



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110760515 A

(43)申请公布日 2020.02.07

(21)申请号 201911215391.8

C12N 1/21(2006.01)

(22)申请日 2019.12.02

(71)申请人 南京林业大学

地址 210037 江苏省南京市玄武区龙蟠路159号

(72)发明人 祁浩然 刘思安 吴玲 胥猛

(74)专利代理机构 南京申云知识产权代理事务所(普通合伙) 32274

代理人 邱兴天

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/82(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

A01H 5/06(2018.01)

A01H 6/00(2018.01)

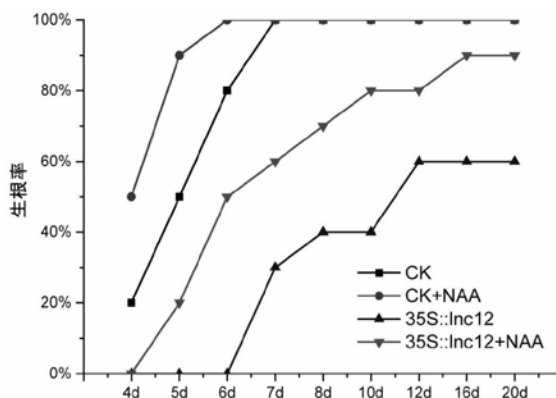
权利要求书1页 说明书13页  
序列表2页 附图6页

(54)发明名称

一种lncRNA lnc12及其在调控杨树不定根发育中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种lncRNA lnc12及其在调控杨树不定根发育中的应用,涉及植物分子生物学技术领域。本发明利用RACE技术克隆得到lncRNA lnc12,其cDNA全长序列如SEQ ID NO:1所示,有1个长159bp的小开放阅读框。通过构建35S::lnc12 sORF-GFP和35S::lnc12 5'UTR+sORF-GFP载体,并在杨树原生质体中进行瞬时表达验证,发现lnc12不具有编码能力。经过lnc12的过表达载体构建、杨树稳定遗传转化及阳性植株筛选,获得lnc12过表达转基因杨树,其杨树微扦插生根时间明显延迟,生根率显著降低,不定根及其根毛数目也少于对照植株。



1. 一种lncRNA lnc12,其cDNA全长序列如SEQ ID NO:1所示。
2. 基于RACE技术扩增lncRNA lnc12的PCR引物,其特征在于,第一轮上游引物的序列为:AGTTTGGTTGGTGTTC AAGTTGGTTGG,第一轮下游引物的序列为:ATATTTCTGAAAAGCAAGAAGCAGGGA;第二轮上游引物的序列为TTGTGTTTGTCAATTTAGTCTTATTC,第二轮下游引物的序列为:ATCTTCAAAGCAAAATGAGAGG。
3. 含有权利要求1所述的lncRNA lnc12的CDNA全长序列或sORF的表达载体,其特征在于,所述sORF的序列如SEQ ID NO:2所示。
4. 含有权利要求3所述的表达载体的重组菌。
5. 根据权利要求3所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体为过表达载体pH35GS或瞬时表达载体p2GWF7.0。
6. 根据权利要求5所述的表达载体,其特征在于,所述表达载体的构建方法为:通过BP反应将lnc12的cDNA全长序列或sORF序列连接到入门载体pCR8/GW/TOPO™上,经过测序验证后,进行LR反应将lnc12的CDNA全长序列或sORF序列从入门载体上转移到过表达载体pH35GS或瞬时表达载体p2GWF7.0上。
7. 权利要求1所述的lncRNA lnc12的CRISPR/Cas9敲除载体,其特征在于,所述CRISPR/Cas9载体是pYLCRISPR/Cas9pUbi-N载体,含有NPTII抗性基因,具有卡那霉素抗性,Cas9蛋白由Ubi启动子驱动;所述lnc12的CRISPR/Cas9的靶位点序列为GTTGTGATGGTTCCAGGCA;CCCAATTGCAGTCCCTGGT;GAGCAAGGTTGTCTTACTGG。
8. 权利要求1所述的lncRNA lnc12在调控杨树不定根发育中的应用。

## 一种lncRNA lnc12及其在调控杨树不定根发育中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物分子生物学技术领域,具体涉及一种lncRNA lnc12及其在调控杨树不定根发育中的应用。

### 背景技术

[0002] 长链非编码RNA (long ncRNA, lncRNA) 是指长度大于200nt,没有长的开放阅读框,不具有编码能力的非编码RNA,但是有个别的lncRNA能够编码功能性多肽。不像miRNA已经研究的较为透彻,lncRNA的研究起步较晚。最初,lncRNA并没有被人们重视,一度被视为没有功能的转录“噪音”。但是自从人体中第一个lncRNA被Lukiw等人(1992)报道后,最近的一系列研究表明,lncRNA在许多生命活动和发育过程中都扮演着重要角色。

[0003] 哺乳动物中lncRNA的研究越来越多,而植物中的lncRNA研究较少,主要集中在拟南芥、水稻等少数几种草本模式植物。近几年随着高通量测序技术发展,在植物越来越多的lncRNA被预测,但深入开展其克隆和功能研究的报道寥寥无几。尽管植物lncRNA研究刚刚起步,但现有的研究发现,植物lncRNA的生物学功能丰富多样,广泛参与了植物生命活动的方方面面。

[0004] 杨树是林木分子生物学的模式树种,研究杨树扦插生根性状的遗传调控机制不仅具有重要的理论意义,而且具有广阔的应用前景。不定根发生与根系响应逆境胁迫的可塑性是植物发育与进化生物学领域的前沿和热点。尽管拟南芥、水稻和玉米等草本植物的根系发育生物学研究已经取得了突破性进展,许多分子调控模式和信号传导途径被揭示。但是,多年生林木与草本植物的器官发生和抗逆适应机制存在明显不同之处。深入解析杨树不定根发生的遗传调控机制,对于揭示物种间器官发生和适应性进化机制的异同有重要的理论意义。近年来,研究人员在越来越多的树种中开展了mRNA、miRNA挖掘与功能验证研究。杨树功能基因组学研究领先于其它树种,杨树不定根发生过程中的一些关键mRNA、miRNA及其调控通路已经得到初步验证和阐释,但是lncRNA如何调控林木不定根的形成和发育还未有过报道。

### 发明内容

[0005] 针对技术的不足,本发明的目的是提供一种lncRNA lnc12,并探索其在调控杨树不定根发育中的应用,以解决现有技术中植物lncRNA克隆极少的问题,并为lncRNA调控林木不定根的形成和发育提供功能验证。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明采用的技术方案为:

[0007] 一种lncRNA lnc12,其cDNA全长序列如SEQ ID NO:1所示。

[0008] 基于RACE技术扩增lncRNA lnc12的PCR引物,第一轮上游引物的序列为:AGTTTGGTTGGTGTTC AAGTTGGTTGG,第一轮下游引物的序列为:ATATTTCTGAAAAGCAAGAAGCAGGGA;第二轮上游引物的序列为TTGTGTTTGTCAATTTAGTCTTATTC,第二轮下游引物的序列为:ATCTCAAAGCAAAATGAGAGG。

[0009] 进一步的,含有权利要求1所述的lncRNA lnc12的cDNA全长序列或sORF 的表达载体,sORF的序列如SEQ ID NO:2所示。

[0010] 含有表达载体的重组菌。

[0011] 进一步的,表达载体为过表达载体pH35GS或瞬时表达载体p2GWF7.0。

[0012] 进一步的,表达载体的构建方法为:通过BP反应将lnc12的cDNA全长序列或sORF序列连接到入门载体pCR8/GW/TOPO™上,经过测序验证后,进行 LR反应将lnc12的cDNA全长序列或sORF序列从入门载体上转移到过表达载体pH35GS或瞬时表达载体p2GWF7.0上。

[0013] 进一步的,lncRNA lnc12的CRISPR/Cas9敲除载体,CRISPR/Cas9载体是pYLCRISPR/Cas9pUbi-N载体,含有NPTII抗性基因,具有卡那霉素抗性,Cas9 蛋白由Ubi启动子驱动;lnc12的CRISPR/Cas9的靶位点序列为 GTTGTGATGGTTTCCAGGCA; CCCAATTGCAGTTCCTGGT; GAGCAAGGTTGTCTTACTGG。

[0014] 上述lncRNA lnc12在调控杨树不定根发育中的应用。

[0015] 有益效果:与现有技术相比,本发明利用RACE技术克隆得到了1个参与生长素信号转导途径的长链非编码RNA lnc12。lnc12的cDNA全长为1372bp,具有典型的5'端帽子结构和3'端多聚腺苷酸尾巴,预测其有1个长159bp的小开放阅读框(sORF)。通过构建35S::lnc12 sORF-GFP和35S::lnc12 5'UTR+sORF-GFP载体,并在杨树原生质体中进行瞬时表达验证,发现lnc12不具有编码能力。经过lnc12的过表达载体构建、杨树稳定遗传转化及阳性植株筛选,获得lnc12过表达转基因杨树。lnc12过表达转基因杨树微扦插生根时间明显延迟,生根率显著降低,不定根及其根毛数目也少于对照植株。在培养基中添加NAA后能够很大程度恢复这些生根缺陷,推测lnc12可能通过调控生长素信号转导途径中的相关基因的表达抑制杨树不定根和根毛的形成与发育。为其他树种lncRNA的相关研究提供了一些良好的借鉴。

## 附图说明

[0016] 图1是lnc12的克隆图;图中,a:5RACE扩增;b:3RACE扩增;c:lnc12的 cDNA全长验证;d:lnc12的基因组DNA序列扩增图;

[0017] 图2是lnc12的基因结构图;

[0018] 图3是lnc12的cDNA序列的Blastn检索结果图;

[0019] 图4是lnc12的二级结构预测图;

[0020] 图5是瞬时表达载体构建图;图中,a:PCR扩增;b:BP反应;c:LR反应;

[0021] 图6是lnc12在不定根不同发育阶段的表达模式图;

[0022] 图7是lnc12在杨树不同组织中的表达模式图;

[0023] 图8是过表达载体构建图;图中,a:BP反应;b:LR反应;c:农杆菌检测;

[0024] 图9是过表达lnc12的转基因杨树的分子检测图;图中,a:DNA水平检测; b:RNA水平检测;\*\*P<0.01;

[0025] 图10是过表达lnc12的转基因杨树的生根率图;

[0026] 图11是过表达lnc12的转基因杨树在MS和MS+NAA培养基中的不定根数目图;

[0027] 图12是过表达lnc12的转基因杨树的根毛图;图中,标尺=1mm。

## 具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例进一步说明本发明,但这些实施例并不用来限制本发明。

[0029] 以下实施例所使用的主要供试材料为:取‘南林895’杨组培苗的茎(CKS)、1周的根(1WR)和2周的根(2WR)用于RNA提取(RNAPrep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒,天根,DP441)和DNA提取(植物基因组DNA提取试剂盒,天根,DP305-02)。这三个样品的RNA等量混合并用于后续的实验。40天的‘南林895’杨组培苗的叶片用于原生质体分离和瞬时转化。

[0030] 实施例1利用RACE技术克隆lnc12的全长

[0031] 1、RNA提取

[0032] ‘南林895’杨组培苗的茎(CKS)、1周的根(1WR)和2周的根(2WR)的RNA提取。

[0033] 2、RACE-Ready cDNA制备

[0034] 根据高通量测序得到的lnc12的序列进行RACE特异性引物的设计。设计原则为:引物长度为23-28nt,GC含量为50%-70%,退火温度 $T_m \geq 65^\circ\text{C}$ (若使用touch down PCR, $T_m \geq 70^\circ\text{C}$ )。使用Oligo 6软件进行引物设计,用到的引物如表1所示:

[0035] 表1 lnc12的5’RACE和3’RACE引物

引物名称	引物序列(5’-3’)
<i>lnc12</i> 5' outer-F	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAA CGCAGAGT
<i>lnc12</i> 5' outer-R	ATATTTCTGAAAAGCAAGAAGCAGGGA
<i>lnc12</i> 5' inner-F	CTAATACGACTCACTATAGGGC
[0036] <i>lnc12</i> 5' inner-R	ATCTTCAAAGCAAAATGAGAGG
<i>lnc12</i> 3' outer-F	AGTTTGGTTGGTGTTCAGTTGGTTGG
<i>lnc12</i> 3' outer-R	ACTCTGCGTTGATACCACTGCTTGCCCTATAGTGAGT CGTATTAG
<i>lnc12</i> 3' inner-F	TTGTGTTTGTCATTTTAGTCTTATTC
<i>lnc12</i> 3' inner-R	GCCCTATAGTGAGTCGTATTAG

[0037] 1) Buffer Mix制备:5×First-Strand Buffer 4.0 $\mu\text{L}$ ,DTT(100mM)0.5 $\mu\text{L}$ ,dNTP(20mM)1.0 $\mu\text{L}$ ,总体积为5.5 $\mu\text{L}$ 。

[0038] 2) Master Mix制备:Buffer Mix 5.5 $\mu\text{L}$ ,RNase Inhibitor 0.5 $\mu\text{L}$ ,SMART Scribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase 2.0 $\mu\text{L}$ ,总体积为8.0 $\mu\text{L}$ 。

[0039] 3) 5’RACE-Ready cDNA制备:

[0040] PCR反应体系:RNA 1.0 $\mu\text{L}$ ,5’-CDS PrimerA 1.0 $\mu\text{L}$ ,无菌水9.0 $\mu\text{L}$ ,总体积为11 $\mu\text{L}$ 。

[0041] PCR反应程序:72 $^\circ\text{C}$ 3min,42 $^\circ\text{C}$ 2min,反应结束后,12000rpm离心10 s,加入8 $\mu\text{L}$  Master Mix;42 $^\circ\text{C}$ 90min,70 $^\circ\text{C}$ 10min。

[0042] 4) 3’RACE-Ready cDNA制备:

[0043] 3’RACE-Ready cDNA体系:RNA 1.0 $\mu\text{L}$ ,3’-CDS PrimerA 1.0 $\mu\text{L}$ ,无菌水10.0  $\mu\text{L}$ ,总

体积为12 $\mu$ L。

[0044] 配平5'RACE-Ready cDNA:添加1 $\mu$ L SMARTer II A oligonucleotide至5'RACE-Ready cDNA中。

[0045] PCR反应程序:72 $^{\circ}$ C 3min;42 $^{\circ}$ C 2min,反应结束后,12000rpm离心10 s,加入8 $\mu$ L Master Mix;42 $^{\circ}$ C 90min,70 $^{\circ}$ C 10min。

[0046] 5)加入90 $\mu$ L Tricine-EDTA Buffer稀释步骤3)、4)的最终产物。

[0047] 3、RACE-PCR反应

[0048] 1)第一轮反应

[0049] RACE-PCR第一轮反应体系:PCR-Grade H<sub>2</sub>O 15.5 $\mu$ L,2 $\times$ SeqAmp<sup>TM</sup> Buffer 25.0 $\mu$ L,SeqAmp DNA Polymerase 1.0 $\mu$ L,5'-or3'-RACE-Ready cDNA 2.5 $\mu$ L,10 $\times$ UPM 5.0 $\mu$ L,5' or 3' GSP (10 $\mu$ M) 1.0 $\mu$ L,总体积50 $\mu$ L。

[0050] RACE-PCR第一轮反应程序:94 $^{\circ}$ C 3min,94 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 3min,5个循环;94 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 3min,5个循环;94 $^{\circ}$ C 30s,68 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3min,25个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。

[0051] 2)第二轮反应

[0052] RACE-PCR第二轮反应体系:PCR-Grade H<sub>2</sub>O 15.5 $\mu$ L,2 $\times$ SeqAmp<sup>TM</sup> Buffer 25.0 $\mu$ L,SeqAmp DNA Polymerase 1.0 $\mu$ L,一轮PCR产物5.0 $\mu$ L,Universal Primer short 1.0 $\mu$ L,5' or 3' GSP (10 $\mu$ M) 1.0 $\mu$ L,总体积48.5 $\mu$ L。

[0053] RACE-PCR第二轮反应程序:94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 3min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。

[0054] 1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,并切下目的条带。

[0055] 4、目的片段回收与载体连接

[0056] 使用AXYGEN公司的DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒(AxyPrep<sup>TM</sup> DNA Gel Extraction Kit)进行目的片段的回收。回收纯化的目的片段DNA经过质量和浓度检测后连接到载体上。使用的平末端连接载体为全式金公司的pEASY<sup>®</sup>-Blunt Zero Cloning Vector,具体步骤如下:

[0057] 新鲜的PCR产物1.0 $\mu$ L,pEASY<sup>®</sup>-Blunt Zero Cloning Vector 1.0 $\mu$ L,dH<sub>2</sub>O 3.0 $\mu$ L,总体积5.0 $\mu$ L,25 $^{\circ}$ C反应20min。

[0058] 5、连接产物转化

[0059] 1)将大肠杆菌感受态Trans1-T1从-80 $^{\circ}$ C冰箱中拿出来,插入冰里化冻。10min后,将5 $\mu$ L连接产物加入已经完全化冻的体积约50 $\mu$ L的Trans1-T1感受态中,轻弹混匀,冰浴30min左右;

[0060] 2)冰浴后将离心管放入42 $^{\circ}$ C水浴锅中,热击30s后迅速将其拿出插入冰里,冰浴2min;

[0061] 3)加入300 $\mu$ L平衡至室温的SOC溶液,将其放入摇床,37 $^{\circ}$ C,200rpm,摇1h;

[0062] 4)摇菌后4000rpm离心3min,将离心管拿到超净工作台内,吸除上清,留下100 $\mu$ L左右菌体,吹打混匀菌体,确保没有菌体沉淀,吸取菌液滴加到加有Amp抗性的固体LB培养基上,用涂布棒均匀涂开,倒置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱内,培养12h。

[0063] 6、菌液检测

[0064] 向1.5mL离心管中加入800 $\mu$ L含有Amp抗性的LB液体培养基,挑取单菌落接种于培

培养基内。摇床设置37℃,250rpm,摇菌6-7h,以菌液为模板,进行PCR检测。

[0065] 反应体系:菌液2μL,10×PCR Buffer 2μL,dNTP 1.5μL,MgCl<sub>2</sub> 1.3μL, M13F 1μL, M13R 1μL,ddH<sub>2</sub>O 11.1μL,rTaq酶0.1μL,总体积20μL。

[0066] 反应程序:94℃4min;94℃30s,55℃30s,72℃3min,30个循环;72℃10min。

[0067] 经菌液PCR检测后挑选3个阳性菌液进行测序。

[0068] 7、lnc12的全长克隆与基因结构分析及序列分析

[0069] 根据高通量测序得到的lnc12序列设计了5'RACE和3'RACE引物。以‘南林895’杨的1周根为材料提取RNA,利用RACE技术进行了5'RACE和3'RACE 扩增,最终得到了lnc12的5'端和3'端片段(图1a和图1b)。利用BioEdit软件对lnc12的5'端和3'端片段进行了拼接,并在两端设计引物对拼接好的lnc12全长cDNA序列进行了PCR扩增,并测序验证(图1c)。最终得到lnc12的cDNA 全长为1372bp。以‘南林895’杨的1周根的DNA为模板,对lnc12的基因组DNA (gDNA) 进行琼脂糖凝胶电泳发现lnc12的基因组DNA序列的条带明显大于其cDNA全长(图1d),进行测序后发现其长度为1808bp,比lnc12的cDNA 全长的长度大了436bp。利用GSDS软件对lnc12的cDNA和gDNA序列进行了分析和展示,发现lnc12有1个内含子(图2)。

[0070] 将lnc12的cDNA序列放入NCBI数据库用blastn程序进行检索,结果发现只有毛果杨(*Populus trichocarpa*)和胡杨(*Populus euphratica*)有较为相似的序列,其他物种没有相似的序列(图3)。毛果杨中与lnc12相似度较高的3个转录本都注释为非编码RNA,胡杨中与lnc12相似度较高的多个转录本都注释为“misc\_RNA”,“misc\_RNA”是指无法用RNA关键词描述的转录物或RNA 产物(图3)。这些结果表明:1) lnc12在其它物种中没有同源序列;2) 在毛果杨和胡杨中有与lncRNA相似的序列,但都只是通过全基因组测序预测的,功能未知,且可能都是非编码RNA;3) 基于前2点结论能够初步推测lnc12的保守性较差且功能未知,可能是一个新的非编码RNA。为了进一步探究lnc12的保守性,将其放入拟南芥数据库TAIR中进行搜索,当E<0.01时未检索到同源序列。将lnc12置于最大的非编码RNA数据库NONCODE中进行检索,也未检索到同源的lncRNA。这些结果表明,lnc12具有较差的保守性。利用lncRNA亚细胞定位预测工具lncLocator (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/lncLocator/#>) 对 lnc12的亚细胞定位情况进行预测,结果显示lnc12定位于细胞质中。有研究发现,有些lncRNA有miRNA的结合位点,可以作为海绵吸附miRNA,从而降低 miRNA对其靶基因的抑制作用,达到间接调控miRNA靶基因的表达和功能的目的。因此,利用植物miRNA靶基因分析工具psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) 对lnc12的miRNA的结合位点进行了预测,结果未发现有miRNA与lnc12结合。这说明lnc12不是通过吸附miRNA来行使功能的。

[0071] lncRNA的二级结构lncRNA的功能具有重要的影响,虽然lncRNA的序列保守性很差,但是有些lncRNA之间的二级结构有相似部分,保守的功能性二级结构可能使不同的lncRNA发挥同样或类似的功能。通过RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) 对lnc12的二级结构进行了预测,发现lnc12的二级结构十分复杂,由包括发夹环、凸环、内环、多分枝环、茎区在内的多个茎环结构组成(图4)。根据二级结构预测得出lnc12 的最小自由能(MFE)为-305.50kcal/mol,结构比较稳定。

[0072] 实施例2lnc12的编码能力预测与验证

[0073] 1、lnc12编码能力与保守性预测

[0074] 使用BioEdit软件拼接lnc12的5'RACE和3'RACE序列,获得lnc12的cDNA全长序列。对拼接好的lnc12的cDNA全长序列设计引物并测序验证(表2)。利用NCBI ORFfinder预测其开放阅读框。通过CPC软件对lnc12的编码能力进行预测,利用生物信息软件RegRNA2.0 (<http://regrna2.mbc.nctu.edu.tw/detection.html>)对lnc12 是否有核糖体结合位点进行预测。利用BlastP对lnc12的小开放阅读框(short ORF, sORF)可能编码的氨基酸序列进行相似性检索。利用Pfam数据库对lnc12的sORF 的结构域进行预测。将lnc12在NONCODE数据库中进行搜索,预测它的保守性。利用Oligo6对预测得到的lnc12的sORF进行引物设计,并设计包含该sORF的 5'UTR的引物,进而进行PCR扩增和测序验证(表2)。反应体系及反应程序与前面相同,按照之前描述的方法对PCR产物进行回收、连接、转化、测序。

[0075] 表2 lnc12的ORF引物

引物名称	引物序列(5'-3')
lnc12全长验证-F	GGATGATCAGCTGTTGTTGATTAGT
lnc12全长验证-R	AACAAAAAGAAAAATAAATATAGGTTCCA
lnc12 sORF-F	ATGAAGTTTGGTTGGTGTTC AAG
lnc12 sORF-R	GCTGCGTAGGAAAATACTGAAGAAT
lnc12 5'UTR+sORF-F	GGATGATCAGCTGTTGTTGATTAGT
lnc12 5'UTR+sORF-R	GCTGCGTAGGAAAATACTGAAGAA

[0077] 通过RACE技术得到了lnc12的全长序列,lnc12的全长序列比lnc12的EST 序列长很多,再次通过生物信息学软件对lnc12的全长序列的编码能力进行预测。通过CPC软件对lnc12的编码能力进行预测,结果显示lnc12是非编码RNA,不具有编码能力。核糖体是RNA到蛋白质这一翻译过程中必不可少的细胞器,因此是否有核糖体结合位点RBS是判断一条RNA能否翻译的一个重要指标,利用RegRNA2.0软件对lnc12的核糖体结合位点进行了预测,结果发现lnc12没有核糖体结合位点。通过对lnc12的ORF进行预测,发现lnc12有1个159bp的sORF,可能编码52个氨基酸。但是,通过BlastP对lnc12可能编码的这52个氨基酸进行检索,结果未发现同源蛋白。另外,利用Pfam数据库对这52个氨基酸进行检索也未发现有功能结构域。这些结果初步表明lnc12可能是一条非编码RNA,不具有编码能力。

[0078] 2、lnc12的编码能力验证

[0079] 将得到的lnc12全长序列的菌液进行扩繁,并用AXYGEN质粒小提试剂盒(AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit)进行质粒提取。以该质粒为模板,表2中lnc12 sORF和lnc12 5'UTR+sORF为引物进行PCR扩增。利用Gateway技术中的BP 反应将得到的lnc12 sORF和lnc12 5'UTR+sORF片段分别连接到入门载体 PCR8/GW/TOPO™中,然后通过LR反应将入门载体上的目的片段转移到携带 GFP标签的p2GWF7.0载体中。详细步骤如下:

[0080] 1) 使用AXYGEN质粒小提试剂盒进行质粒提取;

[0081] 2) 以反转录合成的cDNA为模板,进行PCR扩增,PCR反应体系为:TakaRa LA Taq (5U/μL) 0.5μL, 10×LA PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup>Free) 5.0μL, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 5.0μL, dNTP Mixture (2.5mM each) 8.0μL, 正向引物 (10μM) 2.0μL, 反向引物 (10μM) 2.0μL; cDNA模板1.0μL, ddH<sub>2</sub>O 26.5μL, 总体积为50.0 μL; PCR反应程序为:94℃3min; 94℃30s, 56℃30s, 72℃1min, 30个循环; 72℃10min。

[0082] 3) 利用琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,将目的条带切下并用AXYGEN公司的DNA琼脂



糖凝胶回收试剂盒进行回收纯化。

[0083] 4) BP反应

[0084] 在PCR管中将纯化过的新鲜的PCR产物80ng, Salt solution 0.5 $\mu$ L, pCRTM8/GW/TOPO™ vector 0.5 $\mu$ L, 添加ddH<sub>2</sub>O到总体积为3 $\mu$ L, 将试剂混合均匀, 将PCR仪的温度设置为22 $^{\circ}$ C, 时间为1h, 反应后将其插入冰里;

[0085] TOP 10感受态置于冰上5min后融化, 将前步3 $\mu$ L反应产物加入感受态中混合混匀, 之后冰浴30min;

[0086] 42 $^{\circ}$ C热击60s, 迅速置于冰上3-5min;

[0087] 加入600 $\mu$ L SOC或LB溶液, 150rpm 37 $^{\circ}$ C摇菌1h;

[0088] 4000rpm离心3min, 吸掉大部分上清, 剩余100 $\mu$ L, 混匀剩余菌液, 涂于加有壮观霉素的LB筛选培养平板;

[0089] 在恒温培养箱中37 $^{\circ}$ C培养12h左右, 挑取12个克隆进行阳性检测; 挑取3个阳性克隆进行测序;

[0090] 将公司测序正确的质粒保存备用。

[0091] 5) LR反应

[0092] 在冰上将以下成分加入到无菌PCR管中: Linearized entry clone 50ng, p2GWF7.0vector 75ng; LR Clonase II enzyme mix 0.5 $\mu$ L, 添加1 $\times$ TE, pH8.0至总体积为2.5 $\mu$ L;

[0093] 25 $^{\circ}$ C反应1h; 加入0.25 $\mu$ L的Proteinase K solution, 混合混匀, 之后37 $^{\circ}$ C水浴10min;

[0094] 将反应产物加入大肠杆菌感受态中, 经过转化、37 $^{\circ}$ C培养、挑菌、摇菌、菌液PCR等一系列过程进行阳性克隆筛选;

[0095] 测序正确的质粒即是携带目的基因的p2GWF7.0载体。

[0096] 如图5a显示, 通过PCR反应得到了lnc12 sORF和lnc12 5'UTR+sORF两个目的片段, 经过测序验证后, 利用Gateway技术进行BP反应, 将lnc12 sORF 和lnc12 5'UTR+sORF两个目的片段分别插入pCR8/GW/TOPO™载体上。然后利用目的基因的正向引物和pCR8/GW/TOPO™载体上的T7引物进行菌液检测, 结果显示目的基因已经连接到入门载体上(图5b)。测序验证后, 将目的基因序列无误且方向没有插反的重组子进行LR反应。通过LR反应将目的载体转移到带有GFP标签的瞬时表达载体p2GWF7.0上(图5c), 通过测序对构建好的载体进行验证。最终得到了35S::lnc12 sORF-GFP和35S::lnc12 5'UTR+sORF-GFP 两个载体。

[0097] 实施例3杨树原生质体与转化

[0098] 1、杨树原生质体的分离

[0099] 1) 在10mL离心管中加入: 200mM MES 500 $\mu$ L, 0.8mol/L甘露醇3.75mL, ddH<sub>2</sub>O 75 $\mu$ L, 0.2mol/L KCl 500 $\mu$ L;

[0100] 2) 70 $^{\circ}$ C水浴3-5min;

[0101] 3) 趁热加入100 $\mu$ L纤维素酶和25 $\mu$ L果胶酶;

[0102] 4) 55 $^{\circ}$ C水浴10min后, 置于冰上冷却至室温;

[0103] 5) 加入1mol/L MgCl<sub>2</sub> 50 $\mu$ L、小牛血清蛋白0.005g, 混匀后过滤灭菌。

[0104] 2、酶解杨树叶片

- [0105] 1) 选40天左右,长势良好的‘南林895’杨树组培苗叶片用于制备原生质体;
- [0106] 2) 用刀片将叶片切成0.5-1mm宽的叶条;
- [0107] 3) 将叶片切好后舒展地放入酶液中,28℃暗培养3小时;
- [0108] 4) 加入预冷的5mL W5溶液(2mM MES(Ph5.7),154mM NaCl,125mM CaCl<sub>2</sub>,5mM KCl)稀释含有原生质体的酶液;
- [0109] 5) 使用200目的筛子过滤除去未酶解的叶子;
- [0110] 6) 用50mL的圆底离心管,4℃,900rpm离心5min沉淀原生质体;
- [0111] 7) 除去上清后,用3mL W5溶液重悬沉淀在圆底管底部的原生质体;
- [0112] 8) 显微镜下观察计数;
- [0113] 9) 冰上静止50min,再次除去上清,用一定体积的MMG(4mM MES(Ph5.7),0.4mM甘露醇,15mM MgCl)对原生质体进行重悬,最后使其终浓度达到 $6 \times 10^5$ 个/mL。
- [0114] 3、杨树原生质体瞬时转化
- [0115] 1) 使用天根小提中量质粒提取试剂盒进行高纯度质粒的提取;
- [0116] 2) 向2mL离心管中加入10 $\mu$ L的质粒DNA(10-20 $\mu$ g质粒)和100 $\mu$ L的杨树叶肉原生质体,轻柔混匀;
- [0117] 3) 加入110 $\mu$ L的PEG溶液(1mM甘露醇,0.5mM CaCl<sub>2</sub>,30%PEG-4000),轻柔混匀;
- [0118] 4) 室温静置15-30min;
- [0119] 5) 加入1mL的W5溶液混合混匀;
- [0120] 6) 用水平离心机1000rpm,离心5min,之后弃去上清;
- [0121] 7) 用100 $\mu$ L的0.6M的WI溶液(4mM MES(Ph5.7),0.6mM甘露醇,20mM KCl)轻柔重悬原生质体;
- [0122] 8) 室温下暗培养,诱导原生质体表达转化的载体16h;
- [0123] 9) 使用荧光显微镜观察GFP标签的表达。
- [0124] 结果显示正对照35S::GFP在细胞核、细胞质和细胞膜上都有GFP荧光信号,而在杨树原生质体中分别转化35S::lnc12 sORF-GFP和35S::lnc12 5'UTR+sORF-GFP载体后,原生质体细胞中只检测到叶绿体的自发荧光,未检测到GFP荧光信号。说明lnc12不具有编码能力,确实是一个非编码RNA。
- [0125] 实施例4实时定量检测lnc12的表达水平
- [0126] 实时定量PCR所用试剂盒为PowerUP™ SYBR Green Master mix,购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,所用仪器为ABI ViiA™7 Real-time PCR system (Applied Biosystems,USA)。利用Oligo 6软件进行引物设计,所用引物见表3。每个反应做三次重复,以18S为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对表达量的计算。
- [0127] qRT-PCR反应所用的试剂按下面的比例配置:PowerUP™ SYBR Green Master mix 5 $\mu$ L,PCR Forward Primer(10 $\mu$ M)0.5 $\mu$ L,PCR Reverse Primer(10 $\mu$ M)0.5 $\mu$ L,cDNA模板1 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 3 $\mu$ L,总体积为10 $\mu$ L;
- [0128] 标准反应程序为:50℃2min激活UDG酶;95℃2min预变性;95℃15s,60℃1min,40个循环。
- [0129] 熔解曲线设置:1.6℃/s 95℃15s;1.6℃/s 60℃1min;0.15℃/s 95℃ 15s。
- [0130] 表3 lnc12的实时定量引物

[0131]	引物名称	引物序列 (5'-3')
	lnc12 qRT-PCR F	TTGGTTGGTCTCTCTAGGAGCTGT
	lnc12 qRT-PCR R	GCAGCCTAGCTGCGTAGGAA

[0132] 选择CKS(茎)、WR1(1周根)和WR2(2周根)三个组织进行了高通量测序,通过生物信息分析得到了大量的lncRNA。通过挑选一些差异表达的 lncRNA进行实时定量分析发现,其中lnc12在1周根和2周根中的表达量显著高于在茎中的表达量,并且在2周根中的表达量高于1周根(图6),推测lnc12 可能在杨树不定根发育过程中发挥作用,因此选择了lnc12进行后续的功能研究。另外,在杨树的顶芽(apical bud)、根尖(root tip)、幼叶(young leaf)、成熟叶(mature leaf)、韧皮部(phloem)和木质部(xylem)等七个组织中检测lnc12 的表达水平,发现lnc12在幼叶和幼茎等幼嫩组织中的表达量很高,在韧皮部和木质部的表达量较低(图7)。

[0133] 实施例5 lnc12的过表达载体构建

[0134] 1、BP反应

[0135] 将lnc12全长序列连接到入门载体pCR8/GW/TOPO™ vector。

[0136] 2、过表达载体pH35GS的扩繁与质粒提取

[0137] 1) 将冻存于-80℃的过表达载体pH35GS取出化冻;

[0138] 2) 用接种环蘸取一些已化冻的pH35GS菌液在添加有壮观霉素的LB固体培养基上划线;

[0139] 3) 37℃培养12h左右,经挑菌、摇菌后进行阳性检测;

[0140] 4) 将检测阳性的菌液进行扩繁;

[0141] 5) 使用AXYGEN小提中量试剂盒进行质粒提取,并对质粒的纯度和浓度进行检测;

[0142] 6) 高纯度的质粒存储于-20℃备用。

[0143] 3、线性化过表达载体pH35GS

[0144] 1) 利用BstXI对pH35GS进行酶切,反应如下:10×H Buffer 5μL, purified pH35GS Vector 4μg, Bstx1 2μL, 添加ddH<sub>2</sub>O至总体积为50μL;

[0145] 2) 45℃反应1h;

[0146] 3) 酶切产物用AXYGEN PCR Purification Kit回收纯化。

[0147] 4、LR反应

[0148] 通过LR反应将lnc12全长序列从入门载体转移到过表达载体pH35GS中。

[0149] 5、过表达载体的检测

[0150] 如图8a所示,通过BP反应将lnc12全长序列连接到入门载体上,经过测序验证后,进行后续的LR反应。通过LR反应将lnc12从入门载体上转移到过表达载体pH35GS上。以启动子上的p35SF引物为正向引物,lnc12的下游引物为反向引物对LR反应构建好的载体进行菌液PCR检测并测序验证。经过测序验证后,利用液氮冻融法将序列和插入方向都正确的35S::lnc12载体载入农杆菌,经过PCR检测正确的菌液用于后续的杨树遗传转化。

[0151] 实施例6 lnc12的CRISPR/Cas9敲除载体构建与检测

[0152] 1、lnc12的DNA序列扩增

[0153] 分别以‘南林895’杨和山新杨叶片为材料,利用北京天根公司的植物基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取。利用高保真酶PrimeSTAR Max DNA Ploymerase对lnc12的DNA序列

进行扩增。具体方法如下：

[0154] 反应体系:PrimeSTAR Max premix (2x) 25 $\mu$ L,PCR Forward Primer (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ L, PCR Reverse Primer (10 $\mu$ M) 1 $\mu$ L,DNA模板1 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 22 $\mu$ L,总体积50 $\mu$ L。

[0155] 反应程序:98 $^{\circ}$ C 15s,55 $^{\circ}$ C 15s,72 $^{\circ}$ C 15s,共30个循环

[0156] PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带回收,载体连接、转化,进一步进行菌液检测和测序。

[0157] 2、lnc12的CRISPR/Cas9敲除载体构建

[0158] 根据CRISPR/Cas9载体的原理从‘南林895’和山新杨lnc12的保守的DNA序列中查找潜在的CRISPR/Cas9靶位点。根据靶位点在lnc12的DNA序列中的位置以及靶位点可能的脱靶情况,从中选择了3个作为最终的靶位点,即Target 1、Target 2和Target 3,它们的序列信息见表4。进而,根据这三个靶位点的序列设计sgRNA引物(表5)。选用的CRISPR/Cas9载体是由华南农业大学刘耀光院士惠赠的pYLCRISPR/Cas9pUbi-N载体。该载体含有NPTII抗性基因,具有卡那霉素抗性,Cas9蛋白由Ubi启动子驱动。3个sgRNA表达盒中间载体分别是由拟南芥AtU3d启动子驱动的pYLsgRNA-AtU3d/LacZ载体、AtU3b启动子驱动的pYLsgRNA-AtU3b载体和AtU6-1启动子驱动的pYLsgRNA-AtU6-1载体。首先利用overlapping PCR法将三个拟南芥启动子与3个sgRNA连接起来构成1个AtU3d::Target1-AtU3b::Target2-AtU6-1::Target3表达盒。然后用金门克隆法将AtU3d::Target1-AtU3b::Target2-AtU6-1::Target3表达盒连接到pYLCRISPR/Cas9pUbi-N载体上,最终成功构建成以lnc12为靶标的CRISPR/Cas9敲除载体。载体构建所需引物见表5。

[0159] 表4 lnc12的CRISPR/Cas9靶位点序列

靶位点	靶位点序列 (5'-3')
Target 1	GTTGTGATGGTTTCCAGGCA
Target 2	CCCAATTGCAGTTCCTGGT
Target 3	GAGCAAGGTTGTCTTACTGG

[0161] 3、lnc12的CRISPR/Cas9敲除载体的瞬时转化

[0162] 将lnc12的CRISPR/Cas9敲除载体 (CRISPR/Cas9-lnc12) 转入杨树原生质体中以便于快速检测它的敲除效率。

[0163] 4、CRISPR/Cas9-lnc12的敲除效率检测

[0164] 将转入pYLCRISPR/Cas9pUbi-N空载体和CRISPR/Cas9-lnc12敲除载体的杨树原生质体进行DNA提取。在靶位点两端设计引物进行PCR扩增,然后进行测序。靶位点的检测引物见表5。

[0165] 表5 lnc12敲除载体构建和检测所需的引物

引物名称	引物序列 (5'-3')
U-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG
gR-R	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG
Pps-R	TTCAGAGGTCTCTACCGACTAGTCACGCGTATGGAAT CGGCAGCAA
Pgs-2	AGCGTGGGTCTCGTCAGGGTCCATCCACTCCAAGCTC
Pps-2	TTCAGAGGTCTCTCTGACACTGGAATCGGCAGCAAAG G
Pgs-3	AGCGTGGGTCTCGTCTTCACTCCATCCACTCCAAGCTC
Pps-3	TTCAGAGGTCTCTAAGACTTTGGAATCGGCAGCAAAG G
[0166] SP-L1	GCGGTGTCATCTATGTTACTAG
SP-R	TGCAATAACTTCGTATAGGCT
Cas9-F	CTGACGCTAACCTCGACAAG
Cas9-R	CCGATCTAGTAACATAGATGACACC
Pgs-L	AGCGTGGGTCTCGCTCGACGCGTATCCATCCACTCCA AGC
<i>lnc12</i> target 1 F	TTGTGATGGTTTCCAGGCAGTTTTAGAGCTAGAAAT
<i>lnc12</i> target 1 R	TGCCTGGAAACCATCACAATGACCAATGGTGCTTTG
<i>lnc12</i> target 2 F	GAGCAAGGTTGTCTTACTGGGTTTTAGAGCTAGAAAT
<i>lnc12</i> target 2 R	CCAGTAAGACAACCTTGCTCTGACCAATGTTGCTCC
<i>lnc12</i> target 3 F	CCCAATTGCAGTTCCTGGTGTTTTAGAGCTAGAAAT
<i>lnc12</i> target 3 R	ACCAGGGAAGTCAATTGGGCAATCACTACTTCGTCT
	D
[0167] <i>lnc12</i> 检测 F	GGATGATCAGCTGTTGTTGATTAGT
<i>lnc12</i> 检测 R	AACAAAAAGAAAAATAAATATAGGTTCCA

[0168] 5、杨树的遗传转化

[0169] 1) 挑取阳性单菌落,接种于50mL的LB液体培养基中,28℃250rpm摇菌至OD<sub>600</sub>值约

0.5;

[0170] 2) 将菌液分装于50mL的离心管中,1400xg离心5分钟,除去上清,收集菌斑;

[0171] 3) 用等体积的MS不加蔗糖的液体培养基重悬;

[0172] 4) 取一个月左右的山新杨叶片将叶缘剪出伤口,放入菌液中,在25℃90 rpm下摇半个小时;

[0173] 5) 取出叶盘,转入不添加抗生素的分化培养基中暗培养2天;

[0174] 6) 用不含糖的MS液体培养基对叶盘清洗,然后转入不添加抗生素的分化培养基中正常光下培养1周;

[0175] 7) 1周后将叶盘放到添加抗生素的分化培养基中进行培养;

[0176] 8) 当叶盘长成小芽时,将其转入壮苗培养基中;

[0177] 9) 最后将长大的小苗转入MS培养基中。

[0178] 6、转基因植株的检测与表型观测

[0179] 对转基因植株和未转基因植株进行DNA和RNA提取,利用PCR技术在DNA水平上检测外源基因是否整合到杨树基因组中,利用实时定量PCR技术,检测外源基因在RNA水平的表达情况,对阳性植株进行表型观测。

[0180] 1) 转基因杨树的分子检测

[0181] 利用农杆菌介导法将过表达载体35S::lnc12转入山新杨中。通过愈伤组织进行芽诱导和根诱导,最终得到了大量的转基因株系。从中选取了9个株系以及2株CK一起进行了DNA提取,并以这9个株系和2株CK的DNA为模板,以启动子上的p35sf引物为正向引物,lnc12的下游引物为反向引物进行PCR扩增。结果显示,未进行遗传转化的CK没有条带,而9个转基因株系都有正确的条带,这初步证明lnc12已经整合进了杨树的基因组中,这9个株系都是阳性植株(图9a)。除了DNA层面的检测外,还对转基因株系在RNA层面进行了检测。从这9个阳性株系中选取了6个株系的cDNA为模板,对lnc12在转基因株系中的表达水平进行了实时定量检测。结果显示,lnc12在这6个转基因株系中的表达水平显著高于CK,其中5个株系的表达水平都比CK高一百多倍(图9b)。

[0182] 2) 转基因杨树的表型观测

[0183] 用生长一个月的lnc12转基因杨树和CK在不添加任何外源激素的MS培养基中进行继代培养,并分别选取10株CK和lnc12转基因杨树的生根时间和生根率进行统计。结果显示,与CK相比,lnc12转基因杨树的生根时间明显推迟,且生根率也低很多。CK在继代后的第4天已经有一部分植株开始生根,在第7天生根率就达到了100%;而lnc12转基因杨树到第7天才有部分植株生根,到第12天生根率才达到60%,之后一致维持在60%(图10)。生长素在植物不定根形成和发育过程中起重要的作用,在MS培养基中添加了0.1mg/L的NAA,然后再次对CK和lnc12转基因杨树的生根时间和生根率进行统计。结果发现,与在MS培养基相比,部分CK在添加有NAA的MS培养基的生根时间明显提前,在第6天生根率就达到了100%(图10)。而lnc12转基因杨树的生根时间在加NAA后有了明显的提前,在第5天就有部分植株开始生根,在第7天就有60%的植株生根了,生根率有了明显的提高,达到了90%。这些结果表明,过表达lnc12能够延迟杨树的生根时间和生根率,在培养基中添加NAA后能够很大程度上弥补这一生根缺陷(图10)。

[0184] 对生长40天的lnc12转基因杨树进行观测,发现lnc12转基因杨树的不定根数目

明显减少;在MS培养基中添加0.1mg/L的NAA后,1nc12转基因杨树的不定根数目显著明显。每个株系选取5株进行不定根数目的统计,在不添加NAA的MS培养基中,1nc12转基因杨树的不定根数目显著少于CK;在添加NAA的MS培养基中,无论是CK还是1nc12转基因株系的不定根数目都显著增加(图11)。同时,在添加NAA的MS培养基中,虽然CK的不定根数目仍是比1nc12转基因株系的不定根数目多,但是差异并不显著。这些结果说明1nc12可能通过调控生长素从而参与了杨树不定根的形成和发育。用体式显微镜观察1nc12转基因杨树不定根的根毛,发现与CK相比,1nc12转基因杨树不定根上的根毛明显减少(图12)。这表明1nc12可能参与了杨树不定根根毛的形成。

#### [0185] 7、CRISPR/Cas9敲除载体的构建与敲除效率检测

[0186] 将pYLCRISPR/Cas9pUbi-N空载体和构建好的1nc12-pYLCRISPR/Cas9pUbi-N载体分别转入杨树原生质体中。经过24h暗培养,提取转化的原生质体的DNA,并设计引物对包含3个靶位点的序列进行扩增。测序后,通过Synthego软件分析发现在3个靶位点附近都存在碱基的插入和缺失,这说明三个靶位点都成功地进行了基因编辑,该CRISPR/Cas9基因编辑体系在杨树中是可行的。在Target 1的突变率为4%,Target 2的突变率为4.1%,而Target 3的突变率为3.5%,总的突变率为11.6%。三个靶位点的突变率差别不大,这说明AtU3b、AtU3d和AtU6-1这三个启动子在杨树中的效率相差不大。稳定的遗传转化已经进行,尚未得到转基因植株。

[0187] 需要注意的是,以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

## 序列表

<110> 南京林业大学

<120> 一种lncRNA lnc12及其在调控杨树不定根发育中的应用

<130> 1

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1372

<212> DNA

<213> lnc12

<400> 1

```

ggatgatcag ctgttggtga ttagtggate tatcttcttt cttgggggtt gtctagctct 60
gtactatctt caagcggtgt gaaatttgcg ggggtgttgg ttctttcata catcggttg 120
ctttgtgatt ggctaggttg ttgctgtgtt gttgttgtga tggtttccag gcatggcttt 180
ctttcataca tgggtttgga attgacatgc aagttgttgc cattatcatg attgtgcatt 240
aaatgcactc ttccactttg tgttggtttg tcattaatca tgacttggga gagctgcggt 300
ttttggcttg gacatgatat gttttttctc tcatgaagtt tggttggtgt ttcaagttgg 360
ttggctcttc taggagctgt tcattcccga ttctcatgaa actagatgcg tttttttccc 420
ttgctcattc tttagcacia tttgtgtttg tcatttttagt cttattcttc agtattttcc 480
tacgcagcta ggctgcacct tttttaaatt caatttgtag atgatttata ggcaccctc 540
tcattttgat ttgaagttgg tgtgagatag gcttggtgtt tttgagagag gccttcccaa 600
ccattactct caactcttcc actgtcaata tttttcccaa ttgcagttcc ctggtaggtt 660
tttgttggtt taacagtttg ttttaatttc catcttttgt tgttgctttt ttcgtattgg 720
gtgtgttttt aaattaatgt ttttggtttt ttttttttta tactcagttg ctccaagttc 780
atcatttcat tactgatttg tttctgcagc ttcttgcttt ttcaggaaat atattattcc 840
agttgctgtc tctcttcaat cggttatctg ttttttctg caatttttcc acattgttct 900
tatctttact ctttggtttt gtttcttctc ctttaaatgt gcttttggct ctatgctttt 960
tttatttctg agtttttagt tgtctcagat ggttcagctg gtgactgttt tttttgcagt 1020
gtgttgccctc tgcgtcgggt ccttggttaa cctattaggg ctttcttggg taggagcaag 1080
gttgtcttac tgggtgtctc actcttttca gaagagcttt aacaactgat tgtgccttac 1140
tcggcaagtt tctcttttcc aaggtgtttt aggaacatcg ccatgtcatc tctgtgttcg 1200
tttggttcc caaatctttt ttttttgggt ttgtaacagc ctttcatacc ttcgtttcaa 1260
gggtgctttt taagacctta ccatttggtt cgtgttggtc tgttcttttt tatgtcacc 1320
ttctctttgc attgaatttg gtttgaacc tatatttatt tttctttttg tt 1372

```

<210> 2

<211> 159

<212> DNA

<213> sORF (artificial)



<400> 2

atgaagtttg gttggtgtt caagttggtt ggtctctcta ggagctgttc attcccgatt 60  
ctcatgaaac tagatgcgtt ttttccctt gctcattctt tagcacaatt tgtgtttgtc 120  
attttagtct tattcttcag tatttccta cgcagctag 159

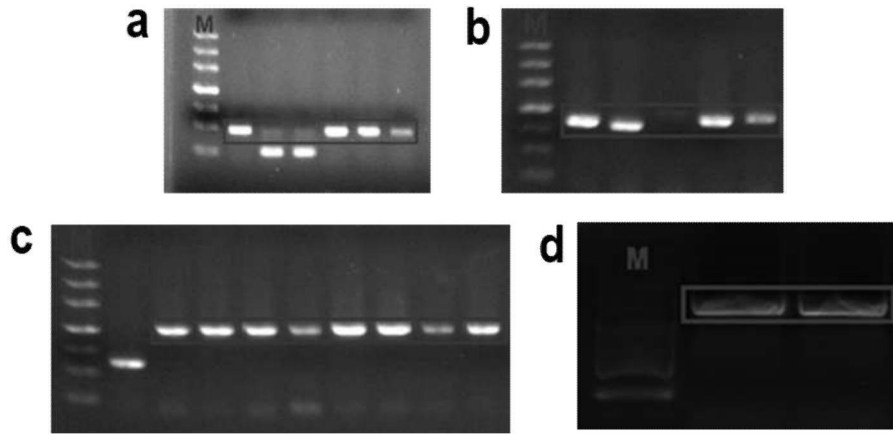


图1

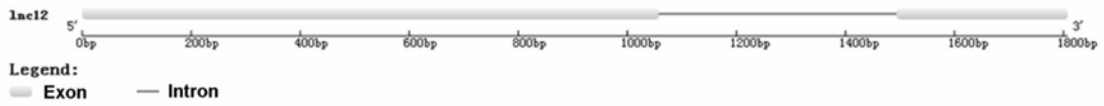


图2



图3



图4

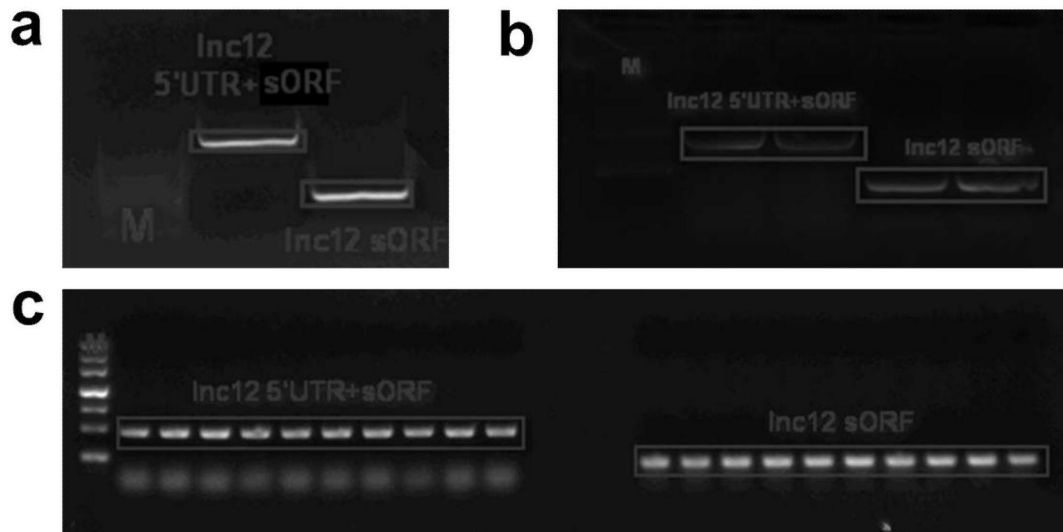


图5

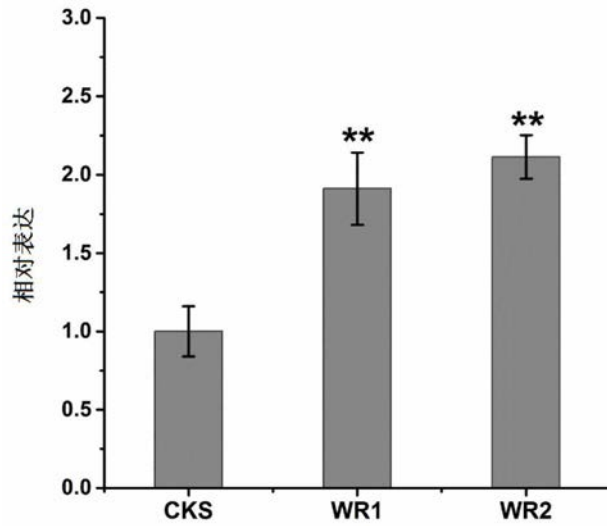


图6

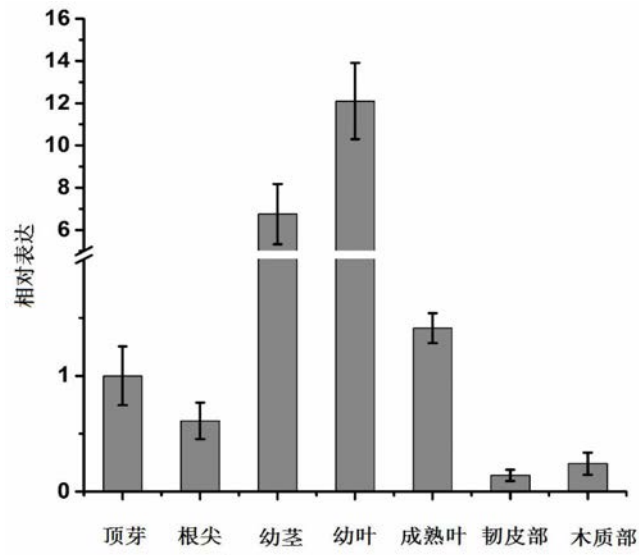


图7

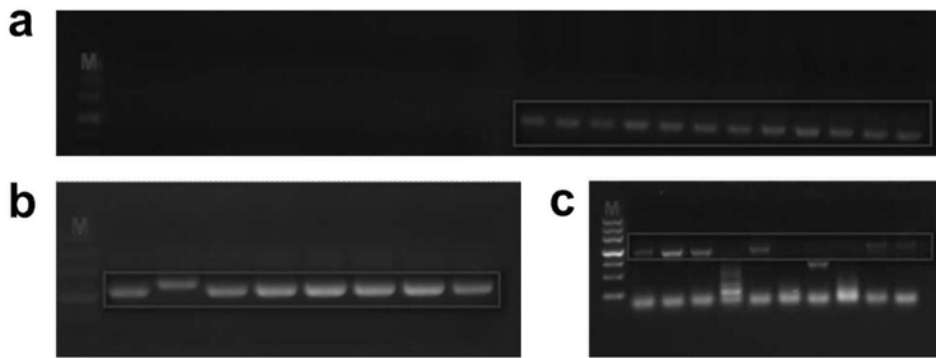


图8

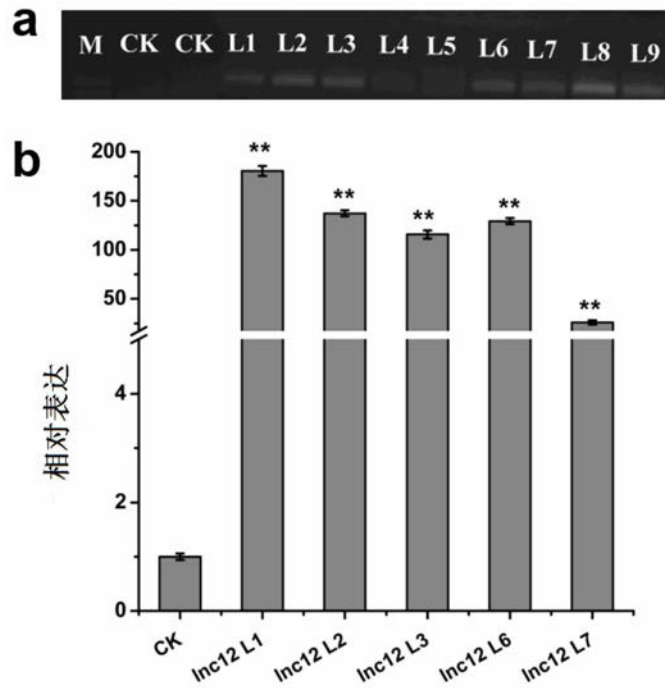


图9

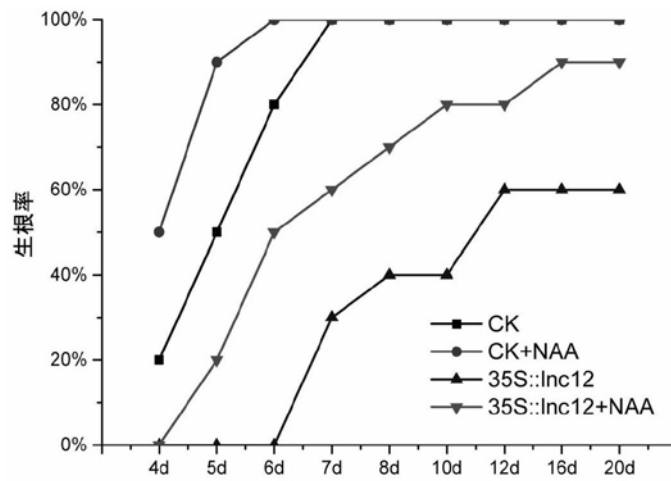


图10

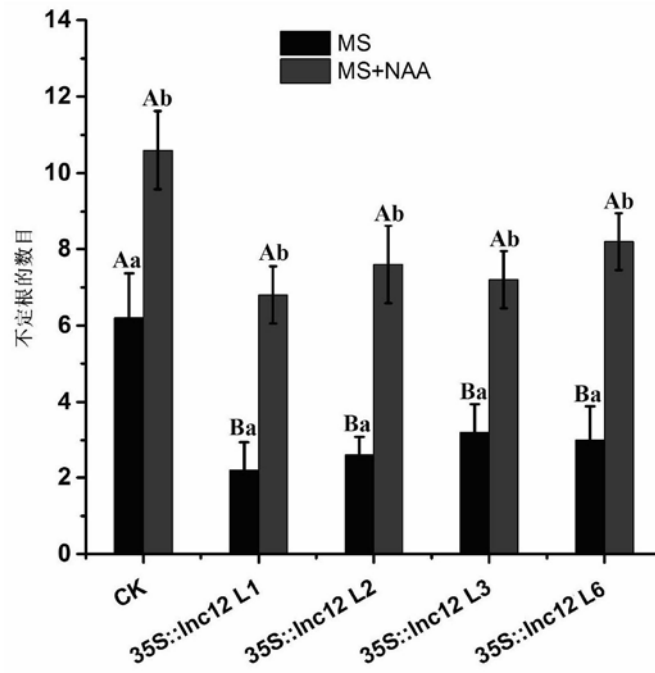


图11

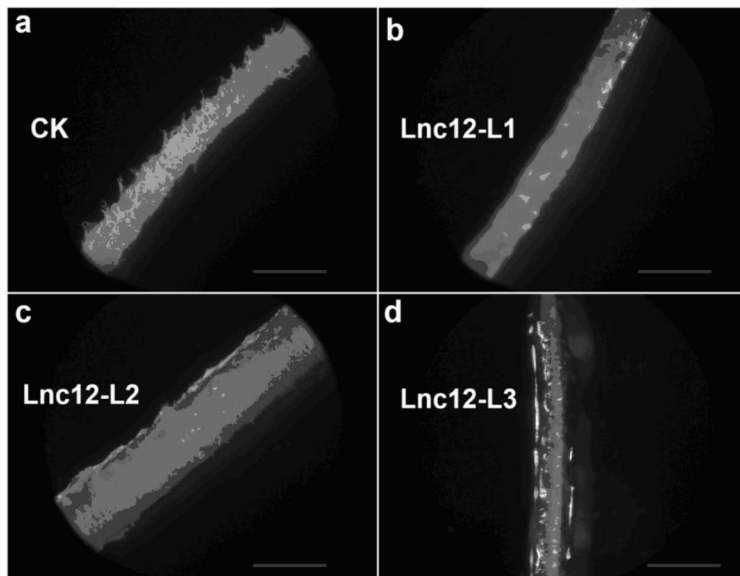


图12