



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107604004 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201710865225.7

(22)申请日 2017.09.22

(71)申请人 西安医学院

地址 710021 陕西省西安市未央区辛王路1号

(72)发明人 马茜 牛静燕 周丽 王婷 汪洋

(74)专利代理机构 西安弘理专利事务所 61214
代理人 罗磊

(51)Int.Cl.

C12N 15/863(2006.01)

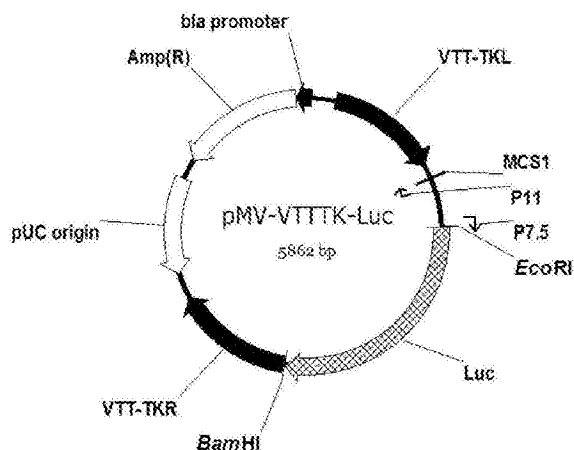
权利要求书2页 说明书5页
序列表5页 附图3页

(54)发明名称

用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒,包括出发载体pMV、痘苗病毒天坛株TK基因的上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR,在VTT-TKL与VTT-TKR之间有痘苗病毒早/晚期启动子P11和晚期启动子P7.5,启动子P11和启动子P7.5间的连接序列有两个酶切位点,启动子P11的下游和启动子P7.5的下游均包含1个多克隆位点,启动子P7.5后的多克隆位点处插入示踪基因Luciferase,该示踪打靶质粒的核苷酸序列如序列1所示。本发明的示踪打靶质粒,解决了现有的重组痘苗病毒无法分析病毒在体内的分布情况问题。本发明还提供了上述示踪打靶质粒的制备方法。



1. 用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒,其特征在于,包括出发载体pMV、痘苗病毒天坛株TK基因的上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR,在VTT-TKL与VTT-TKR之间有痘苗病毒早/晚期启动子P11和晚期启动子P7.5,启动子P11和启动子P7.5间的连接序列有两个酶切位点,启动子P11的下游和启动子P7.5的下游均包含1个多克隆位点,启动子P7.5后的多克隆位点处插入示踪基因Luciferase,该示踪打靶质粒的核苷酸序列如序列1所示。

2. 如权利要求1所述的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒,其特征在于,所述出发载体pMV包含大肠杆菌复制起始位点pUC ori和氨苄青霉素抗性筛选标记。

3. 如权利要求1或2所述的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒,其特征在于,所述启动子P11和启动子P7.5启动基因表达的顺序相反,启动子P11为反向启动,启动子P7.5为正向启动。

4. 如权利要求1所述的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的制备方法,其特征在于,具体按照以下步骤实施:

步骤1:人工设计并合成启动子P7.5和启动子P11序列及两个多克隆位点序列,并克隆到pMV载体中,形成pMV-PRO质粒;设计合成引物,PCR获得上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR及示踪基因Luciferase片段;

步骤2:将步骤1中得到的pMV-PRO质粒和VTT-TKR片段分别经BamHI/KpnI双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得中间质粒pMV-VTTTKR;

步骤3:将步骤2中得到的pMV-VTTTKR质粒和步骤1中得到的VTT-TKL片段分别经PstI/SaII双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得打靶质粒pMV-VTTTK;

步骤4:将步骤3中得到的pMV-VTTTK质粒和步骤1中得到的Luciferase片段分别经EcoRI/BamHI双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得示踪打靶质粒pMV-VTTTK-Luc。

5. 如权利要求4所述的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的制备方法,其特征在于,所述步骤1中设计合成的引物具体包括如下三对引物:

扩增VTT-TKR的引物对:

正向引物VTT-TKR-F:5' -CGGGATCCGGCTTCCTTTTCTAAACGATTGG-3' ;

反向引物VTT-TKR-R:5' -GGGGTACCGAGTCAGTCTCATGTTCTCACCG-3' ;

扩增VTT-TKL的引物对:

正向引物VTT-TKL-F:5' -AACTGCAGACAGATATCCGACAAAGGATTG-3' ;

反向引物VTT-TKL-R:5' -ACGCGTCGACATCAACTGAATATGTCCGCCG-3' ;

扩增Luciferase基因的引物对:

Luc-F:5' -GGAATTCGCCACCATGGAAGACGCCA-3' ;

Luc-R:5' -CGGGATCCTTACACGGCGATCTTCCGC-3' 。

6. 如权利要求5所述的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的制备方法,其特征在于,所述步骤1中获得上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR及示踪基因Luciferase的具体步骤如下:

1) 提取野生型VACV-VTT基因组DNA;

2) 以VACV-VTT基因组DNA为模板,以VTT-TKR-F/VTT-TKR-R为引物PCR获得携带BamHI/

KpnI酶切位点的VTT-TKR,以VTT-TKL-F/VTT-TKL-R为引物PCR获得携带PstI/SalI酶切位点的VTT-TKL;以p-EGFP-Luc质粒为模板,以Luc-F/Luc-R为引物PCR获得携带EcoRI/BamHI酶切位点的Luciferase基因片段;

3) PCR产物经琼脂糖凝胶电泳及胶回收,分别获得上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR及示踪基因Luciferase片段。

用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物基因工程技术领域,具体涉及一种用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒,本发明还涉及该用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的制备方法。

背景技术

[0002] 痘苗病毒(vaccinia virus,VACV)属于痘病毒科,正痘病毒属,是一种有包膜的双链DNA病毒,其基因组长达200kbp。VACV作为疫苗的载体或溶瘤病毒,相比其他病毒载体如逆转录病毒、人单纯疱疹病毒和腺病毒等,具有很多独特的优势。且VACV作为人类消灭天花的疫苗,在人体的应用长达一个多世纪,其安全性和有效性已经在实践中被充分验证。因此,VACV被认为是较理想的溶瘤病毒载体。

[0003] 痘苗病毒天坛株(Vaccinia virus Tian Tan,VACV-VTT)是我国特有的病毒株,由于地域性使用原因,用于溶瘤病毒改造的痘苗病毒主要包括:WR株(Western reserve)、韦氏株(Wyeth或NYCBOH)、李斯特株(Lister)和哥本哈根株(Copenhagen),针对VACV-VTT的溶瘤效力的研究尚少。为了研究并提高VACV-VTT的溶瘤效力,需借助相应的打靶质粒来改造VACV-VTT。目前,我国已构建的20余种针对痘苗病毒天坛株的打靶质粒主要用于预防传染性疾病,且以此构建的重组病毒缺乏示踪功能,无法分析病毒在体内的分布情况,尤其是在肿瘤中的分布,已不能满足当前减毒溶瘤病毒研究的需要。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒,解决了现有的重组痘苗病毒无法分析病毒在体内的分布情况问题。

[0005] 本发明还提供了上述用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的制备方法。

[0006] 本发明所采用的第一种技术方案是:用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒,包括出发载体pMV、痘苗病毒天坛株TK基因的上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR,在VTT-TKL与VTT-TKR之间有痘苗病毒早/晚期启动子P11和晚期启动子P7.5,启动子P11和启动子P7.5间的连接序列有两个酶切位点,启动子P11的下游和启动子P7.5的下游均包含1个多克隆位点(Multiple cloning site,MCS),启动子P7.5后的多克隆位点处插入示踪基因Luciferase,该示踪打靶质粒的核苷酸序列如序列1所示。

[0007] 本发明第一种技术方案的特点还在于,

[0008] 出发载体pMV包含大肠杆菌复制起始位点pUC ori和氨苄青霉素抗性筛选标记。

[0009] 启动子P11和启动子P7.5启动基因表达的顺序相反,启动子P11为反向启动,启动子P7.5为正向启动。

[0010] 本发明所采用的第二种技术方案是:用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的制备方法,具体按照以下步骤实施:

[0011] 步骤1:人工设计并合成启动子P7.5和启动子P11序列及两个多克隆位点序列,并克隆到pMV载体中,形成pMV-PRO质粒;设计合成引物,PCR获得上游同源重组臂VTT-TKL和下

游同源重组臂VTT-TKR及示踪基因Luciferase片段；

[0012] 步骤2:将步骤1中得到的pMV-PRO质粒和VTT-TKR片段分别经BamHI/KpnI双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得中间质粒pMV-VTTTKR;

[0013] 步骤3:将步骤2中得到的pMV-VTTTKR质粒和步骤1中得到的VTT-TKL片段分别经PstI/SaII双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得打靶质粒pMV-VTTTK;

[0014] 步骤4:将步骤3中得到的pMV-VTTTK质粒和步骤1中得到的Luciferase片段分别经EcoRI/BamHI双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得示踪打靶质粒pMV-VTTTK-Luc。

[0015] 本发明第二种技术方案的特点还在于,

[0016] 步骤1中设计合成的引物具体包括如下三对引物:

[0017] 扩增VTT-TKR的引物对:

[0018] 正向引物VTT-TKR-F:5' -CGGGATCCGGCTTCCTTTTCTAAACGATTGG-3' ;

[0019] 反向引物VTT-TKR-R:5' -GGGGTACCGAGTCAGTCTCATGTTCTCACCG-3' ;

[0020] 扩增VTT-TKL的引物对:

[0021] 正向引物VTT-TKL-F:5' -AACTGCAGACAGATATTCGACAAAGGATTG-3' ;

[0022] 反向引物VTT-TKL-R:5' -ACGCGTCGACATCAACTGAATATGTCCGCCG-3' ;

[0023] 扩增Luciferase基因的引物对:

[0024] Luc-F:5' -GGAATTCGCCACCATGGAAGACGCCA-3' ;

[0025] Luc-R:5' -CGGGATCCTTACACGGCGATCTTTCCGC-3' 。

[0026] 步骤1中获得上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR及示踪基因Luciferase的具体步骤如下:

[0027] 1) 提取野生型VACV-VTT基因组DNA;

[0028] 2) 以VACV-VTT基因组DNA为模板,以VTT-TKR-F/VTT-TKR-R为引物PCR获得携带BamHI/KpnI酶切位点的VTT-TKR,以VTT-TKL-F/VTT-TKL-R为引物PCR获得携带PstI/SaII酶切位点的VTT-TKL;以p-EGFP-Luc质粒为模板,以Luc-F/Luc-R为引物PCR获得携带EcoRI/BamHI酶切位点的Luciferase基因片段;

[0029] 3) PCR产物经琼脂糖凝胶电泳及胶回收,分别获得上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR及示踪基因Luciferase片段。

[0030] 本发明的有益效果是,

[0031] (1) 本发明示踪打靶质粒包含Luciferase基因、靶向敲除痘苗病毒天坛株的TK基因的同源重组臂,可制备出具有示踪能力的减毒的重组痘苗病毒天坛株,且TK基因缺失可用于筛选重组病毒;

[0032] (2) 本发明示踪打靶质粒包含痘苗病的特有的早/晚期启动子和晚期启动子,在不同启动子下的外源基因的表达量不同,可满足不同外源基因需要量不同的需求,两启动子间的酶切位点可插入新的基因表达盒用于表达更多的外源基因;

[0033] (3) 本发明示踪打靶质粒制备出的重组痘苗病毒天坛株,可分析溶瘤痘苗病毒在体内的分布情况,尤其在肿瘤中的分布,为痘苗病毒作为载体研发活疫苗及肿瘤生物治疗提供了良好工具。

附图说明

- [0034] 图1是本发明的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的示意图；
- [0035] 图2是本发明的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒中启动子与多克隆位点的示意图；
- [0036] 图3是本发明的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的构建步骤示意图；
- [0037] 图4是本发明的用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒的酶切鉴定图。

具体实施方式

[0038] 下面结合附图以及具体实施方式对本发明进行详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0039] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0040] 下述实施例中所使用的材料、试剂,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0041] 本发明中野生痘苗病毒天坛株的基因组DNA序列为GenBank号为AF095689.1的序列(VRL 14-FEB-2000)。

[0042] 以下实施例中的野生型痘苗病毒天坛株在西安医学院分子病毒与病毒免疫学实验室(本实验室,下同)保藏。质粒p-EGFP-Luc由本实验室保藏。质粒pMV由华大基因公司提供。

[0043] 本发明提供了一种用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒,其模式图如图1所示,其序列见序列1,包括出发载体pMV,其包含大肠杆菌复制起始位点pUC ori和氨苄青霉素抗性筛选标记,用于重组质粒的增殖与筛选、痘苗病毒天坛株TK基因的上游同源重组臂VTT-TKL和下游同源重组臂VTT-TKR,VTT-TKL和VTT-TKR与痘苗病毒天坛株的TK基因两侧的序列同源,可靶向去除痘苗病毒天坛株的TK基因,在VTT-TKL与VTT-TKR之间有痘苗病毒早/晚期启动子P11和晚期启动子P7.5,启动子P11和启动子P7.5间的连接序列有两个酶切位点(MCS1和MCS2),在此处可添加新的表达盒,启动子P11的下游和启动子P7.5的下游均包含1个多克隆位点,启动子P7.5后的多克隆位点处插入示踪基因Luciferase, Luciferase基因由P7.5启动表达,使重组病毒具有示踪能力,启动子P11后可插入其它外源基因,用于提高痘苗病毒天坛株的抑瘤效应, Luciferase基因片段可插入到晚期启动子P7.5下,也可插入到早/晚期P11启动子下,可根据不同外源基因需求量不同而进行置换。

[0044] 启动子P11和启动子P7.5启动基因表达的顺序相反,启动子P11为反向启动,启动子P7.5为正向启动;上述启动子下游的2个多克隆位点包含的酶切位点不同。

[0045] 本发明用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒pMV-VTTTK-Luc构建过程:人工合成示踪打靶质粒包含的启动子P11、P7.5及多克隆位点序列(即序列2的1-417位,命名为P&MCS)并插入到出发载体pMV中,形成pMV-PRO质粒;将野生痘苗病毒天坛株的DNA序列的第80725-81559位(即序列3的1-835位,命名为VTT-TKR)和第79441-80319位(即序列4的1-879位,命名为VTT-TKL)先后克隆至pMV-PRO质粒,得到包含痘苗病毒天坛株TK基因左右侧同源重组臂的打靶质粒pMV-VTTTK;在P7.5启动子后的多克隆位点间插入Luciferase基因序列(即序列5的1-1659位,命名为Lucifefase,简称Luc),获得示踪打靶质粒pMV-VTTTK-Luc。

[0046] 具体操作如下：

[0047] 1. 人工设计并合成启动子及多克隆位点序列

[0048] 选择痘苗病毒早/晚期启动子P11和晚期启动子P7.5,并筛选合适的内切酶识别序列形成多克隆位点(MCS)。启动子P11为反向启动,启动子P7.5为正向启动,分别位于人工序列的两端,MCS1位于P11的下游,MCS2位于P7.5的下游,在两启动子之间设计连接序列,使两启动子间保持距离,连接序列上设计有酶切位点SacI和SpeI,将设计的人工序列送华大基因公司进行合成,并克隆到pMV载体中,形成pMV-PRO质粒。启动子顺序及多克隆位点包含的酶切位点如图2所示。

[0049] 2. 引物设计与合成

[0050] (1) 扩增VTT-TKR的引物对：

[0051] 正向引物VTT-TKR-F:5' -CGGGATCCGGCTTCCTTTTCTAAACGATTGG-3' (下划线之前部分为保护碱基,下划线部分为BamHI内切酶识别序列,其后序列为序列3的第1-23位)

[0052] 反向引物VTT-TKR-R:5' -GGGGTACCGAGTCAGTCTCATGTTCTCACCG-3' (下划线之前部分为保护碱基,下划线部分为KpnI内切酶识别序列,其后序列为序列3的第813-835位的反向互补序列)

[0053] (2) 扩增VTT-TKL的引物对：

[0054] 正向引物VTT-TKL-F:5' -AACTGCAGACAGATATTCCGACAAAGGATTG-3' (下划线之前部分为保护碱基,下划线部分为PstI内切酶识别序列,其后序列为序列4的第1-23位)

[0055] 反向引物VTT-TKL-R:5' -ACGCGTCGACATCAACTGAATATGTCCGCCG-3' (下划线之前部分为保护碱基,下划线部分为SalI内切酶识别序列,其后序列为序列4的第759-879位的反向互补序列)

[0056] (3) 扩增Luciferase基因的引物对：

[0057] Luc-F:5' -GGAATTCGCCACCATGGAAGACGCCA-3' (下划线之前部分为保护碱基,下划线部分为EcoRI内切酶识别序列,其后序列为序列5的第1-19位)

[0058] Luc-R:5' -CGGGATCCCGGGTTACACGGCGATCTTCCGC-3' (下划线之前部分为保护碱基,下划线部分为BamHI内切酶识别序列,其后序列为序列5的第1640-1659位的反向互补序列)

[0059] 3. 同源重组臂VTT-TKR和VTT-TKL及示踪基因Luciferase的DNA片段的获得

[0060] (1) 提取野生型VACV-VTT基因组DNA:采用Biomiga公司的病毒基因组提取试剂盒提取病毒DNA,按试剂盒内提供的说明书进行操作;

[0061] (2) 以VACV-VTT基因组DNA为模板,以VTT-TKR-F/VTT-TKR-R为引物PCR获得携带BamHI/KpnI酶切位点的VTT-TKR,以VTT-TKL-F/VTT-TKL-R为引物PCR获得携带PstI/SalI酶切位点的VTT-TKL;以p-EGFP-Luc质粒为模板,以Luc-F/Luc-R为引物PCR获得携带EcoRI/BamHI酶切位点的Luciferase基因片段;

[0062] PCR反应体系为:DNA 1 μ l,dNTP mix (2.5mM) 1 μ l,正向引物 (10 μ M) 2 μ l,反向引物 (10 μ M) 2 μ l,5 \times PrimeSTAR buffer 10 μ l,PrimeSTAR HS DNA聚合酶0.5 μ l,加DEPC水至总体积50 μ l。

[0063] PCR反应条件为:98 $^{\circ}$ C预变性30s;98 $^{\circ}$ C变性10s,60 $^{\circ}$ C退火15s,72 $^{\circ}$ C延伸1min/kb,循环30次;72 $^{\circ}$ C延伸5分钟,最后置于4 $^{\circ}$ C保存;

[0064] (3) PCR片段回收:PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,见图VTT-TKR为851bp,VTT-TKL为897bp,Luciferase为1678bp,切胶回收目的条带,获得VTT-TKR,VTT-TKL和Luciferase的DNA片段。

[0065] 4. 示踪打靶质粒pMV-VTTTK-Luc的构建,流程如图3所示。

[0066] (1) pMV-PRO质粒和VTT-TKR片段分别经BamHI/KpnI双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得中间质粒pMV-VTTTKR;

[0067] (2) pMV-VTTTKR质粒和VTT-TKL片段分别经PstI/SaII双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得打靶质粒pMV-VTTTK;

[0068] (3) pMV-VTTTK质粒和Luciferase片段分别经EcoRI/BamHI双酶切后纯化回收,将回收的片段进行连接、转化,获得示踪打靶质粒pMV-VTTTK-Luc。

[0069] 以上每一步质粒构建,均进行相应的酶切鉴定,如图4所示的酶切鉴定图,其中M为MarkerIII。A:pMV-VTTTKR经BamHI/KpnI酶切鉴定图;B:pMV-VTTTK经PstI/SaII酶切鉴定图;C:pMV-VTTTK-Luc经EcoRI/BamHI酶切鉴定图。pMV-VTTTKR经BamHI/KpnI双酶切,应出现845bp及2511bp两条片段,酶切结果与预期一致,酶切结果如图4A所示;pMV-VTTTK经PstI/SaII双酶切,应出现881bp及3348bp两条片段,酶切结果与预期一致,酶切结果如图4B所示;pMV-VTTTK-Luc经EcoRI/BamHI双酶切,应出现1669bp及4193bp两条片段,酶切结果与预期一致,酶切结果如图4C所示,最终,用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒pMV-VTTTK-Luc构建成功。

[0070] 在启动子P11后可插入其它的外源基因,用于提高痘苗病毒天坛株的抑瘤效应,启动子P11和P7.5之间的连接序列上有两个酶切位点SacI和SpeI,可根据需求在此处添加新的表达盒以表达更多的外源基因。

[0071] 本发明工作时,同源臂VTT-TKL和VTT-TKR与野生型痘苗病毒天坛株TK基因两侧的序列发生同源重组,形成敲除TK基因、表达Luciferase基因的重组痘苗病毒天坛株, Luciferase催化荧光素反应产生生物荧光,发挥示踪功能。

<110>西安医学院

<120>用于痘苗病毒天坛株TK基因的示踪打靶质粒及其制备方法

<130>无

<210>1

<211>5862

<212>DNA

<213>pMV-VTTTK-Luc

<400>1

```

AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA 60
GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT 120
TGTA AAAACGA CGGCCAGTCG AACCCAGCAA TGCGTCTCGA TCCGCAGTGT CTTGCGTCTC 180
TTTACTGCAG ACAGATATTC CGACAAAGGA TTGATTACTA TAAATGGAGA ATGTTCTCTA 240
TGTATACTTT AATCCTGTGT TTATAGAGCC CACGTTTAAA CATTCTTTAT TAAGTGTTTA 300
TAAACACAGA TTAATAGTTT TATTTGAAGT ATTCGTTGTA TTCATTCTAA TATATGTATT 360
TTTTAGATCT GAATTAATA TGTTCTTCAT GCCTAAACGA AAAATACCCG ATCCTATTGA 420
TAGATTACGA CGTGCTAATC TAGCGTGTGA AGACGATAAA TTAATGATCT ATGGATTACC 480
ATGGATGACA ACTCAAACAT CTGCGTTATC AATAAATAGT AAACCGATAG TGTATAAAGA 540
TTGTGCAAAG CTTTTGCGAT CAATAAATGG ATCACAACCA GTATCTCTTA ACGATGTTCT 600
TCGCAGATGA TGATTCATTT TTTAAGTATT TGGCTAGTCA AGATGATGAA TCTTCATTAT 660
CTGATATATT GCAAATCACT CAATATCTAG ACTTCTGTGTT ATTATTATTG ATCCAATCAA 720
AAAATAAATT AGAAGCCGTG GGTCAATGTT ATCAATCTCT TTCAGAGGAA TACAGACAAT 780
TGACAAAATT CACAGACTCT CAAGATTTTA AAAAAGTGT TAACAAGGTC CCTATTGTTA 840
CAGATGGAAG GGTCAAACCT AATAAAGGAT ATTTGTTCTGA CTTTGTGATT AGTTTGATGC 900
GATTCAAAAA AGAATCCTCT CTAGCTACCA CCGCAATAGA TCCTATTAGA TACATAGATC 960
CTCGTCGCGA TATCGCATTT TCTAACGTGA TGGATATATT AAAGTCGAAT AAAGTGAACA 1020
ATAATTAATT CTTTATTGTC ATCATGAACG GCGGACATAT TCAGTTGATG TCGACAAGCT 1080
TCAACTGTCC ATGGGCCCCG GCGCGCTCGA GCATCTGGTA ATTTATAGCA TAGAAAAAAA 1140
CAAAATGAAA TTCTACTATA TTTTTACATA CATATATTCT AAATATGAAA GTGGTGATTG 1200
TGACTAGCGT AGCATCGCTC ATCTATATAC TATATAGTAA TACCAATAGA GCTCAAGACT 1260
ACGACTAGTA AACTGATACA ATCTCTTATA TGTGGGTAAT GTTCTCGATG TCGATAGCCA 1320
TATGCCCCGT AGTTGCGATA TACATAAACT GATCACTAAT TCCAAACCCA CCCGCTTTTT 1380
ATAGTAAGTT TTTCACCCAT AAATAATAAA TACAATGGAA TTCGCCACCA TGGAAGACGC 1440
CAAAAACATA AAGAAAGGCC CGGCGCCATT CTATCCGCTG GAAGATGGAA CCGCTGGAGA 1500
GCAACTGCAT AAGGCTATGA AGAGATACGC CCTGGTTCCT GGAACAATTG CTTTTACAGA 1560
TGCACATATC GAGGTGGACA TCACTTACGC TGAGTACTTC GAAATGTCCG TTCGGTTGGC 1620
AGAAGCTATG AAACGATATG GGCTGAATAC AAATCACAGA ATCGTCTGAT GCAGTAAAA 1680
CTCTCTCAA TTCTTTATGC CGGTGTTGGG CGCGTTATTT ATCGGAGTTG CAGTTGCGCC 1740
CGCGAACGAC ATTTATAATG AACGTGAATT GCTCAACAGT ATGGGCATTT CGCAGCCTAC 1800

```

CGTGGTGTTT GTTTCCAAAA AGGGGTTGCA AAAAATTTTG AACGTGCAAA AAAAGCTCCC 1860
 AATCATCCAA AAAATTATTA TCATGGATTC TAAAACGGAT TACCAGGGAT TTCAGTCGAT 1920
 GTACACGTTT GTCACATCTC ATCTACCTCC CGGTTTTAAT GAATACGATT TTGTGCCAGA 1980
 GTCCTTCGAT AGGGACAAGA CAATTGCACT GATCATGAAC TCCTCTGGAT CTACTGGTCT 2040
 GCCTAAAAGGT GTCGCTCTGC CTCATAGAAC TGCCTGCGTG AGATTCTCGC ATGCCAGAGA 2100
 TCCTATTTTT GGCAATCAAA TCATTCCGGA TACTGCGATT TTAAGTGTG TTCCATTCCA 2160
 TCACGGTTTT GGAATGTTTA CTACACTCGG ATATTTGATA TGTGGATTTT GAGTCGTCTT 2220
 AATGTATAGA TTTGAAGAAG AGCTGTTTCT GAGGAGCCTT CAGGATTACA AGATTCAAAG 2280
 TGCCTGCTG GTGCCAACCC TATTCTCCTT CTTCGCCAAA AGCACTCTGA TTGACAAATA 2340
 CGATTTATCT AATTTACACG AAATTGCTTC TGGTGGCGCT CCCCTCTCTA AGGAAGTCGG 2400
 GGAAGCGGTT GCCAAGAGGT TCCATCTGCC AGGTATCAGG CAAGGATATG GGCTCACTGA 2460
 GACTACATCA GCTATTCTGA TTACACCCGA GGGGGATGAT AAACCGGGCG CGGTCCGTAA 2520
 AGTTGTTCCA TTTTTGAAG CGAAGGTTGT GGATCTGGAT ACCGGGAAAA CGCTGGGCGT 2580
 TAATCAAAGA GGCGAACTGT GTGTGAGAGG TCCTATGATT ATGTCCGGTT ATGTAAACAA 2640
 TCCGGAAGCG ACCAACGCCT TGATTGACAA GGATGGATGG CTACATTCTG GAGACATAGC 2700
 TTAAGGGAC GAAGACGAAC ACTTCTTCAT CGTTGACCGC CTGAAGTCTC TGATTAAGTA 2760
 CAAAGGCTAT CAGGTGGCTC CCGCTGAATT GGAATCCATC TTGCTCCAAC ACCCCAACAT 2820
 CTTGACGCA GGTGTCGCAG GTCTTCCCGA CGATGACGCC GGTGAACTTC CCGCCGCCGT 2880
 TGTTGTTTTG GAGCACGAA AGACGATGAC GGAAAAAGAG ATCGTGGATT ACGTCGCCAG 2940
 TCAAGTAACA ACCGCGAAAA AGTTGCGCGG AGGAGTTGTG TTTGTGGACG AAGTACCGAA 3000
 AGGTCTTACC GGAAAACTCG ACGCAAGAAA AATCAGAGAG ATCCTCATAA AGGCCAAGAA 3060
 GGGCGGAAAG ATCGCCGTGT AACCCGGGAT CCGGCTCCT TTTCTAAACG ATTGGGTGAG 3120
 GAAACCGAGA TAGAAATAAT AGGAGGTAAT GATATGTATC AATCGGTGTG TAGAAAGTGT 3180
 TACATCGACT CATAATATTA TATTTTTTAT CTAATAAACT AAAAATAAAC ATTGATTAAA 3240
 TTTTAATATA AACTTAAAA ATGGATGTTG TGTCGTTAGA TAAACCGTTT ATGTATTTTG 3300
 AGGAAATTGA TAATGAGTTA GATTACGAAC CAGAAAGTGC AAATGAGGTC GCAAAAAAAC 3360
 TGCCGTATCA AGGACAGTTA AAATAATTAC TAGGAGAATT ATTTTTTCTT AGTAAGTTAC 3420
 AGCGACACGG TATATTAGAT GGTGCCACCG TAGTGTATAT AGGATCTGCT CCCGGTACAC 3480
 ATATACGTTA TTTGAGAGAT CATTCTATA ATTTAGGAGT GATCATCAA TGGATGCTAA 3540
 TTGACGGCCG CCATCATGAT CCTATTTTAA ATGGATTGCG TGATGTGACT CTAGTGA CTC 3600
 GGTTCGTTGA TGAGGAATAT CTACGATCCA TCAAAAAACA ACTGCATCCT TCTAAGATTA 3660
 TTTTAATTTT TGATGTGAGA TCCAAACGAG GAGGAAATGA ACCTAGTACG GCGGATTTAC 3720
 TAAGTAATTA CGCTCTACAA AATGTCATGA TTAGTATTTT AAACCCCGTG GCATCTAGTC 3780
 TTAATGGAG ATGCCCGTTT CCAGATCAAT GGATCAAGGA CTTTTATATC CCACACGGTA 3840
 ATAAAAATGTT ACAACCTTTT GCTCCTTCAT ATTCAGCTGA AATGAGATTA TTAAGTATTT 3900
 ATACCGGTGA GAACATGAGA CTGACTCGGT ACCTAAAGAG ACGGAGTCAC TGCCAACCGA 3960
 GACGGTCATA GCTGTTTCTT GTGTGCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT GCGCTCGGTC 4020
 GTTCGGCTGC GGCGAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT ACCCACAGAA 4080
 TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC CAGGAACCGT 4140

AAAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA GCATCACAAA 4200
 AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA CCAGGCGTTT 4260
 CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC CGGATACCTG 4320
 TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCATA GCTCACGCTG TAGGTATCTC 4380
 AGTTCGGTGT AGGTCGTTTC CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC CGTTCAGCCC 4440
 GACCGCTGCG CCTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGGTAAG ACACGACTTA 4500
 TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT AGGCGGTGCT 4560
 ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT ATTTGGTATC 4620
 TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG ATCCGGCAAA 4680
 CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC GCGCAGAAAA 4740
 AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA GTGGAACGAA 4800
 AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC CTAGATCCTT 4860
 TTAATTAATA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC TTGGTCTGAC 4920
 AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT TCGTTCATCC 4980
 ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT ACCATCTGGC 5040
 CCCAGTGCTG CAATAATACC GCGGGACCCA CGCTCACCGG CTCCAGATTT ATCAGCAATA 5100
 AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC CGCCTCCATC 5160
 CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA TAGTTTGC GC 5220
 AACGTTGTTG CCATCGCTAC AGGCATCGTG GTATCACGCT CGTCGTTTGG TATGGCTTCA 5280
 TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCGA GTTACATGAT CCCCATGTT GCGCAAAAAA 5340
 GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAGTA AGTTGGCCGC CGTGTATCA 5400
 CTCATGGTTA TGGCAGCACT ACATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT AAGATGCTTT 5460
 TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG GCGACCGAGT 5520
 TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC TTTAAAAGTG 5580
 CTCATCATTG GAAAACGTTT TTCGGGGCGA AACTCTCAA GGATCTTACC GCTGTTGAGA 5640
 TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT TACTTTCACC 5700
 AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAAGGG AATAAGGGCG 5760
 ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG CATTTATCAG 5820
 GGTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AG 5862

<210>2

<211>417

<212>DNA

<213>P&MCS

<400>2

TTA CTG CAGG CAT GCG TCGA CAAGCTTCAA CTGTCCATGG GCCCGCGGCC GCTCGAGCAT 60
 CTGGTAATTT ATAGCATAGA AAAAAACAAA ATGAAATTCT ACTATATTTT TACATACATA 120
 TATTCTAAAT ATGAAAGTGG TGATTGTGAC TAGCGTAGCA TCGCTCATCT ATATACTATA 180
 TAGTAATACC AATAGAGCTC AAGACTACGA CTAGTAAACT GATACAATCT CTTATATGTG 240
 GGTAATGTTC TCGATGTCGA TAGCCATATG CCCGGTAGTT GCGATATACA TAAACTGATC 300

ACTAATTCCA AACCCACCCG CTTTTTATAG TAAGTTTTTC ACCCATAAAT AATAAATACA 360
 ATGGAATTCG CGCGGATAT CGGCGCCTAT TCGTCTAGAG GATCCCCGGG TACCTAA 417

<210>3

<211>835

<212>DNA

<213>VTT-TKR

<400>3

GGCTTCCTTT TCTAAACGAT TGGGTGAGGA AACCGAGATA GAAATAATAG GAGGTAATGA 60
 TATGTATCAA TCGGTGTGTA GAAAGTGTTA CATCGACTCA TAATATTATA TTTTTTATCT 120
 AAAAACTAA AAATAAACAT TGATTAAATT TTAATATAAT ACTTAAAAAT GGATGTTGTG 180
 TCGTTAGATA AACCGTTTAT GTATTTTGAG GAAATTGATA ATGAGTTAGA TTACGAACCA 240
 GAAAGTGCAA ATGAGGTCGC AAAAAACTG CCGTATCAAG GACAGTAAA ACTATTACTA 300
 GGAGAATTAT TTTTCTTAG TAAGTTACAG CGACACGGTA TATTAGATGG TGCCACCGTA 360
 GTGTATATAG GATCTGCTCC CGGTACACAT ATACGTTATT TGAGAGATCA TTTCTATAAT 420
 TTAGGAGTGA TCATCAAATG GATGCTAATT GACGGCCGCC ATCATGATCC TATTTTAAAT 480
 GGATTGCGTG ATGTGACTCT AGTGACTCGG TTCGTTGATG AGGAATATCT ACGATCCATC 540
 AAAAAACAAC TGCATCCTTC TAAGATTATT TTAATTTCTG ATGTGAGATC CAAACGAGGA 600
 GGAAATGAAC CTAGTACGGC GGATTTACTA AGTAATTACG CTCTACAAAA TGTCATGATT 660
 AGTATTTTAA ACCCCGTGGC ATCTAGTCTT AAATGGAGAT GCCCGTTTCC AGATCAATGG 720
 ATCAAGGACT TTTATATCCC ACACGGTAAT AAAATGTTAC AACCTTTTGC TCCTTCATAT 780
 TCAGCTGAAA TGAGATTATT AAGTATTTAT ACCGGTGAGA ACATGAGACT GACTC 835

<210>4

<211>879

<212>DNA

<213>VTT-TKL

<400>4

ACAGATATTC CGACAAAGGA TTGATTACTA TAAATGGAGA ATGTTCCCTAA TGTATACTTT 60
 AATCCTGTGT TTATAGAGCC CACGTTTAAA CATTCTTTAT TAAGTGTTTA TAAACACAGA 120
 TTAATAGTTT TATTTGAAGT ATTTCGTTGTA TTCATTCTAA TATATGTATT TTTTAGATCT 180
 GAATTAATAA TGTTCTTCAT GCCTAAACGA AAAATACCCG ATCCTATTGA TAGATTACGA 240
 CGTGCTAATC TAGCGTGTGA AGACGATAAA TTAATGATCT ATGGATTACC ATGGATGACA 300
 ACTCAAACAT CTGCGTTATC AATAAATAGT AAACCGATAG TGTATAAAGA TTGTGCAAAG 360
 CTTTTGCGAT CAATAAATGG ATCACAACCA GTATCTCTTA ACGATGTTCT TCGCAGATGA 420
 TGATTCATTT TTAAAGTATT TGGCTAGTCA AGATGATGAA TCTTCATTAT CTGATATATT 480
 GCAAATCACT CAATATCTAG ACTTTCTGTT ATTATTATTG ATCCAATCAA AAAATAAATT 540
 AGAAGCCGTG GGTCAATTGTT ATCAATCTCT TTCAGAGGAA TACAGACAAT TGACAAAATT 600
 CACAGACTCT CAAGATTTTA AAAAACTGTT TAACAAGGTC CCTATTGTTA CAGATGGAAG 660
 GGTCAAACCT AATAAAGGAT ATTTGTTTCGA CTTTGTGATT AGTTTGATGC GATTCAAAAA 720
 AGAATCCTCT CTAGCTACCA CCGCAATAGA TCCTATTAGA TACATAGATC CTCGTCGCGA 780

TATCGCATTT TCTAACGTGA TGGATATATT AAAGTCGAAT AAAGTGAACA ATAATTAATT 840
 CTTTATTGTC ATCATGAACG GCGGACATAT TCAGTTGAT 879

<210>5

<211>1659

<212>DNA

<213>Luciferase

<400>5

GCCACCATGG AAGACGCCAA AACATAAAG AAAGGCCCGG CGCCATTCTA TCCGCTGGAA 60
 GATGGAACCG CTGGAGAGCA ACTGCATAAG GCTATGAAGA GATACGCCCT GGTTCCCTGGA 120
 ACAATTGCTT TTACAGATGC ACATATCGAG GTGGACATCA CTTACGCTGA GTACTTCGAA 180
 ATGTCCGTTT GGTGGCAGA AGCTATGAAA CGATATGGGC TGAATACAAA TCACAGAATC 240
 GTCGTATGCA GTGAAAACTC TCTTCAATTC TTTATGCCGG TGTGGGCGC GTTATTTATC 300
 GGAGTTGCAG TTGCGCCCGC GAACGACATT TATAATGAAC GTGAATTGCT CAACAGTATG 360
 GGCATTTTCG AGCCTACCGT GGTGTTTCGTT TCCAAAAAGG GGTGCAAAA AATTTTGAAC 420
 GTGCAAAAAA AGCTCCCAAT CATCAAAAAA ATTATTATCA TGGATTCTAA AACGGATTAC 480
 CAGGGATTTT AGTCGATGTA CACGTTCGTC ACATCTCATC TACCTCCCGG TTTTAATGAA 540
 TACGATTTTG TGCCAGAGTC CTTTCGATAGG GACAAGACAA TTGCACTGAT CATGAACTCC 600
 TCTGGATCTA CTGGTCTGCC TAAAGGTGTC GCTCTGCCTC ATAGAAGTGC CTGCGTGAGA 660
 TTCTCGCATG CCAGAGATCC TATTTTTGGC AATCAAATCA TTCCGGATAC TGCGATTTTA 720
 AGTGTTGTTC CATTCCATCA CGGTTTTGGA ATGTTTACTA CACTCGGATA TTTGATATGT 780
 GGATTTTCGAG TCGTCTTAAT GTATAGATTG GAAGAAGAGC TGTTTCTGAG GAGCCTTCAG 840
 GATTACAAGA TTCAAAGTGC GCTGCTGGTG CCAACCCTAT TCTCCTTCTT CGCCAAAAGC 900
 ACTCTGATTG ACAAATACGA TTTATCTAAT TTACACGAAA TTGCTTCTGG TGGCGCTCCC 960
 CTCTCTAAGG AAGTCGGGGA AGCGGTTGCC AAGAGGTTCC ATCTGCCAGG TATCAGGCAA 1020
 GGATATGGGC TCACTGAGAC TACATCAGCT ATTCTGATTA CACCCGAGGG GGATGATAAA 1080
 CCGGGCGCGG TCGGTAAAGT TGTTCCATTT TTTGAAGCGA AGGTTGTGGA TCTGGATACC 1140
 GGGAAAACGC TGGGCGTTAA TCAAAGAGGC GAACTGTGTG TGAGAGGTCC TATGATTATG 1200
 TCCGGTTATG TAAACAATCC GGAAGCGACC AACGCCTTGA TTGACAAGGA TGGATGGCTA 1260
 CATTCTGGAG ACATAGCTTA CTGGGACGAA GACGAACACT TCTTCATCGT TGACCGCCTG 1320
 AAGTCTCTGA TTAAGTACAA AGGCTATCAG GTGGCTCCCG CTGAATTGGA ATCCATCTTG 1380
 CTCCAACACC CCAACATCTT CGACGCAGGT GTCGCAGGTC TTCCCGACGA TGACGCCGGT 1440
 GAACTTCCCG CCGCCGTTGT TGTTTTGGAG CACGAAAAGA CGATGACGGA AAAAGAGATC 1500
 GTGGATTACG TCGCCAGTCA AGTAACAACC GCGAAAAAGT TGCGCGGAGG AGTTGTGTTT 1560
 GTGGACGAAG TACCGAAAAG TCTTACCGGA AAACCTGACG CAAGAAAAAT CAGAGAGATC 1620
 CTCATAAAGG CCAAGAAGGG CGGAAAGATC GCCGTGTAA 1659

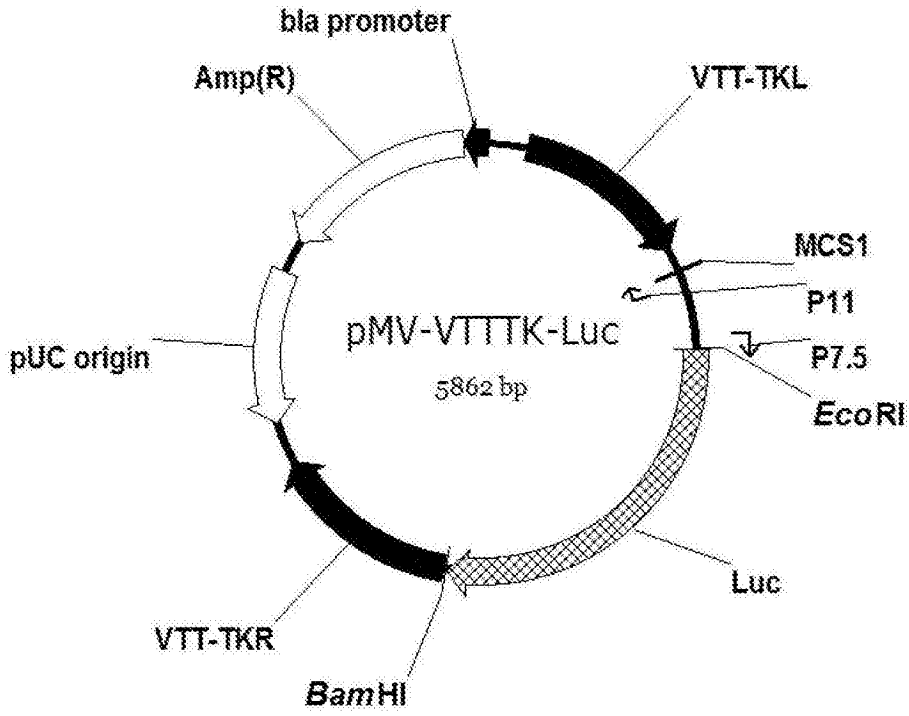


图1

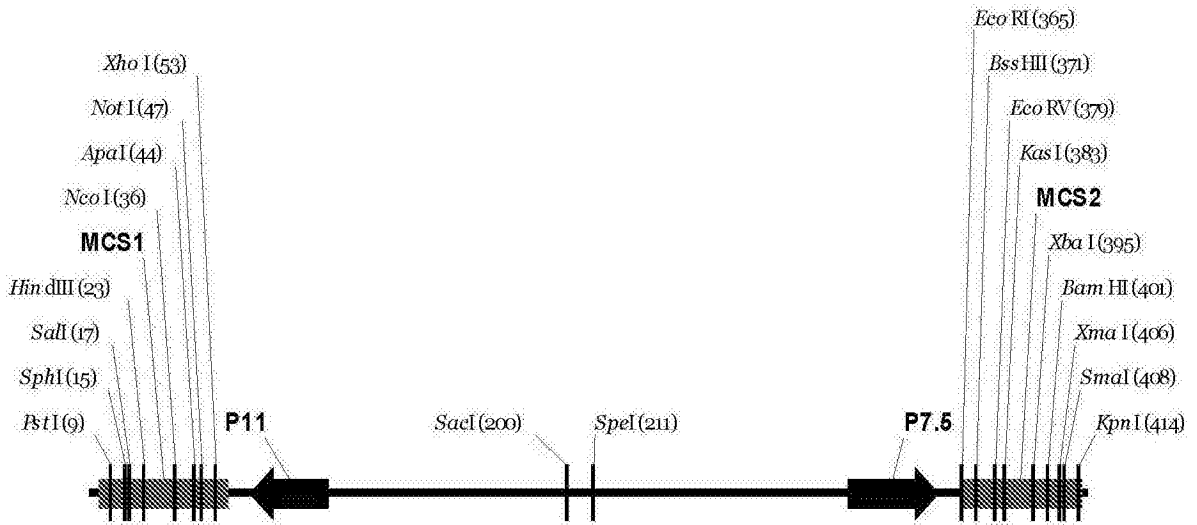


图2

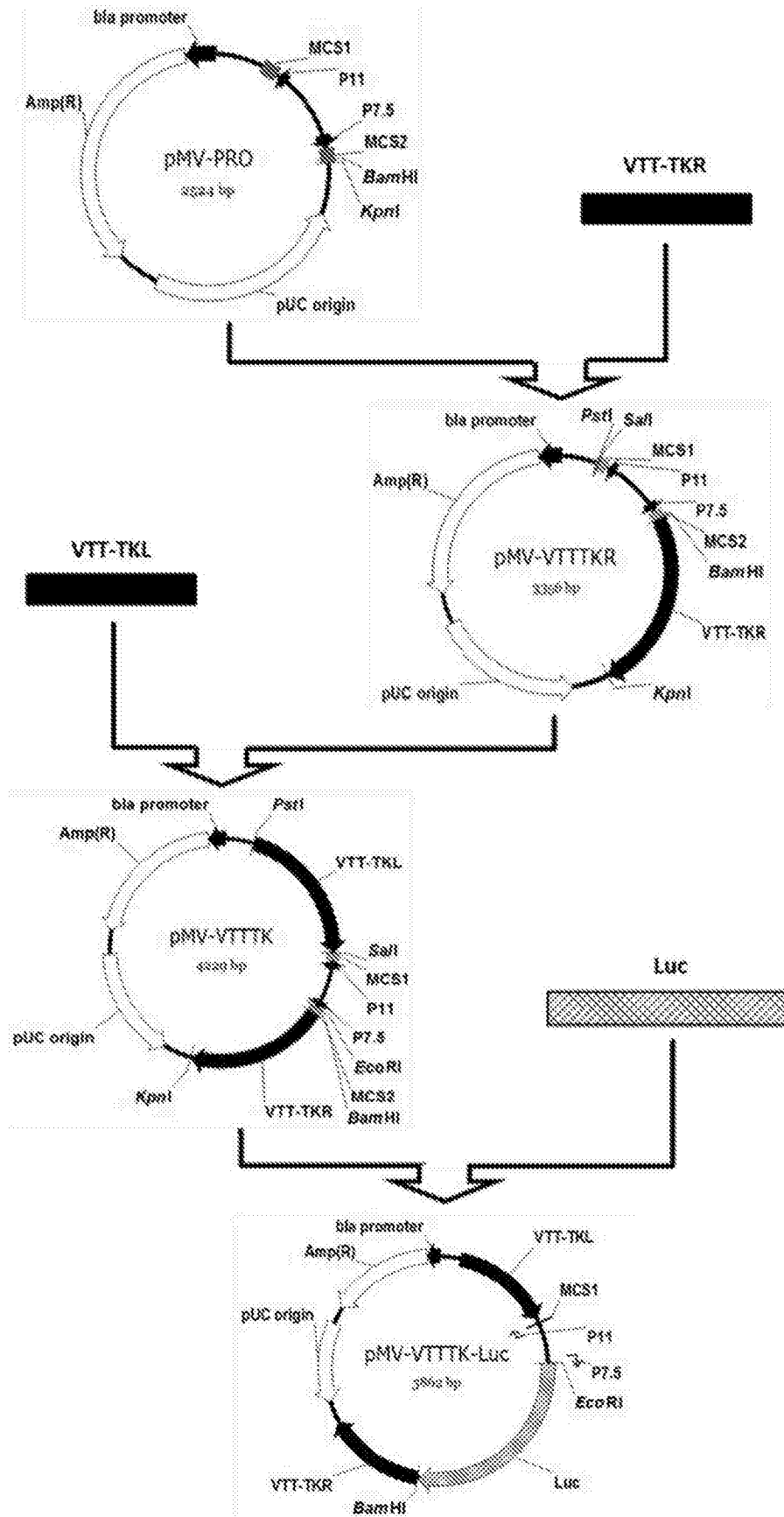


图3

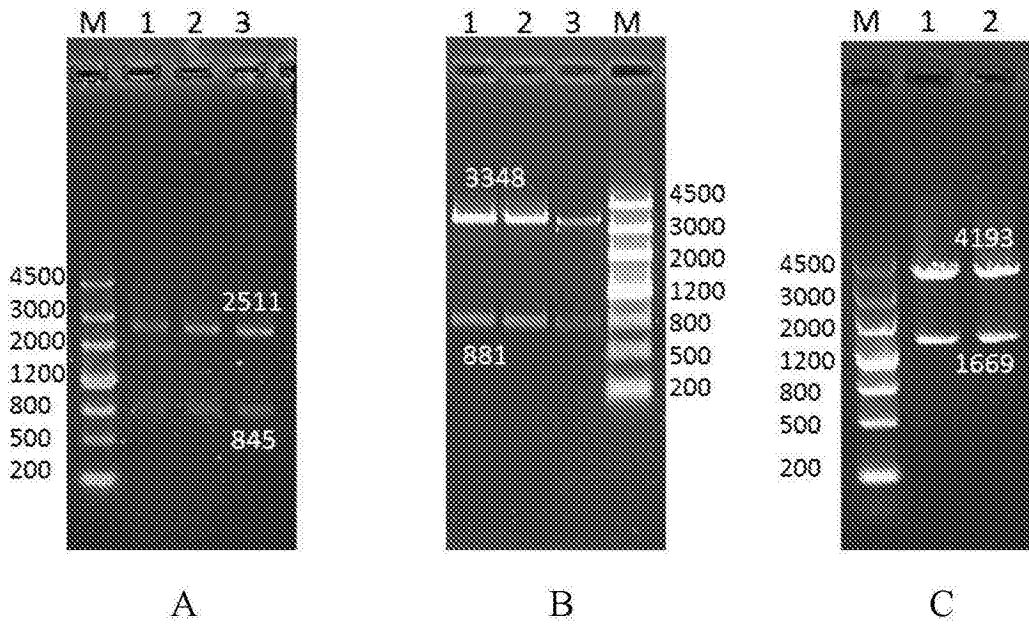


图4