



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107064184 B

(45)授权公告日 2019.08.06

(21)申请号 201710228701.4

(22)申请日 2017.04.10

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107064184 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(73)专利权人 中国科学院上海应用物理研究所  
地址 201800 上海市嘉定区嘉罗公路2019号

(72)发明人 樊春海 诸颖 孔华庭 张继超  
夏凯 闫庆龙 王丽华 胡钧

(74)专利代理机构 上海智信专利代理有限公司  
31002  
代理人 邓琪 余永莉

(51)Int.Cl.  
G01N 23/04(2018.01)

(56)对比文件

CA 2988874 A1,2016.12.15,  
WO 2007099536 A2,2007.09.07,  
WO 2016198609 A1,2016.12.15,

审查员 任晓峰

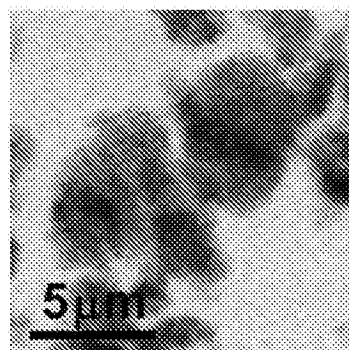
权利要求书1页 说明书4页  
序列表5页 附图3页

(54)发明名称

一种同步X射线可见的成像标签及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种同步X射线可见的成像标签的制备方法,该制备方法包括以下步骤:1)将底物分子溶解于缓冲体系中;2)加入针对所述底物分子具有催化活性的酶或者小分子,混匀;3)反应一段时间至聚合物生成;以及4)将含有所述聚合物的悬液滴加在同步成像基底上,同步X射线成像观察。本发明还提供一种根据所述制备方法制得的同步辐射X射线可见的成像标签。本发明利用X射线具有良好的能量分辨的特点,经体外化学催化反应成功制备了同步X射线可见的成像标签,为进一步制备X射线敏感的分子探针以及实现对细胞内生物分子的特异性识别和成像打下了良好的基础。



1. 一种同步X射线可见的成像标签的制备方法,其特征在于,该制备方法包括以下步骤:

- 1) 将底物分子溶解于缓冲体系中;
- 2) 加入针对所述底物分子具有催化活性的酶或者小分子,混匀;
- 3) 反应一段时间至聚合物生成;以及
- 4) 将含有所述聚合物的悬液滴加在同步成像基底上,同步X射线成像观察。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤1)中的所述缓冲体系包括磷酸盐缓冲液、二甲胍酸钠缓冲液或三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤1)中所述缓冲液的pH值为7.2~7.6。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤1)中所述底物分子为3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐,金属增强型DAB或EnzMet。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤2)中所述具有催化活性的酶或者小分子为抗坏血酸过氧化物酶,迷你单线态氧产生蛋白,辣根过氧化物酶,曙红,亚甲基蓝,二溴荧光素,荧光素,TAMRA,Br-TAMRA,Bromo-Cy5,AF488,AF633,ReAsH-EDT<sub>2</sub>或IRDye<sup>®</sup>700DX。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤3)中的反应温度为4~37℃。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤4)中的所述成像基底为氮化硅窗口、铜网碳支持膜或Mylar膜。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤4)中的所述同步X射线成像的能量为280~20000eV,根据不同的底物分子选择不同的入射能量。

9. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤4)中的所述同步X射线成像的分辨率为20~200nm。

10. 一种根据权利要求1~9中任意一项所述的制备方法制得的同步辐射X射线可见的成像标签。

## 一种同步X射线可见的成像标签及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学技术领域,更具体地涉及一种同步X射线可见的成像标签及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 显微成像技术是细胞生命科学发展的主要推动力之一。基于同步X射线的显微技术在细胞成像领域具有独特的优势。由于X射线的波长在0.1-10nm范围内,因此其天然就是一种超分辨显微成像技术,分辨率理论上能够达到数个纳米。另外,与电子束相比,X射线对生物样品的穿透力更强,因此不需要经过切片等处理就能对完整细胞进行成像。更重要的是,X射线显微成像技术具有很好的能量分辨,能精确分辨很多元素的吸收谱。因此,结合X射线敏感的成像探针,能够实现细胞内生物分子的高分辨识别和成像。

[0003] 在光学显微成像中,荧光标签常被用来标记生物分子。在X射线成像中,同样可以利用X射线本身的特点来开发成像标签,从而应用于制备生物探针,实现对细胞内生物分子的识别和成像。目前,研究人员已经应用X射线对金属纳米颗粒的特征吸收,在纳米颗粒上连接抗体从而对特定生物分子进行识别并成像。但是,细胞内含有大量竞争性生物分子,如何保证对感兴趣生物分子的标记特异性是一大瓶颈。因此,现阶段开发新型同步X射线可见的成像标签,实现对细胞内生物分子的精确识别和定位具有十分重要的意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种同步X射线可见的成像标签及其制备方法,从而解决现有X射线显微成像技术中还无法实现对细胞内生物分子的精确识别和定位的问题。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明采用以下技术方案:

[0006] 根据本发明的第一方面,提供一种同步X射线可见的成像标签的制备方法,该制备方法包括以下步骤:1)将底物分子溶解于缓冲体系中;2)加入针对所述底物分子具有催化活性的酶或者小分子,混匀;3)反应一段时间至聚合物生成;以及4)将含有所述聚合物的悬液滴加在同步成像基底上,同步X射线成像观察。

[0007] 根据本发明所提供的方法,其工作原理为:具有催化活性的酶或者小分子催化底物分子聚合,生成X射线可见的聚合物,从而制备出一种同步X射线可见的成像标签。

[0008] 步骤1)中的所述缓冲体系包括磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)、二甲胍酸钠缓冲液(sodium cacodylate buffer)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液(Tris-HCl buffer)或其他适合相应底物分子的缓冲液。

[0009] 步骤1)中所述缓冲液的pH值为7.2~7.6。其中,最佳地为7.4。

[0010] 步骤1)中所述底物分子为3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB),金属增强型DAB(Metal Enhanced DAB)或EnzMet。

[0011] 其中所述底物分子浓度为0.2~5mM。根据不同的底物分子可选择最适的底物分子浓度。

[0012] 步骤2)中所述具有催化活性的酶或者小分子为抗坏血酸过氧化物酶(APEX、APEX2),迷你单线态氧产生蛋白(miniSOG),辣根过氧化物酶(HRP),曙红(eosin),亚甲基蓝(methylene blue),二溴荧光素(DBF),荧光素(Fluorescein),TAMRA,Br-TAMRA,Bromo-Cy5,AF488,AF633,ReAsH-EDT2或IRDye<sup>®</sup>700DX等等。

[0013] 针对具有催化活性的酶或小分子,可考虑在反应时加入光照条件。例如,对于APEX,APEX2和HRP来说,光照并非必需条件。对于miniSOG,eosin,methylene blue,DBF,Fluorescein,TAMRA,Br-TAMRA,Bromo-Cy5,AF488,AF633,ReAsH-EDT<sub>2</sub>和IRDye<sup>®</sup>700DX来说,光照则为必需条件。其中的混匀方法为使用枪头吹打混匀或者漩涡振荡器振荡混匀。

[0014] 步骤3)中的反应温度为4~37℃。实际应用过程中根据选择的不同的酶或小分子,可选择最优的温度。

[0015] 步骤3)的反应时间为5min~2h。根据选择的不同的酶或小分子,可选择最优的反应时间。

[0016] 步骤4)中的所述成像基底为氮化硅窗口、铜网碳支持膜或Mylar膜。根据不同的底物分子选择最优的成像基底。氮化硅窗口厚度为50-150nm,最佳为100nm。铜网碳膜厚度为5~100nm,最佳为20nm。Mylar膜厚度为2~25μm,最佳为10μm。

[0017] 步骤4)中的所述同步X射线成像的能量为280~20000eV,根据不同的底物分子可选择不同的入射能量。其中,DAB最优成像能量为350~850eV,金属增强型DAB最优成像能量为500~8000eV。EnzMet最优成像能量为500~7000eV。

[0018] 步骤4)中的所述同步X射线成像的分辨率为20~200nm。

[0019] 根据本发明的第二方面,还提供一种根据所述制备方法制得的同步辐射X射线可见的成像标签。

[0020] 本发明的积极进步效果在于:新的显微成像技术和与之相适合的分子探针对于更好地理解细胞生命过程具有十分重要的意义。但是,目前X射线显微技术多用于细胞结构成像,和该技术相适合的特异性识别细胞内重要生物靶标的分子探针仍较缺乏。本发明利用X射线具有良好的能量分辨的特点,经体外化学催化反应成功制备了同步X射线可见的成像标签,为进一步制备X射线敏感分子探针以及实现对细胞内生物分子的特异性识别和成像打下了良好的基础。

## 附图说明

[0021] 图1是纯化的APEX2蛋白的SDS-PAGE图,其中泳道1为标准分子量蛋白Marker,泳道2为纯化的APEX2蛋白;

[0022] 图2A是同步辐射X射线对DAB聚合物的成像图,图2B是同步辐射X射线对标准靶的成像图;

[0023] 图3A、图3B、图3C、图3D分别是APEX2,HRP,miniSOG和IRDye<sup>®</sup>700DX催化DAB分子生成聚合物的同步X射线成像图;

[0024] 图4A、图4B、图4C分别是APEX2催化DAB,金属增强型DAB和EnzMet生成聚合物的同步X射线成像图。

## 具体实施方式

[0025] 以下结合具体实施例,对本发明做进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规方法和条件,或按照商品说明书选择。本发明所用试剂和原料均市售可得。

[0026] 本发明主要选择DAB作为底物分子代表,催化活性的酶以APEX2为主,制备了同步X射线可见的成像标签,并应用于同步X射线成像研究,以下实施例具体说明本发明的实施效果。

[0027] 实施例1 APEX2蛋白的表达与纯化

[0028] pTRC99A-APEX2质粒(Addgene plasmid#72558)购自addgene。该pTRC99A-APEX2质粒的序列如SEQ ID No:1所示。

[0029] BL21-DE3大肠杆菌感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。取50ng pTRC99A-APEX2质粒加入感受态细胞,冰上放置30min,42℃热激,加入LB培养基,37℃、150rpm培养1h,取适量菌液涂布于氨苄抗性的LB琼脂糖平板上,培养过夜。挑取单克隆,接种到1mL氨苄抗性的LB培养基中,37℃、220rpm培养过夜。将1mL菌液接种到500mL氨苄抗性的LB培养基中,37℃、220rpm培养约5h,待菌液OD值达到0.6时加入420μM的IPTG和1mM的5-氨基乙酰丙酸,18℃、220rpm诱导培养16h。离心收集菌体并超声裂解。使用Ni-NTA琼脂糖亲和柱纯化并洗脱APEX2蛋白。SDS-PAGE验证APEX2蛋白的分子量和纯度。

[0030] 结果如图1所示,SDS-PAGE结果显示在分子量30kDa的位置有一条清晰的条带,表明该质粒成功表达了APEX2蛋白且纯度较高,可用于进一步的实验研究。

[0031] 实施例2 DAB聚合物的制备及同步X射线成像观察

[0032] 将DAB水溶液和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分别加到pH7.4的PBS缓冲液中,DAB终浓度为0.4mg/mL,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>终浓度为10mM,混匀。加入APEX2蛋白,终浓度为100nM。反应15min后将生成的DAB聚合物悬液滴加在氮化硅窗上。

[0033] DAB聚合物的X射线成像实验在上海光源BL08U1软X射线谱学显微线站进行,实验方法为软X射线透射成像。X射线经波荡器引出,经过平面光栅单色器单色化后由波带片聚焦到样品上,然后由快速正比计数探测器PMT探测透射光子。光子能量范围250-2000eV,空间分辨率为30nm。DAB聚合物悬液滴在氮化硅窗上,干燥,放置在真空样品室中,选取X射线入射能量为525eV。移动运动电机,完成DAB聚合物样品的寻找、对焦,然后进行软X射线成像,成像分辨率为30nm。

[0034] 结果如图2A、图2B所示,同步X射线显微技术能对DAB聚合物进行很好的成像,空间分辨率达到30nm,说明该聚合物具有良好的X射线吸收特性,可以作为同步X射线成像标签用于进一步的应用研究。

[0035] 实施例3 APEX2,HRP,miniSOG和IRDye<sup>®</sup>700DX催化DAB分子生成聚合物及在同步X射线成像中的应用比较

[0036] APEX2体外催化DAB分子生成聚合物,方法与实施例2相同。

[0037] HRP体外催化DAB分子生成聚合物,方法为:HRP购自Sigma(货号:P8375)。将DAB水溶液和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>分别加到pH7.4的PBS缓冲液中,DAB终浓度为0.4mg/mL,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>终浓度为10mM,混匀。加入HRP,使终浓度为100nM。反应15min后收集DAB聚合物。

[0038] miniSOG体外催化DAB分子生成聚合物,方法为:将miniSOG的cDNA序列克隆进

pBAD-Myc-His A原核表达载体骨架,构建pBAD-miniSOG质粒。pBAD-miniSOG质粒的序列如SEQ ID No:2所示。取50ng pBAD-miniSOG质粒加入感受态细胞,冰上放置30min,42℃热激,加入LB培养基,37℃、150rpm培养1h,取适量菌液涂布于氨苄抗性的LB琼脂糖平板上,培养过夜。挑取单克隆,接种到1mL氨苄抗性的LB培养基中,37℃、220rpm培养过夜。将1mL菌液接种到500mL氨苄抗性的LB培养基中,37℃、220rpm培养约5h,待菌液OD值达到0.6时加入0.2%的阿拉伯糖,37℃、220rpm诱导培养16h。离心收集菌体并超声裂解。使用Ni-NTA琼脂糖亲和柱纯化并洗脱miniSOG蛋白。

[0039] 将DAB水溶液加到pH7.4的PBS缓冲液中,DAB终浓度为0.4mg/mL,混匀。加入miniSOG,使终浓度为50nM。缓慢地向反应体系中通O<sub>2</sub>,使用150W的488nm荧光照射15min,即得DAB聚合物悬液。

[0040] IRDye<sup>®</sup>700DX体外催化DAB分子聚合物,方法为:IRDye<sup>®</sup>700DX购自LI-COR(货号:929-70010)。将DAB水溶液加到pH7.4的PBS缓冲液中,DAB终浓度为0.4mg/mL,混匀。加入IRDye<sup>®</sup>700DX,使终浓度为50nM。使用150W的700nm荧光照射15min,即得DAB聚合物悬液。

[0041] 上述各DAB聚合物的X射线成像观察方法与实施例2相同。

[0042] 结果如图3A、3B、3C、3D所示,同步X射线成像结果显示APEX2,HRP,miniSOG和IRDye<sup>®</sup>700DX均能催化DAB分子生成聚合物,但是酶APEX2,HRP,miniSOG的催化效果优于小分子IRDye<sup>®</sup>700DX。

[0043] 实施例4 APEX2催化DAB,金属增强型DAB以及EnzMet生成聚合物及在同步X射线成像中的应用比较

[0044] APEX2体外催化DAB分子生成聚合物,方法与实施例2相同。

[0045] APEX2体外催化金属增强型DAB分子生成聚合物,方法为:金属增强型DAB购自Thermofisher(货号:34065)。将金属增强型DAB溶液加到Stable Peroxide Buffer中,混匀。使其终浓度为1×。加入APEX2蛋白,使终浓度为100nM,混匀。反应15min后,即得金属增强型DAB聚合物悬液。

[0046] APEX2体外催化EnzMet反应生成聚合物,方法为:EnzMet购自Nanoprobe(货号:6010)。将APEX2蛋白加入330μL的EnzMet<sup>™</sup> Detect A中,混匀,终浓度为300nM。室温孵育4min后,加入330μL的EnzMet<sup>™</sup> Detect B,混匀,室温孵育4min。加入330μL的EnzMet<sup>™</sup> Detect C,混匀,室温反应40min,即得EnzMet聚合物悬液。

[0047] 观察DAB聚合物、金属增强型DAB聚合物、EnzMet聚合物时,X射线入射能量分别选取525,798和606eV,其余同步X射线成像观察方法与实施例3相同。

[0048] 结果如图4A、4B、4C所示,同步X射线成像结果显示APEX2可以催化DAB,金属增强型DAB以及EnzMet生成聚合物,说明这些聚合物都具有良好的X射线吸收特性,可以作为同步X射线成像标签用于进一步的应用研究。

[0049] 以上所述的,仅为本发明的较佳实施例,并非用以限定本发明的范围,本发明的上述实施例还可以做出各种变化。即凡是依据本发明申请的权利要求书及说明书内容所作的简单、等效变化与修饰,皆落入本发明专利的权利要求保护范围。本发明未详尽描述的均为常规技术内容。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 中国科学院上海应用物理研究所	
[0003]	<120> 一种同步X射线可见的成像标签及其制备方法	
[0004]	<160> 2	
[0005]	<210> 1	
[0006]	<211> 4925	
[0007]	<212> DNA	
[0008]	<213> 人工	
[0009]	<220>	
[0010]	<223> pTRC99A-APEX2质粒	
[0011]	<400> 1	
[0012]	gtttgacagc ttatcatcga ctgcacgggtg caccaatget tctggcgtca ggcagccate	60
[0013]	ggaagctgtg gtatggctgt gcaggtcgta aatcactgca taattcgtgt cgctcaagge	120
[0014]	gcactcccgt tctggataat gttttttgcg ccgacatcat aacggttctg gcaaatattc	180
[0015]	tgaaatgagc tgttgacaat taateatccg gctcgtataa tgtgtggaat tgtgagcgga	240
[0016]	taacaatttc acacaggaaa cagaccatgg cacaccacca ccaccaccac ggaaagtett	300
[0017]	acccaactgt gagtgetgat taccaggacg ccgttgagaa ggccaagaag aagctcagag	360
[0018]	gcttcatcgc tgagaagaga tgcgctcctc taatgetccg tttggcattc cactctgctg	420
[0019]	gaacctttga caagggcacg aagaccgggtg gaccttcgg aaccatcaag caccctgccg	480
[0020]	aactggetca cagegetaac aacggctctg acategetgt taggcttttg gagccactca	540
[0021]	aggcggagtt ccctattttg agctacgccc atttctacca gttggetggtg gttgttgcgg	600
[0022]	ttgaggtcac ggggtggacct aaggttccat tccacctgg aagagaggac aagcctgagc	660
[0023]	caccaccaga gggctcgttg cccgatccca ctaagggttc tgaccatttg agagatgtgt	720
[0024]	ttggcaaagc tatggggctt actgaccaag atategttgc tctatctggg ggtcacaacta	780
[0025]	ttggagetgc acacaaggag cgttctggat ttgagggtcc ctggacctct aatectctta	840
[0026]	ttttgacaaa ctactacttc acggagtgtg tgagtgggtga gaaggaaggt ctcttcagc	900
[0027]	tacctctga caaggctctt ttgtctgacc ctgtattccg ccctctcgtt gacaaatag	960
[0028]	cagcggacga agatgccttc tttgctgatt acgctgagge tcacaaaag ctttccgagc	1020
[0029]	ttgggtttgc tgatgcctaa gatecgetag agtegacctg caggcatgca agcttggctg	1080
[0030]	ttttggcgga tgagagaaga ttttcagcct gatacagatt aatcagaac gcagaagcgg	1140
[0031]	tctgataaaa cagaatttgc ctggcggcag tagcgcgggtg gtcccacctg accccatgcc	1200
[0032]	gaactcagaa gtgaaacgcc gtagcgcga ttgtagtgtg gggctctccc atgcgagagt	1260
[0033]	agggaactgc caggcatcaa ataaaacgaa aggctcagtc gaaagaactgg gcctttcgtt	1320
[0034]	ttatctgttg tttgtcgggtg aacgetctcc tgagtaggac aaatccgccg ggagcggatt	1380
[0035]	tgaacgttgc gaagcaacgg cccggagggt ggcgggcagg acgcccgcc taaactgcc	1440
[0036]	ggcatcaaat taagcagaag gccatcctga cggatggcct ttttgcgttt ctacaaactc	1500
[0037]	ttttgttita tttttetaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataacctg	1560
[0038]	ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc	1620
[0039]	ccttatccc tttttgccc cattttgcct tctgttttt gctcaccag aaacgctggt	1680
[0040]	gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct	1740
[0041]	caacagcgggt aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagc	1800

[0042]	ttttaagtt	ctgctatgtg	gcgcggtatt	atcccgtgtt	gacgccgggc	aagagcaact	1860
[0043]	eggtcgccgc	atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	tcacagaaaa	1920
[0044]	gcatcttacg	gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	1980
[0045]	taacactgcg	gccaacttac	ttctgacaac	gatcggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	2040
[0046]	tttgcacaac	atgggggatc	atgtaactcg	ccttgatcgt	tgggaaccgg	agctgaatga	2100
[0047]	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctaca	gcaatggcaa	caacgttgcg	2160
[0048]	caaaactatta	actggcgaac	tacttaactct	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	2220
[0049]	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	cttccggctg	gctggtttat	2280
[0050]	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggt	atcattgcag	cactggggcc	2340
[0051]	agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagttat	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	2400
[0052]	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	tgcctcaactg	attaagcatt	ggtaactgtc	2460
[0053]	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aatttaaaag	2520
[0054]	gatctaggtg	aagatccttt	ttgataatct	catgacccaa	atccctaac	gtgagttttc	2580
[0055]	gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	2640
[0056]	tctgcgcgta	atctgctgct	tgcaaaaaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggttttgtt	2700
[0057]	gccggatcaa	gagctaccaa	ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	2760
[0058]	accaaatact	gtccttctag	tgtagccgta	gtaggccac	cacttcaaga	actctgtage	2820
[0059]	accgcctaca	tacctcctc	tgctaatcct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	2880
[0060]	gtcgtgtctt	accgggttgg	actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	2940
[0061]	ctgaacgggg	ggttcgtgca	cacagcccag	cttgagcga	acgacctaca	ccgaactgag	3000
[0062]	atacctacag	cgtgagctat	gagaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaaa	aggcggacag	3060
[0063]	gtatccggtg	agcggcaggg	tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	3120
[0064]	cgctgggtat	ctttatagtc	ctgtcggggt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	3180
[0065]	gtgatgctcg	tcaggggggc	ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	3240
[0066]	gttcttgccc	ttttgctggc	cttttgetca	catgttcttt	cctgcgttat	ccctgatctc	3300
[0067]	tgtggataac	cgtattaccg	cctttgagtg	agctgatacc	gctcgcgcga	gccgaacgac	3360
[0068]	cgagcgcagc	gagtcagtga	gcgaggaagc	ggaagagcgc	ctgatgcggt	atcttctctc	3420
[0069]	tacgcatctg	tgcggtatct	cacaccgcat	atggtgcaact	ctcagtacaa	tctgctctga	3480
[0070]	tgcgcgatag	ttaagccagt	atacactccg	ctategetac	gtgactgggt	catggctgcg	3540
[0071]	ccccgacacc	cgccaacacc	cgctgacgcg	cctgacggg	cttgtctgct	cccggcatcc	3600
[0072]	gcttacagac	aagctgtgac	cgtctccggg	agctgcatgt	gtcagaggtt	ttcaccgtca	3660
[0073]	tcaccgaaac	gcgcgaggca	gcagatcaat	tcgcgcgcga	aggcgaagcg	gcatgcattt	3720
[0074]	acgttgacac	catgcaatgg	tgcaaaacct	tctcgggtat	ggcatgatag	cgcccggaag	3780
[0075]	agagtcaatt	caggtgtgtg	aatgtgaaac	cagtaacgtt	atacgatgct	gcagagtatg	3840
[0076]	ccggtgtctc	ttatcagacc	gtttcccgcg	tggtgaacca	ggccagccac	gtttctgcca	3900
[0077]	aaacgcggga	aaaagtggaa	gcggcgatgg	cggagctgaa	ttacattccc	aaccgcgtgg	3960
[0078]	cacaacaact	ggcgggcaaa	cagtcgttgc	tgattggcgt	tgccacctcc	agtctggccc	4020
[0079]	tgcacgcgcc	gtcgcgaaat	gtcgcggcga	ttaaatectc	cgccgatcaa	ctgggtgcca	4080
[0080]	gcgtgtgtgt	gtcgtatgta	gaacgaagcg	gcgtcgaagc	ctgtaaagcg	gcggtgcaca	4140
[0081]	atcttctcgc	gcaacgcgctc	agtgggctga	tcattaacta	tccgctggat	gaccaggatg	4200
[0082]	ccattgctgt	ggaagctgcc	tgcactaatg	ttccggcgtt	atctcttgat	gtctctgacc	4260
[0083]	agacaacccat	caacagtatt	atcttctccc	atgaagacgg	tacgcgaactg	ggcgtggagc	4320



[0084] atctggtcgc attgggtcac cagcaaatcg cgctgttagc gggccatta agttctgtct 4380  
 [0085] eggcgcgtct gcgtctggct ggctggcata aatatctcac tcgcaatcaa attcagecga 4440  
 [0086] tagcggaacg ggaaggcgac tggagtgcc a tgcctggtt tcaacaaacc atgcaaatgc 4500  
 [0087] tgaatgaggg catcgttccc actgcgatgc tggttgcaa cgatcagatg gcgctgggcg 4560  
 [0088] caatgcgcgc cattaccgag tccgggctgc gcgttgggtgc ggatatctcg gtagtgggat 4620  
 [0089] acgacgatac cgaagacagc tcatgttata tcccgcgctc aaccaccatc aaacaggatt 4680  
 [0090] ttcgcctgct ggggcaaac agcgtggacc gcttgetgca actctctcag ggccaggcgg 4740  
 [0091] tgaaggcaa tcagctgtt cccgtctcac tggtgaaaag aaaaaccacc ctggcgecca 4800  
 [0092] atacgaaac cgctctccc cgcgcttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 4860  
 [0093] tttcccact ggaaagcggg cagtgcgcgc aacgcaatta atgtgagtta gcgcgaattg 4920  
 [0094] atctg 4925  
 [0095] <210> 2  
 [0096] <211> 4366  
 [0097] <212> DNA  
 [0098] <213> 人工  
 [0099] <220>  
 [0100] <223> pBAD-miniSOG质粒  
 [0101] <400> 2  
 [0102] aagaaaccaa ttgtccatat tgcacagac attgccgta ctgcgtcttt tactggctct 60  
 [0103] tctcgetaac caaacggta acccegetta ttaaagcat tctgtaaaa agcgggacca 120  
 [0104] aagccatgac aaaaacgct acaaaaagt tctataatca cggcagaaaa gtccacattg 180  
 [0105] attatttgc a cgcgctcaca ctttgctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg 240  
 [0106] atctacctg acgcttttta tcgcaactct ctactgttcc tccataaccg ttttttgggc 300  
 [0107] taacaggagg aattaacct ggagaaaagt ttcgtgataa ctgatccaag gctgccagac 360  
 [0108] aatcccatac tcttcgcatc cgatggcttc ctggagctga ccgagtatc cagagaggag 420  
 [0109] atctgggccc gcaatggcgc ctttctgcag ggaccagaga cagaccaggc cacagtgcag 480  
 [0110] aagattcgcg atgccattag agatcgcgc gagattaccg tgcagctgat aaactacaca 540  
 [0111] aaaagcggga agaaattctg gaacctctg cacctccagc ccatgaggga ccagaagggt 600  
 [0112] gagetccagt atttcatcgg agtgcagctg gatggaaagc ttgggcccga acaaaaactc 660  
 [0113] atctcagaag aggatctgaa tagcgcgctc gaccatcacc atcatcatca ttgagtttaa 720  
 [0114] acggtctcca gcttggctgt tttggcggat gagagaagat tttcagcctg atacagatta 780  
 [0115] aatcagaacg cagaagcggc ctgataaac agaatttccc tggcggcagc agcgcggtgg 840  
 [0116] tcccacctga ccccatgcc aactcagaag tgaacgcgc tagcgcgat ggtagtgtgg 900  
 [0117] ggtctcccca tgcgagagta gggaactgcc aggcacaaa taaaacgaaa ggctcagtcg 960  
 [0118] aaagactggg ctttctgtt tatctgttgt ttgtcgtgta acgctctcct gtagtagaca 1020  
 [0119] aatccgccgg gagcggattt gaacgttgcg aagcaacgac ccggagggtg gcgggcagga 1080  
 [0120] cgcccgcct aaactgccag gcatcaaat aagcagaagg ccatctgac ggatggcctt 1140  
 [0121] tttgcgttcc taaaaactct tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct 1200  
 [0122] catgagacaa taacctgat aatgcttca ataatttga aaaaggaaga gtatgagtat 1260  
 [0123] tcaacatttc cgtgtcgcgc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 1320  
 [0124] tcaccagaa acgctgggtg aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggt 1380  
 [0125] ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgc ccaagaacg 1440

[0126]	ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtgttga 1500
[0127]	cgccgggcaa gagcaactcg gtcgcccat acactattct cagaatgaet tggttgagta 1560
[0128]	ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 1620
[0129]	tgcataacc atgagtgata aactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 1680
[0130]	gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 1740
[0131]	ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtage 1800
[0132]	aatggcaaca acgttgcga aactattaac tggcgaaeta cttactctag cttcccggea 1860
[0133]	acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggecct 1920
[0134]	tccggctggc tggtttattg ctgataaatc tggagccggt gacgctgggt ctcgcggtat 1980
[0135]	cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg 2040
[0136]	gagtcagca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat 2100
[0137]	taagcattgg taactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 2160
[0138]	tcatttttaa tttaaaagga tctagtgtaa gatccttttt gataatctca tgacccaaat 2220
[0139]	ccettaacgt gagtttctg tccaactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 2280
[0140]	ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaa aaccaccgct 2340
[0141]	accagcgtg gtttgttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg 2400
[0142]	cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt cttctagtg tagccgtagt taggccacca 2460
[0143]	cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc 2520
[0144]	tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 2580
[0145]	taaggcgcag cggtcggct gaacgggggg ttctgtcaca cageccagct tggagegaa 2640
[0146]	gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagegcca cgttcccgga 2700
[0147]	aggagaaaag gcggacaggt atccgtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 2760
[0148]	ggagctcca ggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttc gccacctctg 2820
[0149]	acttgagcgt cgattttgt gatgctctgc agggggcgagg agcctatgga aaaacgccag 2880
[0150]	caacgcggcc tttttacggt tcttgccct ttgctggcct tttgctcaca tgtttttcc 2940
[0151]	tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 3000
[0152]	tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgcct 3060
[0153]	gatgcggtat tttctcctta cgcattctg cggattttca caccgeatg ggtgactct 3120
[0154]	cagtacaate tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat acactccgct atcgctacgt 3180
[0155]	gactgggtca tggctgcgcc ccgacaccg ccaacaccg ctgacgcgcc ctgacgggt 3240
[0156]	tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt 3300
[0157]	cagaggtttt caccgtcacc accgaaacgc gcgaggcagc agatcaattc gcgcgcgaag 3360
[0158]	gcgaagcggc atgcataatg tgctgtcaa atggacgaag cagggttct gcaaacceta 3420
[0159]	tgctactccg tcaagccgtc aattgtctga ttctttacca attatgacaa cttgacggct 3480
[0160]	acatcattca cttttcttc acaaccggca cggaactcgc tcgggctggc cccggtgcat 3540
[0161]	ttttaaata cccgcgagaa atagagttga tcgtcaaac caacattgcg accgacggtg 3600
[0162]	gcgataggca tccgggtggg gctcaaaaagc agcttcgct ggctgatacg ttggctctcg 3660
[0163]	cgccagetta agacgetaat ccctaactgc tggcggaaaa gatgtgacag acgcgacggc 3720
[0164]	gacaagcaaa catgctgtgc gacgtggcg atataaaaat tgctgtctgc cagggtgatc 3780
[0165]	ctgatgtact gacaagcctc gcgtaccgca ttatccatcg gtggatggag cgactcgta 3840
[0166]	atcgctcca tgcgccgag taacaattgc tcaagcagat ttatcgccag cagctccgaa 3900
[0167]	tagcgcctt ccccttgcgc ggcgttaatg atttgcccac acaggtcgt gaaatgcggc 3960

---

[0168]	tggtgcgett catccggcg aaagaacccc gtattggcaa atattgacgg ccagttaagc	4020
[0169]	cattcatgcc agtaggcgcg cggacgaaag taaaccact ggtgatacca ttegegagcc	4080
[0170]	tccggatgac gaccgtagtg atgaatctct cctggcgggga acagcaaaat atcaccgggt	4140
[0171]	cggcaaaaa attctctcc ctgatttttc accaccct gaccggaat ggtgagattg	4200
[0172]	agaatataac ctttcattcc cagcggtcgg tcgataaaaa aatcgagata accgttggcc	4260
[0173]	tcaatcgcg ttaaaccgc caccgatgg gcattaaacg agtatccgg cagcagggga	4320
[0174]	tcattttgcg ctccagccat acttttcata ctccgccat tcagag	4366

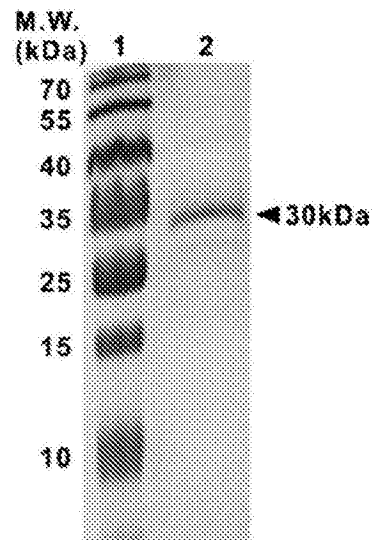


图1

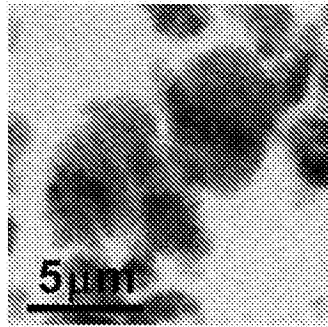


图2A

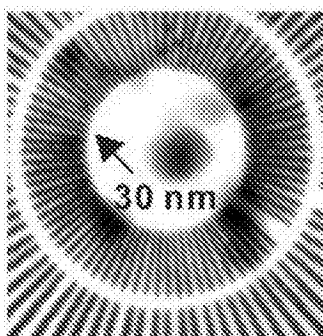


图2B

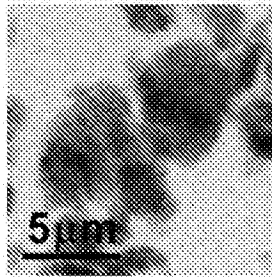


图3A

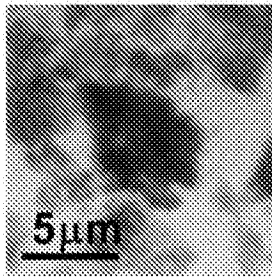


图3B

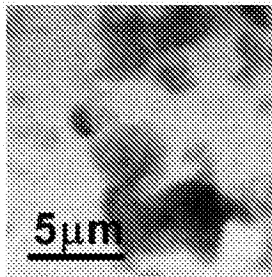


图3C

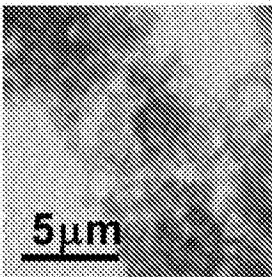


图3D

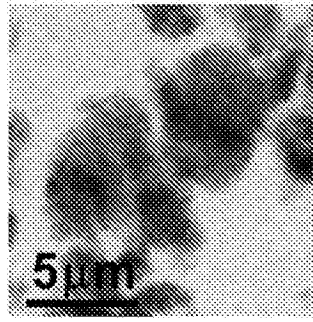


图4A

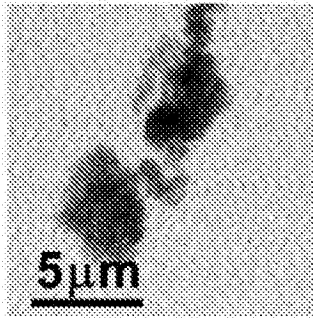


图4B

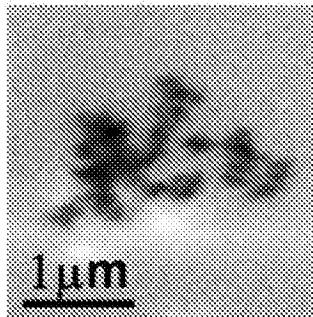


图4C