



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109112149 A

(43)申请公布日 2019.01.01

(21)申请号 201810147454.X

(22)申请日 2018.02.12

(71)申请人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

(72)发明人 张献龙 朱龙付 胡琴 李南南

(74)专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 张红兵

(51)Int.Cl.

C12N 15/54(2006.01)

C12N 9/12(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

序列表5页 附图4页

(54)发明名称

调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因及应用

(57)摘要

本发明属于植物基因工程技术领域,具体涉及调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因及应用。本发明通过对陆地棉中接种黄萎病菌后,利用不同时间点RAN-Seq数据进行分析,筛选得到一种受黄萎病诱导表达的依赖钙离子的蛋白激酶GhCPK33基因,该基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示;该基因编码的蛋白质序列如SEQ ID NO:2所示。通过VIGS体系,在棉花中沉默相应的基因,接种黄萎病菌,快速鉴定该基因在棉花黄萎病抗性中的功能。本发明分离的基因对棉花黄萎病的抗性中起负调控作用,沉默该基因,能够显著提高棉花对黄萎病菌的抗性。

1. 一种调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

2. 一种调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因,该基因编码的蛋白质序列如SEQ ID NO:2所示。

3. 如权利要求1所述的一种钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因在调控棉花黄萎病抗性中的应用。

4. 如权利要求2所述的一种钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因编码序列在调控棉花黄萎病抗性中的应用。

5. 一种抑制表达载体TRV:GhCPK33,其特征在于:含有权利要求1或2所述的基因。

6. 根据权利要求5所述的抑制表达载体,其特征在于:所述表达载体为病毒介导的基因沉默载体,通过转基因的方法获得基因沉默的植株。

7. 一种快速鉴定植物基因功能的方法,其特征在于:将权利要求5所述的抑制表达载体导入宿主细胞,并快速地使目标基因沉默。

## 调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程领域,具体涉及调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因及应用。

### 背景技术

[0002] 棉花是我国重要的经济作物,而黄萎病素有棉花“癌症”之称,严重危害棉花的产量和纤维品质。近些年,黄萎病连年发生,对我国棉花生产常年造成减产10-20%,部分地区发病严重时高达70%,已成为制约我国棉花高产稳产的主要障碍之一。棉花黄萎病是由大丽轮枝菌引起的土传性维管束病害,目前,还没有专一针对性的特效化学药剂,生物防治费用高,且效果不理想,因此,选育抗病品种是防治该病的主要途径(王升正等,抗黄萎病新品系中植棉KV-3抗性遗传特性研究.棉花学报,2010,22(5):501~504)。研究表明陆地棉对黄萎病的抗性基本表现为感病或耐病,其携带有的抗病位点也多是微效多基因位点,且受环境影响大,难以进行聚合,因此生产上还没有高抗棉花黄萎病的品种大面积推广应用。

[0003]  $Ca^{2+}$ 作为第二信使,在植物感知病原菌后激活相应的抗病响应中扮演着重要的角色。研究表明,在黄萎病菌侵入寄主的过程中,植物体内最先发生的生理变化就包括胞内 $Ca^{2+}$ 浓度的快速积累。经典的植物先天免疫模型(病原菌相关分子模式诱发的免疫(PTI)和效应子诱发的免疫(ETI))都通过调节胞内的 $Ca^{2+}$ 浓度,来激活下游的免疫反应以抵抗病原菌的入侵。目前认为,PTI反应会导致植物胞内 $Ca^{2+}$ 浓度瞬时而快速的积累,ETI则是诱导胞内相对持续而稳定的钙离子浓度升高。植物体内主要有钙调素(CaMs)、钙调素类蛋白(CMLs),钙调磷酸酶(CBLs)以及钙依赖蛋白激酶(CPKs)四种 $Ca^{2+}$ 传感器蛋白( $Ca^{2+}$ -binding sensory proteins),其中钙依赖型蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase,CPKs)的研究相对较多。钙依赖型蛋白激酶的结构可分为四部分:N端的可变区,丝氨酸/苏氨酸的蛋白激酶区,自抑制区以及钙调素类似区。在没有 $Ca^{2+}$ 存在的条件下,位于激酶区和钙调素相似区之间的自抑制区结合到激酶区的活性位点上,抑制激酶的活性。而 $Ca^{2+}$ 结合可以导致钙调素相似区构像发生变化,从而使自抑制区从激酶区的活性位点上释放而使激酶活化(吴峻岩,王茂广,吴能表等.植物中的CDPK/SnRK蛋白激酶家族.激光生物学报,2004,13(4):265-269)。

[0004] 近年来钙依赖型蛋白激酶的功能不断被挖掘,研究表明CPKs不仅参与植物的生长发育的调控还参与到植物对生物和非生物逆境的响应(Kawamoto N,Sasabe M,Endo M,et al.Calcium-dependent protein kinases responsible for the phosphorylation of a bZIP transcription factor FD crucial for the florigen complex formation.Scientific reports,2015,5:8341;Munemasa S,Hossain M A,Nakamura Y,et al.The Arabidopsis calcium-dependent protein kinase,CPK6,functions as a positive regulator of methyl jasmonate signaling in guard cells.Plant physiology,2011,155(1):553-61;Wei S,Hu W,Deng X,et al.A rice calcium-

dependent protein kinase OsCPK9 positively regulates drought stress tolerance and spikelet fertility. *BMC plant biology*, 2014, 14(1):133; Fedorowicz-Stronska O, Koczyk G, Kaczmarek M, et al. Genome-wide identification, characterisation and expression profiles of calcium-dependent protein kinase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of applied genetics*, 2017, 58(1):11-22)。Mari'a Coca 等发现 AtCPK1 基因参与拟南芥对病原菌的抗性反应, 真菌的激发子能诱导 AtCPK1 的迅速表达, 与野生型相比, AtCPK1 的突变体拟南芥对病原菌更加敏感, 超表达 AtCPK1 后, 转基因拟南芥积累大量的水杨酸, 水杨酸介导的抗病信号路径持续性激活, 表现出病原菌抗性增强 (Coca M, San Segundo B. AtCPK1 calcium-dependent protein kinase mediates pathogen resistance in Arabidopsis. *Plant journal*, 2010, 63(3):526-40)。水稻 OsCPK10 基因受稻瘟菌诱导表达, 与野生型相比, 超表达 OsCPK10 的水稻植株表现为对稻瘟菌抗性增强; 异源转化拟南芥表现出对丁香假单胞菌的抗性增强 (Fu L, Yu X, An C. Overexpression of constitutively active OsCPK10 increases Arabidopsis resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato and rice resistance against *Magnaporthe grisea*. *Plant physiology and biochemistry*, 2013, 73:202-210)。以上结果表明, 钙依赖型蛋白激酶参与了植物对病原菌的抗性反应中并起到了关键的调控作用。

[0005] 病毒诱导的基因沉默 (Virus-induced gene silencing, VIGS) 技术近年来发展迅速, 其优势在于操作简单, 且可以同时操作多个基因, 越来越多的研究者利用该体系来快速鉴定基因的功能。本发明提出之前, 申请人通过对陆地棉 YZ1 接种黄萎病 (*Verticillium dahliae*) V991 后不同时间点 RAN-Seq 数据进行分析, 筛选到了一系列受黄萎病诱导表达的依赖钙离子的蛋白激酶。通过 VIGS 体系鉴定得到 GhCPK33 基因, 发现该 GhCPK33 基因在棉花对黄萎病的抗性中起到负调控的作用, 沉默该基因, 能够显著提高棉花对黄萎病菌的抗性。结果表明: 与对照相比, VIGS 沉默该基因的植株更加抗病, 茉莉酸含量积累, 茉莉酸信号路径持续性激活, 这为培育具有黄萎病菌抗性的棉花新品种具有重要的意义。

## 发明内容

[0006] 本发明的目的是在于提供一个棉花钙离子依赖的蛋白激酶基因 GhCPK33, 该基因从棉花接种黄萎病菌 V991 的 RNA-Seq 数据中筛选鉴定并克隆, 蛋白激酶基因 GhCPK33 具有如 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列, 或至少 50% 同源性的序列, 以及上述 DNA 片段编码的蛋白或经过改造修饰的具有相同功能的蛋白。

[0007] 本发明的另一个目的是在于提供了一个棉花钙离子依赖的蛋白激酶基因 GhCPK33 在参与棉花抗黄萎病的应用, 通过 GhCPK33 基因, SEQ ID NO:1 或与其功能等同的同源基因在棉花植株中抑制表达, 一种分离的蛋白质, 其具有 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列至少 50% 同源性的序列, 来达到调控棉花对黄萎病抗性的目的, 从而应用于棉花抗黄萎病品系的培育, 同时可作为黄萎病抗性棉花的标记基因。

[0008] 本发明通过对陆地棉 YZ1 接种黄萎病 (*Verticillium dahliae*) V991 后不同时间点 RAN-Seq 数据进行分析, 筛选得到一系列受黄萎病诱导表达的依赖钙离子的蛋白激酶。通过 VIGS 体系, 在棉花中沉默相应的基因, 并接种黄萎病菌, 快速鉴定其在棉花黄萎病抗性中的功能。其中, 鉴定到的 GhCPK33 基因, 在棉花对黄萎病的抗性中起到负调控的作用, 即沉默该

基因,能够显著提高棉花对黄萎病菌的抗性。本发明还涉及含有该基因或者其同源基因片段的载体和设计该基因或其功能类似物增强植物对黄萎病抗性在农业生产中的应用。

[0009] 本发明的技术方案如下:

[0010] 申请人克隆得到一种调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0011] 上述调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因编码的蛋白质序列如SEQ ID NO:2所示。

[0012] 本发明的钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因可在调控棉花黄萎病抗性中的应用。

[0013] 本发明的一种钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因编码序列在调控棉花黄萎病抗性中的应用。

[0014] 申请人制备了一种抑制表达载体TRV:GhCPK33,所述的载体含有权利要求1或2所述的其中之一的核苷酸片段。

[0015] 所述的表达载体为病毒介导的基因沉默载体,通过转基因的方法获得基因沉默的植株。

[0016] 本发明提供了一种快速鉴定基因功能的方法,所述的方法为将上述抑制表达载体导入宿主细胞,快速地将目标基因沉默。

[0017] 更详细的技术方案如下所述。

[0018] 申请人的前期工作是对陆地棉YZ1接种黄萎病(*Verticillium dahliae*) V991后不同时间点RAN-Seq数据进行分析,筛选到了一系列受黄萎病诱导表达的钙离子依赖型的蛋白激酶。通过VIGS体系,在棉花中沉默相应的基因,并接种黄萎病菌,快速鉴定其在棉花黄萎病抗性中的功能。其中,鉴定到的GhCPK33基因能够负调控棉花对黄萎病的抗性,即沉默该基因,能够显著提高棉花对黄萎病菌的抗性。选取其他有代表性植物进行进化树分析和生物信息学分析,结果表明该序列与亚洲棉(*Gossypium arboretum*)和雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)中的GhCPK33最为同源(见图1)。从陆地棉‘YZ1’中提取叶片RNA(Deng F, Tu L, Tan J, et al. *GbPDF1 is involved in cotton fiber initiation via the core cis-element HDZIP2ATATHB2*. *Plant Physiol*, 2012, 158: 890-904),利用反转录酶Superscript III(购自Invitrogen公司,美国)将其反转录合成cDNA,反应条件为:65°C 5min, 50°C 60min, 70°C 10min。利用陆地棉TM-1的基因组信息,合成扩增引物GhCPK33-F(5' ATGGGTCTTGCCTGACGAAAAGC 3')和GhCPK33-R(5' CTAAGAGATTGTGTGTGTTGGG 3')扩增出GhCPK33基因的cDNA全长(1614bp)。PCR反应条件为:94°C 预变性3min; 94°C 30sec, 59°C 30sec, 72°C 1min 50sec, 32个循环; 72°C 延伸7min。将扩增获得的PCR产物连入pGEM-T载体(购自Promega公司,美国),筛选阳性克隆并测序,获得所需的基因ORF,一种分离的基因的ORF,其序列为SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列。通过BlastX(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)确定ORF所对应的537个氨基酸的蛋白质序列是与GrCPK33蛋白同源的。一种分离的蛋白质,其序列为与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0019] 根据GhCPK33的ORF设计引物,并在引物两端分别加上BamHI和KpnI酶切位点的in fusion重组序列,分别将该引物命名为VGhCPK33-F(5' AGAAGGCCTCCATGGGATCCGCCTGACGAAAAGCAAAGACTC3')和VGhCPK33-R(5' GAGACGCGTGAGCTCGGTACCAGGCTGTCCACTCAAATGCTG 3'),以GhCPK33基因的cDNA为模板进行

PCR扩增,得到的PCR产物在400bp左右,通过infusion重组反应构建到pTRV2上,具体方法参考文献(Gao X,Wheeler T,Li Z,Kenerley CM,He P,Shan L.Silencing GhNDR1 and GhMKK2 compromises cotton resistance to *Verticillium wilt*.Plant journal.2011,66:293-305),从而获得VIGS的载体。

[0020] 利用引物RT-GhCPK33-F (5' TCCACCACATCCCTGAAAAACC3') 和RT-GhCPK33-R (5' AAATGGAGGCACCACTGAGT3') 对其进行组织表达模式分析(图2),结果表明该基因在棉花的各个组织中均有表达。进一步地,利用引物qGhCPK33-F (5' TCCACCACATCCCTGAAAAACC3') 和qGhCPK33-R (5' CAATACAAAGATAAGTCACAC3') 对其进行诱导表达模式分析,得到如图3所述的结果。利用病原菌诱导表达模式表明,GhCPK33基因受到黄萎病菌诱导上调表达(见图3;病原菌诱导表达模式表明GhCPK33受水杨酸抑制表达,受茉莉酸诱导上调表达,对过氧化氢没有明显响应(见图3中的B图至-D图)。

[0021] 利用农杆菌介导的植物转化,用注射法将构建好的VIGS载体(目标基因菌株为TRV:CPK33,对照菌株为TRV:00,以及沉默效应指示菌株为TRV:CLA1,(图4)导入到陆地棉YZ1的子叶中,注射VIGS载体两周后,检测GhCPK33的表达量,确认VIGS效应已经产生(图5)。采用伤根接菌的方法,接种黄萎病菌V991孢子液(浓度约为 $10^5$ /ml)。一般接种7d后开始发病,并在发病后统计病情指数,具体方法参考马平等的棉花黄萎病抗性鉴定方法(马平等,一种新的棉花黄萎病快速接种技术及其在病原菌致病力和寄主抗病性鉴定上的应用,植物病理学报,2004,34(6):536-541)。病指统计结果表明TRV:GhCPK33的植株抗性明显高于对照(图6),茉莉酸合成及下游响应相关基因在TRV:GhCPK33的植株明显上调表达(图7)。此外,申请人对TRV:00和TRV:GhCPK33的植株也进行了灰霉菌(*Botrytis cinerea*)抗性的鉴定。结果显示,与对照相比,TRV:GhCPK33的植株表现出对灰霉菌的抗性显著增强,其病斑扩展面积均显著减小(图8)。说明GhCPK33负调控棉花对黄萎病菌和灰霉菌的抗性反应。对TRV:00和TRV:GhCPK33根和叶片分别提取激素,激素含量显示,TRV:GhCPK33植株中茉莉酸和茉莉酸异亮氨酸含量显著高于对照(图8),说明该基因负调控茉莉酸的合成,即抑制该基因的表达能够促进植物体内茉莉酸及其衍生物含量的积累。因此GhCPK33可能是通过调控茉莉酸的合成来调控棉花对黄萎病菌以及灰霉菌的抗性,该基因的应用对于培育棉花抗病品系具有重要的意义。

[0022] 本发明的优点:

[0023] (1) 本发明通过对陆地棉YZ1接种黄萎病(*Verticillium dahliae*) V991后不同时间点RNA-Seq数据进行分析,结合VIGS技术,筛选克隆并鉴定了GhCPK33基因是棉花抗黄萎病的负调控因子。GhCPK33主要通过调控茉莉酸的合成来调节棉花对黄萎病菌的抗性。利用CRISPR/Cas9系统(Wang P C,Zhang J,Sun L,et al.High efficient multi-sites genome editing in allotetraploid cotton(*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system.Plant Biotechnology Journal,2017,16(1):137-150),可通过遗传转化敲除该基因可以获得抗黄萎病的棉花新品系,也可以作为棉花抗性材料的标志基因。

[0024] (2) 虽然在拟南芥中已经克隆了多个CPKs基因,并对其进行了功能验证,但目前在棉花中对CPKs的研究报道还很少,也很少有文献支撑棉花中CPKs能够参与到植物的免疫反应中,本发明克隆的GhCPK33基因丰富了棉花中对这类基因的研究。

[0025] (3) 抑制GhCPK33表达的棉花显著增强了棉花对于黄萎病、灰霉病的抗性。说明

GhCPK33基因参与到了植物对黄萎病菌的抗性响应中,并扮演着重要的角色。通过调控GhCPK33基因的表达能够调节植物体内抗性因子的积累,从而提高植物对黄萎病菌的抗性。

[0026] (4) 利用VIGS载体抑制GhCPK33基因表达的植株中的茉莉酸合成显著增加,并伴随着茉莉酸介导的抗病信号路径的激活,说明抑制GhCPK33表达的植株对黄萎病菌和灰霉病菌表现出抗性增强主要依赖于茉莉酸路径。

[0027] (5) 选育抗黄萎病的棉花材料一直为棉花育种家所重视,GhCPK33的发现和利用将有助于解决生产上棉花抗黄萎病育种资源的稀缺。由于目前生产上黄萎病造成的棉花产量损失巨大,使得选育抗病品种显得尤为重要,应用GhCPK33基因将有助于培育高抗黄萎病的棉花新品种。

## 附图说明

[0028] 图1:GhCPK33基因进化树分析图。选取其他有代表性植物进行进化树分析和生物信息学分析,结果表明该序列与雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*) GhCPK33最为同源,与拟南芥CPK蛋白家族中的CPK33同源性最高,申请人将这个基因命名为GhCPK33基因。

[0029] 图2:GhCPK33基因在棉花各个组织中的表达模式分析。GhCPK33在棉花各个组织中均有表达。附图标记说明:图2中的各组织依次为:根(root);茎(stem);叶片(leaf);花瓣(flower);花药(anther);开花后5天的胚珠(5d ovule)。GhUB7为内参基因。

[0030] 图3:GhCPK33基因诱导表达模式分析。图3中的A图为GhCPK33基因在接种黄萎病菌6h、12h、24h后,与对照相比,受到明显的诱导表达。图3中的图GhCPK33基因受茉莉酸处理诱导上调表达。图3中的C图是GhCPK33基因受水杨酸处理下调表达。图3中的DGhCPK33基因对过氧化氢处理没有响应。

[0031] 图4:VIGS载体构建示意图。附图标记说明:LB,T-DNA左边界;35S,花椰菜病毒35S启动子;Cp,衣壳蛋白;RdRP,RNA依赖型RNA聚合酶;Mp,转运蛋白;16K,16-kD富含半胱氨酸蛋白;MCS,多克隆位点;T,终止子;RB,T-DNA右边界。

[0032] 图5VIGS两周后GhCPK33表达量检测。附图标记说明:在VIGS后两周后,选用幼嫩叶片和根系为材料,提取RNA,检测目标基因的表达量。GhUB7为内参基因。

[0033] 图6:TRV:GhCPK33植株对黄萎病的抗性鉴定。附图标记说明:确定GhCPK33成功沉默后,接种黄萎病菌V991,TRV:GhCPK33的植株发病程度明显低于对照(TRV:00),说明抑制GhCPK33的表达后,植株对黄萎病菌的抗性增强。附图标记说明:病指统计结果与表型观察相符。

[0034] 图7:TRV:GhCPK33植株对灰霉菌的抗性鉴定。确认目标基因GhCPK33成功沉默后,选取对照植株和TRV:GhCPK33植株相同位置的叶片接种灰霉菌。结果显示:TRV:GhCPK33的菌丝扩展面积明显小于对照,说明抑制GhCPK33表达后,植株对灰霉菌的抗性增强。

[0035] 图8:TRV:00和TRV:GhCPK33植株中茉莉酸合成及下游响应路径上标志基因的表达分析。利用图5的材料为模板,检测茉莉酸合成及下游响应路径的关键基因,结果显示:抑制GhCPK33表达后,茉莉酸合成及下游响应路径中的关键基因均被激活,说明GhCPK33可以参与调控JA的合成。

[0036] 图9:TRV:00和TRV:GhCPK33植株中茉莉酸含量的检测。分别选用TRV:00和TRV:GhCPK33的相同部位的叶片和根系作为材料,提取植物激素,测量结果表明,抑制GhCPK33表

达后,叶片和根系中的茉莉酸和茉莉酸异亮氨酸的含量均显著提高,推测GhCPK33基因是负调控棉花体内茉莉酸的生物合成。

### 具体实施方式

[0037] 以下实施例定义了本发明,并描述了本发明在分离克隆包含有GhCPK33基因完整编码区段的DNA片段,以及验证GhCPK33基因功能的方法。根据以下的描述和这些实施例,本领域技术人员可以确定本发明的基本特征,并且在不偏离本发明精神和范围的情况下,可以对本发明做出各种改变和修改,以使其适用不同的用途和条件。

[0038] 实施例1:GhCPK33基因的分离克隆

[0039] 1、基因序列获得

[0040] 本申请人前期工作是通过分析陆地棉YZ1(品种来自中国农业科学院棉花研究所)接种黄萎病菌V991后的表达谱数据出发,结合VIGS方法,鉴定到了一个负调控棉花黄萎病抗性的基因。在NCBI数据库中进行序列比对,发现该基因与亚洲棉(*Gossypium arboretum*)和雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*)中的GhCPK33基因同源性高,因此将所分离的基因命名为GhCPK33基因(见图1)。

[0041] 利用引物GhCPK33-full-F(5' ATGGGTCTTGCTGACGAAAAGC3')和GhCPK33-full-R(5' CTAAGAGTTGTGTGTGTTGGG3'),用陆地棉YZ1的cDNA作为模板克隆GhCPK33的全长序列。PCR反应条件为:94℃预变性3min;94℃30sec,59℃30sec,72℃1min 50sec,32个循环;72℃延伸7min。将扩增获得的PCR产物连入pGEM-T载体(购自Promega公司,美国),筛选阳性克隆并测序,获得所需的基因ORF,其序列为SEQ ID NO:1所示的核苷酸片段。通过BlastX(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)确定ORF所对应537个氨基酸(见SEQ ID NO:1序列中1-1614bp所示的氨基酸序列),GhCPK33基因编码的蛋白质序列如序列表SEQ ID NO:2所示。

[0042] 2、表达分析

[0043] a. 利用半定量PCR方法来检测该基因在陆地棉的各个组织中的表达情况(结果见图2)。以陆地棉YZ1为材料,提取以下6个不同组织的RNA,用半定量PCR的方法检测GhCPK33的表达水平。选取的6个组织分别是:根(root);茎(stem);叶片(leaf);花瓣(flower);花药(anther);5天胚珠(5d ovule)。棉花总RNA的提取方法根据Zhu等(An improved simple protocol for isolation of high quality RNA from *Gossypium* spp.suitable for cDNA library construction,Acta Agronomica Sinica.2005,31.1657-1659)发表的文献,RNA提取完成后后用DNaseI(购自Promega公司)处理,RNA完整性通过1.2%(w/v)琼脂糖胶(EtBr)电泳检测(5V/cm)。核酸浓度的测定在Beckman DU800 spectrophotometer上进行。RNA 260/280比值在1.9到2.1之间,260/230比值大于2.0的RNA用于下一步的分析。cDNA的合成是以3μg总RNA为模版,与1μl 500μg/ml oligo-dT(15)引物(购自Promega公司,美国),DEPC-water混合,总体积15μl;70℃变性5min,放于冰上骤冷5min;再加入5×M-MLV buffer5μl,RNasin®Ribonuclease Inhibitor(Promega)1μl,M-MLVRT 1μl,1.25μl 10mM dNTP,DEPC-water 1.75μl混合,总体积为25μl;然后在42℃70min,70℃10min,每份cDNA稀释到250μl后于-20℃下保存待用。以上述反转录合成的cDNA为模板,用引物RT-GhCPK33-F(5'TCCACCACATCCCTGAAAACC3')和RT-GhCPK33-R(5'AAATGGAGGCACCACTGAGT3')对GhCPK33基因进行特异性的PCR扩增,同时用引物UB7-F(5'GAAGGCATTCCACCTGACCAAC3')和

UB7-R (5'CTTGACCTTCTTCTTCTTGCTTG3')对棉花GhUB7 (GenBank登陆号:DQ116441)基因做特异扩增(扩增产物长198bp)作为内参,进行半定量分析(见图2)。用引物qGhCPK33-F (5'TCCACCACATCCCTGAAAAACC3')和qGhCPK33-R (5'CAATACAAAGATAAGTCACAC3')对GhCPK33基因进行特异性的PCR扩增。同时用引物UB7-F和UB7-R对棉花GhUB7基因做特异扩增作为内参,以作为内对照进行相对定量分析。用定量PCR对GhCPK33基因受黄萎病及各种激素处理的诱导表达模式分析。

[0044] b. 申请人把黄萎菌感性品种'YZ1'作为研究对象,因为考虑到土培拔苗时会对幼苗根部有一定的伤害,所以选择水培。把陆地棉种子催芽,待其长出幼芽1-2cm时种植到蛭石中,待其刚破土时,将其移至营养液中。在幼苗生长至两片真叶完全平展后,接种活化好的V991孢子液( $10^5$ 个/mL),对照用同样的体积的蒸馏水处理,然后在接种后0.5h,2h,6h,12h,24h时间点取样。按照上述的方法提取根系的总RNA,用于GhCPK33基因的黄萎病菌诱导表达分析(图3中的A图)。定量PCR结果显示,GhCPK33基因受到黄萎病菌的诱导上调表达。

[0045] c. 水杨酸、茉莉酸以及过氧化氢在植物对抗病原菌的过程中起着非常重要作用,介导细胞内的信号转导以及下游抗性物质的积累。因此分析GhCPK33基因对这些物质的响应情况,能够预先推测GhCPK33可能参与的信号路径。用对照及不同激素处理(处理浓度:200 $\mu$ M茉莉酸甲酯,2mM水杨酸and 1mM过氧化氢)后植株根系作为样品,取样时间点设为0.5h、1h和3h,按照上述方法提取根系总RNA。GhCPK33激素处理后表达结果分析表明,GhCPK33基因受茉莉酸处理诱导上调表达,受水杨酸处理下调表达,对过氧化氢处理没有明显响应。

[0046] 实施例2:采用VIGS方法进行基因沉默

[0047] 1. 温室育苗

[0048] 选取籽粒饱满的棉花品系YZ1种子,用25 $^{\circ}$ C的温水浸泡2h,然后平铺在放在浸湿的纱布上,上面再覆盖一层湿润的纱布,放在28 $^{\circ}$ C的培养箱催芽。待种子根长至1-2cm时,便可移栽到营养土(体积比,营养土:蛭石=3:1)中种植。将种子的幼根轻轻放入营养土中,上面再覆盖1-2cm厚的营养土,然后用保鲜膜覆盖,光下培养,设定温度为28 $^{\circ}$ C,光照时间16h,待苗子破土后,揭膜。当苗子的子叶完全展开时即可进行注射。

[0049] 2. 农杆菌的活化与保存

[0050] 2.1 准备:

[0051] 农杆菌菌株为GV3101,准备无菌三角瓶,LB(固、液)培养基(含卡那霉素50mg/L),灭菌甘油,无菌枪头,无菌1.5mL离心管。

[0052] 2.2 操作:

[0053] 2.2.1 活化,悬浮:

[0054] 在对棉花幼苗进行VIGS处理前2天,分别取保存于-70 $^{\circ}$ C的辅助载体pTRV1(荷兰Bart P.H.J.Thomma实验室),空载体pTRV2(荷兰Bart P.H.J.Thomma实验室)和该基因TRV重组载体菌液50 $\mu$ L,置于2ml无菌离心管中,并向离心管中加入500 $\mu$ l灭菌LB(含50 $\mu$ g/ml的卡那霉素和利福平)培养液,于28 $^{\circ}$ C摇床200r/min活化培养。将活化好的菌株接种于含50ml LB培养液(含50 $\mu$ g/ml的卡那霉素和利福平)的灭菌三角瓶中,并置于28 $^{\circ}$ C,200r/min摇床培养16h。摇床培养农杆菌菌液至OD600值为0.8左右时,将菌液收集于灭菌处理过的10ml离心管中,于3000r/min离心10min。去除离心管中的上清液后,使用VIGS重悬液重新调整菌液

OD600值至1.0,并将各基因TRV重组载体和pTRV2空载体的重悬菌液分别与辅助载体pTRV1重悬菌液等体积混匀,室温下放置3h或置于28℃摇床200r/min活化培养1h。重悬液配方(体积按1L计):氯化镁:2.03g;吗啉乙磺酸:2.135g;乙酰丁香酮:0.03g。

[0055] 2.2.2菌株的保存:

[0056] 从培养皿内挑取单菌落接于LB液体培养基中150rpm,26℃摇48h,按菌液和甘油体积比为1:1加入1.5mL离心管混匀,-70℃保存。

[0057] 2.3.浸染,共培养:

[0058] 在进行VIGS处理时,首先用1ml枪头在棉花幼苗子叶背面,轻微点3-4个小孔。然后用1ml注射器将处理好的菌液延着小孔注射到棉花子叶,直至整个子叶呈现出水渍状。待幼苗VIGS处理完毕后,统一浇水,并用黑色塑料膜将处理好的棉花幼苗覆盖,避光培养24h。VIGS处理幼苗子叶第二天,将黑色塑料膜揭开,保持培养条件为25℃,光照120μEM-2/S,16h光照/8h黑暗。

[0059] 3.GhCPK33基因沉默效果监测

[0060] 棉花幼苗经VIGS处理10天左右,即当阳性对照TRV:GbCLA的叶片出现失绿叶片白化时,分别取对照空载体TRV:00和TRV:GhCPK33植株的幼嫩叶片,作为检测基因。PCR检测结果显示,VIGS处理后第12天时,GhCPK33在干涉植株的表达量明显低于对照,因此GhCPK33在海岛棉叶片中的表达已成功被抑制(图6)。同时还检测了JA路径中的关键基因(图9),发现抑制GhCPK33表达后,JA路径中的关键基因均被激活,说明GhCPK33可以调控JA的合成。

[0061] 4.黄萎病菌的活化与培养

[0062] 将黄萎病菌置PDA平板上(配方如下:称取200g马铃薯,洗净去皮切碎,加水1000mL煮沸15min,纱布过滤,再加15g葡萄糖和7g琼脂,充分溶解后趁热纱布过滤,按常规方法在121℃、103.4kPa下高压蒸汽灭菌)于25℃暗培养箱活化一周,用接种针取菌块用ddH<sub>2</sub>O震荡悬浮,然后取1mL菌液平铺到新的PDA平板上,五天后用ddH<sub>2</sub>O从平板上洗下孢子,并把浓度调至10<sup>6</sup>spores/mL。

[0063] 5.黄萎病菌接种

[0064] 待棉花幼苗长到二叶一心时,选取生长一致的幼苗,用剪刀剪去其少量根系,进行伤根处理,再将根系浸泡在浓度为10<sup>5</sup>spores/mL黄萎病菌(V991)孢子液中1min,然后将接种过的植株移栽到营养土中,每钵种植4株。

[0065] 6.病情调查

[0066] 接菌后一周左右按照棉花黄萎病苗期分级标准调查并记载病情级数、计算病情指数,其中病情级数按温室棉苗发病的5级制记(张兴华等,棉花抗枯、黄萎病研究进展及其抗性鉴定方法;江西农业学报,2008,20(3):43-49)。具体分级标准如下:

[0067] 0级:外表无病状。

[0068] 1级:病株叶片25%以下显病状。

[0069] 2级:叶片25%-50%显病状。

[0070] 3级:叶片50%以上显病状,有少数叶片凋落。

[0071] 4级:叶片全枯或脱落,生产力很低。

[0072] 病株率(%)=(发病总株数÷调查总株数)×100%。

[0073] 病指(病情指数)=[各级病株数分别乘以相应级数之和÷(调查总株数×最高级

数)] $\times 100$ 。

[0074] 接菌结果表明TRV:GhCPK33的株系较对照材料TRV:00发病表型、病指和病原菌含量显著降低(图7),说明GhCPK33基因能够参与调控棉花对黄萎病的抗病反应,并起到负调控的作用。

[0075] 实施例5:转基因材料灰霉病接种鉴定

[0076] 1、灰霉病菌的活化与培养

[0077] 取一块大约 $1\text{cm}^2$ 的灰霉菌(菌株编号BC17,华中农业大学李国庆教授惠赠,为常规灰霉菌菌株,进行该试验并不特别强调使用专用菌株)菌块,接种到新的PDA平板上, $25^\circ\text{C}$ 暗培养5天左右,待菌丝布满整个培养皿,即可接菌处理。

[0078] 2、灰霉病菌接种

[0079] 检测到GhCPK33的表达量下降后,当确定基因GhCPK33被沉默后,选取3株左右不同处理棉株统一部位的叶片,放置在事先被蒸馏水浸透的滤纸上(滤纸放在白盘里,并且滤纸和白盘之间有一层同样被浸透的吸水纸),用直径为 $0.5\text{cm}$ 的打孔器选取长势一致的菌块,接种到离体叶片上,长有菌丝的一面直接接触叶面。保持湿度在70%左右,温度 $25^\circ\text{C}$ ,暗培养3d后,对叶片上的病斑进行拍照(图8)。结果表明,接菌结果表明抑制GhCPK33表达的株系较对照材料病斑扩展面积显著减少,说明该基因能够参与调控棉花对灰霉病的抗病反应,并起到负调控的作用。

[0080] 3、激素含量的测定

[0081] 棉花植株内的茉莉酸和茉莉酸异亮氨酸的提取方法参照Liu等的抽提方法(Liu et al 2012),并稍作修改。具体步骤为:取 $0.1\text{g}$ 左右的棉花组织样品,用液氮研磨成粉末。每份样品中加入 $750\mu\text{l}$ 预冷的抽提缓冲液(甲醇:双纯水:冰乙酸,80:19:1,V:V:V)。手动震荡摇匀后,避光在 $4^\circ\text{C}$ 震荡仪上剧烈振荡12h左右。待匀浆液充分萃取后, $4^\circ\text{C}$ ,12000rpm离心15min,将上清液转移至一新离心管,向原离心管中加入 $250\mu\text{l}$ 抽提缓冲液,继续在 $4^\circ\text{C}$ 避光震荡2h,然后 $4^\circ\text{C}$ ,12000rpm离心15min,吸取上清于之前离心管中。将两次得到的总上清液用氮吹仪吹干,然后用 $300\mu\text{l}$  10%的甲醇溶解, $4^\circ\text{C}$ 避光震荡2h左右。最后将溶解的激素液体经直径 $13\text{mm}$ ,孔径 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜(Nylon 66)过滤至测激素用的棕色小瓶子里,保存于 $4^\circ\text{C}$ 备用。最后的提取物用HPLC-MS/MS(1200LLC-MS system,Varian)测定茉莉酸和茉莉酸异亮氨酸的含量。测定时茉莉酸含量太少无法测出,仅有茉莉酸异亮氨酸的含量(图9)。由图9可以看出,抑制GhCPK33表达后,棉花植株根和叶片中JA-Ile的含量均比对照显著升高,说明GhCPK33基因是负调控JA-Ile的合成的。

## 序列表

&lt;110&gt; 华中农业大学

&lt;120&gt; 调控棉花黄萎病抗性的棉花钙依赖蛋白激酶GhCPK33基因及应用

&lt;141&gt; 2018-02-12

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1614

&lt;212&gt; DNA

<213> 棉花 (*Gossypium hirsutum*)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; gene

&lt;222&gt; (1) .. (1614)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1614)

&lt;400&gt; 1

```

atg ggt tct tgc ctg acg aaa agc aaa gac tcg aag cca aag cat aat 48
Met Gly Ser Cys Leu Thr Lys Ser Lys Asp Ser Lys Pro Lys His Asn
1           5           10           15
ggg tat gga tca gga cca aca act acg gct gct gtg cac caa caa agg 96
Gly Tyr Gly Ser Gly Pro Thr Thr Thr Ala Ala Val His Gln Gln Arg
           20           25           30
tac cag gag cct gtt agg cct gca cca gtt caa tcc caa ttc cgt cac 144
Tyr Gln Glu Pro Val Arg Pro Ala Pro Val Gln Ser Gln Phe Arg His
           35           40           45
atc cct gaa aaa cca ggt act caa aca tct tgg aag cca gtg gct cca 192
Ile Pro Glu Lys Pro Gly Thr Gln Thr Ser Trp Lys Pro Val Ala Pro
           50           55           60
tca cca agc ccc aag cct gtt gcc cca agg gtt gac acc att ctt ggt 240
Ser Pro Ser Pro Lys Pro Val Ala Pro Arg Val Asp Thr Ile Leu Gly
65           70           75           80
aaa cca ttt gaa gat ata agg gtg cac tac aca att ggt aaa gaa tta 288
Lys Pro Phe Glu Asp Ile Arg Val His Tyr Thr Ile Gly Lys Glu Leu
           85           90           95
ggg aaa ggt cag ttt ggt gtg act tat ctt tgt att gaa aat tca act 336
Gly Lys Gly Gln Phe Gly Val Thr Tyr Leu Cys Ile Glu Asn Ser Thr
           100           105           110

```

gga aag caa tat gct tgc aag acc ata tcc aaa aag aaa tta gtc acg	384
Gly Lys Gln Tyr Ala Cys Lys Thr Ile Ser Lys Lys Lys Leu Val Thr	
115	120
agg aat gat aag gag gat atg aga agg gag ata caa att atg cag cat	432
Arg Asn Asp Lys Glu Asp Met Arg Arg Glu Ile Gln Ile Met Gln His	
130	135
140	
ttg agt gga cag cct aat att gtg gag ttt aaa ggt gca tat gag gat	480
Leu Ser Gly Gln Pro Asn Ile Val Glu Phe Lys Gly Ala Tyr Glu Asp	
145	150
155	160
aag cta tct gtt cac ctt gta atg gaa tta tgt gct ggt ggt gaa ttg	528
Lys Leu Ser Val His Leu Val Met Glu Leu Cys Ala Gly Gly Glu Leu	
165	170
175	
ttt gat agg att att gcc aag gga cat tat agt gaa agg gca gct gct	576
Phe Asp Arg Ile Ile Ala Lys Gly His Tyr Ser Glu Arg Ala Ala Ala	
180	185
190	
tcc att tgt agg gca att gtg aat gtt gtc cat gct tgc cat ttt atg	624
Ser Ile Cys Arg Ala Ile Val Asn Val Val His Ala Cys His Phe Met	
195	200
205	
gga gtg atg cat agg gac ctt aag cct gag aat ttc ttg ttg tct agc	672
Gly Val Met His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Phe Leu Leu Ser Ser	
210	215
220	
aag ggt gag aat gtt ctt ttg aag gcc acc gat ttc ggc ttg tca gtg	720
Lys Gly Glu Asn Val Leu Leu Lys Ala Thr Asp Phe Gly Leu Ser Val	
225	230
235	240
ttc ttt gaa gat gga aag gtg tcc aag gat ata gtc ggg agc gcg tac	768
Phe Phe Glu Asp Gly Lys Val Ser Lys Asp Ile Val Gly Ser Ala Tyr	
245	250
255	
tat gtt gct cct gaa gta tta ctg cgt aaa tat ggg aaa gaa atc gat	816
Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Lys Glu Ile Asp	
260	265
270	
att tgg agt gca ggg gtt ata tta tat atc tta ctc agt ggt gtg cct	864
Ile Trp Ser Ala Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Val Pro	
275	280
285	
cca ttt tgg gca gaa acg gag aag ggg ata ttc gat gct att tta gaa	912
Pro Phe Trp Ala Glu Thr Glu Lys Gly Ile Phe Asp Ala Ile Leu Glu	
290	295
300	
gga gaa att gac ttc gaa agt caa cca tgg cct tct att tca gag agt	960
Gly Glu Ile Asp Phe Glu Ser Gln Pro Trp Pro Ser Ile Ser Glu Ser	
305	310
315	320

```

gcc aag gac cta gtg cgc cgg atg tta aca cag gat ccg aaa aag cgg 1008
Ala Lys Asp Leu Val Arg Arg Met Leu Thr Gln Asp Pro Lys Lys Arg
          325                      330                      335
att act tct act caa gtc cta gag cat cca tgg ata aga gag ggt gga 1056
Ile Thr Ser Thr Gln Val Leu Glu His Pro Trp Ile Arg Glu Gly Gly
          340                      345                      350
agt gca tca gac aag cct ata gat agt gca gtc ctt tct aga atg aag 1104
Ser Ala Ser Asp Lys Pro Ile Asp Ser Ala Val Leu Ser Arg Met Lys
          355                      360                      365
caa ttc aga aga atg aac aaa cta agg caa ctt gcc tta aag gtc att 1152
Gln Phe Arg Arg Met Asn Lys Leu Arg Gln Leu Ala Leu Lys Val Ile
          370                      375                      380
gcg gaa aat ctt tct agc gaa gaa atc cag ggt ctg aag caa atg ttt 1200
Ala Glu Asn Leu Ser Ser Glu Glu Ile Gln Gly Leu Lys Gln Met Phe
385                      390                      395                      400
gca aac atc gac act gac aac agt ggc acg atc acc tat gaa gaa ctt 1248
Ala Asn Ile Asp Thr Asp Asn Ser Gly Thr Ile Thr Tyr Glu Glu Leu
          405                      410                      415
aag act gga tta gct cga ctt gga tca aag ctc aca gag gca gag gtg 1296
Lys Thr Gly Leu Ala Arg Leu Gly Ser Lys Leu Thr Glu Ala Glu Val
          420                      425                      430
cag caa cta atg gaa gct gct gac gtg gat gga aat ggt agt att gat 1344
Gln Gln Leu Met Glu Ala Ala Asp Val Asp Gly Asn Gly Ser Ile Asp
          435                      440                      445
tac att gaa ttc atc act gct aca atg cat aga cat agg ctt gaa aga 1392
Tyr Ile Glu Phe Ile Thr Ala Thr Met His Arg His Arg Leu Glu Arg
          450                      455                      460
gat gaa cat ctt tac aaa gct ttt caa cat ttt gat aag gac aac agt 1440
Asp Glu His Leu Tyr Lys Ala Phe Gln His Phe Asp Lys Asp Asn Ser
465                      470                      475                      480
ggg tat atc aca aga gat gag cta gaa gca gcc atg aaa gaa tac gga 1488
Gly Tyr Ile Thr Arg Asp Glu Leu Glu Ala Ala Met Lys Glu Tyr Gly
          485                      490                      495
atg ggt gat gat gac aca atc aag gaa ata ata tcc gaa gtt gac acc 1536
Met Gly Asp Asp Asp Thr Ile Lys Glu Ile Ile Ser Glu Val Asp Thr
          500                      505                      510
gac aac gac ggc aag atc aac tac gag gag ttc cgg gac atg atg aga 1584
Asp Asn Asp Gly Lys Ile Asn Tyr Glu Glu Phe Arg Asp Met Met Arg
          515                      520                      525

```

agc gga acc caa cac aca caa ctc ttt tag 1614  
 Ser Gly Thr Gln His Thr Gln Leu Phe  
 530 535  
 <210> 2  
 <211> 537  
 <212> PRT  
 <213> 棉花 (*Gossypium hirsutum*)  
 <400> 2  
 Met Gly Ser Cys Leu Thr Lys Ser Lys Asp Ser Lys Pro Lys His Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Tyr Gly Ser Gly Pro Thr Thr Thr Ala Ala Val His Gln Gln Arg  
 20 25 30  
 Tyr Gln Glu Pro Val Arg Pro Ala Pro Val Gln Ser Gln Phe Arg His  
 35 40 45  
 Ile Pro Glu Lys Pro Gly Thr Gln Thr Ser Trp Lys Pro Val Ala Pro  
 50 55 60  
 Ser Pro Ser Pro Lys Pro Val Ala Pro Arg Val Asp Thr Ile Leu Gly  
 65 70 75 80  
 Lys Pro Phe Glu Asp Ile Arg Val His Tyr Thr Ile Gly Lys Glu Leu  
 85 90 95  
 Gly Lys Gly Gln Phe Gly Val Thr Tyr Leu Cys Ile Glu Asn Ser Thr  
 100 105 110  
 Gly Lys Gln Tyr Ala Cys Lys Thr Ile Ser Lys Lys Lys Leu Val Thr  
 115 120 125  
 Arg Asn Asp Lys Glu Asp Met Arg Arg Glu Ile Gln Ile Met Gln His  
 130 135 140  
 Leu Ser Gly Gln Pro Asn Ile Val Glu Phe Lys Gly Ala Tyr Glu Asp  
 145 150 155 160  
 Lys Leu Ser Val His Leu Val Met Glu Leu Cys Ala Gly Gly Glu Leu  
 165 170 175  
 Phe Asp Arg Ile Ile Ala Lys Gly His Tyr Ser Glu Arg Ala Ala Ala  
 180 185 190  
 Ser Ile Cys Arg Ala Ile Val Asn Val Val His Ala Cys His Phe Met  
 195 200 205  
 Gly Val Met His Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Phe Leu Leu Ser Ser  
 210 215 220  
 Lys Gly Glu Asn Val Leu Leu Lys Ala Thr Asp Phe Gly Leu Ser Val  
 225 230 235 240  
 Phe Phe Glu Asp Gly Lys Val Ser Lys Asp Ile Val Gly Ser Ala Tyr

	245	250	255
Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Lys Glu Ile Asp			
	260	265	270
Ile Trp Ser Ala Gly Val Ile Leu Tyr Ile Leu Leu Ser Gly Val Pro			
	275	280	285
Pro Phe Trp Ala Glu Thr Glu Lys Gly Ile Phe Asp Ala Ile Leu Glu			
	290	295	300
Gly Glu Ile Asp Phe Glu Ser Gln Pro Trp Pro Ser Ile Ser Glu Ser			
305	310	315	320
Ala Lys Asp Leu Val Arg Arg Met Leu Thr Gln Asp Pro Lys Lys Arg			
	325	330	335
Ile Thr Ser Thr Gln Val Leu Glu His Pro Trp Ile Arg Glu Gly Gly			
	340	345	350
Ser Ala Ser Asp Lys Pro Ile Asp Ser Ala Val Leu Ser Arg Met Lys			
	355	360	365
Gln Phe Arg Arg Met Asn Lys Leu Arg Gln Leu Ala Leu Lys Val Ile			
	370	375	380
Ala Glu Asn Leu Ser Ser Glu Glu Ile Gln Gly Leu Lys Gln Met Phe			
385	390	395	400
Ala Asn Ile Asp Thr Asp Asn Ser Gly Thr Ile Thr Tyr Glu Glu Leu			
	405	410	415
Lys Thr Gly Leu Ala Arg Leu Gly Ser Lys Leu Thr Glu Ala Glu Val			
	420	425	430
Gln Gln Leu Met Glu Ala Ala Asp Val Asp Gly Asn Gly Ser Ile Asp			
	435	440	445
Tyr Ile Glu Phe Ile Thr Ala Thr Met His Arg His Arg Leu Glu Arg			
	450	455	460
Asp Glu His Leu Tyr Lys Ala Phe Gln His Phe Asp Lys Asp Asn Ser			
465	470	475	480
Gly Tyr Ile Thr Arg Asp Glu Leu Glu Ala Ala Met Lys Glu Tyr Gly			
	485	490	495
Met Gly Asp Asp Asp Thr Ile Lys Glu Ile Ile Ser Glu Val Asp Thr			
	500	505	510
Asp Asn Asp Gly Lys Ile Asn Tyr Glu Glu Phe Arg Asp Met Met Arg			
	515	520	525
Ser Gly Thr Gln His Thr Gln Leu Phe			
	530	535	

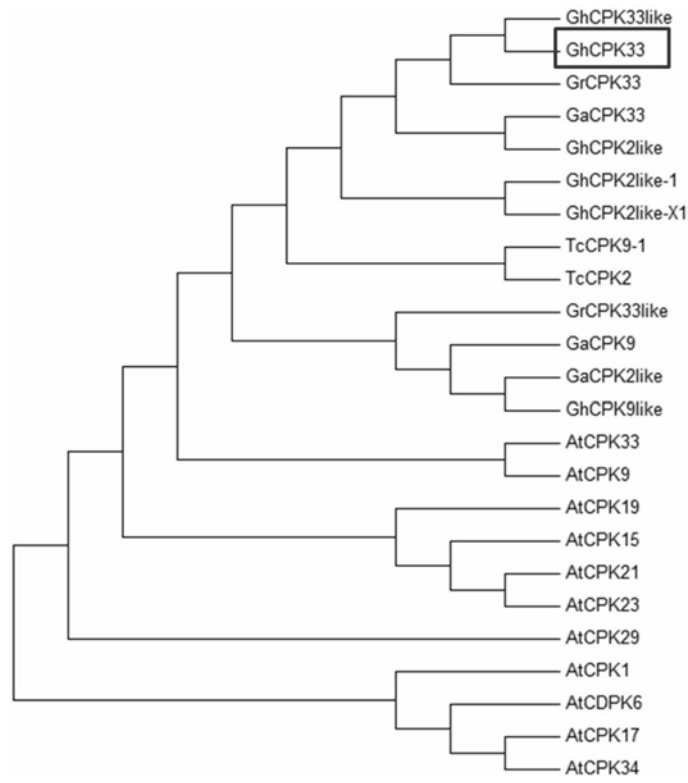


图1

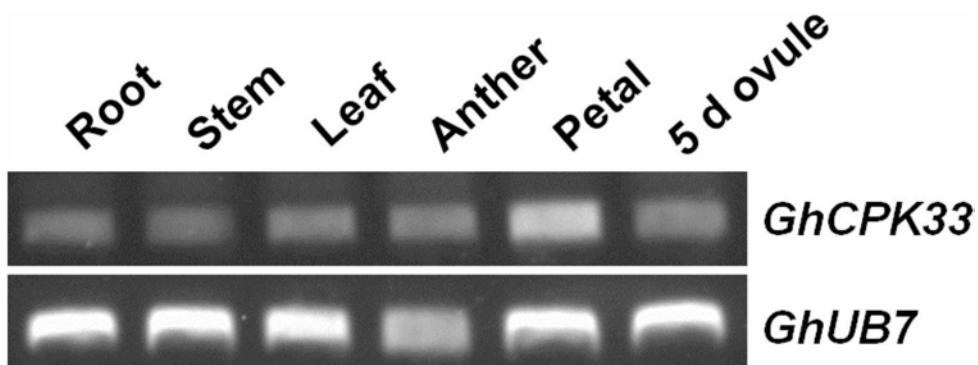


图2

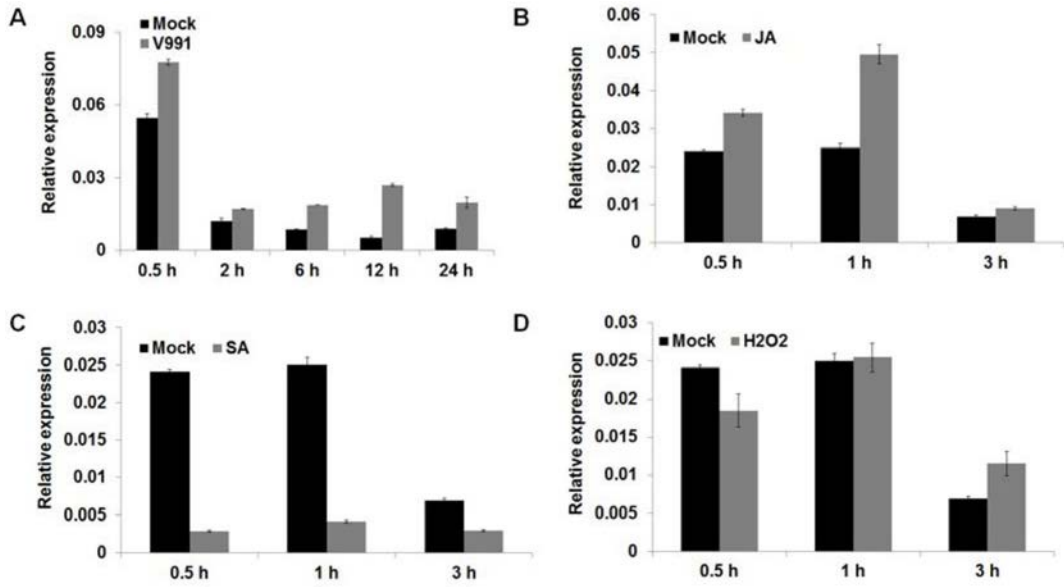


图3

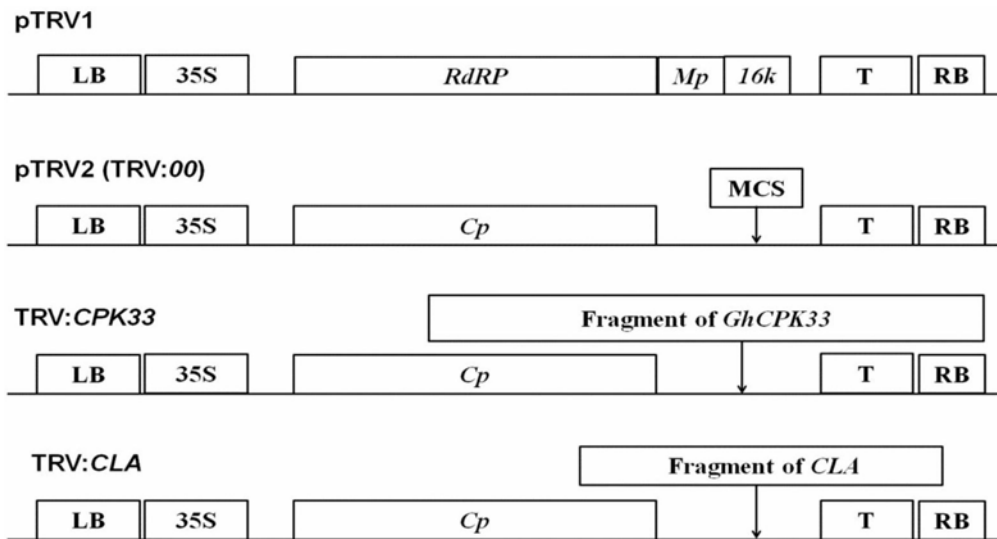


图4

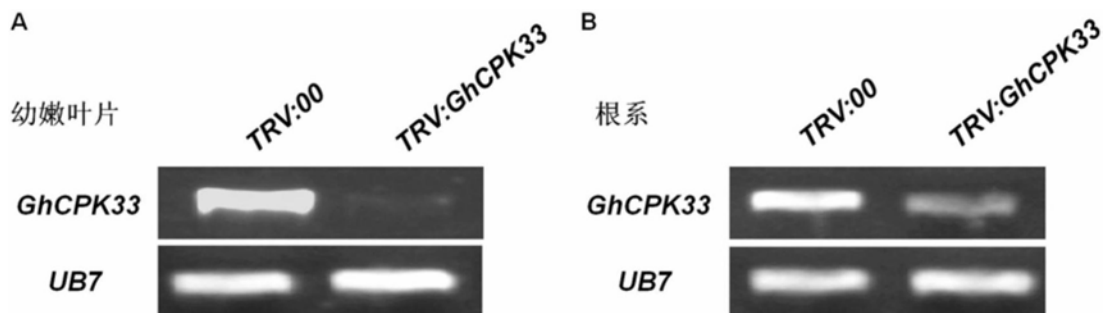


图5

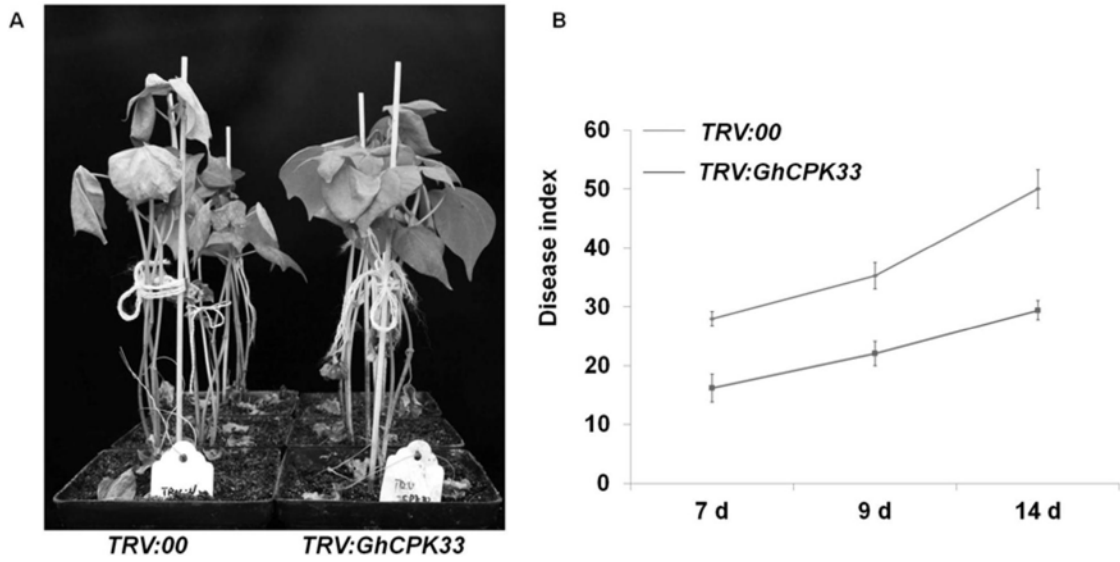


图6

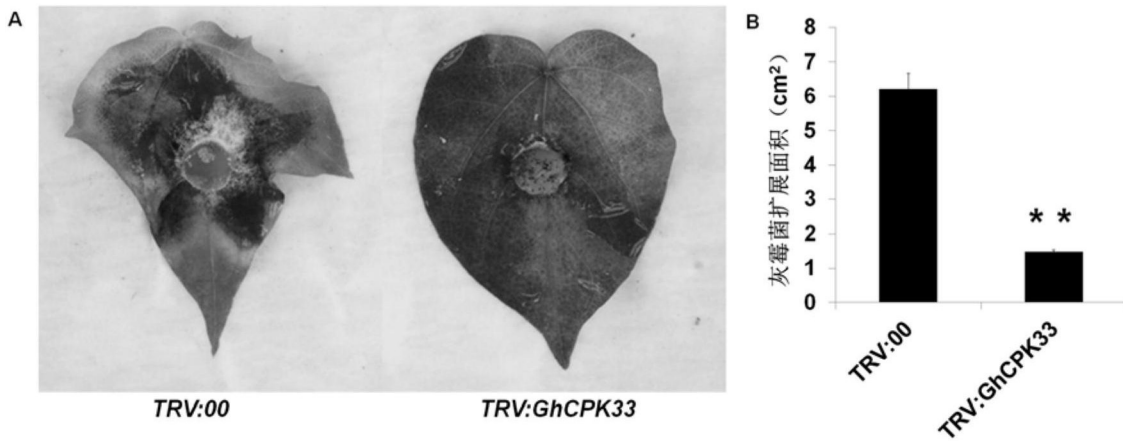


图7

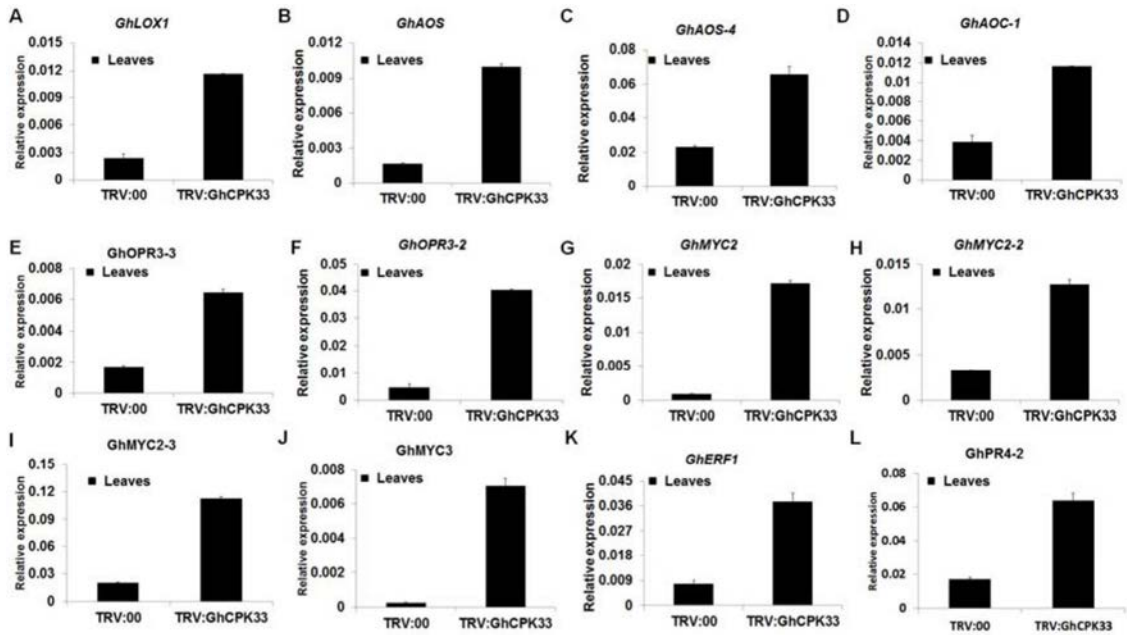


图8

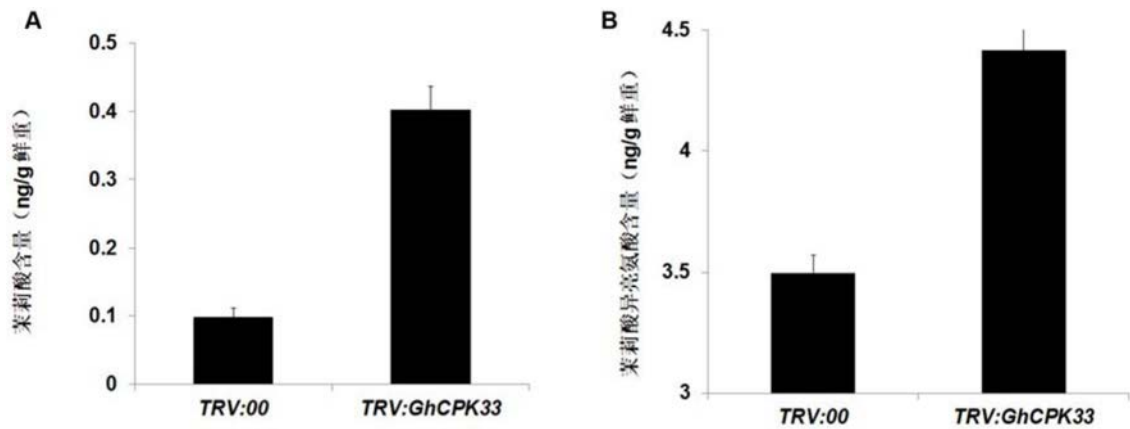


图9