



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103436540 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 11

(21) 申请号 201310414921. 8

(22) 申请日 2013. 09. 12

(71) 申请人 黑龙江省科学院高技术研究院

地址 150010 黑龙江省哈尔滨市道外区南马路 135 号

(72) 发明人 王雷 黄国庆 李瑶 吴琼

曹涤非 王东凯 陈立娟

(74) 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事

务所 23109

代理人 侯静

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006. 01)

C07K 14/415 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表6页 附图5页

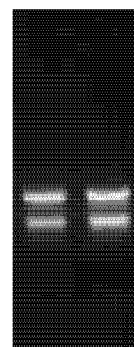
(54) 发明名称

罗布麻 eIF-5A 基因及其编码蛋白

(57) 摘要

罗布麻 eIF-5A 基因及其编码蛋白, 它涉及罗布麻 eIF-5A 基因及其编码蛋白。罗布麻 eIF-5A 基因的核苷酸序列如 SEQ ID No :1 所示, 其编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。本发明是从抗逆性极强、且具有药用价值和经济价值的罗布麻中克隆 eIF-5A 基因 ; 该基因 cDNA 序列为 909bp, 开放读码框为 480bp, 编码 159 个氨基酸。在盐碱、干旱、低温胁迫条件下, AveIF-5A 基因表达量在根、茎、叶中均升高。AveIF-5A 完整 ORF 及删减子 AveIF-5A86-156aa 均能提高酵母菌抗盐碱的能力。盐碱胁迫条件下, AveIF-5A 基因在植物中过量表达可以提高植物抗逆性, 缓解植物膜的过氧化作用。

1 2



1. 罗布麻 eIF-5A 基因,其特征在于罗布麻 eIF-5A 基因的核苷酸序列如 SEQ ID No :1 所示。
2. 罗布麻 eIF-5A 基因的编码蛋白,其特征在于罗布麻 eIF-5A 基因的编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。

罗布麻 eIF-5A 基因及其编码蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及罗布麻 eIF-5A 基因及其编码蛋白。

背景技术

[0002] 荒漠化是一个全球性的问题,全球荒漠化面积是 4000 万 km²,且每年还在以 5-7 万 km² 的速度扩展,威胁到全球近三分之一的土地和十多亿人的生活。我国是世界荒漠化土地面积较大的国家之一,荒漠化土地面积 262.2 万 km²,占国土总面积的 27.3%,每年因荒漠化造成直接经济损失达到 540 亿元。黑龙江省西部地区荒漠化现象十分严重,面积已达 54079.27km²,占全省总土地面积 45.48 万 km² 的 11.89%。荒漠化给工、农、牧业生产和人民生活带来了严重影响。农业生态、生产环境恶化,农田受到荒漠化的危害,耕地和草地严重退化。面对现实,应积极采取有力措施,控制荒漠化产生的条件,依靠科学技术与荒漠化作斗争,耐旱、耐盐碱、耐寒和抗风沙植物的有效利用在土地荒漠化防治中发挥着巨大的作用。

[0003] 罗布麻是一种极具开发价值的多年生草本野生植物,又称红麻或茶叶花,是夹竹桃科罗布麻属,在我国新疆、青海、甘肃、宁夏、内蒙古、山东等省区均有分布,大多生长在盐碱沙荒地、沙漠上,耐寒、耐旱、耐盐、抗风沙,对于荒漠化的治理具有积极意义。罗布麻全身是宝,是一种集盐碱地绿化价值、纤维价值、药用价值于一体的野生优良水土保持植物,生态效益和经济效益兼具,可以说是盐碱、沙漠、干旱地区最具开发潜力和价值的植物品种之一。关于罗布麻的研究多集中于药用价值的开发和利用,以及盐碱、干旱胁迫条件下生理变化,栽培、组织培养再生体系的研究;关于罗布麻分子生物学方面的研究较少,对于罗布麻抗逆相关基因的克隆和功能分析就更少。

[0004] eIF-5A(eukaryotic translation initiation factor,eIF-5A)是真核细胞蛋白翻译起始因子,在真核细胞内普遍存在,由 154 个氨基酸残基组成,相对分子质量约为 16700,等电点约为 5.1,是目前发现的惟一个含羧腐胺赖氨酸(hypusine)残基的蛋白质,其前体无活性,经过 DHS 酶催化、修饰加工后成为有活性的 eIF-5A 蛋白。关于 eIF-5A 的研究在人和酵母细胞中的报道较多,有报道称 eIF-5A 与细胞中的许多生命活动有关,如细胞增殖、蛋白质翻译、mRNA 降解、细胞周期的转化及细胞衰老与凋亡。eIF-5A 在植物中的研究起步较晚,虽然有报道称将 eIF-5A 导入拟南芥、香蕉、杨树中,提高了转基因植株的生物量和抗逆性,但是该基因的功能和作用机理并不十分清楚,尤其是在逆境环境下,该基因生物学功能的研究就更少。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供罗布麻 eIF-5A 基因及其编码蛋白。

[0006] 本发明的罗布麻 eIF-5A 基因的核苷酸序列如 SEQ ID No1 所示。

[0007] 本发明的罗布麻 eIF-5A 基因的编码蛋白的氨基酸序列如 SEQIDNO:2 所示。

[0008] 本发明是从抗逆性极强、且具有药用价值和经济价值的植物——罗布麻中克隆 eIF-5A 基因;该基因在低温、干旱、盐碱胁迫条件下的表达情况;将该基因完整 ORF 及不同

功能区的删减子序列导入到酵母中,通过对转基因酵母抗逆性的分析,确定不同功能区与抗逆性的关系;为进一步验证 eIF-5A 基因的功能,构建 eIF-5A 基因植物表达载体,转化烟草,通过对转基因植株分子生物学检测和抗逆性分析,确定 eIF-5A 基因过量表达对植物抗逆性的影响,从而对该基因的功能进行鉴定。本发明中为进一步揭示罗布麻 eIF-5A 基因在逆境条件下的生物学功能奠定基础,也为该基因在抗逆基因工程育种中的应用提供理论依据和基因资源。

[0009] 本发明从罗布麻中克隆获得 eIF-5A 基因 cDNA 序列为 909bp, 开放读码框为 480bp, 编码 159 个氨基酸。在盐碱、干旱、低温胁迫条件下,AveIF-5A 基因表达量在根、茎、叶中均升高。AveIF-5A 完整 ORF 及删减子 AveIF-5A86-156aa 均能提高酵母菌抗盐碱的能力。盐碱胁迫条件下, AveIF-5A 基因在植物中过量表达可以提高植物抗逆性,缓解植物膜的过氧化作用。

附图说明

[0010] 图 1 为本发明中罗布麻叶片总 RNA 的电泳图,其中 1 和 2 均为罗布麻叶片 RNA 电泳结果;

[0011] 图 2 为本发明中 AveIF-5A 简并引物 PCR 结果的电泳图,其中 M 为 DL2000,1 为简并引物 PCR 产物;

[0012] 图 3 为本发明中 AveIF-5A5'RACE 扩增产物的电泳图,其中 M 为 DL2000,1 为 5'RACE 扩增产物;

[0013] 图 4 为本发明中 AveIF-5A3'RACE 扩增产物的电泳图,其中 M 为 DL2000,1 为 sp5/anchorprimerPCR 产物,2 为 sp4/anchorprimerPCR 产物;

[0014] 图 5 为本发明中 AveIF-5A 保守功能区域图;

[0015] 图 6 为本发明中 NaHCO_3 胁迫下罗布麻 eIF-5A 基因在根茎叶中的表达的柱状图,其中  为叶,  茎,  为根;

[0016] 图 7 为本发明中干旱胁迫下罗布麻 eIF-5A 基因在根茎叶中的表达的柱状图,其中  为叶,  茎,  为根;

[0017] 图 8 为本发明中低温胁迫下罗布麻 eIF-5A 基因在根茎叶中的表达的柱状图,其中  为叶,  茎,  为根;

[0018] 图 9 为本发明中 AveIF-5A 完整 ORF 及删减子示意图;

[0019] 图 10 为本发明中重组菌在 NaHCO_3 胁迫下的存活率的柱状图;

[0020] 图 11 为本发明中转 eIF-5A 基因烟草 PCR 检测的电泳图,其中 M 为 DL2000,1-16 为待检植株,17 为空白对照,18 为阳性对照;

[0021] 图 12 为本发明中 NaHCO_3 胁迫对烟草 POD 活性的影响的柱状图,其中  为未胁迫,  为胁迫;

[0022] 图 13 为本发明中 NaHCO_3 胁迫对烟草 SOD 活性的影响的柱状图,其中  为未胁迫,  为胁迫;

[0023] 图 14 为本发明中 NaHCO_3 胁迫对烟草 MDA 含量的影响的柱状图,其中  为未胁迫,

■ 为胁迫。

具体实施方式

[0024] 本发明技术方案不局限于以下所列举具体实施方式,还包括各具体实施方式间的任意组合。

[0025] 具体实施方式一:本实施方式罗布麻 eIF-5A 基因的核苷酸序列如 SEQ ID No1 所示。

[0026] 本实施方式中罗布麻 eIF-5A 基因的 cDNA 序列为 909bp, 开放读码框为 480bp, 编码 159 个氨基酸。

[0027] 具体实施方式二:本实施方式罗布麻 eIF-5A 基因的编码蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

[0028] 1、罗布麻 eIF-5A 基因的获得方法如下:

[0029] 罗布麻 eIF-5A 基因克隆:利用 SDS 法提取野生罗布麻叶片的总 RNA,以 Oligo d(T)₁₈ 为引物,参照大连宝生物 Reverse TranscriptaseM-MLV(RNaseH-) 方法反转录为 cDNA;在 NCBI 上检索获得美洲黑杨 (FJ032302)、紫苜蓿 (AF416338)、马铃薯 (AB004823)、葡萄 (XM_002273229)、月季 (DQ345329)、巴西橡胶 (AF516357)、木薯 (AF266464) 的 eIF-5A 基因序列,进行序列比对后在同源保守区设计简并引物 AveIF-5AJ-F 和 AveIF-5AJ-R,进行 PCR 后测序,获得 eIF-5A 基因部分序列,设计 5' /3' RACE 引物 SP1、SP2、SP3、SP4 和 SP5。按照 Roche5' /3' RACE Kit, 2nd Generation 试剂盒的方法克隆罗布麻 eIF-5A 基因 5' /3' 端

[0030] 上述引物序列见表 1:

[0031]

Name	Primer sequence
Oligo d(T) ₁₈	TTTTTTTTTTTTTTTTTT
AveIF-5AJ-F	CNCARCARGCNGGNACNA
AveIF-5AJ-R	ATYTGyTCyTCNCCCAT
SP1	CTTCCCTCAGCAAATCCATC
SP2	TGGTAATCAACACGGTTCACAT
SP3	CTTGCCAGTCTTGAAGTTGA
SP4	AGATATTGTCCCTCTCCAC
SP5	CTGAGGCTCCCAACAGATGA

[0032] 上述 RT-PCR 的反应体系为 20 μl 反应体系,由下列成分组成:

[0033]

成分	用量
20 ng/ μ l cDNA 模版	2 μ l
10 μ M 引物 AveIF-5AJ-F	1 μ l
10 μ M 引物 AveIF-5AJ-R	1 μ l
10 $\times$ <i>Taq</i> Buffer	2 μ l
25mM MgCl ₂	2 μ l
dNTP Mixture 10mM each	0.4 μ l
5u/ μ l <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.2 μ l
去离子水	11.4 μ l

[0034] PCR 扩增条件为 :94℃ 预变性 3min;94℃ 变性 30s,54℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,30 个循环 ;72℃ 延伸 7min,4℃ 保温。

[0035] 结果 :

[0036] ①罗布麻总 RNA 提取 :由图 1 可见,RNA 的 28SrRNA 和 18SrRNA 的条带清晰,且 28SrRNA 亮度明显高于 18SrRNA,说明应用 SDS 法提取的总 RNA 无降解,质量合格。经核酸蛋白检测仪检测表明,所提取的 RNA 的 A260nm/A280nm 在 1.8 ~ 2.1 之间,平均在 2.0 左右,说明 RNA 的纯度较高。

[0037] ②罗布麻 eIF-5A 基因 cDNA 克隆 :利用简并引物 PCR 获得 388bp 的 DNA 片段 (见图 2),经 BlastX 比对发现,该片段具有典型的 eIF-5A 基因保守序列,将含此片段的基因命名为 AveIF-5A 基因,对此 cDNA 片段设计特异引物,分别采用 5' /3' RACE(rapid amplification of cDNA ends) 的方法扩增 AveIF-5A 基因的 5' /3' 端,5' RACE 得到一条 283bp 的片段 (图 3),3' RACE 得到一条 500bp 的条带 (图 4)。

[0038] 2、罗布麻 eIF-5A 基因及其推导编码蛋白的生物信息学分析 :

[0039] 采用 NCBI 中的 ORF 程序和保守功能区分析程序推测该基因的 5' /3' 非翻译区、ORF 区和保守功能区,获得罗布麻 eIF-5A 基因的编码蛋白的氨基酸序,ProtParam 计算该基因编码蛋白分子量和等电点,SignalP3.0 预测该蛋白的信号肽。

[0040] 结果 :

[0041] ①AveIF-5A 全长 cDNA 序列分析 :经电子拼接获得带有 PolyA 的全长 cDNA 序列为 909bp。采用 NCBI 中的 ORF 程序显示 5' 非翻译区为 86bp,3' 非翻译区为 340bp,开放读码框为 480bp,编码 159 个氨基酸。经过 ProtParam 计算 AveIF-5A 基因编码的蛋白质分子量为 17.48kDa,理论等电点为 5.61,此基因编码的 159 个氨基酸中 Asp 最多,占氨基酸总数的 9.4%。带负电荷的氨基酸 (Asp+Glu) 有 26 个,带正电荷的氨基酸 (Arg+Lys) 共有 20 个。不稳定系数为 26.79,该蛋白是稳定蛋白。

[0042] ②AveIF-5A 亚细胞定位和特定功能位点的预测 :用 NCBI 的保守功能区域 (conserved domains) 分析程序预测蛋白的保守区,结果表明该蛋白拥有 eIF-5A 保守序列,保守区位于第 86 ~ 156 氨基酸之间 (见图 5)。PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) 亚细胞定位预测的结果显示 :AveIF-5A 定位于细胞质的可信度为 0.65,定位于线粒体基质中

的可信度为 0.1, 定位于内质网膜的可信度为 0。

[0043] ③ AveIF-5A 信号肽的预测 :SignalP3.0 预测该蛋白没有信号肽, 为非分泌型蛋白。

[0044] 3、罗布麻 eIF-5A 基因的表达分析 :分别用 0.4mol/L NaHCO₃ 和 20% (W/V) PEG6000 溶液对罗布麻幼苗进行胁迫处理, 在 4℃ 的人工气候室内进行低温胁迫。在胁迫 0、12、24、48 和 72h, 取处理组和对照组罗布麻根、茎、叶, 用 Real-time PCR 法检测 eIF-5A 基因在 mRNA 水平的表达情况, 罗布麻 GAPDH 基因作为内参基因(见表 2), 利用 $\Delta\Delta CT$ 法计算目的基因的相对表达量, 所得数据利用 SpASS11.0 统计软件进行单因素方差分析 Duncan 检验。

[0045] 表 2 Real-time PCR 引物序列

Name	Primer sequence
GAPDH	F: ACNGGNGTNTTYACNGAYAARGA
	R: ACYTTNCCNACNGCYTTNGC
eIF-5A	F: TTCTCTCCCTTTTCTCAGTCCTT
	R: CACAGACAGTTTACTTGGGACC

[0047] 上述 PCR 的反应体系为 20 μ l 反应体系, 由下列成分组成 :

[0048]

成分	用量
2 $\times$ SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)	10 μ l
10 μ M PCR Forward Primer	1 μ l
10 μ M PCR Reverse Primer	1 μ l
20 ng/ μ l cDNA 模版	2 μ l
去离子水	6 μ l

[0049] PC 扩增条件为 :94℃ 预变性 30s; 94℃ 变性 12s, 58℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 40s, 81℃ 1s 后读板, 44 轮循环 ;55 ~ 99℃ 融解曲线分析。

[0050] 结果 :

[0051] 见图 6、7、8; 在正常生长状态下) AveIF-5A 基因在根、茎、叶中均表达。在 NaHCO₃、干旱、低温胁迫条件下, AveIF-5A 基因表达量在根、茎、叶中均升高, 此基因在根中表达量变化并不显著。随着胁迫时间的延长, AveIF-5A 基因在茎和叶中的表达量逐渐升高。

[0052] 4、eIF-5A 基因不同功能区的真核表达及抗逆性分析 :根据罗布麻 eIF-5A 基因的生物信息学预测, 在 ORF 区两侧及删减子两侧(见图 9) 加入 Xba I 和 Xho I 酶切位点和保护碱基, 设计引物并 PCR, 得到了带有酶切位点的片段, 引物名称分别为 AveIF-5A 和 AveIF-SAD (见表 3)。将该基因完整 ORF 及相关功能区的删减子 cDNA 构建到表达载体上, 分别转化酵母 (INVSc1) (方法见 Invitrogen 公司 pYES2 中的操作方法), 对转基因酵母进行分子生物学检测及 NaHCO₃ 抗逆性分析, 以确定 eIF-5A 不同功能区与抗逆性的关系。

[0053] 表 3 载体构建所用引物

	Name	Primer sequence
[0054]	AveIF-5A	F: CCGCTCGAGCGGAGAAGACGATCATG R: GGCTCTAGAGCAATTTGACACAGACAGTT
	AveIF-5AD	F: CCGCTCGAGCGCACAACCTGTGATGTTCCC R: GGCTCTAGAGCGACAGTTTACTTGGGACC

[0055] 上述 PCR 体系如下：

[0056]

成分	用量
20 ng/ μ l cDNA 模版	2 μ l
10 μ M PCR Forward Primer	1 μ l
10 μ M PCR Reverse Primer	1 μ l
10 $\times$ <i>Taq</i> Buffer	2 μ l
25mM MgCl ₂	2 μ l
dNTP Mixture 10mM each	0.4 μ l
5u/ μ l <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.2 μ l
去离子水	11.4 μ l

[0057] PCR 扩增条件为：94℃预变性 3min；94℃变性 30s，58℃退火 30s，72℃延伸 1min，30 个循环；72℃延伸 7min，4℃保温。

[0058]

上述酶切的体系如下：

成分	用量
10 $\times$ Buffer Tango	4 μ l
<i>Xba</i> I	1 μ l
<i>Xho</i> I	1 μ l
DNA	$\leq$ 1 μ g
灭菌水	up to 20 μ l

[0059] 酶切条件为：37℃酶切过夜。

[0060] 上述连接的体系如下：

[0061] 用 Promega T4 DNA Ligase 对 pYES2 质粒酶切产物和目的基因酶切产物进行连接，连接体系如下：

[0062]

成分	用量
----	----

[0063]

Ligase 10× Buffer	1μl
vector DNA	100 ng
Insert DNA	17ng
3u/μl T4 DNA Ligase	1 u
灭菌水	up to 10 μl

4 °C连接过夜。

[0064] 结果：

[0065] 将相同细胞密度的对照菌 INVSc1/pYES2 和两种重组菌 INVSc1/pYES2-AveIF-5A、INVSc1/pYES2-AveIF-5A_{86-156aa} 涂布在正常和胁迫培养基上。培养一段时间后,统计培养基上的菌斑数目。计算各菌株的存活率(图 10)。NaHCO₃ 胁迫下, INVSc1/pYES2-AveIF-5A 重组菌的存活率高于对照和删减子 INVSc1/pYES2-AveIF-5A_{86-156aa}, 删减子 INVSc1/pYES2-AveIF-5A_{86-156aa} 的存活率高于对照。

[0066] 5、eIF-5A 基因功能验证:将 eIF-5A 基因构建于植物表达载体 pKYLX-71 上,通过农杆菌介导法转化烟草 SR-I (Nicotiana tabacum L. cv. Petit HavanaSR-I), 对转基因植株进行 PCR 检测。分别检测非转基因和转基因烟草在正常生长和 NaHCO₃ 胁迫状态下的 POD 活性、SOD 活性、MDA 含量,以确定 eIF-5A 基因过量表达对植物抗逆性的影响。

[0067] 上述 PCR 的反应体系为 20 μl 反应体系,由下列成分组成：

[0068]

成分	用量
20 ng/μl cDNA 模版	2μl
10 μM 引物 AveIF-5A -F	1μl
10 μM 引物 AveIF-5A -R	1μl
10×Taq Buffer	2μl
25mM MgCl ₂	2μl
dNTP Mixture 10mM each	0.4μl
5u/μl Taq DNA Polymerase	0.2μl
去离子水	11.4μl

[0069] PC 扩增条件为:94°C 预变性 5min;94°C 变性 30s,58°C 退火 30s,72°C 延伸 1min,30 轮循环;72°C 延伸 7min,4°C 保温。

[0070] 结果：

[0071] 将罗布麻 eIF-5A 基因克隆到植物表达载体上,转化农杆菌,利用杆菌介导法转化烟草,图 11 是转基因烟草 PCR 的结果。用 0.25MNaHCO₃ 胁迫一周后对转基因烟草生理指标进行检测,结果见图 12, 13, 140 正常生长情况下,转基因植株 POD 活性、SOD 活性略高于对照,MDA 含量略低于对照;盐胁迫条件下,非转基因植株 POD 活性、SOD 活性迅速增强,MDA 含

量高于转基因植株。这说明 eIF-5A 基因过量表达可以提高植物的抗逆性,对植物膜脂的过氧化作用有一定的缓解。

[0072] 结论:

[0073] 1. 从罗布麻中克隆获得 eIF-5A 基因 cDNA 序列为 909bp, 开放读码框为 480bp, 编码 159 个氨基酸。

[0074] 2. 在盐碱、干旱、低温胁迫条件下, AveIF-5A 基因表达量在根、茎、叶中均升高。

[0075] 3. AveIF-5A 全长 cDNA 及删减子 AveIF-5A86-156aa 均能提高酵母菌抗盐碱的能力。

[0076] 4. 盐碱胁迫条件下, AveIF-5A 基因在植物中过量表达可以提高植物的抗逆性,缓解植物膜脂的过氧化作用。

[0001]

序 列 表

<110> 黑龙江省科学院高技术研究院

<120> 罗布麻 eIF-5A 基因及其编码蛋白

<160> 18

<210> 1

<211> 909

<212> cDNA

<213> 罗布麻属(*Apocynum*)

<220>

<221> CDS

<222> (90)...(566)

<400> 1

```

cttgtctatt ctctcccttt tctcagtcct ttttctctc tctttgtgct tatcaaaacc 60
ttttcgaagc tctcgcgaag aagacgac atg tgc gac gag gag cat cat ttc 113
                               Met Ser Asp Glu Glu His His Phe
                               1           5
gag tcc aag gcc gac gcc gga gct tgc aag acc tac cct cag caa gcc 161
Glu Ser Lys Ala Asp Ala Gly Ala Ser Lys Thr Tyr Pro Gln Gln Ala
    10           15           20
ggt act atc cgt aag aac ggc tac atc gtc atc aag gcc aga cct tgc 209
Gly Thr Ile Arg Lys Asn Gly Tyr Ile Val Ile Lys Ala Arg Pro Cys
    25           30           35           40
aag gtt gtg gaa gtg tca act tcc aag act ggc aag cat ggc cat gcc 257
Lys Val Val Glu Val Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala
           45           50           55
aaa tgt cac ttc gtt ggg att gat ata ttc aat gga aag aag ctg gaa 305
Lys Cys His Phe Val Gly Ile Asp Ile Phe Asn Gly Lys Lys Leu Glu
           60           65           70
gat att gtt ccc tct tcc cac aac tgt gat gtt ccc cat gtg aac cgt 353
Asp Ile Val Pro Ser Ser His Asn Cys Asp Val Pro His Val Asn Arg
           75           80           85
gtt gat tac cag ctg att gac atc tct gag gac ggc ttt gtt agc ctt 401
Val Asp Tyr Gln Leu Ile Asp Ile Ser Glu Asp Gly Phe Val Ser Leu
           90           95          100
ctc act gat aat ggt gaa act aag gat gac ctg agg ctc cca aca gat 449
Leu Thr Asp Asn Gly Glu Thr Lys Asp Asp Leu Arg Leu Pro Thr Asp
        105          110          115          120
gag aat ctg ctt aaa cag atc aag gat gga ttt gct gag gga aag gat 497
Glu Asn Leu Leu Lys Gln Ile Lys Asp Gly Phe Ala Glu Gly Lys Asp
           125          130          135
ctg att gtg tca gtg atg tca tca atg ggg gag gag cag atc tgc gcc 545

```

[0002]

```

Leu Ile Val Ser Val Met Ser Ser Met Gly Glu Glu Gln Ile Cys Ala
      140                      145                      150
ctc aag gat att ggt ccc aag taa actgtctgtg tcaaattact atgaaggettc 600
Leu Lys Asp Ile Gly Pro Lys  *
      155                      159
tatattatat tggaatagac cigtctcttaa cacagtggcg agggaggatc atgaaccacc 660
atgttttctt tttattttat atttagggca ctggactctt gatgggtgat tatggcatca 720
gagctttata agtttagtag ttaatcttgt cacttttggg tgcgttttga acttgtttat 780
ttgtgtgggg aagaatttac tgggtgacaag tgtatactta aaagcaccct caacagctgt 840
ggagatgcga gttctctttt tattgtttaa tgaacaaatg aattgattct cctcaaaaaa 900
aaaaaaaaa 909

```

<210> 2

<211> 159

<212> PRT

<213> 罗布麻属(*Apocynum*)

<400> 2

```

Met Ser Asp Glu Glu His His Phe Glu Ser Lys Ala Asp Ala Gly
      5                      10                      15
Ala Ser Lys Thr Tyr Pro Gln Gln Ala Gly Thr Ile Arg Lys Asn
      20                      25                      30
Gly Tyr Ile Val Ile Lys Ala Arg Pro Cys Lys Val Val Glu Val
      35                      40                      45
Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys His Gly His Ala Lys Cys His Phe
      50                      55                      60
Val Gly Ile Asp Ile Phe Asn Gly Lys Lys Leu Glu Asp Ile Val
      65                      70                      75
Pro Ser Ser His Asn Cys Asp Val Pro His Val Asn Arg Val Asp
      80                      85                      90
Tyr Gln Leu Ile Asp Ile Ser Glu Asp Gly Phe Val Ser Leu Leu
      95                      100                     105
Thr Asp Asn Gly Glu Thr Lys Asp Asp Leu Arg Leu Pro Thr Asp
      110                     115                     120
Glu Asn Leu Leu Lys Gln Ile Lys Asp Gly Phe Ala Glu Gly Lys
      125                     130                     135
Asp Leu Ile Val Ser Val Met Ser Ser Met Gly Glu Glu Gln Ile
      140                     145                     150
Cys Ala Leu Lys Asp Ile Gly Pro Lys
      155                     159

```

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

[0003]

<220>

<223> 引物 Oligo d(T)₁₈ 的核苷酸序列。

<400> 3

ttttttttttt tttttttt 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 AveIF-5AJ-F 的核苷酸序列。

<400> 4

cncarcargc nggnacna 18

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 AveIF-5AJ-R 的核苷酸序列。

<400> 5

atytytctyt cneccat 17

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 SP1 的核苷酸序列。

<400> 6

ctttccctca gcaaattccat c 21

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 SP2 的核苷酸序列。

[0004]

<400> 7

tggtaatcaa cacggttcac at 22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 引物 SP3 的核苷酸序列。

<400> 8

ettgccagtc ttggaagttg a 21

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 引物 SP4 的核苷酸序列。

<400> 9

agatatgtgt cccctcttccc ac 22

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 引物 SP6 的核苷酸序列。

<400> 10

ctgaggctcc caacagatga 20

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 引物 GAPDH-F 的核苷酸序列。

<400> 11

[0005]

acnggngtnt tyacngayaa rga 23

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 GAPDH-R 的核苷酸序列。

<400> 12

acyttncena engcyttngc 20

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 eIF-5A-F 的核苷酸序列。

<400> 13

ttctctccct ttctctcagtc ctt 23

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 eIF-5A-R 的核苷酸序列。

<400> 14

cacagacagt ttacttgga cc 22

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 AveIF-5A-F 的核苷酸序列。

<400> 15

ccgctcgagc ggagaagacg atcatg 26

[0006]

<210> 16
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 AveIF-5A-R 的核苷酸序列。

<400> 16
ggctctagag caatttgaca cagacagtt 29

<210> 17
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 AveIF-5AD-F 的核苷酸序列。

<400> 17
ccgctcgagc gcacaactgt gatgttccc 29

<210> 18
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 AveIF-5AD-R 的核苷酸序列。

<400> 18
ggctctagag cgacagttta cttgggacc 29

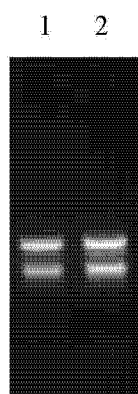


图 1

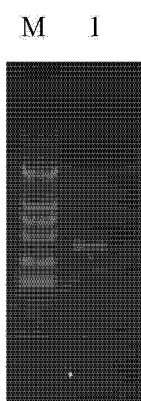


图 2

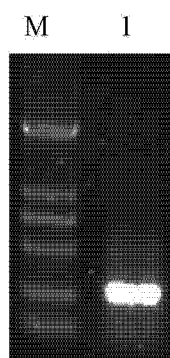


图 3

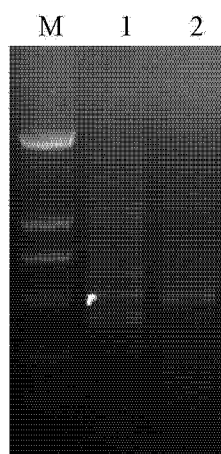


图 4

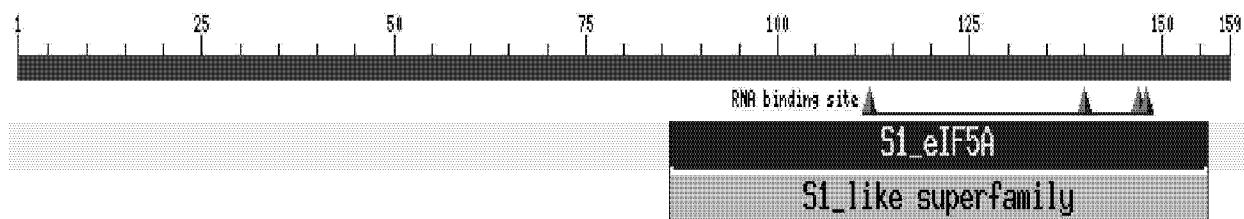


图 5

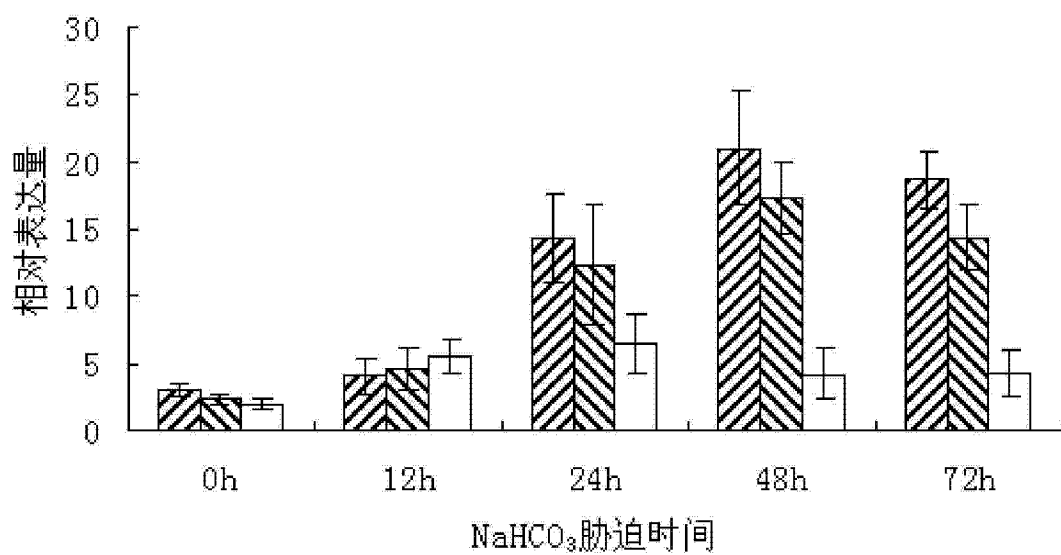


图 6

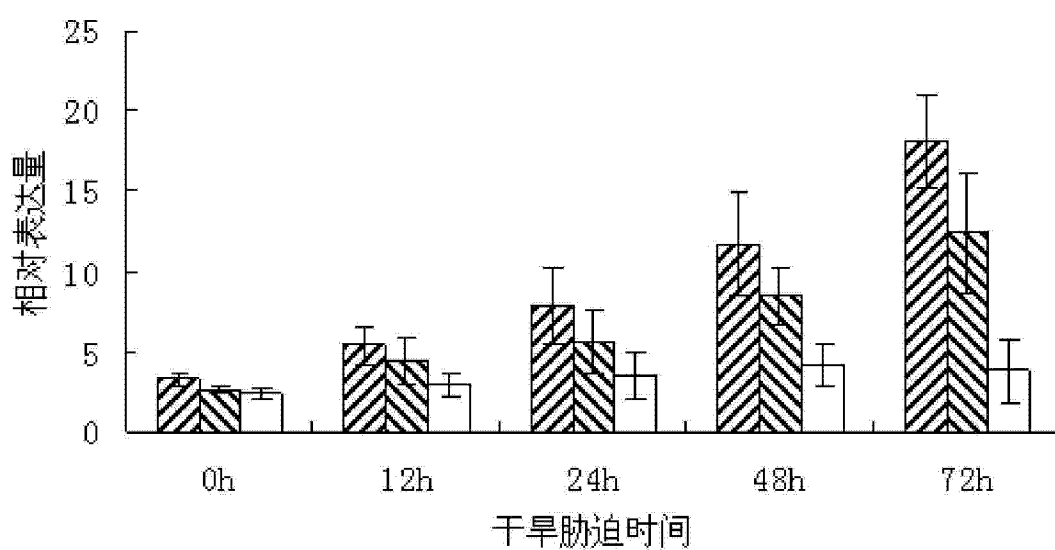


图 7

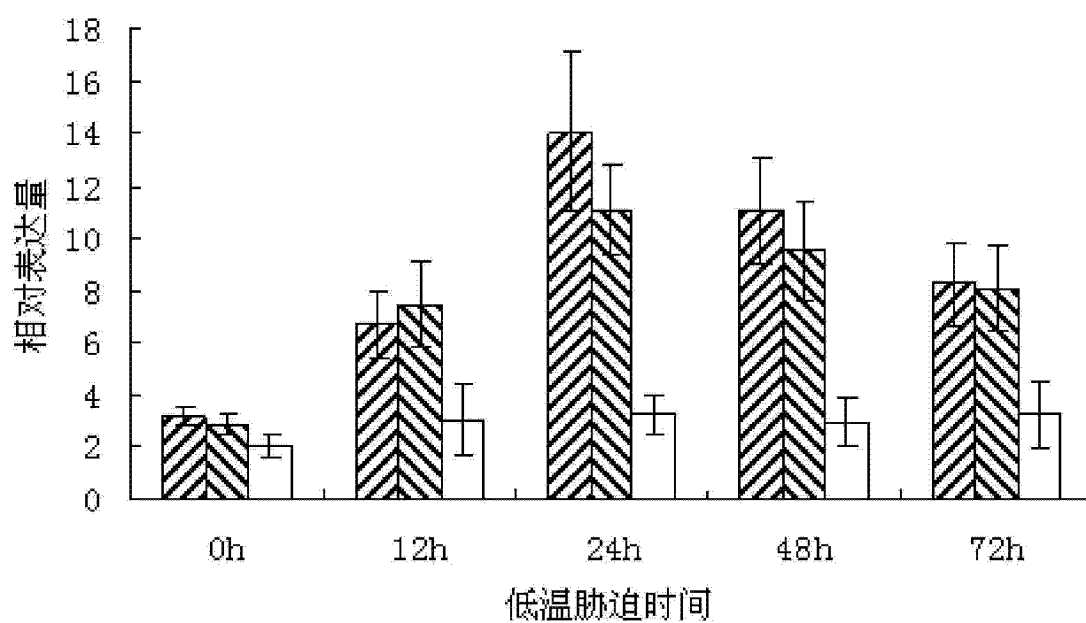


图 8

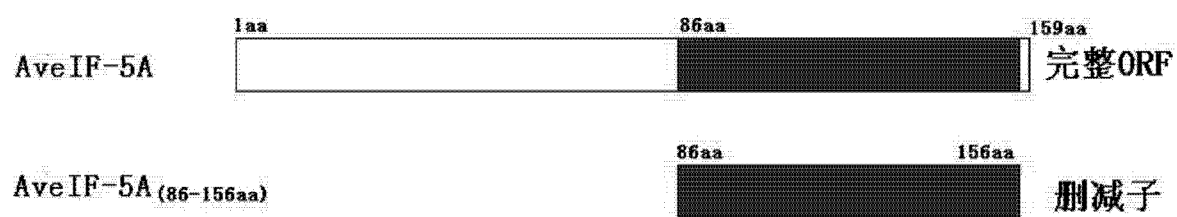


图 9

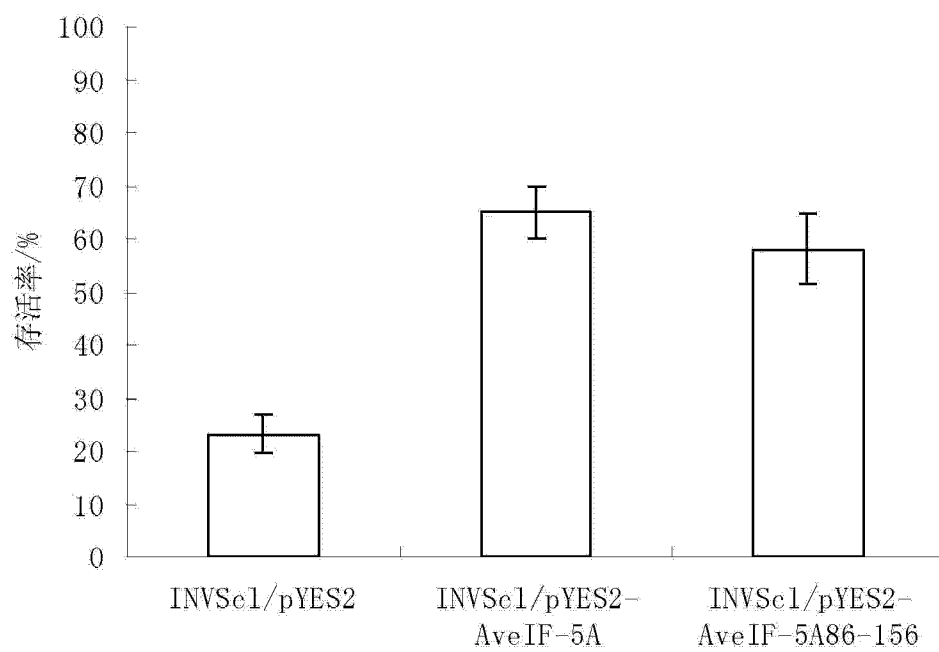


图 10



图 11

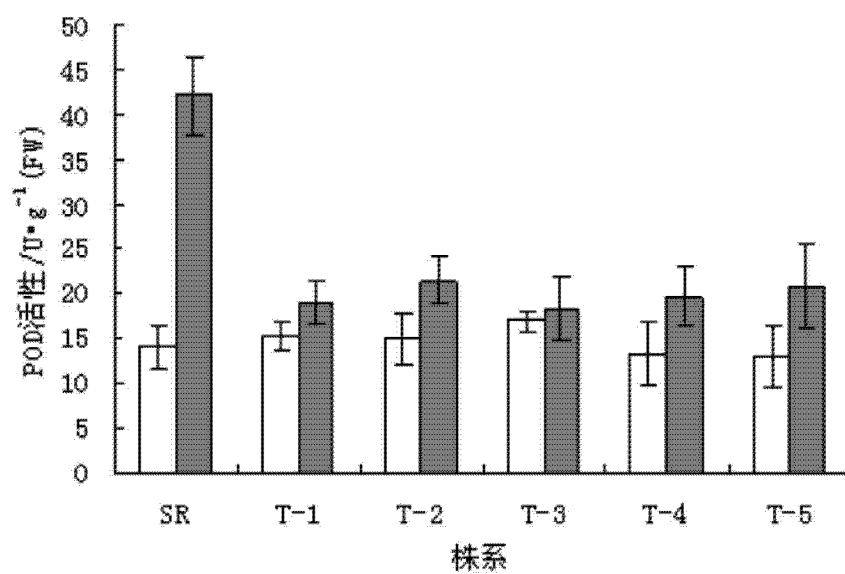


图 12

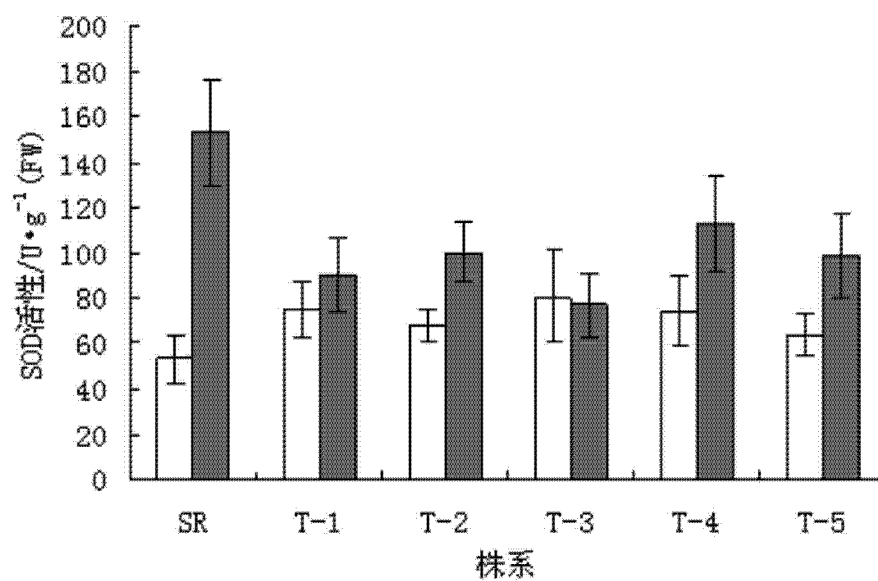


图 13

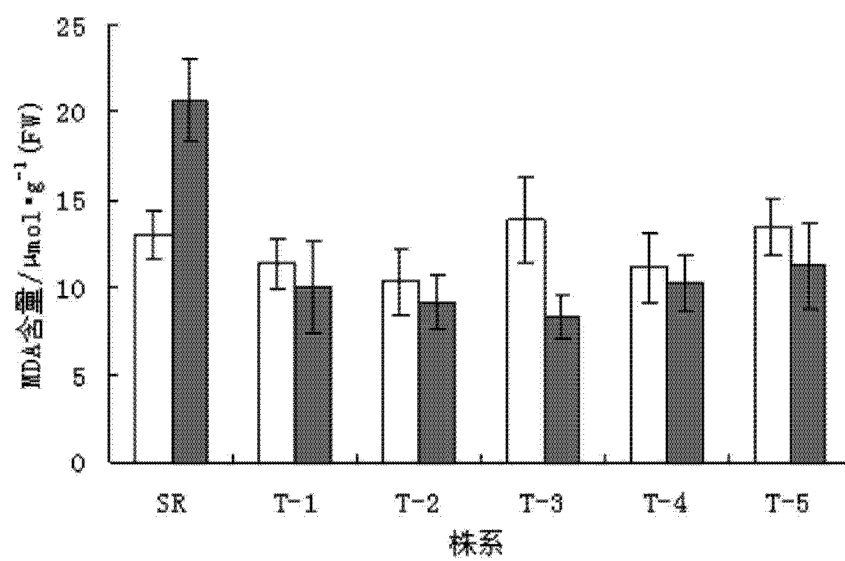


图 14