



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114672512 A

(43) 申请公布日 2022.06.28

(21) 申请号 202210130816.0

(22) 申请日 2022.02.12

(71) 申请人 上海市农业科学院

地址 201403 上海市奉贤区金齐路1000号

申请人 上海瑞丰农业科技有限公司

(72) 发明人 彭日荷 姚泉洪 王波 王宇

田永生 高建杰 李振军 严培兰

(51) Int. Cl.

C12N 15/84 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/61 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/46 (2018.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法,具体过程是:按植物表达模式优化合成来自恶臭假单胞菌的萘降解系统中从萘降解到水杨酸的全部基因,然后与CaMV35S启动子和NOS终止子组成植物表达单元,利用同尾限制性内切酶连接到同一植物表达载体,该载体通过农杆菌介导转化到草坪草中。利用本发明,使培育的草坪草能够吸收来自汽车排放尾气中的多环芳烃,使之转换为植物抗逆信号水杨酸,提高植物对汽车尾气和其他逆境环境的耐受性,种植这种转基因草坪草有利于保护公路周边的环境。

1. 一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法,包括如下步骤,

步骤1,按植物表达模式优化合成来自恶臭假单胞菌的萘降解系统中从萘降解到水杨酸的全部基因,并与CaMV35S启动子和NOS终止子组成植物表达单元,将所有表达单元串联到同一植物表达载体;

步骤2,将所述构建的植物表达载体通过农杆菌介导转化到草坪草中。

2. 如权利要求1所述的一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法,其特征在于:所述恶臭假单胞菌的萘降解系统包括从萘到水杨酸降解的9个基因*NahAa*,*NahAb*,*NahAc*,*NahAd*,*NahB*,*NahC*,*NahD*,*NahE*,*NahF*。

3. 如权利要求1或2所述的一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法,其特征在于:所述恶臭假单胞菌的萘降解系统包括从萘到水杨酸降解的9个基因按照植物表达模式优化改造,其中*NahB*,*NahC*,*NahD*,*NahE*,*NahF*基因序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.6。

4. 如权利要求1所述的一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法,其特征在于:所述萘到水杨酸降解的9个基因全部与CaMV35S启动子和NOS终止子组成植物表达单元,所有表达单元串联到同一植物表达载体。

5. 如权利要求1所述的一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法,其特征在于:所述农杆菌为根癌农杆菌EHA105或根癌农杆菌LBA4404或根癌农杆菌GV3101。

一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法

技术领域

[0001] 本发明属于环境科学领域,具体涉及培育一种能够净化汽车尾气的草坪草方法,培育的草坪草可以大量种植在公路边,实现对环境污染的净化。

背景技术

[0002] 草坪草在城市园林绿化中扮演着重要而独特的角色,对于平衡局部生态环境有着十分重要的意义。不但可以作为软质景观来美化环境,净化空气,其强大的呼吸和蒸腾作用还可以用来调节小气候。同时,草坪草还可以在干旱半干旱地区、公路和铁路周边用于固土护坡、涵养水源。随着国内城市化进程的加快和城市绿化标准的提高、道路建设的快速发展,草坪草的需求快速上升。

[0003] 冷季型草坪草绿色期长,是园林绿化、道路建设的常用品种,但此类草坪草垂直生长量大,易遭病害,生长受高温的胁迫和极端气温的持续时间以及干旱环境的制约,需要精细的管理。草坪草根较浅,其所需水分主要通过地表灌溉获得,因此水分是制约草坪草成坪、生长及维持颜色青绿的主要环境因子,特别是在干旱、半干旱地区水资源数量有限,而且时空分布极不均匀,从而极大地限制了绿地草坪的建植,增加了保养难度。草坪灌溉用水已经成为许多城市景观设施中竞争用水的一个重要方面。另一方面草坪草褐斑病、腐霉病、镰刀菌枯萎病、锈病和德氏霉叶枯病等病害具有较强传播能力,适生性较强,对草坪草的种植构成严重的影响和威胁。

[0004] 水杨酸(SA)作为植物抗病信号传导在诱导植物抗病过程中起关键作用。在病原菌侵染时,植物体内SA生物合成和信号转导增强。当植物体内 SA浓度很低时,NPR3(nonexpresser of PR genes3)和NPR4抑制SA下游基因表达,当病原菌侵染导致SA浓度升高后,NPR3/4活性被抑制,其对SA下游基因转录抑制作用被解除;另一方面,植物体内SA积累激活 NPR1转录激活活性,进一步诱导SA下游抗病相关基因表达。SA还介导植物对非生物胁迫的抗性,如SA能改变植物对重金属、热、冷、干旱、高盐等胁迫环境的适应性。SA 对植物系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)至关重要。

[0005] 植物通过两条通路合成水杨酸:ICS 途径和 PAL途径。它们都起始于叶绿体,以分支酸(chorismate)为前体,并涉及多个酶促反应,但是SA生物合成主要受病原菌侵染或紫外线诱导。通过外源喷施SA能够参与调控植物对干旱的胁迫响应,0.1-1.0 mmol/L SA能增强植物对干旱胁迫的耐受能力,提高植株的耐盐性。如何提高植物体内SA整体水平,增强植物的整体抗逆性,是一项非常有意义的工作。

[0006] 随着现代工农业和交通运输业的快速发展,空气、土壤和水体中的多环芳烃(PAHs)污染日益突出。多环芳烃排放源分为人为源与自然源两类,人为源种类繁多,包括化石燃料燃烧、机动车尾气排放、焦化、金属冶炼等工业过程、烹调过程、垃圾焚烧、露天烧烤、生物质燃烧等。其中2,3环低分子量多环芳烃主要来自石油类产品的泄露,代表了石油源;4-6环高分子量多环芳烃来源于化石燃料燃烧、燃煤和生物质燃烧,据调查,环境中低分子量多环芳烃萘和菲含量均占较高的比例。随着多环芳烃对环境污染的加重,其污染防治成

为环境治理的迫切任务。

[0007] 细菌对多环芳烃的降解取决于细菌产生加氧酶的能力。多环芳烃的最初氧化,即苯环加氧是控制PAHs生物降解反应速度的关键步骤。在多环芳烃等诱导下,细菌分泌的双加氧酶把氧加到苯环上,形成C-O 键,再经过加氢、脱水等作用使C-C键断裂,苯环数减少,产生水杨醛,水杨醛在水杨醛脱氢酶催化下产生水杨酸,水杨酸可以通过水杨酸羟化酶催化合成邻苯二酚等小分子化合物,邻苯二酚进一步分解,最终产生乙酰辅酶A,进入三羧酸循环。

[0008] 本发明将来自细菌的多环芳烃萘降解途径9个基因 (*NahAabcdNahBCDEF*) 通过合成改造后,重构植物表达载体,然后转化到草坪草中,使草坪草通过吸收空气或土壤的萘,将萘转化为水杨酸,一方面净化空气中的多环芳烃,另一方面,通过提高植物内源水杨酸的含量,增强草坪草对病害和非生物胁迫的抗性。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种能够将汽车尾气中的多环芳烃转化为草坪草抗逆信号的方法,通过该方法能够拓宽草坪草的种植范围,提高草坪草对多环芳烃污染环境的修复。

[0010] 为达到上述目的,本发明的技术方案是:

利用微生物萘到水杨酸的代谢途径导入草坪草中,草坪草通过吸收汽车尾气中的多环芳烃,转化为水杨酸,提高植物对多环芳烃的耐受性和抗逆性。

[0011] 优选地,所述萘到水杨酸的代谢途径来自恶臭假单胞菌。

[0012] 优选地,萘到水杨酸的代谢途径包括9个基因分别为*NahAa*,*NahAb*,*NahAc*,*NahAd*,*NahB*,*NahC*,*NahD*,*NahE*,*NahF*,9个基因按照植物偏爱密码优化设计及化学合成,其中*NahAa*,*NahAb*,*NahAc*,*NahAd*合成基因选择ZL200810041089.0。

[0013] 所述萘到水杨酸的代谢途径植物表达载体构建的方法为:通过T4 DNA连接酶将所有9个基因与含有双35S启动子和NOS终止子的pYPX245 (Genbank AY178049.1) 质粒连接;酶切鉴定和序列测定验证每个基因植物表达单元;将9个基因表达单元酶切后依次插入pCambia1301植物表达载体,构建成9价基因植物表达载体pNah6910。

[0014] 通过电击方法将植物表达载体pNah6910导入根癌农杆菌;遗传转化草坪草;通过转基因植株的自交及后代鉴定,最终分别获得一批遗传稳定的转基因株系。

[0015] 本发明的有益效果如下:

1,当植物中转化了萘到水杨酸的代谢途径的植物表达载体后,能够将石油燃烧产生的多环芳烃降解为水杨酸,水杨酸作为植物抗逆信号,可以提高植物对逆境的抵抗能力。因此利用本发明构建的体系一方面可以提高植物对多环芳烃的降解能力,有效修复环境中多环芳烃污染;另一方面可以提高植物的抗逆性。

[0016] 2,该套体系能在植物中安全高效表达,对环境影响较小。

[0017] _

附图说明

[0018] 图1为本发明实施例中构建的萘到水杨酸的代谢途径9价基因植物表达载体。

[0019] 图2 水杨酸LC-MS检测

图3培育的草坪草高羊茅对高含量萘的抗性。

[0020] —

具体实施方式

[0021] 实施例1,构建利用多环芳烃合成水杨酸的植物表达

以下实施例中涉及的构建9价基因植物表达载体pNah6910,其具体的构建方法如下:

1、基因设计及全合成

从恶臭假单胞菌*Pseudomonas putida* 基因组序列(GenBank AP013070)中,分别查找获得1,2-二氢萘脱氢酶(NahB)基因,2-羟基-苯并吡喃-2-羧酸异构酶(NahD)基因,2-羟基-苯并吡喃-2-羧酸异构酶(NahD)基因,反式-羟基-苄基丙酮酸水合-醛缩酶(NahE)基因,乙醛脱氢酶(NahF)基因。

[0022] 基于氨基酸序列,按照以下原则选择密码子:1)按照植物偏爱密码设计基因,比如从甘氨酸简并密码子选择GCT,亮氨酸简并密码子选择TTG等;2) 尽量避开AT重复序列,比如避免从赖氨酸简并密码子选择AAA,避免苯丙氨酸简并密码子选择TTT;3)同一氨基酸尽量避免使用单一密码子,比如精氨酸含有6个简并密码子,以CGT为主,但不能全部选择CGT,也可选择AGA,CGC等在真核生物中使用过的密码子;4)按照密码子优化原则设计后的初步序列还需进一步细化,避免基因中出现RNA转录加尾信号,如AATAAT,AATCAA,AAGCAT等,避免5个以上G+C序列,G+C比例40-60%,避免反向重复序列、茎环结构等。设计后的基因序列见SEQ ID NO 1-NO 6。

[0023] 采用PTDS方法进行上述6个基因的化学合成(Ai-sheng Xiong et al., Nat. Protoc., 2006, 1: 791-797和Ai-sheng Xiong, et al., Nucleic Acids Research 2004,32(12):e98)。首先设计多个60碱基组成的引物,相邻引物之间互为正反引物,引物间设计20个重复碱基,利用PCR进行基因全长扩增,在100 μ l反应体系中,中间引物的添加量为2ng,外侧引物添加量为中间引物10-15倍,扩增条件为:94 $^{\circ}$ C,预热1min;94 $^{\circ}$ C,30s,50 $^{\circ}$ C,30s,72 $^{\circ}$ C,10min,使用的Taq DNA聚合酶为KOD FX taq酶(Toyobo公司,日本),共25个循环。

[0024] PCR结束后,1%琼脂糖胶回收,取10 μ l 直接与T/A 克隆载体相连(大连宝生物公司)。4 $^{\circ}$ C连接过夜,获得质粒T2,将质粒T2高效转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中。获得阳性克隆,通过序列测定鉴定筛选正确的基因。

[0025] 2、构建萘降解到水杨酸植物表达载体

将萘降解到水杨酸9个基因NahAa,NahAb,NahAc,NahAd,NahB,NahC,NahD,NahE,NahF通过“改良重叠延伸PCR技术”与含有CaMV35S启动子和NOS终止子的pYPX245(Genbank AY178049.1)载体连接(Ri-He Peng et al., Applied Microbiology Biotechnology, 2006,73:234-40),构建基因表达盒,序列测定获得所有9个基因植物表达单元。将所有表达单元酶切后依次插入pCambia1301植物表达载体,每插入一个表达单元均进行质粒抽提和酶切鉴定,对鉴定正确的中间载体进行核苷酸全序列分析测定,最终构建成9价基因植物表达载体pNah6910(图1)。

[0026] 实施例2,培育能将多环芳烃转化为水杨酸的草坪草

1) 农杆菌感受态细胞制备

农杆菌菌株为根癌农杆菌EHA105,或LBA4404,或GV3101菌株(Biovector Co., LTD)挑取单菌在25 ml YEB培养基(添加50mg/1 利福平)培养过夜,取5 ml菌液转接到100 ml YEB培养基(添加50mg/1 利福平),培养至OD600 = 0.7-0.8,菌液冰上放置10分钟,5000 rpm离心10 min,4℃,收集菌体,加入100 ml 无菌双蒸水清洗两次。加入4 ml 10%甘油悬浮菌体,转到50 ml离心管。5500 rpm离心10 min,4℃。收集菌体,加入500 μl 10%甘油悬浮菌体,转到1.5 ml离心管。

[0027] 2) 植物表达载体pNah6910经电击法导入农杆菌中

取70μl农杆菌感受态细胞,加入1μl表达载体p pNah6910。混匀,转到0.1cm 电击杯中。电击参数:200 Ω,1.7 KV, 2.5F,电击后立即加入800μl SOC 培养液。培养1h后,取100μl 涂50μg/L卡那霉素抗性板筛选转化子,28℃培养。

[0028] 3) 典型冷季型草坪草高羊茅转化

高羊茅种子用70% 硫酸去外壳10min,无菌水清洗至pH中性。5%次氯酸钠消毒30min,无菌水清洗3次,将消毒种子均匀播种到含一定量激素的MS培养基中(9mg/L 2,4D, 0.5 mg/L 6BA),25℃暗培养5天;将步骤2)获得的农杆菌菌株在含卡那霉素的LB培养基平板上划线中28℃培养2天。刮下所有的细菌,用含5%的蔗糖MS溶液悬浮。挑取愈伤组织生长良好的高羊茅种子,将悬浮菌液用于侵染。侵染15min后,吸干放置在MS+2mg/L 2,4D+0.5 mg/L 6BA的培养基中,24℃共培养3天。然后转入筛选培养基(加入头孢Cb(500μg/ml) 和潮霉素HAT(30μg/ml),转化后的愈伤组织在含有潮霉素HAT(30ug/ml)抗性培养基上培养3~4代(每代15-20天),转入分化培养基中(2 mg/L KT);幼芽长至2 mm转移到生根培养基(1/2MS+0.5mg/L IBA)。以上培养基中分别加入500 mg/L酶水解乳蛋白(CH),0~700 mg/L谷氨酰胺或精氨酸,蔗糖30~80 g/L,琼脂6 g/L。pH 5.8。继代周期为25 d。光照强度1 50~2 00lx,12~14 h/d。

[0029] 4) 验证外源基因的表达。

[0030] 抽提转基因高羊茅总RNA, RNA抽提试剂盒RNeasy Plant Mini Kit为QIAGEN公司产品;利用Clontech公司cDNA 合成试剂盒合成cDNA第一链;利用合成基因设计20个碱基长度的专一性引物。取1μl cDNA。加入基因的专一性引物,进行PCR检测,PCR扩增条件为:94℃,预热1min;94℃,30s,50℃,30s,72℃,30s,扩增30循环,以野生型高羊茅为阴性对照,结果在转基因植物中能够检测到每个基因的专一扩增条带,表明所有基因均实现了转录表达。

[0031] 实施例3,转基因草坪草功能研究

将转基因高羊茅自交纯合2代,获得纯合转化株,收取种子。播种后,移栽到含有100μg/mL萘的MS培养基中,培养3周,观察高羊茅的生长情况。结果表明,转基因高羊茅能够耐受100μg/mL的萘,而对照植株对萘的耐受性只有20μg/mL(图2)。

[0032] 收集所有的培养基,用60 ml 1:1的丙酮和正己烷溶液分3次萃取,每次20 ml 并在超声水浴中超声萃取30min,然后将萃取液收集,利用旋转蒸发器浓缩至干,加入2 ml甲醇溶解。将抽提液进行HPLC分析,流动相为甲醇-水,流速为1 ml/min,柱温30℃,进样量为40μL,在此条件下所得萘的色谱图清晰。转基因高羊茅培养3周后,降解培养基中的萘为56.5-63.6%,而野生性高羊茅对照品种只有25.2-30.1%。

[0033] 利用70%乙醇和蒸馏水清洗萘胁迫培养的高羊茅材料外表面,吸干,冻干研磨(60Hz,60s),称取25mg样品加入1mL提取液(50%乙腈水溶液,-40℃预冷,样品再用40Hz研磨处理4min,冰浴超声5min,然后12000rpm 离心10min;取上清800μL,固态抽提纯化(1mL 100%甲醇过柱—1mL50%乙腈过柱—样品过柱—1mL60%乙腈水溶液洗脱),收集洗脱液,氮气吹干,100μL10%乙腈水溶液复溶,振荡30s,12000rpm 离心15min,进行液-质连用分析。

[0034] 液相色谱分离条件:C18柱(150*2.1mm, 1.7μm),流动相A相含0.01%甲酸水溶液,B相0.01%甲酸乙腈溶液,柱温50℃。

[0035] 质谱条件:气帘气 10-55 Psi,喷雾电压 4500 V;温度475℃,雾化气30 Psi,辅助气30 Psi。

[0036] 结果表明,转基因高羊茅产生的水杨酸含量为220-280μg/Kg,野生型植株水杨酸含量为59-66μg/Kg,转入恶臭假单胞菌的萘降解系统后,高羊茅吸收萘后水杨酸含量提高3-4倍(图3)。

序列表

<110> 上海市农业科学院

上海瑞丰农业科技有限公司

<120> 一种培育能够净化汽车尾气的草坪草的方法

<160> 6

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 789

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

```
atgggtaatc aacaagttgt gtcaatcact ggtgctggtt ctggatcgg tcttgaactg 60
gttcgttcat tcaagttggc tggttactgt gtgtctgcac ttgttcgtaa cgaggaacaa 120
gaggcacttc tttgcaacga gttcaaggat gcaactggaga tcgttggttg tgatgttcgt 180
gatcatgcaa ctaacgagaa gctgatcaag cagactattg atcgtttcgg tcatctggac 240
tgcttcatcg caaacgctgg tatctgggac tacatgctga acatcgaaga accttgggag 300
aaaatctcat catcattcga tgaatcttc gacatcaacg tgaagtcata cttctctggt 360
atctctgctg cactgccaga gctgaagaag actaacggtt ctgtggtgat gactgcatca 420
gtgtcatcac atgcagttgg tggtggtggt tcatgctaca tcgcatctaa gcacgcagtg 480
ctgggtatgg tgaaggcact tgcatacгаа cttgcacctg agattcgtgt gaacgctgtg 540
tcacctggtg gtactgtgac ttactgtgt ggtcctgcat ctgctggttt cgacaagatg 600
cacatgaagg atatgcctgg tatcgacgac atgatcaagg gtctgactcc acttggtttc 660
gctgctaagc ctgaagacgt ggtggcacca tacctgttgc tggcatcacg taagcaaggt 720
aagttcatca ctggtactgt gatctcaatc gacggtggtg tggcactggg tcgtaagtaa 780
ctagcataa 789
```

<210> 2

<211> 909

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

```
atgtcaaagc aagctgctgt gatcgaactt ggttacatgg gtatctctgt gaaggaccct 60
gatgcatgga agtcattcgc aatgaacatg cttggtctgc aagttctgga tgagggtgag 120
aaggatcgtt tctaccttcg tatggactac tggcatcacc gtatcgtggt tcatcattct 180
gctgaggatg acttggagta cettggttgg cgtgttgctg gtaagcctga gttcgaagca 240
cttggtcaga agctgatcga tgetggttac aagatccgtg tgtgtgacaa ggttgaggca 300
caagaacgta tgggtgttggg tctgatgaag actgaggacc ctggtggtta tccaactgaa 360
atcttctggg gtccacgtat cgacatgtct aaccattcc accctggtcg tccactgcat 420
ggtaagttcg tgactggtga tcaaggtctt ggtcactgca tcgttcgtca gactgatggt 480
```


gcagcagcac acaagttcta ctactgctg ggtttccgtg gtgatgtgga gtatcgtatc 540
 ccactgccaa acggtatgac tgctgaactg tcattcatgc actgcaacgc acgtgatcat 600
 tcaatcgcat tcggtgcaat gccagcagca aagcgtctga accatctgat gcttgagtac 660
 actcacatgg aagacttggg ttactctcac caacagttcg tgaagaacga gatcgacatc 720
 gcaacttcagc ttggtatcca tgctaacgac aaggcactga ctttctatgg tgcaactcca 780
 tctggttggc tgatcgaacc aggttggcgt ggtgcaactg caatcgatga agctgagtac 840
 tacgttgggtg acatcttcgg tcatgggtgtt gaagcacctg gttacggctt ggatgtgaag 900
 ctgtcataa 909

<210> 3

<211> 612

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

atgattgttg acttctactt cgatttcttg tcaccattct catacttggc aaaccaacgt 60
 ctgtcaaaac tggcacaaga ctacggtctt actatccgtt acaacgcaat cgaccttgca 120
 cgtgtgaaga tcgcaatcgg taacgttggc ccatcaaacc gtgacttgaa ggtgaaactg 180
 gactacttga aggtggatct gcaacgttgg gcacagctgt acggtatccc actggtgttc 240
 cctgcaaact acaactcacg tcgtatgaac atcggtttct actactctgg tgctgaagca 300
 caggcagcag catacgtgaa cgtgggtgtc aacgcagtg ggggtgaagg tatcgcacct 360
 gatctggagt cactgcctgc actggtgtct gagaagctgg gttgggatcg ttctgcattc 420
 gagcatttcc tgtcatcaaa cgcagcaact gagcgttacg atgaacagac tcatgctgca 480
 atcgaacgta aggtgttcgg tgtgccaact atgttccttg gtgatgagat gtggtgggggt 540
 aacgatcgtc tgttcatgct ggaatctgca atgggacgtc tttgtcgtca gaacgctgac 600
 ttgtcatcat aa 612

<210> 4

<211> 1008

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

atgggtttga acaagtgat caaaactact cgtcttactg ctgaagacat caatgggtgca 60
 tggactatca tgccaactcc atcaactcct gatgcatctg actggcgctt aactaacact 120
 gtggacttgg atgagactgc acgtatcgtt gaagaactga tcgctgctgg tgtgaatggc 180
 atcttgtcaa tgggtacttt cggatgaatgt gcaactctta cttgggagga gaaacgtgat 240
 tacgtgtcaa ctgttgtgga gactatccgt ggtcgtgtgc catacttctg tggactact 300
 gcaactgaaca ctcgtgaagt gattcgtcag actcgtgaac tgatcgacat cgggtgctaac 360
 ggtaactatgc ttggtgtgcc aatgtgggtg aagatggatc ttccaactgc tgtgcagttc 420
 taccgtgatg tggcaggtgc tgttctgag gctgcaatcg caatctacgc taaccctgaa 480
 gcattcaagt tcgactttcc tcgtccattc tgggctgaga tgtctaagat cccacaggtg 540
 gtgactgcaa agtaccttgg tatcggtatg ctggacctgg acctgaagtt ggcaccaaac 600

atccgtttcc tgccacatga ggatgactac tacgcagcag cacgtatcaa ccctgaacgt 660
 atcactgcat tctggtcac tggtgcaatg tgtggctctg caactgcaat catgttgcgt 720
 gacgaagtgg aacgtgctaa gtcaactggg gattggatca aggctaaggc tatctctgac 780
 gacatgcgtg ctgctgactc aactcttttc ccacgtgggtg acttctctga gttctctaag 840
 tacaacattg gtcttgagaa ggcacgatg gatgctgctg gttggctgaa ggctggacca 900
 tgtcgtccac catacaacct tgtgcctgaa gactacctgg ttggcgcaca gaagtctggt 960
 aaggcatggg cagcacttca tgcaaagtac tcaaagtaac tagcataa 1008

<210> 5

<211> 1464

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

atgggtaaga ctaagctggt catcaacaat gcatggatcg actcatctga tcaacagact 60
 ttcgaacgta agcatcctgt gtcactctgag gtgatgactg agtctgcaaa cgcaactgtg 120
 actgatgcaa tcaaggctgc acaagctgct gaggaggcat tcaagacttg gaaggatggt 180
 ggtccatctg agcgtcgtcg tcttctctg aaggttgctg atgtgatgga gtctaagact 240
 cctaagttca tcgaagtgat ggcaatggag gttggctgcat ctgcactgtg ggctggtttc 300
 aacgttcatg catctgcaaa cgtgttccgt gaggctgcat cacttgctac tcagatccag 360
 ggtgagacta tccaactga caaagctgag actctgtcaa tgactctgcg tcaaccagtg 420
 ggtccaatcc tgtcaatcgt gccttggaa ggtactgctg tgctggcagc acgtgcaatc 480
 gcataccac tgggtgtgtg taacactggt gtgttcaagg gttctgagtt ctcaccagca 540
 actcatgcac tgatcactca gtgtgtgag gaagcaggtc ttctgctgg tgtgctgaac 600
 tacctgaact catcaccaga tcgttacca gagatcgag atgactgat ctcagctaag 660
 gagattcgtc gatatcaact cactggttca actcgtgtgg gttcaatcat cgcacagaag 720
 gcagcacaac atctgaagcg ttgtctgctg gaacttggtg gtaagtcacc actgatcgtg 780
 ttggatgatg ctgacatcaa cgcagcagtg aaggcagcag tgttcggttc atttctgttc 840
 caaggtcaaa tctgcatgtc aactgagcgt ttgggtggtg atgagaagat tgctgacgag 900
 ttcgtggcac gtttcgtgga gaagactgaa cgtctgtctg ttggatgatcc atgtctgact 960
 ggtgactgta tcattgggtc tatgggtgca ccaactcag gtgagcgtat caatggtctg 1020
 ttcaaggatg caatcgacaa ggggtcaaag gtgggtgtgtg gtggatggc acagggtgca 1080
 gtgatgccag caactatcct ggatcatgtg aagtctgaca tgcgtatcta cgatgaggaa 1140
 actttcggtc caatcactgt ggtgatccgt tgcaagggtg aagctgaggc aatccgtatc 1200
 gcaaacgact ctgtgtacgg tctgtcatca ggtgtgttcg gtcgtgacat caaccgtgca 1260
 ctgcgtgtgg gtatgtcaat cgagtacggg tgtgtgcata tcaacggttc aactgttcag 1320
 aacgaagcac aggcaccata cgggtgtact aagaactg gttacggctg tttcgatggt 1380
 cgtgctgtga tcgatgagtt cactgagctg aagtggctga ctatcgaacc attcgaacaa 1440
 caatacccat tctaactagc ataa 1464

<210> 6

<211> 1308

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

```
atgggtaaga acaacaaact tggctctcgt atcggattg ttggtggtgg tatctctggt 60
gttgcaactg cactggaact gtgtcgttac tcacatatcc aggttcagct gttcgaagct 120
gcacctgcat tccgtgaagt tggtgctggg gtgtcattcg gtccaaacgc tgttcgtgca 180
atcgttggtc ttggctctgg tgaagcatac ctgcaagtg ctgatcgtac ttctgaacct 240
tgggaagatg tgtggttcga gtggcgtcgt gttctgacg catcacacct tggtgcaact 300
atcgcacctg gtgttggca gtcactctgt catcgtgctg acttcatcga cgcacttgtg 360
actcatctgc ctgaaggat cgcacagttc ggtaagcgtg caactcaagt ggaacagcag 420
gggtggaag tgcagggtct gttcactgat ggtactgagt accgttgtga tctgctgatc 480
gggtgctgat gtatcaagtc tgcactgcgt tcacatgttc ttgaaggtea aggtcttgca 540
ccacaagttc cacgtttctc tggtaactgt gcatacctg gtatggtgga ctactgcat 600
ctgcgtgaag catacctgac acatggtatc gatgaacatc tggtgatgt tccacagatg 660
taccttggtc ttgatggtca catcctgact ttccctgttc gtaacggtgg tatcatcaac 720
gtggttgcac tcactctgca tcgttctgaa cctaagccaa cttggcctgc tgatgcacct 780
tgggttcgtg aggcatacaca acgtgagatg ctggatgcat tcgcaggttg gggatgatgca 840
gcacgtgcac tgctggagtg cattcctgca ccaactctgt gggcactgca tgacctgca 900
gaactgcctg gttactgca tggctcgtgt gtgctgatcg gtgatgcagc acatgcaatg 960
ctgccacatc aaggtgctgg tgctggtcaa ggtcttgagg acgcatactt ccttgccaga 1020
ctgttgggtg atactcaagc tgatgctggc aaccttgctg agctgcttga agcctacgat 1080
gacctgcgtc gtccacgtgc atgtcgtgtg caacagactt catgggagac tggatgaactg 1140
tacgagcttc gtgatcctgt gtttgggtgca aacgaacaac tgctgggtga gaacctgca 1200
actcgtttcg actggctgtg gaaccatgat ctggatactg accttgctga ggcacgtgca 1260
cgtcttgggt gggagcatgg tggtggtggg gcactgcgtc aaggttaa 1308
```

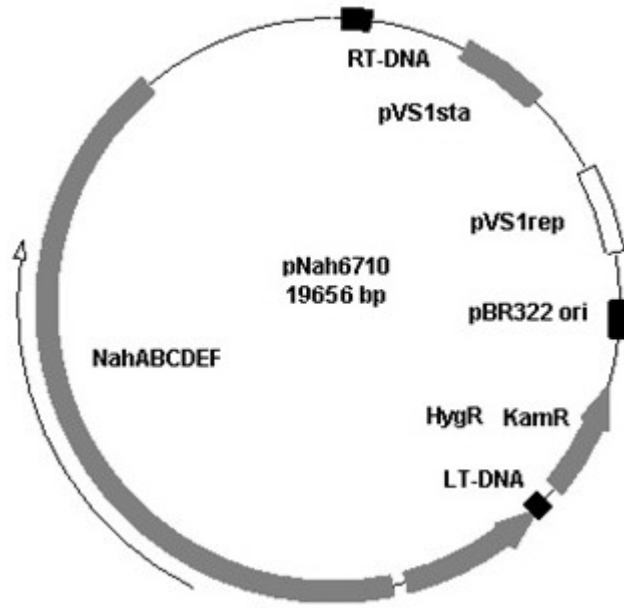


图1



图2

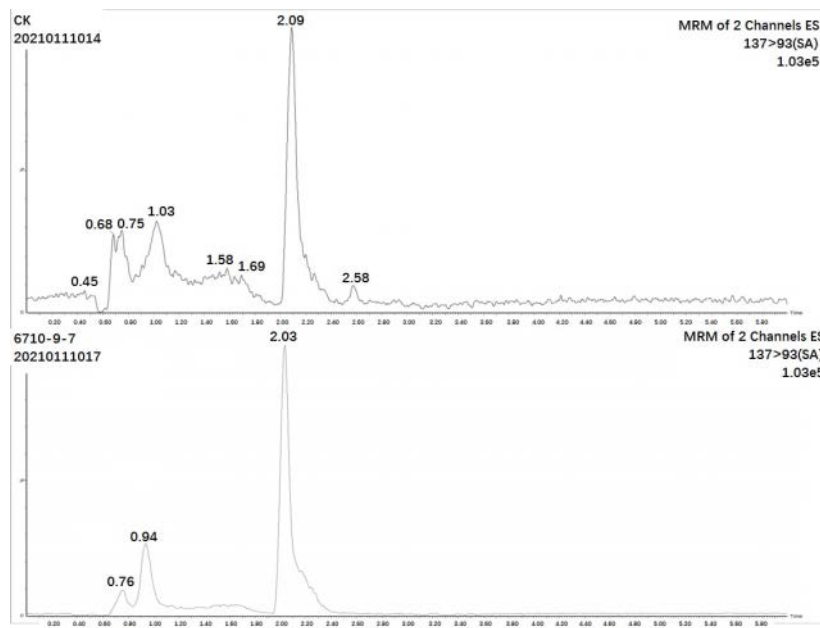


图3