



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107759676 B

(45)授权公告日 2019.12.17

(21)申请号 201711204587.8

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2017.11.27

C12N 15/82(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A01H 5/00(2018.01)

申请公布号 CN 107759676 A

A01H 5/10(2018.01)

A01H 6/46(2018.01)

(43)申请公布日 2018.03.06

(73)专利权人 南京农业大学

(56)对比文件

CN 106432447 A,2017.02.22,

地址 211225 江苏省南京市溧水区白马镇
国家农业科技园南京农业大学基地

Zeng D.Du1, encoding a novel Prp1 protein, regulates starch biosynthesis through affecting the splicing ofWxbpre-mRNAs in rice (*Oryza sativa*L.).《Plant Molecular Biology》.2007,第65卷(第4期),第501-509页.

(72)发明人 万建民 张文伟 蔡跃 王益华

江玲 刘喜 刘世家 陈亮明

刘裕强 汪鹏 燕海刚 王亮

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 徐冬涛 杜静

NCBI.putative C2H2 zinc-finger protein [*Oryza sativa Japonica Group*].《GenBank》.2008,BAD54671.

(51)Int.Cl.

C07K 14/415(2006.01)

C12N 15/29(2006.01)

审查员 陈晋

权利要求书1页 说明书7页

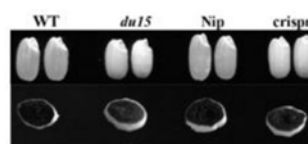
序列表9页 附图4页

(54)发明名称

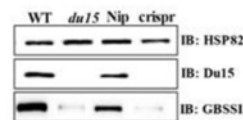
一种植物直链淀粉合成相关蛋白Du15与其编码基因及应用

(57)摘要

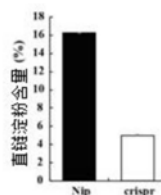
本发明公开一种植物直链淀粉合成相关蛋白Du15及其编码基因与应用。本发明提供的蛋白质,是如下(a)或(b)的蛋白质:(a)由序列表中SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的蛋白质;(b)将SEQ ID NO.1的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与植物直链淀粉合成相关的由序列1衍生的蛋白质。本发明的植物直链淀粉调控相关蛋白影响植物中直链淀粉的合成。将所述蛋白的编码基因进行表达调控,可以培育低直链淀粉的转基因植物。所述蛋白及其编码基因可以应用于植物遗传改良。



A



B



C

1. SEQ ID NO.1 所示的蛋白、SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3 所示的基因、包含SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3 所示的基因的重组表达载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌中的至少一种在培育低直链淀粉的转基因水稻中的应用；所述低直链淀粉的转基因水稻的胚乳为暗胚乳表型。

2. 一种培育低直链淀粉的转基因水稻的方法，是将SEQ ID NO.2或SEQ ID NO.3 所示的基因导入正常水稻中，得到低直链淀粉的转基因水稻；所述低直链淀粉转基因水稻的胚乳为暗胚乳表型。

一种植物直链淀粉合成相关蛋白Du15与其编码基因及应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,涉及一种植物直链淀粉合成相关蛋白Du15及其编码基因与应用。

背景技术

[0002] 在植物中,淀粉是主要的储能物质,其合成途径中的许多合成酶和调控因子都已经被很好地鉴定和研究。淀粉是稻米籽粒最主要的组成成分,其含量和特性直接影响稻米的各项品质指标及最终适口性,同时淀粉的积累水平还可能影响水稻的产量,因此,深入研究水稻这一单子叶模式植物淀粉合成途径中的关键因子及调控网络具有重要的理论意义与应用价值。

[0003] 水稻胚乳水不溶的淀粉主要由直链淀粉和支链淀粉组成。支链淀粉占75%以上,它由分支的 α -1,6糖苷键连接,而占少量的直链淀粉线性的 α -1,4糖苷键连接。一般认为,直链淀粉含量(amylose content, AC)是稻米蒸煮、加工以及食用品质的决定因素。直链淀粉由颗粒结合型淀粉合酶I(Granule bound starch synthase, GBSSI)合成,在水稻中,GBSSI由位于第6号染色体的Wx编码,蛋白质大小60kD左右。众多研究表明Wx外显子和内含子结构的改变,都将影响其表达水平以及蛋白质功能的变化。Wx的表达受到转录水平和转录后水平的调控。MYC转录因子OsBP-5可与乙烯应答元件结合蛋白OsEBP-89形成异源二聚体,协同调控Wx表达。通过RNA干扰OsBP-5,发现Wx的表达下调,成熟种子中的直链淀粉含量降低。RSp29和RSZp23,两个富含Ser/Arg的蛋白,能够增强Wx^b pre-mRNA的剪接,并能影响Wx第1内含子5'端的剪切方式。Du1, Wxpre-mRNA加工复合物的一员,能够影响Wx^bpre-mRNA的剪接效率并调节淀粉的生物合成。另外,发现从水稻发育中种子提取的核蛋白能够结合于Wx启动子的基序上。

[0004] 低直链淀粉含量的稻米,是介于一般黏米和糯米之间的中间类型,其柔软、富弹性的米饭质地不仅受到喜好软米的人群的青睐,而且具有冷不回生、冷饭食口性及膨化性好等特点。随着生活节奏的不断加快,人们对方便米饭等方便食品的需求也在增加。因此,培育优质低直链淀粉含量水稻品种,不仅可以满足多样化的消费需求,而且有利于开拓国内外稻米市场。因此发现并克隆调控Wx表达的基因,将有助于我们通过基因工程的手段来对稻米进行改良。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种调控直链淀粉合成相关蛋白及其编码基因与应用。

[0006] 本发明提供的淀粉合成相关蛋白(Du15),来源于稻属水稻品种(Oryza sativavar.)越光(Koshihikari),是如下(a)或(b)的蛋白质:

[0007] (a)由SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0008] (b)将SEQ ID NO.1的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且与直链淀粉合成相关的由SEQ ID NO.1衍生的蛋白质。

[0009] 序列表中的SEQ ID NO.1由723个氨基酸残基组成。

[0010] 为了使(a)中的Du15便于研究在水稻细胞的亚细胞位置,可在由序列表中SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列组成的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如SEQ ID NO.8所示的标签。

[0011] 上述(b)中的Du15可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0012] 上述(b)中的Du15的编码基因可通过将序列表中SEQ ID NO.2所示的DNA序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子,和/或进行一个或几个碱基对的错义突变,和/或在5'端和/或3'端连上表1所示的标签的编码序列得到。

[0013] 编码上述直链淀粉合成相关蛋白的基因(Du15)也属于本发明的保护范围。

[0014] 所述基因Du15可为如下1)或2)或3)或4)的DNA分子:

[0015] 1)序列表中SEQ ID NO.2所示的DNA分子;

[0016] 2)序列表中SEQ ID NO.3所示的DNA分子;

[0017] 3)在严格条件下与1)或2)限定的DNA序列杂交且编码所述蛋白的DNA分子;

[0018] 4)与1)或2)或3)限定的DNA序列具有90%以上同源性,且编码调控淀粉合成相关蛋白的DNA分子。

[0019] 所述严格条件可为在 $0.1 \times$ SSPE(或 $0.1 \times$ SSC),0.1%SDS的溶液中,在65°C下杂交并洗膜。

[0020] SEQ ID NO.2由2172个核苷酸组成,为Du15的CDS。

[0021] SEQ ID NO.3由7044个核苷酸组成,为Du15的DNA序列。

[0022] 含有以上任一所述基因的重组表达载体也属于本发明的保护范围。

[0023] 可用现有的植物表达载体构建含有所述基因的重组表达载体。

[0024] CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats),被称为规律成簇间隔短回文重复,实际上就是一种基因编辑器,是细菌用以保护自身对抗病毒的一个系统,也是一种对付攻击者的基因武器。后来,研究人员发现,它似乎是一种精确的万能基因武器,可以用来删除、添加、激活或抑制其他生物体的目标基因,这些目标基因包括人、老鼠、斑马鱼、细菌、果蝇、酵母、线虫和农作物细胞内的基因,这也意味着基因编辑器是一种可以广泛使用的生物技术。

[0025] CRISPR簇是一个广泛存在于细菌和古生菌基因组中的特殊DNA重复序列家族,其序列由一个前导区(Leader)、多个短而高度保守的重复序列区(Repeat)和多个间隔区(Spacer)组成。前导区一般位于CRISPR簇上游,是富含AT长度为300~500bp的区域,被认为是CRISPR簇的启动子序列。重复序列区长度为21~48bp,含有回文序列,可形成发卡结构。重复序列之间被长度为26~72bp的间隔区隔开。Spacer区域由俘获的外源DNA组成,类似免疫记忆,当含有同样序列的外源DNA入侵时,可被细菌机体识别,并进行剪切使之表达沉默,达到保护自身安全的目的。

[0026] 通过对CRISPR簇的侧翼序列分析发现,在其附近存在一个多态性家族基因。该家族编码的蛋白质均含有可与核酸发生作用的功能域(具有核酸酶、解旋酶、整合酶和聚合酶等活性),并且与CRISPR区域共同发挥作用,因此被命名为CRISPR关联基因(CRISPR associated),缩写为Cas。目前发现的Cas包括Cas1~Cas10等多种类型。Cas基因与CRISPR共同进化,共同构成一个高度保守的系统。

[0027] 为了便于对转基因植物细胞或植物进行鉴定及筛选,可对所用植物表达载体进行加工,如加入可在植物中表达的编码可产生颜色变化的酶或发光化合物的基因(GUS基因、萤光素酶基因等)、具有抗性的抗生素标记物(庆大霉素标记物、卡那霉素标记物等)或是抗化学试剂标记基因(如抗除草剂基因)等。从转基因植物的安全性考虑,可不加任何选择性标记基因,直接以逆境筛选转化植株。

[0028] 所述重组表达载体优选为在CRISPR/Cas9载体的酶切位点之间插入所述基因(Du15)得到的重组质粒,可以将含有Du15的CRISPR/Cas9载体命名为CRISPR-Du15。

[0029] 含有以上所述基因(Du15)的任一表达盒、转基因细胞系及重组菌均属于本发明的保护范围。

[0030] 扩增所述基因(Du15)全长或任一片段的引物对也属于本发明的保护范围。

[0031] 本发明的另一个目的是提供一种培育低直链淀粉的转基因植物的方法。

[0032] 本发明提供的低直链淀粉的转基因植物的方法,是将所述CRISPR-Du15导入正常植物中,得到低直链淀粉的转基因植物;所述低直链淀粉植物的胚乳表现为暗胚乳表型的植物。具体来说,所述基因通过所述CRISPR-Du15载体导入正常植物中,得到低直链淀粉的转基因植物;所述低直链淀粉植物可命名为Du15。

[0033] 所述蛋白、所述基因、所述重组表达载体、表达盒、转基因细胞系或重组菌或所述方法均可应用于水稻育种。

[0034] 利用任何一种可以引导外源基因在植物中表达的载体,将编码所述蛋白的基因导入植物细胞,可获转基因细胞系及转基因植株。携带有所述基因的表达载体可通过使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、显微注射、电导、农杆菌介导等常规生物学方法转化植物细胞或组织,并将转化的植物组织培育成植株。被转化的植物宿主既可以是单子叶植物,也可以是双子叶植物,如:烟草、百脉根、拟南芥、水稻、小麦、玉米、黄瓜、番茄、杨树、草坪草、苜蓿等。

[0035] 有益效果:

[0036] 本发明的Waxy调控相关蛋白Du15影响水稻胚乳中直链淀粉合成的过程。将所述的CRISPR-Du15导入正常植株中,可以得到低直链淀粉的转基因植物。所述蛋白及其编码基因可以应用于植物品质的遗传改良。

附图说明

[0037] 图1为野生型越光和突变体du15的籽粒表型。

[0038] 图2为野生型越光和突变体du15的籽粒扫描电镜及半薄切片观察。

[0039] 图3为野生型越光和突变体du15灌浆速率及千粒重对比。

[0040] 图4为野生型越光和突变体du15理化性质比较。

[0041] 图5为突变基因在第6染色体上的精细定位。

[0042] 图6为转CRISPR-Du15的T₁代植株的T₂籽粒表型、Western和直链淀粉检测结果。

具体实施方式

[0043] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自

常规生化试剂商店购买得到的。

[0044] 实施例1、植物直链淀粉调控相关蛋白及其编码基因的发现

[0045] 一、水稻低直链淀粉突变体du15表型分析及其遗传分析

[0046] 粳稻品种越光经MNU诱变突变体库中筛选出种子暗胚突变体du15。

[0047] 图1最左图为越光成熟种子 (WT) 整体和横断面的碘染图, 表现为胚乳完全透明、碘染深的表型, 右图为du15成熟种子整体和横断面的碘染图, 表现为暗胚乳、碘染着色较浅的表型。中图为Wx突变体w53的成熟种子整体和横断面的碘染图。

[0048] 图2为越光 (WT) 和du15成熟种子扫描电镜及半薄切片分析图。越光 (WT) 与du15之间在淀粉颗粒上没有明显差异。

[0049] 在整个种子发育过程中, 如图3 (1) 所示, du15突变体的灌浆速率明显低于野生型 (WT)。从开花后5天开始, 突变体的干物质积累开始显著低于野生型 (WT), 并且这个差异一直维持到灌浆结束。与灌浆速率明显降低相对应的结果是, 成熟的du15突变体种子千粒重明显低于越光 (WT), 如图3 (2) 所示, 与越光 (WT) 相比, 成熟的du15突变体种子长度明显短, 但厚度明显变厚。

[0050] 与越光 (WT) 相比, du15突变体的种子具有较低含量的直链淀粉, 如图4A和E所示, 脂质含量上升 (图4D), 总淀粉和蛋白含量没有明显变化 (图4B和C)。

[0051] 二、突变基因定位

[0052] 1、突变基因初步定位

[0053] 用突变体du15与南京11杂交, 在du15/南京11的F₂分离群体中随机选取籽粒呈现暗胚乳的种子, 发芽后, 分别将各株的叶片等量混合后提取DNA。首先, 用覆盖水稻全基因组的565对SSR引物在越光和南京11之间进行多态性分析, 之后每间隔10cM挑选一对在两个亲本间有多态的引物。两个亲本DNA连同群体DNA共计三个DNA样本, 利用挑选好的覆盖12条染色体的且具有多态的引物进行分析, 最后将直链淀粉合成关键基因du15定位在第6染色体InDel标记W72和W47之间。

[0054] 上述SSR标记分析的方法如下所述:

[0055] (1) 提取上述选取单株的总DNA作为模板, 具体方法如下:

[0056] ①取0.2克左右的水稻幼嫩叶片, 置于Eppendorf管中, 管中放置一粒钢珠, 把装好样品的Eppendorf管在液氮中冷冻5min, 置于2000型GENO/GRINDER仪器上粉碎样品1min。

[0057] ②加入660μL提取液, 含100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20mM EDTA (pH 8.0), 1.4M NaCl, 0.2g/mL CTAB的溶液, 漩涡器上剧烈涡旋混匀, 冰浴30min。

[0058] ③加入40μL 20% SDS, 65℃温浴10min, 每隔两分钟轻轻上下颠倒混匀。

[0059] ④加入100μL 5M NaCl, 温和混匀。

[0060] ⑤加入100μL 10×CTAB, 65℃温浴10min, 间断轻轻上下颠倒混匀。

[0061] ⑥加入900μL氯仿, 充分混匀, 12000rpm离心3min。

[0062] ⑦转移上清液至1.5mL Eppendorf管中, 加入600μL异丙醇, 混匀, 12000rpm离心5min。

[0063] ⑧弃上清液, 沉淀用70% (体积百分含量) 乙醇漂洗一次, 室温凉干。

[0064] ⑨加入100μL 1×TE (121克Tris溶于1升水中, 用盐酸调pH值至8.0得到的溶液) 溶解DNA。

[0065] ⑩取2 μ L电泳检测DNA质量,并用DU800分光光度仪测定浓度(Bechman Instrument Inc.U.S.A)。

[0066] (2)将上述提取的DNA稀释成约20ng/ μ L,作为模板进行PCR扩增;PCR反应体系(10 μ L):DNA(20ng/ μ L)1 μ L,上游引物(2pmol/ μ L)1 μ L,下游引物(2pmol/ μ L)1 μ L,10xBuffer(MgCl₂free)1 μ L,dNTP(10mM)0.2 μ L,MgCl₂(25mM)0.6 μ L,rTaq(5u/ μ L)0.1 μ L,ddH₂O 5.1 μ L,共10 μ L。

[0067] PCR反应程序:94.0 $^{\circ}$ C变性5min;94.0 $^{\circ}$ C变性30s、55 $^{\circ}$ C退火30s、72 $^{\circ}$ C延伸1min,共循环35次;72 $^{\circ}$ C延伸7min;10 $^{\circ}$ C保存.PCR反应在MJ Research PTC-225热循环仪中进行。

[0068] (3)SSR标记的PCR产物检测

[0069] 扩增产物用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。以50bp的DNA Ladder为对照比较扩增产物的分子量大小,银染显色。

[0070] 2、突变基因精细定位

[0071] 根据初步定位的结果,在突变位点所在区域间隔一定区段自行开发SSR标记,以便在该染色体的相关区段筛选更多标记进一步定位突变体位点。从越光/南京11杂交组合获得的F₂分离群体中挑出确认为突变表型的F₂种子,用于突变位点的精细定位。利用公共图谱上的分子标记和基于水稻基因组序列数据自行开发的SSR、Indel分子标记对突变位点进行了精细定位,并根据定位结果初步确定突变位点,具体方法如下:

[0072] (1)SSR标记开发

[0073] 将公共图谱的SSR标记与水稻基因组序列进行整合,下载突变位点附近的BAC/PAC克隆序列。用SSR Hunter(李强等,遗传,2005,27(5):808-810)或SSRIT软件搜索克隆中潜在的SSR序列(重复次数 \geq 6);将这些SSR序列及其邻近400~500bp的序列在NCBI通过BLAST程序在线与相应的籼稻序列进行比较,如果两者的SSR重复次数有差异,初步推断该SSR引物的PCR产物在籼、粳间存在多态性;再利用Primer Premier 5.0软件设计SSR引物并由上海英俊生物技术有限公司合成。将自行设计的SSR成对引物等比例混合,检测其在越光和南京11之间的多态性,表现多态者用作精细定位du15基因的分子标记。用于精细定位的分子标记见表2。

[0074] 表2用于精细定位的分子标记

[0075]

标记	正向引物	反向引物	类型
W26	TGCAAGCTGTACAGTTCATGTGG	GGCCATTACGGCTACAAAGG	InDel
W13	TCGTGATGTGCTAATGAACC	CATCCATACTACGGGACCTAA	InDel
W53	GTCGGTTCATGCCCTAGAG	GAAGATGTTTCAGCCTGGTTAC	InDel
W59	ACTGGTGCCTCTGCCTATTC	AGATAAAAGACTACCTATGGACCA	InDel
W72	CCTCTCCTTCCATGCTACTAG	CTCCTCTTCTGACCCCTTC	InDel
W47	TCCCAGGTCTACCTAGTGTCT	ACAAGTCGCCAAGTGAGGT	InDel

[0076] 根据F₂群体中胚乳粉质单株的分子数据和表型数据,按照Zhang等报道的“隐性极端个体基因作图”方法,最终把du15基因精细定位在W72和W47之间,物理距离约为187kb(图5)。候选区段基因组测序显示,在du15中,基因Os06g0698859中存在一个碱基的突变,由G突变为A,导致蛋白翻译提前终止。

[0077] (3)突变基因的获得

[0078] 根据定位的位点设计引物,序列如下所述:

[0079] primer1:5'-ATGGCTGACGTCATCGACC-3' (SEQ ID NO.4)

[0080] primer2:5'-CTACAAACTTCTGTAGTCAAGAACG-3' (SEQ ID NO.5)

[0081] 以primer1和primer2为引物,以越光的cDNA为模板,进行PCR扩增获得目的基因。该对引物位于序列2最上游和最下游,扩增产物为2172bp的目的片段。

[0082] 扩增反应在PTC-200 (MJ Research Inc.) PCR仪上进行:94°C3min;94°C30sec,60°C45sec,72°C2min,35个循环;72°C5min。将PCR产物回收纯化后克隆到载体pEASY (北京全式金公司),转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞(北京Tiangen公司CB101),挑选阳性克隆后,进行测序。序列测定结果表明,PCR反应获得的片段具有序列表中SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列,编码723个氨基酸残基组成的蛋白质(从ATG到TGA)(见序列表的SEQ ID NO.1)。将SEQ ID NO.1所示的蛋白命名为Du15(即为基因定位中所述的Du15基因),将SEQ ID NO.1所示的蛋白的编码基因命名Du15。

[0083] 实施例2、转基因植物的获得和鉴定

[0084] 一、CRISPR/Cas9载体构建

[0085] CRISPR引物序列如下:

[0086] primer3:

[0087] 5'GGCATGCCGCTGACTGGGAAAAGA 3' (SEQ ID NO.6)

[0088] primer4:

[0089] 5'AAACTCTTTCCAGTCAGCGGCA 3' (SEQ ID NO.7)

[0090] Dimer adaptor的生成:将上述引物分别稀释为100 μ M浓度,在克隆管中分别加入1 μ L上述引物,再加入8 μ L ddH₂O,95°C5min。酶切连接体系:10 \times 内切酶buffer1 μ L,50 \times oligo 0.2 μ L,ATP (10 μ M) 1 μ L,载体质粒 (20 μ g/ μ L) 1 μ L,dimer adaptor1 μ L,AarI 0.2 μ L,T4ligase 0.1 μ L,ddH₂O 5.5 μ L。37°C5min,20°C5min,共计10个循环。将所有反应体系用热激法转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞(北京Tiangen公司;CB101)。将全部转化细胞均匀涂布在含50mg/L卡那霉素的LB固体培养基上。

[0091] 37°C培养16h后,挑取克隆阳性克隆,进行测序。将测序正确的质粒命名为CRISPR-Du15。

[0092] 二、重组农杆菌的获得

[0093] 用电击法将CRISPR-Du15转化农杆菌EHA105菌株(购自美国英俊公司),得到重组菌株,提取质粒进行PCR及酶切鉴定。将PCR及酶切鉴定正确的重组菌株命名为CRISPR-Du15。

[0094] 三、转基因植物的获得

[0095] 将CRISPR-Du15转化日本晴,具体方法为:

[0096] (1) 28°C培养CRISPR-Du15培养16小时,收集菌体,并稀释到含有100 μ mol/L乙酰丁香酮的N6液体培养基(Sigma公司,C1416)中至浓度为OD₆₀₀ \approx 0.5,获得菌液;

[0097] (2) 将培养至一个月的日本晴水稻成熟胚性愈伤组织与步骤(1)的菌液混合感染30min,滤纸吸干菌液后转入共培养培养基(N6固体共培养培养基,Sigma公司)中,24°C共培养3天;

[0098] (3) 将步骤(2)的愈伤接种在含有100mg/L巴龙霉素(Phyto Technology

Laboratories公司)的N6固体筛选培养基上第一次筛选(16天)；

[0099] (4) 挑取健康愈伤转入含有100mg/L巴龙霉素的N6固体筛选培养基上第二次筛选，每15天继代一次；

[0100] (5) 挑取健康愈伤转入含有50mg/L巴龙霉素的N6固体筛选培养基上第三次筛选，每15天继代一次；

[0101] (6) 挑取抗性愈伤转入分化培养基上分化；得到分化成苗的T₀代阳性植株。

[0102] 四、转基因植株的鉴定

[0103] 1、潮霉素抗性鉴定

[0104] 本研究中利用1‰浓度的潮霉素溶液鉴定转基因植株。具体方法：将新鲜的转基因植株叶片(没有转基因植株叶片做阴性对照)放在培养皿中，用新配的1‰的潮霉素溶液浸泡，放在28℃培养箱中暗培养48小时，与对照比较，叶片坏死的表明不抗，没有坏死的表明抗，将抗潮霉素的家系命名为crispr。

[0105] 2、Western Blot鉴定

[0106] 对T₁代植株所结的T₂代种子提取总蛋白，种子蛋白提取液配方(5M UREA, 4% SDS, 0.125M Tris-HCl pH6.8, β-Me 5%, 少量溴酚蓝)，每一粒种子加入350μL提取液，于50℃烘箱放置12-16个小时，上下颠倒混匀，12000rpm离心2分钟，吸取10μL进行SDS-PAGE，转到尼龙膜后，用Du15一抗和兔二抗分别进行孵育。T₁代不同家系植株所结的T₂代种子中，挑取暗胚乳的个体在目标位置(80kD)有条带的，即为阳性家系。图6B中突变体du15和crispr转基因家系目的条带明显变弱。

[0107] 3、表型鉴定

[0108] 分别将T₁代转CRISPR-Du15的阳性植株，越光和du15种植在南京农业大学牌楼试验基地。对T₂代种子进行表型鉴定，发现T₂代(crispr)显示出du15相同的碘染表型(图6A)，说明导致du15突变体表型确实是du15基因控制的，即该Du15基因为淀粉合成相关基因；此外T₂代(crispr)的直链淀粉含量也明显降低(图6C)。

[0001] 序列表

[0002] <110> 南京农业大学

[0003] <120> 一种植物直链淀粉合成相关蛋白Du15与其编码基因及应用

[0004] <160> 8

[0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0006] <210> 1

[0007] <211> 723

[0008] <212> PRT

[0009] <213> 稻属水稻(Oryza sativa var.)

[0010] <400> 1

[0011] Met Ala Asp Val Ile Asp Pro Ala Ser Thr Glu Ala Pro Arg Ala Arg

[0012] 1 5 10 15

[0013] Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Gly Arg Ser Pro Pro

[0014] 20 25 30

[0015] Leu Pro Pro Pro Pro Pro Gly Gly Pro Pro Gln Pro Ala Ala Thr Arg

[0016] 35 40 45

[0017] Lys Arg Ser Arg Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Leu Pro

[0018] 50 55 60

[0019] Pro Pro Pro Pro Leu Gly Ser Ser Arg Pro Glu Arg Tyr Arg Asp Asn

[0020] 65 70 75 80

[0021] His His Arg Gly Gly Gly Gly Gly Arg Gly Gly Gly Ser Ser Ser Pro

[0022] 85 90 95

[0023] Pro Pro Tyr Arg Ser Gly Arg Arg His Ser Pro Ser Arg Arg Ser Pro

[0024] 100 105 110

[0025] Ser Pro Pro Phe Lys Arg Ser Arg Arg Asp Asp Gly Tyr Asp Arg Arg

[0026] 115 120 125

[0027] Gly Gly Arg Gly Ser Pro Pro Pro Arg Tyr Gly Tyr Gly Asp Arg Arg

[0028] 130 135 140

[0029] Tyr Gly Tyr Asp His Glu Arg Gly Gly Gly Arg Gly Gly Tyr Asp Asp

[0030] 145 150 155 160

[0031] Asp Arg Tyr His Gly Arg Tyr Gln Asn Arg Ala Ala Asp Trp Ala Asp

[0032] 165 170 175

[0033] Ser Gly Phe Gly Ala Ser Asn Asp Gly Pro Gly Ile Thr Gln Arg Glu

[0034] 180 185 190

[0035] Gly Leu Met Thr Tyr Lys Gln Phe Ile Gln Val Leu Glu Asp Asp Ile

[0036] 195 200 205

[0037] Ser Pro Ala Glu Ala Glu Lys Arg Tyr Gln Glu Tyr Arg Thr Glu Tyr

[0038] 210 215 220

[0039]	Ile Thr Thr Gln Lys Arg Ala Tyr Phe Asp Leu Asn Lys Asn Asp Asp
[0040]	225 230 235 240
[0041]	Arg Leu Lys Asp Lys Tyr His Pro Thr Asn Leu Ser Ser Val Ile Asp
[0042]	245 250 255
[0043]	Arg Arg Asn Asp Ser Cys Lys Ala Thr Ala Lys Asp Phe Phe His Asp
[0044]	260 265 270
[0045]	Leu Gln Asn Gly Thr Leu Asp Leu Gly Pro Gly Ile Thr Ala Ala Ala
[0046]	275 280 285
[0047]	Ala Ser Gly Ser Asp Gly Asn Ser Asp Asp Asp Gly Asp Ser Asp Lys
[0048]	290 295 300
[0049]	Arg Arg Lys His Gly Arg Gly Ser Ser Lys Glu Thr Asp Pro Leu Ser
[0050]	305 310 315 320
[0051]	Gly Ala Pro Val Ala His Pro Val Ser Ser Glu Ser Arg Arg Val Gln
[0052]	325 330 335
[0053]	Val Asp Ile Glu Gln Ala Leu Ala Leu Val Arg Lys Leu Asp Thr Glu
[0054]	340 345 350
[0055]	Lys Gly Ile Val Gly Asn Ile Leu Ser Ser Gly Asp His Asp Lys Ser
[0056]	355 360 365
[0057]	Asp Val Asp Lys Ser His Ile Gly Ser Met Gly Pro Ile Ile Ile Ile
[0058]	370 375 380
[0059]	Arg Gly Leu Thr Thr Val Lys Gly Leu Glu Gly Val Glu Leu Leu Asp
[0060]	385 390 395 400
[0061]	Thr Leu Leu Thr Tyr Leu Trp Arg Ile His Gly Val Asp Tyr Tyr Gly
[0062]	405 410 415
[0063]	Met Ser Glu Thr Asn Glu Ala Lys Gly Ser Arg His Val Arg Ala Asp
[0064]	420 425 430
[0065]	Asn Lys Thr Ser Asn Thr Thr Asn Ile Asn Ala Ala Asp Trp Glu Lys
[0066]	435 440 445
[0067]	Lys Val Asp Thr Phe Trp Gln Glu Arg Leu Arg Gly Gln Asp Pro Met
[0068]	450 455 460
[0069]	Val Ile Leu Ala Ala Lys Asp Lys Ile Asp Ala Ala Ala Val Glu Val
[0070]	465 470 475 480
[0071]	Leu Glu Pro Tyr Val Arg Lys Ile Arg Asp Glu Lys Tyr Gly Trp Lys
[0072]	485 490 495
[0073]	Tyr Gly Cys Gly Ala Lys Gly Cys Thr Lys Leu Phe His Ala Pro Glu
[0074]	500 505 510
[0075]	Phe Val His Lys His Leu Arg Leu Lys His Pro Glu Leu Val Leu Glu
[0076]	515 520 525
[0077]	Leu Thr Ser Lys Val Arg Glu Asp Leu Tyr Phe Gln Asn Tyr Met Asn

[0078]	530	535	540
[0079]	Asp Pro Asn Ala Pro Gly Gly Thr Pro Val Met Gln Gln Ser Ala Pro		
[0080]	545	550	555
[0081]	Asp Lys Ser Arg Gln Arg Pro Gly Met Asp Asn Arg Leu Arg Tyr Asp		
[0082]	565	570	575
[0083]	Arg Ala Asn Arg Arg Glu Tyr Asp Arg Ala Glu Arg Asp Gly Ser Arg		
[0084]	580	585	590
[0085]	Tyr Gly Arg Gly Asp Arg Ser Pro Ser Leu Asp Gly Ala Asp Asp Gln		
[0086]	595	600	605
[0087]	Met Phe Asp Ala Phe Arg Gly Arg Gly Pro Asn Ala Pro Phe Val Pro		
[0088]	610	615	620
[0089]	Glu Leu Pro Ala Pro Pro Ile Leu Met Pro Ile Pro Gly Ala Gly Pro		
[0090]	625	630	635
[0091]	Leu Gly Pro Phe Val Pro Ala Pro Pro Glu Ile Ala Met His Met Leu		
[0092]	645	650	655
[0093]	Arg Glu Gln Gly Pro Pro Pro Pro Phe Glu Pro Asn Gly Pro Pro His		
[0094]	660	665	670
[0095]	Ala Asn Pro Gly Val Leu Gly Pro Met Met Gly Gly Pro Ala Pro Ile		
[0096]	675	680	685
[0097]	Ile Thr Met Pro Pro Ser Phe Arg Gln Asp Pro Arg Arg Leu Arg Ser		
[0098]	690	695	700
[0099]	Tyr Asn Asp Leu Asp Ala Pro Asp Glu Glu Val Thr Val Leu Asp Tyr		
[0100]	705	710	715
[0101]	Arg Ser Leu		
[0102]	<210> 2		
[0103]	<211> 2172		
[0104]	<212> DNA		
[0105]	<213> 稻属水稻(Oryza sativa var.)		
[0106]	<400> 2		
[0107]	atggctgacg tcatcgacc cgctccacc gaggccccc gcgcgcgccg cccgccgccc 60		
[0108]	cctccgccc acagcccgga gggccgctcg ccgcccctc cgccccgcc ccccgggtggc 120		
[0109]	ccgcccagc cgccggccac ccgcaagcgg agcccctcgc caccgccgcc tccccgccc 180		
[0110]	ccctcctcc cgccgcccc gccgctcggc tcgtcgcgcc ccgagcgcta ccgcgacaac 240		
[0111]	caccaccggg gaggaggcgg tggccgggggt ggggtagtt ccagccccc gccgtatcgg 300		
[0112]	agtggccgcc gccactcccc gtcgaggaga tccccttcgc cgccgttcaa gaggtcgcgg 360		
[0113]	cgggacgacg ggtacgacc ccgtggcggc cgtgggagcc cgccgccgcg gtacgggtac 420		
[0114]	ggcgacagga ggtatggata tgaccacgag cgtggtggag gcagaggtgg gtatgatgat 480		
[0115]	gaccgatacc atggcaggta tcaaaatcgc gcagcagatt gggccgattc agggtttggg 540		
[0116]	gcatccaatg atggtcctgg aattaccaa agggaaggac tgatgactta caaacagttc 600		

[0117]	atccaagttc ttgaggatga tatttcacct gctgaagctg agaaacggta tcaagaatac	660
[0118]	aggacagagt acatcactac tcaaaaacgt gcttattttg accttaacaa gaatgatgat	720
[0119]	cggttgaaag acaagtacca tccgaccaac ttgtcatctg ttattgacag gaggaatgat	780
[0120]	agttgtaagg caacagcaaa ggatttcttt catgatttgc aaaatggaac tctggacctt	840
[0121]	ggccctggaa taactgcggc tgcagcaagt ggcagtgatg gaaattctga tgatgatgga	900
[0122]	gacagtgaca agagaagaaa gcatggcagg gtttctcaa aagaaacaga ccctctttct	960
[0123]	ggtgctcccg tggctcatcc agttagctct gaatctgac gggttcaagt tgacattgaa	1020
[0124]	caagctctag cccttgtgcg taagcttgac actgagaagg gtattgtggg gaatataccta	1080
[0125]	tcaagtggcg atcatgacaa atcagatgta gacaagtctc atattggatc tatggggcct	1140
[0126]	ataattataa tccgaggctt aaccactgtc aaaggccttg aaggtgttga gctcctagat	1200
[0127]	actcttetta cctatttatg gcgtattcat ggtgttgatt actatggcat gtctgagaca	1260
[0128]	aatgaagcaa aaggcagtcg ccatgtcaga gcagacaata agacgtctaa tacaaccaat	1320
[0129]	attaatgccg ctgactggga aaagaagggtg gatactttct ggcaagaaag gctgagaggt	1380
[0130]	caggacccca tggtaatatt agcagccaag gacaaaatcg atgcagcagc tgtggaagtt	1440
[0131]	ctggaacctt atgtcaggaa gataagggtat gaaaaatag gttggaataa tggctgtgga	1500
[0132]	gctaagggtt gtacgaaact tttccatgct cctgagttcg ttcacaagca tttgaggctg	1560
[0133]	aagcatccag agcttgtggt agagttgact tccaaagtcc gagaggatct ctatttccaa	1620
[0134]	aattacatga atgatcctaa tgcacctggt ggaactccag ttatgcaaca gtctgcacca	1680
[0135]	gacaaatcaa gacagagacc tggatggat aatcgtctga gatatgaccg tgccaatcgt	1740
[0136]	agagaatatg atagggcaga gagagatgga agcagatatg gtagaggatga tcgttctcca	1800
[0137]	agtcttgatg gcgctgatga tcagatgttt gatgctttcc gtgggcgagg tccaaatgct	1860
[0138]	ctttttgttc ctgaacttcc cgctccgcca attttgatgc ctattcctgg tgctggtcct	1920
[0139]	ttgggtccat ttgttctgct acctccagaa atagccatgc atatgctgag agagcaaggg	1980
[0140]	ccgccacctc catttgaacc aaacggacct cctcatgcca acccaggagt gcttggacca	2040
[0141]	atgatgggtg gtccctgcgc aattataacc atgcctccat cttttcgtea agatcctcgc	2100
[0142]	cgtttgcgaa gttacaatga ccttgatgct ccggacgagg aagttaccgt tcttgactac	2160
[0143]	agaagtttgt ag	2172
[0144]	<210> 3	
[0145]	<211> 7044	
[0146]	<212> DNA	
[0147]	<213> 稻属水稻 (<i>Oryza sativa</i> var.)	
[0148]	<400> 3	
[0149]	gtgcgcccga gcccgcagcc tagcctacc tctctctctc cccctcctc aagctgtgcg	60
[0150]	cgattcgett cctcactccc aaaccetaac ccaccgcga cgctcccccc catggctgac	120
[0151]	gtcatcgacc ccgcctccac cgaggcccc cgcgcgcgcc gcccgccgc gcctccgccc	180
[0152]	gacagcccgg agggccgctc gccgcccctc ccgccccgc cccccggtgg cccgcccag	240
[0153]	ccggcggcca cccgcaagcg gagccgctcg ccaccgccg ctccccgcc gccctcctc	300
[0154]	ccgcccccc cgccgctcgg ctctctcgcg cccgagcgt accgcgacaa ccaccaccg	360
[0155]	ggaggaggcg gtggccgggg tgggggtagt tccagcccc cgccgtatcg gagtggccgc	420

[0156] cgccactccc cgtcaggag atccccttcg ccgcccgtca agaggtcgcg gcgggacgac 480
 [0157] gggtagcacc gccgtggcgg ccgtgggagc ccgcccgcgc ggtacgggta cggcgacagg 540
 [0158] aggtgagggg tttcttcttg gtcatttggt cgaatctgt actggattgg tggttagttc 600
 [0159] ttcgaggctc tgcggtttca tcgctgtgtc ttgggtgatg tgttgggtag gtatggatat 660
 [0160] gaccacgagc gtggtaggag cagaggtagg tatgatgatg accgatacca tggcaggtat 720
 [0161] caaatcgcg cagcaggatga ggattcttct cctcgggcaa agtttcgttt cgatctcaga 780
 [0162] agtaagctgt ttgagtagca cagcatgagc gaaccccaaa tggtaggagg gaaattgatt 840
 [0163] atttgctgt agttagttcc ccaccaaatt agattggttt tgatgatcta caacatagtt 900
 [0164] tagtgaaac tatcagatcc tttgctccat agtcagtatg agtttactga attcaagtga 960
 [0165] acagcatggg gctgttctac ttggtaaaca ttagcaacct tgctttgta gcacttgcta 1020
 [0166] atgtactccc tgcggtcata aatatttgac gtttagaaca aaattcgggt gaattttcaa 1080
 [0167] aattccgact gtaatttccc aatgcttag ttttaaaca aaataaatg ttgtatatag 1140
 [0168] attttcttg aaaagtacta tcataatata aaaagttatt agattttata aacttatttc 1200
 [0169] tactacaaaa ttgatggtg taattttaaa tttgaccaa atcttgcct aatgtttaa 1260
 [0170] tatttatggc agggaggttc aggatttcag atctgtagat gttgggtggt agggctatta 1320
 [0171] gctctttgat ttgtttggtg tgttatagtt gtagtaagaa ttttaccact atcttcta 1380
 [0172] ttgttctcgc ttcgaatcat tctagtcggg atgaagacaa agtatatgca tggctgtttt 1440
 [0173] tttttacttt agctagcact tacactcctc atttagaaca tagattcttg atacttgtga 1500
 [0174] atatgttctg acaattcgat ttcaatgtca gattgggccg attcagggtt tggggcatcc 1560
 [0175] aatgatggtc ctggaattac ccaaaggtag ttattccttt accatgttta ctctttctga 1620
 [0176] ttgttaggca ctttgatggt gtctcctggg tactgtaact atgtagcgat cgacaatact 1680
 [0177] ggagctaatt gccactacta ttgggaaatg caaattaagc ctctatgct agatgctgta 1740
 [0178] aggcatcgtt aacagataga gaatcttctc agaaaattct ccaatttga tgtttgaaat 1800
 [0179] ctgactgatt ctttgagaac tgtgagcctg tagttaagct atcagcttga aatcctttac 1860
 [0180] tgcagcacta cactactccg aaccttgta ctgttattag ccaccagcaa gccagctcaa 1920
 [0181] tttacagta gtgccaccac aaaaggactc ttcccagta tatgtaagct ataccacca 1980
 [0182] gatattcagc tacaccttga aggcataaga agcatatgct tttggataca atcaaatgga 2040
 [0183] gaatctgatg ggaatattct ttatctgta acaacaaca aaggtcaga ggctttattt 2100
 [0184] gaatctctag tagtggattt ctttttcttt cttttttta attctatacc atgttatctt 2160
 [0185] aatatacat tgataactcc atggaacaca acacttcaa tgctaatttg cataagtaga 2220
 [0186] tgttatcatg ttaacactat gcatttttgt cctattgatg gtagactggt agattgtggt 2280
 [0187] aacattgta acaggaaaa ggtgagggat tcttgtttc ttctcttgta tatcttcttt 2340
 [0188] tgccactatt tagttgctga aatatgttca tcaatttatg atacttgctc agaggaacga 2400
 [0189] aatggatgaa ttgcttcta tgtaacatga aatcattgaa gcatgatcac gcttgttagg 2460
 [0190] agtagttgat gcttgggctt ttcattagaa aattataatt tagtgtttt agtgtaatt 2520
 [0191] ctctataata ctgggcttgc taatcaattt tgtattctgt tgaattgtag ccttttattt 2580
 [0192] tagtgatgct attaataaac ctgagggtct tttcttgat ttggttctg gcattgagaa 2640
 [0193] attagattcg ttctccttat ctttgcctcc cgtagttgct atctgaagga attctagaat 2700
 [0194] tttcttgac aaaaacaata gcggaaagat agtaattgga atcagctgat ggatgggcag 2760

[0195] aagttattgg tataccccat caaccatcac atggttgtaa tgacttcttc aagtttttaa 2820
[0196] gaaataacaa ttattctatg ctgataatac ttttgggtggc aacgcatgta attagcaaat 2880
[0197] gtttattcag ttgtttcctc tagttatgtg tatgtcacat ttacatttat cattgagtggt 2940
[0198] tattgtgtgc ttaaggtgtc ttagttagga agaacatgaa atgttagaga aggtagacca 3000
[0199] tgttgctaag gaagataata tttagttagt tattggtcag gatttttttt aattaggaga 3060
[0200] atcttttgcc cgaccaatgc agttgttcct ggtgaccgat ttgcataaaa cattgtaatg 3120
[0201] agtggcagtt catatgaagg ccacatgtta gatgacatct ctgtagggag aggtggattg 3180
[0202] ccttcttttt tgttatttgt aaaaaatat tcaacatgca taccttttaa actgatcttt 3240
[0203] gaactgttga aacagattta tgaaaacttc tattgcagat taaagaaatc tgaactgttg 3300
[0204] tcacatttaa acttgttttc aaatattggt ccctccatc attttgacga gctaaccgtt 3360
[0205] ctaacatatt gagcagagga ttgggatata gtttcatgag tttctcttag tgtattttctg 3420
[0206] ttatcttata tgattatgca tcttttcagg gaaggactga tgacttaca acagtccatc 3480
[0207] caagttcttg aggatgatat ttcacctgct gaagctgaga aacggtaaat gcacaacact 3540
[0208] tactgattat atctttgtgc taccttttta gtattgatgg gctatgtctg tttaaaaagg 3600
[0209] tatcaagaat acaggacaga gtacatcact actcaaaaac gtgcttattt tgaccttaac 3660
[0210] aagaatgatg atcggtaagt caaaatgatt tagctgtaca caactaggaa caaaaatggt 3720
[0211] ccacttgctt taactgacat ttcatttgct ttcacttga ggttgaaaga caagtacat 3780
[0212] ccgaccaact tgcacatctg tattgacagg tggagttgaa ttccttttta ttgagcctgt 3840
[0213] tcccttatgc attcataaac attattatgt tgtggaaaa attttcttgc agaacaatac 3900
[0214] cctttatact gctcatctta actcctttta catttttgtt aagtaaattt cagaaaacta 3960
[0215] caggtgcttt gaccaaatta tcacaaaagt atagatttaa ggcgctgtat cacaaaacta 4020
[0216] catatttgat ttcgaagtta tcacaaaact gcagatatta caatttaaat ccctagtact 4080
[0217] actgttatgt tagagttata aatgtttag tttcgtctaa ctgcaacttt tccatataat 4140
[0218] gcaggaggaa tgatagttgt aaggcaacag caaaggattt ctttcatgat ttgcaaaatg 4200
[0219] gaactctgga cctgtgagtt atatctgcac agcttgtgtt atgatgatct tctggacttc 4260
[0220] ttgtttatac cttgattttt tactgagcag tggccctgga ataactgcgg ctgcagcaag 4320
[0221] tggcagtgat gaaattctg atgatgatgg agacagtac aagagaagaa agcatggcag 4380
[0222] gggttcctca aaagaaacag accctctttc tgggtctccc gtggctcatc cagttagctc 4440
[0223] tgaatctega cgggttcaag ttgacattga acaagctcta gcccttgtgc gtaagcttga 4500
[0224] cactgagaag ggtattgtgg ggaatatcct atcaagtggc gatcatgaca aatcagatgt 4560
[0225] agacaagtct catattggat ctatggggcc tataattata atccgaggct taaccactgt 4620
[0226] caaaggcett gaaggtgttg agctcctaga tactcttctt acctatttat ggcgtattca 4680
[0227] tgggtttgat tactatggca tgtctgagac aatgaagca aaaggcagtc gccatgtcag 4740
[0228] agcagacaat aagacgtcta atacaacca tattaatgcc gctgactggg aaaagaaggt 4800
[0229] ggatactttc tggcaagaaa ggctgagagg tcaggacccc atggtaatat tagcagccaa 4860
[0230] ggacaaaatc gatgcagcag ctgtggaagt tctggaacct tatgtcagga agataaggga 4920
[0231] tgaaaaatat ggttggaat atggctgtgg agctaagggt tgtacgaaac ttttccatgc 4980
[0232] tctgagttc gttcacaagc atttgaggct gaagcatcca gagcttgtgt tagagttgac 5040
[0233] ttcaaagtc cgagaggatc tctatttcca aaattacatg aagtatgtac atatgatttt 5100

[0234]	ctgcctgtgc tacttttttt taaggaggtg ttactgatct ggatgtttct ttatgaacag	5160
[0235]	tgatcctaata gcacctgggtg gaactccagt tatgcaacag tctgcaccag taagaacctc	5220
[0236]	atactctatt acttgcttaa ataaaacaga acaattctac aagtgaattc catgcataat	5280
[0237]	tacataccag tataatcacat atgtgtctata cacatgttac attataactt cgaataaaaag	5340
[0238]	ttccctgcaa aaaagaactt caaataaaaat ttgcttttgc ttttatccca gctgcttcct	5400
[0239]	gtaggttggt tctttttcat ttgtcagtaa accccagctc ccttttaaga ataatttgta	5460
[0240]	tgctgtgcc ttttggttac tagtttgtgt acacatggac catataccat tccaccctt	5520
[0241]	tgttccttct acagattttt ccttttaggt gctaagccta cattagatga actatacggt	5580
[0242]	atcagtcaga cagtcactta tgtggcctaa ccggtgacgt gagagttaaa ggagggttg	5640
[0243]	cttatttgag ggaatgatca ggccctggaca gaatcagtg aaggaatctg actaaagctt	5700
[0244]	ttagtgatgg gtcaataccc tactgaagaa ttagctgac acttctctaa gtatcattaa	5760
[0245]	tgataaata cattgagtgc aggtggaac tgcagttaca tggattcatt gaaatccttg	5820
[0246]	acaatatatt ataacttctga tttgcaggac aatcaagac agagacctgg tatggataat	5880
[0247]	cgtctgagat atgacctgc caatcgtaga gaatatgata gggcagagag agatggaagc	5940
[0248]	agatatgga gaggtgatcg ttctccaagt cttgatggcg ctgatgatca gatgtttgat	6000
[0249]	gctttccgtg ggcgaggtec aatgctcct tttgttctg aacttcccgc tccgccaatt	6060
[0250]	ttgatgcta ttcttggtgc tgggtaggtg ctgtgagaag atatgatttc aatttttggt	6120
[0251]	ctgatagtat aaaagactgc taatgagcgt ggctggtttt attttcagtc ctttgggtcc	6180
[0252]	atgtttcct gcacctccag aatagccat gcatatgctg agagagcaag ggccgccacc	6240
[0253]	tccatttgaa ccaaacggac ctctcatgc caaccagga gtgcttgac caatgatggg	6300
[0254]	tggtctgcg ccaattataa ccatgcctcc atcttttctg caagatcctc gccgtttgcg	6360
[0255]	aaggttagta attattcatt cataccattg aattcatga tgtctattct cctattttgc	6420
[0256]	ttgattggc ttgattatgc cacattctga ccaacaattt ggccacctag ggcttgccac	6480
[0257]	caagccttac accttgcttt agtttgtata tgattactc tactcgaggg ctttaaccata	6540
[0258]	ctgtctttat tatcatagag gcaaaaatag tatgttgatt tactgtgcca ttgtactata	6600
[0259]	ttttacaacc ggcaacttaa cccatccatg atgacgattc ttctgcagtt acaatgacct	6660
[0260]	tgatgctccg gacgaggaag ttaccgttct tgactacaga agtttgtaga gcttgccctg	6720
[0261]	gtgtaattgt aatttgccaa tcacaactct agcatctccg gtctagtcta ggttggtgat	6780
[0262]	gtattctttt tcagacatag gggatgtcat gaacaataga gcatTTTTTg aggtgtaatg	6840
[0263]	cgtcagaaac tactgttgta atttcaaatg gcaacatctg ttattgaaact gtgcaccacg	6900
[0264]	tgacttgta gtcccaagaa gtgttgaacg cagtttgata aatgtaatt tttgagactt	6960
[0265]	tatatgaaa cgttttagct gacaacattt tacttctcca ttggaagtaa ttaatttatt	7020
[0266]	ccttcagttg gaacttgga gagg	7044
[0267]	<210> 4	
[0268]	<211> 19	
[0269]	<212> DNA	
[0270]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
[0271]	<400> 4	
[0272]	atggctgacg tcatcgacc	19

[0273]	<210> 5	
[0274]	<211> 25	
[0275]	<212> DNA	
[0276]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0277]	<400> 5	
[0278]	ctacaaactt ctgtagtcaa gaacg	25
[0279]	<210> 6	
[0280]	<211> 24	
[0281]	<212> DNA	
[0282]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0283]	<400> 6	
[0284]	ggcatgccgc tgactgggaa aaga	24
[0285]	<210> 7	
[0286]	<211> 24	
[0287]	<212> DNA	
[0288]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0289]	<400> 7	
[0290]	aaactctttt cccagtcagc ggca	24
[0291]	<210> 8	
[0292]	<211> 240	
[0293]	<212> PRT	
[0294]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0295]	<400> 8	
[0296]	Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu	
[0297]	1 5 10 15	
[0298]	Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly	
[0299]	20 25 30	
[0300]	Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile	
[0301]	35 40 45	
[0302]	Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr	
[0303]	50 55 60	
[0304]	Phe Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys	
[0305]	65 70 75 80	
[0306]	Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu	
[0307]	85 90 95	
[0308]	Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu	
[0309]	100 105 110	
[0310]	Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly	
[0311]	115 120 125	

[0312]	Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
[0313]	130 135 140
[0314]	Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
[0315]	145 150 155 160
[0316]	Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
[0317]	165 170 175
[0318]	Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
[0319]	180 185 190
[0320]	Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
[0321]	195 200 205
[0322]	Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
[0323]	210 215 220
[0324]	Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr His Gly Met Asp Glu Leu Tyr Arg Ser
[0325]	225 230 235 240

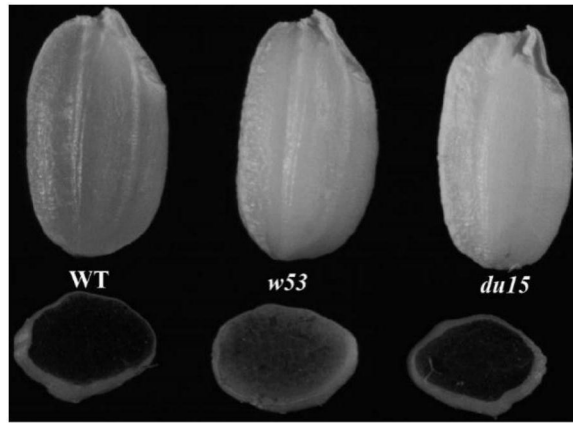


图1

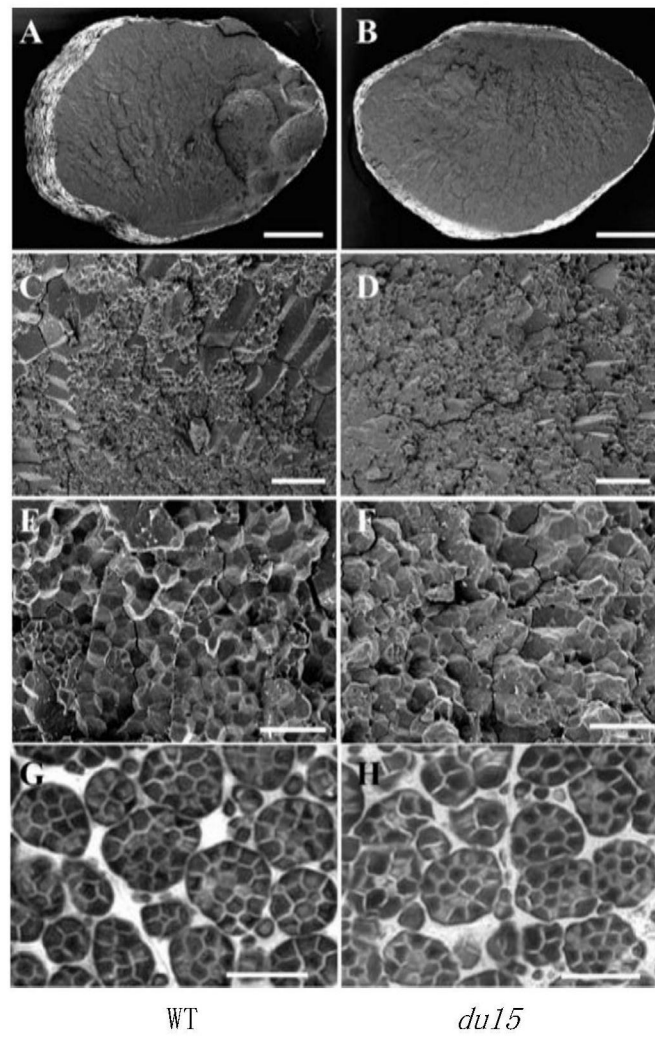
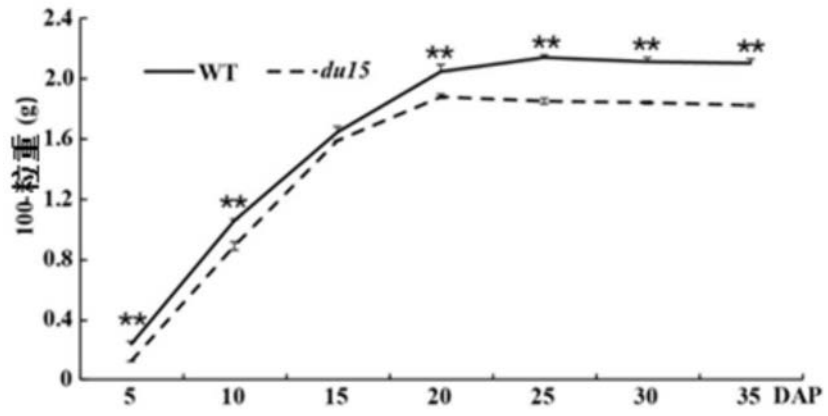
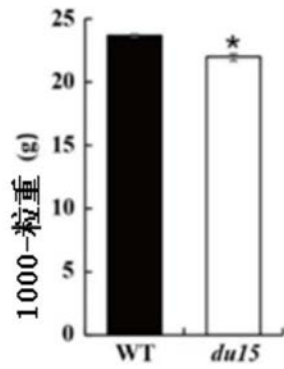


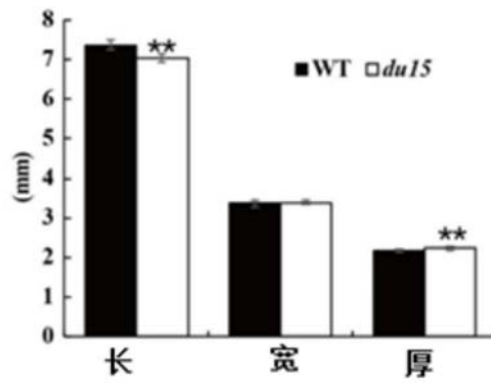
图2



(1)



(2)



(3)

图3

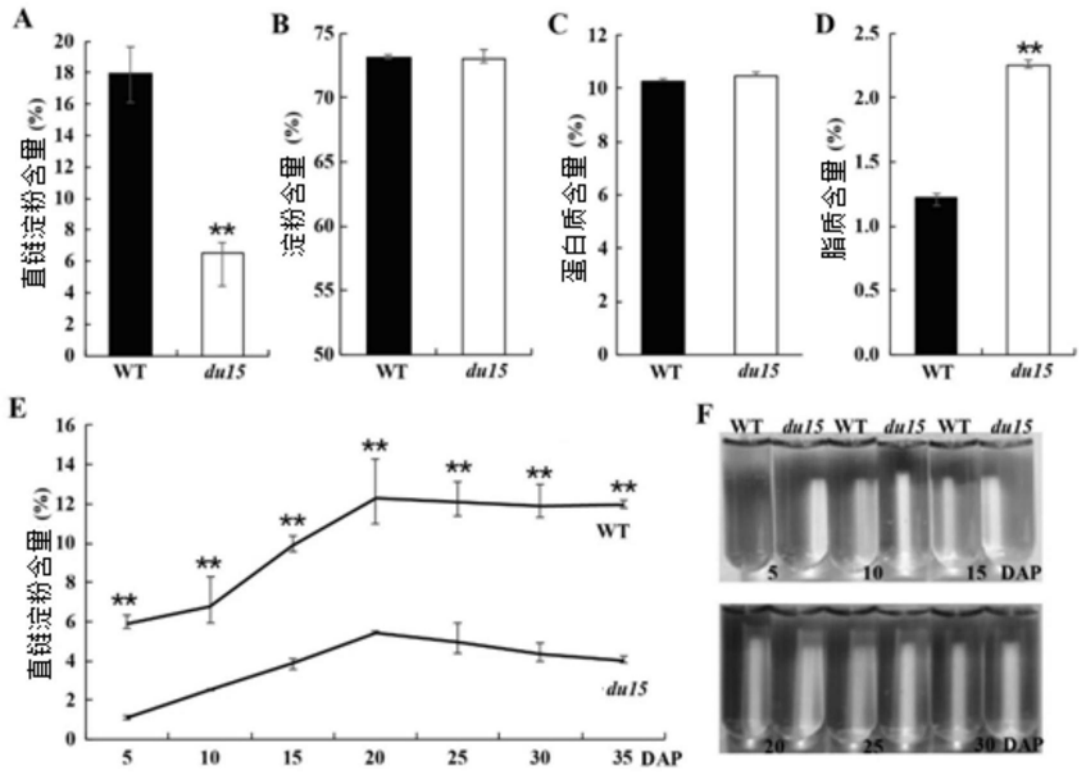


图4

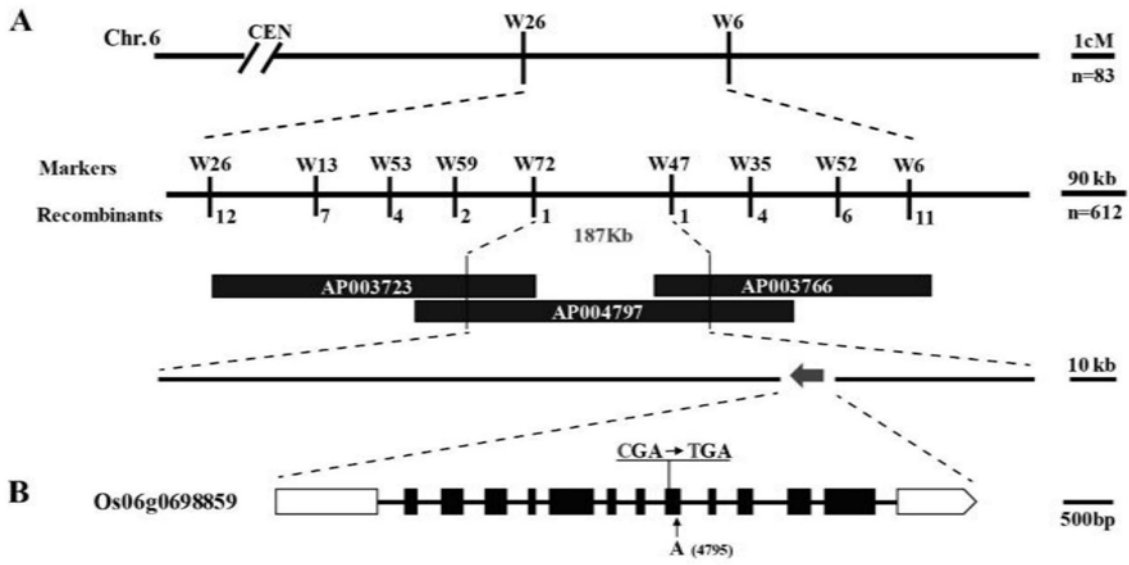
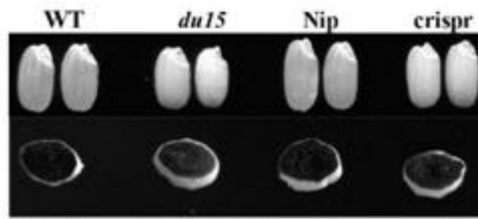
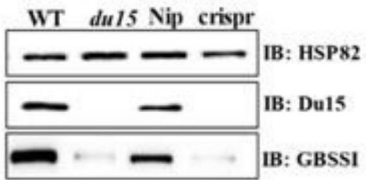


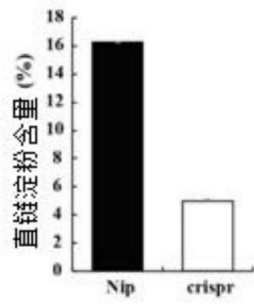
图5



A



B



C

图6