

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02813983.6

[45] 授权公告日 2007 年 3 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1304570C

[22] 申请日 2002.7.6 [21] 申请号 02813983.6

[30] 优先权

[32] 2001. 7. 12 [33] DE [31] 10133343.9

[32] 2002. 5. 6 [33] DE [31] 10220115.3

[86] 国际申请 PCT/EP2002/007555 2002. 7. 6

[87] 国际公布 WO2003/006647 德 2003. 1. 23

[85] 进入国家阶段日期 2004. 1. 12

[73] 专利权人 巴斯福植物科学有限公司

地址 德国路德维西港

[72] 发明人 I·福伊斯纳 M·施通佩

[56] 参考文献

WO0138484A2 2001. 5. 31

审查员 葛永奇

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 3 页 说明书 31 页 附图 9 页

[54] 发明名称

分离自展叶剑叶藨的 CYP74 酶家族之丙二烯氧化物合酶和二乙烯基醚合酶和编码这些合酶的核苷酸序列以及产生病原体抗性植物的方法

[57] 摘要

本发明涉及来自细胞色素 P450 家族的酶和编码它们的核苷酸序列，还涉及它们在产生病原体抗性植物的方法中的用途。

1. 一种具有如 SEQ ID No. 4 所示的氨基酸序列的二乙烯基醚合酶。
2. 一种如权利要求 1 所述的酶，其转化作为底物的 9-HPOD/TE 和 13-HPOD/TE。
3. 分离的核苷酸序列，该核苷酸序列选自：
 - a) 如 SEQ ID No. 3 所示的核苷酸序列，
 - b) 与 a) 互补的核苷酸序列。
4. 一种如权利要求 3 所述的分离的核苷酸序列，其源自藓类或高等植物。
5. 一种如权利要求 4 所述的分离的核苷酸序列，其源自展叶剑叶藓。
6. 一种基因构建体，其含有至少一种如权利要求 3-5 任一项所述的核苷酸序列以及与之可操作地连接的核苷酸调节序列。
7. 一种载体，其含有至少一种如权利要求 3-5 任一项所述的分离核苷酸序列和/或如权利要求 6 所述的基因构建体以及额外的核苷酸序列，所述额外序列用于筛选和/或在宿主细胞中的复制和/或向宿主细胞基因组的整合。
8. 一种转基因植物细胞，其含有可复制形式的至少一种如权利要求 3-5 任一项所述的分离的核苷酸序列和/或如权利要求 6 所述的基因构建体和/或如权利要求 7 所述的载体，并且与内源性基因表达相比，其显示出编码二乙烯基醚合酶的核苷酸序列的表达的增加，这使得植物对病原体的抗性增强。
9. 一种如权利要求 8 所述的转基因植物细胞，其中至少一种如权利要求 3-5 任一项所述的核苷酸序列和/或如权利要求 6 所述的基因构建体和/或如权利要求 7 所述的载体以染色体外形式存在和/或稳定整合到植物基因组中。
10. 一种如权利要求 8 或 9 所述的转基因植物细胞，其具有和植物细胞中相应的内源性酶比活相比比活增加的如权利要求 1 所述的二乙烯基醚合

酶。

11. 权利要求 8 或 9 所述的转基因植物细胞，其为来自茄科或谷类植物的转基因细胞。

12. 权利要求 11 所述的转基因植物细胞，其为来自马铃薯、大麦或小麦的转基因细胞。

13. 一种增加植物对病原体的抗性的方法，其包括向植物细胞中转移可复制形式的单独或组合的如权利要求 3-5 任一项所述的核苷酸序列和/或如权利要求 6 所述的基因构建体和/或如权利要求 7 所述的载体，和从由此转化的植物细胞再生完整植株。

14. 如权利要求 13 所述的方法，其中所使用的植物细胞为来自茄科或谷类植物的细胞。

15. 如权利要求 14 所述的方法，其中所使用的植物细胞为来自马铃薯、大麦或小麦的细胞。

16. 至少一种如权利要求 3-5 任一项所述的核苷酸序列在增加植物细胞、完整的植株和/或它们的子代对病原体的抗性中的用途。

17. 如权利要求 1 或 2 所述的酶在增加植物细胞、完整的植株和/或它们的子代对病原体的抗性中的用途。

18. 如权利要求 17 所述的用途，其中和相应的内源性酶比活相比，如权利要求 1 或 2 所述的酶的增加的比活使得植物细胞或植物对病原体的抗性增加 20-90%。

19. 如权利要求 18 所述的用途，其中和相应的内源性酶比活相比，如权利要求 1 或 2 所述的酶的增加的比活使得植物细胞或植物对病原体的抗性增加 30-80%。

20. 如权利要求 19 所述的用途，其中和相应的内源性酶比活相比，如权利要求 1 或 2 所述的酶的增加的比活使得植物细胞或植物对病原体的抗性增加 40-70%。

21. 权利要求 17-20 中任一项所述的用途，其中如权利要求 1 或 2 所述的酶使得对霉菌的抗性增加。

22. 权利要求 21 所述的用途，其中如权利要求 1 或 2 所述的酶使得对禾本科布氏白粉菌大麦专化型或小麦专化型和/或致病疫霉的抗性增加。

分离自展叶剑叶藓的 CYP74 酶家族之丙二烯氧化物合酶和二乙烯基醚合酶和编码这些合酶的核苷酸序列以及产生病原体抗性植物的方法

本发明涉及来源于细胞色素 P450 类的酶，涉及相应的编码核苷酸序列的分离和它们的用途——用于产生具病原体抗性的植物细胞和它们的子代的方法。

细胞色素 P450 酶类包括丙二烯氧化物合酶(AOS)、氢过氧化物裂合酶(HPL)和二乙烯基醚合酶(DES)。它们形成一个单独的称作 CYP74 的亚族。由于细胞色素 P450 酶的多样性，命名法根据每种蛋白的一级结构，将该酶类的每种蛋白划归到特定的族和亚族中。这样，所有 AOS 形成它们自己的亚族 CYP74A，而 CYP74B 包含 13-HPL，CYP74C 包含 9/13-HPL，CYP74D 包含 9-DES(Feussner 等；2001, *Trends Plant Sci.* 6, 268-273)。来自相同亚族的蛋白按时间顺序编号。

CYP74 为具有血色分子(hemamolecule)辅基的单加氧酶。尽管它们也与作为辅基的原卟啉 IX 基团(hem b)相连，但是它们对 CO 的亲合力微弱(Matsui, 1998, *Belgian Journal of Botany.* 131, 50-62)。它们组成了多烯脂肪酸代谢中重要的酶，该代谢叫做脂肪氧合酶 (LOX) 途径(Feussner 和 Wasternack, 1998, *Fett/Lipid.* 100, 146-152)。

LOX 为双加氧酶，其中催化中心的铁和氨基酸侧链结合(Brash, 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 23679-23682)。它们催化分子氧掺入到多不饱和脂肪酸的(1Z, 4Z)-戊二烯系统中。在植物中，这些脂肪酸主要是亚油酸和 α -亚麻酸。根据所用的 LOX 的区域选择性，所得产物为氢过氧化物的两种不同的位置异构体：即(9S)异构体或(13S)异构体。例如，从 α -亚麻酸得到(13S,9Z,11E,15Z)-13-过氧羟基-9,11,15-十八碳三烯酸(13S-HPOTE)，从亚油酸得到(13S, 9Z,11E)-13-过氧羟基-9,11-十八碳二烯酸(13S-HPODE)。

植物中，这些氢过氧化物很快进一步被各种酶反应。现今，已知在植物领域中有7种不同的酶家族，它们转化氢过氧化物从而竞争LOX产物，这些反应是：丙二烯氧化物合酶(AOS)反应、氢过氧化物裂合酶(HPL)反应、二乙烯基醚合酶(DES)反应、还原酶反应、peroxygenase反应、环氧醇合酶(EAS)反应和LOX反应本身(Feussner等；2001, *Trends Plant Sci.* 6, 268-273)。当在丙二烯氧化物环化酶(AOC)存在下13-HPOTE反应时，发生环化反应得到12-氧代Phytodienoic acid(12-氧代-PDA)(Ziegler等；2000, *J. Biol. Chem.* 275, 19132-8), 12-氧代Phytodienoic acid为茉莉酮酸的前体，这里认为茉莉酮酸是一种植物激素。

AOS(EC4.2.1.92; CYP74A)是被首先描述的CYP74酶；首先从亚麻中分离出了均一的蛋白(Song和Brash, 1991, *Science.* 253, 781-784)。AOS催化的反应得到不稳定的丙二烯氧化物，其在水的存在下能分解成相应的 α -和 γ -乙酰醇。AOS参与茉莉酮酸的生物合成(Vick和Zimmerman, 1983, *Biochem, Biophys. Res. Commun.* 111, 470-7)。茉莉酮酸本身参与诱导特定mRNA的转录和调节茉莉酮酸酯诱导的蛋白(JIP)(如LOX、AOS和蛋白酶抑制剂)的翻译。这使得茉莉酮酸是植物胁迫应答中一种重要的信号物质(Wasternack和Parthier, 1997, *Trends Plant Sci.* 2, 302-307)。此外，描述了其参与调节生长和促进老化(Sembdner和Parthier, 1993, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 569-589)。已经克隆并在大肠杆菌中功能性表达了许多AOS，包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、亚麻(*Linum usitatissimum*)和大麦(*Hordeum vulgare*)AOS。除了大麦AOS，到现今为止克隆的所有AOS都表现出对(13S)-氢过氧化物的底物专一性(Maucher等；2000, *Plant J.* 21, 199-213)。

HPL(CYP74B和C)将氢过氧化物切割成(3Z)-醛和 ω -含氧酸(Matsui, 1998, *Belgian Journal of Botany.* 131, 50-62)。甚至在该酶发现前，HPL反应产物就被称作“叶醛”，其使得植物和水果具有特征性气味(Hatanaka, 1996, *Food Rev. Int.* 12, 303-350)。对于13-HPOTE作为底物，形成(3Z)-己烯醛和(9Z)-12-氧代-9-十二碳烯酸，后者异构化得到(10E)-12-氧代-10-

十二碳烯酸(愈伤素), 其作为创伤激素被讨论。还讨论了其作为植物信使物质的功能(Bate 和 Rothstein, 1998, *Plant J.* 16, 561-569)。愈伤素还可进一步氧化得到愈伤酸, 其似乎同样参与植物创伤应答(Zimmerman 和 Vick, 1970, *Plant Physiol.* 46, 445-453)。克隆并在大肠杆菌中表达为活性蛋白的 HPL 有例如拟南芥、黄瓜(*Cucumis sativus*)、紫花苜蓿(*Medicago sativus*)和番茄的 HPL。这些酶的大多数也具有对(13S)-氢过氧化物的底物专一性。只有来源于黄瓜的一种 HPL 和来源于甜瓜的一种 HPL 没有底物专一性, 因此称作 9/13-HPL(McIntyre 等; 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 25189-25192; Matsui 等; 2000, *FEBS Lett.* 481, 183-188)。对两种序列与其他 CYP74 家族成员关系的研究揭示了这两种序列与 AOS 的同源性比与 13-HPL 的同源性高。这是为什么这些酶被归类为单独的 CYP74C 亚族的原因(Matsui 等; 2000, *FEBS Lett.* 481, 183-188)。已经阐明拟南芥属 HPL 被创伤所诱导。

DES(CYP74D)催化具有杀真菌活性的二乙烯基醚的形成(Weber 等 1999)。还讨论了二乙烯基醚类似于 HPL 的产物醛参与抵抗病原真菌和细菌(Weber 等; 1999, *Plant Cell.* 11, 485-493; Göbel 等; 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 6267-6273)。在 2001 年 Itoh 和 Howe 克隆了第一个番茄 DES。其与 AOS 和 HPL 在序列上具有高度同源性; 因此也认为它属于细胞色素 P450 类, CYP74D 亚族。而且, DES 在 CYP74 组中是独特的, 因为它是对 9S-氢过氧化物具有高度专一性的唯一一种酶(Itoh 和 Howe, 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 3620-3627)。

自然中, P450 酶通过多种途径参与许多内源性物质的生物合成和代谢。它们在异生素解毒中的参与尤其重要。而且, 植物 P450 酶参与创伤信号(茉莉酮酸、水杨酸、愈伤素)和激素(赤霉素、油菜素类固醇)的生物合成。可以以许多形式产生引发植物中创伤信号和随后的信号转导级联的物质。它们可以被植物的损害或伤害引发, 还可以被外部的化学化合物(人工地)诱导。然而, 植物疾病的发生率和主要地植物对这些病原体的防御反应的提高才尤其具有农业经济学上的极大的相关性。相对于植物对创伤胁迫的自身防御, 植物对病原体的应答可能涉及十分不同的途径。由例如病毒、

细菌或真菌引起的植物疾病的发生通常导致植物受到极大的伤害或者实际上整株植物的死亡，连带造成作物的数量和质量急剧下降。

如果要将产量损失限制在经济上可接受的程度，必须采取植物保护措施。尤其，希望提高植物对病原体和/或有害生物的防御反应而不使用化学药品，这些化学药品会对土壤、地下水和使用者造成额外的污染。

因此，本发明的一个目的是提供显示出对病原体具有增强的抗性的转基因植物细胞、植物和它们的子代，以及生产它们的改良的方法。

该目的通过氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示的丙二烯氧化物合酶或者其同工酶和/或氨基酸序列如 SEQ ID No. 4 所示的二乙烯基醚合酶或其同工酶来完成。

上面提到的两种酶属于 CYP74 酶家族。相对于植物细胞中这些酶的内源性比活，这些 CYP74 酶的增加的比活可以单独地或者组合地导致植物细胞对病原体的抗性增加。这里，与植物细胞或植物中内源性比活相比，根据本发明增加的 CYP 酶比活使得植物细胞或植物对病原体的抗性增加 20-90%，优选 30-80%，特别优选 40-70%。植物的抗性通过侵入频率的下降来确定。为了本发明的目的，侵入频率指成功侵入表皮细胞的感染位点数除以感染位点总数所得的值。

根据本发明的 CYP74 酶单独或组合地有利地带来了植物中对病原体(例如活体营养真菌)的增强的抗性。根据本发明的 CYP74 蛋白的增加的浓度(增加的比活)优选带来对白粉菌，特别优选地对禾本科布氏白粉菌大麦专化型 (*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*) 或小麦专化型(f. sp. *tritici*.) 的增强的抗性。然而，这不排除对其他植物病原体增强的抗性。这些植物病原体的其他例子是腐霉属 (*Pythium* spec.)，白锈属 (*Albugo* spec.)，立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、寄生霜霉(*Peronospora parasitica*)、*Erysiphe crucifearum*，二孢白粉菌(*E. cichoreacearum*)、芸蔓生链格孢(*Alternaria brassicicola*)，灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotium*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)、大刀镰孢(*F. culmorum*)、禾本科镰孢(*F. graminearum*)、雪腐镰孢(*F. nivale*)、致病

疫霉(*Phytophthora infestans*)或丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)。

必须说明的是上面提到的根据本发明的 CYP74 酶显示出比以前已知的该类 CYP 酶有更广的底物谱。根据本发明的 CYP74 酶不仅能够转化 9-HPOD/TE, 而且能够将 13-HPOD/TE 作为底物。

根据本发明, 该 CYP74 酶起源于藓类或高等植物。优选地, 根据本发明的 CYP74 酶起源于展叶剑叶藓(*Physcomitrella patens*)。

本发明还涉及分离的核苷酸序列, 其编码参与多不饱和脂肪酸生物合成的上述类型的丙二烯氧化物合酶, 可以用于增加植物细胞或植物对病原体的抗性, 该核苷酸序列选自:

- a) 如 SEQ ID No. 1 所示的核苷酸序列,
- b) 与如 SEQ ID No. 1 所示的核苷酸序列至少有 70% 同一性的核苷酸序列,
- c) 与 a) 或 b) 互补的核苷酸序列。

本发明还包括与 a) 或 b) 杂交的核苷酸序列。

同样地, 本发明包括分离的核苷酸序列, 其编码参与多不饱和脂肪酸生物合成的上述类型的二乙烯基醚合酶, 可以用于增加植物细胞或植物对病原体的抗性, 该核苷酸序列选自:

- a) 如 SEQ ID No. 3 所示的核苷酸序列,
- b) 与如 SEQ ID No. 3 所示的核苷酸序列至少有 70% 同一性的核苷酸序列,
- c) 与 a) 或 b) 互补的核苷酸序列。

本发明还包括与 a) 或 b) 杂交的核苷酸序列。

根据本发明, 分离的核酸或者分离的核酸片段指单链或双链的并且可以任选含有天然的、化学合成的、修饰的或人工的核苷酸的 RNA 或 DNA 聚合物。在该上下文中, 术语 DNA 聚合物还包括基因组 DNA、cDNA 或它们的混合物。

为了本发明目的, 杂交的核苷酸序列指在标准杂交条件下和根据本发明的编码 CYP74 酶的相应核苷酸序列结合的寡或多核苷酸。术语“标准杂

交条件”应该从广义上理解，指严紧或不那么严紧的杂交条件。例如，Sambrook 等(1989，分子克隆 (Molecular Cloning)，第二版，冷泉港实验室出版社)描述了这些条件。根据本发明，术语“杂交的序列”包括来自 DNA 或 RNA 类群的基本类似的核苷酸序列，这些序列在本身已知的标准杂交条件下和根据本发明的核苷酸序列特异性相互作用(结合)。这些杂交的序列还包括长度为例如 10 到 30，优选 12 到 15 个核苷酸的短核苷酸序列。根据本发明，这些杂交序列还包括引物或探针等。

根据本发明，互补的核苷酸序列指根据碱基配对原则构成正讨论的起始序列的转录物的 DNA 或 RNA(mRNA)序列。

根据本发明，等位基因指功能上等价的核苷酸序列，即具有基本上相同类型的作用的核苷酸序列。功能上等价的序列指核苷酸序列发生改变(例如，由于遗传密码的简并性)但是保留了期望功能的那些序列。这样，功能等价物包括此处描述的这些序列的天然发生的变体以及人工核苷酸序列，例如通过化学合成得到的和(如果适当)适应宿主生物的密码子选择进行了修饰的核苷酸序列。此外，功能等价序列包括那些具有修饰核苷酸序列的序列，该修饰核苷酸序列使该蛋白例如对抑制剂丧失敏感性或者产生抗性。

功能等价物还尤其指最初分离的序列的天然或人工突变体，这些突变体保留了期望的功能。突变包括替代、加入、缺失、互换或者插入一个或多个核苷酸残基。此处还包括所谓的有义突变，其在蛋白水平可以，例如导致保守氨基酸的替代，但不导致该蛋白功能的根本改变，即突变是功能中性的。这还包括核苷酸序列的修饰，该修饰在蛋白水平上和蛋白的 N 或 C 末端相关，但不会对该蛋白的功能造成实质上的不利影响。实际上，这些修饰可以对蛋白结构有稳定作用。功能等价物还指那些和最初的基因或基因片段相比活力变弱或增强的变体。

人工 DNA 序列也是本发明的主题，只要它们赋予上述的期望性质。可通过例如反向翻译利用分子建模得到的蛋白质或者通过体外选择确定这些人工 DNA 序列。特别合适的 DNA 序列是根据宿主-生物体的特定密码子选择反向翻译多肽序列得到的编码 DNA 序列。熟悉分子遗传学方法的技

术人员可通过计算机评估所要转化的生物的其他已知基因容易地确定特定密码子选择。术语“功能等价物”还指由正讨论的核苷酸序列编码的蛋白。这时，术语“功能等价物”描述和参考蛋白(这种情况下指 CYP74 酶)在氨基酸序列上具有一定百分数的同源性的蛋白。该百分数至少为 75%，优选 80%，特别优选 90-95%，尤其是 99.9%。

此外，本发明还包括例如那些通过修饰核苷酸序列而得到的核苷酸序列，这就导致相应的衍生物。这种修饰的目的可以是例如进一步限定 (delimitate) 其中的编码序列或者例如插入其它的限制性酶切割位点。

根据本发明的核苷酸序列还可通过它们起源自藓类或高等植物这一事实来区别。优选地，它们起源自展叶剑叶藓。

为了阐明术语，应该指出由 SEQ ID No. 1 编码的蛋白为一类 CYP74A 细胞色素 P450 酶(丙二烯氧化物合酶；AOS)。由于底物专一性等原因，由 SEQ ID No. 3 编码的酶归为 CYP74E 类(二乙烯基醚合酶；DES)。

本发明还涉及含有如 SEQ ID No. 1 所示的核苷酸序列和/或如 SEQ ID No. 3 所示的核苷酸序列以及与之可操作连接的核苷酸调节序列的基因构建体。根据本发明的基因构建体还包括含有如 SEQ ID No. 1 和/或 SEQ ID No. 3 所示的核苷酸序列的衍生物、等位基因或部分的那些构建体。在该上下文中，这些编码区单独或组合地(即共同地)受到相同调节序列或者多个单独的调节序列的控制。

可操作连接指例如启动子、编码序列、终止子和(如果合适)其他调节元件的顺序排列，这种排列方式使得当编码序列表达时，每个调节元件都能够完成其预期功能。这些核苷酸调节序列可以是天然来源的或者可以通过化学合成得到。合适的启动子原则上是能调节正讨论的宿主生物中的基因表达的任何启动子。根据本发明，这种启动子也可以是天然的或者合成产生的化学可诱导的启动子，通过该启动子，由其控制的基因的表达可以在宿主细胞中于特定时间点发生。这些启动子还包括组织特异性启动子。用例如在 T. Maniatis, E.F. Fritsch 和 J. Sambrook, 分子克隆：实验指南 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual)，冷泉港实验室，冷泉港，

NY(1989)中所描述的常用重组和克隆技术, 通过将合适的启动子融合到至少一个根据本发明的核苷酸序列上, 可以产生基因结构。为了将 DNA 片段连接起来, 可向片段添加接头或衔接子。

根据本发明还可以包括编码区之前的序列区(结构基因; 5'或上游序列区)和/或之后的序列区(3'或下游序列区)。尤其还可以包括具有调节功能的序列区。它们能够影响转录、RNA 稳定性或 RNA 的加工和翻译。调节序列的例子为启动子、增强子、操纵基因、终止子或翻译增强子等。

本发明还包括一种载体, 该载体含有如 SEQ ID No. 1 所示的分离的核苷酸序列、其等位基因、衍生物或部分和/或如 SEQ ID No. 3 所示的分离的核苷酸序列、其等位基因、衍生物或部分和/或上述类型的基因构建体和用于宿主细胞筛选和/或宿主细胞中的复制和/或向宿主细胞基因组中的整合的额外核苷酸序列。

通常, 根据本发明, 合适的宿主细胞可以是高等植物的细胞。优选的细胞为有用的植物的细胞, 优选单子叶有用植物的细胞, 特别优选谷类, 尤其是大麦和/或小麦的细胞。优选的双子叶有用植物的细胞是来自茄科 (Solanaceae) 的细胞。

这样, 本发明还包括至少一种转基因植物细胞、完整的植株和/或它们的子代, 它们含有可复制形式的如 SEQ ID No. 1 所示的分离的核苷酸序列、其等位基因、衍生物或部分和/或如 SEQ ID No. 3 所示的分离的核苷酸序列、其等位基因、衍生物或部分和/或上述类型的基因构建体和/或上述类型的载体; 和内源性基因表达(即例如在未转化的植物或植物细胞中发现的天然基因表达)相比, 该转基因植物细胞、完整的植株和/或它们的子代显示出编码丙二烯氧化物合酶的核苷酸序列和/或编码二乙烯基醚合酶的核苷酸序列的增强的表达, 这使得植物对病原体的抗性增强。

增强的基因表达可以由所讨论的核苷酸序列的拷贝数增加导致。备选地, 该增加可以基于例如这样的事实: 核苷酸序列的编码区可操作连接到一个或多个调节序列上, 而此调节序列可以导致基因表达起始的增强。这可以例如通过强的和/或可诱导的启动子和/或增强子和/或其他调节序列来

实现。

至于拷贝数，在本发明的一个变体中上面提到的核苷酸序列之一或两者存在的拷贝数可以是2-100，优选5-50，特别优选2-15个。

在上面提到的根据本发明的转基因植物细胞、植株和/或它们的子代中，根据本发明的核苷酸序列(单独地或组合地)、其等位基因、衍生物或部分和/或上述类型的基因构建体和/或载体可以存在于染色体外和/或稳定整合到植物基因组中。

将核苷酸序列整合到植物基因组中的合适的方法和辅助手段(如基因构建体或载体)和合适的辅助生物是本领域技术人员已知的，将不再详述。

本发明同样包括这样的转基因植物细胞、完整的植株和/或它们的子代，它们具有如SEQ ID No. 2所示的丙二烯氧化物合酶和/或如SEQ ID No. 4所示的二乙烯基醚合酶和/或其相应同工酶、衍生物和/或其部分，与相关内源性酶活力(例如在野生型细胞中)相比，在该转基因宿主系统中，所述酶的相关比活得到增加。

同工酶应理解为指具有相同或相似的底物专一性和作用专一性但是具有不同一级结构的酶。

根据本发明，衍生物指在序列中具有修饰(例如，在该多肽的N和/或C末端或者在保守氨基酸区域)但是该修饰对酶的功能没有不利影响的酶。可通过本身已知的方法以氨基酸替代的形式进行这些修饰。

本发明的一个特定实施方案包括根据本发明的酶的变体，和所讨论的起始蛋白相比，由于氨基酸替代，该变体的活力降低了或增强了。这同样适用于在那些细胞中或多或少对例如蛋白酶的降解敏感的根据本发明的酶的稳定性。

此外，本发明涉及具有丙二烯氧化物合酶或二乙烯基醚合酶功能的酶，该酶的氨基酸序列被修饰使得这些酶对于调节化合物，例如调节它们活力的代谢物(对反馈作用脱敏)丧失敏感性。

根据本发明，上面提到的转基因植物细胞，完整的植株和/或它们的子代为有用植物或其细胞的形式，优选来自茄科或谷类，特别优选来自马铃薯

薯、大麦或小麦。

本发明还包括增加植物细胞或植物对病原体的抗性的方法，其中将如 SEQ ID No. 1 所示的核苷酸序列和/或如 SEQ ID No. 3 所示的核苷酸序列和/或上面详述类型的基因构建体和/或载体以可复制的形式转移到植物细胞中，并且从由此转化的植物细胞再生全株。

产生根据本发明的这些转基因植物的方法是标准的实验室操作。在本发明有利的变体方案中，通过所谓的“微粒轰击”和/或农杆菌介导的转化将核苷酸序列和/或基因构建体和/或载体转移到植物或植物的部分或细胞中。

根据本发明得到的转基因植物和其子代的一个特别的优点是：至少一种根据本发明的核苷酸序列的拷贝数增加或者类似地，至少一种相应编码的蛋白质的浓度增加导致实质上增强的疾病抗性。这意味着根据本发明的基因和/或编码的蛋白是产生对病原有害生物的抗性的原因。病原有害生物的例子是禾本科布氏白粉菌大麦专化型或小麦专化型，腐霉属、白锈属、立枯丝核菌、寄生霜霉、*Erysiphe cruciferarum*、二孢白粉菌、芸薹生链格孢、灰葡萄孢、齐整小核菌、核盘菌、尖镰孢、大刀镰孢、禾本科镰孢、雪腐镰孢、致病疫霉或丁香假单胞菌。

在一个根据本发明的方法的优选变体方案中，所用的植物细胞为有用植物的细胞，优选来自茄科或谷类，特别优选马铃薯、大麦或小麦。

本发明还涉及如 SEQ ID No. 1 所示的核苷酸序列和/或 SEQ ID No. 3 所示的核苷酸序列和/或它们的等位基因、衍生物和/或其部分的用途，用于增加转基因植物细胞、完整的植株和/或它们的子代对病原体的抗性。

本发明还涉及至少一种如 SEQ ID No. 2 所示的和/或如 SEQ ID No. 3 所示的多肽和/或其同工酶和/或衍生物在增加转基因植物细胞、完整的植株和/或它们的子代对病原体的抗性中的用途。

根据本发明，还包括至少一种上面提到的酶的用途，其中和相应的内源性酶比活相比，此至少一种酶的比活的增加导致植物细胞或植物对病原体的抗性增加 20-90%，优选 30-80%，特别优选 40-70%。

在该上下文中，至少一种根据本发明的酶的使用使得例如对白粉菌，优选禾本科布氏白粉菌大麦专化型或小麦专化型和/或致病疫霉的抗性增强。

下面的实施例旨在阐明本发明而不是对本发明进行限定。

一般方法：

一般的 DNA 和克隆技术、凝胶电泳、测序、PCR、Northern 印迹、重组蛋白的表达和纯化、Western 印迹、HPLC 和 GC 分析和微生物的培养都是常规的实验室方法，参见如 Sambrook 等(分子克隆，实验指南(1989)冷泉港实验室出版社)所述。藓类和植物材料的处理同样是惯用的实验室操作，参见如 Gelvin 等(植物分子生物学手册 (Plant Molecular Biology Manual)，1995，Dordrecht/Holland, Kluwer Academic Publ.)所述。

通过 PCR 克隆编码 CYP74 酶的基因

可得到两个展叶剑叶藓 λ ZapII cDNA 文库(一个来自原丝体组织，一个来自配子体组织)以进行 RACE-PCR。T7-lang 引物(5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT GGG-3')用作载体引物以进行 5'-RACE-PCR。使用标准方法。

对于嵌套的 RACE-PCR，用 M13rev 引物(5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3')和 RACE 引物进行第一次 PCR。该混合物作为模板进行第二次 PCR，其中使用 T7-lang 引物和一个(基因特异性)嵌套-RACE 引物，其选自：

PP291AOS5R : 5'-TCA CCT CAT CCG ATA CGC TAG TC-3'

PP364AOS5R : 5'-GTC GAT GTC GTC TCA ATG TTC C-3'

PP364AOS5R2 : 5'-CCA TTC GTG ATT GCC AGA ACT GC-3'

为了克隆完整片段，后者用 ExpandTM PCR 系统进行扩增。除了 Taq 聚合酶，该系统还含有一种具有校读活性的 *Pwo* 聚合酶。这第二种酶的目的在于保持较低的阅读出错率以便在所克隆的 DNA 中出现尽可能少的突

变。下面的 cDNA 文库用作模板：原丝体展叶剑叶藓 cDNA λ ZapII 和配子体展叶剑叶藓 cDNA λ ZapII。使用下面的引物：

PP291/5'SphI

5'-AAA GCA TGC ATG GCA GTC CCT TCA TCC AAG C - 3'

PP291/3'PstI

5'-AAA CTG CAG TCA CTT TTT GAG ATC GGA AAA GAA AAC CTT
GGT CGC-3'

PP364/5'BamHI

5'-GGA TCC CGT ACG GTT GTA GCC AGT CTT GGG-3'

PP364/3'HindIII

5'-AAG CTT TCA ATC TGA TCG CGG CGT CAG TG-3'

为了检查 RACE 克隆期间的克隆和完整 cDNA，用 Tfl 聚合酶进行称作“集落”PCR 的方法，因为此时出错率并不重要。保留引物并用标准设置进行该过程。

CYP74 酶的分离

从两个展叶剑叶藓 λ ZapII cDNA 文库中分离了两个编码 CYP74 酶的基因。

克隆 Pp291

分离的克隆 Pp291 具有 322 个氨基酸的可读框。该蛋白与灰白银胶菊 (*Parthenium argentatum*) AOS 有 48% 的同一性 (Pan 等; 1995, *J. Biol. Chem.* 270, 8487-8494)。然而，将其核苷酸序列与其他已知的 AOS 相比较发现，在 5' 末端仍然缺了约 500 到 650 bp。这就是用来自原丝体组织的 λ ZapII cDNA 文库和来自配子体组织的 λ ZapII cDNA 文库进行 5'-RACE-PCR 的原因。用 RACE 引物 PP291AOS5R (见上面的) 及退火温度 60°C，从原丝体文库中成功的扩增出了 3 个不同长度的片段。通过和琼脂糖凝胶中的分子大小标准比较可以估计片段的长度。片段的长度是 600 bp, 700 bp 和 800 bp。将两个较长的片段克隆到载体 pGEM-T 中并测序。所得两个序列都为起始克隆的 5' 末端的延伸。在两个序列中，终止密码子都位于第一个起始密码子 (ATG) 上游的 15 bp 处。为了克隆完整 cDNA，从 RACE-PCR 的 cDNA 序列衍生出具有 SphI 和 PstI 限制性切割位点的表达引物

(PP291/5'SphI 和 PP291/3'PstI, 见上面)。所得完整 cDNA 序列如 SEQ ID No. 1 所示并编码具有 475 个氨基酸的蛋白(SEQ ID No. 2)。

克隆 Pp364

此第二个 cDNA 克隆含有编码 489 个氨基酸的蛋白的可读框。在氨基酸水平上, 该蛋白和拟南芥 AOS(Laudert 等; 1996, *Plant Mol. Biol.* 31, 323-335)具有 42% 的同一性, 和亚麻 AOS 具有 41% 同一性。尽管该克隆较长, 但是其没有包含起始密码子。具有 BamHI 和 HindIII 限制性切割位点的表达引物 PP364/5'BamHI 和 PP364/3'HindIII 都衍生自此已知的克隆序列。完整 cDNA 序列通过 RACE-PCR 和反向 PCR 得到。完整的 cDNA 序列如 SEQ ID No. 3 所示并且编码具有 532 个氨基酸的蛋白(SEQ ID No. 4)。

重组蛋白的表达和纯化

为了表达分离的 cDNA, 必须将它们连接到表达载体中。使用载体 pQE30(Qiagen, Hilden)以表达具有 N 末端 His₆-标签的蛋白。用 T4-DNA 连接酶进行预先切割的 pQE30 和供体 DNA(约 3:1 的比例)之间的连接。重组蛋白在大肠杆菌菌株 SG13009(Gottesmann 等; 1981, *J. Bacteriol.* 148, 265-73) 中表达。首先, 将表达克隆在 LB 培养基(含有羧苄青霉素和卡那霉素)中于 37°C 孵育直到 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8。用 IPTG(终浓度为 1 mM) 诱导后, 在 10°C 下细菌继续生长 2-3 天。

尽可能将纯化在冰上进行, 而离心步骤在 4°C 下进行。4000 × g 下离心 15 分钟以沉淀细胞。细胞沉淀物重新完全悬浮于 pH8 的 50 mM 磷酸钠溶液中, 并以 50% 强度和 50% 脉冲超声处理 (Sonopuls GM 70, Bandelin, 柏林) 5 次, 每次 1 分钟。4000 × g 离心 15 分钟除去细胞残渣, 并且进一步离心(100 000 × g, 1 小时)从上清液沉淀细胞膜。

对于两种克隆 Pp291 和 Pp364, 通过亲和层析纯化重组产生的蛋白。然后用 pH 梯度(图 1A)或者咪唑梯度(图 1B)洗脱。在所有洗涤和洗脱步骤中得到相同的体积(1 ml)并加载至凝胶。从图 1A 中我们可以看出, 在 pH 4

时从柱中洗脱出纯的 Pp291 蛋白。对于咪唑梯度, 在咪唑浓度为 100 mM 和 100 mM 以上时洗脱出相对较纯的蛋白。比较两种方法, 没有发现差异。这是下面只用 pH 梯度纯化蛋白的原因。

活力测定

由于序列对比 (align) 不能得到关于催化活力的结论, 所以用光度活力测定法和 HPLC 以及 GC 分析来分析酶催化时形成的产物, 所有的测定都用标准方法进行。

在光度活力测定中, 在 234 nm 测量光吸收的下降。下降基于和 Cyp74 酶反应时氢过氧化物的共轭双烯体系的破坏。为此, 将各底物溶解(为了纯粹的活力测定, 通常终浓度为 20 μ M 13-HPOTE 或 9-HPODE)于磷酸盐缓冲液(pH 依赖于酶的最适 pH)并加入酶开始反应。通过 234 nm 的光吸收监测底物的浓度。摩尔吸光系数($\lambda_{234\text{nm}}$)为 25 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。

用克隆 Pp291 编码的酶和克隆 Pp364 编码的酶转化两种底物 (13-HPOTE 和 9-HPODE)。图解表示如图 2。

氢过氧化物和 DES 的反应得到二乙烯基醚, 其在酸性环境中水解得到醛。这些醛是挥发性的。为了鉴定形成的这些醛, 可以将它们用 DNPH 衍生(Kohlmann 等; 1999, *Eur. J. Biochem.* 260, 885-895)。这样所形成的腙不再是挥发的并且可以用 HPLC 分析通过它们的存留时间(retention time)来鉴定。如图 3 所示, 当用衍生试剂处理时, 二乙烯基醚也可以分解成醛, 其然后可以以 DNPH 衍生物的形式检测。使用该方法, 可以显示出在克隆 Pp364 编码的酶和底物 13-HPOTE 和 9-HPODE 的反应混合物中形成了醛(图 4)。这些醛通过它们的存留时间被鉴定为(2E)-己烯醛和(2E)-壬烯醛。它们还具有典型的醛-DNPH 衍生物的紫外光谱。对于 Pp291 没有检测到醛类(没有列出数据)。

在对非挥发性化合物进行 HPLC 分析时, 进行 $1\text{-}^{14}\text{C}$ 标记的氢过氧化物的反应。所形成的标记产物可以用放射检测器而不用紫外检测器观察到。用这种方法, 即使没有典型的紫外最大吸收的物质也可以通过它们的存留时间来鉴定。另一个优点是这种类型的检测比紫外检测更灵敏。如果将

$1\text{-}^{14}\text{C}$ -13-HPOTE 用作酶反应中的底物, 图 5 中的层析谱揭示了 Pp291 和用作参比的大麦 9/13-AOS1(Maucher 等; 2000, *Plant J.* 21, 199-213)具有相同的洗脱图。对于其他 AOS, 已经阐明在没有丙二烯氧化物环化酶时主要反应产物是 α -乙酮醇。Pp364 的表达和随后的转化的层析谱表明在约 30 分钟时有一个信号(图 6)。该信号在黄瓜 9/13-HPL 和大麦 9/13-AOS1 中都不存在。在和黄瓜 9/13-HPL 产物相同的存留时间上 Pp364 还显示有其他信号。因在放射 HPLC 中, 在柱洗出物中加入液体闪烁剂, 故用未标记的底物进行同样的 HPLC 以收集产物并进一步对它们进行分析。由于 α -乙酮醇没有典型的紫外最大吸收, 此时在 210 nm 进行检测(Gardner, 1997, *Advances in Lipid Methodology-four* (Christie, W.W., ed.) 1-43 页, The Oily Press, Dundee)。

对于 Pp291, 收集和标准——针对从 13-HPOTE 形成的 α -乙酮醇的标准——具有相同存留时间的物质, 将其衍生并进行 GC/MS 研究。所得层析谱如图 7。质谱和相应的 α -乙酮醇标准的相同。

酶特征的确定

最适 pH 值

用光度法测量克隆 Pp291 的最适 pH 值。为此, 将 13-HPOTE 用作底物(溶于适当 pH 的 50 mM 磷酸钠溶液中, 约 25 μM)。在 5.0-6.0 的 pH 范围内酶具有最高活力。如图 8 所示。

酶的动力学参数

研究 Pp291 对底物, 特别是花生四烯酸(HPETE)的氢过氧化物的专一性, 因为花生四烯酸是该生物中主要的脂肪酸(Girke 等;1998, *Plant J.* 15, 39-48)。转化速度的比率如图 9 所示。在本发明研究的氢过氧化物中, 8-HPETE 是转化最快的底物。接着是 13-HPOTE、9-HPODE 和 11-HPETE, 比率是 8-HPETE:13-HPOTE:9-HPODE:11-HPETE 为 100:70:60:57。

过表达以产生增强的病原体抗性

为了将 Pp291 和 Pp364 cDNA 克隆到二元载体中，将它们用 BamHI 和 NotI 限制性切割并转移到 BamHI-和 NotI-切割的 pCRScript 载体中。然后用 SalI 将它们从该载体中切除并连接到 SalI 适当切割的 pBinAR 载体。通过用 BamHI 控制切割和测序确定基因为有义取向的那些克隆。

转化到拟南芥:

用含有有义取向的 Pp291 和 Pp364 cDNA 的 pBinAR 载体转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)(C58C1 pMP90)。其后，根据 Clough 和 Bent(Clough S. 和 Bent A., Plant J 1998, 16(6): 735-43)和 Bechtold 等(Bechtold, N. 等 CRAcad Sci Paris 1993, 1144(2): 204-212)的真空渗入方法的改良方法用各转化的根癌农杆菌菌株转化野生型拟南芥植株(cv. Columbia)。根据卡那霉素抗性通过将种子种植于含有卡那霉素的 MS 平板(MS 培养基(Sigma)补加 40 mg/l 卡那霉素, 10 mg/l 苯菌灵(benomyl)和 100 mg/l 特美汀(timentin))以筛选初级转化体的种子。2 周后，将卡那霉素抗性幼苗转移到土壤；当它们完全发育成植株时将它们用于表型和分子分析。

在用有义取向的 Pp291 和 Pp364 转化的转基因植物中，选择没有观察到共抑制效果的植株。为此，从植物中分离总 RNA，并且用实时 PCR(Perkin-Elmer)检测此信使 RNA 的存在。然后由此鉴定的转基因植物用各种病原体感染。这些病原体包括禾本科布氏白粉菌大麦专化型和小麦专化型、腐霉菌、白锈菌、立枯丝核菌、寄生霜霉、*Erysiphe crucifearum*、二孢白粉菌、芸蔓生链格孢、灰葡萄孢、齐整小核菌、核盘菌、尖镰孢、大刀镰孢、禾本科镰孢、雪腐镰孢或丁香假单胞菌。

用荧光和光学显微镜等方法分析结果，即植物对病原真菌或细菌的抗性的宏观程度。发现和野生型相比，Pp291-和 Pp364-转基因拟南芥植物表现出对上面提到的病原体的增强的抗性。

转化入大麦

将大麦(cv. *Pallas*)叶块用存在于 GFP(绿色荧光蛋白)表达载体中的

Pp291 或 Pp364 的 cDNA 转化。然后用病原真菌禾本科布氏白粉菌大麦专化型（大麦白粉菌）接种叶子，48 小时后用光学显微镜和荧光显微镜分析结果。通过检测活细胞中的吸器和评估正好处于那些细胞中的真菌的发育来评价对 GFP 表达细胞的侵入。在所有的 6 个实验中，和用外来对照 cDNA(人甲状腺激素受体 dsRNA, TR)轰击的细胞相比，用 Pp291 或 Pp364 cDNA 对大麦 cv. Pallas 的轰击使得被禾本科布氏白粉菌大麦专化型（大麦白粉菌）成功侵入的细胞数减少。Pp291 和 Pp364 cDNA 的抗性诱导作用导致禾本科布氏白粉菌大麦专化型的侵入效率平均减少 44%。

用已经描述的将 cDNA 通过生物轰击导入大麦叶子的表皮细胞的方法 (Schweizer P 等; (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12: 647-54; Schweizer P 等 (2000) *Plant J* 2000 24: 895-903) 进行大麦的瞬时转化。将直径 1.1 mm 的钨微粒(微粒密度 25 mg/ml)用 cDNA 和作为转化标记的载体 pGFP(GFP 处于 CaMV 35S 启动子控制下) 的质粒 DNA 包裹。为此，每次轰击用下面的量的 cDNA 和报道质粒进行包裹：1 mg pGFP 和 2 mg cDNA。为了制备微载体，将 55 mg 钨微粒(M 17, 直径 1.1 mm; Bio-Rad, Munich)用 1 ml 高压灭菌的蒸馏水洗两次并用 1 ml 无水乙醇洗 1 次，干燥并置于 1 ml 浓度为 50%的甘油中(约 50 mg/ml 储存液)。将溶液用浓度为 50%的甘油稀释到 25 mg/ml，使用前彻底混合并于超声浴中悬浮。为了包裹微载体，每次轰击将 1 mg 质粒、2 mg cDNA (1 mL)、12.5 ml 钨微粒悬浮液(25 mg/ml)、12.5 ml 1M 的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 溶液(pH 10)在持续混合情况下逐滴混合，室温静置 10 分钟后短暂离心，除去 20 ml 上清液。将含有钨微粒的剩余物重新悬浮(超声浴)并用于实验。

使用约 4 cm 长的大麦初生叶段。组织置于培养皿(直径 6.5 cm)中的添加有 20 mg/ml 苯并咪唑的 0.5% Phytagar(GibcoBRL Life Technologist, Karlsruhe)上；临在微粒轰击前，将边缘用具有 2.2 cm × 2.3 cm 大小的长方形缝的蜡纸(stencil)覆盖。将培养皿相继置于真空室的底部(Schweizer P 等 (1999) *Mol Plant Microbe Interact* 12: 647-54)，之上将尼龙网(网孔大小 0.2 mm, Millipore, Eschborn)插在有孔板(高于底部 5 cm, 低于宏载体 11 cm,

见下文)上作为扩散器以使微粒聚集物散开和减慢微粒流。对于每次轰击,将结合在室顶部的宏载体(塑料无菌过滤器支架(filter holder) 13mm, Gelman Sciences, Swinney, UK)装入 5.8 ml DNA 包裹的钨微粒(微载体,见下文)。用膜真空泵(Vacuubrand, Wertheim)将室内气压降低 0.9 巴,在 9 巴的氦气压下用钨微粒轰击植物组织的表面。此后立即将室充气。

为了标记转化的细胞,用质粒(pGFP; 基于 pUC18 的载体,具有插入的 GFP 基因的 CaMV 35S 启动子/终止子盒; Schweizer P 等(1999)*Mol Plant Microbe Interact* 12: 647-54; 由 P. Schweizer 博士提供, Schweizer P, Institute of Plant Genetics IPK, Gatersleben, 德国)轰击叶子。在用另一个质粒轰击之前,每次用水彻底清洗宏载体。轰击后,将培养皿微微打开,日光下在室温将叶子孵育 4 小时,此后给它们接种 100 个分生孢子/mm 的大麦白粉菌真菌(race A6)并在相同条件下继续孵育 40 到 48 小时。

利用微粒注入枪(particle inflow gun)用包裹的微粒轰击叶块。每次轰击使用 312 mg 钨微粒。在轰击后 4 小时用禾本科布氏白粉菌(race A6)接种叶子,再过 40 小时后评估感染症状。用荧光和光学显微镜分析结果(例如侵入效率,定义为形成成熟吸器和次级延伸菌丝的受攻击的细胞的百分比;计算:见下文)。用 100 个分生孢子/mm² 接种得到的攻击频率为转化细胞的约 50%。对每次单独实验最少估计 100 个相互作用位点。在蓝光的激发下鉴定转化的(表达 GFP)细胞。区分出三类不同的转化细胞:

1. 含有易于识别的吸器的被侵入细胞。具有多于 1 个吸器的细胞被认为是 1 个细胞。
2. 尽管被真菌附着器攻击但不含有吸器的细胞。被禾本科布氏白粉菌大麦专化型重复攻击但不含有吸器的细胞被认为是 1 个细胞。
3. 不被禾本科布氏白粉菌大麦专化型攻击的细胞。

评估中不包括气孔细胞和副卫细胞。通过光学显微镜方法和对真菌用 0.1% Calcofluor(w/v, 溶于水)进行荧光染色 30 秒以分析禾本科布氏白粉菌大麦专化型的表面结构。用 Calcofluor 染色后可容易地用荧光显微镜估计真菌的发育。尽管在 Pp291-或 Pp364-dsRNA 转化的细胞中真菌形成了

初级和附着芽管，但没有发生吸器的生长。吸器的形成是形成次级菌丝的条件。

相对侵入效率(RPE)计算为转化的细胞(用 Pp291 或 Pp364 cDNA 转化)中的侵入效率与未转化的细胞中的侵入效率(这里：平均侵入效率为 57%)的差异。RPE 的百分数(%RPE)计算为 RPE 减去 1 后乘以 100 所得的值。

$$\text{RPE} = \frac{[\text{转化细胞中的 PE}]}{[\text{未转化细胞中的 PE}]}$$

$$\% \text{RPE} = 100 \times (\text{RPE} - 1)$$

%RPE 值(相对于对照的平均侵入效率的偏差数)用于确定用 Pp291 或 Pp364 cDNA 转化的细胞的易感性。

在 5 个独立的实验中，对照 cDNA 揭示了对于禾本科布氏白粉菌大麦专化型的侵入效率，用对照 cDNA 和水转染两者间没有差别。为了排除 cDNA 对于转化率和受攻击细胞的存活率的影响，比较了对照和 Pp291 或 Pp364 cDNA 实验之间的表达 GFP 细胞的数目。Pp291 和 Pp364 cDNA 对于总数和受攻击的 GFP 表达细胞的数目没有影响。

Pp291 和 Pp364 的转染率导致禾本科布氏白粉菌大麦专化型的侵入频率急剧下降(平均 %RPE 值=-30%)。

附图说明

图 1: 亲和纯化克隆 Pp291(A); 用 pH 梯度洗脱: M=分子标记; 1=空白载体 pQE30(未诱导); 2=pQE30(IPTG 诱导的); 3=未诱导的 Pp291; 4=诱导的 Pp291; 5=超离心 1 后的上清液; 6=超离心 2 后的上清液; 7=洗脱物; 8, 9, 10=洗涤步骤 pH 8, pH 7, pH 6; 11,12=洗脱步骤 pH 5, pH 4; (B) 用咪唑梯度洗脱: M=分子标记; 1 到 11 增加咪唑浓度(mM): 0, 20, 40, 60, 80, 100, 125, 150, 200, 250, 300。

图 2: 光度活力测定: 所示为加入克隆 Pp291 的细胞裂解液(C)、该细胞裂解液的 1:50 稀释物(B)和空白载体 pQE30(A)后氢过氧化物溶液在 234 nm 的吸收下降。

图 3: 在氢过氧化物和二乙烯基醚合酶的反应中形成的挥发性醛的衍生物醇的 HPLC 分析的洗脱图: 用醛衍生试剂处理 colneleic(一种二乙烯基醚)后检测到(2E)-壬烯醛。

图 4: 由克隆 Pp364 编码的 DES 酶催化底物 13-HPOTE 和 9-HPODE 形成的产物(醛类)的 HPLC 分析的洗脱图。基于它们的存留时间鉴定它们为(2E)-己烯醛和(2E)-壬烯醛。

图 5: 由克隆 Pp291 编码的 AOS 酶转化氢过氧化物形成的非挥发性产物的 HPLC 分析的洗脱图。

图 6: 由克隆 Pp364 编码的 DES 酶转化氢过氧化物形成的非挥发性产物的 HPLC 分析的洗脱图。

a=细胞裂解液; b=纯化的酶。

图 7: 通过克隆 Pp291 编码的 CYP74 酶的催化作用形成的产物的 GC/MS 层析谱。在 18.2 分钟时的信号具有窗口中所示的质谱。

图 8: 克隆 Pp291 编码的酶的相对酶活力的 pH 函数。

图 9: 克隆 Pp291 编码的 CYP74 酶对各种底物的相对转化率(底物专一性); 每种情况下底物浓度为 20 μM ; 用光度法测量; n.d.=未能检测到。

序列表

<110> 巴斯福植物科学有限公司 (BASF Plant Science GmbH)

<120> 分离自展叶剑叶藓的 CYP74 酶家族之丙二烯氧化物合酶和二乙烯基醚合酶和编码这些合酶的核苷酸序列以及产生病原体抗性植物的方法

<130> 1

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1428

<212> DNA

<213> 展叶剑叶藓 (*Physcomitrella patens*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1428)

<223> Pp291 丙二烯氧化物合酶

<400> 1

atg gca gtc cct tca tcc aag ctg ccg ttg aag gcg att cct gga gac	48
Met Ala Val Pro Ser Ser Lys Leu Pro Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asp	
1 5 10 15	
tat gga gtc ccc tac ttc ggt gcc ata aag gat cga cta gac tac ttt	96
Tyr Gly Val Pro Tyr Phe Gly Ala Ile Lys Asp Arg Leu Asp Tyr Phe	
20 25 30	
tgg ttg cag ggg gag gag cag ttt tac cga agc cgg atg gcc aag tac	144
Trp Leu Gln Gly Glu Glu Gln Phe Tyr Arg Ser Arg Met Ala Lys Tyr	
35 40 45	
aat agc acg gtg ttt cgt gtc aac atg ccg cct ggc cct cca att tcc	192
Asn Ser Thr Val Phe Arg Val Asn Met Pro Pro Gly Pro Pro Ile Ser	
50 55 60	
gaa cac cct caa gtc atc tgc ctc ttg gat cag aaa agc ttt cca att	240
Glu His Pro Gln Val Ile Cys Leu Leu Asp Gln Lys Ser Phe Pro Ile	
65 70 75 80	
ctg ttc gac gtt agc aag gtt gag aaa aag gac gtg ttc aca gga aca	288
Leu Phe Asp Val Ser Lys Val Glu Lys Lys Asp Val Phe Thr Gly Thr	
85 90 95	
tac atg ccg agt gtg agc ttc acc agc ggg tac cgc gtt tgc tcc tac	336
Tyr Met Pro Ser Val Ser Phe Thr Ser Gly Tyr Arg Val Cys Ser Tyr	
100 105 110	
ttg gat ccc tct gag gaa cgc cac acg aag ctc aag caa tgg tgc ttt	384
Leu Asp Pro Ser Glu Glu Arg His Thr Lys Leu Lys Gln Trp Cys Phe	
115 120 125	
gaa gtc att gcg atg aac ggg cgg aac ttt ctt ccc gag ttt cac aag	432
Glu Val Ile Ala Met Asn Gly Arg Asn Phe Leu Pro Glu Phe His Lys	

130	135	140	
tcg att gaa gag tcg atg gtg ctc tgg gag acg agt ctg gcc aag ggc			480
Ser Ile Glu Glu Ser Met Val Leu Trp Glu Thr Ser Leu Ala Lys Gly			
145	150	155	160
gag aag act agc gta tcg gat gag gtg aaa cag ttc gcg ttt aat ttc			528
Glu Lys Thr Ser Val Ser Asp Glu Val Lys Gln Phe Ala Phe Asn Phe			
	165	170	175
ctg atg cgc gct gta tgc cat cac gac ccc gct gcg cct gga gaa tac			576
Leu Met Arg Ala Val Cys His His Asp Pro Ala Ala Pro Gly Glu Tyr			
	180	185	190
agc tta ggg cgt aat ggt ggc ccg tat gca acc gcc tgg gca aat ccc			624
Ser Leu Gly Arg Asn Gly Gly Pro Tyr Ala Thr Ala Trp Ala Asn Pro			
	195	200	205
cag ctc gct ccg att gca gga cag acg ggt ctc ccc cat gtc gtg gag			672
Gln Leu Ala Pro Ile Ala Gly Gln Thr Gly Leu Pro His Val Val Glu			
	210	215	220
gag ctc gtg tta cac acc gtc cca ctc ccc tct gcc ctg gtc aag aag			720
Glu Leu Val Leu His Thr Val Pro Leu Pro Ser Ala Leu Val Lys Lys			
	225	230	235
aac tac gat gcc ctc tac aat ttc atc aaa aac tac gcc acc gag gcg			768
Asn Tyr Asp Ala Leu Tyr Asn Phe Ile Lys Asn Tyr Ala Thr Glu Ala			
	245	250	255
ctg gat agg gct gaa gct atg ggc atc gag cgc aat gac gcc act gcc			816
Leu Asp Arg Ala Glu Ala Met Gly Ile Glu Arg Asn Asp Ala Thr Ala			
	260	265	270
aac ctg ctg ttc ttc ctt tgc ttt aac gcc tac ggc gga ttc agc atc			864
Asn Leu Leu Phe Phe Leu Cys Phe Asn Ala Tyr Gly Gly Phe Ser Ile			
	275	280	285
ttc ttc ccc ctc atc act atc ctc att tct tca tgc ggt ccg gag ctc			912
Phe Phe Pro Leu Ile Thr Ile Leu Ile Ser Ser Cys Gly Pro Glu Leu			
	290	295	300
atg cac gat ctc cac gac gaa gtc acc aag gcc gtc gcc gcc aca gat			960
Met His Asp Leu His Asp Glu Val Thr Lys Ala Val Ala Ala Thr Asp			
	305	310	315
ggg aaa gtc act ctt caa tcc atc gag aac atg cca ttg gtg aag tcc			1008
Gly Lys Val Thr Leu Gln Ser Ile Glu Asn Met Pro Leu Val Lys Ser			
	325	330	335
gtc gtc tac gaa gct ttc cga ttc aag ccc cca gtg cca tac caa tac			1056
Val Val Tyr Glu Ala Phe Arg Phe Lys Pro Pro Val Pro Tyr Gln Tyr			
	340	345	350
ggc aag gcc aag ttc gac ttc acc ata gag aac cac gaa aac tcc ttc			1104
Gly Lys Ala Lys Phe Asp Phe Thr Ile Glu Asn His Glu Asn Ser Phe			
	355	360	365
gag gtc aag aag gga gaa atg ctg tat ggt tat caa cct atc gtg atg			1152

Glu Val Lys Lys Gly Glu Met Leu Tyr Gly Tyr Gln Pro Ile Val Met
 370 375 380
 cac gac ccc aag gtc ttc tcg gac cca gat cag ttt cta cct cga cga 1200
 His Asp Pro Lys Val Phe Ser Asp Pro Asp Gln Phe Leu Pro Arg Arg
 385 390 395 400
 ttc atg ggc ccc gac ggc gag aag ctc atc aaa tac atc ttc tgg tcc 1248
 Phe Met Gly Pro Asp Gly Glu Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Phe Trp Ser
 405 410 415
 aat ggt tac gag act gac gag ccg act acc gca aac aag cag tgc gcc 1296
 Asn Gly Tyr Glu Thr Asp Glu Pro Thr Thr Ala Asn Lys Gln Cys Ala
 420 425 430
 gga aag gac ttg gtg gtc aca atg gcg cga gca ttc gtc gca gaa atg 1344
 Gly Lys Asp Leu Val Val Thr Met Ala Arg Ala Phe Val Ala Glu Met
 435 440 445
 ttc ttg aga tat aaa gag tat acc ctg acc atg gag ggc gca gga aat 1392
 Phe Leu Arg Tyr Lys Glu Tyr Thr Leu Thr Met Glu Gly Ala Gly Asn
 450 455 460
 gcg acc aag gtt ttc ttt tcc gat ctc aaa aag tga 1428
 Ala Thr Lys Val Phe Phe Ser Asp Leu Lys Lys
 465 470 475

 <210> 2
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> 展叶剑叶蕨

 <400> 2

 Met Ala Val Pro Ser Ser Lys Leu Pro Leu Lys Ala Ile Pro Gly Asp
 1 5 10 15
 Tyr Gly Val Pro Tyr Phe Gly Ala Ile Lys Asp Arg Leu Asp Tyr Phe
 20 25 30
 Trp Leu Gln Gly Glu Glu Gln Phe Tyr Arg Ser Arg Met Ala Lys Tyr
 35 40 45
 Asn Ser Thr Val Phe Arg Val Asn Met Pro Pro Gly Pro Pro Ile Ser
 50 55 60
 Glu His Pro Gln Val Ile Cys Leu Leu Asp Gln Lys Ser Phe Pro Ile
 65 70 75 80
 Leu Phe Asp Val Ser Lys Val Glu Lys Lys Asp Val Phe Thr Gly Thr
 85 90 95
 Tyr Met Pro Ser Val Ser Phe Thr Ser Gly Tyr Arg Val Cys Ser Tyr
 100 105 110
 Leu Asp Pro Ser Glu Glu Arg His Thr Lys Leu Lys Gln Trp Cys Phe
 115 120 125

Glu Val Ile Ala Met Asn Gly Arg Asn Phe Leu Pro Glu Phe His Lys
 130 135 140

Ser Ile Glu Glu Ser Met Val Leu Trp Glu Thr Ser Leu Ala Lys Gly
 145 150 155 160

Glu Lys Thr Ser Val Ser Asp Glu Val Lys Gln Phe Ala Phe Asn Phe
 165 170 175

Leu Met Arg Ala Val Cys His His Asp Pro Ala Ala Pro Gly Glu Tyr
 180 185 190

Ser Leu Gly Arg Asn Gly Gly Pro Tyr Ala Thr Ala Trp Ala Asn Pro
 195 200 205

Gln Leu Ala Pro Ile Ala Gly Gln Thr Gly Leu Pro His Val Val Glu
 210 215 220

Glu Leu Val Leu His Thr Val Pro Leu Pro Ser Ala Leu Val Lys Lys
 225 230 235 240

Asn Tyr Asp Ala Leu Tyr Asn Phe Ile Lys Asn Tyr Ala Thr Glu Ala
 245 250 255

Leu Asp Arg Ala Glu Ala Met Gly Ile Glu Arg Asn Asp Ala Thr Ala
 260 265 270

Asn Leu Leu Phe Phe Leu Cys Phe Asn Ala Tyr Gly Gly Phe Ser Ile
 275 280 285

Phe Phe Pro Leu Ile Thr Ile Leu Ile Ser Ser Cys Gly Pro Glu Leu
 290 295 300

Met His Asp Leu His Asp Glu Val Thr Lys Ala Val Ala Ala Thr Asp
 305 310 315 320

Gly Lys Val Thr Leu Gln Ser Ile Glu Asn Met Pro Leu Val Lys Ser
 325 330 335

Val Val Tyr Glu Ala Phe Arg Phe Lys Pro Pro Val Pro Tyr Gln Tyr
 340 345 350

Gly Lys Ala Lys Phe Asp Phe Thr Ile Glu Asn His Glu Asn Ser Phe
 355 360 365

Glu Val Lys Lys Gly Glu Met Leu Tyr Gly Tyr Gln Pro Ile Val Met
 370 375 380

His Asp Pro Lys Val Phe Ser Asp Pro Asp Gln Phe Leu Pro Arg Arg
 385 390 395 400

Phe Met Gly Pro Asp Gly Glu Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Phe Trp Ser
 405 410 415

Asn Gly Tyr Glu Thr Asp Glu Pro Thr Thr Ala Asn Lys Gln Cys Ala
 420 425 430

Gly Lys Asp Leu Val Val Thr Met Ala Arg Ala Phe Val Ala Glu Met
 435 440 445

Phe Leu Arg Tyr Lys Glu Tyr Thr Leu Thr Met Glu Gly Ala Gly Asn
 450 455 460

Ala Thr Lys Val Phe Phe Ser Asp Leu Lys Lys
 465 470 475

<210> 3

<211> 1821

<212> DNA

<213> 展叶剑叶藓

<220>

<221> CDS

<222> (25)..(1623)

<223> Pp364 二乙烯基醚合酶

<400> 3

gcggaaaact ccgctccgat caat atg gat cgc act tta gtt ctg act tgc 51
 Met Asp Arg Thr Leu Val Leu Thr Cys
 1 5

act acg act tgc agc cac tcc gca ttc cgc cag tct gca ttg cct agc 99
 Thr Thr Thr Cys Ser His Ser Ala Phe Arg Gln Ser Ala Leu Pro Ser
 10 15 20 25

aac acc agc ata tct gtg agg tta gga aca tgt agc gtt cgc aca cag 147
 Asn Thr Ser Ile Ser Val Arg Leu Gly Thr Cys Ser Val Arg Thr Gln
 30 35 40

aag cgc cgt acg gtt gta gcc agt ctt ggg aac att gag acg aca tcg 195
 Lys Arg Arg Thr Val Val Ala Ser Leu Gly Asn Ile Glu Thr Thr Ser
 45 50 55

aca tcg acc gtg ggg caa gag agc aat ctg ccc ctc cgt gaa atc ccc 243
 Thr Ser Thr Val Gly Gln Glu Ser Asn Leu Pro Leu Arg Glu Ile Pro
 60 65 70

gga agc tac gga atc cct tat ttg tcg caa ttg ctc gac aga tgg acc 291
 Gly Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Leu Ser Gln Leu Leu Asp Arg Trp Thr
 75 80 85

ttt ttt tac agg gaa ggc gaa ccg cag ttc tgg caa tca cga atg gcg 339
 Phe Phe Tyr Arg Glu Gly Glu Pro Gln Phe Trp Gln Ser Arg Met Ala
 90 95 100 105

aag tat ggg agc acc gtg att cga tcc aac atg ccg cct ggt tgg ttt 387
 Lys Tyr Gly Ser Thr Val Ile Arg Ser Asn Met Pro Pro Gly Trp Phe
 110 115 120

tgg acc gac tcc cgc tgc att atg ctt ctt gac cag aag agc tac ccc 435
 Trp Thr Asp Ser Arg Cys Ile Met Leu Leu Asp Gln Lys Ser Tyr Pro
 125 130 135

acc gtc ttt gat tac gat aag gtg gat aag tac aaa gcc ttt gct ggg 483
 Thr Val Phe Asp Tyr Asp Lys Val Asp Lys Tyr Lys Ala Phe Ala Gly
 140 145 150

acc atc atg cca agc acc gaa tac aat ggc ggg tat gag gtg tgt gcg	531
Thr Ile Met Pro Ser Thr Glu Tyr Asn Gly Gly Tyr Glu Val Cys Ala	
155 160 165	
tac ctc gac gct tct gac aag aag cat gag cag ctc aaa ggc tat tgc	579
Tyr Leu Asp Ala Ser Asp Lys Lys His Glu Gln Leu Lys Gly Tyr Cys	
170 175 180 185	
ttc gag ctt ctc aaa ttt tcc tcg tcg aaa tgg gca cgg gag ttt cac	627
Phe Glu Leu Leu Lys Phe Ser Ser Ser Lys Trp Ala Arg Glu Phe His	
190 195 200	
acg gcc atc tca gag aca ttc aat cag tgg gaa ggc aaa ctt gca caa	675
Thr Ala Ile Ser Glu Thr Phe Asn Gln Trp Glu Gly Lys Leu Ala Gln	
205 210 215	
aag acg cct gca tta att aac ccg acg ctt cct gaa tcg ctc ttt agt	723
Lys Thr Pro Ala Leu Ile Asn Pro Thr Leu Pro Glu Ser Leu Phe Ser	
220 225 230	
ttt gtg atc aat gca ctg act acc gct aga ttc gac gac agt agc ata	771
Phe Val Ile Asn Ala Leu Thr Thr Ala Arg Phe Asp Asp Ser Ser Ile	
235 240 245	
ccc gat gca gag aag cca gtc tgc ggg gat ttg caa aaa tgg gcg gga	819
Pro Asp Ala Glu Lys Pro Val Cys Gly Asp Leu Gln Lys Trp Ala Gly	
250 255 260 265	
ttc cag ctg atg ccc gta atc aga acc ggg gca cct atc tac att gaa	867
Phe Gln Leu Met Pro Val Ile Arg Thr Gly Ala Pro Ile Tyr Ile Glu	
270 275 280	
gag atg ctc cac gtt gct ccc atc cct gca agc cta act aaa ggg ggc	915
Glu Met Leu His Val Ala Pro Ile Pro Ala Ser Leu Thr Lys Gly Gly	
285 290 295	
tat gac aaa atg gtg gtg ttt ctt caa aag tat gcg gct gaa acg cta	963
Tyr Asp Lys Met Val Val Phe Leu Gln Lys Tyr Ala Ala Glu Thr Leu	
300 305 310	
tcc atc gca gag aag ttt ggg ttg tct cag gac gag gcg gtt cac aac	1011
Ser Ile Ala Glu Lys Phe Gly Leu Ser Gln Asp Glu Ala Val His Asn	
315 320 325	
ttg atc ttc ttc cta atc ttg aac gct cat ggc gga ttc tgc cgg ttc	1059
Leu Ile Phe Phe Leu Ile Leu Asn Ala His Gly Gly Phe Cys Arg Phe	
330 335 340 345	
ctt cca gtg atc ctt cgg gaa gta gcc aag aat ggc caa ctg caa gct	1107
Leu Pro Val Ile Leu Arg Glu Val Ala Lys Asn Gly Gln Leu Gln Ala	
350 355 360	
gat ttg cga gag gaa gtg cgg gcc gca gtg aaa gcc agc gga tcg gac	1155
Asp Leu Arg Glu Glu Val Arg Ala Ala Val Lys Ala Ser Gly Ser Asp	
365 370 375	
caa gtg acc atg aag gcc gtg atg aat gac atg cct ctg gtg gca tcg	1203
Gln Val Thr Met Lys Ala Val Met Asn Asp Met Pro Leu Val Ala Ser	
380 385 390	

```

aca gta ttc gag gcg ctc cgc ttc gac ccc ccg gtg cca ttt cag tac      1251
Thr Val Phe Glu Ala Leu Arg Phe Asp Pro Pro Val Pro Phe Gln Tyr
      395                      400                      405

gcc aga gcg aag aag gac ttc atc atc gaa tcc cac gac gcg aga tac      1299
Ala Arg Ala Lys Lys Asp Phe Ile Ile Glu Ser His Asp Ala Arg Tyr
410                      415                      420                      425

caa ata aaa acc ggc gac ttc ctc ggc ggc gtg aac tac atg gtc tcc      1347
Gln Ile Lys Thr Gly Asp Phe Leu Gly Gly Val Asn Tyr Met Val Ser
                      430                      435                      440

cgc gac ccg aag gtg ttc acc gac agg ccc aac gag ttc aac gcg cgg      1395
Arg Asp Pro Lys Val Phe Thr Asp Arg Pro Asn Glu Phe Asn Ala Arg
                      445                      450                      455

cgg ttc atg gga ccg gag ggg gac aag ctg ctt gca cat ttg gtg tgg      1443
Arg Phe Met Gly Pro Glu Gly Asp Lys Leu Leu Ala His Leu Val Trp
      460                      465                      470

tcg aac ggc cgg caa act gat gaa acc acg gtg tac aca aag cag tgt      1491
Ser Asn Gly Arg Gln Thr Asp Glu Thr Thr Val Tyr Thr Lys Gln Cys
      475                      480                      485

gcg ggg aag gag att gtg ccg ctc aca ggg cgc ctt ctt ctg gcg gag      1539
Ala Gly Lys Glu Ile Val Pro Leu Thr Gly Arg Leu Leu Leu Ala Glu
490                      495                      500                      505

ctt ttc atg cgc ttc gat tcc ttc aac atc gaa ggc ctc gaa atg gag      1587
Leu Phe Met Arg Phe Asp Ser Phe Asn Ile Glu Gly Leu Glu Met Glu
                      510                      515                      520

gca acc ttc act tca ctg acg ccg cga tca gat tga agctatagct      1633
Ala Thr Phe Thr Ser Leu Thr Pro Arg Ser Asp
                      525                      530

tgtaaaacac ccaccccacg ttgtgagatt attagtagca cgtacatcag tagttcacga 1693
gactcatatt ctgatccatc atcgctgga tgtcgaaact gactatatgt agtatactcg 1753
actttgtatg ccaaaaacac attttcaatt tgtctaatacg gcctgtttc cacttcaaaa 1813
aaaaaaaaa 1821

```

```

<210> 4
<211> 532
<212> PRT
<213> 展叶剑叶蕨

```

```
<400> 4
```

```

Met Asp Arg Thr Leu Val Leu Thr Cys Thr Thr Thr Cys Ser His Ser
1                      5                      10                      15

Ala Phe Arg Gln Ser Ala Leu Pro Ser Asn Thr Ser Ile Ser Val Arg
      20                      25                      30

```

Leu Gly Thr Cys Ser Val Arg Thr Gln Lys Arg Arg Thr Val Val Ala
 35 40 45
 Ser Leu Gly Asn Ile Glu Thr Thr Ser Thr Ser Thr Val Gly Gln Glu
 50 55 60
 Ser Asn Leu Pro Leu Arg Glu Ile Pro Gly Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr
 65 70 75 80
 Leu Ser Gln Leu Leu Asp Arg Trp Thr Phe Phe Tyr Arg Glu Gly Glu
 85 90 95
 Pro Gln Phe Trp Gln Ser Arg Met Ala Lys Tyr Gly Ser Thr Val Ile
 100 105 110
 Arg Ser Asn Met Pro Pro Gly Trp Phe Trp Thr Asp Ser Arg Cys Ile
 115 120 125
 Met Leu Leu Asp Gln Lys Ser Tyr Pro Thr Val Phe Asp Tyr Asp Lys
 130 135 140
 Val Asp Lys Tyr Lys Ala Phe Ala Gly Thr Ile Met Pro Ser Thr Glu
 145 150 155 160
 Tyr Asn Gly Gly Tyr Glu Val Cys Ala Tyr Leu Asp Ala Ser Asp Lys
 165 170 175
 Lys His Glu Gln Leu Lys Gly Tyr Cys Phe Glu Leu Leu Lys Phe Ser
 180 185 190
 Ser Ser Lys Trp Ala Arg Glu Phe His Thr Ala Ile Ser Glu Thr Phe
 195 200 205
 Asn Gln Trp Glu Gly Lys Leu Ala Gln Lys Thr Pro Ala Leu Ile Asn
 210 215 220
 Pro Thr Leu Pro Glu Ser Leu Phe Ser Phe Val Ile Asn Ala Leu Thr
 225 230 235 240
 Thr Ala Arg Phe Asp Asp Ser Ser Ile Pro Asp Ala Glu Lys Pro Val
 245 250 255
 Cys Gly Asp Leu Gln Lys Trp Ala Gly Phe Gln Leu Met Pro Val Ile
 260 265 270
 Arg Thr Gly Ala Pro Ile Tyr Ile Glu Glu Met Leu His Val Ala Pro
 275 280 285
 Ile Pro Ala Ser Leu Thr Lys Gly Gly Tyr Asp Lys Met Val Val Phe
 290 295 300
 Leu Gln Lys Tyr Ala Ala Glu Thr Leu Ser Ile Ala Glu Lys Phe Gly
 305 310 315 320
 Leu Ser Gln Asp Glu Ala Val His Asn Leu Ile Phe Phe Leu Ile Leu
 325 330 335
 Asn Ala His Gly Gly Phe Cys Arg Phe Leu Pro Val Ile Leu Arg Glu
 340 345 350

<222> (1)..(19)
<223>

<400> 6
ggaaacagct atgaccatg

19

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> PP291AOS5R; 基因特异性 RACE-引物
<222> (1)..(23)
<223>

<400> 7
tcacctcatc cgatacgcta gtc

23

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> Pp364AOS5R; 基因特异性 RACE-引物
<222> (1)..(22)
<223>

<400> 8
gtc gatgtcg tctcaatggt cc

22

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> Pp364AOS5R2; 基因特异性 RACE-引物
<222> (1)..(23)
<223>

<400> 9
ccattcgtga ttgccagaac tgc

23

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> Pp291/5'-SphI; 表达引物
<222> (1)..(31)
<223>

<400> 10
 aaagcatgca tggcagtccc ttcaccaag c 31

<210> 11
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> Pp291/3'PstI; 表达引物
 <222> (1)..(45)
 <223>

<400> 11
 aaactgcagt cactttttga gatcggaaaa gaaaaccttg gtcgc 45

<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> Pp364/5'BamHI; 表达引物
 <222> (1)..(30)
 <223>

<400> 12
 ggatcccgta cggttgtagc cagtcttggg 30

<210> 13
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <221> Pp364/3'HindIII; 表达引物
 <222> (1)..(29)
 <223>

<400> 13
 aagctttcaa tctgatcgcg gcgtcagtg 29

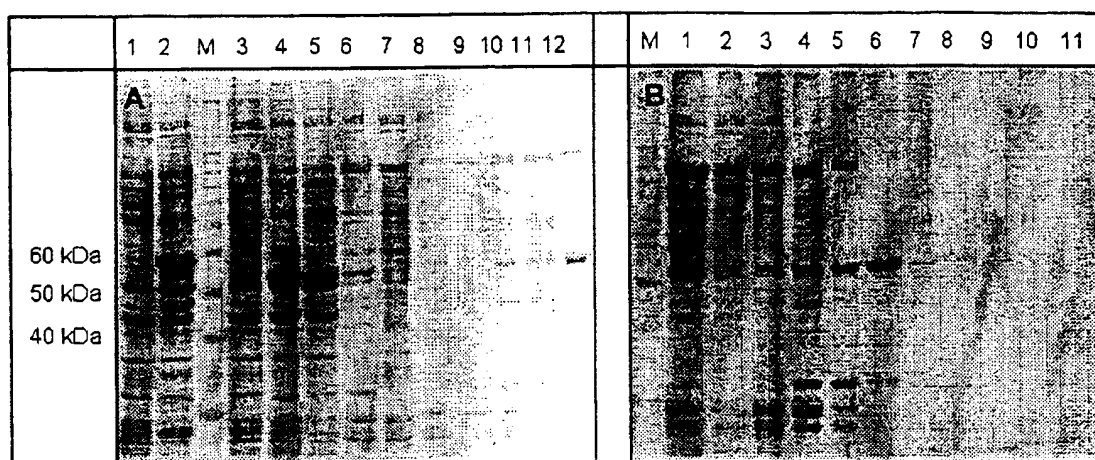


图 1

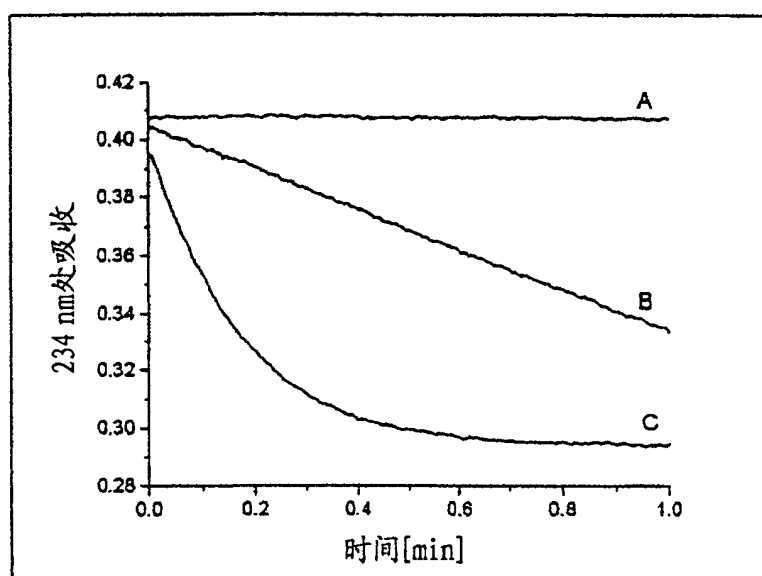


图2

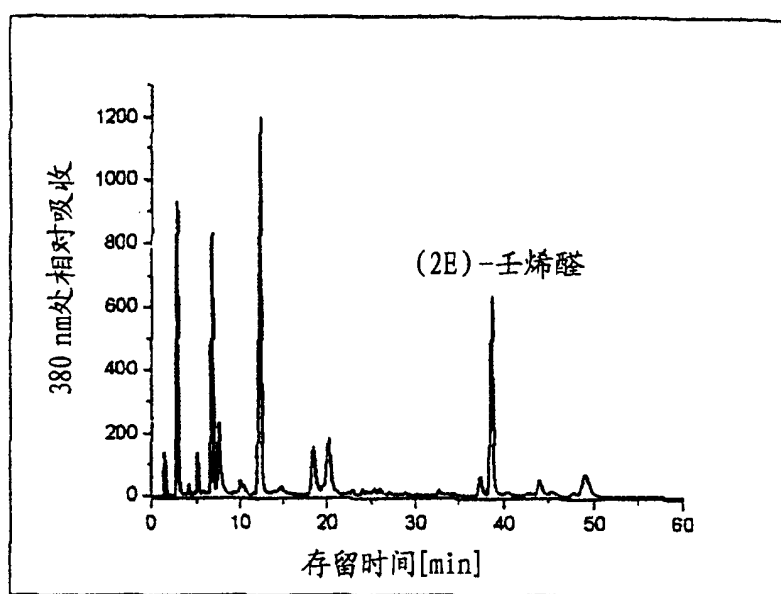


图3

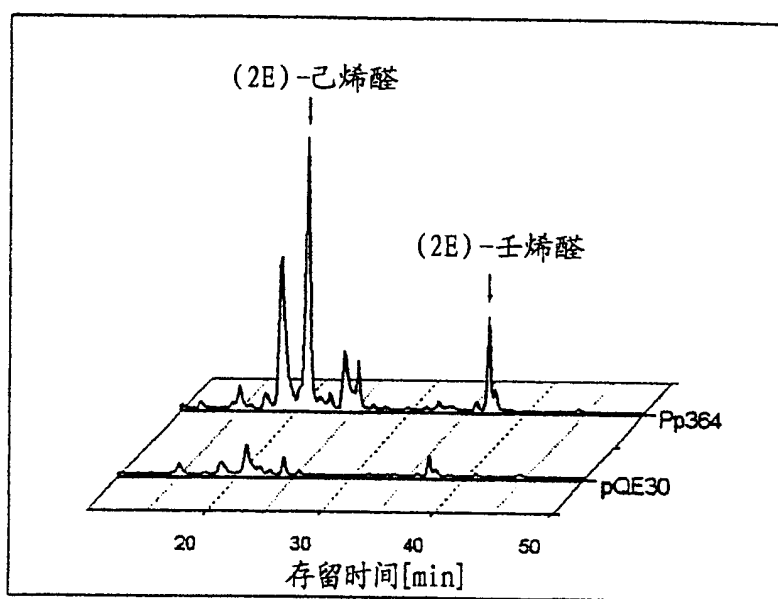


图4

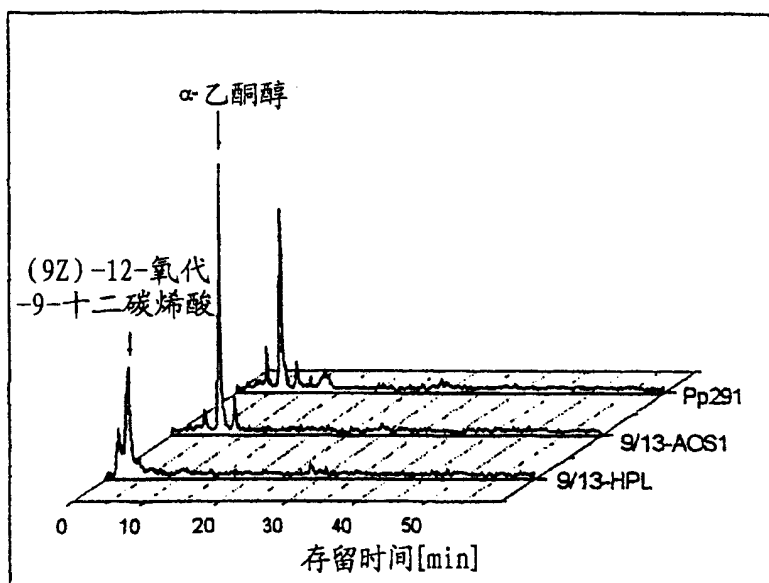


图5

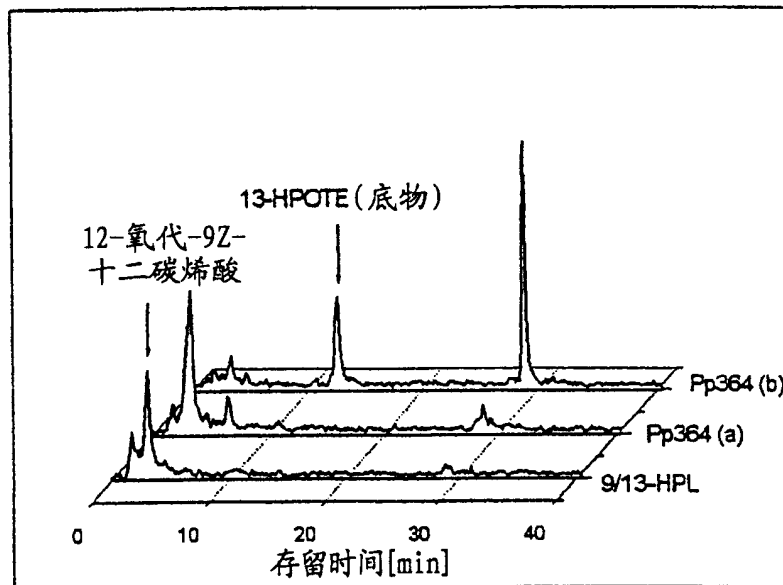


图6

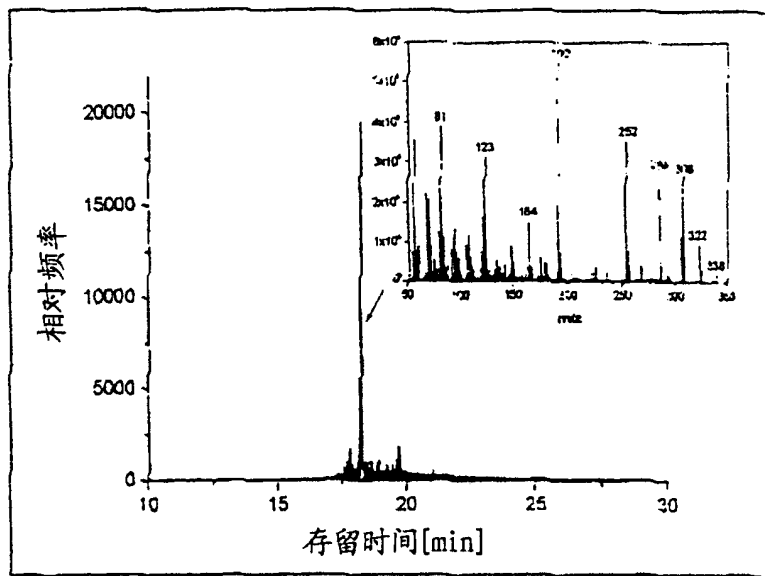


图7

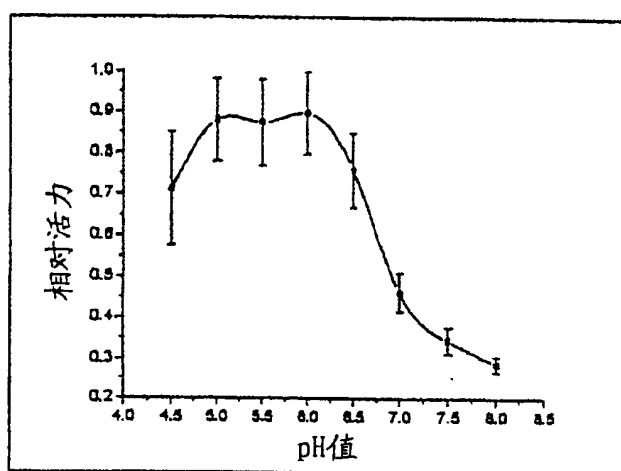


图8

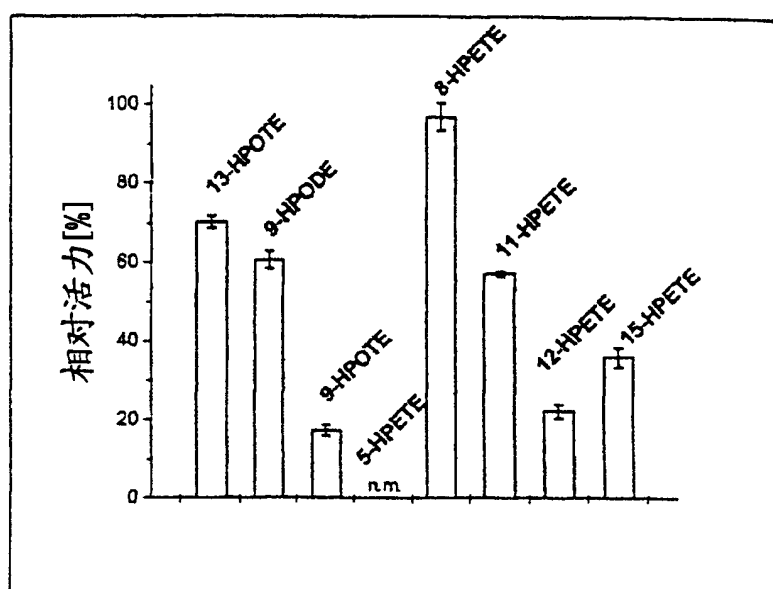


图9