



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109266628 B

(45)授权公告日 2020.04.14

(21)申请号 201811172475.3

(22)申请日 2018.10.09

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109266628 A

(43)申请公布日 2019.01.25

(73)专利权人 南京市胸科医院
地址 210029 江苏省南京市鼓楼区广州路
215号

(72)发明人 张晨曦 吴晓渊 张斌

(74)专利代理机构 南京天华专利代理有限责任
公司 32218

代理人 杜静

(51)Int.Cl.

C12N 9/12(2006.01)

C12N 15/54(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12Q 1/686(2018.01)

C12R 1/19(2006.01)

(56)对比文件

WO 2007011891 A2,2007.01.25,说明书第1
页第13-17行、第7页第14-17行、第8页第17-30
行、第9页第24-29行、第10页第6-10行、SEQ ID
NO:11的序列信息.

WO 2007011891 A2,2007.01.25,说明书第1

页第13-17行、第7页第14-17行、第8页第17-30
行、第9页第24-29行、第10页第6-10行、SEQ ID
NO:11的序列信息.

CN 106754812 A,2016.12.21,摘要、说明书
第5-10段、SEQ ID NO.2的序列信息.

WO 2007011891 A2,2007.01.25,说明书第1
页第13-17行、第7页第14-17行、第8页第17-30
行、第9页第24-29行、第10页第6-10行、SEQ ID
NO:11的序列信息.

CN 106754812 A,2016.12.21,摘要、说明书
第5-10段、SEQ ID NO.2的序列信息.

WO 0192501 A1,2001.12.06,第31页第29-
21行、第32页第10-21行以及SEQ ID NO:1的序列
信息.

CN 107475216 A,2017.12.15,权利要求1、
2、SEQ ID NO.1的序列信息.

Erlet Shehi, et al..The Sso7d DNA-
binding protein from Sulfolobus
solfataricus has ribonuclease activity.
《FEBS Letters》.2001,第131-136页.

Yan Wang, et al..A novel strategy to
engineer DNA polymerases for enhanced
processivity and improved performance in
vitro.《Nucleic Acids Research》.2004,第32
卷(第3期),第1197-1207页.

审查员 王帆

权利要求书1页 说明书4页
序列表5页 附图1页

(54)发明名称

一种融合的TaqDNA聚合酶及其应用

(57)摘要

为实现上述目的,本发明公开一种融合的
Taq DNA聚合酶,其为DNA单链结合蛋白Sac7d或
DNA单链结合蛋白sso7d分别与野生型Taq DNA聚
合酶融合而成。本发明提供的一种融合的Taq
DNA聚合酶,增强了扩增过程中与模板链的亲
和能力从而提高扩增效率,实现困难模板的扩
增,且酶活性稳定,可以直接用血液当模板进行扩

增。

1. 一种融合的Taq DNA聚合酶,其特征在于,编码基因序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示。
2. 一种载体,其特征在于,所述载体包含SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。
3. 根据权利要求2所述的载体,其特征在于,由SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列与表达载体经重组得到。
4. 根据权利要求2所述的载体,其特征在于,由SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列插入pET-28a表达载体经重组得到。
5. 一种重组细胞,其特征在于,所述重组细胞包含SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。
6. 根据权利要求5所述的重组细胞,其特征在于,所述重组细胞包含载体,所述载体包含SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列与表达载体经重组得到。
7. 权利要求1所述的融合的Taq DNA聚合酶的制备方法,其特征在于,构建含有SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列的载体,转化至宿主细胞获得重组细胞,表达融合的Taq DNA聚合酶。
8. 一种Taq DNA聚合酶试剂,所述试剂中含有权利要求1所述融合的Taq DNA聚合酶。
9. 权利要求1所述融合的Taq DNA聚合酶在PCR中的应用。
10. 权利要求1所述融合的Taq DNA聚合酶在直接用血液作为模板进行PCR扩增中的应用。
11. 根据权利要求10所述的应用,其特征在于,血液在PCR反应体系中的体积占比不高于20%。
12. 根据权利要求11所述的应用,其特征在于,血液在PCR反应体系中的体积占比不高于15%。

一种融合的TaqDNA聚合酶及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程领域,具体涉及一种融合的Taq DNA聚合酶及其应用。

背景技术

[0002] PCR是分子生物学领域最基本但是最重要的方法,它可以将微量的核酸复制扩大,实现生物学上的研究,大大促进了分子生物学和相关学科的发展。PCR的主要成分包括:反应Buffer、酶、dNTP、模板、引物。这些组分中,每个组分都是PCR扩增不可缺少的,但DNA聚合酶是实现DNA复制的关键,目前针对这些不同的组分,研究者关注最多的是酶的研究,期望通过对酶的改造,实现更多应用,比如:血液直扩、土壤直扩、植物直扩等。

[0003] Taq DNA聚合酶存在于水生嗜热菌(*Thermus aquaticus*)的嗜热DNA聚合酶,可在74℃复制DNA,在95℃仍具有酶活力。该酶可在离体条件下,以DNA为模板,延伸引物,合成双链DNA。其在结构上由三部分构成:DNA聚合酶区、3' 核酸外切酶区和5' 核酸外切酶区,只有5' →3' DNA聚合酶活性和5' →3' 的外切酶活性,缺少3' →5' 的外切酶活性。Taq DNA聚合酶是重要的生物技术工具酶,广泛应用于疾病诊断与治疗、传染病检测、药物作用机理等医药领域。

[0004] 随着医药科技的发展,对Taq酶性能的要求不断提高,野生型的Taq DNA聚合酶已经不能满足特殊PCR技术的要求了,例如用于定点突变时要求聚合酶有较高的保真性,用于长片段扩增时要求聚合酶有较高的扩增效率。由此而带来了多种酶的改造方法,比如:通过制备酶单分子纳米凝胶提高酶的稳定性(化学修饰);定点突变置换氨基酸,如3' 端核酸外切酶区的氨基酸变化使其失去5' →3' 的外切功能(分子修饰)等等。目前常用的改造方法有定点突变、定点缺失、基因融合等。

[0005] 当前对Taq DNA聚合酶改造用的最多的是聚合酶联合应用、定点突变、缺失突变等,通过定向改变氨基酸种类,达到增强某种性能的目的。例如:Taq DNA聚合酶缺乏校正功能,所以将Taq DNA聚合酶和Pfu DNA聚合酶联合应用,利用Taq DNA聚合酶较强的延伸能力和Pfu DNA聚合酶的校正功能,使得扩增可以达到40kb。例如:将Taq DNA聚合酶543位的丝氨酸定点突变为天冬酰胺,可以增强Taq DNA聚合酶和模板引物复合物的相互作用,提高了对高GC含量等困难模板的扩增能力。

[0006] 很多报道通过酶改造增强了Taq DNA聚合酶的扩增效率、扩增特异性等,但是很少有报道提高了Taq DNA聚合酶在不经过纯化的DNA,实现直接用血液进行扩增。当下用于医院或者工业用户的扩增都是样本数量庞大,如果要先进行DNA提取纯化,再进行扩增,一方面需耗费很长的时间,另一方面DNA交叉污染可能出现很多假阳性,不利于结果的判定。

发明内容

[0007] 针对上述现有技术存在的问题,本发明目的提供一种融合的Taq DNA聚合酶,增强了扩增过程中与模板链的亲和能力从而提高扩增效率,实现困难模板的扩增,且酶活性稳定,可以直接用血液当模板进行扩增。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供一种融合的Taq DNA聚合酶,其为DNA单链结合蛋白Sac7d或DNA单链结合蛋白sso7d分别与野生型Taq DNA聚合酶融合而成。

[0009] 本发明所述的野生型Taq DNA聚合酶的编码序列优选如SEQ ID NO.3所示。

[0010] 本发明所提供的融合的Taq DNA聚合酶,编码基因序列如SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0011] 所述的核苷酸序列还可以为SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列进行1个或几个核苷酸取代而得到的密码子同义突变的核苷酸序列。

[0012] 本发明还提供一种载体,所述载体包含可编码上述融合的Taq DNA聚合酶的核苷酸序列。

[0013] 具体的,上述载体可以包含SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0014] 该载体可以进一步由可编码上述融合的Taq DNA聚合酶的核苷酸序列与表达载体经重组得到。所述表达载体为含有转录和翻译插入的编码序列所需的元件的空载体。

[0015] 所述表达载体可以为本领域常用载体,如可以为pET-28a。

[0016] 具体的,上述载体可以由SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列插入pET-28a等表达载体经重组得到。

[0017] 本发明还提供一种重组细胞,该重组细胞可以包含编码上述融合的Taq DNA聚合酶的核苷酸序列。

[0018] 具体的,该重组细胞包含SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0019] 该重组细胞还可包含载体,所述载体包含可编码上述Taq DNA聚合酶的核苷酸序列。

[0020] 进一步的,该重组细胞还可包含载体,所述载体包含SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0021] 重组细胞可包含载体,所述载体可以由编码上述融合的Taq DNA聚合酶的核苷酸序列与表达载体经重组得到。

[0022] 进一步的,该重组细胞还可包含载体,所述载体由SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列与表达载体经重组得到。

[0023] 所述表达载体可以为本领域常用载体,如可以为pET-28a。

[0024] 所述重组细胞的宿主细胞为大肠杆菌等。

[0025] 本申请还提供上述融合的Taq DNA聚合酶的制备方法,构建含有可编码上述融合的Taq DNA聚合酶的核苷酸序列的载体,转化至宿主细胞获得重组细胞,表达融合的Taq DNA聚合酶。

[0026] 本方法还提供一种Taq DNA聚合酶试剂,所述试剂中含有上述融合的Taq DNA聚合酶。

[0027] 本发明还提供上述融合的Taq DNA聚合酶在PCR中的应用。

[0028] 本发明所述的应用,可以直接用血液作为模板进行扩增。

[0029] 本发明所述的应用,用血液扩增时,血液在PCR反应体系中的占比(体积)不高于20%,优选的不高于15%。

[0030] 本申请的有益效果:

[0031] 本申请所述的融合的Taq DNA聚合酶增强了扩增过程中与模板链的亲和能力从而

提高扩增效率,实现困难模板的扩增,且酶活性稳定,可以直接用血液当模板进行扩增。

附图说明

[0032] 图1是实施例2所述的4种酶扩增电泳图。

具体实施方式

[0033] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0034] 实施例1制备融合的Taq DNA聚合酶

[0035] 我们获得了表达DNA单链结合蛋白的3个基因:HMF、Sac7d、sso7d,其序列可通过现有公开途径查询获得,或者分别为SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2的序列中出去野生型Taq DNA聚合酶即除去SEQ ID NO.3的序列后剩余的序列。通过前期扩增、胶回收、测序得到HMF、Sac7d、sso7d的核酸序列,用ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit(南京诺唯赞生物科技有限公司)将HMF、Sac7d、sso7d分别与Taq首尾相连在pET28a载体,得到重组基因,转化到大肠杆菌中,37℃摇菌1小时(转速200-250rpm),5000rpm离心5min,弃900μl上清,剩余培养基将菌体重悬,用无菌涂布棒在Kan平板上涂布。37℃培养箱中倒置培养12-16h。通过PCR鉴定阳性菌落,将阳性菌落送测序,确认基因序列正确。将正确的大肠杆菌IPTG诱导表达蛋白,用本行业通俗的方法纯化蛋白,得到融合的3种Taq DNA聚合酶,分别命名为HMF-Taq(编码序列如SEQ ID NO.4所示)、Sac7d-Taq(编码序列如SEQ ID NO.1所示)、sso7d-Taq(编码序列如SEQ ID NO.2所示)。

[0036] 同源重组所用的引物序列

[0037] HMF-Taq-1-F: taagaaggagatataccatgTAAGAAGGAGATATACCATGGATGATG

[0038] HMF-Taq-1-R: catccccgaattcatGCTCTTAATTGCGAGCTTAATGTC

[0039] HMF-Taq-2-F: agagcATGAATTCGGGGATGCTGC

[0040] HMF-Taq-2-R: tgatgatgatggctgctgccTCACTCCTTGGCGGAGAGC

[0041] Sac7d-Taq-1-F: taagaaggagatataccatgGTGAAGGTAAAGTTCAAGTATAAGGGTG

[0042] Sac7d-Taq-1-R: gcagcatccccgaattcatTTTCTTCTCTTTCTGCTCTTGCT

[0043] Sac7d-Taq-2-F: aATGAATTCGGGGATGCTGC

[0044] Sac7d-Taq-2-R: tgatgatgatggctgctgccTCACTCCTTGGCGGAGAGC

[0045] sso7d-Taq-1-F: taagaaggagatataccatgGCAACCGTAAAGTTCAAGTACAAAG

[0046] sso7d-Taq-1-R: gcatccccgaattcatTCACTTTTTCTGCTTCTCCAGCA

[0047] sso7d-Taq-2-F: gtgaATGAATTCGGGGATGCTGC

[0048] sso7d-Taq-2-R: tgatgatgatggctgctgccTCACTCCTTGGCGGAGAGC

[0049] 实施例2检测得到的改进的Taq DNA聚合酶直接用于血液扩增的效果

[0050] 测试改造后的HMF-Taq、Sac7d-Taq、sso7d-Taq和野生型Taq(序列如SEQ ID NO.3所示)在血液直扩时的效果。

[0051] 测试用到的反应Buffer配方:30mM Tris,pH8.3,Mg 2.5mM,KCl 10mM,海藻糖0.5M,反应酶浓度2U/μl。

[0052] 血液模板浓度为反应体系的15%。反应程序:95℃30sec,95℃5min,58℃30sec,72℃30sec (35cycles),72℃5min。

[0053] 扩增所用的引物序列:

[0054] R:CTGCCCGTAGTAGTCGTAATCGTCCTCCAT

[0055] F:AACTGCTGCTTGGCTACAGCGACATCGA

[0056] PCR产物在1%的琼脂糖胶进行电泳,得到如图1结果,显示通过基因融合得到的Sac7d-Ta_q、sso7d-Ta_q可以在含有15%血液的体系中良好扩增,而对比例HMF-Ta_q和野生型Ta_q则扩增效果较弱。

[0057] 实施例3检测HMF-Ta_q、Sac7d-Ta_q、sso7d-Ta_q和野生型Ta_q在不同浓度血液存在下的酶活

[0058] 将实施例1制备的3种酶和野生型Ta_q组成的4种酶(HMF-Ta_q、Sac7d-Ta_q、sso7d-Ta_q和野生型Ta_q)分别与活化的小牛胸腺DNA和P³²标记的dATP一起温育,在不同体积浓度血液抑制的情况下,70℃下保持10分钟,通过检测核苷酸渗入DNA的速度检测酶的活性,在酶标仪上检测,得到结果如表1所示,显示通过基因融合得到的Sac7d-Ta_q、sso7d-Ta_q在不同血液存在的情况下,酶活性稳定,15%血液依然能维持90%以上的活性,而野生型和HMF-Ta_q活性分别下降至11%、30%。

[0059] 表1:4种酶在血液抑制下检测酶活结果(酶活,单位:%)

[0060]

血液含量 \ 酶种类	0%	5%	10%	15%
HMF-Ta _q	100%	90%	70%	30%
Sac7d-Ta _q	100%	105%	102%	91%
sso7d-Ta _q	100%	108%	95%	90%
野生型Ta _q	100%	76%	62%	11%

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 南京市胸科医院	
[0003]	<120> 一种融合的TaqDNA聚合酶及其应用	
[0004]	<160> 4	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 2697	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0010]	<400> 1	
[0011]	gtgaaggtaa agttcaagta taagggtgaa gagaaagaag tagacacttc aaagataaag	60
[0012]	aaggtttgga gagtaggcaa aatggtgtcc tttacctatg acgacaatgg taagacaggt	120
[0013]	agaggagctg taagcgagaa agatgctcca aaagaattat tagacatggt agcaagagca	180
[0014]	gaaagagaga agaaaatgaa ttcggggatg ctgcccctct ttgagcccaa gggccgggtc	240
[0015]	ctcttggtgg acggccacca cctggcctac cgcaccttcc acgccctgaa gggcctcacc	300
[0016]	accagccggg gggagccggt gcaggcggtc tacggcttcg ccaagagcct cctcaaggcc	360
[0017]	ctcaaggagg acggggacgc ggtgatcgtg gtctttgacg ccaaggcccc ctccttccgc	420
[0018]	cacgaggcct acggggggta caaggcgggc cgggccccca cgccggagga ctttccccgg	480
[0019]	caactcgcct tcatcaagga gctggtggac ctctggggc tggcgcgcct cgaggtcccg	540
[0020]	ggctacgagg cggacgacgt cctggccagc ctggccaaga aggcggaaaa ggagggctac	600
[0021]	gaggtccgca tctcaccgc cgacaaagac ctttaccagc tcttttccga ccgcatccac	660
[0022]	gtctccacc ccgaggggta cctcatcacc ccggcctggc tttgggaaaa gtacggcctg	720
[0023]	aggcccagcc agtgggcca ctaccggcc ctgaccgggg acgagtccga caaccttccc	780
[0024]	gggtcaagg gcatcgggga gaagacggcg aggaagcttc tggaggagtg ggggagcctg	840
[0025]	gaagccctcc tcaagaacct ggaccggctg aagcccccca tccgggagaa gatcctggcc	900
[0026]	cacatggacg atctgaagct ctctgggac ctggccaagg tgcgcaccga cctgcccctg	960
[0027]	gaggtggact tcgcaaaaag gcgggagccc gaccgggaga ggcttagggc ctttctggag	1020
[0028]	aggcttgagt ttggcagcct cctccacgag ttcggccttc tggaaagccc caaggccctg	1080
[0029]	gaggaggccc cctggcccc gccggaagg gccttcgtgg gctttgtgct ttcccgaag	1140
[0030]	aagcccatgt gggccgatct tctggccctg gccgccgcca gggggggccg ggtccaccgg	1200
[0031]	gccccgagc cttataaagc cctcagggac ctgaaggagg cgcgggggct tctcgccaaa	1260
[0032]	gacctgagcg ttctggccct gagggaaggc cttggcctcc cgcccggcga cgaccccatg	1320
[0033]	ctctcgcct acctctgga cccttccaac accacccccg tgggggtggc ccggcgctac	1380
[0034]	ggcggggagt ggacggagga ggcgggggag cgggccgccc tttccgagag gctcttcgcc	1440
[0035]	aacctgtggg ggaggcttga gggggaggag aggctccttt ggctttaccg ggaggtggag	1500
[0036]	aggccccttt ccgctgtcct ggcccacatg gaggccacgg ggggtgcgcct ggacgtggcc	1560
[0037]	tatctcaggg cttgtccct ggaggtggcc gaggagatcg cccgcctcga ggccgaggtc	1620
[0038]	ttcgcctgg ccggccacc cttcaacctc aactcccggg accagctgga aagggtctct	1680
[0039]	tttgacgagc tagggtctcc cgccatcggc aagacgaaga agaccggcaa gcgctccacc	1740
[0040]	agcgcgccg tcttgaggc cctccgcgag gccacccca tcgtggagaa gatcctgcag	1800
[0041]	taccgggagc tcaccaagct gaagagcacc tacattgacc cttgcccga cctcatccac	1860

[0042]	cccaggacgg gccgcctcca caccgccttc aaccagacgg ccacggccac gggcaggcta	1920
[0043]	agtagctccg gccccaacct ccagaacatc cccgtccgca ccccgttgg gcagaggatc	1980
[0044]	cgccgggect tcatcgccga ggaggggtgg ctattggtgg tgctggacta tagccagata	2040
[0045]	gagctcaggg tgctggccca cctctccggc gacgagaacc tgatccgggt cttccaggag	2100
[0046]	ggcggggaca tccacacgga gaccgccagc tggatgttcg gcgtccccg ggaggccgtg	2160
[0047]	gacccctga tgcgccggc ggccaagacc atcaacttcg gggtcctcta cggcatgtcg	2220
[0048]	gcccaccgcc tctcccagga gctagccatc ctttacgagg aggccaggc cttcattgag	2280
[0049]	cgctactttc agagcttccc caaggtgcgg gcctggattg agaagaccct ggaggagggc	2340
[0050]	aggaggcggg ggtacgtgga gaccctcttc ggccgccgc gctacgtgcc agacctagag	2400
[0051]	ggccgggtga agagcgtgcg ggaggcggcc gagcgcgcg cttcaacat gccctccag	2460
[0052]	ggcaccgcc cgcacctcat gaagctggct atggatgaagc tcttccccag gctggaggaa	2520
[0053]	atgggggcca ggatgctcct tcaggtccac gacgagctgg tctcagagc cccaaaagag	2580
[0054]	aggcgaggag ccgtggcccg gctggccaag gaggtcatgg agggggtgta tcccctggcc	2640
[0055]	gtgcccttg aggtggaggt ggggataggg gaggactgac tctccgcaa ggagtga	2697
[0056]	<210> 2	
[0057]	<211> 2694	
[0058]	<212> DNA	
[0059]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0060]	<400> 2	
[0061]	gcaaccgtaa agttcaagta caaaggcgaa gaaaaagagg tagacatctc caagatcaag	60
[0062]	aaagtatggc gtgtgggcaa gatgatctcc ttcacctacg acgagggcgg tggcaagacc	120
[0063]	ggccgtggtg cgtaagcga aaaggacgcg ccgaaggagc tgctgcagat gctggagaag	180
[0064]	cagaaaaagt gaatgaattc ggggatgctg cccctctttg agcccaaggg ccgggtcctc	240
[0065]	ctggtggacg gccaccacct ggcctaccgc accttcacg ccctgaaggg cctcaccacc	300
[0066]	agccgggggg agccggtgca ggcggtctac ggcttcgcca agagcctcct caaggcctc	360
[0067]	aaggaggacg gggacgcggt gatcgtggtc tttgacgcca aggccccctc cttccgccac	420
[0068]	gaggcctacg ggggtataca ggcgggcccg gccccacgc cggaggactt tccccgcaa	480
[0069]	ctcgcctca tcaaggagct ggtggacctc ctggggctgg cgcgcctcga ggtcccgggc	540
[0070]	tacgagggcg acgacgtcct ggccagcctg gccaaagagg cggaaaagga gggctacgag	600
[0071]	gtccgcatcc tcaccgccga caaagacctt taccagctcc tttccgaccg catccacgtc	660
[0072]	ctccaccccg aggggtacct catcaccocg gcctggcttt gggaaaagta cggcctgagg	720
[0073]	cccaccagtg gggccgacta ccgggccctg accggggacg agtccgacaa ccttcccggg	780
[0074]	gtcaagggca tcggggagaa gacggcgagg aagcttctgg aggagtgggg gagcctggaa	840
[0075]	gccctcctca agaacctgga ccggctgaag cccgccatcc gggagaagat cctggcccc	900
[0076]	atggacgatc tgaagctctc ctgggacctg gccaaaggtc gcaccgacct gccctggag	960
[0077]	gtggacttcg caaaaggcgg ggagcccac cgggagaggc ttagggcctt tctggagagg	1020
[0078]	cttgagtttg gcagcctcct ccacgagttc ggccttctgg aaagccccaa ggccctggag	1080
[0079]	gaggccccct ggccccgcc ggaaggggcc ttcgtgggct ttgtgcttcc ccgcaagaag	1140
[0080]	cccatgtggg ccgatcttct ggccctggcc gccgccaggg ggggccgggt ccaccgggc	1200
[0081]	cccagcctt ataaagcct cagggacctg aaggaggcgc gggggcttct cgccaaagac	1260
[0082]	ctgagcgttc tggccctgag ggaaggcctt ggcctcccgc ccggcgacga ccccatgctc	1320
[0083]	ctcgcctacc tcttgaccc ttccaacacc acccccgtgg gggtgcccc gcgctacggc	1380

[0084]	ggggagtgga cggaggaggc gggggagcgg gccgcccttt ccgagaggct cttcgccaac	1440
[0085]	ctgtggggga ggcttgaggg ggaggagagg ctcctttggc tttaccggga ggtggagagg	1500
[0086]	cccccttcg ctgtcctggc ccacatggag gccacggggg tgcgcctgga cgtggcctat	1560
[0087]	ctcaggcct tgteccctgga ggtggccgag gagatcgccc gcctcgaggc cgaggtcttc	1620
[0088]	cgcttgccg gccaccctt caacctcaac tcccgggacc agctggaaag ggtcctcttt	1680
[0089]	gacgagctag ggcttcccgc catcggcaag acgaagaaga ccggcaagcg ctccaccagc	1740
[0090]	gccgccgtcc tggagccct ccgcgaggcc caccctatcg tggagaagat cctgcagtac	1800
[0091]	cgggagctca ccaagctgaa gacacctac attgaccct tgcggacct catccacccc	1860
[0092]	aggacgggcc gcctccacac ccgcttcaac cagacggcca cggccacggg caggctaagt	1920
[0093]	agctccggcc ccaacctca gaacatcccc gtccgcaccc cgcttgggca gaggatccgc	1980
[0094]	cgggccttca tcgccgagga ggggtggcta ttggtggtgc tggactatag ccagatagag	2040
[0095]	ctcagggtgc tggcccacct ctccggcgac gagaacctga tccgggtctt ccaggagggg	2100
[0096]	cgggacatcc acacggagac cgccagctgg atgttcggcg tccccggga ggccgtggac	2160
[0097]	cccctgatgc gccggcgcc caagaccatc aacttcgggg tcctctacgg catgtcggcc	2220
[0098]	caccgcctct ccaggagct agccatcct tacgaggagg ccaggcctt cattgagcgc	2280
[0099]	tactttcaga gcttcccaa ggtgcgggcc tggattgaga agacctgga ggagggcagg	2340
[0100]	aggcgggggt acgtggagac cctcttcggc cgccgccgt acgtgccaga cctagaggcc	2400
[0101]	cgggtgaaga gcgtgcggga ggccggccgag cgccgcgcct tcaacatgcc cgtccaggcc	2460
[0102]	accgcccg acctcatgaa gctggctatg gtgaagctct tcccaggct ggaggaaatg	2520
[0103]	ggggccagga tgctcttca ggtccacgac gagctggtcc tcgaggcccc aaaagagagg	2580
[0104]	gcggagccg tggcccggct ggccaaggag gtcattgagg ggggtgtatcc cctggccgtg	2640
[0105]	cccctggagg tggaggtggg gataggggag gactggctct ccgccaagga gtga	2694
[0106]	<210> 3	
[0107]	<211> 2502	
[0108]	<212> DNA	
[0109]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0110]	<400> 3	
[0111]	atgaattcgg ggatgtgcc cctctttgag cccaagggcc ggtcctcct ggtggacggc	60
[0112]	caccacctgg cctaccgac ctccacgcc ctgaagggcc tcaccaccag ccggggggag	120
[0113]	ccggtgcagg cggctacgg ctccgccaag agcctcctca aggcctcaa ggaggacggg	180
[0114]	gacgcggtga tcgtgtctt tgacgccaag gccctcctt tccgccacga ggcctacggg	240
[0115]	gggtacaagg cgggccggc cccacgccg gaggacttc cccggcaact cgccctcatc	300
[0116]	aaggagctgg tggacctcct ggggctggcg cgcctcgagg tcccgggcta cgaggcggac	360
[0117]	gacgtcctgg ccagcctggc caagaaggcg gaaaaggagg gctacgaggt ccgcatctc	420
[0118]	accgccgaca aagaccttta ccagctcct tccgaccgca tccacgtcct ccaccccag	480
[0119]	gggtacctca tcacccggc ctggctttgg gaaaagtac gcctgaggcc cgaccagtgg	540
[0120]	gccgactacc gggcctgac cggggacgag tccgacaacc ttcccgggt caaggcctc	600
[0121]	ggggagaaga cggcgaggaa gcttctggag gactggggga gcctggaagc cctcctcaag	660
[0122]	aacctggacc ggctgaagc cgccatccg gagaagatcc tggcccacat ggacgatctg	720
[0123]	aagctcctt gggacctggc caaggtgcg accgacctgc ccctggaggt ggacttcgcc	780
[0124]	aaaaggcggg agcccgacc ggagaggctt agggccttc tggagaggct tgagtttggc	840
[0125]	agcctcctcc acgagttcgg ccttctggaa agccccagg ccctggagga ggccccctgg	900

[0126]	ccccgccgg aagggcctt cgtgggcttt gtgctttccc gcaagaagcc catgtgggcc	960
[0127]	gatcttctgg ccctggccgc cgccaggggg ggccgggtcc accgggcccc cgagccttat	1020
[0128]	aaagccctca gggacctgaa ggagggcggg gggcttctcg ccaaagacct gagcgttctg	1080
[0129]	gccctgaggg aaggccttgg cctcccggcc ggcgacgacc ccatgctcct cgcctacctc	1140
[0130]	ctggaccctt ccaacaccac ccccgtgggg gtggcccggc gctacggcgg ggagtggacg	1200
[0131]	gaggagcggg gggagcgggc cgccctttcc gagaggctct tcgccaacct gtgggggagg	1260
[0132]	cttgaggggg aggagaggct cttttggctt taccgggagg tggagaggcc cttttccgct	1320
[0133]	gtcctggccc acatggaggc cacgggggtg cgcctggacg tggcctatct cagggccttg	1380
[0134]	tcctggaggg tggccgagga gatcgcccgc ctcgaggccg aggtcttccg cctggccggc	1440
[0135]	cacccttca acctcaactc ccgggaccag ctggaaaggg tcctctttga cgagctaggg	1500
[0136]	cttcccgcc tggcaagac gaagaagacc ggcaagcgt ccaccagcgc cgccgtcctg	1560
[0137]	gaggccctcc gcgagccca ccccatcgtg gagaagatcc tgcagtaccg ggagctcacc	1620
[0138]	aagctgaaga gcacctacat tgacccttg ccggacctca tccaccccag gacgggccgc	1680
[0139]	ctccacacc gttcaacca gacggccacg gccacgggca ggctaagtag ctccggcccc	1740
[0140]	aacctccaga acatcccctg ccgcaccccg cttgggcaga ggatccgccg ggccttcatc	1800
[0141]	gccgaggagg ggtggtatt ggtggtctg gactatagcc agatagagct caggggtgctg	1860
[0142]	gcccacctct ccggcgacga gaacctgatc cgggtcttcc aggagggcg ggacatccac	1920
[0143]	acggagaccg ccagctggat gttcggcgtc ccccgggagg ccgtggacc cctgatgcgc	1980
[0144]	cgggcggcca agaccatcaa cttcggggtc ctctacggca tgtcggccca ccgcctctcc	2040
[0145]	caggagctag ccatccctta cgaggaggcc caggccttca ttgagcgtta ctttcagagc	2100
[0146]	ttcccaagg tgcgggctg gattgagaag accctggagg agggcaggag gcgggggtac	2160
[0147]	gtggagacc tcttcggccg ccgccgtac gtgccagacc tagaggccc ggtgaagagc	2220
[0148]	gtgcgggagg cggccgagcg ccgcgccttc aacatgccg tccagggcac cgccgccgac	2280
[0149]	ctcatgaagc tggctatggt gaagctctc cccaggctgg aggaaatggg ggccaggatg	2340
[0150]	ctcttcagg tccacgacga gctggtctc gaggccccaa aagagaggc ggaggccgtg	2400
[0151]	gcccggctgg ccaaggaggt catggagggg gtgtatcccc tggccgtgcc cctggaggtg	2460
[0152]	gagtgggga taggggagga ctggctctcc gccaggagt ga	2502
[0153]	<210> 4	
[0154]	<211> 2727	
[0155]	<212> DNA	
[0156]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0157]	<400> 4	
[0158]	taagaaggag atataccatg gatgatggga gaattaccaa ttgccccagt tgacagactt	60
[0159]	ataagaaagg ctggtgctca gagagttagc gagcaagcag ctaaggtact tgcagagcac	120
[0160]	cttgaggaaa aagctattga gatcgcaaaa aaggcagtag atcttgcaaa gcacgcaggt	180
[0161]	agaaagaccg ttaagtgca agacattaag ctcgcaatta agagcatgaa ttcggggatg	240
[0162]	ctgccctct ttgagccca gggccgggtc ctctggtgg acggccacca cctggcctac	300
[0163]	cgcaccttc acgcctgaa gggcctcacc accagccggg gggagccggt gcaggcggtc	360
[0164]	tacggtctcg ccaagagcct cctcaaggcc ctcaaggagg acggggacgc ggtgatcgtg	420
[0165]	gtctttgacg ccaaggcccc ctcttccgc cacgaggcct acggggggta caaggcgggc	480
[0166]	cgggccccca cgccggagga ctttcccgg caactcggc tcatcaagga gctggtggac	540
[0167]	ctcctggggc tggcgcgct cgaggtccc ggctacgagg cggacgacgt cctggccage	600

[0168]	ctggccaaga aggcggaaaa ggagggctac gaggtccgca tcctcaccgc cgacaaagac	660
[0169]	ctttaccagc tcctttccga ccgcatccac gtcctccacc ccgaggggta cctcatcacc	720
[0170]	ccggcctggc tttgggaaaa gtacggcctg aggccccgacc agtgggcccga ctaccgggcc	780
[0171]	ctgaccgggg acgagtccga caacctccc ggggtcaagg gcatcgggga gaagacggcg	840
[0172]	aggaagcttc tggaggagtg ggggagcctg gaagccctcc tcaagaacct ggaccggctg	900
[0173]	aagcccgcca tccgggagaa gatcctggcc cacatggacg atctgaagct ctctgggac	960
[0174]	ctggccaagg tgcgaccga cctgccctg gaggtggact tcgcaaaaag gcgggagccc	1020
[0175]	gaccgggaga ggcttagggc ctttctggag aggcttgagt ttggcagcct cctccacgag	1080
[0176]	ttcggccttc tgaaaagccc caaggccctg gaggaggccc cctggcccc gccggaagg	1140
[0177]	gccttcgtgg gctttgtgct ttcccgaag aagccccatgt gggccgatct tctggccctg	1200
[0178]	gccccgcca gggggggccg ggtccaccg gcccccagc cttataaagc cctcagggac	1260
[0179]	ctgaaggagg cgcgggggct tctcgccaaa gacctgagcg ttctggccct gagggaaggc	1320
[0180]	cttggcctcc cgcccggga cgaccccatg ctctctgect acctctgga cccttccaac	1380
[0181]	accacccccg tgggggtggc ccggcgctac ggcggggagt ggacggagga ggcgggggag	1440
[0182]	cggccgccc tttccgagag gctcttcgcc aacctgtggg ggaggcttga gggggaggag	1500
[0183]	aggtccttt ggctttaccg ggaggtggag aggccccitt ccgctgtcct ggcccacatg	1560
[0184]	gaggccacgg ggggtgcct ggacgtggcc tatctcaggg cttgtccct ggaggtggcc	1620
[0185]	gaggagatcg cccgcctga ggccgagtc ttccgctgg ccggccacc cttcaacctc	1680
[0186]	aactcccggg accagctgga aagggtctc tttgacgagc tagggcttc cgccatcggc	1740
[0187]	aagacgaaga agaccggcaa gcgctccacc agcgccgccc tcctggaggc cctccgcgag	1800
[0188]	gcccaccca tcgtggagaa gatcctgcag taccgggagc tcaccaagct gaagagcacc	1860
[0189]	tacattgacc cttgcccga cctcatccac cccaggacgg gccgcctcca caccgcttc	1920
[0190]	aaccagacgg ccacggccac gggcaggcta agtagctccg gcccacact ccagaacatc	1980
[0191]	cccgtccga ccccgcttg gcagaggatc cgccgggctc tcctcggca ggaggggtgg	2040
[0192]	ctattgggtg tgctggacta tagccagata gagctcaggg tgctggccca cctctccggc	2100
[0193]	gacgagaacc tgatccgggt cttccaggag gggcgggaca tccacacgga gaccgccagc	2160
[0194]	tggatgttcg gcgtccccg ggaggccgtg gacccctga tgcgccggc ggccaagacc	2220
[0195]	atcaacttcg ggtctctta cggcatgtc gccaccgcc tctcccagga gctagccatc	2280
[0196]	ccttacgagg aggcccaggc cttcattgag cgctacttc agagcttccc caaggtgcgg	2340
[0197]	gcctggattg agaagacct ggaggaggc aggaggcggg ggtacgtgga gaccctcttc	2400
[0198]	ggcccgccc gctacgtgc agacctagag gcccggtga agagcgtgc ggaggcggcc	2460
[0199]	gagcgcgcg cttcaacat gcccgccag ggcaccgccc ccgacctcat gaagctggct	2520
[0200]	atggtgaagc tcttcccag gctggaggaa atgggggcca ggatgctcct tcaggctccac	2580
[0201]	gacgagctgg tctcagagc cccaaaagag agggcgagg ccgtggcccc gctggccaag	2640
[0202]	gaggtcatgg aggggtgta tcccctggc gtgccctgg aggtggaggt ggggatagg	2700
[0203]	gaggactggc tctccgcaa ggagtga	2727



图1