



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109652433 A

(43)申请公布日 2019.04.19

(21)申请号 201811556737.6

(22)申请日 2018.12.19

(71)申请人 南京理工大学

地址 210094 江苏省南京市孝陵卫200号

(72)发明人 宁金凤 周敏 冯昕妍 王犇

(74)专利代理机构 南京理工大学专利中心

32203

代理人 刘海霞

(51)Int.Cl.

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/66(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

序列表13页 附图8页

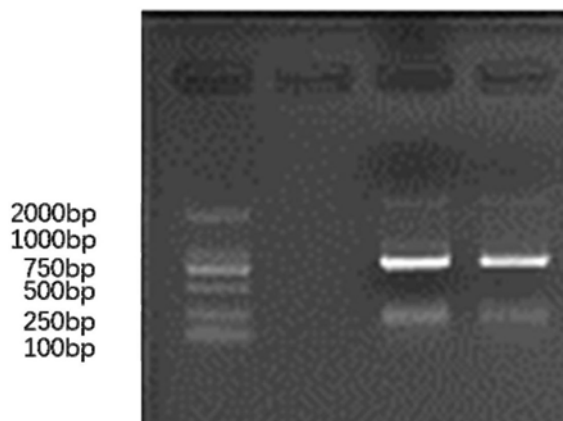
(54)发明名称

可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体及其构建方法

(57)摘要

本发明公开了一种可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体及其构建方法。所述载体通过分别构建细菌视紫红质的可溶化表达载体pET28a-ΔspMBP-bR-ApoAI*-His和高度折叠的绿色荧光蛋白表达载体pET28a(+)-sfGFP载体,经酶切将bR-ApoAI*-His整合到pET28a(+)-sfGFP载体中,得到可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体。本发明构建的融合表达载体能够实现细菌视紫红质的水可溶性和可视化表达,并且表达量较高。

PCR-product



1. 可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体,其特征在于,利用PCR扩增pET19b-sfGFP质粒,得到sfGFP,将sfGFP整合到pET28a(+)质粒中得到pET28a(+)-sfGFP载体;PCR扩增pMBP-p质粒,得到除去N端信号肽的麦芽糖结合蛋白cDNA即 Δ spMBP,将 Δ spMBP整合到pET28a(+)质粒中得到pET28a(+)- Δ spMBP载体;PCR扩增pET28a(+)-ApoAI质粒,得到截短的人类载脂蛋白cDNA即ApoAI*,将ApoAI*整合到pET28a(+)- Δ spMBP载体中得到pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-His载体;PCR扩增密码子优化过的细菌视紫红质合成基因,将其整合到pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-His载体中,得到细菌视紫红质的可溶化表达载体pET28a- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His;酶切 Δ spMBP-bR-ApoAI*-His,得到bR-ApoAI*-His,将bR-ApoAI*-His整合到pET28a(+)-sfGFP载体中得到可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体即pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体。

2. 根据权利要求1所述的可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体的构建方法,其特征在于,具体步骤如下:

步骤1, pET28a(+)-sfGFP载体的构建:

先将pET19b-sfGFP质粒进行PCR后得到sfGFP片段,用NcoI限制性核酸内切酶和NdeI限制性核酸内切酶对sfGFP和pET28a(+)质粒进行酶切,连接反应得到pET28a(+)-sfGFP载体;

步骤2, pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His载体的构建:

步骤2.1, 先将pMBP-p质粒进行PCR扩增,得到除去N端信号肽的麦芽糖结合蛋白cDNA即 Δ spMBP,用NcoI限制性核酸内切酶和NdeI限制性核酸内切酶对 Δ spMBP和pET28a(+)质粒进行酶切,连接反应得到pET28a(+)- Δ spMBP载体;

步骤2.2, 将pET28a(+)-ApoAI质粒进行PCR扩增,得到截短的人类载脂蛋白cDNA即ApoAI*,用HindIII限制性核酸内切酶和NotI限制性核酸内切酶对ApoAI*和pET28a(+)- Δ spMBP质粒进行酶切,在ApoAI*末端无终止子的情况下,引入pET28a(+)本身所带的His标签,连接反应得到pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-His载体;

步骤2.3, 将密码子优化过的细菌视紫红质DNA进行PCR扩增,用NdeI限制性核酸内切酶和HindIII限制性核酸内切酶对细菌视紫红质DNA和pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-His质粒进行酶切,连接反应得到pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His载体;

步骤3, pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体的构建:

用PstI限制性核酸内切酶和NotI限制性核酸内切酶对pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His和pET28a(+)-sfGFP质粒进行酶切,连接反应得到可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体即pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体。

3. 根据权利要求2所述的构建方法,其特征在于,步骤2.3中,所述的优化为将原有序列中的对于大肠杆菌K-12菌株而言的稀有密码子和不利于蛋白翻译的碱基替换成易于在宿主菌中翻译表达的碱基。

4. 根据权利要求1所述的可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体的表达方法,其特征在于,具体步骤如下:将可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体转化到大肠杆菌BL21(DE3)中,挑选阳性单克隆菌进行扩大培养和诱导表达,收集菌液,离心得到表达融合了高度折叠的绿色荧光蛋白sfGFP的细菌视紫红质的菌体。

5. 根据权利要求4所述的表达方法,其特征在于,所述的诱导表达过程中,采用异丙基

硫代半乳糖苷为诱导物。

6. 根据权利要求5所述的表达方法,其特征在于,所述的诱导时间为1h。

可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体及其构建方法

技术领域

[0001] 本发明属于基因载体制备技术领域,涉及一种可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体及其构建方法。

背景技术

[0002] 微生物视紫红质(Microbial Rhodopsin)是原核生物和低等真核生物中普遍存在的光感受器,其中以古细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin,bR)为代表。bR是古细菌中的质子泵,主要负责捕获光能并利用此能量实现质子的跨细胞膜运输。当其配体,也就是视黄醇分子(Retinol),吸收一个光子从反式变为顺式结构时,将导致视紫红质蛋白质发生构象变化并籍此实现质子的跨膜运输。然而由于视紫红质是一类由七个跨膜螺旋组成的整合膜蛋白,它的结构功能的研究受阻于其水不溶性以及来自表面活性剂的干扰,尤其是光化学循环中视紫红质蛋白质的构象变化细节及一系列中间态信息还有待深入研究。

[0003] 但是从生物组织中提取的细菌视紫红质质量非常少,若要达到一定的剂量,研究成本很高。文献1(POMPEJUS M,et al.High-yield production of bacteriorhodopsin via expression of a synthetic gene in Escherichia coli[J].The FEBS Journal,1993,211(1-2):27-35.),在大肠杆菌中表达的细菌视紫红质以包涵体形式存在,其天然构象被破坏,而且表达量不高。因此需要寻找细菌视紫红质大量表达的方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体及其构建方法。该载体以pET28a(+)质粒作为骨架,在细菌视紫红质N端连接了高度折叠的绿色荧光蛋白sfGFP,在细菌视紫红质C端连接截短的人载脂蛋白ApoAI*包裹细菌视紫红质的脂溶性表面,使bR蛋白实现水溶性,且能使bR蛋白表达可视化。

[0005] 实现本发明的目的的技术方案如下:

[0006] 可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体,利用PCR扩增pET19b-sfGFP质粒,得到sfGFP,将sfGFP整合到pET28a(+)质粒中得到pET28a(+)-sfGFP载体;PCR扩增pMBP-p质粒,得到除去N端信号肽的麦芽糖结合蛋白cDNA即 Δ spMBP,将 Δ spMBP整合到pET28a(+)质粒中得到pET28a(+)- Δ spMBP载体;PCR扩增pET28a(+)-ApoAI质粒,得到截短的人类载脂蛋白cDNA即ApoAI*,将ApoAI*整合到pET28a(+)- Δ spMBP载体中得到pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-His载体;PCR扩增密码子优化过的细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin,bR)合成基因,将其整合到pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-His载体中,得到细菌视紫红质的可溶化表达载体pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His;酶切pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His,得到bR-ApoAI*-His,将bR-ApoAI*-His整合到pET28a(+)-sfGFP载体中得到可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体即pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体。

[0007] 本发明进一步提供上述可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体的构建方法,具体步骤如下:

[0008] 步骤1, pET28a (+)-sfGFP载体的构建:

[0009] 先将pET19b-sfGFP质粒进行PCR后得到sfGFP (SEQ.NO.1) 片段, 用NcoI限制性核酸内切酶和NdeI限制性核酸内切酶对sfGFP和pET28a (+) 质粒进行酶切, 连接反应得到pET28a (+)-sfGFP载体;

[0010] 步骤2, pET28a (+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His (SEQ.NO.2) 载体的构建:

[0011] 步骤2.1, 先将pMBP-p质粒进行PCR扩增, 得到除去N端信号肽的麦芽糖结合蛋白cDNA即 Δ spMBP (SEQ.NO.3), 用NcoI限制性核酸内切酶和NdeI限制性核酸内切酶对 Δ spMBP和pET28a (+) 质粒进行酶切, 连接反应得到pET28a (+)- Δ spMBP载体;

[0012] 步骤2.2, 将pET28a (+)-ApoAI质粒进行PCR扩增, 得到截短的人类载脂蛋白cDNA即ApoAI* (SEQ.NO.4), 用HindIII限制性核酸内切酶和NotI限制性核酸内切酶对ApoAI*和pET28a (+)- Δ spMBP质粒进行酶切, 在ApoAI*末端无终止子的情况下, 引入pET28a (+) 本身所带的His标签, 连接反应得到pET28a (+)- Δ spMBP-ApoAI*-His载体;

[0013] 步骤2.3, 将密码子优化过的细菌视紫红质DNA (SEQ.NO.5) 进行PCR扩增, 用NdeI限制性核酸内切酶和HindIII限制性核酸内切酶对细菌视紫红质DNA和pET28a (+)- Δ spMBP-ApoAI*-His质粒进行酶切, 连接反应得到pET28a (+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His载体;

[0014] 步骤3, pET28a (+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His (SEQ.NO.6) 载体的构建:

[0015] 用PstI限制性核酸内切酶和NotI限制性核酸内切酶对 Δ spMBP-bR-ApoAI*-His和pET28a (+)-sfGFP质粒进行酶切, 连接反应得到可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体即pET28a (+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体。

[0016] 步骤2.3中, 所述的优化为将原有序列中的对于大肠杆菌K-12菌株而言的稀有密码子和不利于蛋白翻译的碱基替换成易于在宿主菌中翻译表达的碱基, 即增强mRNA的稳定性、降低mRNA翻译成蛋白时中断的可能性。

[0017] 进一步地, 本发明还提供上述可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体的表达方法, 具体步骤如下: 将可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体pET28a (+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 中, 挑选阳性单克隆菌进行扩大培养和诱导表达, 收集菌液, 离心得到表达高度折叠的绿色荧光蛋白sfGFP和细菌视紫红质的菌体。

[0018] 优选地, 所述的诱导表达过程中, 采用异丙基硫代半乳糖苷为诱导物, 诱导时间为1h。

[0019] 本发明与现有技术相比, 具有以下优点:

[0020] (1) 本发明的融合表达载体实现了脂溶性蛋白bR蛋白的水溶性表达;

[0021] (2) 在表达载体中添加了高度折叠的绿色荧光蛋白sfGFP, 其作为一个融合标签和报告基因片段, 与其融合表达后的bR蛋白在表达蛋白时很好地折叠, 提高蛋白的稳定性, 同时sfGFP作为绿色荧光蛋白, 在绿光激发下会显示绿色荧光, 实现了bR蛋白的可视化表达, 无需经过Western Blot验证试验。

附图说明

[0022] 图1为psfGFP-p PCR琼脂糖凝胶电泳结果图。

[0023] 图2为pET28a (+)-sfGFP双酶切验证结果图。

[0024] 图3为构建完成的pET28a (+)-sfGFP质粒图谱。

- [0025] 图4为细菌视紫红质DNA的PCR扩增后的琼脂糖凝胶电泳图。
- [0026] 图5为细菌视紫红质和pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-6His载体酶切后琼脂糖凝胶电泳图。
- [0027] 图6为pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-6His载体示意图。
- [0028] 图7为pET28a(+)-sfGFP质粒酶切的琼脂糖凝胶电泳结果图。
- [0029] 图8为pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His双酶切结果图。
- [0030] 图9为构建完成的pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His质粒图谱。
- [0031] 图10为可溶性验证的Western Blot结果图。
- [0032] 图11为可视化表达的荧光成像结果图。

具体实施方式

[0033] 下面结合实施例和附图对本发明作进一步详述。实施本发明的过程、条件、试剂、实验方法等,除以下专门提及的内容之外,均为本领域的普遍知识和公知常识,本发明没有特别限制内容。

[0034] 实施例中所用材料如下:

[0035] 1. 细胞来源

[0036] 大肠杆菌DH5 α 、BL21 (DE3) 细胞购自武汉灵淼生物公司。

[0037] 2. 质粒来源

[0038] pET19b-sfGFP质粒购自上海北诺生物科技公司;pMBP-p质粒购自武汉灵淼生物公司;pET28a(+)、pET28a(+)-ApoAI质粒购自MERK公司。

[0039] 3. 引物来源

[0040] 合成引物SEQ.NO.7、SEQ.NO.8来自擎科生物有限公司,SEQ.NO.9、SEQ.NO.10、SEQ.NO.11、SEQ.NO.12来自上海生工有限公司。

[0041] 4. 主要试剂

[0042] 胰蛋白胨、酵母提取物、NaCl、Tris-HCl均购自Sigma公司;限制性核酸内切酶购自Takara公司;rTaq酶、T4连接酶购自Takara公司。质粒小提试剂盒、凝胶回收试剂盒购自Axygen公司。兔源Anti-His mAb购自CST公司,兔抗HRP标记二抗购自Jackson公司;显影液及定影液购自Tanon公司。

[0043] 实施例1

[0044] 1、高折叠绿色荧光蛋白融合载体pET28a(+)-sfGFP构建方法:

[0045] a) 根据pET19b-sfGFP质粒,设计1对引物。引物上游的寡核苷酸序列如SEQ.NO.7所示,引物下游的寡核苷酸序列如SEQ.NO.8所示。以psfGFP-p质粒为模板,经PCR反应,得到sfGFP片段。PCR反应体系配置如表1所示。

[0046] 表1PCR反应体系配制表

[0047]

试剂名称	储备液浓度	加入PCR反应体系的体积(μ L)
5 \times HF Buffer	5 \times	10
dNTP Mix	10mmol/L	2
Forward primer	10 μ mol/L	1

Reverse primer	10 μ mol/L	1
Phusion酶	5U/ μ L	0.5
DNA模板	50ng/ μ L	1
MilliQ H ₂ O		加MilliQ H ₂ O至终体积50 μ L

[0048] PCR结果如图1所示。第一道为Marker,第二道为目的片段sfGFP.

[0049] b) 回收PCR产物sfGFP片段后,用NcoI和NdeI双酶切回收产物和pET28a(+)载体,后进行琼脂糖凝胶电泳,回收酶切产物;将回收的sfGFP和pET28a(+)载体片段,按摩尔比为3:1比例加入小离心管中,加入T4连接酶,在22 $^{\circ}$ C下连接1h。

[0050] c) 以上连接产物用42 $^{\circ}$ C热激法转化入100 μ L DH5 α 感受态细胞,加入700 μ L LB培养基后置于37 $^{\circ}$ C摇床,在200转/分钟下培养40分钟。

[0051] d) 上述菌液在12000转/分钟转速下离心1分钟后,吸去700 μ L上清;用移液器轻轻吹吸剩余培养基后涂布在含有卡那霉素的LB固体平板上,倒置于37 $^{\circ}$ C培养箱中,培养12小时。

[0052] e) 挑取上述平板中的单菌落,小量扩增后提取质粒,用NcoI和NdeI单酶切双酶切所提取质粒后经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果如图2经测序鉴定正确后,得到pET28a(+)-sfGFP载体。构建得到的pET28a(+)-sfGFP质粒图谱如图3所示。

[0053] 2、pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-6His (MBA) 载体的构建方法:

[0054] 2.1. 细菌视紫红质的PCR扩增。

[0055] 按照表2构建PCR扩增反应体系:

[0056] 表2细菌视紫红质PCR反应体系配制表

	试剂名称	储备液浓度	体积(μ L)
	BacteriorhodopsinFP (SEQ.NO.9)	10 μ mol/L	2 μ L
	BacteriorhodopsinRP (SEQ.NO.10)	10 μ mol/L	2 μ L
[0057]	5X HF Buffer	5X	10 μ L
	dNTP Mix	10mmol/L	3 μ L
	ddH ₂ O	--	30.5 μ L
	Template	50ng/ μ L	2 μ L
	Phusion enzyme	5 U/ μ L	0.5 μ L
	Total	--	50 μ L

[0058] PCR结果如图4所示, lane1为DL5000DNAMarker, lane3、4为细菌视紫红质PCR产物。

[0059] 2.2. pET28a(+)- Δ spMBP的构建方法:

[0060] a) 根据从武汉淼灵生物所购得的pMBP-p质粒,以pMBP-p质粒为模板,经PCR反应,得到除去N端信号肽的麦芽糖结合蛋白cDNA。PCR反应体系配置如表3所示。

[0061] 表3MBP-cDNA的PCR反应体系配制表

试剂名称	储备液浓度	加入 PCR 反应体系的体积 (μL)
5 \times HF Buffer	5 \times	10
dNTP Mix	10mmol/L	2
spMBPFP (SEQ.NO.11)	10 $\mu\text{mol/L}$	2.5
spMBPRP (SEQ.NO.12)	10 $\mu\text{mol/L}$	2.5
Phusionenzyme	5 U/ μL	0.5
DNA 模板	50 ng/ μL	2
MilliQ H ₂ O		加 MilliQ H ₂ O 至终体积 50 μL

[0062] b) 回收除去N端信号肽的麦芽糖结合蛋白cDNA,用NcoI和NdeI双酶切回收产物和pET28a (+)载体,后进行琼脂糖凝胶电泳,回收酶切产物;将回收的除去N端信号肽的麦芽糖结合蛋白cDNA和pET28a (+)载体片段,按浓度比为3:1比例加入小离心管中,加入T4连接酶,在22 $^{\circ}\text{C}$ 下连接2h。

[0064] c) 以上连接产物取20 μL 用42 $^{\circ}\text{C}$ 热激法转化入100 μL DH5 α 感受态细胞,加入700 μL LB培养基后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床,在200转/分钟下培养45分钟。

[0065] d) 上述菌液在4000转/分钟转速下离心1分钟后,吸去700 μL 上清;用移液器轻轻吹吸剩余培养基后涂布在含有卡那霉素的LB固体平板上,倒置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,培养12小时。

[0066] e) 挑取上述平板中的单菌落,少量扩增后提取质粒,用NcoI和NdeI单酶切双酶切所提取质粒后经琼脂糖凝胶电泳鉴定,经测序鉴定正确后,得到pET28a (+) - Δ spMBP载体。

[0067] 2.3.pET28a (+) - Δ spMBP-ApoAI*-His构建方法:

[0068] a) 根据购自MERK的pET28a (+) -ApoAI质粒,根据pET28a (+) - Δ spMBP质粒的多克隆位点特点,在ApoAI*的上游设计引入Hind III限制性核酸内切酶位点,详细序列见SEQ.NO.13;下游设计引入NotI限制性核酸内切酶位点,详细序列见SEQ.NO.14。在ApoAI*末端无终止子的情况下,可引入pET28a (+)本身所带的His标签。以原有pET28a (+) -ApoAI载体为模板,经PCR反应,得到截短的人类载脂蛋白ApoAI* (Δ 1-43)的cDNA。

[0069] b) 回收截短人类载脂蛋白ApoAI* (Δ 1-43)的cDNA,用Hind III和NotI双酶切回收产物和pET28a (+) - Δ spMBP载体,后进行琼脂糖凝胶电泳,回收酶切产物;将回收的截短人类载脂蛋白ApoAI* (Δ 1-43)的cDNA和pET28a (+) - Δ spMBP载体片段,按浓度比为3:1比例加入小离心管中,加入T4连接酶,在22 $^{\circ}\text{C}$ 下连接2h。

[0070] c) 以上连接产物取20 μL 用42 $^{\circ}\text{C}$ 热激法转化入100 μL DH5 α 感受态细胞,加入700 μL LB培养基后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床,在200转/分钟下培养45分钟。

[0071] d) 上述菌液在4000转/分钟转速下离心1分钟后,吸去700 μL 上清;用移液器轻轻吹吸剩余培养基后涂布在含有卡那霉素的LB固体平板上,倒置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,培养12小时。

[0072] e) 挑取上述平板中的单菌落,少量扩增后提取质粒,用Hind III和NotI单酶切双酶切所提取质粒后经琼脂糖凝胶电泳鉴定,经测序鉴定正确后,得到pET28a (+) - Δ spMBP-ApoAI*-His载体。

[0073] 2.4.pET28a (+) - Δ spMBP-bR-ApoAI*-6His载体的构建

[0074] a) 回收1中PCR得到的bR的cDNA,用NdeI和HindIII双酶切回收产物和pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-His载体,后进行琼脂糖凝胶电泳,回收酶切产物;将回收的细菌视紫红质DNA(bR)的cDNA和pET28a(+)- Δ spMBP-ApoAI*-His载体片段,按浓度比为3:1比例加入小离心管中,加入T4连接酶,在22℃下连接2h。

[0075] b) 以上连接产物取20 μ L用42℃热激法转化入100 μ L DH5 α 感受态细胞,加入700 μ L LB培养基后置于37℃摇床,在200转/分钟下培养45分钟。

[0076] c) 上述菌液在4000转/分钟转速下离心1分钟后,吸去700 μ L上清;用移液器轻轻吹吸剩余培养基后涂布在含有卡那霉素的LB固体平板上,倒置于37℃培养箱中,培养12小时。

[0077] d) 挑取上述平板中的单菌落,少量扩增后提取质粒,用NdeI和HindIII单酶切双酶切所提取质粒后经琼脂糖凝胶电泳鉴定,经测序鉴定正确后,得到的pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-His载体,其中 Δ spMBP-bR-ApoAI*-His段核苷酸序列如序列表SEQ NO.15。构建得到的pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-6His质粒图谱如图6所示。

[0078] 3、目的蛋白融合载体pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His构建方法:

[0079] a) 用PstI限制性核酸内切酶和NotI限制性核酸内切酶对pET28a(+)- Δ spMBP-bR-ApoAI*-6His质粒和pET28a(+)-sfGFP质粒进行酶切,进行琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图7。连接反应得到pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体;

[0080] 结果如图7所示,第一道为Marker,第二道为bR-ApoAI*-His,目的片段长度为1415bp。

[0081] b) 将pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His载体(酶连产物)进行42℃热激法转化入100 μ L DH5 α 感受态细胞后,加入700 μ L LB培养基后置于37℃摇床,在200转/分钟下培养40分钟。

[0082] c) 上述菌液在12000转/分钟转速下离心1分钟后,吸去700 μ L上清;用移液器轻轻吹吸剩余培养基后涂布在含有卡那霉素的LB固体平板上,倒置于37℃培养箱中,培养12小时。

[0083] d) 挑取上述平板中的单菌落,少量扩增后提取质粒,用NcoI和NotI单酶切双酶切后经琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果如图8。构建得到的pET28a(+)-sfGFP-bR-ApoAI*-His(MBA)质粒图谱如图9所示。

[0084] 4、融合蛋白水溶性验证及可视化表达

[0085] 选取对数生长期作为诱导起始点。37℃下培养至OD₆₀₀达到0.8-1.0,在培养的七瓶菌液中分别加入浓度为0mM、0.8mM、1mM、1.5mM、2mM、3mM的IPTG(异丙基硫代半乳糖苷),后每间隔一小时4000转/分钟离心15分钟收集菌体。将菌体重悬于PBS缓冲液中,加入2 \times Loading Buffer(含 β -Me)后混合均匀,经过4000转/分钟离心30分钟,即得到可溶性融合表达离子通道蛋白sfGFP-bR-ApoAI*-His的样品。

[0086] 选取对数生长期作为诱导起始点。37℃下培养至OD₆₀₀达到0.8-1.0,收全菌按上述方法制备蛋白样品5。

[0087] 加入1mM IPTG(异丙基硫代半乳糖苷)诱导一个半小时后收菌,加入100mM配制好的PMSF(苯甲基磺酰氟,一种蛋白酶抑制剂)溶液4000转/分钟、4℃离心15分钟后取沉淀(沉淀1)重悬于PBS缓冲液中,加入2 \times Loading Buffer(含 β -Me)后混合均匀,95℃热变性7分钟,经过12000转/分钟离心30分钟,取上清液为蛋白样品6;

[0088] 另将上清液取出加入100mM配制好的PMSF(苯甲基磺酰氟-蛋白酶抑制剂)溶液20000g、4℃离心两小时,取沉淀(沉淀2)按上述步骤制备蛋白样品7,取上清加入PBS混合均匀,2s一次,间隔4s超声破碎15分钟,取样按步骤2制备蛋白样品8。

[0089] 与此同时,进行对照样品的制备。未诱导的转入sfGFP-bR-ApoAI*-His质粒的大肠杆菌BL21(DE3)按上述相同的方法制备四种蛋白样品1、2、3、4。

[0090] 负对照为未转入sfGFP-bR-ApoAI*-His质粒的大肠杆菌二次接种收菌后制备的样品。

[0091] 将制得的样品1、2、3、4、5、6、7、8进行SDS-PAGE跑胶后进行Western Blot得到图10。

[0092] 上述样品在制备过程中每一步都会有PBS重悬的步骤,此时在CCD下进行荧光成像,绿色光激发。图11为荧光图像,由图中可以看出,空白对照和未诱导前全菌都没有荧光,说明bR蛋白未表达。而在已诱导全菌中可看到荧光,说明bR蛋白表达;在沉淀样品中无荧光,但是上清液中有荧光,说明bR蛋白是水溶性的。

序列表

<110> 南京理工大学

<120> 可视化的离子通道蛋白bR可溶性融合表达载体及其构建方法

<160> 16

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 711

<212> DNA

<213> 大肠杆菌 (*Escherichia coli*)

<400> 1

```
tctaaagggtg aagaactggt caccgggtgtt gttecgatcc tggttgaact ggacgggtgac 60
gttaacgggtc acaaattctc tgttcgtggt gaaggtgaag gtgacgctac caacggtaaa 120
ctgaccctga aattcatctg caccaccgggt aaactgccgg ttccgtggcc gaccctgggtt 180
accaccctga cctacgggtg tcagtgettc tctcgttacc cggaccacat gaaacgtcac 240
gacttcttca aatctgctat gccggaaggt tacgttcagg aacgtaccat ctctttcaaa 300
gacgacggta cctacaaaac ccgtgctgaa gttaaattcg aaggtgacac cctggttaac 360
cgtatcgaac tgaaaggat cgacttcaaa gaagacggta acatcctggg tcacaaactg 420
gaatacaact tcaactctca caacgtttac atcaccgctg acaaacagaa aaacggtatc 480
aaagctaact tcaaaatccg tcacaacggt gaagacgggt ctgttcagct ggctgaccac 540
taccagcaga acaccccgat cggtgacgggt ccggttctgc tgccggacaa ccaactacctg 600
tctaccagct ctgttctgct taaagacccg aacgaaaaac gtgaccacat ggttctgctg 660
gaattcggtta ccgctgctgg taccacccac ggtatggacg aactgtacaa a 711
```

<210> 2

<211> 7710

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

```
ccaccaccac cactgagatc cggctgctaa caaagcccga aaggaagctg agttggctgc 60
tgccaccgct gagcaataac tagcataacc cttggggcc tctaaacggg tcttgagggg 120
ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg attggcgaat gggacgcgcc ctgtagcggc 180
gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc 240
ctagcggccg ctcccttctc tttcttccct tctttctctg ccacgttctc cggctttccc 300
cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc 360
gaccccaaaa aacttgatta gggatgatggg tcacgtagtg ggccatcgcc ctgatagacg 420
gtttttcgcc ctttgacggt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt gttccaaact 480
ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt tataaggat tttgccgatt 540
tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa 600
atattaacgt ttacaatttc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctatt 660
```

tgtttatfff tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgaattaatt cttagaaaaa 720
 ctcatcgagc atcaaatgaa actgcaatff attcatatca ggattatcaa taccatattf 780
 ttgaaaaagc cgtttctgta atgaaggaga aaactcaccg aggcagttcc ataggatggc 840
 aagatcctgg tatcggctg cgattccgac tcgtccaaca tcaatacaac ctattaatff 900
 cccctcgtca aaaataaggt tatcaagtga gaaatcacca tgagtgcaga ctgaatccgg 960
 tgagaatggc aaaagtttat gcatttctff ccagacttgt tcaacaggcc agccattacg 1020
 ctcgtcatca aaatcactcg catcaaccaa accgttattc attcgtgatt gcgcctgagc 1080
 gagacgaaat acgcgatcgc tgttaaaagg acaattacaa acaggaatcg aatgcaaccg 1140
 gcgcaggaac actgccagcg catcaacaat atfftcacct gaatcaggat attcttctaa 1200
 tacctggaat gctgttttcc cggggatcgc agtggtgagt aacctgcat catcaggagt 1260
 acggataaaa tgcttgatgg tcggaagagg cataaatcc gtcagccagt ttagtctgac 1320
 catctcatct gtaacatcat tggcaacgct acctttgcca tgtttcagaa acaactctgg 1380
 cgcacggggc ttcccataca atcgatagat tgtcgcacct gattgcccg cattatcgcg 1440
 agcccattta taccatata aatcagcatc catgttggaa tttaatcgcg gcctagagca 1500
 agacgtttcc cgttgaatat ggctcataac accccttght ttactgttta tgtaagcaga 1560
 cagttttatt gttcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag 1620
 accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatcctff ttttctgcgc gtaatctgct 1680
 gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag cggtggtttg tttgccgat caagagctac 1740
 caactctfff tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc 1800
 tagttagacc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgct acatacctcg 1860
 ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtgcgca taagtcgtgt cttaccgggt 1920
 tggactcaag acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt 1980
 gcacacagcc cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc 2040
 tatgagaaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca 2100
 gggctcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata 2160
 gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg 2220
 ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctffff acggttctct gccttttgcct 2280
 ggccttttgc tcacatgttc tttctgctg tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta 2340
 ccgcctttga gtgagctgat accgctgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag 2400
 tgagcgagga agcggaaagag cgctgatgc ggtatffct cttacgcat ctgtcgggta 2460
 tttcacaccg catatatggt gcaactctag tacaactctg tctgatccg catagttaag 2520
 ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgggctatgg ctgcgccccg acaccgccca 2580
 acaccgctg acgcgcctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct 2640
 gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg 2700
 aggcagctgc ggtaaagctc atcagcgtgg tcgtgaagcg attcacagat gtctgcctgt 2760
 tcatccgctt ccagctcgtt gagtttctcc agaagcgtta atgtctggct tctgataaag 2820
 cgggccatgt taaggcggtt ttttctctgt ttggtcactg atgcctccgt gtaaggggga 2880
 tttctgttca tgggggtaat gataccgatg aaacgagaga ggatgctcac gatacgggtt 2940
 actgatgatg aacatgcccg gttactggaa cgttgtgagg gtaaacaact ggcggtatgg 3000

atgcggcggg accagagaaa aatcactcag ggtcaatgcc agcgcttcgt taatacagat 3060
gtaggtgttc cacagggtag ccagcagcat cctgcgatgc agatccggaa cataatggtg 3120
cagggcgctg acttccgcgt ttccagactt tacgaaacac ggaaaccgaa gaccattcat 3180
gttgttgctc aggtcgcaga cgttttgag cagcagtcgc ttcacgttcg ctgcggtatc 3240
ggtgattcat tctgctaacc agtaaggcaa ccccgccagc ctagccgggt cctcaacgac 3300
aggagcacga tcatgcgcac ccgtggggcc gccatgccgg cgataatggc ctgcttctcg 3360
ccgaaacggt tgggtggcggg accagtgcag aaggcttgag cgagggcgtg caagattccg 3420
aataaccgaa gcgacaggcc gatcatcgtc gcgctccagc gaaagcggtc ctgcgccgaa 3480
atgaccacga gcgctgccgg cacctgtcct acgagttgca tgataaagaa gacagtcata 3540
agtgcggcga cgatagtcac gccccgcgc caccggaagg agctgactgg gttgaaggct 3600
ctcaagggca tcggtcgaga tcccgggtgc taatgagtga gctaacttac attaattgag 3660
ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc 3720
ggccaacgcg cggggagagg cggtttgct attgggcgc agggtggttt ttcttttcac 3780
cagtgcgacg ggcaacagct gattgccctt caccgcctgg cctgagaga gttgcagcaa 3840
gcggtccacg ctggtttgcc ccagcaggcg aaaatcctgt ttgatggtgg ttaacggcgg 3900
gatataacat gagctgtctt cggtatcgtc gtatcccact accgagatat ccgcaccaac 3960
gcgcagcccc gactcggtaa tggcgcgcat tgcgccagc gccatctgat cgttggaac 4020
cagcatcgca gtgggaacga tgccctcatt cagcatttgc atggtttgtt gaaaaccgga 4080
catggcactc cagtcgcctt cccgttcgc tatcggtga atttgattgc gagtgcagata 4140
tttatgccag ccagccagac gcagacgcgc cgagacagaa cttaatgggc ccgctaacag 4200
cgcgatttgc tggtgacca atgcgaccag atgctccacg cccagtcgcg taccgtcttc 4260
atgggagaaa ataactgt tgatgggtgt ctggtcagag acatcaagaa ataacgccgg 4320
aacattagtg caggcagctt ccacagcaat ggcactctgg tcatccagcg gatagttaat 4380
gatcagccca ctgacgcgtt gcgcgagaag attgtgcacc gccgctttac aggcttcgac 4440
gccgcttcgt tctaccatcg acaccaccac gctggcacc agttgatcgg cgcgagattt 4500
aatcgccgcg acaatttgcg acggcgcgtg caggccaga ctggaggtgg caacgccaat 4560
cagcaacgac tgtttgccg ccagttgtt tgccacgcgg ttgggaatgt aattcagctc 4620
cgccatcgcc gcttccactt tttcccgcgt tttcgcagaa acgtggctgg cctggttcac 4680
cacgcgggaa acggtctgat aagagacacc ggcatactct gcgacatcgt ataacgttac 4740
tggtttcaca ttcaccacc tgaattgact ctcttcggg cgctatcatg ccataccgag 4800
aaaggttttg cgccattcga tgggtgccgg gatctgcag ctctccctta tgcgactcct 4860
gcattaggaa gcagcccagt agtaggttga ggccgttgag caccgccgc gcaaggaatg 4920
gtgcatgcaa ggagatggcg cccaacagtc cccggccac ggggcctgcc accataccca 4980
cgccgaaaca agcgtcatg agcccgaagt ggcgagccc atcttccca tcggtgatgt 5040
cggcgatata ggcgccagca accgcacctg tggcgcgggt gatgccggc acgatgcgtc 5100
cggcgtagag gatcgagatc tcgatcccgc gaaattaata cgactcacta taggggaatt 5160
gtgagcggat aacaattccc ctctagattt aagaaggaga tataccatgg gcaaatcga 5220
gaaagatacc ggaattaaag tcaccgttga gcatccgat aaactggaag agaaattccc 5280
acaggttgcg gcaactggcg atggccctga cattatcttc tgggcacacg accgctttgg 5340

tggctacgct caatctggcc tgttggctga aatcaccccg gacaaagcgt tccaggacaa 5400
gctgtatccg tttacctggg atgccgtacg ttacaacggc aagctgattg cttacccgat 5460
cgctgttgaa gcgttatcgc tgatttataa caaagatctg ctgccgaacc cgccaaaaac 5520
ctgggaagag atcccggcgc tggataaaga actgaaagcg aaaggtaaga gcgctgat 5580
gttcaacctg caagaaccgt acttcacctg gccgctgatt gctgctgacg ggggttatgc 5640
gttcaagtat gaaaacggca agtacgacat taaagacgtg ggcgtggata acgctggcgc 5700
gaaagcgggt ctgaccttcc tggttgacct gattaaaaac aaacacatga atgcagacac 5760
cgattactcc atcgcagaag ctgcctttaa taaaggcgaa acagcgatga ccatcaacgg 5820
cccgtgggca tggccaaca tcgacaccag caaagtgaat tatggtgtaa cggtactgcc 5880
gaccttcaag ggtcaacat ccaaaccgtt cgttggcgtg ctgagcgcag gtattaacgc 5940
cgccagtccg aacaaaagagc tggcgaaaga gttctcga aactatctgc tgactgatga 6000
aggtctggaa gcggttaata aagacaaacc gctgggtgcc gtagcctga agtcttacga 6060
ggaagagttg gcgaaagatc cacgtattgc cgccaccgtg gaaaacgcc agaaaggatga 6120
aatcatgccg aacatcccgc agatgtccgc tttctggtat gccgtgcgta ctgcggtgat 6180
caacgccgcc agcggctcgc agactgtcga tgaagccctg aaagacgcgc agactaatct 6240
gcagggatct ggcagtgggt ctctggtgcc gcgcggcagc catatgctgg aactgctgcc 6300
gaccgcggtg gaagggtgta gccaggcgca gattaccgtt cgtccggaat ggatctggct 6360
ggcgtgggt accgcgctga tgggcctggg taccctgtat tttctggtga aaggatggg 6420
cgtgagcgat ccgatgcga aaaaatttta tgcgatcacc accctggtgc cggcgatcgc 6480
gtttaccatg tatctgagca tgctgctggg ttatggcctg accatggtgc cgtttggcgg 6540
cgaacagaac ccgatttatt gggcgcgcta tgcggattgg ctgtttacca ccccgctgct 6600
gctgctggat ctggcgtgc tggatgatgc ggatcagggc accatcctgg cgctggtggg 6660
cgcgatggc atcatgatcg gtaccggcct ggtgggcgcg ctgaccaaag tgtatagcta 6720
tcgttttgtg tggatggcga ttagcaccgc ggcatgctg tatattctgt atgtgctggt 6780
ttttggttt accagcaaag cggaaagcat gcgtccgga gtggcgagca ctttaaagt 6840
gctgcgtaac gtgaccgtgg tgctgtggag cgcgtatccg gtggtgtggc tgattggtag 6900
cgaaggcgcg ggtattgtgc cgctgaatat cgaaaccctg ctgtttatgg tgctggatgt 6960
gagcgcgaaa gtgggttttg gcctgattct gctgcgtagc cgtgcgattt ttggtgaagc 7020
ggaagcggcg gaaccgagcg cgggtgatgg cgcggcggcg accagcgata agcttgatga 7080
cgacgacaag atgaagctcc ttgacaactg ggacagcgtg acctctacct tcagtaaact 7140
tcgcaacaa ctgggccccg tgacgcagga attctgggac aacctgaaa aagaaaccga 7200
gggactgctg caggaaatgt ccaaagattt agaagagtg aaggccaagg ttcagccata 7260
tctcgatgac tttcagaaaa aatggcagga agagatggaa ttatatcgtc aaaagggtga 7320
accgctgctg gcggaactgc aagagggggc acgcaaaaa ctccatgagc tccaagagaa 7380
gctcagccca ttaggcgaag aatgcgcga tcgcgccgt gcacatgtt atgcactccg 7440
gactcatttg gcgccgtatt cggatgaact tcgccagcgt ttggccgcac gtctcgaggc 7500
gctgaaagaa aacgggggtg cccgcttggc tgagtaccac gcgaaagcga cagaacacct 7560
gagcaccttg agcgaaaaag cgaaaccggc gctggaagat ctacgccagg gcttattgcc 7620
tgttcttgag agctttaaag tcagttttct gtcagctctg gaagaatata ctaaaaagct 7680

gaatacccag gcggccgcac tcgagcacca 7710
 <210> 3
 <211> 1039
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)
 <400> 3
 atgggcaaat tcgagaaaga taccggaatt aaagtcaccg ttgagcatcc ggataaactg 60
 gaagagaaat tcccacaggt tgcggcaact ggcgatggcc ctgacattat cttctgggca 120
 cacgaccgct ttggtggcta cgctcaatct ggctgttg ctgaaatcac cccggacaaa 180
 gcgttccagg acaagctgta tccgtttacc tgggatgccg tacgttaca cggcaagctg 240
 attgcttacc cgatcgctgt tgaagcgta tcgctgatt ataacaaga tctgctgccg 300
 aaccgccea aaacctgga agagatccc gcgctggata aagaactgaa agcgaaaggt 360
 aagagcgcgc tgatgttcaa cctgcaagaa ccgtacttca cctggccgct gattgctgct 420
 gacgggggtt atgcgttcaa gtatgaaaac ggcaagtacg acattaaaga cgtgggcgtg 480
 gataacgctg gcgcgaaagc gggctctgacc ttctggttg acctgattaa aaacaacac 540
 atgaatgcag acaccgatta ctccatcgca gaagctgcct ttaataaagg cgaaacagcg 600
 atgaccatca acggcccgtg ggcatggtcc aacatcgaca ccagcaaagt gaattatggt 660
 gtaacggtac tgccgacctt caagggtcaa ccatcacaac cgttcgttg cgtgctgagc 720
 gcaggtatta acgcccag tccgaacaaa gagctggcga aagagttcct cgaaaactat 780
 ctgctgactg atgaaggctt ggaagcgtt aataaagaca aaccgctggg tgccgtagcg 840
 ctgaagtctt acgaggaaga gttggcga gatccacgta ttgccgccac cgtggaanaac 900
 gccagaaaag gtgaaatcat gccgaacatc ccgcagatgt ccgctttctg gtatgccgtg 960
 cgtactgcgg tgatcaacgc cgccagcggc cgtcagactg tcgatgaagc cctgaaagac 1020
 gcgcagacta atctgcagg 1039
 <210> 4
 <211> 600
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)
 <400> 4
 atgaagctcc ttgacaactg ggacagcgtg acctctacct tcagtaaact tcgcaacaa 60
 ctgggccccg tgacgcagga attctgggac aacctgaaa aagaaaccga gggactgcgt 120
 caggaaatgt ccaaagattt agaagaggtg aaggccaagg ttcagccata tctcgatgac 180
 tttcagaaaa aatggcagga agagatggaa ttatctgctc aaaaggtgga accgctgcgt 240
 gcggaactgc aagagggggc acgcaaaaa ctccatgagc tccaagagaa gctcagccca 300
 ttaggcgaag aaatgcgcga tcgcgccgct gcacatgttg atgactccg gactcatttg 360
 gcgccgtatt cggatgaact tcgccagcgt ttggccgcac gtctcgaggc gctgaaagaa 420
 aacgggggtg cccgcttggc tgagtaccac gcgaaagcga cagaacacct gagcaccttg 480
 agcgaaaaag cgaaaccggc gctggaagat ctacgccagg gcttattgcc tgttcttgag 540
 agctttaaag tcagtttct gtcagctctg gaagaatata ctaaaaagct gaataccag 600

<210> 5

<211> 786

<212> DNA

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 5

```

atgctggaac tgctgccgac cgcggtgaa ggtgtgagcc aggcgagat taccggctgt 60
ccggaatgga tctggctggc gctgggtacc gcgctgatgg gcctgggtac cctgtatttt 120
ctggtgaaaag gtatgggcgt gagcgatccg gatgcgaaaa aattttatgc gatcaccacc 180
ctggtgccgg cgatcgcggt taccatgtat ctgagcatgc tgctgggtta tggcctgacc 240
atgggtgccgt ttggcggcga acagaaccgc atttattggg cgcgctatgc ggattggctg 300
tttaccacc cgcctgtgct gctggatctg gcgctgctgg tggatgcgga tcagggcacc 360
atcctggcgc tggtagggcg ggatggcatc atgatcggtc cggcctggg gggcgcgctg 420
accaaagtgt atagctatcg ttttgtgtgg tgggcgatta gcaccgcggc gatgctgtat 480
attctgtatg tgctgttttt tggttttacc agcaaagcgg aaagcatgcg tccggaagtg 540
gcgagcacct ttaaagtgtc gcgtaacgtg accgtggtgc tgtggagcgc gtatccggtg 600
gtgtggctga ttgtagcga aggcgcggtt attgtgccgc tgaatatcga aaccctgctg 660
tttatgggtgc tggatgtgag cgcgaaagtg gttttggcc tgattctgct gcgtagccgt 720
gcgatttttg gtgaagcggg agcgccgga ccgagcgcgg gtgatggcgc ggcggcgacc 780
agcgat 786

```

<210> 6

<211> 7411

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

```

aatgggacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg 60
tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc cttcctttc 120
tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc 180
gatttagtgc tttacggcac ctcgaccca aaaaacttga ttagggtgat gttcacgta 240
gtgggccatc gccctgatag acggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta 300
atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcttttg 360
atttataagg gattttgccg atttcggcct attggttaaa aatgagctg atttaacaaa 420
aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgtttacaat ttcaggtggc acttttcggg 480
gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat ttttctaat acattcaaat atgtatccgc 540
tcatgaatta attcttagaa aaactcatcg agcatcaaat gaaactgaa tttattcata 600
tcaggattat caataccata tttttgaaaa agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca 660
ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc tggatcggt ctgcgattcc gactcgtcca 720
acatcaatac aacctattaa tttcccctcg tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca 780
ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat ggcaaaagtt tatgcatttc tttccagact 840
tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaatcac tcgcatcaac caaacgtta 900

```


ttcattcgtg attgcgctg agcgagacga aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta 960
caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg aacactgcc aacatcaac aatattttca 1020
cctgaatcag gatattcttc taatacctgg aatgctgttt tcccgggat cgcagtgggtg 1080
agtaaccatg catcatcagg agtacggata aatgcttga tggtcggaag aggcataaat 1140
tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat cattggcaac gctacctttg 1200
ccatgtttca gaaacaactc tggcgcacg ggcttccat acaatcgata gattgtcgca 1260
cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttataccat ataaatcagc atccatggtg 1320
gaatttaate gcggcctaga gcaagacgtt tcccgttga tatggctcat aacaccctt 1380
gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcag accaaaatcc cttaacgtga 1440
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg agaaaagac aaaggatctt cttgagatcc 1500
ttttttctg cgcgtaatct gctgcttga aacaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgt 1560
ttgtttgcc gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc 1620
gcagatacca aatactgtcc ttctagtga gccgtagta ggccaccact tcaagaactc 1680
ttagcaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg 1740
cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccgata aggcgcagcg 1800
gtcgggctga acggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga 1860
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgcacg cttcccgaag ggagaaaggc 1920
ggacaggat ccgtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgagg agcttccagg 1980
gggaaacgcc tggatcttt atagtctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 2040
atttttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt 2100
tttacggtt ctggccttt gctggccttt tgctcacatg ttctttctg cgttatcccc 2160
tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg 2220
aacgaccgag cgcagcagc cagttagcga ggaagcggaa gagcgcctga tgcggtattt 2280
tctccttacg catctgtgag gtatttaca ccgcataat ggtgactct cagtacaatc 2340
tgctctgatg ccgcatagtt aagccagat aactcctct atcgctacgt gactgggtca 2400
tggctgcgcc ccgacaccg ccaacaccg ctgacgcgcc ctgacgggct tgtctgctcc 2460
cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt cagaggtttt 2520
caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc tgcggtaaag ctcatcagc tggtcgtgaa 2580
gcgattcaca gatgtctgcc tgttcatccg cgtccagctc gttgagttt tccagaagcg 2640
ttaatgtctg gcttctgata aagcgggcca tgttaaggc ggttttttcc tgtttgtgca 2700
ctgatgcctc cgtgtaaggg ggatttctgt tcatgggggt aatgataccg atgaaacgag 2760
agaggatgct cacgatacgg gttactgat atgaacatgc ccggttactg gaacgttgtg 2820
agggtaaaca actggcggta tggatgcggc gggaccagag aaaaatcact cagggtcaat 2880
gccagcgtt cgtaataca gatgtaggtg ttccacagg tagccagcag catcctgcga 2940
tgcagatccg gaacataatg gtgcagggcg ctgacttccg cgtttccaga ctttacgaaa 3000
cacggaaacc gaagaccatt catgttgtt ctcaggtcgc agacgtttt cagcagcagt 3060
cgcttcacgt tcgctcgcgt atcggtgatt cattctgcta accagtaagg caaccccgcc 3120
agcctagccg ggtcctcaac gacaggagca cgatcatgc caccctggg gccgccatgc 3180
cggcgataat ggctgcttc tcgccgaaac gtttgggtgc gggaccagt acgaaggctt 3240

gagcgagggc gtgcaagatt ccgaataccg caagcgacag gccgatcatc gtcgcgctcc 3300
agcgaaagcg gtcctcgccg aaaatgaccc agagcgctgc cggcacctgt cctacgagtt 3360
gcatgataaa gaagacagtc ataagtgcgg cgacgatagt catgccccgc gccaccgga 3420
aggagctgac tgggttgaag gctctcaagg gcatcggtcg agatccccgt gcctaagtag 3480
tgagctaact tacattaatt gcgttgcgct cactgccccg tttccagtcg ggaaacctgt 3540
cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc 3600
gccagggtag tttttctttt caccagtgag acgggcaaca gctgattgcc cttcaccgcc 3660
tggccctgag agagttgcag caagcggtec acgctggttt gccccagcag gcgaaaatcc 3720
tgtttgatgg tggttaacgg cgggatataa catgagctgt cttcggtatc gtcgtatccc 3780
actaccgaga tatccgcacc aacgcgcagc ccggactcgg taatggcgcg cattgcgccc 3840
agcgcacatc gatcgttggc aaccagcatc gcagtgggaa cgatgcctc attcagcatt 3900
tgcattggtt gttgaaaacc ggacatggca ctccagtcgc cttcccgttc cgctatcggc 3960
tgaatttgat tgcgagtgag atatttatgc cagccagcca gacgcagacg cgccgagaca 4020
gaacttaatg ggcccgctaa cagcgcgatt tgctggtgac ccaatgcgac cagatgctcc 4080
acgccagtc gcgtaccgtc ttcattgggag aaaataatac tgttgatggg tgtctggtca 4140
gagacatcaa gaaataacgc cggaacatta gtgcaggcag cttccacagc aatggcatcc 4200
tggtcatcca gcggatagtt aatgatcagc ccaactgacg gttgcgcgag aagattgtgc 4260
accgccgctt tacaggcttc gacgccgctt cgttctacca tcgacaccac cacgctggca 4320
cccagttgat cggcgcgaga ttaaatcgcc gcgacaattt gcgacggcgc gtgcagggcc 4380
agactggagg tggcaacgcc aatcagcaac gactgtttgc ccgccagttg ttgtgccacg 4440
cggttgggaa tgtaattcag ctccgccatc gccgcttcca ctttttcccg cgttttcgca 4500
gaaacgtggc tggcctggtt caccacgcgg gaaacggtct gataagagac accggcatac 4560
tctgcgacat cgtataacgt tactggttcc acattacca ccctgaattg actctcttcc 4620
gggcgctatc atgccatacc gcgaaagggt ttgcgccatt cgatggtgtc cgggatctcg 4680
acgctctccc ttatgcgact cctgcattag gaagcagccc agtagtaggt tgaggccggt 4740
gagcaccgcc gccgcaagga atggtgcatg caaggagatg gcgccaaca gtccccggc 4800
cacggggcct gccaccatac ccacgccgaa acaagcgtc atgagcccga agtggcgagc 4860
ccgatcttcc ccatcgggta tgtcggcgat ataggcgcca gcaaccgac ctgtggcgcc 4920
ggtgatgccg gccacgatgc gtccggcgta gaggatcgag atctcgatcc cgcgaaatta 4980
atacactca ctatagggga attgtgagcg gataacaatt cccctctaga aataattttg 5040
tttaacttta agaaggagat ataccatggg ctctaaagggt gaagaactgt tcaccggtgt 5100
tgttccgatc ctggttgaac tggacgggta cgttaacggc cacaattct ctgttcggtg 5160
tgaagtgaa ggtgacgcta ccaacggtaa actgacctg aaattcatct gcaccaccgg 5220
taaactgccg gttccgtggc cgacctggt taccacctg acctacggtg ttcagtgttt 5280
ctctcgttac ccggaccaca tgaaacgtea cgacttcttc aaatctgcta tgccggaagg 5340
ttacgttcag gaacgtacca tctctttcaa agacgacggt acctacaaa cccgtgctga 5400
agttaaattc gaaggtgaca ccctggttaa ccgtatcgaa ctgaaaggta tcgacttcaa 5460
agaagacggt aacatcctgg gtcacaaact ggaatacaac ttcaactctc acaacgttta 5520
catcaccgct gacaaacaga aaaacggtat caaagctaac ttcaaatcc gtcacaactg 5580

tgaagacggt tctgttcagc tggctgacca ctaccagcag aacaccccga tcggtgacgg 5640
 tccggttctg ctgccggaca accactacct gtctaccag tctgttctgt ctaaagacce 5700
 gaacgaaaaa cgtgaccaca tggttctgct ggaattcgtt accgctgctg gtatcaccca 5760
 cggtatggac gaactgtaca aactgcaggg atctggcagt ggttctctgg tgccgcgcgg 5820
 cagccatatg ctggaactgc tgccgaccgc ggtggaaggt gtgagccagg cgcagattac 5880
 cggtcgtccg gaatggatct ggctggcgt gggtaccgc ctgatgggcc tgggtaccct 5940
 gtattttctg gtgaaaggta tgggcgtgag cgatccggat gcgaaaaaat tttatgcat 6000
 caccaccctg gtgccggcga tcgcgtttac catgtatctg agcatgctgc tgggttatgg 6060
 cctgaccatg gtgccgtttg gcggcgaaca gaacccgatt tattgggcgc gctatgcgga 6120
 ttggctgttt accaccccgc tgctgctgct ggatctggcg ctgctggtgg atgcggatca 6180
 gggcaccatc ctggcgtgg tgggcgcgga tggcatcatg atcgggtaccg gcctgggtggg 6240
 cgcgctgacc aaagtgtata gctatcgttt tgtgtggtgg gcgattagca ccgcggcgat 6300
 gctgtatatt ctgtatgtgc tgttttttgg tttaccagc aaagcggaaa gcatgcgtcc 6360
 ggaagtggcg agcacctta aagtgtgctg taacgtgacc gtggtgctgt ggagcgcgta 6420
 tccggtgggtg tggctgattg gtagcgaagg cgcgggtatt gtgccgctga atatcgaac 6480
 cctgctgttt atggtgctgg atgtgagcgc gaaagtgggt tttggcctga ttctgctgcg 6540
 tagccgtgcg atttttgggt aagcggaaag gccggaaccg agcgcgggtg atggcgcggc 6600
 ggcgaccagc gataagcttg atgacgacga caagatgaag ctccctgaca actgggacag 6660
 cgtgacctct accttcagta aacttcgca acaactgggc cccgtgacgc aggaattctg 6720
 ggacaacctg gaaaaagaaa ccgagggact gcgtcaggaa atgtccaaag atttagaaga 6780
 ggtgaaggcc aaggttcagc catatctcga tgactttcag aaaaaatggc aggaagagat 6840
 ggaattatat cgtcaaaagg tgaaccgct gcgtgcggaa ctgcaagagg gggcacgcca 6900
 aaaactccat gagtccaag agaagctcag ccattaggc gaagaaatgc gcgatcgcgc 6960
 ccgtgcacat gttgatgcac tccggactca tttggcgcgg tatteggatg aacttcgcca 7020
 gcgtttggcc gcacgtctcg aggcgctgaa agaaaacggg ggtgcccgtg tggctgagta 7080
 ccacgcgaaa gcgacagaac acctgagcac cttgagcgaa aaagcgaac cggcgtgga 7140
 agatctacgc cagggttat tgctgttct tgagagcttt aaagtcagtt ttctgtcagc 7200
 tctggaagaa tataactaaa agctgaatac ccaggcggcc gcactcgagc accaccacca 7260
 ccaccactga gatccggtg ctaacaaagc ccgaaaggaa gctgagttgg ctgctgccac 7320
 cgctgagcaa taactagcat aacccttgg ggctctaaa cgggtcttga ggggtttttt 7380
 gctgaaagga ggaactatat ccgattggc g 7411

<210> 7

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

catgccatgg gctctaaagg tgaagaactg ttcaccg 37

<210> 8

<211> 44

<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 8
ggaattccat atgggcctgc agtttgata gttcgtccat accg 44
<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 9
ggaattccat atgctggaac tgctgcc 27
<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 10
atcgctggtc gccgcatcgc tggctgccgc 30
<210> 11
<211> 74
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 11
catgccatgg gccatcatca tcatcatcat catcatcatc acagcagcgg atccaaattc 60
gagaaagata ccgg 74
<210> 12
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 12
tatcatatgg ctgccgcgcg gcaccagaga accactgcca gatccctgca gattagtctg 60
cgcgtctttc 70
<210> 13
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 13
cgcaagctta tgaagtcct tgacaactgg gacagcg 37
<210> 14
<211> 39
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

atttgcggcc gcctgggtat tcagcttttt agtatattc 39

<210> 15

<211> 2562

<212> DNA

<213> 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

<400> 15

gcggataaca attcccctct agatttaaga aggagatata ccatgggcaa attcgagaaa 60
gataaccggaa ttaaagtac cgttgagcat ccggataaac tggaagagaa attcccacag 120
gttgcggcaa ctggcgatgg cctgacatt atcttctggg cacacgaccg ctttgggtggc 180
tacgctcaat ctggcctggt ggetgaaatc accccggaca aagcgttcca ggacaagctg 240
tatccgttta cctgggatgc cgtacgttac aacggcaagc tgattgctta cccgatcgtc 300
gttgaagcgt tatcgtgat ttataacaaa gatctgctgc cgaaccgcc aaaaacctgg 360
gaagagatcc cggcgtgga taaagaactg aaagcgaag gtaagagcgc gctgatgttc 420
aacctgcaag aaccgtactt cacctggccg ctgattgctg ctgacggggg ttatgcgttc 480
aagtatgaaa acggcaagta cgacattaaa gacgtggcg tgataacgc tggcgcgaaa 540
gcgggtctga ccttcctggt tgacctgatt aaaaacaaac acatgaatgc agacaccgat 600
tactccatcg cagaagctgc cttaataaaa ggcgaaacag cgatgacat caacggcccc 660
tgggcatggt ccaacatcga caccagcaaa gtgaattatg gtgtaacggt actgccgacc 720
ttcaagggtc aaccatccaa accgttcggt ggcgtgctga gcgcaggtat taacgccgcc 780
agtccgaaca aagagctggc gaaagagttc ctgaaaact atctgctgac tgatgaaggt 840
ctggaagcgg ttaataaaga caaacgctg ggtgccgtag cgctgaagtc ttacgaggaa 900
gagttggcga aagatccacg tattgccgcc accgtggaaa acgccagaa aggtgaaatc 960
atcccgaaca tcccgcagat gtccgctttc tggatgccg tgcgtactgc ggtgatcaac 1020
gccgccagcg gtcgtcagac tgtcgtgaa gccctgaaag acgcgcagac taatctgcag 1080
ggatctggca gtggttctct ggtgccgcgc ggcagccata tgctggaact gctgccgacc 1140
gcggtggaag gtgtgagcca ggcgcagatt accgctcgc cggaatgat ctggctggcg 1200
ctgggtaccg cgctgatggg cctgggtacc ctgtattttc tggtgaaagg tatggcgctg 1260
agcgatccgg atgcgaaaaa attttatgcg atcaccacc tggtgccggc gatcgcgttt 1320
accatgtatc tgagcatgct gctgggttat ggctgacca tggtgccgtt tggcggcgaa 1380
cagaaccgca tttattgggc gcgctatgcg gattggtgt ttaccacccc gctgctgctg 1440
ctggatctgg cgctgctggt ggatgcggat cagggcacca tctggcgct ggtgggcgcg 1500
gatggcatca tgatcggtac cggcctggtg ggcgcgctga ccaaagtgt tagctatcgt 1560
tttgtgtggt gggcgattag caccgcggcg atgctgtata ttctgtatgt gctgtttttt 1620
ggttttacca gcaaagcgga aagcatgctc ccggaagtgg cgagcacctt taaagtgctg 1680
cgtaacgtga ccgtggtgct gtggagcgcg tatccggtgg tgtggctgat tggtagcgaa 1740
ggcgcgggta ttgtgccgct gaatatcgaa accctgctgt ttatggtgct ggatgtgagc 1800
gcgaaagtgg gttttggcct gattctgctg cgtagccgtg cgatttttgg tgaagcgaa 1860

gcgcccgaac cgagcgcggg tgatggcgcg gcggcgacca gcgataagct tgatgacgac 1920
 gacaagatga agctccttga caactgggac agcgtgacct ctaccttcag taaacttcgc 1980
 gaacaactgg gccccgtgac gcaggaattc tgggacaacc tggaaaaaga aaccgaggga 2040
 ctgcgtcagg aaatgtccaa agatttagaa gaggtgaagg ccaaggttca gccatatctc 2100
 gatgactttc agaaaaaatg gcaggaagag atggaattat atcgtcaaaa ggtggaaccg 2160
 ctgcgtgcgg aactgcaaga gggggcacgc caaaaactcc atgagctcca agagaagctc 2220
 agcccattag gcgaagaaat gcgcgatcgc gcccgtcac atgttgatgc actccggact 2280
 catttggcgc cgtattcggg tgaacttcgc cagcgtttgg ccgcacgtct cgaggcgctg 2340
 aaagaaaacg ggggtgccc cttggctgag taccacgcga aagcgacaga acacctgagc 2400
 accttgagcg aaaaagcgaa accggcgctg gaagatctac gccagggctt attgcctggt 2460
 cttgagagct ttaaagtcag ttttctgtca gctctggaag aatatactaa aaagctgaat 2520
 acccaggcgg ccgcaactga gcaccaccac caccaccact ga 2562

<210> 16

<211> 2235

<212> DNA

<213> 大肠杆菌 (Escherichia coli)

<400> 16

ttttgtttaa ctttaagaag gagatatacc atgggctcta aaggtgaaga actgttcacc 60
 ggtgtttgtc cgatcctggt tgaactggac ggtgacgta acggtcacia attctctggt 120
 cgtgggtgaag gtgaagggtga cgctaccaac ggtaaactga ccctgaaatt catctgcacc 180
 accggtaaac tgccggttcc gtggccgacc ctggttacca ccctgacctg cgggtgttcag 240
 tgcttctctc gttaccgga ccacatgaaa cgtcacgact tcttcaaate tgctatgccg 300
 gaaggttacg ttcaggaacg taccatctct ttcaaagac acggtacctg caaaaccctg 360
 gctgaagtta aattcgaagg tgacaccctg gttaccgta tcgaactgaa aggtatcgac 420
 ttcaaagaag acggtaacat cctgggtcac aaactggaat acaacttcaa ctctcacaac 480
 gtttacatca ccgctgacaa acagaaaaac ggtatcaaag ctaacttcaa aatccgtcac 540
 aacgttgaag acggttctgt tcagctggct gaccactacc agcagaacac cccgatcggg 600
 gacggtcagg ttctgctgcc ggacaaccac tacctgtcta cccagtctgt tctgtctaaa 660
 gacccgaacg aaaaacgtga ccacatggtt ctgctggaat tcgttaccgc tgctgggtatc 720
 acccacggta tggacgaact gtacaaactg cagggatctg gcagtggttc tctggtgccg 780
 cgcggcagcc atatgctgga actgctgccg accgcggtgg aaggtgtgag ccaggcgcag 840
 attaccggtc gtccggaatg gatctggctg gcgctgggta ccgcgctgat gggcctgggt 900
 accctgtatt ttctggtgaa aggtatgggc gtgagcgatc cggatgcgaa aaaattttat 960
 gcgatcacca ccctggtgcc ggcgatcgcg tttaccatgt atctgagcat gctgctgggt 1020
 tatggcctga ccatggtgcc gtttggcggc gaacagaacc cgatttattg ggcgcgctat 1080
 gcggattggc tgtttaccac cccgctgctg ctgctggatc tggcgctgct ggtggatgag 1140
 gatcagggca ccatcctggc gctggtgggc gcggatggca tcatgatcgg taccggcctg 1200
 gtgggcgcgc tgaccaaagt gtatagctat cgttttgtgt ggtgggcgat tagcaccgcg 1260
 gcgatgctgt atattctgta tgtgctgttt tttggtttta ccagcaaagc ggaaagcatg 1320

cgtccggaag tggcgagcac ctttaaagtg ctgcgtaacg tgaccgtggt gctgtggagc 1380
gcgtatccgg tgggtgtggct gattggtagc gaaggcgcgg gtattgtgcc gctgaatatic 1440
gaaaccctgc tgtttatggt gctggatgtg agcgcgaaag tgggttttgg cctgattctg 1500
ctgcgtagcc gtgcgatttt tggatgaagc gaagcgccgg aaccgagcgc ggtgatggc 1560
gcggcggcga ccagcgataa gcttgatgac gacgacaaga tgaagctcct tgacaactgg 1620
gacagcgtga cctctacctt cagtaaactt cggaacaac tgggccccgt gacgcaggaa 1680
ttctgggaca acctggaaaa agaaaccgag ggactgcgctc agaaatgtc caaagattta 1740
gaagaggtga aggccaaggt tcagccatat ctgatgact ttcagaaaa atggcaggaa 1800
gagatggaat tatatcgta aaaggtggaa ccgctgcgtg cggaactgca agagggggca 1860
cgccaaaaac tccatgagct ccaagagaag ctacgccc ataggcgaaga aatgcgcgat 1920
cgccccgtg cacatgttga tgcaactcgg actcatttgg cgccgtattc ggatgaactt 1980
cgccagcgtt tggccgcacg tctcgaggcg ctgaaagaaa acgggggtgc ccgcttggct 2040
gagtaccacg cgaaagcgac agaacacctg agcacctga gcgaaaaagc gaaaccggcg 2100
ctggaagatc tacgccaggg cttattgcct gttcttgaga gctttaaagt cagttttctg 2160
tcagctctgg aagaatatac taaaaagctg aataccagg cgccgcact cgagcaccac 2220
caccaccac actga 2235

PCR-product

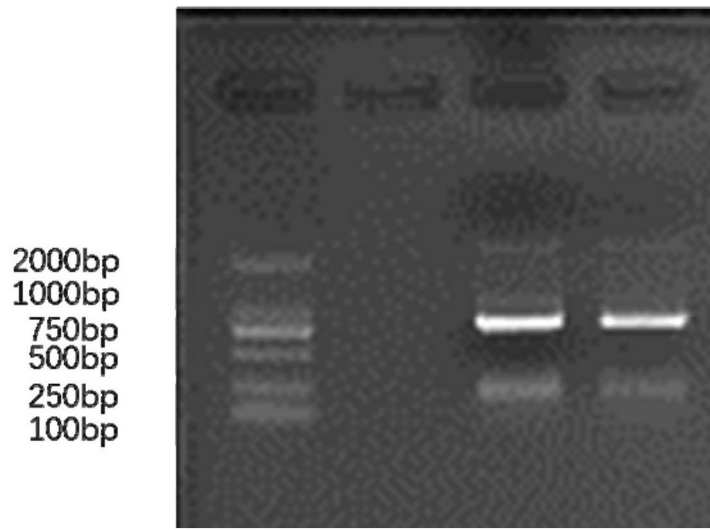


图1

bR vector

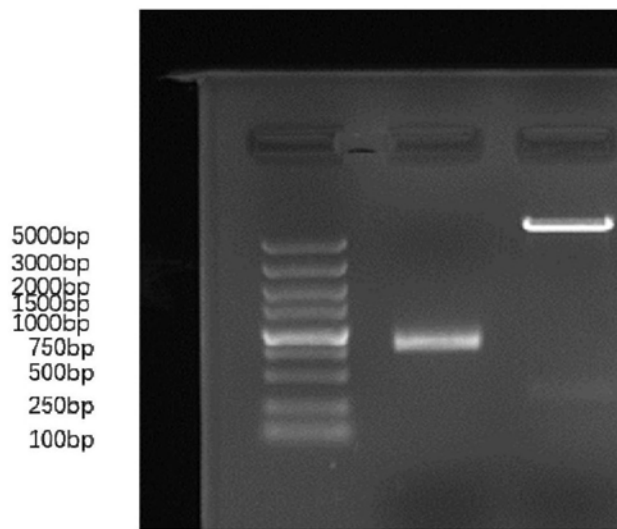


图2

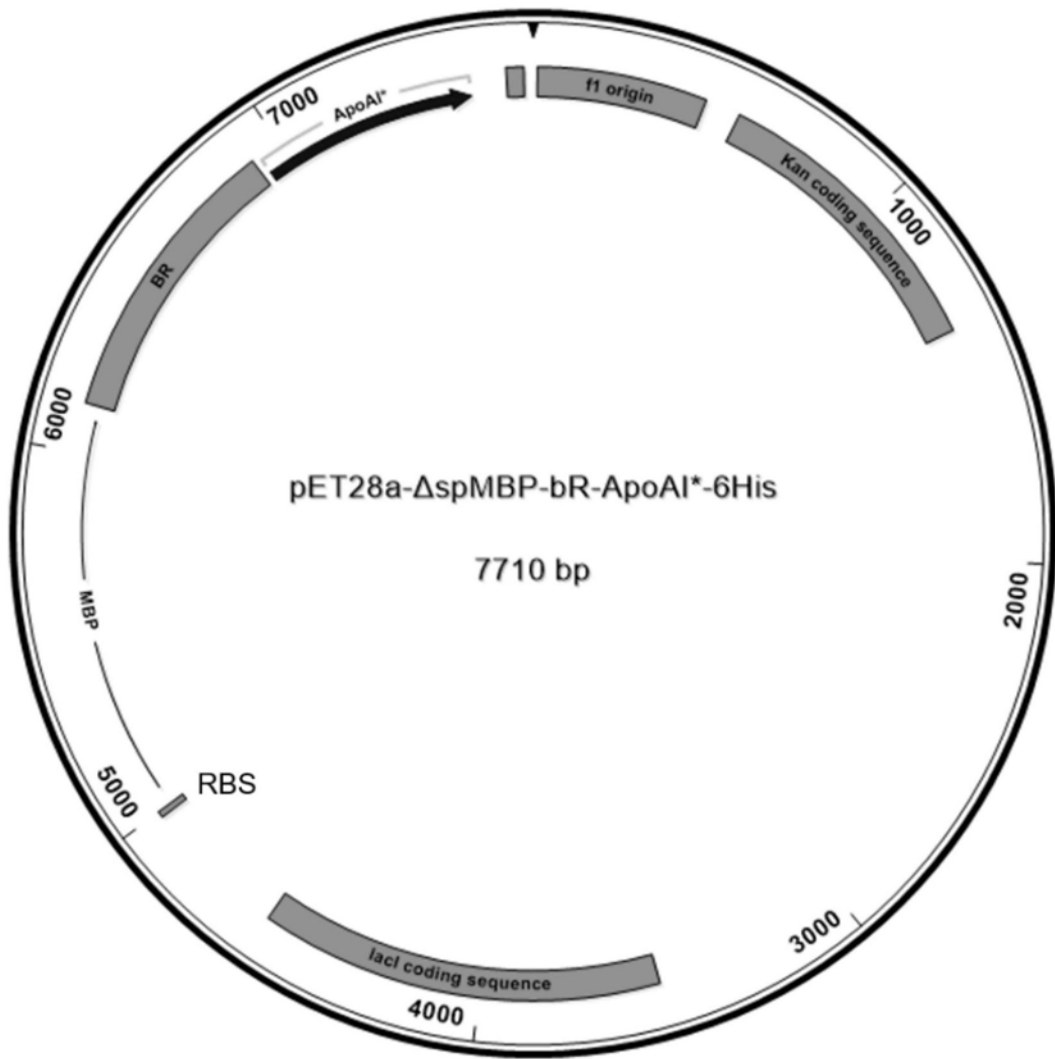


图3

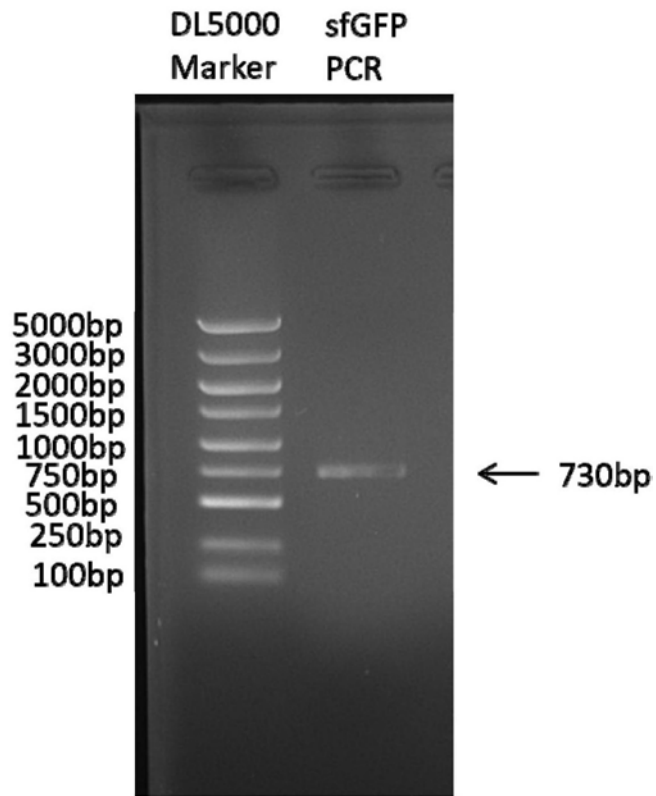


图4

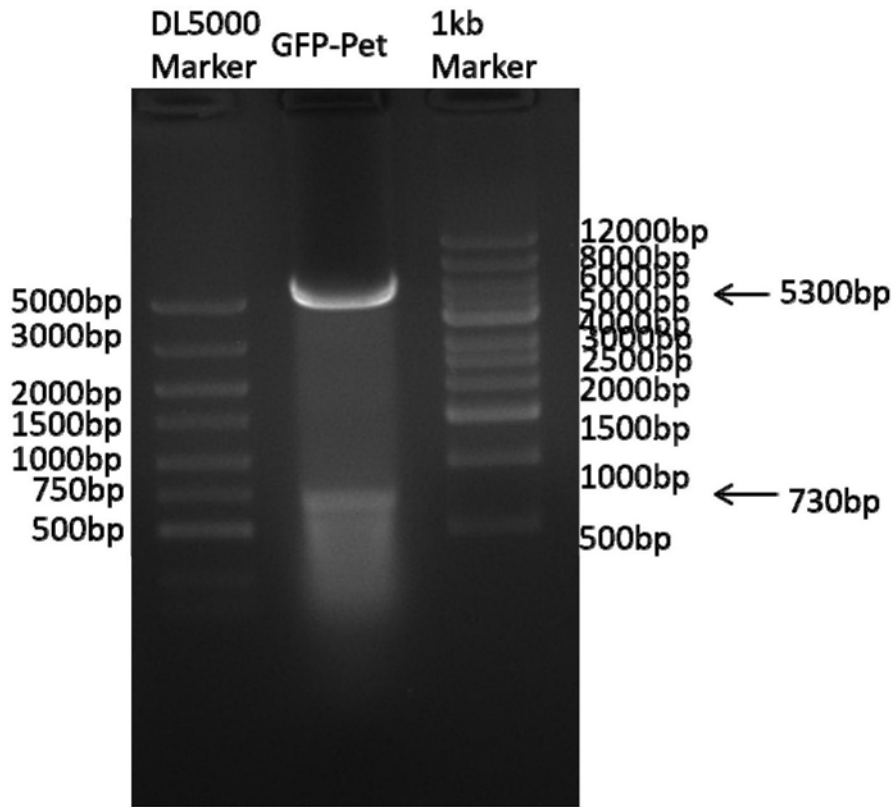


图5

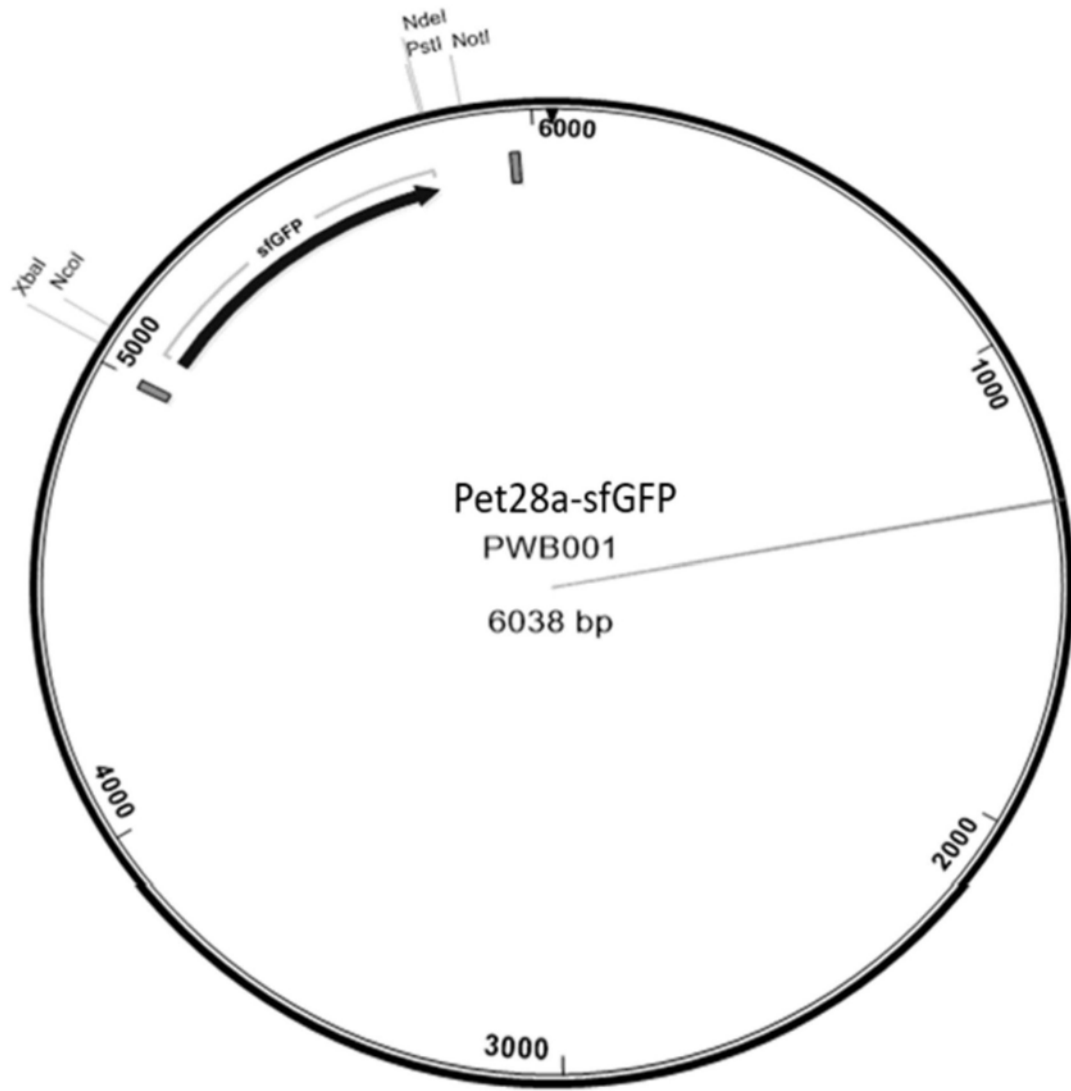


图6

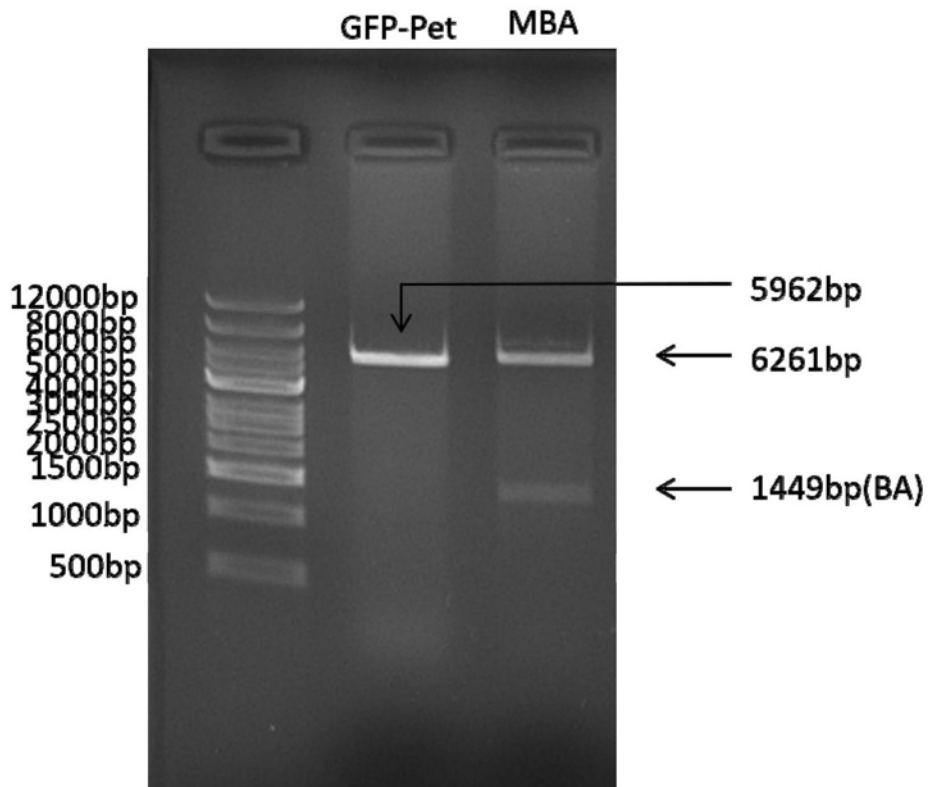


图7

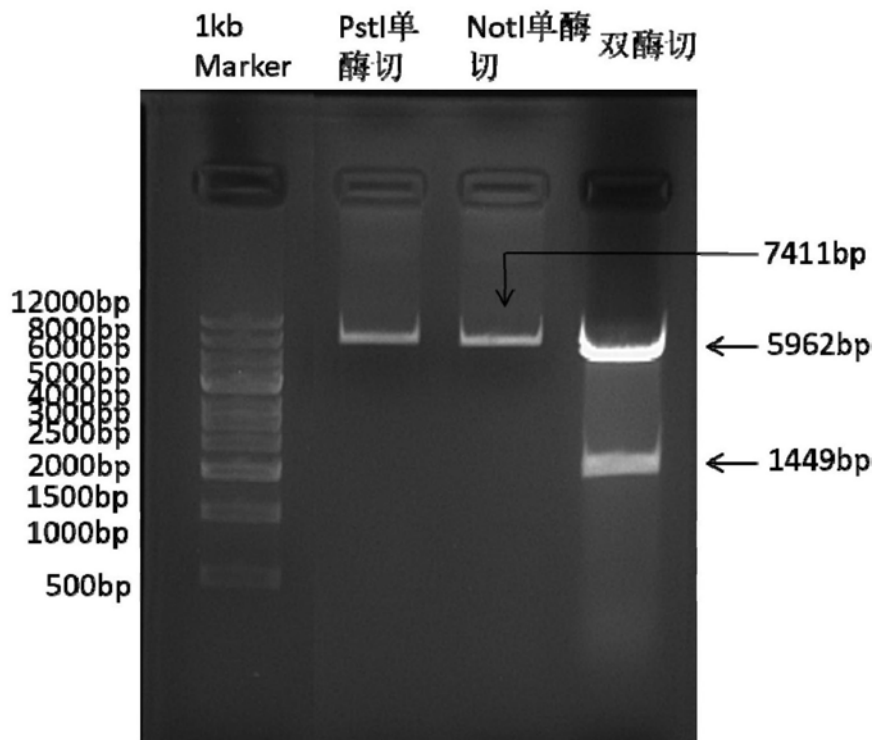


图8

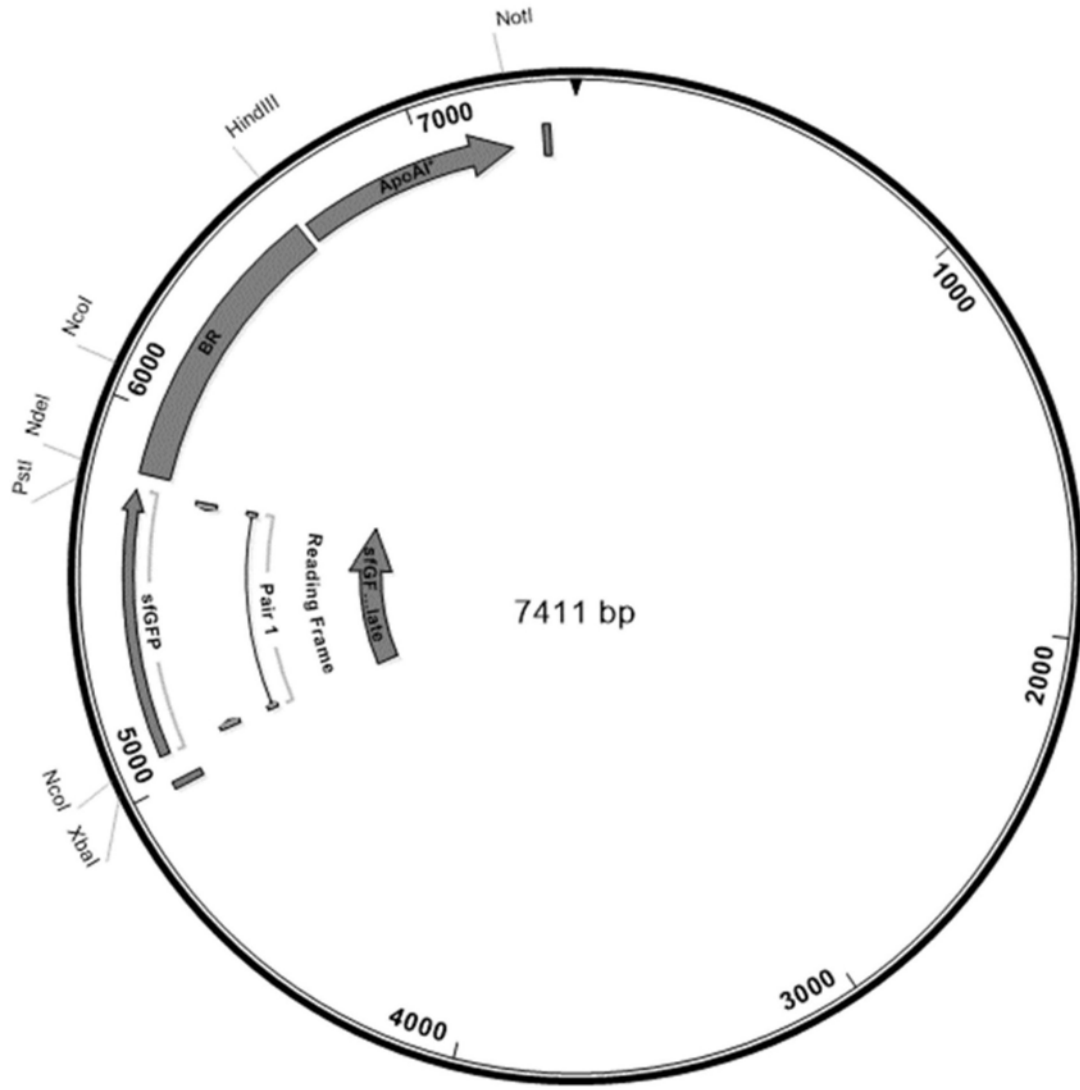
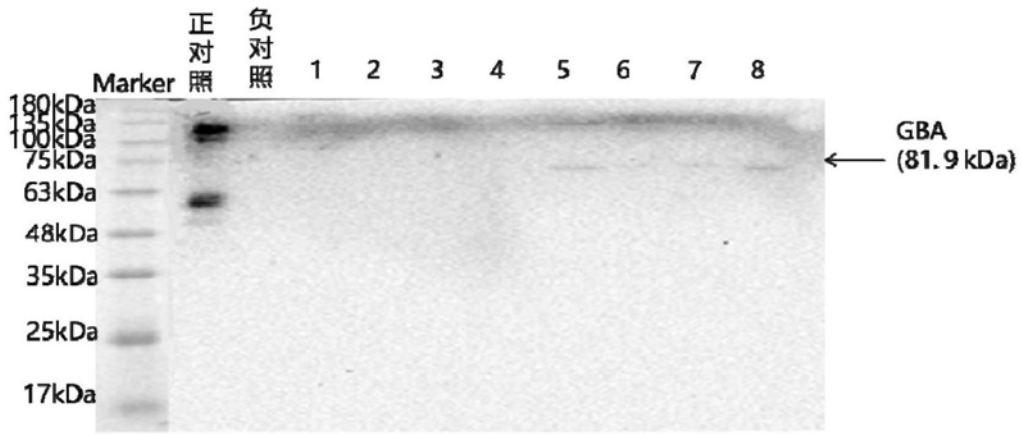


图9



1-4:未诱导的全菌、沉淀1、沉淀2、上清
5-8:诱导1h的全菌、沉淀1、沉淀2、上清

图10

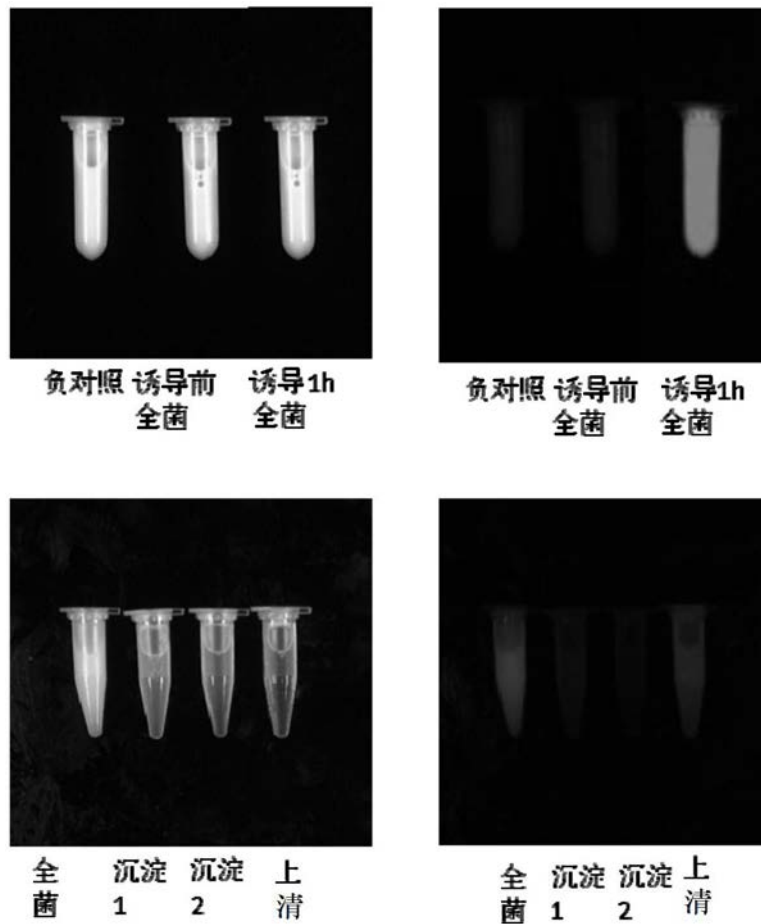


图11