat tcatgttg aagaaaaatt gcaagcgaag ttgcaacacc gtagacaaa	1500
	agcaaaagcc acccagctgc acttacaac accaagtacg gtttaggcaa gagggagctc	1560

	ttgaaagcct gcatggatag agaaactg ctcatgaaga gaaattcatt cgtttacttc	1620
	ttcaaattat ttcaattaac tttcatgggg acagttgcta tgactgtatt tttccgaact	1680
	aagatgcata gacgtgggat tgaagaagga ggactatatg ttggtgcttt gttctttggt	1740
	gtcaccatga tcatgttcaa tgggatggct gagatttcaa tgacaatctc aaagettcct	1800
	gtttctata agcaacggga tttctgttt tttcctcgt ggggtgatgc tttccatct	1860
	tggtttgca agattcctgt ttcgtttgt gaagccgcac ttggacagt tctaacttac	1920
	catgttatgg gatttgacce caatattgg agatttctca aacattttt tctactcatg	1980
	accgttcacc agatgtctc agcattatc agattcattg gggctgcagg tcgcaacatg	2040
	attattgca acacgtttg tcattttca ctcttatac tctttgatt ggggtgattc	2100
[0003]	gtcttagtgc gagaggatgt aaaaaagtg tggattggg gatactggat ctgccaatg	2160
	atgtatgca tgaacggaat tgtgtaaat gaatatctg gtcacaagt taaaaagcct	2220
	ttccaagact caactggg acgagtaata gtaaactc gaggattgt cgcagaaagt	2280
	tactgttatt ggatttctat cgctgcttg ctgggttta tgtactcta caatcttgt	2340
	tatgcattgt ctctccagtt tctcgaccg ttctcgaaag ctcaagcaac tgtagaagac	2400
	aatgatgaat catcgtctac acaaatgaa ggaaatgaaa acacgaagag aggaatggta	2460
	cttccctcg aaccacatc cattacatt gatgatata agtactcggg tgatatgcca	2520
	caggaaatga aagaccaagg tattactgaa gacagattg tttactta gaatttaagt	2580
	ggagctttcc gacctggcgt acttacagcg ctatggggg ttagtggtgc gggtaaaact	2640

	actttgatgg atgtgcttgc aggtagaaaa actggtggac tcatagaagg tgatgttcgg	2700
	atctcggggt atccaaagaa acaagaaaca ttgctcggga tttctggata ttgtgaacaa	2760
	aatgacatcc attctcctca tgttactgtt tatgaatcct tgatatactc tgcgtggcta	2820
	aggttgccag gagatgftaa tgaagacact agaaagatgt ttggtgatca ggtgatggac	2880
	cttggtgaac taaacccggt aaaaaatgct ctatgtagct tgccaggtgt caatggactc	2940
	tcaactgaac agcgaaagag gftaacata gctgttgagc ttgtggctaa tccatctata	3000
	atatttatgg atgagccaac atcaggacta gatgctagag cggctgcaat tgtgatgaga	3060
	actgttagga acacagtga cacaggaaga acagttgtgt gcaccattca tcaacctage	3120
[0004]	attgacatat ttgaagcttt tgatgagttg ttcttgatga aaagaggagg acgagagata	3180
	tacgttggac ctgttgaca tgaatcttgc gaactgatca agtactttga ggatatcgaa	3240
	ggggtgagta agattacaaa tggatataac cctgccacat ggatgttga agtaagtact	3300
	gcatcacaag aagtggcttt gggagtcgat ttactgaaa ttacaagaa ttcagaactt	3360
	tatgcgagaa acaaagcact tattgccgaa ctaagccaac cacgacctgg ttcaaatgat	3420
	cttcatttcg caactcaata ctgacgtcc ttcttcatcc aatgttgggt atgtttatgg	3480
	aaacaacgac agtcatattg gagaaccct cttatactg ctgttcgttt cacattcacc	3540
	actttcatcg caatcatggt tggaactatt ttctgggatc ttggtggtaa aagggaacaa	3600
	gtgcaggatc taagtaatgc aatgggttct ctatacagct cegtctctt cataggggtc	3660

Ser Thr Ser Leu Trp Arg Asn Ser Gly Met Asp Val Phe Ser Lys Ser
 35 40 45

Ser Arg Glu Glu Asn Asp Glu Glu Ala Leu Lys Trp Ala Ala Leu Glu
 50 55 60

Lys Leu Pro Thr Phe Asp Arg Leu Lys Lys Gly Leu Leu Phe Gly Ser
 65 70 75 80

Thr Gly Pro Ser Asn Glu Val Asp Ile Asp Asn Leu Gly Asp Gln Asp
 85 90 95

Arg Lys Arg Leu Val Asp Arg Leu Val Asn Ala Ala Asp Glu Asp Asn
 100 105 110

Glu Lys Phe Leu Leu Lys Leu Arg Asn Arg Ile Asp Arg Val Gly Ile
 115 120 125

[0006]

Asp Leu Pro Thr Ile Glu Val Lys Phe Glu His Leu Thr Val Glu Ala
 130 135 140

Asp Val Asn Thr Gly Ser Arg Ala Leu Pro Ser Phe Leu Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Leu Gly Phe Phe Glu Gly Ile Leu Asn Ile Phe His Leu Leu Pro Asn
 165 170 175

Lys Lys Lys His Ile Thr Ile Leu Asp Asp Val Ser Gly Ile Val Lys
 180 185 190

Pro Gly Lys Met Thr Leu Leu Leu Gly Pro Pro Ser Ser Gly Lys Thr
 195 200 205

Thr Leu Leu Leu Ala Leu Ala Asp Gly Leu Ala Lys Glu Leu Gln Lys

Ala Pro Glu Thr Tyr Asn Leu Phe Asp Glu Ile Leu Leu Leu Ser Asp
405 410 415

Gly Lys Ile Val Tyr Glu Gly Pro Arg Glu Asn Val Leu Glu Phe Phe
420 425 430

Glu Ser Met Gly Phe Lys Cys Pro Glu Arg Lys Gly Val Ala Asp Phe
435 440 445

Leu Gln Glu Val Thr Ser Lys Lys Asp Gln Lys Gln Tyr Trp Met Arg
450 455 460

Thr Asp Glu Pro Tyr Arg Phe Val Thr Ser Lys Glu Phe Ala Lys Ala
465 470 475 480

Tyr Glu Ser Phe His Val Gly Arg Lys Ile Ala Ser Glu Val Ala Thr
485 490 495

[0008]

Pro Tyr Asp Lys Ser Lys Ser His Pro Ala Ala Leu Thr Asn Thr Lys
500 505 510

Tyr Gly Leu Gly Lys Arg Glu Leu Leu Lys Ala Cys Met Asp Arg Glu
515 520 525

Ile Leu Leu Met Lys Arg Asn Ser Phe Val Tyr Phe Phe Lys Leu Phe
530 535 540

Gln Leu Thr Phe Met Gly Thr Val Ala Met Thr Val Phe Phe Arg Thr
545 550 555 560

Lys Met His Arg Arg Gly Ile Glu Glu Gly Gly Leu Tyr Val Gly Ala
565 570 575

Leu Phe Phe Gly Val Thr Met Ile Met Phe Asn Gly Met Ala Glu Ile
580 585 590

Ser Met Thr Ile Ser Lys Leu Pro Val Phe Tyr Lys Gln Arg Asp Phe
 595 600 605

Leu Phe Phe Pro Ser Trp Val Tyr Ala Leu Pro Ser Trp Phe Val Lys
 610 615 620

Ile Pro Val Ser Phe Val Glu Ala Ala Leu Trp Thr Val Leu Thr Tyr
 625 630 635 640

His Val Met Gly Phe Asp Pro Asn Ile Trp Arg Phe Leu Lys His Phe
 645 650 655

Phe Leu Leu Met Thr Val His Gln Met Ser Ser Ala Leu Phe Arg Phe
 660 665 670

Ile Gly Ala Ala Gly Arg Asn Met Ile Ile Ala Asn Thr Phe Gly Ser
 675 680 685

[0009]

Phe Ser Leu Leu Ile Leu Phe Ala Leu Gly Gly Phe Val Leu Val Arg
 690 695 700

Glu Asp Val Lys Lys Trp Trp Ile Trp Gly Tyr Trp Ile Ser Pro Met
 705 710 715 720

Met Tyr Ala Met Asn Gly Ile Val Val Asn Glu Tyr Leu Gly His Lys
 725 730 735

Phe Lys Lys Pro Phe Gln Asp Ser Thr Leu Gly Arg Val Ile Val Lys
 740 745 750

Ser Arg Gly Leu Phe Ala Glu Ser Tyr Trp Tyr Trp Ile Ser Ile Ala
 755 760 765

Ala Leu Leu Gly Phe Met Leu Leu Tyr Asn Leu Cys Tyr Ala Leu Ser

770	775	780														
Leu	Gln	Phe	Leu	Asp	Pro	Phe	Ser	Lys	Ala	Gln	Ala	Thr	Val	Glu	Asp	
785					790					795					800	
Asn	Asp	Glu	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Asn	Glu	Gly	Asn	Glu	Asn	Thr	Lys	
			805						810					815		
Arg	Gly	Met	Val	Leu	Pro	Phe	Glu	Pro	His	Ser	Ile	Thr	Phe	Asp	Asp	
			820					825						830		
Ile	Lys	Tyr	Ser	Val	Asp	Met	Pro	Gln	Glu	Met	Lys	Asp	Gln	Gly	Ile	
		835					840						845			
Thr	Glu	Asp	Arg	Leu	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Leu	Ser	Gly	Ala	Phe	Arg	
	850					855						860				
[0010]	Pro	Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Met	Gly	Val	Ser	Gly	Ala	Gly	Lys	Thr
	865					870					875					880
Thr	Leu	Met	Asp	Val	Leu	Ala	Gly	Arg	Lys	Thr	Gly	Gly	Leu	Ile	Glu	
				885					890						895	
Gly	Asp	Val	Arg	Ile	Ser	Gly	Tyr	Pro	Lys	Lys	Gln	Glu	Thr	Phe	Ala	
			900					905						910		
Arg	Ile	Ser	Gly	Tyr	Cys	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	His	Ser	Pro	His	Val	
		915					920						925			
Thr	Val	Tyr	Glu	Ser	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Trp	Leu	Arg	Leu	Pro	Gly	
	930					935						940				
Asp	Val	Asn	Glu	Asp	Thr	Arg	Lys	Met	Phe	Val	Asp	Gln	Val	Met	Asp	
945					950						955				960	

Leu Val Glu Leu Asn Pro Leu Lys Asn Ala Leu Val Gly Leu Pro Gly
 965 970 975

Val Asn Gly Leu Ser Thr Glu Gln Arg Lys Arg Leu Thr Ile Ala Val
 980 985 990

Glu Leu Val Ala Asn Pro Ser Ile Ile Phe Met Asp Glu Pro Thr Ser
 995 1000 1005

Gly Leu Asp Ala Arg Ala Ala Ala Ile Val Met Arg Thr Val Arg
 1010 1015 1020

Asn Thr Val Asp Thr Gly Arg Thr Val Val Cys Thr Ile His Gln
 1025 1030 1035

Pro Ser Ile Asp Ile Phe Glu Ala Phe Asp Glu Leu Phe Leu Met
 1040 1045 1050

[0011]

Lys Arg Gly Gly Arg Glu Ile Tyr Val Gly Pro Val Gly His Glu
 1055 1060 1065

Ser Cys Glu Leu Ile Lys Tyr Phe Glu Asp Ile Glu Gly Val Ser
 1070 1075 1080

Lys Ile Thr Asn Gly Tyr Asn Pro Ala Thr Trp Met Leu Glu Val
 1085 1090 1095

Ser Thr Ala Ser Gln Glu Val Ala Leu Gly Val Asp Phe Thr Glu
 1100 1105 1110

Ile Tyr Lys Asn Ser Glu Leu Tyr Ala Arg Asn Lys Ala Leu Ile
 1115 1120 1125

Ala Glu Leu Ser Gln Pro Arg Pro Gly Ser Asn Asp Leu His Phe
 1130 1135 1140

	Ala Thr	Gln Tyr	Ser Thr	Ser	Phe Phe	Ile Gln	Cys	Trp Val	Cys				
	1145				1150		1155						
	Leu Trp	Lys Gln	Arg Gln	Ser	Tyr Trp	Arg Asn	Pro	Pro Tyr	Thr				
	1160				1165		1170						
	Ala Val	Arg Phe	Thr Phe	Thr	Thr Phe	Ile Ala	Ile	Met Phe	Gly				
	1175				1180		1185						
	Thr Ile	Phe Trp	Asp Leu	Gly	Gly Lys	Arg Glu	Gln	Val Gln	Asp				
	1190				1195		1200						
	Leu Ser	Asn Ala	Met Gly	Ser	Leu Tyr	Thr Ser	Val	Leu Phe	Ile				
	1205				1210		1215						
	Gly Val	Gln Asn	Ala Ser	Ala	Val Gln	Pro Val	Val	Asp Ile	Glu				
[0012]	1220				1225		1230						
	Arg Thr	Val Phe	Tyr Arg	Glu	Arg Ala	Ala Gly	Met	Tyr Ser	Ala				
	1235				1240		1245						
	Leu Pro	Tyr Ala	Phe Ala	Gln	Val Leu	Val Glu	Ile	Pro Tyr	Val				
	1250				1255		1260						
	Leu Ala	Gln Ala	Ala Ala	Tyr	Gly Val	Ile Val	Tyr	Ala Met	Ile				
	1265				1270		1275						
	Gly Phe	Asp Trp	Thr Ala	Ala	Lys Phe	Phe Trp	Phe	Phe Phe	Phe				
	1280				1285		1290						
	Met Phe	Cys Ser	Leu Leu	Tyr	Met Thr	Phe Tyr	Gly	Met Met	Thr				
	1295				1300		1305						
	Val Ala	Val Ser	Pro Asn	Ala	Asn Val	Ala Ala	Ile	Ile Ala	Ala				

	1310		1315		1320
	Ala Phe Tyr Ser Leu Trp Asn		Leu Phe Ser Gly Phe Ile Ile Pro		
	1325		1330		1335
	Arg Pro Lys Ile Pro Ile Trp		Trp Arg Trp Tyr Tyr Trp Ala Asn		
	1340		1345		1350
	Pro Ile Ala Trp Thr Leu Tyr		Gly Leu Ile Val Ser Gln Phe Gly		
	1355		1360		1365
	Asp Phe Glu Asp Val Leu Ser		Ser Gly Glu Thr Val Lys Gly Tyr		
	1370		1375		1380
	Leu Arg Arg Tyr Phe Gly Phe		Lys His Asn Phe Leu Gly Ala Ile		
	1385		1390		1395
[0013]	Ala Gly Val His Val Gly Phe		Val Ile Leu Phe Ala Phe Ile Phe		
	1400		1405		1410
	Ala Leu Cys Ile Lys Ser Phe		Asn Phe Gln Lys Arg		
	1415		1420		1425

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

aaaccctttt tgctttctaa ttgattca

28

<210> 4

<211> 24

[0014]

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

ttatctcttc tggaaattaa agga

24

<210> 5

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

tataccccag cctcgactag tatggtgagc aagggcgagg a

41

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

cttgatateg aattcctgca gttatctctt ctggaaatta a

41

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

cgagctcatg gaaggaagtg atatacacia

30

<210> 8

[0015]

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

cgggatcccc attgtacgtc acctttccag

30

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

gaagatgcct ctgccgacag tg

22

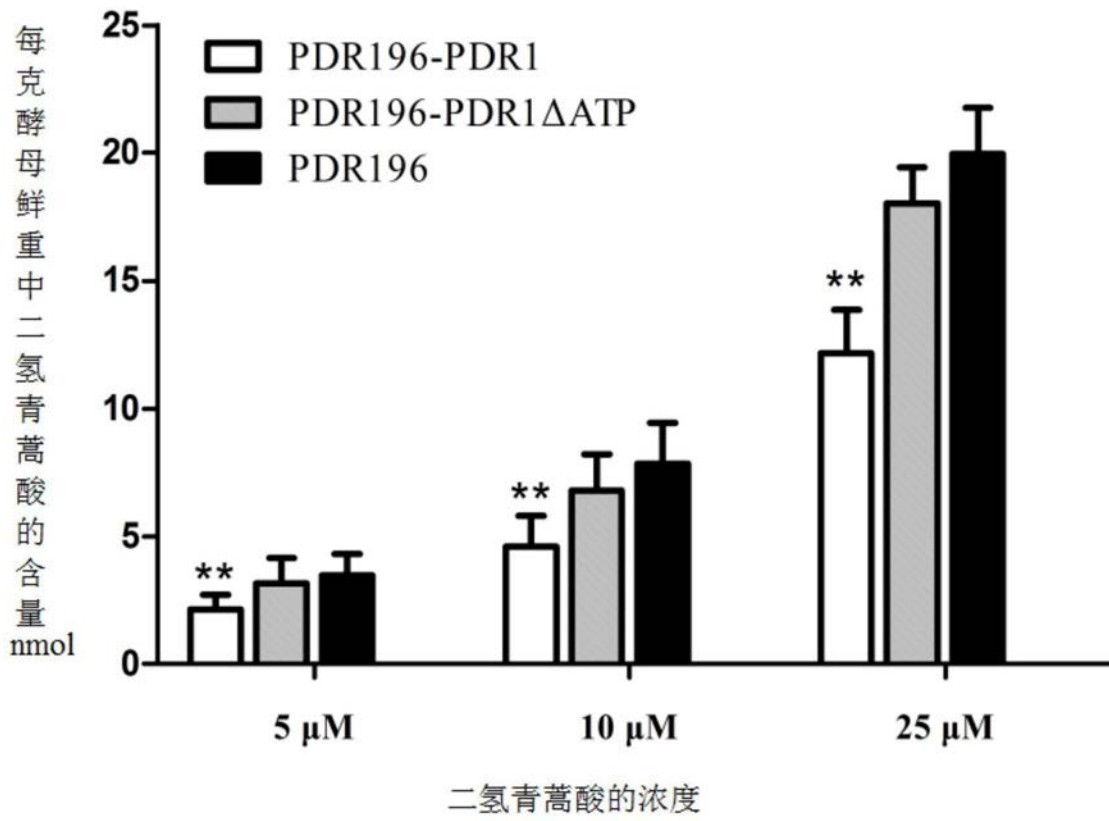


图1

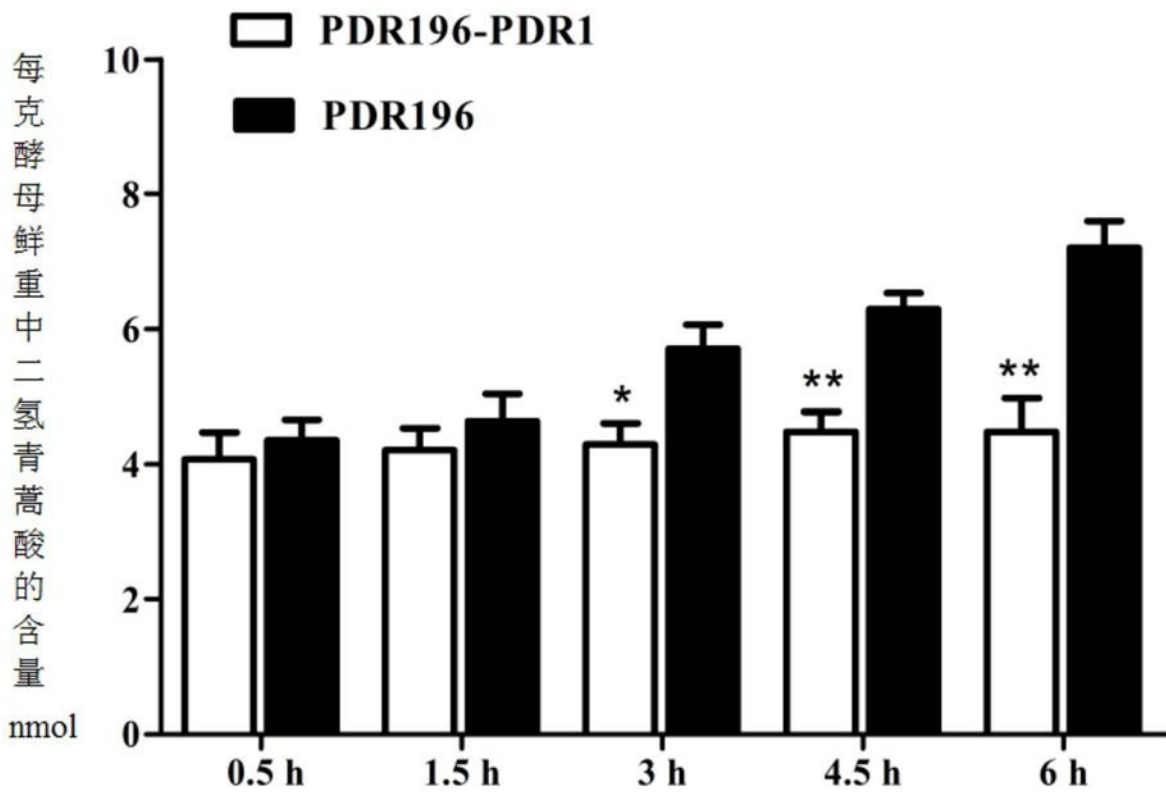


图2

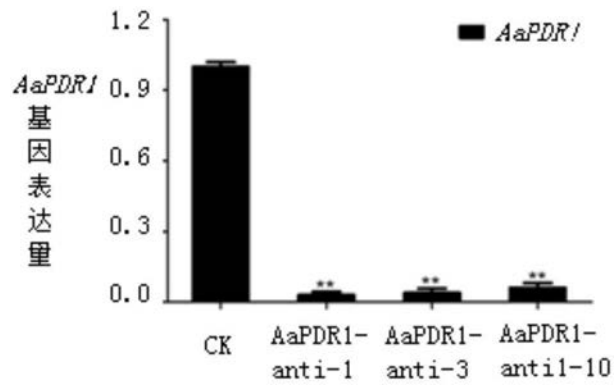


图3

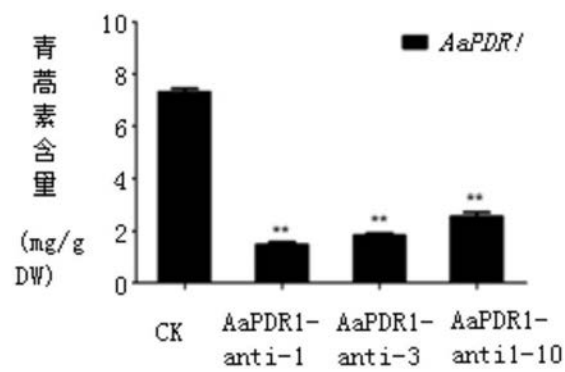


图4

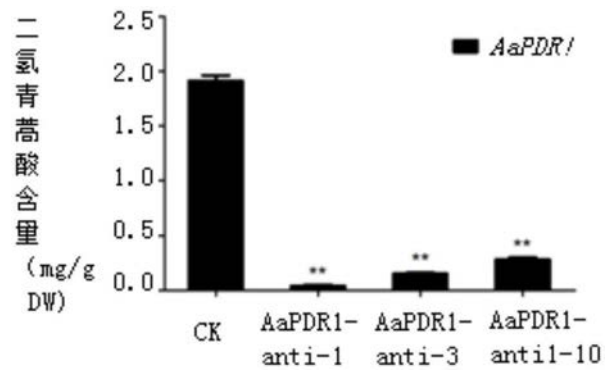


图5

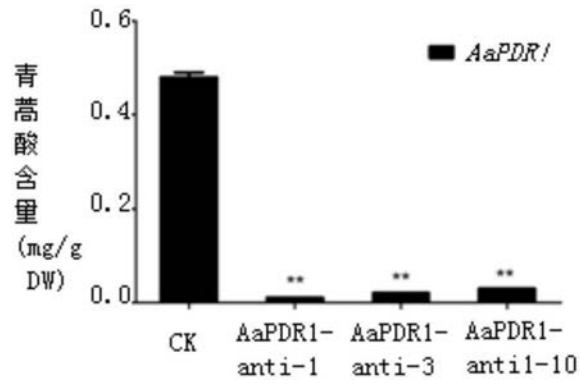


图6