



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110845590 B

(45) 授权公告日 2022.03.18

(21) 申请号 201911066289.6

A01H 6/20 (2018.01)

(22) 申请日 2019.11.04

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 103255165 A, 2013.08.21

申请公布号 CN 110845590 A

CN 106538341 A, 2017.03.29

CN 104910263 A, 2015.09.16

(43) 申请公布日 2020.02.28

None.PREDICTED: *Vitis vinifera*

(73) 专利权人 河南科技大学

pentatricopeptide repeat-containing

地址 471000 河南省洛阳市洛龙区开元大道263号

protein Atlg33350 (LOC100243058),

transcript variant X2, mRNA.《Genbank

database》.2016,1-2.

(72) 发明人 余义和 郭大龙 李旭飞 李敏

张贺程 张国海

None.PREDICTED: *Vitis vinifera*

pentatricopeptide repeat-containing

protein Atlg33350 (LOC100243058),

transcript variant X2, mRNA.《Genbank

database》.2016,

(74) 专利代理机构 北京睿智保诚专利代理事务

所(普通合伙) 11732

代理人 周新楣

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 5/10 (2018.01)

范敏等. 马铃薯PPR蛋白家族基因SoDIPPR的克隆及其在干旱条件下的表达特征分析.《中国农业科学》.2008,第41卷(第08期),

审查员 戎晓媛

权利要求书1页 说明书6页

序列表3页 附图5页

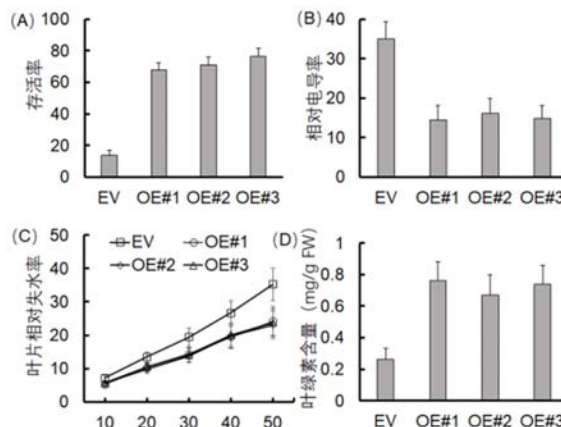
(54) 发明名称

野葡萄VyPPR基因及其编码蛋白在干旱胁迫中的应用

(57) 摘要

本发明公开了野葡萄VyPPR基因及其编码蛋白在干旱胁迫中的应用,核苷酸序列如SEQ:NO.1所示,编码序列全长为1874个核苷酸,开放阅读框为1590个核苷酸,该基因编码蛋白的氨基酸序列如SEQ:NO.2所示,可编码一个含529个氨基酸的蛋白,本发明通过利用强启动子驱动原理的转基因技术,将VyPPR基因的超量表达载体转入拟南芥中,从而获得转基因拟南芥植株.相对于转化空载体的拟南芥植株,超量表达VyPPR基因导致转基因拟南芥中抗逆相关物质的积累和抗旱相关基因的表达,葡萄克隆葡萄VyPPR基因,能够增加转基因植株中抗逆相关物质的积累和抗旱相关基因的表达,促进转基因植株抗旱性增强。

CN 110845590 B



1. 野葡萄VyPPR基因的编码蛋白在干旱胁迫中的应用,其特征在於:所述葡萄VyPPR基因在拟南芥中的过量表达的具体方法:

(1) 将包含有VyPPR基因编码区在内的共1011 bp的ORF片段正确插入植物过量表达载体pCAMBIA2300-GFP上;

(2) 根据前期克隆到的VyPPR基因ORF序列,根据pCAMBIA2300-GFP载体上的酶切位点,在引物VyPPR-ORF-F的5'端加上酶切位点XbaI和KpnI,

GGGTCTAGAATGGCTCCTCCCCAAAATCAAC,

GGGGTACCCTAGTACAGACTAATCAGACTC;

(3) 以pMD18-T-VyPPR质粒为模板,用VyPPR-ORF-XbaI-F与VyPPR-ORF-KpnI-R进行扩增,回收目的条带后连接到pMD19-T克隆载体,连接、转化后经过卡那霉素筛选、验证,即得植物表达载体pCAMBIA2300-VyPPR;

(4) 将含有重组植物表达载体的农杆菌划线培养在含有卡那霉素的LB平板上划线,并置于培养箱中进行培养;

(5) 将菌液转移至离心瓶或离心管中,转速为4000 rpm离心10 min,去除上清液收集菌体,并重悬于渗透缓冲液中;

(6) 将去除果荚的南芥花浸入渗透液中,浸透结束后清理掉南芥花上多余的渗透缓冲液,将南芥花放入培养箱中继续培养,经过转化的拟南芥植株进行正常管理,待果荚现白色时进行收种子;

(7) 对上述通过卡那霉素初步筛选得到的VyPPR转基因植株及野生型植株,进一步在DNA水平进行鉴定,采用改进的SDS微量提取法提取总DNA。

2. 根据权利要求1所述的野葡萄VyPPR基因的编码蛋白在干旱胁迫中的应用,其特征在於:对转基因拟南芥植株的抗旱性鉴定。

3. 根据权利要求1所述的野葡萄VyPPR基因的编码蛋白在干旱胁迫中的应用,其特征在於:对转基因拟南芥植株生理生化特性分析,所述生理生化特性分析包括失水率的测定、解质渗漏率的测定和叶绿素含量的测定。

野葡萄VyPPR基因及其编码蛋白在干旱胁迫中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物抗逆基因鉴定及基因工程技术领域,具体为野葡萄VyPPR基因及其编码蛋白在干旱胁迫中的应用。

背景技术

[0002] PPR蛋白又叫三角状五状重复蛋白,是陆生植物最大的蛋白家族之一,在大多数物种中拥有超过400个成员,它们在植物生长发育的各个阶段发挥着重要功能。玉米中发现的只包含4个PPR基序的THA8,参与到了两个基因ycf3和 trnA的转录本二型内含子的剪切过程中,此蛋白因为只包含少量的PPR基序,不具备与 ycf3或者trnA的单链RNA结合的能力,但是能够与剪切因子WTF1和RNC1相互作用,这两个剪切因子同样参与到了对trnARNA内含子的剪切之中。红莲型水稻中的育性恢复蛋白RF5,属于PLS家族,不具有结合目标转录本atp6-orfH79的能力,其互作蛋白GRP162能够随其进入线粒体,与目的转录本结合,同时,具有WD40结构域的RFC3参与育性恢复蛋白复合体的构建,与RF5,GRP162以及未知的蛋白一起组建成400至500 kDa的复合体,它们共同介导atp6-orfH79转录本在第1169位核苷酸处切割,抑制雄性不育蛋白ORFH79的翻译表达。另一个育性恢复基因Rf6,属于P家族PPR蛋白,包含20个PPR基序,与己糖激酶HXK6相互作用,研究发现RF6也能与其他蛋白组建成一个蛋白复合体,约400~500 kDa大小,并且RF6不与GRP162相互作用,暗示RF6和RF5所参与形成的蛋白复合体并不一样。RF6参与的育性恢复复合体,同样具有对atp6-orfH79转录本的剪切功能,于转录本的第1238核苷酸处进行切割,抑制ORFH79在线粒体中的积累,进而使雄配子正常发育成具有育性的成熟花粉。

[0003] 葡萄是世界第二大水果,拥有悠久的栽培历史,种类繁多,具有重要的食用价值和经济价值。近年来,随着全球气候的恶变,世界各地干旱事件频繁发生,在非干旱季节或非干旱地区干旱危害也频繁出现。干旱对葡萄生长发育过程和产量品质有严重的影响,已经成为制约葡萄生长和提高果品质量的主要因素之一,尤其是近年来全球气候的变化和我国南方干旱的频频出现,使葡萄产业受到很大的威胁。在世界范围内都面临缺水问题的大背景之下,发掘抗旱葡萄资源、研究葡萄抗旱基因对提高葡萄抗旱性、培育抗旱新品种及节水栽培等都具有重要的科学价值和意义。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种葡萄克隆葡萄VyPPR基因,能够增加转基因植株中抗逆相关物质的积累和抗旱相关基因的表达,促进转基因植株抗旱性增强。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:野葡萄VyPPR基因及其编码蛋白在干旱胁迫中的应用,核苷酸序列如SEQ: N0.1所示,编码序列全长为1874个核苷酸,开放阅读框为1590个核苷酸。

[0006] 优选的,该基因编码蛋白的氨基酸序列如SEQ:N0.2所示,可编码一个含529个氨基酸的蛋白。

[0007] 野葡萄VyPPR基因植物过量表达载体构建的方法,具有方法如下:

[0008] (1)将包含有VyPPR基因编码区在内的共1011 bp的ORF片段正确插入植物过量表达载体pCAMBIA2300-GFP上;

[0009] (2)根据前期克隆到的VyPPR基因ORF序列,根据pCAMBIA2300-GFP载体上的酶切位点,在引物VyPPR-ORF-F的5'端加上酶切位点XbaI和KpnI,

[0010] GGGTCTAGAATGGCTCCTCCCCAAAATCAAC,

[0011] GGGGGTACCCTAGTACAGACTAATCAGACTC;

[0012] (3)以pMD18-T-VyPPR质粒为模板,用VyPPR-ORF-XbaI-F与VyPPR-ORF-KpnI-R进行扩增,回收目的条带后连接到pMD19-T克隆载体,连接、转化后筛选、验证,即得植物表达载体pCAMBIA2300-VyPPR。

[0013] 一所述的野葡萄VyPPR基因的编码蛋白在干旱胁迫中的应用,所述葡萄VyPPR基因在拟南芥中的过量表达的具体方法:

[0014] (1)将含有重组植物表达载体的农杆菌划线培养在LB平板上划线,并置于培养箱中进行培养;

[0015] (2)将菌液转移至离心瓶或离心管中,转速为4000 rpm离心10 min,去除上清液收集菌体,并重悬于渗透缓冲液中;

[0016] (3)将去除果荚的南芥花浸入渗透液中,浸透结束后清理掉南芥花上多余的渗透缓冲液,将南芥花放入培养箱中继续培养,经过转化的拟南芥植株进行正常管理,待果荚现白色时进行收种子;

[0017] (4)对上述通过卡那霉素初步筛选得到的VyPPR转基因植株及野生型植株,进一步在DNA水平进行鉴定,采用改进的 SDS 微量提取法提取总DNA。

[0018] 优选的,对转基因拟南芥植株的抗旱性鉴定。

[0019] 优选的,对转基因拟南芥植株生理生化特性分析,所述生理生化特性分析包括失水率的测定、解质渗漏率的测定和叶绿素含量的测定。

[0020] 本发明提供了野葡萄VyPPR基因及其编码蛋白在干旱胁迫中的应用,具备以下有益效果:

[0021] 本发明通过利用强启动子(花椰菜花叶病毒35S启动子)驱动原理的转基因技术,将VyPPR基因的超量表达载体转入拟南芥中,从而获得转基因拟南芥植株。相对于转化空载体的拟南芥植株,超量表达VyPPR基因导致转基因拟南芥中抗逆相关物质的积累和抗旱相关基因的表达,转基因植株抗旱性增强,从而可知,葡萄克隆葡萄VyPPR基因,能够增加转基因植株中抗逆相关物质的积累和抗旱相关基因的表达,促进转基因植株抗旱性增强。

附图说明

[0022] 图1为本发明的VyPPR基因在葡萄不同组织中的表达;

[0023] 图2为本发明的VyPPR基因在低温处理后的表达;

[0024] 图3为本发明的VyPPR基因在干旱处理后的表达;

[0025] 图4为本发明的VyPPR基因在盐胁迫后的表达;

[0026] 图5为本发明的转VyPPR基因拟南芥植株的抗旱性鉴定;

[0027] 图6为本发明的转VyPPR基因拟南芥植株的生理特性分析;

[0028] 图7为本发明的转基因拟南芥植株中抗旱相关基因的表达分析。

具体实施方式

[0029] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0030] 实施例1

[0031] 葡萄VyPPR基因的表达特性分析

[0032] 燕山葡萄组培苗继代培养16 d后,选择生长健壮表现一致的幼苗用于各种逆境处理。干旱处理:将葡萄幼苗从培养基中拔出,置于滤纸上暴露在室温为 $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为55%、光周期为光照14 h/黑暗10 h的条件下处理,在0、2、6、12、24 h取样。低温处理:将组培苗置于温度为 $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为75%、光周期为光照14 h/黑暗10 h的条件下培养,在0、2、6、12、24 h取样。盐胁迫:在三角瓶中加入20 mL $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaCl溶液,在温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、相对湿度为75%、光周期为光照14 h/黑暗10 h的条件下培养,在0、2、6、12、24 h取样。在三角瓶中加入等体积的蒸馏水作为盐胁迫处理的对照。正常培养的组培苗作为干旱和低温处理的对照。在大田生长8~10 a的燕山葡萄,在转色期取葡萄果实,于盛花期取根系(第一新生侧根)、茎(新展开叶下第4~5片叶的茎段)、叶(新展开叶下第4~5片)、花序和卷须(新生枝条的第1个枝)等样品。

[0033] 用plus植物总RNA提取试剂盒(天根)提取葡萄叶片总RNA。普通反转录用PrimeScriptIII1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)合成cDNA第一链。具体操作步骤如下:在PCR管中加入:Random 6 mers($50 \mu\text{M}$) $1 \mu\text{l}$, dNTP Mixture(10 mM each) $1 \mu\text{l}$, Total RNA $2 \mu\text{g}$, RNase free dH₂O补齐至 $10 \mu\text{l}$,充分混匀,瞬时离心使溶液至PCR管底部。在PCR仪上 65°C 反应5 min,冰上急冷。根据VyPPR基因序列设计实时荧光定量PCR引物,正向引物序列为qRT-VyPPR-F($5' \text{CCCAACCATTTTATCTACCCTCA3}'$),反向引物序列为qRT-VyPPR-R($5' \text{CCAAGACACAACATTCCTCTCAGT3}'$)。以VyGAPDH基因为内参,其正向引物序列为qRT-VyGAPDH-F($5' \text{CCCTTGTCCTCCCAACTCT3}'$),反向引物序列为qRT-VyGAPDH-R($5' \text{CCTTCTCAGCACTGTCCCT3}'$)。实时荧光定量PCR按照TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™ II (Perfect Real Time) 说明在Bio-Rad IQ5 Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)上进行。 $25 \mu\text{l}$ 的反应体系: $1 \mu\text{l}$ 的反转录模板;正反向引物各 $1 \mu\text{l}$; $12.5 \mu\text{l}$ 的 $2 \times \text{SYBR}^\circledR \text{ Premix Ex Taq}^\text{TM} (2 \times)$; $9 \mu\text{l}$ 的nuclease-free water;反应程序为: 95°C , 30 s; 40 cycles of 95°C for 5 s; 57°C for 30 s; 72°C for 30 s。结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行分析。

[0034] 实施例2

[0035] 葡萄VyPPR基因过量表达载体的构建

[0036] 为研究葡萄VyPPR基因的功能,将含有VyPPR基因编码区在内的共1011 bp的ORF片段正确插入植物过量表达载体pCAMBIA2300-GFP上。

[0037] 根据前期克隆到的VyPPR基因ORF序列,设计可以扩增VyPPR基因ORF的上下游引物VyPPR-ORF-F和VyPPR-ORF-R;根据pCAMBIA2300-GFP载体上的酶切位点,在引物VyPPR-ORF-F的5'端加上酶切位点XbaI,具体序列为GGGTCTAGAATGGCTCCTCCCCAAAATCAAC,在引物VyPPR-ORF-R的5'端加上酶切位点KpnI,具体序列为GGGGGTACCCTAGTACAGACTAATCAGACTC。

[0038] 以pMD18-T-VyPPR质粒为模板,用VyPPR-ORF-XbaI-F与VyPPR-ORF-KpnI-R进行扩增,回收目的条带后连接到pMD19-T克隆载体,转化TOP10感受态细胞,在附加Amp的LB培养基上进行蓝白斑筛选,分别经过菌液PCR与质粒酶切检测,pMD19-T-VyPPR阳性克隆送公司测序。用XbaI、KpnI双酶切重组克隆载体pMD19-T-VyPPR与植物表达载体pCAMBIA2300-GFP,回收线性化载体与目标片段,连接并转化TOP10,经Kan抗生素筛选,挑取单克隆摇菌,菌液检测后提质粒酶切检测,形成植物表达载体pCAMBIA2300-VyPPR。

[0039] 实施例3:

[0040] 葡萄VyPPR基因在拟南芥中的过量表达

[0041] 将含有重组植物表达载体的农杆菌划线培养在LB平板(含60 mg/L的Gent,100 mg/L的Kan)上划线,置于28℃条件下培养24 h;挑取单克隆在10 ml LB液体培养基(附加相应的抗生素)中,在28℃条件下培养24 h;取5 ml菌液转移至50 ml新鲜的LB液体培养基中,在28℃条件下继续培养,至菌液OD600达到0.6左右;转移至离心瓶或离心管中,室温条件下,转速为4000 rpm离心10min,去除上清液收集菌体;重悬于渗透缓冲液(0.5×MS, 5%蔗糖,0.03% Silwet L-77(GE Health)),调OD600至0.8;将拟南芥花序上已有的果荚去掉,花序完全浸入渗透液中10-30 s(或用移液器直接将渗透液滴在花序上),立即去掉拟南芥叶或茎秆上的渗透液,将植株平放在托盘中,用塑料薄膜覆盖托盘,24h后取下薄膜,于温室中继续培养;为提高转化效率,7天之后用同样方法再次侵染;经过转化的拟南芥植株进行正常管理,待果荚现白色时进行收种子。

[0042] 对上述通过卡那霉素初步筛选得到的VyPPR转基因植株及野生型植株,进一步在DNA水平进行鉴定,采用改进的 SDS 微量提取法提取总DNA。分别以上述所提取的VyPPR转基因植株及野生型植株的DNA为模板,在3.5S启动子上设计上游引物(5'-GAAGATGCCCTCTGCCGACAGTG-3'),与基因特异的下游引物(5'-GCTGAAGTGTGATCAGAATGAGAAGC-3')组成引物对,进行PCR检测;反应体系(25μL)为:10×buffer 2.5 μL;d NTPs 0.5 μL;Taq 酶 0.3 μL;ddH₂O 16.2μL;Primer F 1.5μL;Primer R 1.5μL;DNA 2.5μL。反应程序:94℃预变性5min;35个循环,94℃变性30S,58℃退火30S,72℃延伸 1 min;72℃延伸10min,4℃保存,PCR产物在1%琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

[0043] 实施例4:

[0044] 转基因拟南芥植株的抗旱性鉴定

[0045] VyPPR 转基因植株和野生型植株在 MS 培养基上生长 7 天后,转移至营养钵中,正常浇水20天使其生长成健壮的幼苗。然后停止给拟南芥幼苗浇水即进行干旱处理,直到第7天部分拟南芥植株叶片出现明显的失水萎焉症状。之后对所有植株进行复水,48小时后观察植株生长状况。干旱处理前后及复水后拟南芥植株的表现型通过拍照记录。

[0046] 实施例5:

[0047] 转基因拟南芥植株生理生化特性分析

[0048] 失水率的测定:VyPPR转基因植株和野生型植株正常生长3周后,分别取约0.2 g的莲座叶进行失水率的测定。将采取的莲座叶放置于干燥的滤纸上,每隔10 min测量一次叶片的鲜重(FW),直到测至50 min时失水率测定结束。将每一次测定的失水量与第一次测定的鲜重的比值作为失水率。

[0049] 电解质渗漏率(EL)的测定:将叶片装入离心管中,用超去离子水定容至 10 ml,室

温下振荡1小时后测定溶液的电导值,记为煮前C1。随后将溶液连同叶片置于沸水中煮沸10 min后,等温度降至室温后测定电导值,记为C2。将C1 与C2的比值(C1/C2)作为相对电解质渗漏值。

[0050] 叶绿素含量的测定:将新鲜的各株系拟南芥叶片剪成0.2 cm左右的细丝或小块混合均匀后,称取0.1-0.2g,放入50ml的离心管中,在容量瓶或试管中加入0.5ml纯丙酮和10-15ml 80%的丙酮,并仔细将粘附在瓶壁边缘的叶子碎末洗到丙酮溶液中,盖上瓶塞,室温下置摇床浸提过夜,次日取出容量瓶,观察叶组织已全部变白时,表示叶绿素已浸提干净,然后用 80%丙酮定容至25ml,离心后,波长645nm,663nm,652nm比色测定。

[0051] 实施例6:

[0052] 转基因拟南芥抗旱相关基因表达分析

[0053] 用plus植物总RNA提取试剂盒提取干旱处理后的转基因拟南芥叶片总RNA。普通反转录用PrimeScriptIII1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)合成cDNA第一链,具体操作步骤如下:

[0054] 在PCR管中加入:Random 6 mers (50 μ M) 1 μ l, dNTP Mixture (10 mM each) 1 μ l, Total RNA 2 μ g, RNase free dH2O补齐至10 μ l,充分混匀,瞬时离心使溶液至PCR管底部。在PCR仪上65 $^{\circ}$ C反应5 min,冰上急冷。以拟南芥AtActin为内参基因,

[0055] 正向引物序列qRT-AtActin-F: 5' -CGGTGGTTCTATCTTGGCATC-3' ,

[0056] 反向引物序列qRT-AtActin-R: 5' -GTCTTTCGCTTCAATAACCCTA-3' 。AtCOR15A基因

[0057] 正向引物序列qRT-AtCOR15A-F:5' -CAGCGGAGCCAAGCAGAGCAG-3' ,

[0058] 反向引物序列qRT-AtCOR15A-R: 5' -CATCGAGGATGTTGCCGTCACC-3' 。

[0059] AtERD15基因

[0060] 正向引物序列qRT-AtERD15-F: 5' -CCAGCGAAATGGGGAAACCA-3' ,

[0061] 反向引物序列qRT-AtERD15-R: 5' -ACAAAGGTACAGTGGTGGC-3' 。

[0062] AtRD29A基因

[0063] 正向引物序列qRT-AtRD29A-F: 5' -GTTACTGATCCCACCAAAGAAGA-3' ,

[0064] 反向引物序列qRT-AtRD29A-R: 5' -GGAGACTCATCAGTCACTTCCA-3' 。

[0065] AtP5CS1基因

[0066] 正向引物序列qRT-AtP5CS1-F: 5' -CGACGGAGACAATGGAATTGT-3' ,

[0067] 反向引物序列qRT- AtP5CS1-R:5' -GATCAGAAATGTGTAGGTAGC-3' 。

[0068] 实时荧光定量PCR按照TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time) 说明在Bio-Rad IQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 上进行。25 μ l的反应体系:1 μ l的反转录模板;正反向引物各1 μ l; 12.5 μ l 的2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2 \times);9 μ l的nuclease-free water。反应程序为:95 $^{\circ}$ C,30 s;40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 5 s;57 $^{\circ}$ C for 30 s;72 $^{\circ}$ C for 30 s。结果采用2- $\Delta\Delta C(t)$ 法进行分析。

[0069] SEQ: NO.1

[0070] AGCTAGCCAAAGCAGGGCCATTTTCAGTTAACTTTTCAGTTGTCCAGTTACAACTCGGAGCTCAAAGC
GCCGTAGCAGTTCTGAAGAACTCAAGAACATGGCTCTCCCAAAATCAACTCAATCTGAACAACTCTGTCTAGCC
CTCCTTGAAAGATGCATTCATCTCAATCATCTCAAGCAGCTCCAAGCCTTTTCATCACTCTCGGCCATGCCAGAC

TCATTTCTACGCCTTCAAGCTCCTCCGCTTCTGCACTCTAGCCCTCTCCAATCTCTCCTACGCTCGCTTCATCTTCG
ACCACGTCGAATCCCCAATGTCTACCTCTACACTGCAATGATCACTGCTTATGCTTCTCATTCTGATCACACTTCA
GCCCTTCTTTTGTACCGCAACATGGTTCGTCGCCGTCGGCCTTGGCCCAACCATTTTATCTACCCTCATGTCTTGAA
GTCGTGCACCCAGGTCGTGGGGCCGGGGAGTGCAGAAATGGTGCATTGTCAGGTGCTGAGGTCGGGTTTTGAACAAT
ACCCAGTTGTGCAAAACAGCTCTTCTTGATGCCTACTTGAGGTTTTGGTCTGATGTGGAAAGTGCAGCTCTCTTGTT
GATGAAATGACTGAGAGGAATGTTGTGTCTTGACAGCTATGATTTCTGGGTACACGAGGCTTGGACAGATTGGGAA
TGCTGTATTGTTGTTGAGGAAATGCCCGAGAGGGATGTGCCGCTTGGAAACGCTTTGATTGCTGGTTACACACAGA
ATGGGTTGTTTTCATGGAGGCGTTATCACTTTTCAGGAGAATGATTGCCGTTGAGGCGGGAGCTTGGGGTCAAGGAAAT
AGGCCAAATCAGGTTACTGCTGTGTGCTCACTCTCAGCTTGTGGTCACACTGGTATGCTCCGGCTTGGTAAATGGAT
ACATGGTTATGTTTACAGAAATGGGCTTGGTTTGGATTCATTTGTATCTAATGCTCTGGTGGATATGTATGGGAAAT
GTGGATGTTTGAAGAGGCAAGAAGGGTTTTTGATAGGACATTGGAGAGAAGCTTGACATCATGGAATTCATGATC
AATTGTCTCGCCCTCCATGGGCAAAGTCAGAATGCAATAAGTGTGTTTGAAGAGATGATGACATGTGGAAGTGGTGT
AAAACCTGATGAAGTTACATTTATTGGCTTGTGAAATGCCTGTACCCATGGGGTTTTGGTTGAAAAAGGTTGGCTTT
ATTTTGAGCTGATGACTCAAAATTATGGGATAGAACCTCAGATTGAGCATTATGGTTGCTTGGTAGATCTTCTTGGT
CGTGCAGGTCAGTTTGAAGAAGCTATGGAGGTTGTAAGGGGAATGAGAATTGAACCTGATGAGGTTATTTGGGGCTC
TTTGCTTAATGGATGTAAGATTCATGGCCACACAGATTTGGCTGAATTTCCATTAATAAATTGATTGATATGGATC
CAAATAATGGTGGTTATGGTATAATGTTGGCAAATATATATGGGGAGCTAGGCAAGTGGGATGAGGTTCCGAAGGTT
CGGAAGGTGTTGAAGGAGCAGAATGCCACAAGACCCCTGGTTCAGTTGGATTGAAATTGACAACCAAGTTCATCA
ATTCTATTCTGTTGATAAAACACATCCTAGAACGGAGGAGATATAACAATACATTGGAGAGTCTGATTAGTCTGTACT
AGCTTAGAGGTGCTGGGGTTTTTCCACAATTATAAAAACGGTTAAAAAATAAAATTTGAGTTTACAGGAGTTCA
AATTTGATTCTAATTCTCAAACACTACATGTTTACATGCCTACAGCACTATTCTGCTTTGGAGGGTAACCCTCTCAA
GTCCTTATGGAAGTGGTTGATGAGGGGCCAAGGT

[0071] SEQ: NO.2

[0072] MAPPQNQLNLSVLAALLERC IHLNHLKQLQAFLLITLGHQTHFYAFKLLRFCTLALSNSYARFIFDH
VESPVLYTAMITAYASHDHTSALLLYRNMVRRRRPWPNHFIYPHVLKSCQVVGPGSARMVHCQVLRSGFEQYP
VVQTALLDAYLRFWSDVESARLLFDEMTERNVVSWTAMISGYTRLGQIGNAVLLFEEMPERDVPSWNL IAGYTQNG
LFMEALSLFRRMIAVEAGAWGQGNRPNQVTAVCSLSACGHTGMLRLGKWIHGYYVRNGLGLDSFVSNALVDMYGKCG
CLKEARRVFDRTLERSLTSWNSMINCLALHGQSQNAISVFEEEMTCGSGVKPDEVTFIGLLNACTHGGLVEKGWLYF
ELMTQNYGIEPQIEHYGCLVDLLGRAGQFEEAMEVVRGMRIEPDEVIWGSLLNGCKIHGHTDLAEFSIKKLIDMDPN
NGGYGIMLANIYGELGKWDEVKVRKVLKEQNAHKTPGCSWIEIDNQVHQFYSDVKTHPRTEEIYNTLESLSLY

[0001]	序列表	
[0002]	<110>	河南科技大学
[0003]	<120>	野葡萄VyPPR基因及其编码蛋白在干旱胁迫中的应用
[0004]	<160>	2
[0005]	<170>	SIP0SequenceListing 1.0
[0006]	<210>	1
[0007]	<211>	1874
[0008]	<212>	DNA
[0009]	<213>	VyPPR
[0010]	<400>	1
[0011]	agctagccaa agcagggccc atttcagtta aactttcagt tgtccagtta caaactcgga	60
[0012]	gctcaaagcg ccgtagcagt tctgagaac tcaagaacat ggctcctccc caaaatcaac	120
[0013]	tcaatctgaa caactctgtc ctagecctcc ttgaaagatg cattcatctc aatcatctca	180
[0014]	agcagctcca agcctttctc atcactctcg gccatgccca gactcatttc tacgccttca	240
[0015]	agctcctccg cttctgcaact ctagecctct ccaatctctc ctacgctcgc ttcatcttcg	300
[0016]	accacgtcga atcccccaat gtctacctct acactgcaat gatcactgct tatgcttctc	360
[0017]	attctgatca cacttcagcc cttcttttgt accgcaacat ggttcgctgc cgtcggcctt	420
[0018]	ggcccaacca ttttatctac cctcatgtct tgaagtcgtg caccaggtc gtggggccgg	480
[0019]	ggagtgcgag aatggtgcat tgctcaggtgc tgaggtcggg ttttgaacaa taccagttg	540
[0020]	tgcaaacagc tcttcttgat gcctacttga ggttttggtc tgatgtggaa agtgcgcgtc	600
[0021]	tcttgtttga tgaatgact gagaggaatg ttgtgtcttg gacagctatg atttctgggt	660
[0022]	acacgaggct tggacagatt gggaatgctg tattgttgtt tgaggaaatg cccgagaggg	720
[0023]	atgtgccgtc ttggaacgct ttgattgctg gttacacaca gaatgggttg ttcatggagg	780
[0024]	cgttatcact tttcaggaga atgattgccg ttgaggcggg agcttggggg caaggaaata	840
[0025]	ggccaaatca ggttactgct gtgtgtcac tctcagcttg tggtcacact ggtatgctcc	900
[0026]	ggcttggtaa atggatacat ggttatgttt acagaaatgg gcttggtttg gattcatttg	960
[0027]	tatctaagtc tctggtgat atgtatggga aatgtggatg tttgaaagag gcaagaaggg	1020
[0028]	ttttgatag gacattggag agaagctga catcatggaa ttccatgac aattgtctcg	1080
[0029]	ccctccatgg gcaaagtcag aatgcaataa gtgtgtttga ggagatgatg acatgtggaa	1140
[0030]	gtggtgtaaa acctgatgaa gttacattta ttggcttgtt gaatgcctgt acccatgggg	1200
[0031]	gtttggttga aaaaggttg ctttattttg agctgatgac tcaaaattat gggatagaac	1260
[0032]	ctcagattga gcattatggt tgcttggtag atcttcttgg tcgtgcaggt cagtttgaag	1320
[0033]	aagctatgga ggttgtaagg ggaatgagaa ttgaacctga tgaggttatt tggggctctt	1380
[0034]	tgcttaatgg atgtaagatt catggccaca cagatttggc tgaattttcc attaaaaaat	1440
[0035]	tgattgatat ggatccaaat aatggtggtt atggtataat gttggcaaat atatatgggg	1500
[0036]	agctaggcaa gtgggatgag gttcggaaagg ttcggaaggt gttgaaggag cagaatgcc	1560
[0037]	acaagacccc tggttgcagt tggattgaaa ttgacaacca agttcatcaa ttctattctg	1620
[0038]	ttgataaaac acatctaga acggaggaga tatacaatac attggagagt ctgattagtc	1680
[0039]	tgtactagct tagaggtgct ggggttttcc ccacaattat aaaaacggtt taaaaataa	1740
[0040]	aattttgagt ttacaggagt tcaaatttga ttcttaattc tcaaaactaca tgtttcacat	1800
[0041]	gcctacagca ctattctgct ttggagggtg accctctcaa gtccttatgg aagtggttga	1860

[0042] tgaggggcca aggt 1874
 [0043] <210> 2
 [0044] <211> 529
 [0045] <212> PRT
 [0046] <213> VyPPR
 [0047] <400> 2
 [0048] Met Ala Pro Pro Gln Asn Gln Leu Asn Leu Asn Asn Ser Val Leu Ala
 [0049] 1 5 10 15
 [0050] Leu Leu Glu Arg Cys Ile His Leu Asn His Leu Lys Gln Leu Gln Ala
 [0051] 20 25 30
 [0052] Phe Leu Ile Thr Leu Gly His Ala Gln Thr His Phe Tyr Ala Phe Lys
 [0053] 35 40 45
 [0054] Leu Leu Arg Phe Cys Thr Leu Ala Leu Ser Asn Leu Ser Tyr Ala Arg
 [0055] 50 55 60
 [0056] Phe Ile Phe Asp His Val Glu Ser Pro Asn Val Tyr Leu Tyr Thr Ala
 [0057] 65 70 75 80
 [0058] Met Ile Thr Ala Tyr Ala Ser His Ser Asp His Thr Ser Ala Leu Leu
 [0059] 85 90 95
 [0060] Leu Tyr Arg Asn Met Val Arg Arg Arg Arg Pro Trp Pro Asn His Phe
 [0061] 100 105 110
 [0062] Ile Tyr Pro His Val Leu Lys Ser Cys Thr Gln Val Val Gly Pro Gly
 [0063] 115 120 125
 [0064] Ser Ala Arg Met Val His Cys Gln Val Leu Arg Ser Gly Phe Glu Gln
 [0065] 130 135 140
 [0066] Tyr Pro Val Val Gln Thr Ala Leu Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Phe Trp
 [0067] 145 150 155 160
 [0068] Ser Asp Val Glu Ser Ala Arg Leu Leu Phe Asp Glu Met Thr Glu Arg
 [0069] 165 170 175
 [0070] Asn Val Val Ser Trp Thr Ala Met Ile Ser Gly Tyr Thr Arg Leu Gly
 [0071] 180 185 190
 [0072] Gln Ile Gly Asn Ala Val Leu Leu Phe Glu Glu Met Pro Glu Arg Asp
 [0073] 195 200 205
 [0074] Val Pro Ser Trp Asn Ala Leu Ile Ala Gly Tyr Thr Gln Asn Gly Leu
 [0075] 210 215 220
 [0076] Phe Met Glu Ala Leu Ser Leu Phe Arg Arg Met Ile Ala Val Glu Ala
 [0077] 225 230 235 240
 [0078] Gly Ala Trp Gly Gln Gly Asn Arg Pro Asn Gln Val Thr Ala Val Cys
 [0079] 245 250 255
 [0080] Ser Leu Ser Ala Cys Gly His Thr Gly Met Leu Arg Leu Gly Lys Trp
 [0081] 260 265 270
 [0082] Ile His Gly Tyr Val Tyr Arg Asn Gly Leu Gly Leu Asp Ser Phe Val
 [0083] 275 280 285

[0084]	Ser Asn Ala Leu Val Asp Met Tyr Gly Lys Cys Gly Cys Leu Lys Glu
[0085]	290 295 300
[0086]	Ala Arg Arg Val Phe Asp Arg Thr Leu Glu Arg Ser Leu Thr Ser Trp
[0087]	305 310 315 320
[0088]	Asn Ser Met Ile Asn Cys Leu Ala Leu His Gly Gln Ser Gln Asn Ala
[0089]	325 330 335
[0090]	Ile Ser Val Phe Glu Glu Met Met Thr Cys Gly Ser Gly Val Lys Pro
[0091]	340 345 350
[0092]	Asp Glu Val Thr Phe Ile Gly Leu Leu Asn Ala Cys Thr His Gly Gly
[0093]	355 360 365
[0094]	Leu Val Glu Lys Gly Trp Leu Tyr Phe Glu Leu Met Thr Gln Asn Tyr
[0095]	370 375 380
[0096]	Gly Ile Glu Pro Gln Ile Glu His Tyr Gly Cys Leu Val Asp Leu Leu
[0097]	385 390 395 400
[0098]	Gly Arg Ala Gly Gln Phe Glu Glu Ala Met Glu Val Val Arg Gly Met
[0099]	405 410 415
[0100]	Arg Ile Glu Pro Asp Glu Val Ile Trp Gly Ser Leu Leu Asn Gly Cys
[0101]	420 425 430
[0102]	Lys Ile His Gly His Thr Asp Leu Ala Glu Phe Ser Ile Lys Lys Leu
[0103]	435 440 445
[0104]	Ile Asp Met Asp Pro Asn Asn Gly Gly Tyr Gly Ile Met Leu Ala Asn
[0105]	450 455 460
[0106]	Ile Tyr Gly Glu Leu Gly Lys Trp Asp Glu Val Arg Lys Val Arg Lys
[0107]	465 470 475 480
[0108]	Val Leu Lys Glu Gln Asn Ala His Lys Thr Pro Gly Cys Ser Trp Ile
[0109]	485 490 495
[0110]	Glu Ile Asp Asn Gln Val His Gln Phe Tyr Ser Val Asp Lys Thr His
[0111]	500 505 510
[0112]	Pro Arg Thr Glu Glu Ile Tyr Asn Thr Leu Glu Ser Leu Ile Ser Leu
[0113]	515 520 525
[0114]	Tyr

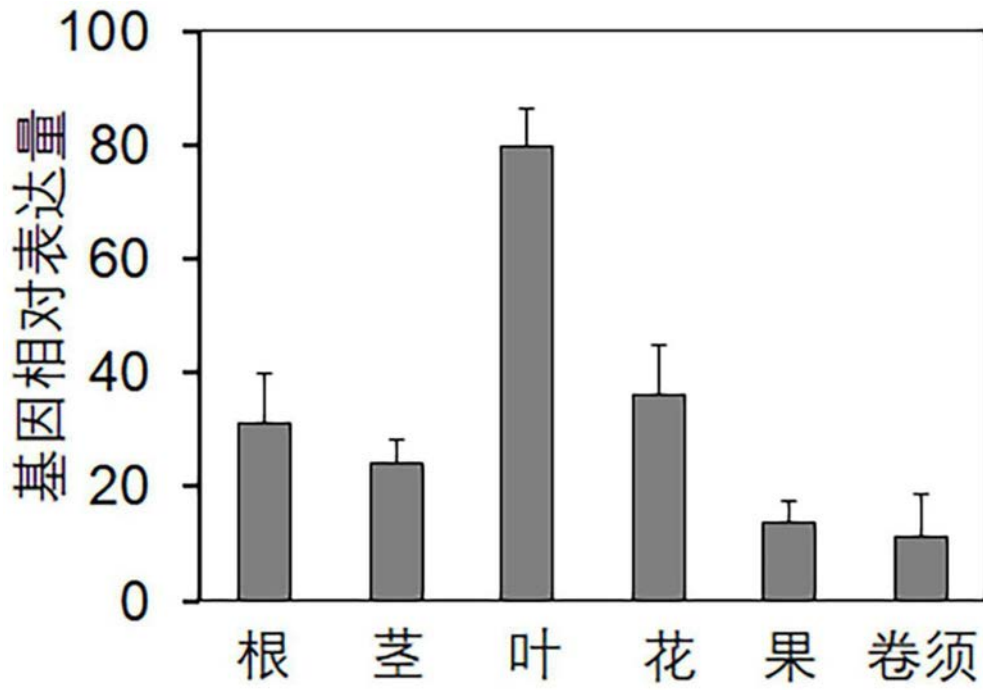


图1

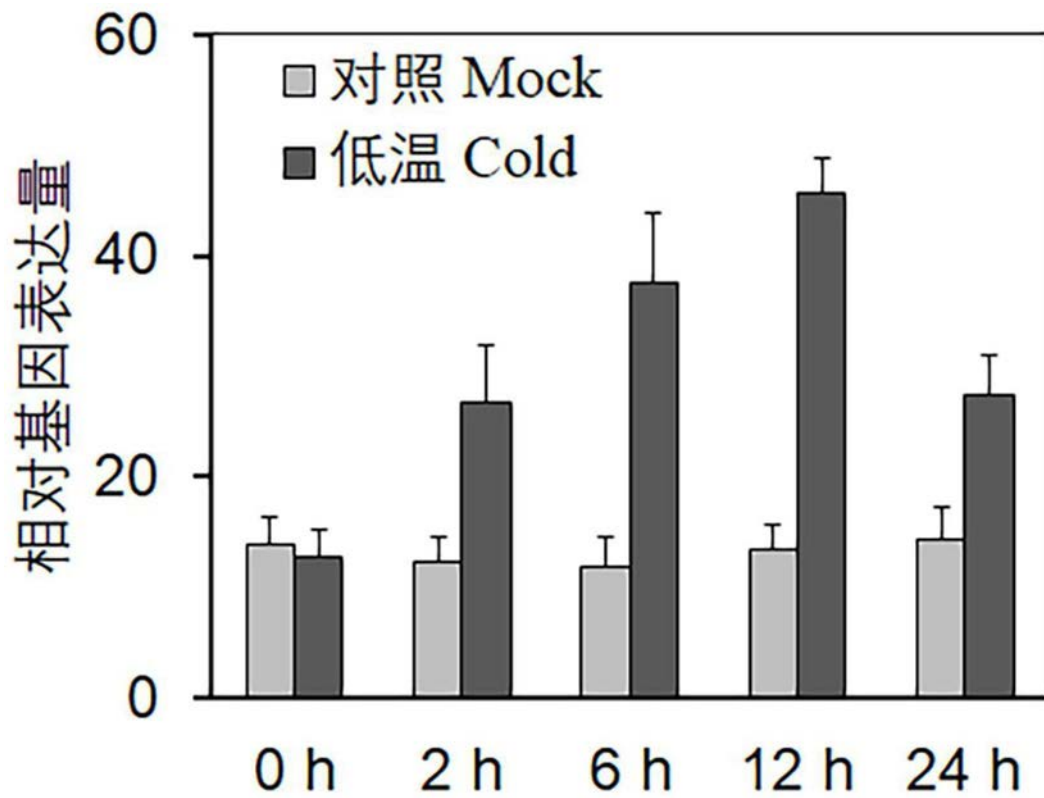


图2

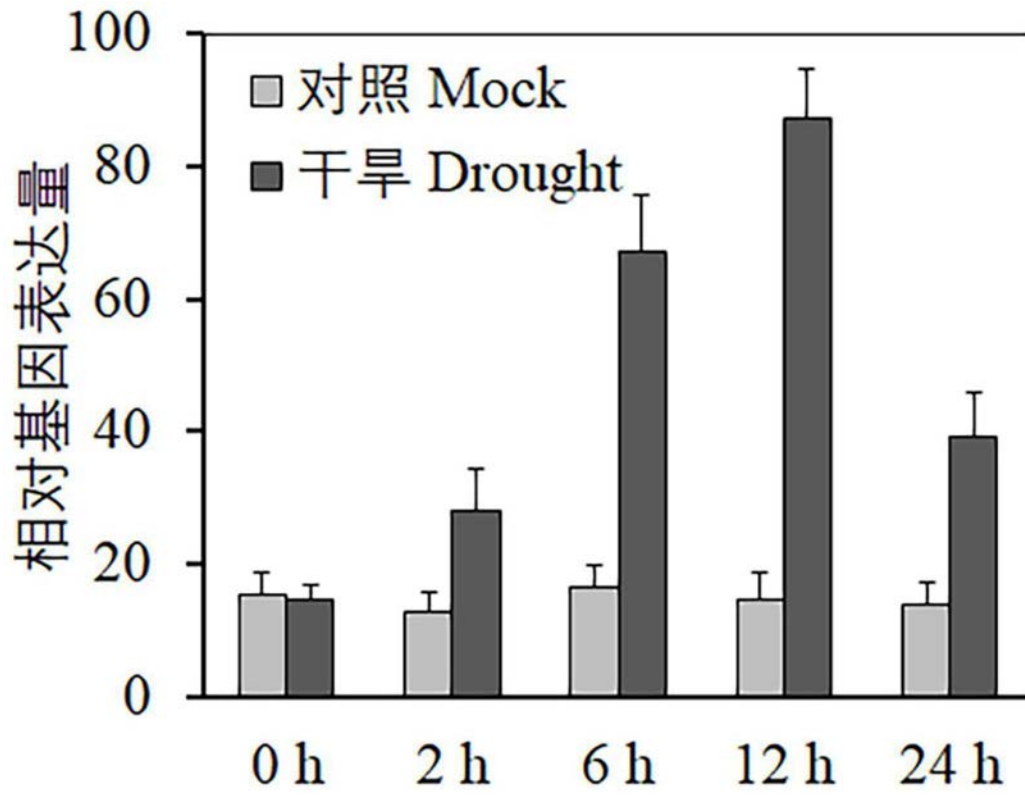


图3

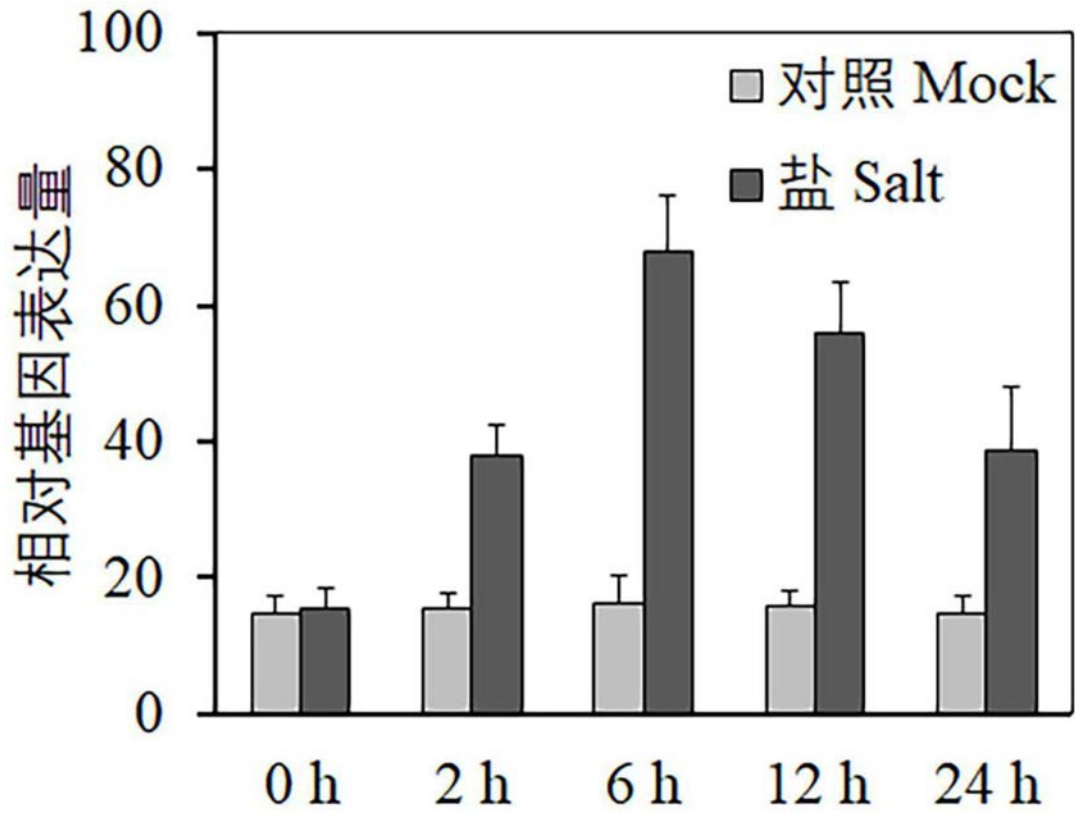


图4

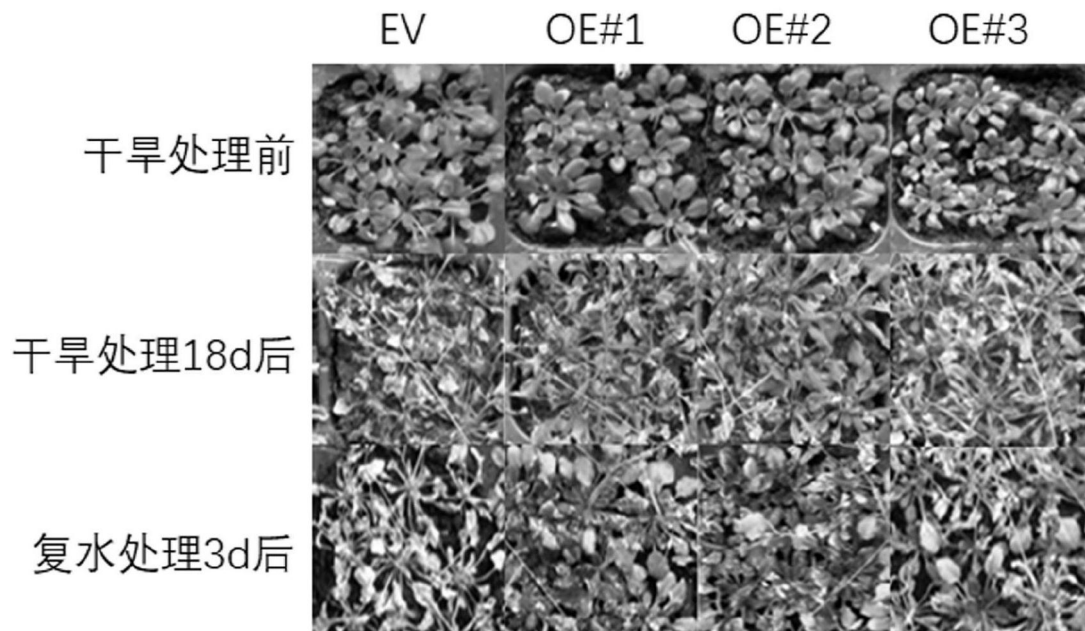


图5

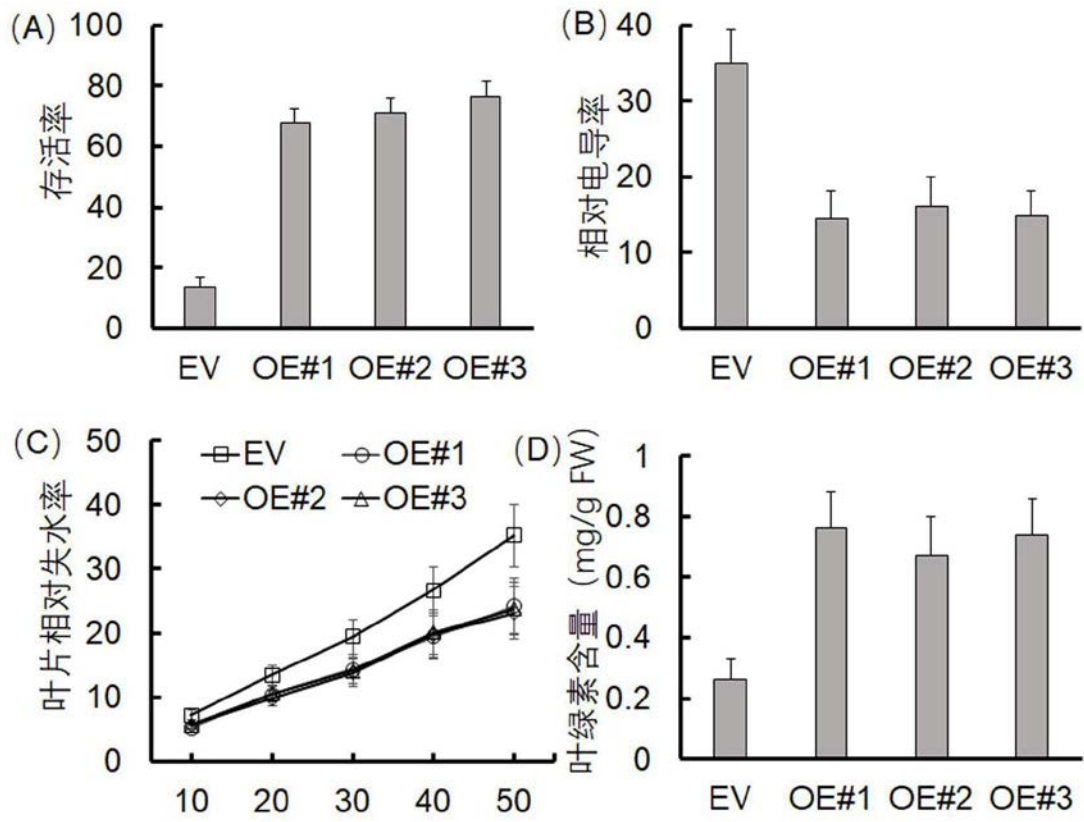


图6

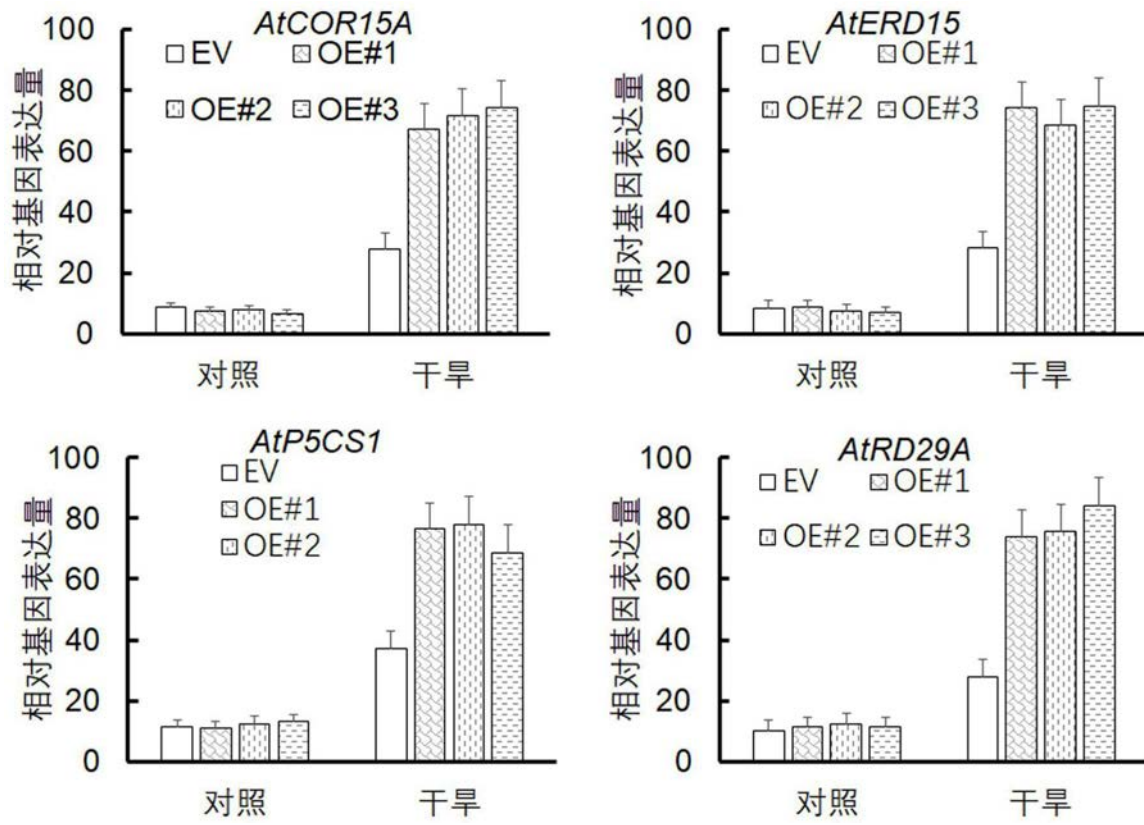


图7