



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113073094 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 28

(21) 申请号 202110333256.4

C12N 15/55 (2006.01)

(22) 申请日 2021.03.29

C12N 15/85 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 陈永强

申请公布号 CN 113073094 A

(43) 申请公布日 2021.07.06

(73) 专利权人 中山大学

地址 510275 广东省广州市海珠区新港西路135号

(72) 发明人 元少春 徐安龙 陈燕 罗灵杰

陈尚武 邓丽思

(74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司

公司 44202

专利代理师 颜希文 杨虹坤

(51) Int. Cl.

C12N 9/78 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

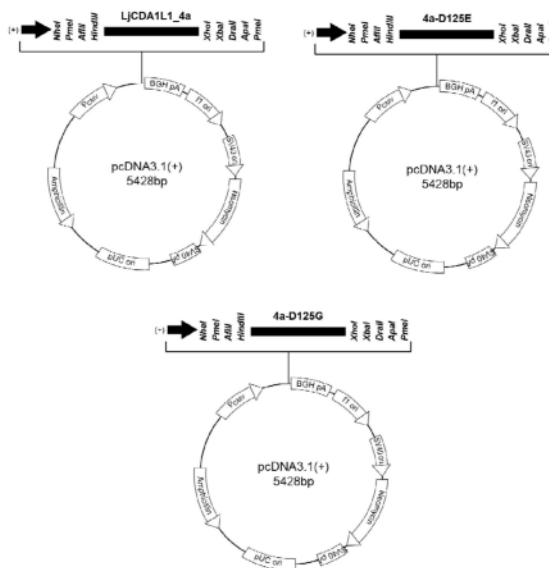
序列表4页 附图4页

(54) 发明名称

基于胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的单碱基突变系统

(57) 摘要

本发明提供了一种胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a以其突变体,以及将它们作为单碱基编辑器。本发明的胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体能够在单链DNA、泡状DNA和双链DNA上进行脱氨。同时,本发明的突变体LjCDA1L1_4a-D125E和LjCDA1L1_4a-D125G在GC这种比较难编辑的二核苷酸环境也能脱氨,使得胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的底物偏好性(TC/AC)发生改变。本发明为以LjCDA1L1_4a为基础的单碱基编辑系统带来新工具。



1. 一种胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的突变体,其特征在于,所述突变体为LjCDA1L1_4a-D125E或LjCDA1L1_4a-D125G;所述突变体LjCDA1L1_4a-D125E的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,所述突变体LjCDA1L1_4a-D125G的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

2. 如权利要求1所述的突变体,其特征在于,编码所述胞苷脱氨酶突变体LjCDA1L1_4a-D125E的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示;编码所述胞苷脱氨酶突变体LjCDA1L1_4a-D125G的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。

3. 一种单碱基编辑器BE,其特征在于,所述编辑器包括A质粒和B质粒,所述A质粒为以下质粒中的任一种:

(1) NLS-LjCDA1L1_4a D125E -linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP或

(2) NLS-LjCDA1L1_4a D125G -linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP;

B质粒为:U6-SgRNA-CAG-UGI-T2A-mcherry;

所述NLS-LjCDA1L1_4a D125E编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示;

所述NLS-LjCDA1L1_4a D125G编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

4. 如权利要求1所述的胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的突变体在单碱基编辑器中的应用。

5. 如权利要求4所述的应用,其特征在于,所述胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的突变体为LjCDA1L1_4a-D125E或LjCDA1L1_4a-D125G。

6. 如权利要求3所述的所述单碱基编辑器BE在单碱基编辑中的应用。

7. 如权利要求6所述的应用,其特征在于,所述单碱基编辑为在GC二核苷酸中胞苷编辑中的应用。

基于胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的单碱基突变系统

技术领域

[0001] 本发明属于基因编辑技术领域,具体涉及一种胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a与其突变体及其应用。

背景技术

[0002] AID/APOBEC家族蛋白是一类在机体内具有多种重要功能的脱氨酶蛋白,这些蛋白可以将RNA或者ssDNA链上的胞苷(C)脱氨,导致C-U的转换,引起基因的点突变或者引起DNA双链断裂。目前发现的AID/APOBEC家族蛋白主要分为AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3, APOBEC4五类。不同的脱氨酶蛋白对底物序列的偏好性不一样, hAPOBEC1偏好TC, hAPOBEC3G偏好CC, 其他的hAPOBEC3蛋白偏好TC。基于该家族蛋白能够在ssDNA上脱氨, 2016年David Liu等研究者将rAPOBEC1蛋白与dCas9蛋白融合构建单碱基修饰器BE3用来修饰人类基因组突变碱基。但是由于rAPOBEC1的底物偏好性, 以及潜在的脱靶性, 使得BE3只能在TC这样的二核苷酸环境下有较高的编辑活性, 而不能适用于其他底物序列偏好性的二核苷酸环境, 而限制了单碱基修饰器BE3的使用范围。

[0003] 因此, 扩展单碱基修饰器BE3的使用范围, 使其适用于多种底物序列偏好性的二核苷酸环境成为本领域亟待解决的技术问题。

发明内容

[0004] 为解决上述技术问题, 本发明提供了一种胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体。本发明的胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体均能在单链DNA、泡状DNA和双链DNA上进行脱氨, 且突变体还能在GC这种比较难编辑的二核苷酸环境也能脱氨。

[0005] 本发明通过以下技术方案实现本发明的目的:

[0006] 第一方面: 本发明提供了一种胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a, 所述胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。发明人从七鳃鳗基因组克隆得到LjCDA1L1_4a基因及其编码的蛋白LjCDA1L1_4a, 该胞苷脱氨酶不仅可以在单链DNA和泡状DNA上脱氨, 也可以在双链DNA上脱氨, 这也是目前其他胞嘧啶脱氨酶所不具备的功能。

[0007] 进一步地, 编码所述胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的核苷酸如SEQ ID NO:1所示。

[0008] 第二方面: 本发明还提供了所述胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的突变体LjCDA1L1_4a-D125E或LjCDA1L1_4a-D125G; 编码所述胞苷脱氨酶突变体LjCDA1L1_4a-D125E的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示; 编码所述胞苷脱氨酶突变体LjCDA1L1_4a-D125G的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示。发明人在胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的基础上在D125位点进行了突变, 获得两种突变体LjCDA1L1_4a-D125E和LjCDA1L1_4a-D125G。经实验证明这两种突变体与LjCDA1L1_4a一样能够在单链DNA、泡状DNA和双链DNA上进行脱氨, 并且仅在D125位点的突变导致LjCDA1L1_4a的底物偏好性(TC/AC)发生改变, 在GC这种难以编辑的二核苷酸环境也能进行脱氨。

[0009] 进一步地, 编码所述胞苷脱氨酶突变体LjCDA1L1_4a-D125E的核苷酸序列如SEQ

ID NO:2所示;编码所述胞苷脱氨酶突变体LjCDA1L1_4a-D125G的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0010] 第三方面:本发明还提供了一种单碱基编辑器BE,所述编辑器包括A质粒和B质粒,所述A质粒为以下质粒中的任一种:

[0011] (1)NLS-LjCDA1L1_4a-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP或

[0012] (2)NLS-LjCDA1L1_4a D125E-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP或

[0013] (3)NLS-LjCDA1L1_4a D125G-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP;

[0014] B质粒为:U6-SgRNA-CAG-UGI-T2A-mcherry。

[0015] 本发明的单碱基编辑系统能在单链DNA、泡状DNA和双链DNA上进行脱氨,同时,本发明的编辑系统LjCDA1L1_4a-BE、LjCDA1L1_4a D125E-BE和LjCDA1L1_4a D125G-BE的编辑效率高于编辑系统BE3。

[0016] 第四方面:本发明提供了所述胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a或所述胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a突变体在单碱基编辑器中的应用。

[0017] 优选地,所述胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a突变体为LjCDA1L1_4a-D125E或LjCDA1L1_4a-D125G。

[0018] 第五方面:本发明提供了所述单碱基编辑器BE在单碱基编辑中的应用。

[0019] 优选地,所述单碱基编辑为在GC二核苷酸中胞苷编辑中的应用。本发明的单碱基编辑器BE在GC这种比较难编辑的二核苷酸环境也能进行单碱基编辑。

[0020] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:本发明的胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体能够在单链DNA、泡状DNA和双链DNA上进行脱氨,这是目前其他胞嘧啶脱氨酶所不具备的特性。同时,本发明的突变体LjCDA1L1_4a-D125E和LjCDA1L1_4a-D125G在GC这种比较难编辑的二核苷酸环境也能脱氨,使得胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a的底物偏好性(TC/AC)发生改变。因此,本发明为以LjCDA1L1_4a为基础的单碱基编辑系统带来新工具。

附图说明

[0021] 图1为构建LjCDA1L1_4a、LjCDA1L1_4a-D125E和LjCDA1L1_4a-D125G的真核表达载体的质粒图谱

[0022] 图2为四种编辑系统中A质粒和B质粒的质粒图谱。

[0023] 图3为胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的胞苷(C)在单链DNA上脱氨结果示意图(其中S表示:底物;P1表示:产物1)

[0024] 图4为胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的胞苷(C)在泡状DNA上脱氨结果示意图(其中S表示:底物;P1表示:产物1;P2表示:产物2)

[0025] 图5为胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的胞苷(C)在双链DNA上脱氨结果示意图(其中S表示:底物;P1表示:产物1;P2表示:产物2;P3表示:产物3)

[0026] 图6为不同编辑系统最终编辑效率的比较结果示意图

具体实施方式

[0027] 为了更加简洁明了的展示本发明的技术方案、目的和优点,下面结合具体实施例详细说明本发明的技术方案。如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品,

均可以通过商业渠道购买获得。

[0028] 实施例1获得胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体

[0029] 1、通过已知序列设计引物扩增的方法,从日本七鳃鳗的基因组克隆得到的LjCDA1L1_4a基因,其DNA序列如SEQ ID NO:1所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0030] 引物序列:4a-F 5'-ATGGCCGGCGACGAGAACGTGCGAG-3'

[0031] 4a-R 5'-TCATGTAAACAGGTGCAAGGGCATAACC-3'

[0032] 2、在LjCDA1L1_4a基因的基础上设计随机突变引物,获得LjCDA1L1_4a的随机突变文库,将随机突变文库转化进大肠杆菌,37摄氏度培养24小时后,吸取适量菌液涂利福平(Rif⁺)抗性平板筛选出LjCDA1L1_4a-D125E和LjCDA1L1_4a-D125G突变体。LjCDA1L1_4a-D125E突变体DNA序列如SEQ ID NO:3所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,LjCDA1L1_4a-D125G突变体DNA序列如SEQ ID NO:5所示,氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0033] 实施例2验证胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的胞苷(C)脱氨活性

[0034] 验证胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的胞苷(C)脱氨活性分别在单链DNA、泡状DNA和双链DNA上脱氨的方法按照以下步骤进行:

[0035] (1) 分别将LjCDA1L1_4a、LjCDA1L1_4a-D125E和LjCDA1L1_4a-D125G基因克隆到真核表达载体pcDNA3.0上,其具体质粒构建方法如图1所示;

[0036] (2) 将上述步骤(1)中的真核表达载体转染HEK293T细胞;

[0037] (3) 对转染的HEK293T细胞进行培养,37℃,培养48小时后收集并裂解细胞,获得细胞裂解液;

[0038] (4) 以合成的带有荧光素的单链DNA、泡状DNA、双链DNA(其中,单链DNA、泡状DNA和双链DNA的序列如表1~3所示)为底物与细胞裂解液在37℃孵育4小时后,将反应后的溶液用20%的urea-page胶分离,分离后的胶在凝胶成像系统Gel Doc 1000(美国BIO-RAD公司)成像。

[0039] 脱氨酶蛋白会在其偏好性的位点引起DNA链的断裂。因此,底物单链DNA、泡状DNA、双链DNA与细胞裂解液孵育后,裂解液中的胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体会在其偏好性的位点引起DNA链的断裂,形成长度不同的DNA片段(或产物)。因此,分离胶成像后,会出现不同的目的条带。本发明胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的偏好性,结果如图3~5所示。

[0040] 表1:ssDNA(单链DNA)

[0044] 表3:dsDNA (双链DNA)

	Substrate	Sequence (5'-3')
	S1	CY5-5'-TAATAATAATAATAGT <u>GCTA</u> ATAGTACTAATAATGTTCTAATAATAA-3' 3'-ATTATTATTATTATCACGATTATCATGATTATTACAAGATTATTATT-5'
	S2	CY5-5'-TAATAATAATAATAGAGCTAATAGAACTAATAATGATCTAATAATAA-3' 3'-ATTATTATTATTATCTCGATTATCTTGATTATTACTAGATTATTATT-5'
[0045]	S3	CY5-5'-TAATAATAATAATAGGGCTAATAGGACTAATAATGGTCTAATAATAA-3' 3'-ATTATTATTATTATCCCGATTATCCTGATTATTACCAGATTATTATT-5'
	S4	CY5-5'-TAATAATAATAATAGCGCTAATAGCACTAATAATGCTCTAATAATAA-3' 3'-ATTATTATTATTATCACGATTATCATGATTATTACAAGATTATTATT-5'
	S5	CY5-5'-TAATAATAATAATAGCCCTAATAGACCTAATAATGTCCTAATAATAA-3' 3'-ATTATTATTATTATCGGGATTATCTGGATTATTACAGGATTATTATT-5'

[0046] 注:表1~3中的下划线“—”表示DNA链断裂的位置。

[0047] 结果如图3~5所示,其中图3、4表明LjCDA1L1_4a在ssDNA和buDNA上的偏好序列是TC和AC,D125突变为谷氨酸(E)或者甘氨酸(G)后底物序列的特异性基本消失,在CC和GC底物也能有较高的脱氨活性。图5表明LjCDA1L1_4a和突变体D125E/D125G都能在dsDNA上脱氨,并且依然有序列偏好性:TC和AC。

[0048] 实施例3单碱基编辑系统

[0049] 本实施例提供一种单碱基编辑系统,所述碱基编辑器包括A质粒和B质粒,A质粒为:NLS-LjCDA1L1_4a-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP或

[0050] 为:NLS-LjCDA1L1_4a D125E-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP或

[0051] 为:NLS-LjCDA1L1_4a D125G-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP;

[0052] B质粒为:U6-SgRNA-CAG-UGI-T2A-mcherry

[0053] 实施例4验证本发明单碱基编辑系统的编辑效率

[0054] 为了验证本发明单碱基编辑系统的编辑效率进行了以下实验,具体操作如下:

[0055] 1、提供了待编辑的序列,具体序列如图5所示;

[0056] 2、根据图5所示的靶位点合成SgRNA引物,然后将SgRNA引物进行高温退火形成引物与靶序列二聚体;

[0057] 3、利用BbsI限制性内切酶将所述B质粒进行线性化,然后与上述二聚体混合后进行连接,获得连接产物;

[0058] 4、将连接产物进行转化感受态细胞,涂平板培养,挑选阳性克隆,扩增细菌,纯化回收B质粒;

[0059] 5、将A、B质粒进行HEK293T细胞共转染后,37℃培养72h;

[0060] 6、提取细胞基因组,用靶基因位点上下游引物PCR扩增后,进行琼脂糖胶电泳,回收目的片段后进行Sanger测序;

[0061] 7、测序结果用EditR软件分析计算编辑效率。

[0062] 上述实验中分别使用了四种编辑系统,其中包括单碱基系统BE3、LjCDA1L1_4a单碱基系统BE、LjCDA1L1_4a D125E单碱基系统BE和LjCDA1L1_4a D125G单碱基系统BE。

[0063] 其中单碱基系统BE3包括

[0064] A质粒:NLS-rAPOBEC1-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP;

[0065] B质粒:U6-SgRNA-CAG-UGI-T2A-mcherry。

[0066] LjCDA1L1_4a单碱基系统BE包括A质粒和B质粒;

[0067] A质粒:NLS-LjCDA1L1_4a-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP;

[0068] B质粒:U6-SgRNA-CAG-UGI-T2A-mcherry。

[0069] LjCDA1L1_4a D125E单碱基系统BE包括A质粒和B质粒;

[0070] A质粒:NLS-LjCDA1L1_4a D125E-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP

[0071] B质粒:U6-SgRNA-CAG-UGI-T2A-mcherry。

[0072] LjCDA1L1_4a D125G单碱基系统BE包括A质粒和B质粒;

[0073] A质粒:NLS-LjCDA1L1_4a D125G-linker-nCas9-NLS-UGI-T2A-EGFP;

[0074] B质粒:U6-SgRNA-CAG-UGI-T2A-mcherry。

[0075] 结果如图6所示,可以看出与单碱基编辑系统BE3相比,本发明的编辑系统LjCDA1L1_4a-BE、LjCDA1L1_4a D125E-BE和LjCDA1L1_4a D125G-BE的C to T的转变率远高于编辑系统BE3,同时,也说明本发明的单碱基编辑系统的编辑效率更高。

[0076] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 中山大学
 [0003] <120> 基于胞苷脱氨酶LjCDA1L1_4a及其突变体的单碱基突变系统
 [0004] <130> 3.18
 [0005] <160> 6
 [0006] <170> PatentIn version 3.3
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 630
 [0009] <212> DNA
 [0010] <213> 七思鳗
 [0011] <400> 1
 [0012] atggccggcg acgagaacgt gcgagtctcc gagaagttgg acttcaacac gttcgaattt 60
 [0013] gaatttgaaa atttgcacta cgccgagggg aggggccgga cgtacgtgat attcgacgtc 120
 [0014] aagccgcaga gtgagggggg ccggggtaaa cgtctgtggg ggtacgtcag aaataatccc 180
 [0015] ttggacgacc atgccgaagt gatcctgatg tcgaagatca acgaccattt ggagacccat 240
 [0016] caaggcaact acacaatgac gtggtacatg tcgtggagtc cgtgcggcaa ctgctcgtcg 300
 [0017] gagctggtgc cttggctcaa aatctggag gaacagcagc acacgctgac gatgcacttc 360
 [0018] tcgcaatct acgacaaaga cagagcggta gaccaccgtg ggctctgtga ccttcagcgc 420
 [0019] gtcgtgtcca actacttcca aatgggggtc atgaggaaga aagaggtgaa aaagtgtctg 480
 [0020] gcggaatacg tggaagcaag tggacgcacg ctcaggtggc tgcgcacgac cacgagcaat 540
 [0021] gcgggcagga ggcgacgcaa actttattcc atcctggtaa ggtgtgcggg gatgcgtgag 600
 [0022] tctggtatgc ccttgcacct gtttacatga 630
 [0023] <210> 2
 [0024] <211> 209
 [0025] <212> PRT
 [0026] <213> 七思鳗
 [0027] <400> 2
 [0028] Met Ala Gly Asp Glu Asn Val Arg Val Ser Glu Lys Leu Asp Phe Asn
 [0029] 1 5 10 15
 [0030] Thr Phe Glu Phe Glu Phe Glu Asn Leu His Tyr Ala Glu Gly Arg Gly
 [0031] 20 25 30
 [0032] Arg Thr Tyr Val Ile Phe Asp Val Lys Pro Gln Ser Glu Gly Gly Arg
 [0033] 35 40 45
 [0034] Gly Lys Arg Leu Trp Gly Tyr Val Arg Asn Asn Pro Leu Asp Asp His
 [0035] 50 55 60
 [0036] Ala Glu Val Ile Leu Met Ser Lys Ile Asn Asp His Leu Glu Thr His
 [0037] 65 70 75 80
 [0038] Gln Gly Asn Tyr Thr Met Thr Trp Tyr Met Ser Trp Ser Pro Cys Gly

[0039]		85		90		95
[0040]	Asn Cys Ser Ser Glu Leu Val Pro Trp Leu Lys Asn Leu Glu Glu Gln					
[0041]		100		105		110
[0042]	Gln His Thr Leu Thr Met His Phe Ser Arg Ile Tyr Asp Lys Asp Arg					
[0043]		115		120		125
[0044]	Ala Val Asp His Arg Gly Leu Cys Asp Leu Gln Arg Val Val Ser Asn					
[0045]		130		135		140
[0046]	Tyr Phe Gln Met Gly Val Met Arg Lys Lys Glu Val Lys Lys Cys Leu					
[0047]		145		150		155
[0048]	Ala Glu Tyr Val Glu Ala Ser Gly Arg Thr Leu Arg Trp Leu Arg Thr					
[0049]		165		170		175
[0050]	Thr Thr Ser Asn Ala Gly Arg Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Ser Ile Leu					
[0051]		180		185		190
[0052]	Val Arg Cys Ala Gly Met Arg Glu Ser Gly Met Pro Leu His Leu Phe					
[0053]		195		200		205
[0054]	Thr					
[0055]	<210> 3					
[0056]	<211> 630					
[0057]	<212> DNA					
[0058]	<213> 七思鳗					
[0059]	<400> 3					
[0060]	atggccggcg acgagaacgt gcgagtctcc gagaagttgg acttcaacac gttcgaattt 60					
[0061]	gaatttgaaa atttgacta cgccgagggg aggggccgga cgtacgtgat attcgacgtc 120					
[0062]	aagccgcaga gtgagggggg ccggggtaaa cgtctgtggg ggtacgtcag aaataatccc 180					
[0063]	ttggacgacc atgccgaagt gatcctgatg tcgaagatca acgaccattt ggagacccat 240					
[0064]	caaggcaact acacaatgac gtggtacatg tegtggagtc cgtgcggcaa ctgctcgtcg 300					
[0065]	gagctggtgc cttggctcaa aaatctggag gaacagcagc acacgctgac gatgcacttc 360					
[0066]	tcgcaatct acgaaaaaga cagagcggta gaccaccgtg ggctctgtga ccttcagcgc 420					
[0067]	gtcgtgtcca actacttcca aatgggggtc atgaggaaga aagagtgaa aaagtgtctg 480					
[0068]	gcggaatacg tggaagcaag tggacgcacg cttaggtggc tgcgcacgac cacgagcaat 540					
[0069]	gcgggcagga ggcgacgcaa actttattcc atcctggtaa ggtgtgctgg gatgcgtgag 600					
[0070]	tctggtatgc cttgacact gtttacatga 630					
[0071]	<210> 4					
[0072]	<211> 209					
[0073]	<212> PRT					
[0074]	<213> 七思鳗					
[0075]	<400> 4					
[0076]	Met Ala Gly Asp Glu Asn Val Arg Val Ser Glu Lys Leu Asp Phe Asn					
[0077]		1		5		10
						15

[0078]	Thr Phe Glu Phe Glu Phe Glu Asn Leu His Tyr Ala Glu Gly Arg Gly
[0079]	20 25 30
[0080]	Arg Thr Tyr Val Ile Phe Asp Val Lys Pro Gln Ser Glu Gly Gly Arg
[0081]	35 40 45
[0082]	Gly Lys Arg Leu Trp Gly Tyr Val Arg Asn Asn Pro Leu Asp Asp His
[0083]	50 55 60
[0084]	Ala Glu Val Ile Leu Met Ser Lys Ile Asn Asp His Leu Glu Thr His
[0085]	65 70 75 80
[0086]	Gln Gly Asn Tyr Thr Met Thr Trp Tyr Met Ser Trp Ser Pro Cys Gly
[0087]	85 90 95
[0088]	Asn Cys Ser Ser Glu Leu Val Pro Trp Leu Lys Asn Leu Glu Glu Gln
[0089]	100 105 110
[0090]	Gln His Thr Leu Thr Met His Phe Ser Arg Ile Tyr Glu Lys Asp Arg
[0091]	115 120 125
[0092]	Ala Val Asp His Arg Gly Leu Cys Asp Leu Gln Arg Val Val Ser Asn
[0093]	130 135 140
[0094]	Tyr Phe Gln Met Gly Val Met Arg Lys Lys Glu Val Lys Lys Cys Leu
[0095]	145 150 155 160
[0096]	Ala Glu Tyr Val Glu Ala Ser Gly Arg Thr Leu Arg Trp Leu Arg Thr
[0097]	165 170 175
[0098]	Thr Thr Ser Asn Ala Gly Arg Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Ser Ile Leu
[0099]	180 185 190
[0100]	Val Arg Cys Ala Gly Met Arg Glu Ser Gly Met Pro Leu His Leu Phe
[0101]	195 200 205
[0102]	Thr
[0103]	<210> 5
[0104]	<211> 630
[0105]	<212> DNA
[0106]	<213> 七思鳎
[0107]	<400> 5
[0108]	atggccggcg acgagaacgt gcgagtctcc gagaagttgg acttcaacac gttcgaat 60
[0109]	gaatttgaaa atttgacta cgccgagggg aggggccgga cgtacgtgat attcgacgtc 120
[0110]	aagccgcaga gtgagggggg ccggggtaaa cgtctgtggg ggtacgtcag aaataatccc 180
[0111]	ttggacgacc atgccgaagt gatcctgatg tcgaagatca acgaccattt ggagaccat 240
[0112]	caaggcaact acacaatgac gtggtacatg tcgtggagtc cgtgcgga ctgctcgtcg 300
[0113]	gagctggtgc cttggctcaa aatctggag gaacagcagc acacgctgac gatgcacttc 360
[0114]	tcgcaatct acgaaaaga cagagcggta gaccaccgtg ggctctgtga ccttcagcgc 420
[0115]	gtcgtgtcca actacttcca aatgggggtc atgaggaaga aagaggtgaa aaagtgtctg 480
[0116]	gcggaatag tggaagcaag tggacgcacg ctcaggtggc tgcgcacgac cacgagcaat 540

[0117] gcgggcagga ggcgacgcaa actttattcc atcctggtaa ggtgtgcggg gatgcgtgag 600
 [0118] tctggtatgc ccttgcacct gtttacatga 630
 [0119] <210> 6
 [0120] <211> 209
 [0121] <212> PRT
 [0122] <213> 七思鳗
 [0123] <400> 6
 [0124] Met Ala Gly Asp Glu Asn Val Arg Val Ser Glu Lys Leu Asp Phe Asn
 [0125] 1 5 10 15
 [0126] Thr Phe Glu Phe Glu Phe Glu Asn Leu His Tyr Ala Glu Gly Arg Gly
 [0127] 20 25 30
 [0128] Arg Thr Tyr Val Ile Phe Asp Val Lys Pro Gln Ser Glu Gly Gly Arg
 [0129] 35 40 45
 [0130] Gly Lys Arg Leu Trp Gly Tyr Val Arg Asn Asn Pro Leu Asp Asp His
 [0131] 50 55 60
 [0132] Ala Glu Val Ile Leu Met Ser Lys Ile Asn Asp His Leu Glu Thr His
 [0133] 65 70 75 80
 [0134] Gln Gly Asn Tyr Thr Met Thr Trp Tyr Met Ser Trp Ser Pro Cys Gly
 [0135] 85 90 95
 [0136] Asn Cys Ser Ser Glu Leu Val Pro Trp Leu Lys Asn Leu Glu Glu Gln
 [0137] 100 105 110
 [0138] Gln His Thr Leu Thr Met His Phe Ser Arg Ile Tyr Gly Lys Asp Arg
 [0139] 115 120 125
 [0140] Ala Val Asp His Arg Gly Leu Cys Asp Leu Gln Arg Val Val Ser Asn
 [0141] 130 135 140
 [0142] Tyr Phe Gln Met Gly Val Met Arg Lys Lys Glu Val Lys Lys Cys Leu
 [0143] 145 150 155 160
 [0144] Ala Glu Tyr Val Glu Ala Ser Gly Arg Thr Leu Arg Trp Leu Arg Thr
 [0145] 165 170 175
 [0146] Thr Thr Ser Asn Ala Gly Arg Arg Arg Arg Lys Leu Tyr Ser Ile Leu
 [0147] 180 185 190
 [0148] Val Arg Cys Ala Gly Met Arg Glu Ser Gly Met Pro Leu His Leu Phe
 [0149] 195 200 205
 [0150] Thr

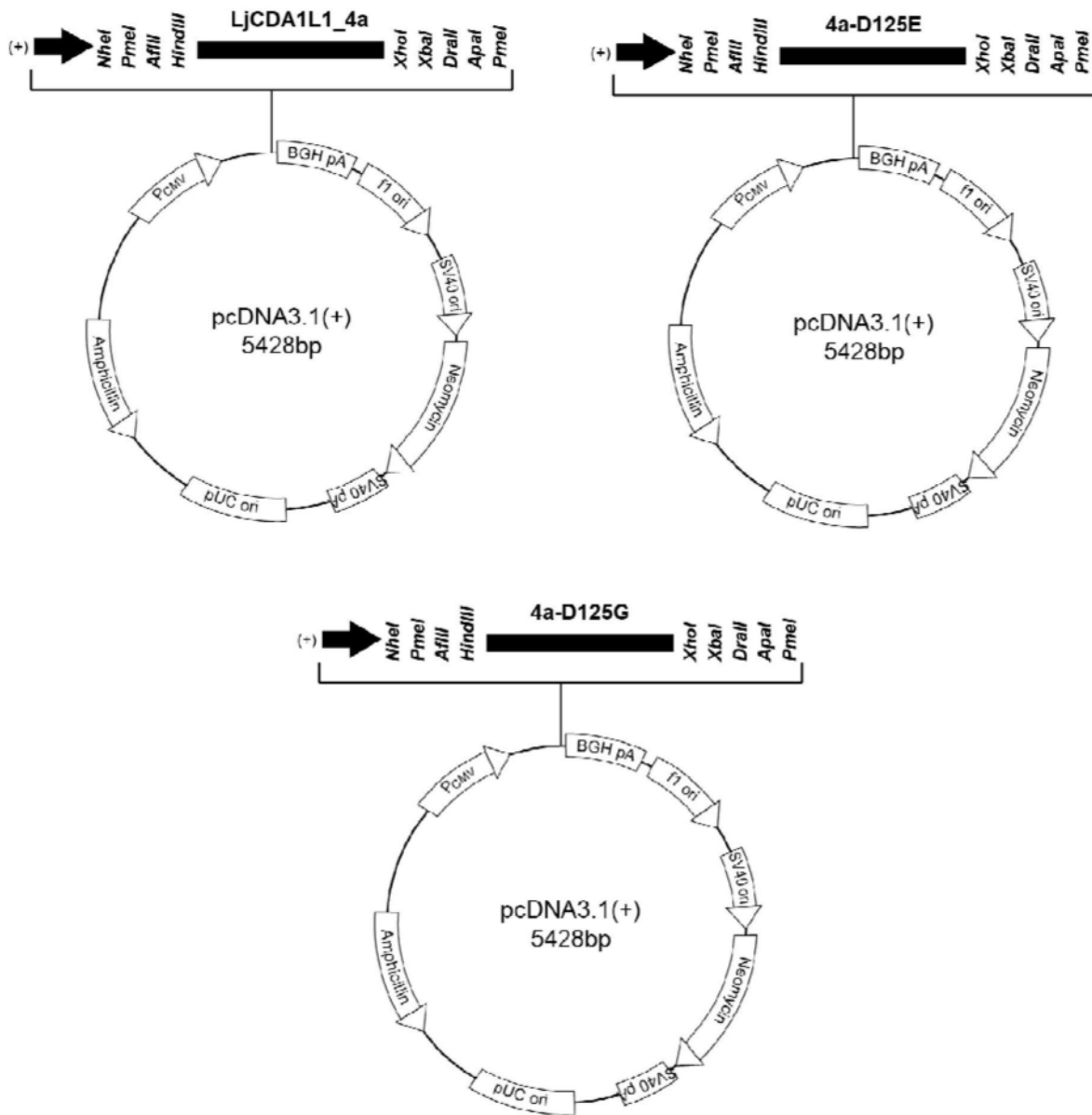


图1

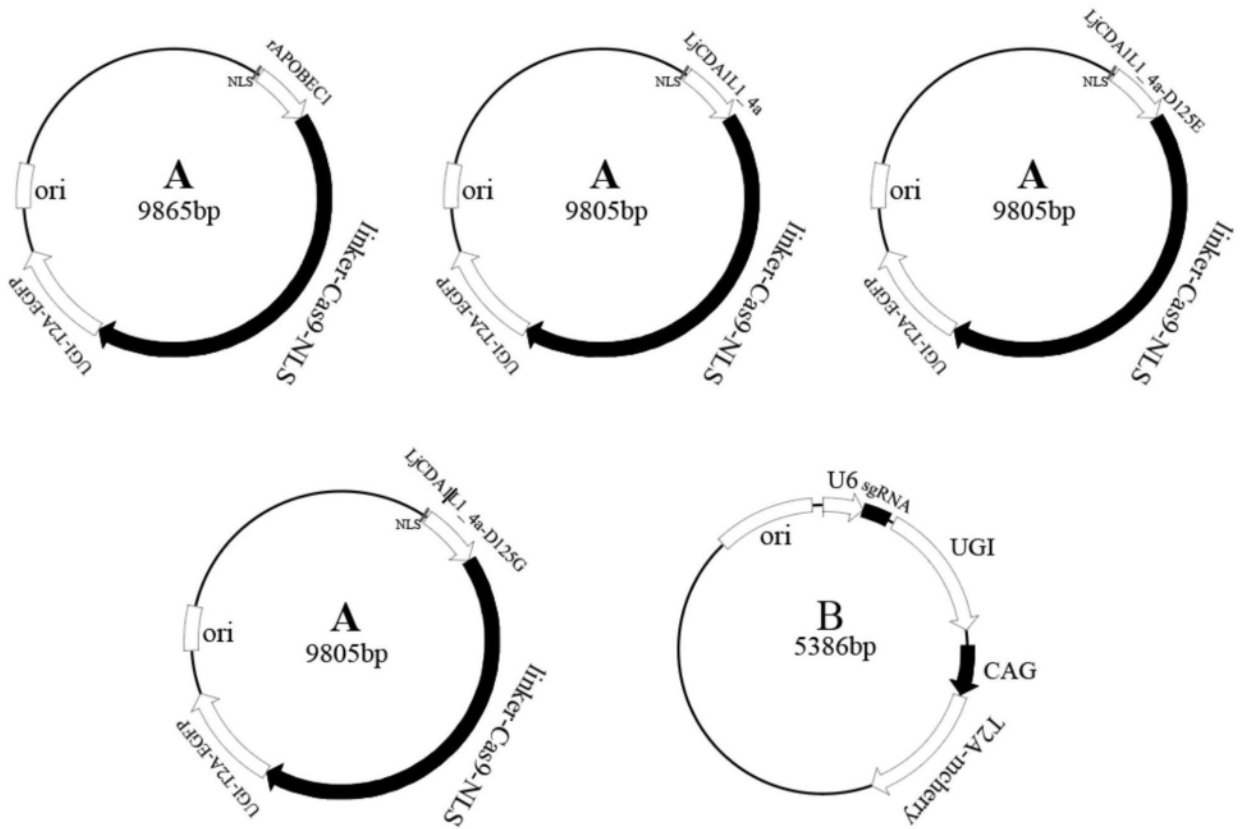


图2

ssDNA:

Substrate	Sequence (5'-3')
AAC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG AACCTAGTTAAGTTAT-3'
GAC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG GACTTAGTTAAGTTAT-3'
CAC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG CACTTAGTTAAGTTAT-3'
TAC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG TACTTAGTTAAGTTAT-3'
AGC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG AGCTTAGTTAAGTTAT-3'
GGC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG GGCTTAGTTAAGTTAT-3'
CGC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG CGCTTAGTTAAGTTAT-3'
TGC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG TGCTTAGTTAAGTTAT-3'
ACC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG ACCTTAGTTAAGTTAT-3'
GCC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG GCCTTAGTTAAGTTAT-3'
CCC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG CCCTTAGTTAAGTTAT-3'
TCC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG TCCTTAGTTAAGTTAT-3'
ATC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG ATCTTAGTTAAGTTAT-3'
GTC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG GTCTTAGTTAAGTTAT-3'
CTC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG CTCTTAGTTAAGTTAT-3'
TTC	CY5-5'-AGAATTAAGTTATG TTCTTAGTTAAGTTAT-3'

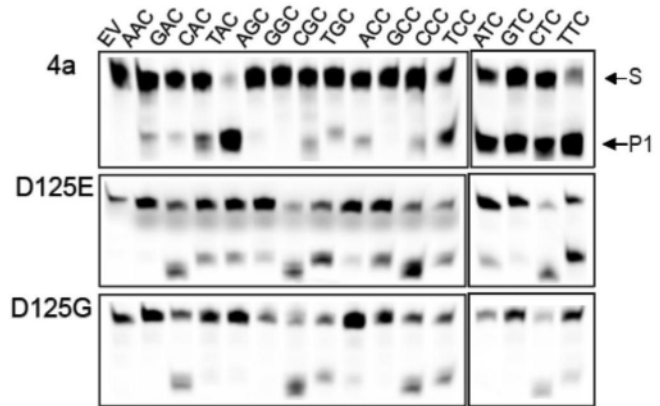


图3

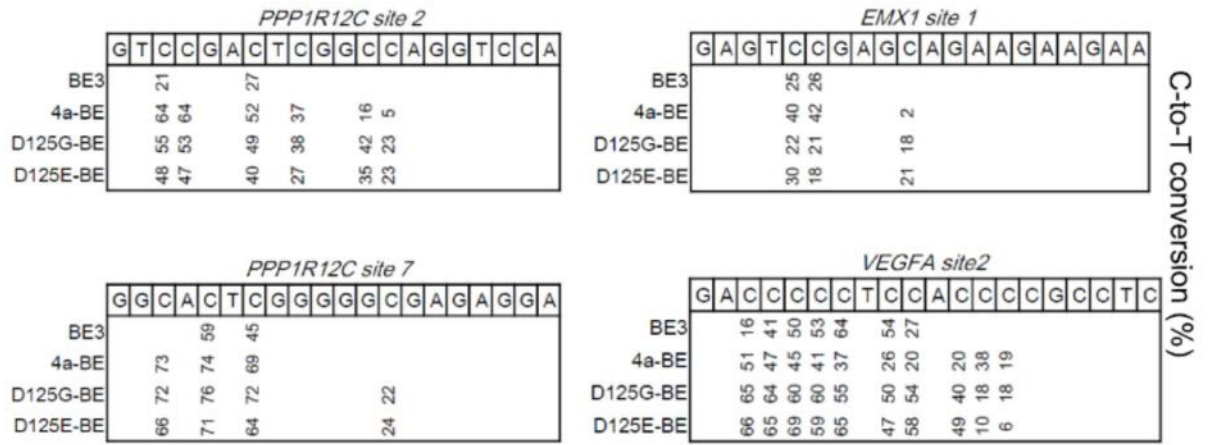


图6