



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102471779 A

(43) 申请公布日 2012. 05. 23

(21) 申请号 201080032920. 1

C07K 14/415(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 16

A01H 5/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/228195 2009. 07. 24 US

61/286061 2009. 12. 14 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 01. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/042231 2010. 07. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02011/011273 EN 2011. 01. 27

(71) 申请人 先锋国际良种公司

地址 美国依阿华州

(72) 发明人 S·J·拉维特 D·T·托姆斯

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李波 李炳爱

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 52 页

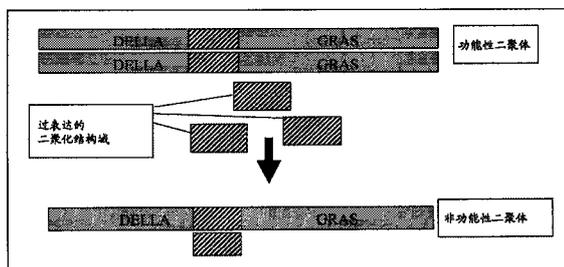
序列表 34 页 附图 4 页

(54) 发明名称

使用二聚化结构域组分堆叠以调节植株构造

(57) 摘要

本方法提供了通过用二聚化结构域和组分堆叠以调节转基因的表达,从而调节植株构造来改变作物的收获指数的手段。在单个转化载体单元中提供了所述转基因/二聚化结构域堆叠并用于调节植物中的植物生长、产量和收获指数。



1. 一种分离的编码二聚化结构域的核酸,所述二聚化结构域包含 SEQ ID NO :41 的共有氨基酸序列或与 SEQ ID NO :41 具有 90%同一性的序列。
2. 根据权利要求 1 所述的编码二聚化结构域的核酸,所述二聚化结构域基本上由 SEQ ID NO :19 或 21 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO :19 或 21 具有 90%同一性的序列组成。
3. 根据权利要求 1 所述的分离的核酸,所述核酸包含 SEQ ID NO :9 的多核苷酸序列。
4. 根据权利要求 1 所述的分离的核酸,其中所述二聚化结构域结合至天然的玉米 D8 蛋白或 D9 蛋白以产生非功能性 D8 或 D9 二聚体。
5. 一种重组表达盒,所述表达盒包含根据权利要求 3 所述的多核苷酸,其中所述多核苷酸可操作地连接至启动子。
6. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据权利要求 5 所述的表达盒。
7. 一种转基因植物,所述转基因植物包含根据权利要求 5 所述的重组表达盒。
8. 根据权利要求 7 所述的转基因植物,其中所述植物是单子叶植物。
9. 根据权利要求 7 所述的转基因植物,其中所述植物是双子叶植物。
10. 根据权利要求 7 所述的转基因植物,其中所述植物选自:玉米、大豆、向日葵、高粱、卡诺拉 (canola)、小麦、苜蓿、棉花、水稻、大麦、小米、花生、甘蔗、草、草皮草和可可。
11. 一种转基因种子,所述转基因种子来自根据权利要求 7 所述的转基因植物。
12. 一种调节转基因植物中的收获指数的方法,所述方法包括表达编码矮秆基因二聚化结构域的重组多核苷酸。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述矮秆基因是来自玉米的 D8。
14. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述多核苷酸包含可操作地连接至启动子的根据权利要求 3 所述的核酸序列。
15. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物选自:玉米、大豆、向日葵、高粱、卡诺拉、小麦、苜蓿、棉花、水稻、大麦、小米、花生、甘蔗、草、草皮草和可可。
16. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述二聚化结构域形成内源性玉米 D8 或 D9 蛋白的非功能性二聚体。
17. 一种在植物中用二聚化结构域调节植物组织生长的方法,所述方法包括表达重组表达盒,所述重组表达盒包含可操作地连接至启动子的根据权利要求 3 所述的多核苷酸。
18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述植物组织生长是由于内源性赤霉酸的抑制降低。
19. 根据权利要求 17 所述的方法,其中所述植物选自:玉米、大豆、高粱、卡诺拉、小麦、苜蓿、棉花、水稻、大麦、小米、花生、甘蔗、草、草皮草和可可。
20. 一种衍生自对转基因植物组分进行加工的方法的产品,所述转基因植物组分表达编码二聚化结构域的分离多核苷酸,所述方法包括:
 - a. 栽培植物,所述植物表达可操作地连接至启动子的与 SEQ ID NO :9 的全长序列具有至少 90%序列同一性的多核苷酸;以及
 - b. 对所述植物组分进行加工以获得产品。
21. 根据权利要求 20 所述的产品,其中所述植物组分是种子。
22. 根据权利要求 20 所述的产品,其中所述多核苷酸还编码选自 SEQ ID NO :19 的多肽。

23. 根据权利要求 20 所述的产品,所述产品是乙醇组分。
24. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有改善的株冠形状。
25. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物在叶组织中具有增加的光合作用容量。
26. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有改善的茎秆强度。
27. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有改善的植物抗倒伏性。
28. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有改变的维管束结构或数目。
29. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有增加的根生物量。
30. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有增强的根生长。
31. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有受调节的苗发育。
32. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有受调节的叶发育。
33. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述植物具有改善的青贮饲料品质和可消化性。
34. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述启动子选自叶特异性启动子、维管元件优选的启动子和根特异性启动子。

使用二聚化结构域组分堆叠以调节植株构造

技术领域

[0001] 本发明整体涉及分子生物学领域。

背景技术

[0002] 收获指数即谷粒与总地上部分生物量之比在过去 100 年里已近乎保持在约 50% 不变 (Sinclair, (1998) *Crop Science* 38 :638-643; Tollenaar 和 Wu, (1999) “*Crop Science* 39 :1597-1604)。因而, 已因为每单位土地面积的总生物量产量的增加而在过去 50-60 年间谷粒产量增加了四倍, 这种每单位土地面积的总生物量产量的增加是通过增加种植密度来实现的 (Duvick 和 Cassman, (1999) *Crop Science* 39 :1622-1630)。对不断增加的种植密度条件下更高谷粒产量的选择已导致植物结构的显著构造变化, 其具有相对竖直且狭小的叶片以尽量减小遮光。较高密度种植 (或高植物种群) 的不良后果是茎秆倒伏和根倒伏的频率增加。随着追求最大的每单位土地面积生物量产量而接近最佳的密度时, 种植密度与生物量产量之间的关系显著偏离线性。这反映在个体植株生物量的成比例地更大降低, 该降低以较弱的茎秆以及因此导致的倒伏增加的形式表现出来。另外, 成熟时大约 20% 的总生物量以根的形式保持在土壤中, 构成其有机物含量 (Amos 和 Walters, 2006)。由于茎秆和根倒伏二者是影响收获指数的农学特性, 所以矮秆型植物可能在产量稳定性方面具有潜在的优势。

[0003] 矮秆植物对农业具有大的影响。由于倒伏可能性低和对更集约的管理的响应以及产量稳定性和潜在更高的产量, 小麦 (以及其他小谷粒谷类) 的矮秆品种在北美得以广泛应用。还存在可从矮秆作物的较高收获指数实现的其他有益效果, 包括所需的杀虫剂和肥料的量减少、种植密度更高以及人工费用减少。矮秆植物使得易于收获、作物管理简化以及水和营养物质使用量的潜在减少。

[0004] 鉴于当前人口不断增加以及适于农业的土地面积不断减少这两个趋势, 不断增加农业生产力是且将继续是极为重要的挑战。矮秆作物是我们农业生产体系的重要组成。矮秆作物的使用率增加可有助于满足未来的农业生产需求。

[0005] 可对增加茎秆强度的基因即在作物中负责纤维素产生的纤维素合酶进行修饰以增加多种植物组织的尺寸和强度。据发现单位玉米茎秆长度中的纤维素是机械强度的最好指标 (Appenzeller 等人 (2004), *Cellulose* 11 :287-299 ;Ching 等人 (2006))。茎秆干物质中不断增加的纤维素浓度可导致改善茎秆机械强度以及增加生物量, 这继而可增加产量以及潜在地增加收获指数。植物强度 (生物量) 的改善和特定植物组织 (器官) 的生长为植物提供了更高的生物量和增加的收获指数。

[0006] 开花时间决定成熟期, 是一个重要的农学特性。控制从营养生长向生殖生长转变的基因是操纵开花时间所必需的。在玉米中, 成花基因为作物产量增加、种质对不同气候带的适应以及杂交种子生产的同步开花提供了机会。开花经修饰的近交系的开发有利于优良种质跨越整个成熟带 (maturity zone)。此外, 还存在另外的机会来增加灌浆和 / 或谷粒脱水速率以对开花开始的改变进行补充。

[0007] 转化植物内的植株构造基因、开花时间基因和矮秆基因组分的组合控制表达将不仅会增加作物的产量潜力和收获指数,而且还会改善使管理规范简化以及增加作物物种对新地理区域的适应性的农学特性。

[0008] 本发明提供了通过用多种堆叠的植物基因和矮秆基因组分调节转基因的表达,从而调节植株构造来改变作物的收获指数的手段。矮秆基因 D8 的组分即二聚化结构域 (DD) 为亮氨酸拉链二聚化结构域 (SEQ ID NO :9),作为显性负效应转基因过表达。在单个转化载体单元中提供该转基因 / 二聚化结构域组分堆叠并在植物中用于调节植物的特定植物器官以增加植物的生长、产量和收获指数。在特定植物组织如根、穗或雄穗中表达可导致特定植物器官的伸长。

[0009] 这些堆叠单元可在若干领域中用于增强作物性能和价值,这些领域包括 :1) 植株抗倒伏性 (由茎秆倒伏和根倒伏构成)、收获指数和产量潜力 ;2) 特定植物器官尺寸的修饰 ;3) 作为乙醇或其它可再生生物产品的给料的植物干物质和 4) 青贮饲料。

发明内容

[0010] 提供了用于控制植物生长和二聚化结构域组分堆叠形成以用于增加植物产量的组合物和方法。所述组合物包含来自玉米的二聚化结构域组分堆叠。本发明的组合物包含选自 SEQ ID NO :1-22 的氨基酸序列和核苷酸序列以及它们的变体和片段。

[0011] 在 DNA 构建体中提供了编码该二聚化结构域组分堆叠的多核苷酸用于在所关注的植物中表达。还提供了包含本发明的序列的表达盒、植物、植物细胞、植物部分和种子。在具体的实施方案中,该多核苷酸有效地连接至组成型启动子。

[0012] 提供了用于调节植物或植物部分中二聚化结构域组分堆叠序列的水平的方法。该方法包括向植物或植物部分引入异源多核苷酸,该异源多核苷酸包含本发明的二聚化结构域组分堆叠序列。可增加或降低二聚化结构域组分堆叠多肽的水平。这种方法可用来增加植物中的产量 ;在一个实施方案中,该方法用来提高谷类中的谷粒产量。

[0013] 植物激素 GA 在多种生长过程 (特别是植物生长过程中茎和根的伸长) 中是活跃的。玉米的 D8 (和 D9) 基因编码起到赤霉素信号传导途径抑制剂的作用并且由 DELLA 和 GRAS 结构域组成的转录调节因子。在存在 GA 的情况下 GA 受体与 DELLA 蛋白相互作用,这导致 DELLA 蛋白的多泛素化。多泛素化是 26S 蛋白酶体进行蛋白质降解的信号。DELLA 蛋白的降解消除了它们对 GA 生长响应的抑制。通常,D8/D9 蛋白的降解速率看起来与植物尺寸相关 (即较慢的降解导致对 GA 的响应较少,伸长较少以及高度减少越大)。D8 的 DELLA 结构域中的缺失和特定突变因为这些蛋白质的降解动力学改变而造成矮秆表型。

[0014] D8 (和 D9) 蛋白据认为在体内作为二聚体发挥功能,该二聚体的分解代谢调节植物伸长。强矮秆基因如 D8 的二聚体对降解较不敏感,而中等矮秆基因如 D8MPL 对降解相对更敏感。天然野生型基因 d8 对降解敏感,观察到高的或正常的高度。D8 蛋白的特异性亮氨酸拉链结构域 ZM-D8 243-331 涉及二聚体的形成。一种改变的二聚化结构域蛋白由 ZM-D8 243-331 蛋白的过表达形成。这些截短的蛋白质片段竞争结合全长 D8 和 D9 的亮氨酸拉链结构域。该竞争性结合导致形成具有全长蛋白质 :截短蛋白质的缺陷型二聚体。所得的非功能性二聚体缺乏抑制 GA 响应的能力,当在植物或植物器官中存在时增加伸长。另外,与矮秆植株相比较,利用特定植物器官如根、穗或雄穗的启动子的组织特异性表达预计具有

增加的尺寸（长度）。具体地讲，矮秆植物类型可具有尺寸与野生型或正常高度的植株类似的根。

附图说明

[0015] 图 1 :使用杂交体 33A14、PHP24843、PHP26998 和 PHP26998 时的根生长,该根生长是 2006 年在爱荷华州的约翰斯顿的微根管 (Mini Rhizitron) 中测量的。

[0016] 图 2 :构建体 D8-MPL 堆叠平均收获指数,该收获指数是基于晚季植株干重的。

[0017] 图 3 :24K 时的 D8-MPL 堆叠产量比较。

[0018] 图 4 :描述 DD 的 Zm-D8 243-331 (显性负效应转基因) 过表达的选择性构造修饰的示意图,Zm-D8 243-331 的过表达导致非功能性二聚体。当在诸如根、穗或雄穗之类的组织中表达时非功能性二聚体 (DN) 增加了伸长。

[0019] 图 5 :多个物种 (大豆 (*Glycine max*) (SEQ ID NO :24、26、28、30)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (SEQ ID NO :32、34、36、38 和 40)、玉米 (*Zea mays*) (SEQ ID NO :19)) 的 DD 结构域的比对,示出了保守区和共有序列 (SEQ ID NO :41)。

具体实施方式

[0020] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。除非另外提出,否则本文所采用或所考虑的技术是本领域普通技术人员所熟知的标准方法。材料、方法和例子仅为示例性的而不是限制性的。如下内容以举例说明的方式给出而无意于限制本发明的范围。

[0021] 下文将参考附图更完整地描述本发明,其中示出了本发明的一些但并非全部实施方案。确实,这些发明方案可以以许多不同的形式来体现,不应被认为局限于本文给出的实施方案;提供这些实施方案是为了使本公开内容能满足适用的法律要求。类似的编号在全文中是指类似的要素。

[0022] 借助前面的描述和随附的附图中给出的教导,本发明所属领域的技术人员将会想到本发明的许多修改形式和其他实施方案。因此,应当了解,本发明不限于所公开的特定实施方案,并旨在将修改形式和其他实施方案包括在所附权利要求的范围内。虽然本文采用了特定术语,但它们仅以一般性和描述性含义使用而不出于限制目的。

[0023] 除非另外指明,否则本发明的实施将采用植物学、微生物学、组织培养、分子生物学、化学、生物化学和重组 DNA 技术的常规技术,这些技术处于本领域技能范围内。这类技术在文献中有完全的解释。参见例如 Langenheim 和 Thimann, *BOTANY :PLANT BIOLOGY AND ITS RELATION TO HUMAN AFFAIRS*, John Wiley(1982); *CELL CULTURE AND SOMATIC CELL GENETICS OF PLANTS*, 第 1 卷, Vasil 编辑 (1984); Stanier 等人, *THE MICROBIAL WORLD*, 第 5 版, Prentice-Hall(1986); Dhiringra 和 Sinclair, *BASIC PLANT PATHOLOGY METHODS*, CRC Press(1985); Maniatis 等人, *MOLECULAR CLONING :A LABORATORY MANUAL* (1982); *DNA CLONING*, 第 I 和第 II 卷, Glover 编辑 (1985); *OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS*, Gait 编辑 (1984); *NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION*, Hames 和 Higgins 编辑 (1984) 以及 *METHODS IN ENZYMOLOGY* 系列, Colowick 和 Kaplan 编辑, Academic Press, Inc., San Diego, CA。

[0024] 单位、前缀和符号可以它们 SI 接受的形式表示。除非另外指明,否则分别地,核酸

以 5' 至 3' 取向从左向右书写；氨基酸序列以氨基向羧基取向从左向右书写。数值范围包括限定该范围的数字。氨基酸在本文中可通过它们通常知道的三字母符号表示或通过 IUPAC-IUB 生化命名委员会 (IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission) 推荐的单字母符号表示。同样,核苷酸可通过它们通常接受的单字母密码表示。下面定义的术语通过参考本说明书整体进行更完整的定义。

[0025] 在描述本发明时,将采用下面的术语,并且旨在如下文所指出的进行定义。

[0026] 所谓“微生物”意指任何微生物(包括真核微生物和原核微生物),如真菌、酵母、细菌、放线菌、藻类和原生动物以及其他单细胞结构。

[0027] 所谓“扩增”意指构建核酸序列的多个拷贝或与该核酸序列互补的多个拷贝,该构建是利用所述核酸序列中的至少一者作为模板进行。扩增系统包括聚合酶链反应 (PCR) 系统、连接酶链反应 (LCR) 系统、基于核酸序列的扩增 (NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario)、 $Q-\beta$ 复制酶系统、基于转录的扩增系统 (TAS) 和链置换扩增 (SDA)。参见例如 *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*, Persing 等人 (编辑), American Society for Microbiology, Washington, DC (1993)。扩增的产物称为扩增子。

[0028] 术语“保守修饰的变体”同时适用于氨基酸序列和核酸序列二者。就特定核酸序列而言,保守修饰的变体指编码氨基酸序列的相同的或保守修饰的变体的那些核酸。由于遗传密码的简并性,大量功能上相同的核酸编码任何给定蛋白质。例如,密码子 GCA、GCC、GCG 和 GCU 全部编码丙氨酸这种氨基酸。因而,在每个由密码子规定丙氨酸的位置,可将该密码子变更为所描述的相应密码子中的任一种而不会改变所编码的多肽。这种核酸变异为“沉默变异”,代表保守修饰变异的一种。本文中编码多肽的每种核酸序列还描述了该核酸的每种可能的沉默变异。普通技术人员将认识到,可修饰核酸中的每种密码子 (AUG 除外,其通常为甲硫氨酸的唯一密码子;一个例外是红色微球菌 (*Micrococcus rubens*),对于其来说 GTG 是甲硫氨酸密码子 (Ishizuka 等人, (1993) *J. Gen. Microbiol.* 139 :425-32) 以产生功能上相同的分子。因此,编码本发明多肽的核酸的每种沉默变异均隐含在每种所描述的多肽序列中并以引用的方式并入本文。

[0029] 对于氨基酸序列,技术人员将认识到,对核酸、肽、多肽或蛋白质序列作出的会改变、添加或缺失所编码的序列中的单个氨基酸或一小部分氨基酸的各个置换、缺失或添加,在该变更导致氨基酸为化学类似的氨基酸所置换时,为“保守修饰的变体”。因而,还可变更选自 1 至 15 的整数的任何数目的氨基酸残基。因而,例如,可作出 1、2、3、4、5、7 或 10 个变更。保守修饰的变体通常提供与它们所源自的未经修饰的多肽序列类似的生物活性。例如,底物特异性、酶活性或配体 / 受体结合通常为天然蛋白质对于其天然底物的至少 30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90%,优选 60-90%。提供功能上相似的氨基酸的保守置换表是本领域所熟知的。

[0030] 下面的六个组各含有对彼此而言是保守置换的氨基酸:

[0031] 1) 丙氨酸 (A)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T);

[0032] 2) 天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E);

[0033] 3) 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q);

[0034] 4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K);

[0035] 5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V) ;和

[0036] 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W)。

[0037] 还可参见 Creighton, PROTEINS, W. H. Freeman and Co. (1984)。

[0038] 本文所用的“基本上由...组成”意指包括目标多核苷酸以外的额外序列,其中该额外序列在严格杂交条件下不选择性杂交至所述多核苷酸所杂交的同一 cDNA,并且其中所述杂交条件包括在 65°C 下在 0.1X SSC 和 0.1% 十二烷基硫酸钠中的洗涤步骤。

[0039] 术语“基本上由...组成的”或“基本上由...组成”在编码二聚化结构域的核酸序列或该二聚化结构域的氨基酸序列的语境中,通常指在本质上不改变该二聚化结构域片段的基本结合性质(例如,与目标蛋白质形成缺陷型二聚体)的重组二聚化结构域序列和任何其他序列。例如,ZM-D8 243-331 为 D8 蛋白对应于二聚化结构域区的部分。在一个实施方案中,该结构域片段可含有在氨基端和 / 或羧基端的其他序列,只要该另外的序列本质上不改变该二聚化结构域片段与目标蛋白质的基本结合性质,该基本结合性质会导致受赤霉素 (GA) 激素的抑制减少。例如,全长 D8 氨基酸序列是不合适的,因为其将导致形成会阻断 GA 响应的功能性二聚体。

[0040] 就指定的核酸而言,所谓“编码”意指包含翻译成指定蛋白质的信息。编码蛋白质的核酸可在该核酸的翻译区内包含非翻译序列(例如内含子),或可缺少这种居间的非翻译序列(例如,如在 cDNA 中)。据以编码蛋白质的信息是通过使用密码子来确定的。通常,氨基酸序列由核酸利用“通用”遗传密码来编码。然而,可使用如在某些植物、动物和真菌线粒体、细菌山羊支原体 (*Mycoplasma capricolum*) (Yamao 等人, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :2306-2309) 或纤毛虫大核中存在的通用密码的变体,当用这些生物体表达该核酸时。

[0041] 当通过合成法制备或改变核酸时,可利用将在其中表达核酸的预期宿主的已知密码子偏好性。例如,尽管本发明的核酸序列在单子叶植物物种和双子叶植物物种中都可表达,但可对序列进行修饰以解决单子叶植物或双子叶植物的特定密码子偏好性和 GC 含量偏好性,因为这些偏好性已被证实不同 (Murray 等人, (1989) Nucleic Acids Res. 17 : 477-98, 将其以引用的方式并入本文)。因而,具体氨基酸的玉米优选密码子可由来自玉米的已知基因序列得出。关于来自玉米植物的 28 种基因的玉米密码子使用在 Murray 等人 (出处同上) 的表 4 中列出。

[0042] 如本文所用,针对核酸的“异源”为起源于外来物种的核酸,或者,如果起源于相同物种的话,则为通过蓄意的人为干预对其天然形式在组成和 / 或基因座方面进行实质性修饰的核酸。例如,可操作地连接至异源结构基因的启动子是来自不同于衍生该结构基因的物种的物种,或者如果是来自相同的物种,则对一者或二者由其初始形式进行了实质性的修饰。异源蛋白质可起源于外来物种,或者,如果起源于相同物种,则通过蓄意的人为干预对其天然形式进行了实质修饰。

[0043] 所谓“宿主细胞”意指含有载体并且支持该表达载体的复制和 / 或表达的细胞。宿主细胞可以是原核细胞如大肠杆菌,或真核细胞如酵母、昆虫、植物、两栖动物或哺乳动物细胞。优选地,宿主细胞是单子叶植物细胞或双子叶植物细胞,包括但不限于玉米、高粱、向日葵、大豆、小麦、苜蓿、水稻、棉花、卡诺拉、大麦、小米和番茄。特别优选的单子叶宿主细胞是玉米宿主细胞。

[0044] 术语“杂交复合体”包括指由两条相互选择性杂交的单链核酸序列形成的双链核酸结构。

[0045] 在将核酸插入细胞的语境中,术语“引入”意指“转染”或“转化”或“转导”,包括指核酸掺入进真核或原核细胞中,其中该核酸可掺入进细胞的基因组(例如染色体、质粒、质体或线粒体 DNA)中,转化成自主复制子或瞬时表达(例如,转染的 mRNA)。

[0046] 术语“分离的”指诸如核酸或蛋白质之类的物质,该物质实质上或基本上不含在其天然存在的环境中发现的通常与其相伴随或与其相互作用的组分。分离的物质任选包含未发现在其天然环境中与其一起的物质。如本文所定义,“分离的”核酸也称为“异源”核酸。除非另有说明,否则术语“二聚化结构域组分堆叠核酸”意指包含编码二聚化结构域组分堆叠多肽的多核苷酸(“二聚化结构域组分堆叠多核苷酸”)。

[0047] 如本文所用,“核酸”包括指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,并且除非另外限制,否则涵盖在以下方面具有天然核苷酸的基本性质的已知类似物:其与天然存在的核苷酸(例如肽核酸)相似的方式杂交至单链核酸。

[0048] 所谓“核酸文库”意指分离的 DNA 或 RNA 分子的集合,其包含且实质上代表指定生物体的基因组的整个被转录的部分。示例性的核酸文库如基因组文库和 cDNA 文库的构建在标准的分子生物学参考文献中教导,如 Berger 和 Kimmel, GUIDE TO MOLECULAR CLONING TECHNIQUES, METHODS IN ENZYMOLOGY 系列,第 152 卷, Academic Press, Inc., San Diego, CA(1987); Sambrook 等人, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 第 2 版, 第 1-3 卷(1989) 和 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel 等人(编辑), Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc. 合著(1994 增刊)。

[0049] 如本文所用,“可操作地连接”包括指第一序列(如启动子)和第二序列之间的功能性连接,其中启动子序列起始或介导对应第二序列的 DNA 的转录。一般来讲,可操作地连接意指被连接的核酸序列是连续的,并且如果有必要连接两个蛋白质编码区的话,是连续的且在相同的阅读框内。

[0050] 如本文所用,术语“植物”包括指整个植株、植物器官(例如叶、茎、根等)、种子和植物细胞和它们的子代。如本文所用,植物细胞包括但不限于种子悬浮培养物、胚、分生组织区、愈伤组织、叶、根、苗、配子体、孢子体、花粉和小孢子。可用于本发明方法的植物类型通常与适用于转化技术的高等植物类型一样宽泛,包括单子叶植物和双子叶植物,包括来自如下属的种:南瓜属(Cucurbita)、玫瑰属(Rosa)、葡萄属(Vitis)、胡桃属(Juglans)、草莓属(Fragaria)、百脉根属(Lotus)、苜蓿属(Medicago)、驴食草属(Onobrychis)、三叶草属(Trifolium)、胡芦巴属(Trigonella)、豇豆属(Vigna)、柑桔属(Citrus)、亚麻属(Linum)、老鹳草属(Geranium)、木薯属(Manihot)、胡萝卜属(Daucus)、拟南芥属(Arabidopsis)、芸苔属(Brassica)、萝卜属(Raphanus)、白芥属(Sinapis)、颠茄属(Atropa)、辣椒属(Capsicum)、曼陀罗属(Datura)、天仙子属(Hyoscyamus)、番茄属(Lycopersicon)、烟草属(Nicotiana)、茄属(Solanum)、碧冬茄属(Petunia)、毛地黄属(Digitalis)、Majorana、菊苣属(Cichorium)、向日葵属(Helianthus)、莴苣属(Lactuca)、雀麦属(Bromus)、天门冬属(Asparagus)、金鱼草属(Antirrhinum)、萱草属(Heterocallis)、Nemesis、天竺葵属(Pelargonium)、黍属(Panicum)、狼尾草属

(*Pennisetum*)、毛茛属 (*Ranunculus*)、千里光属 (*Senecio*)、蛾蝶花属 (*Salpiglossis*)、黄瓜属 (*Cucumis*)、布洛华丽属 (*Browaalia*)、大豆属 (*Glycine*)、豌豆属 (*Pisum*)、菜豆属 (*Phaseolus*)、黑麦草属 (*Lolium*)、稻属 (*Oryza*)、燕麦属 (*Avena*)、大麦属 (*Hordeum*)、黑麦属 (*Secale*)、葱属 (*Allium*) 和小麦属 (*Triticum*)。还包括在内的是来自禾本科 (*Poaceae*) 的草本植物,包括但不限于如下属:早熟禾属 (*Poa*)、剪股颖属 (*Agrostis*)、黑麦草属 (*Lolium*)、羊茅属 (*Festuca*)、结缕草属 (*Zoysia*)、狗牙根属 (*Cynodon*)、钝叶草属 (*Stenotaphrum*)、雀稗属 (*Paspalum*)、蜈蚣草属 (*Eremochloa*)、地毯草属 (*Axonopus*)、野牛草属 (*Buchloe*)、格兰马草属 (*Bouteloua*),包括蓝草、本特草、黑麦草、羊茅、结缕草、百慕大草、奥古斯丁草 (*St. Augustine grass*)、百喜草、假俭草、地毯草、水牛草和格兰马草。特别优选的植物是玉米。

[0051] 如本文所用,“产量”包括指收获时针对谷粒水分(通常是15%)进行了调整后的每英亩谷类作物的蒲式耳数。谷粒水分是在收获时的谷粒中测量。谷粒的经调整的测试重量确定为针对收获时的谷粒水分水平进行了调整的重量,单位为磅/蒲式耳。

[0052] 如本文所用,“多核苷酸”包括指脱氧核糖多核苷酸、核糖多核苷酸或其类似物,所述类似物在如下方面具有天然核糖核苷酸的基本性质:在严格杂交条件下其所杂交的核苷酸序列与天然存在的核苷酸所杂交的核苷酸序列基本上相同,和/或可翻译成与天然存在的核苷酸所翻译的氨基酸相同的氨基酸。多核苷酸可以是天然或异源结构基因或调控基因的全长序列或其子序列。除非另外指明,否则该术语包括指指定的序列及其互补序列。因而,为了稳定性或为了其他原因对主链进行了修饰的DNA或RNA是如该术语在本文所意指的“多核苷酸”。此外,包含稀有碱基(如肌苷)或修饰碱基(如三苯甲基化的碱基)(仅举两个例子)的DNA或RNA是多核苷酸(如该术语在本文所用的)。应当理解,已对DNA和RNA进行了很多种修饰,这些修饰起到本领域技术人员已知的许多有用目的。本文所用的术语多核苷酸涵盖多核苷酸的这类经化学修饰、酶修饰或代谢修饰的形式,以及病毒和细胞(包括特别是简单细胞和复杂细胞)特征性的DNA和RNA的化学形式。

[0053] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基为相应的天然存在的氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物。

[0054] 本文所用的“启动子”包括指DNA的在转录起始的上游并涉及RNA聚合酶和其他蛋白质的识别和结合以起始转录的区域。“植物启动子”是能够引发在植物细胞中的转录的启动子。示例性的植物启动子包括但不限于从植物、植物病毒和包含在植物细胞中表达的基因的细菌获得的那些启动子,所述细菌如农杆菌 (*Agrobacterium*) 或根瘤菌 (*Rhizobium*)。例子为优先起始在某些组织,如叶、根、种子、纤维、木质部导管、管胞或厚壁组织中的转录的启动子。这种启动子称为“组织优选的”。“细胞类型”特异性启动子主要驱动在一种或多种器官中的某些细胞类型(例如,根或叶中的维管细胞)中的表达。“诱导型”或“调控型”启动子是处于环境控制下的启动子。可实现通过诱导型启动子进行的转录的环境条件的例子包括无氧条件或光的存在。另一类型的启动子是发育调节启动子,例如在花粉发育过程中驱动表达的启动子。组织优选的、细胞类型特异性的、发育调节的和诱导型的启动子构成了“非组成型”启动子类别。“组成型”启动子是在大多数环境条件下活跃的启动子。

[0055] 术语“二聚化结构域组分堆叠多肽”指一种或多种氨基酸序列,该氨基酸序列包

括所关注的二聚化结构域区和不是该二聚化结构域序列所源自的同一母体序列的另一多肽序列。该术语还包括其片段、变体、同源物、等位基因或前体（例如原前蛋白或前蛋白）。“二聚化结构域组分堆叠蛋白”包含二聚化结构域组分堆叠多肽。除非另有说明，否则术语“二聚化结构域组分堆叠核酸”意指包含编码二聚化结构域组分堆叠多肽的多核苷酸（“二聚化结构域组分堆叠多核苷酸”）的核酸。

[0056] 如本文所用，“重组的”包括指已通过引入异源核酸进行修饰的细胞或载体，或者源于经这样修饰过的细胞的细胞。因而，例如，重组细胞表达不以天然（非重组）形式的细胞内的相同形式存在的基因，或因为蓄意人为干预而表达原本异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因。本文所用的术语“重组的”不涵盖通过天然发生的事件（例如自发突变、天然转化/转导/转座）进行的细胞或载体的变更，所述事件为例如在没有蓄意人为干预的情况下发生的那些。术语“重组多肽”或“重组核酸”指已经经过修饰而使得它们在天然情况下不以它们现有的形式存在的多肽和核酸序列。

[0057] 本文所用的“重组表达盒”是具有一系列规定核酸元件的通过重组法或合成法产生的核酸构建体，其允许特定核酸在靶细胞中转录。可将重组表达盒掺入到质粒、染色体、线粒体 DNA、质体 DNA、病毒或核酸片段中。通常，除了别的序列以外，表达载体的重组表达盒部分还包含待转录的核酸和启动子。

[0058] 术语“残基”或“氨基酸残基”或“氨基酸”在本文中可互换使用，指掺入进蛋白质、多肽或肽（统称“蛋白质”）中的氨基酸。氨基酸可以是天然存在的氨基酸，除非另外进行限制，否则可涵盖可以以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥功能的天然氨基酸已知类似物。

[0059] 术语“选择性杂交”包括指在严格杂交条件下核酸序列与指定的核酸靶序列杂交的程度比其与非靶序列杂交的程度可检测地更高（例如，至少 2 倍于背景），并且基本上排除非靶核酸。选择性杂交的序列通常相互具有约至少 40% 的序列同一性，优选 60-90% 的序列同一性，最优选 100% 的序列同一性（即互补性）。

[0060] 术语“严格条件”或“严格杂交条件”包括指探针与其靶序列杂交的程度将比它与其他序列杂交的程度可检测地更高（例如，至少 2 倍于背景）的条件。严格条件是序列依赖性的，在不同的环境中将会不同。通过控制杂交和/或洗涤条件的严格性，可鉴别与探针可最高达 100% 互补的靶序列（同源探测）。或者，可调节严格性条件以允许序列中有一些错配，以使得检测到较低程度的相似性（异源探测）。优选地，探针长为大约 500 个核苷酸，但长度可变化很大，从小于 500 个核苷酸到等于靶序列的整个长度。

[0061] 通常，严格条件将为其中盐浓度低于约 1.5M 钠离子，通常为约 0.01 至 1.0M 钠离子浓度（或其他盐），pH 为 7.0 至 8.3，对短探针（例如，10 至 50 个核苷酸）而言温度为至少 30°C，对长探针（例如超过 50 个核苷酸）而言温度为至少约 60°C 的那些条件。严格条件还可通过添加去稳定剂如甲酰胺或 Denhardt's 来实现。示例性的低严格性条件包括在 37°C 下用 30 至 35% 甲酰胺、1M NaCl、1% SDS（十二烷基硫酸钠）的缓冲溶液杂交，并在 50 至 55°C 下在 1X 至 2X SSC（20X SSC = 3.0M NaCl/0.3M 柠檬酸三钠）中洗涤。示例性的中等严格性条件包括 37°C 下在 40 至 45% 甲酰胺、1M NaCl、1% SDS 中杂交，并在 55 至 60°C 下在 0.5X 至 1X SSC 中洗涤。示例性的高严格性条件包括 37°C 下在 50% 甲酰胺、1M NaCl、1% SDS 中杂交，并在 60 至 65°C 下在 0.1X SSC 中洗涤。特异性通常决定于杂交后的洗涤，关键

因素为最终洗涤溶液的离子强度和温度。对于 DNA-DNA 杂交体, T_m 可从 Meinkoth 和 Wahl, (1984) Anal. Biochem. 138 :267-84 的公式来估计: $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\% \text{GC}) - 0.61(\% \text{form}) - 500/L$; 其中 M 为单价阳离子的摩尔浓度, % GC 为 DNA 中的鸟嘌呤核苷酸和胞嘧啶核苷酸的百分数, % form 为杂交溶液中的甲酰胺的百分数, L 为杂交体的长度(单位为碱基对)。 T_m 为 50% 的互补靶序列杂交至完全匹配的探针时的温度。每 1% 错配, T_m 减少约 1°C , 因而, 可调节 T_m 、杂交和 / 或洗涤条件以杂交至所需同一性的序列。例如, 如果寻求具有 $\geq 90\%$ 同一性的序列, 则可将 T_m 降低 10°C 。通常, 将严格条件选择为比特定序列及其互补序列在确定的离子强度和 pH 下的热解链温度 (T_m) 低约 5°C 。然而, 极严格条件可采用在低于热解链温度 (T_m) 1 、 2 、 3 或 4°C 下杂交和 / 或洗涤; 中等严格条件可采用在低于热解链温度 (T_m) 6 、 7 、 8 、 9 或 10°C 下杂交和 / 或洗涤; 低严格条件可采用在低于热解链温度 (T_m) 11 、 12 、 13 或 14 、 15 或 20°C 下杂交和 / 或洗涤。利用该公式, 杂交和洗涤组成以及所需的 T_m , 普通技术人员将认识到, 杂交和 / 或洗涤溶液的严格性的变化固有地得到了描述。如果所需的错配程度导致 T_m 低于 45°C (水溶液) 或 32°C (甲酰胺溶液), 则优选增加 SSC 浓度以使得可使用较高的温度。有关核酸杂交的详尽指导可在如下文献中找到: Tijssen, LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY—HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, 第 I 部分, 第 2 章, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” Elsevier, New York (1993) 和 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 第 2 章, Ausubel 等人 (编辑), Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)。除非另外指明, 否则在本专利申请中, 高严格性定义为在 65°C 下在 $4X$ SSC、 $5X$ Denhardt's (500ml 水中的 5g Ficoll, 5g 聚乙烯吡咯烷酮、5g 牛血清白蛋白)、 0.1mg/ml 煮沸鲑精 DNA 和 25mM 磷酸钠中杂交, 并在 65°C 下在 $0.1X$ SSC、 0.1% SDS 中洗涤。

[0062] 如本文所用, “转基因植物” 包括指在其基因组内包含异源多核苷酸的植物。一般来讲, 异源多核苷酸稳定地整合在基因组内使得该多核苷酸得以传递到连续世代。可将异源多核苷酸单独整合进基因组中或作为重组表达盒的一部分整合进基因组中。“转基因” 在本文中用于包括其基因型已因异源核酸的存在而改变的任何细胞、细胞系、愈伤组织、组织、植株部分或植株, 包括那些最初经如此改变的转基因植物以及通过有性杂交或无性繁殖从最初的转基因植物产生的那些。本文所用的术语“转基因” 不涵盖通过常规植物育种方法或通过诸如随机异花受精、非重组病毒感染、非重组细菌转化、非重组转座或自发突变之类的自然发生事件导致的基因组 (染色体基因组或染色体外基因组) 的改变。

[0063] 如本文所用, “载体” 包括指用于转染宿主细胞并可在其中插入多核苷酸的核酸。载体常常是复制子。表达载体允许插入其中的核酸转录。

[0064] 以下术语用来描述两条或更多条核苷酸或多肽之间的序列关系: (a) “参考序列”, (b) “比较窗口”, (c) “序列同一性”, (d) “序列同一性百分比” 和 (e) “基本上相同”。

[0065] 本文所用的“参考序列” 是用作序列比较基准的确定的序列。参考序列可为指定的序列的子集或全部; 例如作为全长 cDNA 或基因序列的区段或者该完全 cDNA 或基因序列。

[0066] 如本文所用, “比较窗口” 意指包括指多核苷酸序列的连续和指定的区段, 其中该比较窗口中的该多核苷酸序列相比于参考序列 (不包含添加或缺失) 可包含添加或缺失 (即空位), 以便两个多核苷酸的最佳比对。通常, 比较窗口长度为至少 20 个连续的核苷

酸,任选地可为 30、40、50、100 个或更长。本领域技术人员认识到,为避免由于在多核苷酸序列中加入空位所致的与参考序列的高度相似性,通常引入空位罚分并从匹配数扣除空位罚分。

[0067] 将核苷酸和氨基酸序列进行比对以作比较的方法是本领域公知的。Smith 和 Waterman, (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482 的局部同源算法 (BESTFIT) 可对用于比较的序列进行最佳比对;通过 Needleman 和 Wunsch, (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-53 的同源比对算法 (GAP);通过 Pearson 和 Lipman, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 的相似性搜索算法 (Tfasta 和 Fasta);通过这些算法的计算机化执行,包括但不限于: *Intelligenetics* (Mountain View, California) 的 PC/Gene 程序中的 CLUSTAL、Wisconsin Genetics Software Package® 第 8 版(可得自 Genetics Computer Group (GCG® 程序 (Accelrys, Inc., San Diego, CA)) 中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA。如下文献详细描述了 LUSTAL 程序:Higgins 和 Sharp, (1988) *Gene* 73:237-44;Higgins 和 Sharp, (1989) *CABIOS* 5:151-3;Corpet 等人, (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90;Huang 等人, (1992) *Computer Applications in the Biosciences* 8:155-65 以及 Pearson 等人, (1994) *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31。用于多序列的最佳全局比对的优选程序是 PileUp (Feng 和 Doolittle, (1987) *J. Mol. Evol.*, 25:351-60, 其类似于 Higgins 和 Sharp, (1989) *CABIOS* 5:151-53 描述的方法,藉此以引用的方式将其并入本文)。可用于数据库相似性搜索的 BLAST 程序家族包括:用于核苷酸查询序列对核苷酸数据库序列的 BLASTN;用于核苷酸查询序列对蛋白质数据库序列的 BLASTX;用于蛋白质查询序列对蛋白质数据库序列的 BLASTP;用于蛋白质查询序列对核苷酸数据库序列的 TBLASTN 和用于核苷酸查询序列对核苷酸数据库序列的 TBLASTX。参见 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 第 19 章, Ausubel 等人 (编辑), Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1995)。

[0068] GAP 利用 Needleman 和 Wunsch (出处同上) 的算法来寻找两个完整序列的比对, 该比对使匹配数最大而使空位数最小。GAP 会考虑所有可能的比对和空位位置, 并产生具有最大数目的匹配碱基和最少的空位的比对。其允许提供以匹配碱基数为单位的空位产生罚分和空位延伸罚分。GAP 对于其插入的每个空位, 都必须利用匹配的空位产生罚分数。如果选择大于零的空位延伸罚分, GAP 对于每个插入的空位必须另外利用空位长度乘以空位延伸罚分。Wisconsin Genetics Software Package® 第 10 版中的默认空位产生罚分值和空位延伸罚分值分别为 8 和 2。空位产生和空位延伸罚分可以以选自 0-100 的整数来表示。因而, 例如, 空位产生和空位延伸罚分可以是 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50 或更大。

[0069] GAP 给出最好的比对的群体中的一个成员。这个群体可能存在许多成员, 但其他成员没有更好的质量。GAP 显示关于比对的四个品质因素: 品质 (quality)、比率 (ratio)、同一性 (identity) 和相似性 (similarity)。品质是为了比对序列而被最大化的指标 (metric)。比率是品质除以较短区段中的碱基数。同一性百分数是实际匹配的符号的百分数。相似性百分数是相似的符号的百分数。将对应于空位的符号忽略。当一对符号的打分矩阵值大于或等于 0.50 (相似性阈值) 时, 对相似性打分。Wisconsin Genetics Software Package® 版本 10 中所用的打分矩阵为 BLOSUM62 (参见 Henikoff 和 Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915)。

[0070] 除非另外指明,否则本文所提供的序列同一性/相似性值指用BLAST 2.0程序包,采用默认参数获得的值(Altschul等人,(1997)*Nucleic Acids Res.* 25 :3389-402)。

[0071] 如本领域普通技术人员将会理解的,BLAST搜索假定蛋白质可被模拟为随机序列。然而,许多真实蛋白质包含非随机序列区,该非随机序列可为同聚段、短周期重复或富含一种或多种氨基酸的区域。这种低复杂性区域可在不相关的蛋白质之间比对,尽管该蛋白质的其他区域完全不相似。可采用多种低复杂性过滤程序来减少这种低复杂性比对。例如,SEG(Wooten和Federhen,(1993)*Comput. Chem.* 17 :149-63)和XNU(Claverie和States,(1993)*Comput. Chem.* 17 :191-201)低复杂性过滤器可单独使用或联合使用。

[0072] 在两条多核苷酸或多肽序列的情形中,本文所用的“序列同一性”或“同一性”是指当在指定的比较窗口上进行比对以获得最大对应时两个序列中相同的残基。当序列同一性百分数针对蛋白质使用时,应认识到,不相同的残基位置往往差别在于保守氨基酸置换,其中氨基酸残基被其他具有相似的化学性质(例如电荷或疏水性)的氨基酸残基置换,因此不会改变分子的功能性质。如果序列差别在于保守置换,则可上调百分比序列同一性以校正置换的保守性质。差异在于这种保守置换的序列被称为具有“序列相似性”或“相似性”。作出这个调整的方法是本领域技术人员公知的。通常,这涉及将保守置换打分为部分错配而不是完全错配,从而提高序列同一性百分数。因而,例如,如果相同的氨基酸给予1分,非保守置换给予0分,则保守置换给予0至1之间的分数。例如,根据Meyers和Miller,(1988)*Computer Applic. Biol. Sci.* 4 :11-17的算法计算保守置换的分数,例如如在程序PC/GENE(Intelligenetics,Mountain View,California,USA)中所执行的。

[0073] 本文所用的“序列同一性百分数”意指通过在比较窗口上比较两个最佳比对的序列所确定的数值,其中多核苷酸序列在比较窗口中的部分与参考序列(不包含添加或缺失)相比包含添加或缺失(即空位),以便两个序列的最佳比对。该百分数是这样计算的:确定在两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置的数目以得到匹配的位置的数目,将匹配的位置的数目除以比较窗口中的位置的总数目,然后将结果乘以100以得到序列同一性百分数。

[0074] 术语多核苷酸序列的“基本上相同”意指利用所描述的比对程序之一采用标准参数与参考序列比较时,多核苷酸包含具有50-100%之间的序列同一性,优选至少50%的序列同一性,优选至少60%的序列同一性,优选至少70%,更优选至少80%,更优选至少90%且最优选至少95%序列同一性的序列。技术人员将会认识到,可通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等等适当调整这些值以确定两个核苷酸序列所编码的蛋白质的相应同一性。用于这些目的的氨基酸序列的基本上相同通常意指55-100%之间的序列同一性,优选至少55%,优选至少60%,更优选至少70%、80%、90%,最优选至少95%。

[0075] 核苷酸序列基本上相同的另一指示是两个分子在严格条件下是否彼此杂交。遗传密码的简并性允许许多氨基酸置换,这种氨基酸置换在编码相同氨基酸的核苷酸序列中导致多样化,因而有可能该DNA序列可编码相同多肽但在严格条件下不彼此杂交。例如,当利用遗传密码所允许的最大密码子简并性产生一个核酸拷贝时,这可能会发生。两条核酸序列是基本上相同的一个指示是,第一核酸编码的多肽与第二核酸所编码的多肽发生免疫交叉反应。

[0076] 在肽的情形中,术语“实质相同”指肽包含在指定比较窗口上与参考序列具有

55-100%之间的序列同一性;优选与参考序列具有至少 55%的序列同一性,优选 60%,优选 70%,更优选 80%,最优选至少 90%或 95%的序列同一性。优选地,利用 Needleman 和 Wunsch(出处同上)的同源比对算法进行最佳比对。两条肽序列是基本上相同的指示是,一种肽可与针对第二种肽产生的抗体发生免疫反应。因而,例如,如果某种肽与第二种肽差别仅在于保守置换的话,则这两种肽基本上相同。此外,当某种肽与第二种肽差别在于非保守变化时,如果抗体识别的表位基本上相同,则它们基本上相同。“基本上相似的”肽共有如上所述的序列,例外的是不相同的残基位置差别可在于保守氨基酸变化。

[0077] 本发明公开了二聚化结构域多核苷酸和多肽。本发明的新核苷酸和蛋白质具有表明它们改变细胞壁形成并因而在植物发育中起重要作用的表达模式。该多核苷酸在多种植物组织中表达。该多核苷酸和多肽因而提供了操纵植物发育来改变种子和营养组织发育、时间安排或组成的机会。这可用于产生不育植株、无种子植株或具有改变的胚乳组成的植株。

[0078] 核酸

[0079] 本发明特别提供了分离的 RNA、DNA 及其类似物和 / 或嵌合体核酸,包含二聚化结构域多核苷酸。

[0080] 本发明还包括为在不同生物体中表达而经优化的多核苷酸。例如,对于多核苷酸在玉米植物中的表达,可变更该序列以解决特定的密码子偏好性和改变 GC 含量,如根据 Murray 等人(出处同上)所述。关于来自玉米植物的 28 种基因的玉米密码子使用在 Murray 等人(出处同上)的表 4 中列出。

[0081] 该二聚化结构域核酸包括分离的二聚化结构域多核苷酸,该分离的二聚化结构域多核苷酸包括:

[0082] (a) 编码二聚化结构域多肽的多核苷酸及其经保守修饰的和多态性的变体;

[0083] (b) 与 (a) 或 (b) 的多核苷酸具有至少 70%序列同一性的多核苷酸;

[0084] (c) (a) 或 (b) 的多核苷酸的互补序列。

[0085] 下表 1 列出了本文所公开的序列的具体命名。

[0086] 表 1

[0087]

SEQ ID NO:	名称
SEQ ID NO: 1	MS-S2A 启动子
SEQ ID NO: 2	ZmCesA10 多核苷酸
SEQ ID NO: 3	Pin II 终止子
SEQ ID NO: 4	F3.7 启动子
SEQ ID NO: 5	ZmCesA4 多核苷酸
SEQ ID NO: 6	ZmD8 多核苷酸
SEQ ID NO: 7	ZmNAS2 启动子
SEQ ID NO: 8	ZmNAS2 5'UTR
SEQ ID NO: 9	ZmD8 二聚化结构域多核苷酸 (起始密码子和终止密码子是 243-331 编码序列的人工附加序列)
SEQ ID NO: 10	NOS 终止子
SEQ ID NO: 11	ZmFTM1 多核苷酸
SEQ ID NO: 12	GmGAI1 多核苷酸
SEQ ID NO: 13	ZRP2.47 启动子
SEQ ID NO: 14	ADH1 内含子
SEQ ID NO: 15	ZmRootMet2 启动子
SEQ ID NO: 16	ZmCesA10 多肽
SEQ ID NO: 17	ZmCesA4 多肽
SEQ ID NO: 18	ZmD8 多肽
SEQ ID NO: 19	ZmD8 243-331 二聚化结构域多肽 (ATG 起始密码子是人造的, 导致在 243-331 氨基酸添加 N 端的甲硫氨酸)。
SEQ ID NO: 20	ZmFTM1 多肽
SEQ ID NO: 21	GmGAI1 二聚化结构域多肽
SEQ ID NO: 22	GmGAI1 多肽
SEQ ID NO: 23	Gm 05g27190.1
SEQ ID NO: 24	Gm 05g27190.1 二聚化结构域
SEQ ID NO: 25	Gm 08g10140.1

[0088]	SEQ ID NO: 26	Gm 08g10140.1 二聚化结构域
	SEQ ID NO: 27	Gm 11g33720.1
	SEQ ID NO: 28	Gm 11g33720.1 二聚化结构域
	SEQ ID NO: 29	Gm 18g04500.1
	SEQ ID NO: 30	Gm 18g04500.1 二聚化结构域
	SEQ ID NO: 31	At GAI
	SEQ ID NO: 32	At GAI 二聚化结构域
	SEQ ID NO: 33	At RGA
	SEQ ID NO: 34	At RGA 二聚化结构域
	SEQ ID NO: 35	At RGL1
	SEQ ID NO: 36	At RGL1 二聚化结构域
	SEQ ID NO: 37	At RGL2
	SEQ ID NO: 38	At RGL2 二聚化结构域
	SEQ ID NO: 39	At RGL3
	SEQ ID NO: 40	At RGL3 二聚化结构域
	SEQ ID NO: 41	共有二聚化结构域
	SEQ ID NO: 42	引物
	SEQ ID NO: 43	引物

[0089] 核酸的构建

[0090] 可用 (a) 标准的重组方法、(b) 合成技术或二者的组合产生分离的本发明核酸。在一些实施方案中,本发明的多核苷酸将从真菌或细菌克隆、扩增或以其他方式构建。

[0091] 便利的是所述核酸可包含除本发明多核苷酸之外的序列。例如,可将包含一个或多个内切核酸酶限制性位点的多克隆位点插入核酸中以帮助分离该多核苷酸。另外,可插入可翻译序列以助于分离翻译了的本发明多核苷酸。例如,六组氨酸标记序列提供了便利的手段来纯化本发明的蛋白质。本发明的核酸(排除所述多核苷酸序列)任选为用于本发明多核苷酸的克隆和/或表达的载体、衔接子或接头。可将另外的序列添加至这种克隆和/或表达序列来优化它们在克隆和/或表达中的功能,以助于分离所述多核苷酸,或改善所述多核苷酸向细胞内的引入。通常,本发明的核酸的长度减去其多核苷酸的长度为不到 20 千碱基对,通常不到 15kb,常常不到 10kb。克隆载体、表达载体、衔接子和接头的使用是本领域已知的。示例性的核酸包括诸如如下的载体: M13、 λ ZAP Express、 λ ZAP II、 λ gt10、 λ gt11、pBK-CMV、pBK-RSV、pBluescript II、 λ DASH II、 λ EMBL 3、 λ EMBL 4、pWE15、SuperCos 1、SurfZap、Uni-ZAP、pBC、pBS+/-、pSG5、pBK、pCR-Script、pET、pSPUTK、p3' SS、pGEM、pSK+/-、pGEX、pSPORTI 和 pSPORTII、pOPRSVI CAT、pOPI3 CAT、pXT1、pSG5、pPbac、pMbac、pMC1neo、pOG44、pOG45、pFRTbGAL、pNEObGAL、pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pRS413、pRS414、pRS415、pRS416、 λ MOSSlox and λ MOSElox。本发明的任选载体包括但不限于 λ ZAP II 和 pGEX。有关多种核酸的描述,参见例如 Stratagene Cloning Systems, Catalogs 1995,1996,1997(La Jolla, CA) 和 Amersham Life Sciences, Inc, Catalog' 97(Arlington Heights, IL)。

[0092] 构建核酸的合成方法

[0093] 用于本发明方法中的核酸还可用诸如如下的方法通过直接化学合成来制备: Narang 等人, (1979)Meth. Enzymol. 68 :90-9 的磷酸三酯法; Brown 等人, (1979)Meth.

Enzymol. 68 :109-51 的磷酸二酯法 ;Beaucage 等人, (1981) Tetra. Letts. 22(20) :1859-62 的二乙基亚磷酰胺法 ;Beaucage 等人 (出处同上) 描述的固相亚磷酰胺三酯法, 例如使用自动合成仪, 例如, 如 Needham-VanDevanter 等人, (1984) Nucleic Acids Res. 12 :6159-68 中所描述的, 以及第 4, 458, 066 号美国专利的固相载体法。化学合成通常产生单链寡核苷酸。这可通过与互补序列杂交或通过将该单链作为模板用 DNA 聚合酶进行聚合来转变为双链 DNA。技术人员将会认识到, 虽然 DNA 的化学合成局限于约 100 个碱基的序列, 但可通过连接较短的序列来获得较长的序列。

[0094] UTR 和密码子偏好性

[0095] 总体来说, 已发现翻译效率受 RNA 的 5' 非编码或非翻译区 (5' UTR) 中的特定序列元件的调控。正序列基序包括翻译起始共有序列 (Kozak, (1987) Nucleic Acids Res. 15 : 8125) 和 5' 甲基 GpppG RNA 帽结构 (Drummond 等人, (1985) Nucleic Acids Res. 13 : 7375)。负元件包括稳定的分子内 5' UTR 茎-环结构 (Muesing 等人, (1987) Cell 48 :691) 和 5' UTR 中的 AUG 序列或前面有适当 AUG 的短开放阅读框 (Kozak (出处同上)、Rao 等人, (1988) Mol. and Cell. Biol. 8 :284)。因此, 本发明提供了用于调节异源编码序列的翻译的 5' 和 / 或 3' UTR 区。

[0096] 另外, 可修饰本发明多核苷酸的多肽编码区段以改变密码子使用。可采用改变了的密码子使用, 来改变翻译效率和 / 或优化编码序列在所需宿主中的表达或为了在玉米中表达而优化异源序列中的密码子使用。本发明多核苷酸的编码区中的密码子使用可用可商购获得的软件包 (如可得自 University of Wisconsin Genetics Computer Group 的 "Codon Preference") 进行统计分析。参见, Devereaux 等人, (1984) Nucleic Acids Res. 12 :387-395 ;或 MacVector 4.1 (Eastman Kodak Co., New Haven, Conn.)。因而, 本发明提供了本发明多核苷酸中的至少一者的编码区的密码子使用频率特性。可用于确定密码子使用频率的多核苷酸的数目 (每个氨基酸 3 个核苷酸) 可以为从 3 至本文所提供的本发明多核苷酸的数目的任何整数。任选地, 多核苷酸将为全长序列。用于统计分析的序列的示例性数目可以为至少 1、5、10、20、50 或 100。

[0097] 序列改组

[0098] 本发明提供了使用本发明的多核苷酸进行序列改组的方法以及由此得到的组合物。序列改组在第 96/19256 号 PCT 公开中有描述。另参见 Zhang 等人, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 :4504-9 和 Zhao 等人, (1998) Nature Biotech 16 :258-61。一般来讲, 序列改组提供出用于产生具有所需特性的多核苷酸的文库的手段, 该文库可被进行选择或筛选。从一群相关序列多核苷酸产生重组多核苷酸的文库, 所述相关序列多核苷酸包含具有实质序列同一性并可在体外或体内进行同源重组的序列区。序列重组的多核苷酸的群体包含具有所需的或有利的特性并且可通过合适的选择或筛选方法来选择的核苷酸的亚群。所述特性可以为任何能够被选择用于筛选系统或在筛选系统中检测的性质或属性, 可包括 : 所编码的蛋白质、转录元件、控制转录的序列、RNA 加工、RNA 稳定性、染色质构象、基因或转基因的翻译或其他表达性质、复制元件、蛋白质结合元件等等的性质, 例如赋予可选择或可检测性质的任何特征。在一些实施方案中, 选择的特性将为相对于本文所提供的野生型蛋白质而言改变了的 K_m 和 / 或 K_{cat} 。在其它实施方案中, 序列改组所产生的蛋白质或多核苷酸具有的配体结合亲和力将比非改组的野生型多核苷酸的高。在另外其它实施方案中,

与非改组的野生型多核苷酸相比,序列改组所产生的蛋白质或多核苷酸将具有改变了的最佳 pH。这类性质的提高可以为野生型值的至少 110%、120%、130%、140%或高于 150%。

[0099] 重组表达盒

[0100] 本发明还提供了重组表达盒的用途,该表达盒包含本发明的核酸。可将编码所需的本发明多核苷酸的核酸序列,例如编码长度足以编码本发明的活性蛋白质的多肽的基因组序列用于构建重组表达盒,可将该表达盒引入所需的宿主细胞。重组表达盒将通常包含可操作地连接至转录起始调控序列的本发明多核苷酸,所述转录起始调控序列将引导所述多核苷酸在预期的宿主细胞(如转化植物的组织)中的转录。

[0101] 例如,植物表达载体可包含(1)处于 5' 和 3' 调控序列的转录控制下的克隆植物基因和(2)显性选择性标志物。如果需要,这种植物表达载体还可含有启动子调控区(例如,赋予诱导型表达或组成型表达,由环境或发育调节的表达,或细胞或组织特异性/选择性表达的启动子调控区)、转录起始位点、核糖体结合位点、RNA 加工信号、转录终止位点和/或多腺苷酸化信号。

[0102] 可采用会引导本发明多核苷酸在再生植物的所有组织中表达的植物启动子片段。这种启动子在本文中称为“组成型”启动子并且在大多数环境条件和发育或细胞分化状态下是活跃的。组成型启动子的例子包括源于根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的 T-DNA 的 1' - 或 2' - 启动子、Smas 启动子、肉桂基醇脱氢酶启动子(第 5,683,439 号美国专利)、Nos 启动子、rubisco 启动子、GRP1-8 启动子、来自花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子,如 Odell 等人,(1985)Nature 313:810-2 中所述;水稻肌动蛋白启动子(McElroy 等人,(1990)Plant Cell 163-171);泛素启动子(Christensen 等人,(1992)Plant Mol. Biol. 12:619-632 和 Christensen 等人,(1992)Plant Mol. Biol. 18:675-89);pEMU(Last 等人,(1991)Theor. Appl. Genet. 81:581-8);MAS(Velten 等人,(1984)EMBO J. 3:2723-30)和玉米 H3 组蛋白启动子(Lepetit 等人,(1992)Mol. Gen. Genet. 231:276-85 和 Atanassova 等人,(1992)Plant Journal 2(3):291-300);ALS 启动子,如第 WO 96/30530 号 PCT 申请中所述;GOS2(第 6,504,083 号美国专利)以及技术人员已知的来自多种植物基因的其他转录起始区。对于本发明而言,泛素启动子是用于在单子叶植物中表达的优选启动子。

[0103] 或者,植物启动子可指导本发明的多核苷酸在特定组织中的表达或者可另外在更精确的环境或发育控制下。这种启动子在本文中称为“诱导型”启动子(Rab17、RAD29)。可实现通过诱导型启动子进行的转录的环境条件包括病原体攻击、无氧条件或光的存在。诱导型启动子的例子是 Adh1 启动子(其可通过低氧或寒冷胁迫诱导)、Hsp70 启动子(其可通过热胁迫诱导)和 PPK 启动子(其可通过光诱导)。

[0104] 在发育控制下的启动子的例子包括仅仅或优先在某些组织(如叶、根、果实、种子或花)中起始转录的启动子。取决于启动子在基因组的位置,启动子的操作也可以变化。因而,诱导型启动子在某些位置可变为完全或部分组成型的。

[0105] 如果多肽表达是所需的,则通常期望在多核苷酸编码区的 3' - 端包括多腺苷酸化区。该多腺苷酸化区可源于多种植物基因,或源于 T-DNA。待添加的 3' 端序列可源于(例如)胭脂碱合酶或章鱼碱合酶基因,或作为另一种选择,源于另一植物基因,或较不优选地,源自任何其他真核基因。这种调控元件的例子包括但不限于 3' 终止和/或多腺苷酸化区如根瘤农杆菌胭脂碱合酶(nos)基因的那些(Bevan 等人,(1983)Nucleic Acids

Res. 12 :369-85) ;马铃薯蛋白酶抑制剂 II (PINII) 基因 (Keil 等人, (1986)Nucleic Acids Res. 14 :5641-50 和 An 等人, (1989)Plant Cell 1 :115-22) 和 CaMV 19S 基因 (Mogen 等人, (1990)Plant Cell 2 :1261-72)。

[0106] 可将内含子序列添加至部分编码序列的 5' 非翻译区或编码序列以增加在胞质溶胶中积聚的成熟信息的量。在植物表达构建体和动物表达构建体二者中的转录单位中包括可剪接内含子, 已证实能在 mRNA 水平和蛋白质水平二者上使基因表达增加高达 1000 倍 (Buchman 和 Berg, (1988)Mol. Cell Biol. 8 :4395-4405 ;Callis 等人, (1987)Genes Dev. 1 :1183-200)。当设置在接近转录单位的 5' 端时, 这种基因表达的内含子增强通常是最大的。玉米内含子 Adh1-S 内含子 1、2 和 6、Bronze-1 内含子的使用是本领域已知的。主要参见 The Maize Handbook, 第 116 章, Freeling 和 Walbot (编辑), Springer, New York (1994)。

[0107] 植物信号序列, 包括但不限于将蛋白质靶向植物细胞的细胞外基质的信号肽编码 DNA/RNA 序列 (Dratewka-Kos 等人, (1989)J. Biol. Chem. 264 :4896-900), 如皱叶烟草 (*Nicotiana plumbaginifolia*) 扩展基因 (DeLoose 等人, (1991)Gene 99 :95-100) ;将蛋白质靶向液泡的信号肽, 如甘薯甘薯贮藏蛋白基因 (Matsuka 等人, (1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :834) 和大麦凝集素基因 (Wilkins 等人, (1990)Plant Cell, 2 :301-13) ;引起蛋白质分泌的信号肽, 如 PR1b 的信号肽 (Lind 等人, (1992)Plant Mol. Biol. 18 :47-53) 或大麦 α 淀粉酶 (BAA) 的信号肽 (Rahmatullah 等人, (1989)Plant Mol. Biol. 12 :119, 藉此将该文献以引用的方式并入本文) 或将蛋白质靶向质体的信号肽如油菜籽烯酰 -Acp 还原酶的信号肽 (Verwaert 等人, (1994)Plant Mol. Biol. 26 :189-202), 在本发明中是有用的。融合至二聚化结构域组分堆叠多核苷酸的大麦 α - 淀粉酶信号序列是本发明的用于在玉米中表达的优选构建体。

[0108] 包含来自本发明多核苷酸的序列的载体将通常包含标记基因, 该标记基因可在植物细胞上赋予选择性表型。通常, 选择性标记基因将编码抗生素抗性, 合适的基因包括编码对壮观霉素这种抗生素的抗性的基因 (例如 aada 基因)、编码链霉素抗性的链霉素磷酸转移酶 (SPT) 基因、编码卡那霉素或遗传霉素抗性的新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 基因、编码潮霉素抗性的潮霉素磷酸转移酶 (HPT) 基因、编码对起到抑制乙酰乳酸合酶 (ALS) 的作用的除草剂, 特别是磺酰脲类除草剂的抗性的基因 (例如含有导致这种抗性的突变特别是 S4 和 / 或 Hra 突变的乙酰乳酸合酶 (ALS) 基因)、编码对起到抑制谷氨酰胺合酶的作用的除草剂如草胺磷或 basta 的抗性的基因 (例如 bar 基因), 或本领域已知的其他这种基因。bar 基因编码对除草剂 basta 的抗性, ALS 基因编码对除草剂氯磺隆的抗性。

[0109] 可用于基因在高等植物中的表达的典型载体是本领域所熟知的, 包括源于根瘤农杆菌的肿瘤诱导 (Ti) 质粒的载体, 这类载体由 Rogers 等人, (1987), Meth. Enzymol. 153 :253-77 进行了描述。这些载体是植物整合型载体, 因为在转化时, 这些载体将载体 DNA 的一部分整合进宿主植物的基因组中。可用于本发明的示例性根瘤农杆菌载体是 Schardl 等人, (1987)Gene 61 :1-11 和 Berger 等人, (1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 :8402-6 的质粒 pKYLX6 和 pKYLX7。本发明中可用的另一种载体是质粒 pBI101.2, 其可得自 CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA)。

[0110] 蛋白质在宿主细胞中的表达

[0111] 使用本发明的核酸, 可以在重组工程改造的细胞如细菌细胞、酵母细胞、哺乳动物

细胞或优选植物细胞中表达本发明的蛋白质。这类细胞在非天然条件下（例如，在数量、组成、位置和 / 或时间方面）产生蛋白质，因为它们已通过人为干预被遗传改变成在非天然条件下产生蛋白质。

[0112] 预期的是，本领域的技术人员会知道多种可用于表达编码本发明的蛋白质的核酸的表达体系。无意于详细描述已知用于在原核生物或真核生物中表达蛋白质的各种方法。

[0113] 简单概括而言，编码本发明蛋白质的分离核酸的表达通常将通过使例如 DNA 或 cDNA 可操作地连接至启动子（组成型或诱导型），然后掺入进表达载体中来实现。该载体可适合于在原核生物或真核生物中复制和整合。典型的表达载体含有可用于调控编码本发明蛋白质的 DNA 的表达的转录和翻译终止子、起始序列和启动子。为了获得克隆基因的高水平表达，期望构建表达载体，该表达载体在最低程度上含有用以指导转录的强启动子（如泛素启动子）、用于翻译起始的核糖体结合位点和转录 / 翻译终止子。组成型启动子被分类为可提供一系列组成型表达。因而，某些是弱组成型启动子，而另一些是强组成型启动子。一般来讲，所谓“弱启动子”意指驱动编码序列以低水平表达的启动子。所谓“低水平”意指处于约 1/10,000 个转录物至约 1/100,000 个转录物至约 1/500,000 个转录物的水平。相反，“强启动子”驱动编码序列以“高水平”或约 1/10 个转录物至约 1/100 个转录物至约 1/1,000 个转录物进行表达。

[0114] 技术人员将认识到，可对本发明的蛋白质进行修饰而不减少其生物活性。可进行某些修饰以有利于目标分子的克隆、表达或掺入进融合蛋白中。这种修饰是本领域技术人员所熟知的，包括例如在氨基末端添加甲硫氨酸以提供起始位点，或在任一端设置额外的氨基酸（例如多聚 His）以产生便利地定位的限制性位点或终止密码子或纯化序列。

[0115] 在原核生物中的表达

[0116] 原核细胞可用作表达的宿主。原核生物最通常由大肠杆菌的多种菌株代表；然而，也可使用其他微生物株。在本文中定义为包括用于转录起始的启动子（任选具有操纵子）以及核糖体结合位点序列的常用原核控制序列，包括诸如 β -内酰胺酶（青霉素酶）启动子系统和乳糖 (lac) 启动子系统 (Chang 等人, (1977) Nature 198 :1056)、色氨酸 (trp) 启动子系统 (Goeddel 等人, (1980) Nucleic Acids Res. 8 :4057) 和 λ 衍生 PL 启动子之类的常用启动子和 N-基因核糖体结合位点 (Shimatake 等人, (1981) Nature 292 :128)。在转染进大肠杆菌中的 DNA 载体中包含选择标志物也是有用的。这种标志物的例子包括规定对氨苄青霉素、四环素或氯霉素的抗性的基因。

[0117] 选择载体以使得将所关注基因引入到适当的宿主细胞中。细菌载体通常是质粒或噬菌体起源的。将适当的细菌细胞用噬菌体载体颗粒转染或用裸噬菌体载体 DNA 转染。如果使用质粒载体，则将细菌细胞用质粒载体 DNA 转染。用于表达本发明蛋白质的表达系统可用芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 和沙门氏菌属 (*Salmonella*) 提供 (Palva 等人, (1983) Gene 22 :229-35 ; Mosbach 等人, (1983) Nature 302 :543-5)。来自 Pharmacia 的 pGEX-4T-1 质粒载体是本发明的优选大肠杆菌表达载体。

[0118] 在真核生物中的表达

[0119] 多种真核表达系统如酵母、昆虫细胞系、植物和哺乳动物细胞是本领域技术人员已知的。如下面简单解释的，本发明可在这些真核系统中表达。在一些实施方案中，将转化的 / 转染的植物细胞（如下文所论述的）用作表达系统，用于产生本发明的蛋白质。

[0120] 异源蛋白质在酵母中的合成是众所周知的。Sherman 等人, (1982) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory 是描述多种可用于在酵母中产生蛋白质的方法的广泛认可的著作。两种广泛采用的用于产生真核蛋白质的酵母是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。用于在酵母属 (*Saccharomyces*) 和毕赤酵母属 (*Pichia*) 中表达的载体、菌株和方法是本领域已知的并可从商业来源 (例如 Invitrogen) 获得。根据需要, 合适的载体通常具有表达控制序列如启动子 (包括 3- 磷酸甘油酸激酶或醇氧化酶启动子) 和复制起始区、终止序列等等。

[0121] 本发明的蛋白质, 一旦表达, 可通过裂解细胞并向溶胞产物或离心沉淀物应用标准蛋白质分离技术来从酵母分离。可通过使用蛋白质印记技术或其他标准免疫测定技术的放射免疫测定法来完成对纯化过程的监测。

[0122] 还可将编码本发明蛋白质的序列连接至多种用于转染例如哺乳动物、昆虫或植物起源的细胞培养物的表达载体。哺乳动物细胞系统通常会单层细胞的形式, 但也可使用哺乳动物细胞悬浮液。本领域已开发了多种能够表达完整蛋白质的合适宿主细胞系, 包括 HEK293、BHK21 和 CHO 细胞系。用于这些细胞的表达载体可包括表达控制序列, 如复制起始区、启动子 (例如 CMV 启动子、HSV tk 启动子或 pgk (磷酸甘油酸激酶) 启动子)、增强子 (Queen 等人, (1986) *Immunol. Rev.* 89 :49) 和必要的加工信息位点如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多腺苷酸化位点 (例如 SV40 大 T Ag poly A 添加位点) 和转录终止子序列。可用于产生本发明蛋白质的其他动物细胞可从 (例如) 美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) *Catalogue of Cell Lines and Hybridomas* (第 7 版, 1992) 获得。

[0123] 用于在昆虫细胞中表达本发明的蛋白质的适当载体通常源于 SF9 杆状病毒。合适的昆虫细胞系包括蚊幼虫、蚕、行军虫、蛾和果蝇属 (*Drosophila*) 细胞系如 Schneider 细胞系 (参见例如 Schneider, (1987) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 27 :353-65)。

[0124] 如使用酵母一样, 当采用高等动物或植物宿主细胞时, 通常将多腺苷酸化或转录终止子序列整合进载体中。终止子序列的例子是来自牛生长激素基因的多聚腺苷酸化序列。还可包括用于转录物的精确剪接的序列。剪接序列的例子是来自 SV40 的 VP1 内含子 (Sprague 等人, (1983) *J. Virol.* 45 :773-81)。另外, 可将控制在宿主细胞中的复制的基因序列掺入进载体 (如牛乳头瘤病毒类型的载体中存在的那些) (Saveria-Campo, "Bovine Papilloma Virus DNA a Eukaryotic Cloning Vector", *DNA CLONING :A PRACTICAL APPROACH*, 第 II 卷, Glover 编辑, IRL Press, Arlington, VA, 第 213-38 页 (1985))。

[0125] 另外, 可将设置在适当植物表达载体中的二聚化结构域的基因用于转化植物细胞。然后可从植物愈伤组织分离多肽或可将转化的细胞用于再生转基因植物。可收获这种转基因植物, 将适当的组织 (例如, 种子或叶) 进行大规模蛋白质提取和纯化技术。

[0126] 植物转化方法

[0127] 多种将外来基因引入植物中的方法是已知的并且可用于将二聚化结构域多核苷酸插入植物宿主中, 包括生物和物理植物转化方案。参见例如 Miki 等人, "Procedure for Introducing Foreign DNA into Plants", *METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, Glick 和 Thompson 编辑, CRC Press, Inc., Boca Raton, 第 67-88 页 (1993)。所选择的方法随宿主植物而变化, 包括化学转染方法如磷酸钙介导的基因转移、微生物介

导的基因转移如农杆菌介导的基因转移 (Horsch 等人, *Science* 227 :1229-31(1985))、电穿孔、显微注射和基因枪轰击。

[0128] 用于植物细胞或组织转化和植物再生的表达盒和载体以及体外培养方法是已知的并可获得。参见例如 Gruber 等人, “Vectors for Plant Transformation”, *METHODS IN PLANT MOLECULAR BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY* (出处同上), 第 89-119 页。

[0129] 可通过一种或多种通常用于直接递送进细胞的技术将分离的多核苷酸或多肽引入植物中。取决于要进行基因修饰的生物体、细胞、植物或植物细胞的类型 (即单子叶植物或双子叶植物), 这种方案可不同。转化植物细胞的合适方法包括显微注射 (Crossway 等人, (1986) *Biotechniques* 4 :320-334 和第 6, 300, 543 号美国专利)、电穿孔 (Riggs 等人, (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 :5602-5606)、直接基因转移 (Paszkowski 等人, (1984) *EMBO J.* 3 :2717-2722) 和弹道粒子加速 (参见例如 Sanford 等人, 第 4, 945, 050 号美国专利; W0 91/10725 和 McCabe 等人, (1988) *Biotechnology* 6 :923-926)。还可参见 Tomes 等人, *Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment*, 第 197-213 页, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Fundamental Methods* 编辑, Gamborg and Phillips, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1995; 第 5, 736, 369 号美国专利 (分生组织); Weissinger 等人, (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22 :421-477; Sanford 等人, (1987) *Particulate Science and Technology* 5 :27-37 (洋葱); Christou 等人, (1988) *Plant Physiol.* 87 :671-674 (大豆); Datta 等人, (1990) *Biotechnology* 8 :736-740 (水稻); Klein 等人, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :4305-4309 (玉米); Klein 等人, (1988) *Biotechnology* 6 :559-563 (玉米); W0 91/10725 (玉米); Klein 等人, (1988) *Plant Physiol.* 91 :440-444 (玉米); Fromm 等人, (1990) *Biotechnology* 8 :833-839 和 Gordon-Kamm 等人, (1990) *Plant Cell* 2 :603-618 (玉米); Hooydaas-Van Slogteren 和 Hooykaas, (1984) *Nature (伦敦)* 311 :763-764; Bytebier 等人, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 :5345-5349 (百合科 (Liliaceae)); De Wet 等人, (1985), *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, G. P. Chapman 等人 (编辑), 第 197-209 页; Longman, NY (花粉); Kaeppler 等人, (1990) *Plant Cell Reports* 9 :415-418 和 Kaeppler 等人, (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84 :560-566 (晶须介导的转化); 第 5, 693, 512 号美国专利 (超声处理); D'Halluin 等人, (1992) *Plant Cell* 4 :1495-1505 (电穿孔); Li 等人, (1993) *Plant Cell Reports* 12 :250-255 以及 Christou 和 Ford, (1995) *Annals of Botany* 75 :407-413 (rice); Osjoda 等人, (1996) *Nature Biotech.* 14 :745-750; 农杆菌介导的玉米转化 (第 5, 981, 840 号美国专利); 碳化硅晶须方法 (Frame 等人, (1994) *Plant J.* 6 :941-948); 激光方法 (Guo 等人, (1995) *Physiologia Plantarum* 93 :19-24); 超声处理方法 (Bao 等人, (1997) *Ultrasound in Medicine & Biology* 23 :953-959; Finer 和 Finer, (2000) *Lett Appl Microbiol.* 30 :406-10; Amoah 等人, (2001) *J Exp Bot* 52 :1135-42); 聚乙二醇方法 (Krens 等人, (1982) *Nature* 296 :72-77); 可利用电穿孔转化单子叶植物和双子叶植物细胞的原生质体 (Fromm 等人, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 :5824-5828) 和显微注射法 (Crossway 等人, (1986) *Mol. Gen. Genet.* 202 :179-185), 以引用的方式将这些参考文献并入本文。

[0130] 农杆菌介导的转化

[0131] 最广泛使用的将表达载体引入植物中的方法是基于农杆菌的天然转化系统。根瘤农杆菌和毛根农杆菌是植物病原性土壤细菌,其能遗传转化植物细胞。根瘤农杆菌和毛根农杆菌各自的 Ti 和 Ri 质粒携带负责植物的遗传转化的基因。参见例如 Kado, (1991) Crit. Rev. Plant Sci. 10 :1。如下文献提供了有关用于农杆菌介导的基因转移的农杆菌载体系统和方法的描述 :Gruber 等人 (出处同上) ;Miki 等人 (出处同上) 和 Moloney 等人, (1989) Plant Cell Reports 8 :238。

[0132] 相似地,可将基因插入源于根瘤农杆菌或毛根农杆菌各自的 Ti 或 Ri 质粒的 T-DNA 区。因而,可使用这些质粒,如上构建表达盒。已知有许多控制序列,其在偶联至异源编码序列并转化进宿主生物体中时,在初始编码序列的组织 / 器官特异性方面显示出基因表达的保真性。参见例如 Benfey 和 Chua, (1989) Science 244 :174-81。用于这些质粒中的特别合适的控制序列是用于基因在各种靶植物中的组成型叶特异性表达的启动子。其他可用的控制序列包括来自胭脂碱合酶基因 (NOS) 的启动子和终止子。NOS 启动子和终止子存在于质粒 pARC2 中,该质粒可得自美国典型培养物保藏中心,指定的 ATCC 存放号为 67238。如果使用这样一种系统,则来自 Ti 或 Ri 质粒的毒力 (vir) 基因也必须存在,或者与 T-DNA 部分一起,或者通过其中 vir 基因存在于单独载体上的双元系统。用于本发明的这类系统、载体以及转化植物细胞的方法在如下文献中进行了描述 :第 4, 658, 082 号美国专利 ;1993 年 11 月 16 日提交的第 5, 262, 306 号美国专利中引用的、1986 年 10 月 1 日提交的系列号为 913, 914 的美国专利申请以及 Simpson 等人, (1986) Plant Mol. Biol. 6 :403-15 (也在 '306 专利中引用),将所有上述参考文献以引用的方式全文并入本文。

[0133] 一旦构建,可将这些质粒置于毛根农杆菌或根瘤农杆菌中并将这些载体用于转化植物物种的细胞,所述植物物种的细胞通常对镰孢属 (*Fusarium*) 或链格孢属 (*Alternaria*) 感染而言是易感的。本发明还可以想到若干其他转基因植物,包括但不限于大豆、玉米、高粱、苜蓿、水稻、三叶草、卷心菜、香蕉、咖啡、芹菜、烟草、豇豆、棉花、甜瓜和胡椒。根瘤农杆菌或者毛根农杆菌的选择将取决于用其转化的植物。通常,根瘤农杆菌是用于转化的优选生物体。大多数双子叶植物、一些裸子植物和少数单子叶植物 (例如百合目 (*Liliales*) 和天南星目 (*Arales*) 的某些成员) 对根瘤农杆菌感染是易感的。毛根农杆菌也具有广泛的宿主范围,涵盖大多数双子叶植物和一些裸子植物,其包括豆科 (*Leguminosae*)、菊科 (*Compositae*) 和藜科 (*Chenopodiaceae*) 的成员。单子叶植物现在可以一定的成功率进行转化。第 604 662 A1 号欧洲专利申请公开了用农杆菌转化单子叶植物的方法。第 672 752 A1 号欧洲专利申请公开了利用未成熟胚的盾片用农杆菌转化单子叶植物的方法。Ishida 等人论述了通过使未成熟胚暴露于根瘤农杆菌来转化玉米的方法 (*Nature Biotechnology* 14 :745-50 (1996))。

[0134] 一旦转化,可将这些细胞用于再生转基因植物。例如,整个植株可通过使该植株产生伤口,然后将载体引入该伤口位点来用这些载体进行感染。可使植株的任何部分产生伤口,包括叶、茎和根。或者,可将外植体形式的植物组织如子叶组织或叶圆片用这些载体接种,并在可促进植物再生的条件下培养。可将通过用毛根农杆菌或根瘤农杆菌 (含有编码伏马毒素降解酶的基因) 接种植物组织而转化的根或苗用作植物来源,以通过体细胞胚胎发生或器官发生来再生伏马毒素抗性转基因植物。用于再生植物组织的这类方法的例子在如下文献中有所公开 :Shahin, (1985) Theor. Appl. Genet. 69 :235-40 ;第 4, 658, 082 号美国

专利 ;Simpson 等人 (出处同上) 和在 1993 年 11 月 16 日提交的第 5,262,306 号美国专利中引用的均于 1986 年 10 月 1 日提交的系列号为 913,913 和 913,914 的美国专利申请,将上述文献的全部公开内容以引用的方式并入本文。

[0135] 直接基因转移

[0136] 尽管农杆菌介导的转化的宿主范围广泛,但一些主要的谷类作物物种和裸子植物总体上对该基因转移模式而言是顽拗的,尽管最近已在稻中获得了一定的成功 (Hiei 等人, (1994) *The Plant Journal* 6 :271-82)。已开发了几种植物转化的方法 (统称为直接基因转移) 作为对农杆菌介导的转化的替代。

[0137] 一般适用的植物转化方法是微抛射体 (microprojectile) 介导的转化,其中 DNA 携带在约 1 至 4 μm 的微抛射体的表面上。用基因枪装置将表达载体引入植物组织中,该基因枪装置将微抛射体加速至 300 至 600m/s 的速度,该速度足以穿透植物细胞壁和膜 (Sanford 等人, (1987) *Part. Sci. Technol.* 5 :27 ;Sanford, (1988) *Trends Biotech* 6 :299 ;Sanford, (1990) *Physiol. Plant* 79 :206 和 Klein 等人, (1992) *Biotechnology* 10 :268)。

[0138] 物理递送 DNA 至植物的另一种方法是如 Zang 等人, (1991) *BioTechnology* 9 :996 中所述的对靶细胞的超声处理。或者,脂质体或原生质球融合已用于将表达载体引入植物中。参见例如 Deshayes 等人, (1985) *EMBO J.* 4 :2731 和 Christou 等人, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 :3962。利用 CaCl_2 沉淀、聚乙烯醇或聚-L- 鸟氨酸直接将 DNA 摄入原生质体中已有报道。参见例如 Hain 等人, (1985) *Mol. Gen. Genet.* 199 :161 和 Draper 等人, (1982) *Plant Cell Physiol.* 23 :451。

[0139] 原生质体和完整细胞和组织的电穿孔也已有描述。参见例如 Donn 等人, (1990), *Abstracts of the VIIth Int' l. Congress on Plant Cell and Tissue Culture IAPTC*, A2-38, 第 53 页 ;D'Halluin 等人, (1992) *Plant Cell* 4 :1495-505 和 Spencer 等人, (1994) *Plant Mol. Biol.* 24 :51-61。

[0140] 增加二聚化结构域多肽的活性和 / 或水平

[0141] 提供了方法来增加二聚化结构域多肽的活性和 / 或水平。二聚化结构域多肽的水平 and / 或活性的增加可通过向植物提供二聚化结构域多肽来实现。可通过将编码二聚化结构域多肽的氨基酸序列引入植物中、向植物中引入编码二聚化结构域多肽的核苷酸序列或作为另一种选择,通过选择编码本发明的二聚化结构域多肽的基因座的不同变体来提供二聚化结构域多肽。

[0142] 如本文别处所讨论的,许多用来将多肽提供给植物的方法是本领域已知的,包括但不限于将多肽直接引入到植物中,或者将编码具有引导植物发育活性的二聚化结构域组分堆叠的多肽的多核苷酸构建体引入到植物中 (瞬时引入或稳定引入)。还应认识到,本发明的方法可采用不能够在转化的植物中引导蛋白质或 RNA 的表达的多核苷酸。因而,二聚化结构域多肽的水平 and / 或活性可通过改变编码二聚化结构域多肽的基因或其启动子来增加。参见例如 Kmiec, 第 5,565,350 号美国专利 ;Zarling 等人, PCT/US93/03868。因而提供了在二聚化结构域基因中携带突变的诱变植物,其中所述突变可增加二聚化结构域基因的表达或增加植物生长和 / 或所编码的二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性。

[0143] 降低二聚化结构域多肽的活性和 / 或水平

[0144] 提供了方法来通过用表达可抑制二聚化结构域多肽的表达的多核苷酸的表达盒

转化植物细胞,降低或消除本发明的二聚化结构域多肽的活性。该多核苷酸可通过防止二聚化结构域信使 RNA 的翻译直接抑制二聚化结构域多肽的表达,或通过编码可抑制编码二聚化结构域多肽的二聚化结构域基因的转录或翻译的多肽间接抑制二聚化结构域多肽的表达。用于抑制或消除基因在植物中的表达的方法是本领域所熟知的,任何这种方法可用于本发明中来抑制二聚化结构域多肽的表达。

[0145] 如果目标多肽的蛋白质水平低于还未经遗传修饰或诱变处理来抑制该二聚化结构域多肽的表达的植物中该多肽的蛋白质水平的 70%,则该多肽的表达被抑制。在本发明的特定实施方案中,在根据本发明的经修饰的植物中二聚化结构域多肽的蛋白质水平不到不是突变体或还未经遗传修饰来抑制该二聚化结构域多肽的表达的植物中相同二聚化结构域多肽的蛋白质水平的 60%、不到 50%、不到 40%、不到 30%、不到 20%、不到 10%、不到 5%或不到 2%。二聚化结构域多肽的表达水平可例如通过测定植物细胞或植物中表达的二聚化结构域多肽的水平来直接测量,或者例如通过测量植物细胞或植物中的植物生长和 / 或二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性,或通过测量植物中的生物量来间接测量。进行这种测定的方法在本文的其他地方进行了描述。

[0146] 在本发明的其他实施方案中,通过用表达盒转化植物细胞来降低或消除二聚化结构域多肽的活性,所述表达盒包含编码可抑制二聚化结构域多肽的活性的多肽的多核苷酸。如果植物生长和 / 或二聚化结构域组分堆叠多肽的二聚化结构域活性不到还未经修饰以抑制植物生长和 / 或该二聚化结构域组分堆叠多肽的二聚化结构域活性的植物中的植物生长和 / 或相同二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性的 70%,则植物生长和 / 或二聚化结构域组分堆叠多肽的二聚化结构域活性根据本发明受到了抑制。在本发明的特定实施方案中,在根据本发明的经修饰的植物中植物生长和 / 或二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性不到还未经遗传修饰以抑制该二聚化结构域多肽的表达的植物中植物生长和 / 或相同二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性的 60%、不到 50%、不到 40%、不到 30%、不到 20%、不到 10%或不到 5%。当植物生长和 / 或二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性不能通过本文其他地方所描述的测定法检测时,则其根据本发明而得以“消除”。确定植物生长和 / 或二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性的方法在本文其他地方进行了描述。

[0147] 在其它实施方案中,可通过破坏编码二聚化结构域多肽的基因来降低或消除二聚化结构域组分堆叠多肽的活性。本发明涵盖在二聚化结构域基因中携带突变的诱变植物,其中该突变可降低二聚化结构域基因的表达或抑制植物生长和 / 或所编码的二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性。

[0148] 因而,可将许多方法用于降低或消除二聚化结构域多肽的活性。此外,有不止一种方法可用于降低单种二聚化结构域多肽的活性。降低或消除二聚化结构域多肽的表达的方法的非限制性实例在下面给出。

[0149] 1. 基于多核苷酸的方法:

[0150] 在本发明的一些实施方案中,用表达盒转化植物,该表达盒能够表达可抑制本发明的二聚化结构域多肽的表达的多核苷酸。本文所用的术语“表达”指基因产物的生物合成,包括所述基因产物的转录和 / 或翻译。例如,出于本发明的目的,能够表达可抑制至少一种二聚化结构域多肽的表达的多核苷酸的表达盒,是能够产生可抑制至少一种本发明的二聚化结构域多肽的转录和 / 或翻译的 RNA 分子的表达盒。蛋白质或多肽从 DNA 分子的

“表达”或“产生”指该编码序列转录和翻译而产生该蛋白质或多肽，而蛋白质或多肽从 RNA 分子“表达”或“产生”指该 RNA 编码序列翻译而产生蛋白质或多肽。

[0151] 可抑制二聚化结构域多肽的表达的多核苷酸的例子在下面给出。

[0152] i. 有义抑制 / 共抑制

[0153] 在本发明的在一些实施方案中，二聚化结构域多肽表达的抑制可通过有义抑制或共抑制获得。对于共抑制，将表达盒设计为表达这样的 RNA 分子，该 RNA 分子以“有义”取向对应于编码二聚化结构域多肽的信使 RNA 的全部或部分。该 RNA 分子的过表达可导致天然基因的表达减少。因此，对用该共抑制表达盒转化的多个植物品系进行筛选以鉴别对二聚化结构域多肽表达显示出最大抑制的那些品系。

[0154] 用于共抑制的多核苷酸可对应于编码二聚化结构域多肽的序列的全部或部分、二聚化结构域多肽转录物的 5' 和 / 或 3' 非翻译区的全部或部分、或者编码二聚化结构域多肽的转录物的编码序列和非翻译区二者的全部或部分。在其中所述多核苷酸包含二聚化结构域多肽的编码区的全部或部分的一些实施方案中，将表达盒设计用于消除该多核苷酸起始密码子，使得不会翻译出蛋白质产物。

[0155] 共抑制可用来抑制植物基因的表达以产生对于由这些基因编码的蛋白质而言具有不可检测的蛋白质水平的植物。参见（例如）Broin 等人，(2002)Plant Cell 14:1417-1432。共抑制还可用来抑制同一植株中的多种蛋白质的表达。参见（例如）第 5,942,657 号美国专利。利用共抑制来抑制植物中的内源基因的表达的方法在如下文献中有描述：Flavell 等人，(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3490-3496；Jorgensen 等人，(1996)Plant Mol. Biol. 31:957-973；Johansen 和 Carrington，(2001)Plant Physiol. 126:930-938；Broin 等人，(2002)Plant Cell 14:1417-1432；Stoutjesdijk 等人，(2002)Plant Physiol. 129:1723-1731；Yu 等人，(2003)Phytochemistry 63:753-763 和第 5,034,323 号、第 5,283,184 号和第 5,942,657 号美国专利，将这些文献每一者以引用的方式并入本文。共抑制的效率可通过在表达盒中在有义序列的 3' 和聚腺苷酸化信号的 5' 位置包括多聚 dT 区来提高。参见第 2002/0048814 号美国专利申请公开，将其以引用的方式并入本文。通常，这种核苷酸序列与内源基因的转录物的序列具有相当大的序列同一性，优选的是高于约 65% 的序列同一性，更优选的是高于约 85% 的序列同一性，最优选的是高于约 95% 的序列同一性。参见第 5,283,184 号和第 5,034,323 号美国专利，将它们以引用的方式并入本文。

[0156] ii. 反义抑制

[0157] 在本发明的一些实施方案中，对二聚化结构域多肽表达的抑制可通过反义抑制来获得。对于反义抑制，将表达盒设计为表达这样的 RNA 分子，该 RNA 分子与编码二聚化结构域多肽的信使 RNA 的全部或部分互补。该反义 RNA 分子的过量表达可导致天然基因的表达减少。因此，对用该反义抑制表达盒转化的多个植物品系进行筛选以鉴别对二聚化结构域多肽表达显示出最大抑制的那些品系。

[0158] 用于反义抑制的多核苷酸可对应于编码二聚化结构域多肽的序列的互补序列的全部或部分、二聚化结构域转录物的 5' 和 / 或 3' 非翻译区的互补序列的全部或部分、或者编码二聚化结构域多肽的转录物的编码序列和非翻译区二者的互补序列的全部或部分。此外，反义多核苷酸可与目标序列完全互补（即与目标序列的互补序列 100% 相同）或部分

互补（即与目标序列的互补序列的同一性低于100%）。反义抑制还可用来抑制同一植株中的多种蛋白质的表达。参见（例如）第5,942,657号美国专利。此外，反义核苷酸的部分可用来破坏靶基因的表达。一般来讲，可使用至少50个核苷酸、100个核苷酸、200个核苷酸、300、400、450、500、550或更多个核苷酸的序列。使用反义抑制来抑制植物中的内源基因的表达的方法在例如如下文献中有描述：Liu等人，(2002)Plant Physiol. 129:1732-1743以及第5,759,829号和第5,942,657号美国专利，将这些参考文献的每一者以引用的方式并入本文。反义抑制的效率可通过在表达盒中在反义序列的3'和聚腺苷酸化信号的5'位置处包括多聚dT区来提高。参见第2002/0048814号美国专利申请公开，将其以引用的方式并入本文。

[0159] iii. 双链 RNA 干扰

[0160] 在本发明的一些实施方案中，对二聚化结构域多肽表达的抑制可通过双链RNA(dsRNA)干扰来获得。对于dsRNA干扰，有义RNA分子（如上文针对共抑制所描述）和与该有义RNA分子完全或部分互补的反义RNA分子在同一细胞中表达，从而导致对应的内源信使RNA的表达的抑制。

[0161] 有义和反义分子的表达可通过将表达盒子设计为同时包含有义序列和反义序列来实现。或者，可将单独的表达盒分别用于有义序列和反义序列。对用一个或多个dsRNA干扰表达盒转化的多个植株进行筛选以鉴别对二聚化结构域多肽表达显示出最大抑制的植物品系。利用dsRNA干扰来抑制内源植物基因的表达的方法在如下文献中有描述：Waterhouse等人，(1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13959-13964、Liu等人，(2002)Plant Physiol. 129:1732-1743和WO 99/49029、WO 99/53050、WO 99/61631以及WO 00/49035，将这些参考文献的每一者以引用的方式并入本文。

[0162] iv. 发夹 RNA 干扰和含内含子的发夹 RNA 干扰

[0163] 在本发明的一些实施方案中，对二聚化结构域多肽表达的抑制可通过发夹RNA(hpRNA)干扰或含内含子的发夹RNA(ihpRNA)干扰来获得。这些方法在抑制内源基因表达方面是高度有效的。参见Waterhouse和Helliwell，(2003)Nat. Rev. Genet. 4:29-38以及其中引用的参考文献。

[0164] 对于hpRNA干扰，将表达盒设计为表达这样的RNA分子，该RNA分子自身杂交而形成包括单链环区和碱基配对茎的发夹结构。该碱基配对茎区包含对应于编码要对其表达进行抑制的基因的内源信使RNA的全部或部分的有义序列和与该有义序列完全或部分互补的反义序列。因而，该分子的碱基配对茎区通常决定RNA干扰的特异性。hpRNA分子在抑制内源基因的表达方面是高度有效的，并且它们诱导的RNA干扰被植物后代遗传。参见（例如）Chuang和Meyerowitz，(2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990；Stoutjesdijk等人，(2002)Plant Physiol. 129:1723-1731以及Waterhouse和Helliwell，(2003)Nat. Rev. Genet. 4:29-38。利用hpRNA干扰来抑制或沉默基因表达的方法例如在如下文献中有描述：Chuang和Meyerowitz，(2000)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:4985-4990；Stoutjesdijk等人，(2002)Plant Physiol. 129:1723-1731；Waterhouse和Helliwell，(2003)Nat. Rev. Genet. 4:29-38；Pandolfini等人，BMC Biotechnology 3:7和第2003/0175965号美国专利申请公开，将这些参考文献的每一者以引用的方式并入本文。hpRNA构建体体内沉默基因表达的效率的瞬时测定法已由Panstruga等人，(2003)Mol.

Biol. Rep. 30 :135-140 进行了描述,将该文献以引用的方式并入本文。

[0165] 对于 ihpRNA,干扰分子具有与 hpRNA 相同的总体结构,但该 RNA 分子另外包含内含子,该内含子能够在表达该 ihpRNA 的细胞中被剪接。内含子的使用使得发夹 RNA 分子中的环区大小在剪接后最小化,这可提高干扰的效率。参见(例如)Smith 等人,(2000)Nature 407 :319-320。事实上,Smith 等人显示使用 ihpRNA 介导的干扰 100%抑制了内源基因表达。利用 ihpRNA 干扰来抑制内源植物基因的表达的方法例如在如下文献中有描述:Smith 等人,(2000)Nature 407 :319-320;Wesley 等人,(2001)Plant J. 27 :581-590;Wang 和 Waterhouse,(2001)Curr. Opin. Plant Biol. 5 :146-150;Waterhouse 和 Helliwell,(2003)Nat. Rev. Genet. 4 :29-38;Helliwell 和 Waterhouse,(2003)Methods 30 :289-295 以及第 2003/0180945 号美国专利申请公开,将这些参考文献的每一个以引用的方式并入本文。

[0166] 还可对用于 hpRNA 干扰的表达盒进行设计,使得有义序列和反义序列不对应于内源 RNA。在这个实施方案中,该反义和有义序列在这样的环序列的旁侧,该环序列包含对应于靶基因的内源信使 RNA 的全部或部分的核苷酸序列。因而,是环区决定了 RNA 干扰的特异性。参见例如 WO 02/00904,以引用的方式将其并入本文。

[0167] v. 扩增子介导的干扰

[0168] 扩增子表达盒包含源自植物病毒的序列,该序列含有靶基因的全部或部分但通常不含有该天然病毒的基因的全部。存在于表达盒的转录产物中的病毒序列使得该转录产物能指导其自身的复制。由扩增子产生的转录物相对于目标序列(即二聚化结构域多肽的信使 RNA)可以是有义或反义的。利用扩增子来抑制内源植物基因表达的方法例如在如下文献中有描述:Angell 和 Baulcombe,(1997)EMBO J. 16 :3675-3684,Angell 和 Baulcombe,(1999)Plant J. 20 :357-362 以及第 6,646,805 号美国专利,将这些参考文献的每一者以引用的方式并入本文。

[0169] vi. 核酶

[0170] 在一些实施方案中,由本发明的表达盒表达的多核苷酸是催化性 RNA 或具有二聚化结构域多肽的信使 RNA 特异性的核酶活性。因而,该多核苷酸引起内源信使 RNA 的降解,从而导致二聚化结构域多肽表达降低。这个方法例如在第 4,987,071 号美国专利中进行了描述,将该专利以引用的方式并入本文。

[0171] vii. 小干扰 RNA 或微 RNA

[0172] 在本发明的一些实施方案中,对二聚化结构域多肽表达的抑制可通过经由编码微 RNA(miRNA)的基因的表达进行的 RNA 干扰来获得。miRNA 是由约 22 个核糖核苷酸组成的调控因子。miRNA 在抑制内源基因的表达方面是高度有效的。参见例如 Javier, 等人,(2003)Nature 425 :257-263,将该文献以引用的方式并入本文。

[0173] 对于 miRNA 干扰,将表达盒设计成表达模仿内源 miRNA 基因的 RNA 分子。该 miRNA 基因编码可形成发夹结构的 RNA,该发夹结构含有与另一内源基因(靶序列)互补的 22 核苷酸序列。为了抑制二聚化结构域表达,从二聚化结构域转录物序列选择该 22 核苷酸序列,其含有有义取向的所述二聚化结构域序列的 22 个核苷酸和与该有义序列互补的相应反义序列的 21 个核苷酸。miRNA 分子在抑制内源基因的表达方面是高度有效的,并且它们诱导的 RNA 干扰被植物后代遗传。

[0174] 2. 基因表达的基于多肽的抑制

[0175] 在一个实施方案中,所述多核苷酸编码与编码二聚化结构域多肽的基因结合的锌指蛋白,从而导致所述基因的表达降低。在特定实施方案中,该锌指蛋白结合至二聚化结构域基因的调控区。在其它实施方案中,该锌指蛋白结合至编码二聚化结构域多肽的信使RNA并防止其翻译。选择被锌指蛋白靶向的位点的方法已例如在第6,453,242号美国专利进行了描述,利用锌指蛋白来抑制植物中的基因表达的方法例如在第2003/0037355号美国专利申请公开中进行了描述,将这些专利每一者以引用的方式并入本文。

[0176] 3. 蛋白质活性的基于多肽的抑制

[0177] 在本发明的一些实施方案中,所述多核苷酸编码与至少一种二聚化结构域多肽结合并降低该二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性的抗体。在另一个实施方案中,该抗体的结合导致由细胞质量控制机制进行的抗体-二聚化结构域复合物的周转增加。抗体在植物细胞中的表达以及通过抗体表达并结合至植物细胞中的蛋白质来抑制分子途径是本领域所熟知的。参见例如 Conrad 和 Sonnewald, (2003) Nature Biotech. 21 :35-36,将该文献以引用的方式并入本文。

[0178] 4. 基因破坏

[0179] 在本发明的一些实施方案中,通过破坏编码二聚化结构域多肽的基因来降低或消除该二聚化结构域多肽的活性。可通过本领域已知的任何方法来破坏编码二聚化结构域多肽的基因。例如,在一个实施方案中,通过转座子标签法破坏所述基因。在另一个实施方案中,通过利用随机诱变或定向诱变来对植物进行诱变处理并选择具有降低的二聚化结构域活性的植物来破坏所述基因。

[0180] i. 转座子标签法

[0181] 在本发明的一个实施方案中,将转座子标签法用于降低或消除一种或多种二聚化结构域多肽的二聚化结构域活性。转座子标签法包括在内源二聚化结构域基因内插入转座子以降低或消除所述二聚化结构域多肽的表达。“二聚化结构域基因”旨在意指编码根据本发明的二聚化结构域多肽的基因。

[0182] 在该实施方案中,通过在编码二聚化结构域多肽的基因的调控区或编码区内插入转座子来降低或消除一种或多种二聚化结构域多肽的表达。处于二聚化结构域基因的外显子、内含子、5' 或 3' 非翻译序列、启动子或任何其他调控序列内的转座子,可用于降低或消除所编码二聚化结构域多肽的表达和 / 或活性。

[0183] 用于对植物中的特定基因进行转座子标记的方法是本领域所熟知的。参见(例如)Maes 等人,(1999)Trends Plant Sci. 4 :90-96 ;Dharmapuri 和 Sonti, (1999)FEMS Microbiol. Lett. 179 :53-59 ;Meissner 等人,(2000)Plant J. 22 :265-274 ;Phogat 等人,(2000)J. Biosci. 25 :57-63 ;Walbot, (2000)Curr. Opin. Plant Biol. 2 :103-107 ;Gai 等人,(2000)Nucleic Acids Res. 28 :94-96 ;Fitzmaurice 等人,(1999)Genetics 153 :1919-1928)。此外,用于选择选定基因中的 Mu 插入序列的 TUSC 方法已在如下文献中进行了描述 :Bensen 等人,(1995)Plant Cell 7 :75-84 ;Mena 等人,(1996)Science 274 :1537-1540 和第 5,962,764 号美国专利,将这些参考文献的每一个以引用的方式全文并入本文。

[0184] ii. 活性降低的突变体植物

[0185] 用于降低或消除植物中的内源基因的表达的另外方法也是本领域已知的,并且可

类似地应用于本发明。这些方法包括其他形式的诱变,例如甲磺酸乙酯诱导的诱变、缺失诱变和快中子缺失诱变,快中子缺失诱变以反向遗传学方式(使用 PCR)用于鉴别其中内源基因已缺失的植株。这些方法的例子参见 Ohshima 等人,(1998)Virology 243:472-481; Okubara 等人,(1994)Genetics 137:867-874 和 Quesada 等人,(2000)Genetics 154:421-436,将这些参考文献的每一个以引用的方式全文并入本文。此外,一种用于筛选化学诱导的突变的快速且可自动化的方法 TILLING(Targeting Induced Local Lesions In Genomes(定向诱导基因组局部突变))也适用于本发明,该方法利用变性 HPLC 或者对选定的 PCR 产物的选择性内切核酸酶消化。参见 McCallum 等人,(2000)Nat. Biotechnol. 18:455-457,将该文献以引用的方式并入本文。

[0186] 影响基因表达或干扰所编码的蛋白质的功能(二聚化结构域活性)的突变是本领域所熟知的。基因外显子中的插入突变通常导致无效突变体。保守残基的突变在抑制所编码的蛋白质的二聚化结构域活性方面是特别有效的。植物二聚化结构域多肽的适于以消除二聚化结构域活性为目标来进行诱变的保守残基已得到描述。可根据熟知的程序分离这种突变体,并且可通过遗传杂交对不同二聚化结构域基因座中的突变进行堆叠。参见例如 Gruis 等人,(2002)Plant Cell 14:2863-2882。

[0187] 在本发明的另一个实施方案中,显性突变体由于基因倒位和重复基因座的重组可用于引发 RNA 沉默。参见例如 Kusaba 等人,(2003)Plant Cell 15:1455-1467。

[0188] 本发明涵盖另外的用于降低或消除一种或多种二聚化结构域多肽的活性的方法。用于改变或突变植物中的基因组核苷酸序列的其他方法的例子是本领域已知的,包括但不限于使用 RNA:DNA 载体、RNA:DNA 突变载体、RNA:DNA 修复载体、混合双链寡核苷酸、自互补 RNA:DNA 寡核苷酸以及重组工程寡核碱基(recombinogenic oligonucleobase)。这种载体和使用方法是本领域已知的。参见例如第 5,565,350 号美国专利;第 5,731,181 号美国专利;第 5,756,325 号美国专利;第 5,760,012 号美国专利;第 5,795,972 号美国专利和第 5,871,984 号美国专利,将这些专利中的每一个以引用的方式并入本文。另参见 WO 98/49350、WO 99/07865、WO 99/25821 和 Beetham 等人,(1999)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:8774-8778,将这些专利和参考文献的每一个以引用的方式全文并入本文。

[0189] iii. 调节植物生长和 / 或二聚化结构域组分堆叠活性

[0190] 在特定的方法中,通过增加植物中的二聚化结构域多肽的水平或活性来增加二聚化结构域基因的水平或 / 或活性。增加植物中的二聚化结构域多肽的水平或 / 或活性的方法在本文其他地方进行了论述。简而言之,这种方法包括将本发明的二聚化结构域多肽提供给植物,从而增加该二聚化结构域多肽的水平或 / 或活性。在其它实施方案中,可通过向植物引入包含本发明的二聚化结构域核苷酸序列的多核苷酸,使该二聚化结构域序列表达,增加二聚化结构域多肽的活性,从而增加二聚化结构域活性并因而增加所述植物或植物部分中的植物生长来提供编码二聚化结构域多肽的二聚化结构域核苷酸序列。在其他的实施方案中,引入植物中的二聚化结构域核苷酸构建体被稳定掺入植物的基因组中。

[0191] 在其他方法中,通过增加植物中的二聚化结构域多肽的水平或活性来增加植物组织的细胞数目和生物量。这种方法在本文其他地方进行了详细公开。在一这样的方法中,将二聚化结构域核苷酸序列引入植物中,所述二聚化结构域核苷酸序列的表达可降低二聚化结构域多肽的活性并从而增加植物或植物部分中的植物生长和 / 或二聚化结构域。在其

他的实施方案中,引入植物中的二聚化结构域核苷酸构建体被稳定掺入植物的基因组中。

[0192] 如上面所论述的,技术人员将认识到,可将适当的启动子用于调节植物中的植物生长和 / 或二聚化结构域多核苷酸和多肽的水平 / 活性。在本文其他地方已经公开了该实施方案的示例性启动子。

[0193] 因此,本发明还提供了当与对照植物组织的植物生长和 / 或二聚化结构域比较时具有经修饰的植物生长和 / 或二聚化结构域的植物。在一个实施方案中,本发明的植物具有增加的本发明二聚化结构域多肽的水平 / 活性,因而在植物组织中具有增加的植物生长和 / 或二聚化结构域。在另一个实施方案中,本发明的植物具有降低的或消除的本发明二聚化结构域多肽的水平,因而在植物组织中具有降低的植物生长和 / 或二聚化结构域。在其它实施方案中,这种植物已在其基因组中稳定掺入了核酸分子,该核酸分子包含可操作地连接至驱动在该植物细胞中的表达的启动子的本发明二聚化结构域核苷酸序列。

[0194] iv. 调节根发育

[0195] 提供了用于调节植物中的根发育的方法。所谓“调节根发育”意指在与对照植物比较时植物根的发育的任何改变。根发育的这种改变包括但不限于:初生根的生长速率、根鲜重、侧根和不定根形成的程度、维管系统、分生组织发育或径向扩张度。具体地讲,最期望的结果将是根具有较强的维管结构,该较强的维管结构可改善植物的抗倒伏性并因而减少根倒伏以及较不易受害虫影响。

[0196] 提供了用于调节植物中的根发育的方法。该方法调节植物中的二聚化结构域多肽的水平和 / 或活性。在一种方法中,将本发明的二聚化结构域序列提供给植物。在另一方法中,通过向植物中引入包含本发明的二聚化结构域核苷酸序列、表达该二聚化结构域序列并从而修饰根发育来提供二聚化结构域核苷酸序列。在其他的方法中,引入植物中的二聚化结构域核苷酸构建体被稳定掺入植物的基因组中。

[0197] 在另外的方法中,通过改变植物中的二聚化结构域多肽的水平或活性来调节根发育。当与对照植物比较时二聚化结构域活性的增加可导致至少一种或多种如下对根发育的变更,包括但不限于:较大的根分生组织、根生长增加、增强的径向扩张、增强的维管系统、增加的根分支、更多的不定根和 / 或鲜根重的增加。

[0198] 本文所用的“根生长”涵盖单子叶植物和双子叶植物中构成根系的不同部分在根系发育的不同阶段的生长的所有方面。应当理解,根生长增强可由其各部分(包括初生根、侧根、不定根等)中的一者或多者的生长增强引起。

[0199] 测量根系中的这种发育改变的方法是本领域已知的。参见例如第 2003/0074698 号美国专利申请和 Werner 等人,(2001)PNAS 18:10487-10492,将这两篇文献以引用的方式并入本文。

[0200] 如上面所论述的,技术人员将会认识用于调节植物中的根发育的适当启动子。用于这个实施方案的示例性启动子包括组成型启动子和根优选的启动子。示例性的根优选的启动子已在本文别处公开。

[0201] 通过增加二聚化结构域多肽的活性和 / 或水平来刺激根生长和增加根量也在改善植物的抗倒伏性方面得到应用。术语“耐倒伏性”或“抗倒伏性”指植物使其自身固定至土壤的能力。对于具有竖立或半竖立生长习性的植物,该术语还指在不利(环境)条件下保持直立位置的能力。该性状涉及根系的尺寸、深度和形态。此外,通过增加二聚化结构域多

肽的水平和 / 或活性来刺激根生长和增加根量也在促进外植体的体外繁殖方面得到应用。

[0202] 此外,由于增加的二聚化结构域活性的水平和 / 或活性引起的较高的根生物量产量对产量具有直接效果以及对由根细胞或转基因根细胞或所述转基因根细胞的细胞培养物产生的化合物的产生具有间接的影响。在根培养物中产生的关注化合物的一个实例是紫草素 (shikonin),其产量可通过所述方法有利地增强。

[0203] 因此,本发明还提供了与对照植物的根发育相比较时具有受调节的根发育的植物。在一些实施方案中,本发明的植物具有增加的本发明二聚化结构域多肽的水平 / 活性,并且具有增加的根生长和 / 或根生物量。在其它实施方案中,这种植物已在其基因组中稳定掺入了核酸分子,该核酸分子包含可操作地连接至驱动在该植物细胞中的表达的启动子的本发明二聚化结构域核苷酸序列。

[0204] v. 调节苗和叶发育

[0205] 还提供了用于调节植物中的苗和叶发育的方法。所谓“调节苗和 / 或叶发育”其意指植物苗和 / 或叶的发育的任何改变。苗和 / 或叶发育中的这种改变包括但不限于在苗分生组织发育方面、在叶数目、叶尺寸、叶和茎维管系统、节间长度和叶老化方面的改变。本文所用的“叶发育”和“苗发育”涵盖在单子叶植物和双子叶植物中分别构成叶系统和苗系统的不同部分在这些系统发育的不同阶段中的生长的所有方面。测量苗和叶系统中的这种发育改变的方法是本领域已知的。参见例如 Werner 等人,(2001)PNAS 98 :10487-10492 和第 2003/0074698 号美国专利申请公开,将这两篇文献各以引用的方式并入本文。

[0206] 调节植物中的苗和 / 或叶发育的方法包括调节本发明的二聚化结构域多肽的活性和 / 或水平。在一个实施方案中,提供了本发明的二聚化结构域序列。在其他实施方案中,通过向植物中引入包含本发明的二聚化结构域核苷酸序列的多核苷酸、表达该二聚化结构域序列并从而修饰苗和 / 或叶发育来提供二聚化结构域核苷酸序列。在其他的实施方案中,引入植物中的二聚化结构域核苷酸构建体被稳定掺入植物的基因组中。

[0207] 在具体的实施方案中,通过降低植物中的二聚化结构域多肽的水平 and / 或活性来调节苗或叶发育。当与对照植物比较时,二聚化结构域活性的降低可导致至少一种或多种如下苗和 / 或叶发育的改变,包括但不限于:叶数目减少、叶表面降低、维管减少、节间较短以及生长矮小和叶老化延缓。

[0208] 如上面所论述的,技术人员将会认识到用于调节植物的苗和叶发育的适当启动子。用于这个实施方案的示例性启动子包括组成型启动子、苗优选的启动子、苗分生组织优选的启动子和叶优选的启动子。示例性的启动子已在本文别处公开。

[0209] 降低植物中的二聚化结构域活性和 / 或水平会导致节间较短和生长矮小。因而,本发明的方法可在产生矮秆植物方面有应用。另外,如上面所论述的,植物中的二聚化结构域活性的调节可调节根和苗二者的生长。因而,本发明还提供了用于改变根 / 苗比的方法。可进一步通过降低植物中的二聚化结构域多肽的水平 and / 或活性来调节苗或叶发育。

[0210] 因此,本发明还提供了与对照植物相比较时具有受调节的苗和 / 或叶发育的植物。在一些实施方案中,本发明的植物具有增加的本发明二聚化结构域多肽的水平 / 活性,从而改变了苗和 / 或叶发育。这种改变包括但不限于与对照植物相比较,叶数目增加、叶表面增加、维管结构增加、节间更长和植物株高增加以及叶老化改变。在其他实施方案中,本发明的植物具有降低的本发明二聚化结构域多肽的水平 / 活性。

[0211] vi 调节繁殖组织发育

[0212] 提供了用于调节繁殖组织发育的方法。在一个实施方案中,提供了用于调节植物中的花发育的方法。所谓“调节花发育”其意指与其中二聚化结构域多肽的活性或水平还未受调节的对照植物相比,植物的繁殖组织的结构的任何改变。“调节花发育”还包括与其中二聚化结构域多肽的活性或水平还未受调节的对照植物相比,植物繁殖组织发育的时限的任何改变(即花发育时限的延迟或加速)。宏观改变可包括在环境胁迫时的如下变化:繁殖组织的尺寸、形状、数目或位置,这些结构形成的发育时间周期,或者维持或发展经过开花过程的能力。微观改变可包括构成繁殖组织的细胞的类型或形状的改变。

[0213] 用于调节植物中的花发育的方法包括调节植物中的二聚化结构域活性。在一种方法中,提供了本发明的二聚化结构域序列。可通过向植物中引入包含本发明的二聚化结构域核苷酸序列的多核苷酸、表达该二聚化结构域序列并从而修饰花发育来提供二聚化结构域核苷酸序列。在其他的实施方案中,引入植物中的二聚化结构域核苷酸构建体被稳定掺入植物的基因组中。

[0214] 在具体的方法中,通过降低植物中的二聚化结构域多肽的水平或活性来调节花发育。当与对照植物比较时,二聚化结构域活性的降低可导致至少一种或多种如下的花发育改变,包括但不限于:开花延迟、花数目减少、部分雄性不育和种组减少。诱导开花延迟或抑制开花可用于增强诸如苜蓿之类的饲料作物的产量。用于测量花发育的这种发育改变的方法是本领域已知的。参见例如 Mouradov, 等人, (2002) *The Plant Cell* S111-S130, 将该文献以引用的方式并入本文。

[0215] 如上面所论述的,技术人员将会认识用于调节植物中的花发育的适当启动子。用于该实施方案的示例性启动子包括组成型启动子、诱导型启动子、苗优选的启动子、花序优选的启动子。

[0216] 在其他方法中,通过增加本发明的二聚化结构域序列的水平或 / 或活性来调节花发育。这种方法可包括将二聚化结构域核苷酸序列引入植物从而增加二聚化结构域多肽的活性。在其他的方法中,引入植物中的二聚化结构域核苷酸构建体被稳定掺入植物的基因组中。增加本发明的二聚化结构域序列的表达可调节胁迫期间的花发育。这种方法在本文别处进行了描述。因此,本发明还提供了当与对照植物的花发育相比时具有受调节的花发育的植物。组合物包括具有增加的本发明二聚化结构域多肽的水平 / 活性且具有改变的花发育的植物。组合物还包括具有增加的本发明二聚化结构域多肽的水平 / 活性的植物,其中所述植物在胁迫时保持或继续开花过程。

[0217] 还提供了使用本发明的二聚化结构域来增加种子尺寸和 / 或重量的方法。该方法包括增加植物或植物部分如种子中的二聚化结构域的活性。种子尺寸和 / 或重量的增加包括种子尺寸或重量增加和 / 或一个或多个种子部分(包括例如胚芽、胚乳、种皮、糊粉或子叶)的尺寸或重量增加。

[0218] 如上面所论述的,技术人员将认识到用于增加种子尺寸和 / 或种子重量的适当启动子。该实施方案的示例性启动子包括组成型启动子、诱导型启动子、种子优选的启动子、胚优选的启动子和胚乳优选的启动子。

[0219] 降低植物中的种子尺寸和 / 或种子重量的方法包括降低该植物中的二聚化结构域活性。在一个实施方案中,通过向植物中引入包含本发明的二聚化结构域核苷酸序列的

多核苷酸、表达该二聚化结构域序列并从而修饰种子重量和 / 或大小来提供二聚化结构域核苷酸序列。在其他的实施方案中,引入植物中的二聚化结构域核苷酸构建体被稳定掺入植物的基因组中。

[0220] 还认识到,增加种子尺寸和 / 或重量可以还伴随有籽苗生长速度的增加或早期活力的增加。如本文所用,术语“早期活力”指植物在早期发育期间快速生长的能力并且涉及萌发后的成功建植、具有发育良好的根系和发育良好的光合作用器官。此外,当与对照比较时,种子尺寸和 / 或重量的增加还可导致植物产量的增加。

[0221] 因此,本发明还提供了当与对照植物比较时具有增加的种子重量和 / 或种子尺寸的植物。在其它实施方案中,还提供了具有增加的活力和植物产量的植物。在一些实施方案中,本发明的植物具有增加的本发明二聚化结构域多肽的水平 / 活性并且具有增加的种子重量和 / 或种子尺寸。在其它实施方案中,这种植物已在其基因组中稳定掺入了核酸分子,该核酸分子包含可操作地连接至驱动在该植物细胞中的表达的启动子的本发明二聚化结构域核苷酸序列。

[0222] vii. 二聚化结构域启动子多核苷酸的使用方法

[0223] 当与 DNA 构建体装配使得二聚体结构域启动子序列可操作地连接至包含所关注的多核苷酸的核苷酸序列时,包含本发明中所公开的二聚化结构域启动子的多核苷酸以及其变体和片段可用于任何宿主细胞(优选植物细胞)的遗传操纵。这样,本发明的二聚化结构域启动子多核苷酸连同所关注的多核苷酸序列一起在表达盒中提供用于在所关注的宿主细胞中表达。本发明的二聚化结构域启动子序列在含有具有二聚化结构域的细胞的多种组织中表达,因而所述启动子序列可特别是在含有该二聚化结构域的细胞中用于调节所关注的多核苷酸的时间和 / 或空间表达。

[0224] 合成的杂合启动子区是本领域已知的。这种区域包含可操作地连接至另一多核苷酸的启动子元件的一多核苷酸的上游启动子元件。在本发明的一个实施方案中,通过合成的杂合启动子控制异源序列表达,该合成的杂合启动子包含可操作地连接至来自异源启动子的上游启动子元件的本发明的二聚化结构域启动子序列或其变体或片段。涉及植物防御系统的上游启动子元件已被鉴定并可用于产生合成启动子。参见例如 Rushton 等人,(1998)Curr. Opin. Plant Biol. 1 :311-315。作为另一种选择,合成的二聚化结构域启动子序列可包含二聚化结构域启动子序列内存在的上游启动子元件的重复。

[0225] 已经认识到,本发明的启动子序列可与其天然的二聚化结构域编码序列使用。包含与其天然二聚化结构域基因可操作地连接的二聚化结构域启动子的 DNA 构建体可用于转化任何所关注的植物来引起所需的表型变化,例如调节细胞数目、调节根、苗、叶、花和胚的发育、胁迫耐受性和本文其他地方描述的任何其他表型。

[0226] 本文所公开的启动子核苷酸序列和方法可用于调控任何异源核苷酸序列在宿主植物中的表达以便改变植物表型。有多种表型变化是值得关注的,包括修饰植物中的脂肪酸组成、改变植物的氨基酸含量、改变植物的病原体防御机制等等。这些结果可通过在植物中表达异源产物或增加内源产物的表达来实现。或者,这些结果可通过在植物中减少一种或多种内源产物(特别是酶或辅因子)的表达来实现。这些改变导致转化植物的表型变化。

[0227] 所关注基因反映了作物开发的参与者的商业市场和利益。所关注作物和市场在变化,并且随着发展中国家开放了世界市场,也将会出现新的作物和技术。另外,随着我们

对农学性状和特性如产量和杂种优势的理解的增加,对用于转化的基因的选择将会相应变化。所关注基因的大体类别包括例如涉及信息的那些基因(如锌指)、涉及通信的那些基因(如激酶)和涉及看家的那些基因(如热休克蛋白)。转基因的更具体类别例如包括编码对农学、昆虫抗性、病害抗性、除草剂抗性、不育性、谷粒特征和商业产品重要的性状的基因。一般而言,所关注基因包括涉及油脂、淀粉、碳水化合物或营养物质代谢的那些以及影响仁大小、蔗糖载量等的那些。

[0228] 在某些实施方案中,可将本发明的核酸序列与所关注的其他多核苷酸序列联合(“堆叠”)使用,以便产生具有所需表型的植物。生成的组合可包括所关注多核苷酸中的任何一者或多者的多个拷贝。本发明的多核苷酸可与任何基因或基因的组合堆叠以产生具有多种所需性状组合的植物,包括但不限于对动物饲料而言理想的性状如高油脂基因(例如第 6, 232, 529 号美国专利);平衡的氨基酸(例如 hordothionin 类(第 5, 990, 389 号;第 5, 885, 801 号;第 5, 885, 802 号和第 5, 703, 409 号美国专利);大麦高赖氨酸(Williamson 等人,(1987)Eur. J. Biochem. 165 :99-106 和 WO 98/20122)和高甲硫氨酸蛋白质(Pedersen 等人,(1986)J. Biol. Chem. 261 :6279 ;Kiriwara 等人,(1988)Gene 71 :359 和 Musumura 等人,(1989)Plant Mol. Biol. 12 :123));增加的可消化性(例如经修饰的贮藏蛋白(于 2001 年 11 月 7 日提交的系列号为 10/053, 410 的美国专利申请)和硫氧还蛋白(于 2001 年 12 月 3 日提交的系列号为 10/005, 429 的美国专利申请)),将上述文献的公开内容以引用的方式并入本文。本发明的多核苷酸还可与昆虫、病害或除草剂抗性所需的性状进行堆叠(例如苏芸金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)毒蛋白(第 5, 366, 892 号、第 5, 747, 450 号、第 5, 737, 514 号、第 5723, 756 号、第 5, 593, 881 号美国专利;Geiser 等人,(1986)Gene 48 :109);凝集素(Van Damme 等人,(1994)Plant Mol. Biol. 24 :825);伏马毒素解毒基因(第 5, 792, 931 号美国专利);无毒性和病害抗性基因(Jones 等人,(1994)Science 266 :789 ;Martin 等人,(1993)Science 262 :1432 ;Mindrinos 等人,(1994)Cell 78 :1089);导致除草剂抗性的乙酰乳酸合酶(ALS)突变体,如 S4 和 / 或 Hra 突变;谷氨酰胺合酶的抑制剂,如膦丝菌素或 basta(例如 bar 基因)和草甘磷抗性(EPSPS 基因)),以及对加工或工艺产品而言理想的性状如高油脂(例如第 6, 232, 529 号美国专利);经修饰的油脂(例如脂肪酸去饱和酶基因(第 5, 952, 544 号美国专利;WO 94/11516));经修饰的淀粉(例如 ADPG 焦磷酸化酶(AGP 酶)、淀粉合酶(SS)、淀粉分支酶(SBE)和淀粉脱支酶(SDBE))和聚合物或生物塑料(例如第 5, 602, 321 号美国专利;促进聚羟基链烷酸酯(PHA)表达的 β -酮硫解酶、聚羟基丁酯合酶和乙酰乙酰辅酶 A 还原酶(Schubert 等人,(1988)J. Bacteriol. 170 :5837-5847)),将上述文献的公开内容以引用的方式并入本文。还可以将本发明的多核苷酸与影响诸如雄性不育(例如参见第 5, 583, 210 号美国专利)、茎秆强度、开花时间之类的农学性状或诸如细胞周期调控或基因打靶(例如 WO 99/61619 ;WO 00/17364 ;WO 99/25821)之类的转化技术性状的组合,将上述文献以引用的方式并入本文。

[0229] 在一个实施方案中,所关注序列可改善植物生长和 / 或作物产量。例如,所关注序列包括可导致初生根系或侧根系改善的农学上重要的基因。这类基因包括但不限于营养物质 / 水转运蛋白和生长诱导。这类基因的例子包括但不限于玉米质膜 H^+ -ATP 酶(MHA2)(Frias 等人,(1996)Plant Cell 8 :1533-44);AKT1,拟南芥属中钾摄取器的组件,(Spalding 等人,(1999)J Gen Physiol 113 :909-18);RML 基因,其激活根顶端细胞中的

细胞分裂周期 (Cheng 等人, (1995) *Plant Physiol* 108 :881) ;玉米谷氨酰胺合成酶基因 (Sukanya 等人, (1994) *Plant Mol Biol* 26 :1935-46) 和血红蛋白 (Duff 等人, (1997) *J. Biol. Chem* 27 :16749-16752 ;Arredondo-Peter 等人, (1997) *Plant Physiol*. 115 : 1259-1266 ;Arredondo-Peter 等人, (1997) *Plant Physiol* 114 :493-500 以及其中引用的参考文献)。所关注序列还可用于表达负面影响根发育的基因反义核苷酸序列。

[0230] 另外,除了利用传统的育种方法外,还可遗传改变诸如油脂、淀粉和蛋白质含量之类的农学上重要的性状。修饰包括增加油酸、饱和或不饱和油的含量、增加赖氨酸或硫的水平、提供必需氨基酸以及修饰淀粉。第 5,703,049 号、第 5,885,801 号、第 5,885,802 号和第 5,990,389 号美国专利中描述了 Hordothionin 蛋白修饰,将这些文献以引用的方式并入本文。另外的例子是第 5,850,016 号美国专利中描述的由大豆 2S 白蛋白编码的富含赖氨酸和 / 或硫的种子蛋白和 Williamson 等人, (1987) *Eur. J. Biochem.* 165 :99-106 中描述的来自大麦的胰凝乳蛋白酶抑制剂,将上述参考文献的公开内容以引用的方式并入本文。

[0231] 可通过定点诱变产生编码序列的衍生物来增加预选氨基酸在所编码的多肽中的水平。例如,编码大麦高赖氨酸多肽的基因 (BHL) 源于大麦胰凝乳蛋白酶抑制剂,参见于 1996 年 11 月 1 日提交的系列号为 08/740,682 的美国专利申请和 WO 98/20133,将这两篇文献的公开内容以引用的方式并入本文。其他蛋白质包括富含甲硫氨酸的植物蛋白如来自向日葵籽 (Lilley 等人, (1989) *Proceedings of the World Congress on Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feedstuffs*, Applewhite (编辑) (American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois), 第 497-502 页,将该文献以引用的方式并入本文);玉米 (Pedersen 等人, (1986) *J. Biol. Chem.* 261 :6279 ;Kiriara 等人, (1988) *Gene* 71 :359,将这两篇文献均以引用的方式并入本文) 和水稻 (Musumura 等人, (1989) *Plant Mol. Biol.* 12 :123,将该文献以引用的方式并入本文)。其他农学上重要的基因编码胶乳、Floury 2、生长因子、种子贮藏因子和转录因子。

[0232] 昆虫抗性基因可编码针对会导致产量大跌的害虫 (如根虫、切根虫、欧洲玉米螟等) 的抗性。这类基因包括例如苏芸金杆菌毒蛋白基因 (第 5,366,892 号、第 5,747,450 号、第 5,736,514 号、第 5,723,756 号、第 5,593,881 号美国专利和 Geiser 等人, (1986) *Gene* 48 :109) 等等。

[0233] 编码病害抗性性状的基因包括:解毒基因,如对抗伏马毒素的基因 (第 5,792,931 号美国专利);无毒力 (avr) 和病害抗性 (R) 基因 (Jones 等人, (1994) *Science* 266 :789 ;Martin 等人, (1993) *Science* 262 :1432 和 Mindrinis 等人, (1994) *Cell* 78 :1089) 等等。

[0234] 抗除草剂性性状可包括编码对起到抑制乙酰乳酸合酶 (ALS) 作用的作用的除草剂,特别是磺酰胺类除草剂的抗性的基因 (例如含有导致这种抗性的突变,特别是 S4 和 / 或 Hra 突变的乙酰乳酸合酶 (ALS) 基因)、编码对抑制烯醇丙酮莽草酸磷酸合酶 (EPSPS) 的除草剂的抗性的基因 (例如草甘膦乙酰转移酶 (GAT))、编码对起到抑制谷氨酰胺合酶作用的作用的除草剂 (例如草胺膦或 basta) 的抗性的基因 (例如 bar 基因)、它们的组合或本领域已知的其他这类基因。bar 基因编码针对除草剂 basta 的抗性,nptII 基因编码对抗生素卡那霉素和遗传霉素的抗性,ALS 基因突变编码针对除草剂氯磺隆的抗性。

[0235] 不育基因也可编码在表达盒中,为物理去雄提供另选方案。可以这类方式使用的基因的例子包括雄性组织优选的基因和具有雄性不育表型的基因如 QM,其在第 5,583,210

号美国专利中进行了描述。其他基因包括激酶和编码对雄性或雌性配子体发育有毒的化合物的那些。

[0236] 谷粒品质反映在诸如饱和和非饱和的油的水平和类型、必需氨基酸的品质和数量以及纤维素的水平之类的性状中。在玉米中,修饰的hordothionin蛋白在第5,703,049号、第5,885,801号、第5,885,802号和第5,990,389号美国专利中进行了描述。

[0237] 还可在(一种或多种)基因上编码商业性状,所述基因可增加例如用于乙醇生产的淀粉,或提供蛋白质的表达。转化植物的另一重要的商业用途是生产聚合物和生物塑料,如第5,602,321号美国专利中描述的。诸如 β -酮硫解酶、PHB酶(聚羟基丁酸酯合酶)和乙酰乙酰辅酶A还原酶之类的基因(参见Schubert等人,(1988)J. Bacteriol. 170:5837-5847)可促进聚羟基链烷酸酯(PHA)的表达。

[0238] 外源产物包括植物酶和产物以及来自包括原核生物和其他真核生物在内的其他来源的那些。这类产物包括酶、辅因子、激素等等。可增加蛋白质,特别是具有改善的氨基酸分布以改善植物营养价值的修饰蛋白质的水平。这可通过表达具有提高的氨基酸含量的这类蛋白质来实现。

[0239] 参考如下非限制性实施方案可更好地理解本发明。本领域技术人员将会理解,可在不脱离本文所公开的并受权利要求书保护的发明的精神和范围的情况下实施本发明的其他实施方案。

[0240] 实施例

[0241] 实施例 1. 产量和收获指数测试 -RT810ZBS T(Intro-EF09B/GR1B5)

[0242] -PHP26963(S2a:D8MPL+S2a:CesA10)-10个事件

[0243] -PHP26998(S2a:D8mp1+Nas2:DD+S2a:CesA10)-8个事件

[0244] -PHP24843(S2a:D8MPL+NAS2:DD)-4个事件

[0245] -无效构建体(3个事件/无效)

[0246] -野生型(Intro-EF09BZTZ/GR1B5)

[0247] 2种密度

[0248] -36,000PPA(JH,MR)-产量(5个重复)

[0249] -48,000PPA(JH,MR)-产量(5个重复),收获指数(3个重复)

[0250] 以两种密度(36,000株植株/英亩(PPA)和48,000PPA,20英寸苗幅宽度)在爱荷华州的约翰斯顿(Johnston, JH)和马里昂(Marion, MR)测试了这些构建体。所测试的基因由矮秆突变型D8mp1和另外的基因(堆叠基因)DD(D8基因的二聚化结构域)或CesA10基因。下面示出了所述构建体,其中转基因事件与它们的质粒名称一起示出,无效构建体(分离的非转基因同胞)与它们的质粒名称和字母n一起示出。

[0251] 表 2

[0252]

D8mpl + DD	php24843	E7216.51.1.1
	php24843n	E7216.49.1.5
D8 + CesA	php26963	E7216.49.2.1
	php26963	E7216.49.2.2
	php26963	E7216.49.3.1
	php26963n	CN
D8+DD+CesA	php26998	E7216.50.1.1
	php26998	E7216.50.1.3
	php26998n	CN

[0253] 选择了较高的植物种群密度来确定矮秆和矮秆堆叠转基因植物与构建体无效同胞（无转基因，具有正常高度）就产量和收获指数而言表现是相同还是不同。一般而言，谷类在高于最佳经济产量的种群中显示出产量的下降，使得产量水平下降。通过穗干物质/总地上部分干物质进行定义，谷类的收获指数已相对稳定，为 45 至 50%。生物量的和收获指数的增加是产量的主要决定因素，因而任一属性的积极改变可导致更高的潜在产量。

[0254] 对于所选择的不同构建体的事件，在约翰斯顿和马里昂进行了产量比较。一般而言，相比与各个转基因堆叠构建体，由于密植导致的产量水平降低在无效同胞中更明显。在某些情况下，转基因处理显示出意料不到的且增加的产量响应，特别是在爱荷华州的马里昂。这种观察现象表明，除了与这些转基因堆叠使用的那些或对农学因素（例如苗幅宽度、施肥规范或矮秆表型的最优化植物种群）的额外优化之外，用多种不同种质来源进一步育种将进一步改善产量潜力。

[0255] 测量了在 48,000PPA 的较高种群密度下的各测试物的收获指数。总体上，无效同胞的收获指数刚好在 0.5 至 0.52 之间，而转基因堆叠的大多数的收获指数在 0.54 至 0.58 的范围内。收获指数的增加可预期能更好地利用可用的土壤水分和营养物质，因为更大比例的所产生的干物质是以谷粒的形式。

[0256] 实施例 2. 产量和收获指数测试 - (Intro-EF09B/HG11)

[0257] 用 PHP26963、PHP26998 和 PHP24843 T0 植株与 HG11 雌株进行顶交。这产生了类似于市售杂种 33A14 的背景基因型，可将 33A14 用作参照。然后将这些植株在约翰斯顿观察用地中栽培。还包括了小面积栽培的 PHP17881 杂种。

[0258] -PHP26963 (S2a :D8MPL+S2a :CesA10) -2 个事件, 6 苗行

[0259] -PHP26998 (S2a :D8mpl+Nas2 :DD+S2a :CesA10) -2 个事件, 6 苗行

[0260] -PHP24843 (S2a :D8MPL+NAS2 :DD) -2 个事件, 8 苗行

[0261] -PHP17881 (S2a :D8MPL)

[0262] -野生型 (EF09B/HG11-33A14) -11 行

[0263] 将微根管插入靠近这些植株的土壤中以使得能对与管相交的根进行成像。这使得能直接测量 NAS2 :DD 堆叠构建体的根长度（图 2-5）。与非 DD 对应物相比，同等 DD 堆叠构建体在较早的时间点具有更长的根系，并且看起来在土壤中定植更快。在稍后的时间点显示，非 DD 构建体在较浅的深度处与 DD 堆叠构建体具有相似的根长，但仍未完全定植在所测量土壤的最深处。这些植株的表面积随长度成比例地增加，从而表明没有牺牲根宽度。植株高度和产量与先前对 S2a :D8MPL 构建体的观察结果一致（图 4 和表 3- 来自田间试验的高度）

[0264] 表 3

[0265]

	平均株高(m)	标准偏差(m)
33A14	2.90	0.06
PHP17881 (D8 MPL)	1.99	0.28
PHP24843 (D8/DD)	1.96	0.06
PHP26963 (D8/CES)	2.10	0.09
PHP26998 (D8/DD/CES)	1.90	0.10

[0266] 实施例 3. 温室栽培的转基因堆叠植物

[0267] 在 introEF09B 背景中在 T0 代测试了三种构建体以确定 D8 二聚化结构域堆叠植物的农学特性以及用于田间测试的准备。将每一种堆叠的构建体 (PHP24843、PHP26963 和 PHP26998) 均利用 S2A PRO :D8MPL 基因、NAS2 PRO :D8 243-331 和 / 或 S2A PRO :ZM-CES A10。

[0268] • 所测试的基因 (Intro EF09B)

[0269] -S2a :D8MPL (维管元件优选的启动子 : 中等矮秆基因)

[0270] -Nas2 :DD (根优选的启动子 : 亮氨酸拉链二聚化结构域)

[0271] -S2a :CesA10 (维管元件优选的启动子 : 茎秆组织中的纤维素合酶基因)

[0272] • 两种或三种基因的组合 (“堆叠”)

[0273] -PHP24843-NAS2 PRO :D8 243-331/S2A PRO :D8MPL 堆叠 (13 个事件)

[0274] -PHP26963-S2A PRO :ZM-CES A10/S2A PRO :D8MPL 堆叠 (15 个事件)

[0275] -PHP26998-NAS2 PRO :D8 243-331/S2A PRO :ZM-CES A10/S2APRO :D8MPL (14 个事件)

[0276] 对来自该试验的成熟 T0 植株进行形态测定分析 (图 6)。在该试验中 NAS2 PRO :D8 243-331 基因增加了叶宽度和面积。S2A PRO :ZM-CES A10 基因增加了叶角, 降低了叶长度且增加了种子数目。

[0277] 实施例 4. 温室栽培的转基因堆叠植物

[0278] 在 GS3×GF3 中的 T0 代测试了五种构建体以确定 D8 二聚化结构域逆转玉米根系的矮化的效力。每一种堆叠的构建体 (PHP24843、PHP24844 和 PHP24861) 均利用不同的根优选启动子来驱动 D8 243-331 编码序列的表达。

[0279] • 所测试的基因 (GS3×GF#)

[0280] -S2a :D8MPL (维管元件优选的启动子 : 中等矮秆基因)

[0281] -Nas2 :DD (根优选的启动子 : 亮氨酸拉链二聚化结构域)

[0282] -ZRP2. 47 PRO :D8 243-331 (根优选的启动子 : 亮氨酸拉链二聚化结构域)

[0283] -ROOTMET2 PRO :D8 243-331 (根优选的启动子 : 亮氨酸拉链二聚化结构域)

[0284] -ROOTMET2 PRO :GUSINT (根优选的启动子 : β - 葡糖醛酸酶报道基因)[0285] • 两种基因的组合 (“堆叠”)

[0286] -PHP24843-NAS2 PRO :D8 243-331/S2A PRO :D8MPL 堆叠 (25 个事件)

[0287] -PHP24844-ZRP2. 47 PRO :D8 243-331/S2A PRO :D8MPL 堆叠 (23 个事件)

[0288] -PHP24861-ROOTMET2 PRO :D8 243-331/S2A PRO :D8MPL 堆叠 (22 个事件)

[0289] -PHP17881-S2A PRO :D8MPL (矮秆对照) (14 个事件)

[0290] -PHP23206-ROOTMET2 PRO :GUSINT (实际尺寸对照) (14 个事件)

[0291] 对来自该试验的成熟 T0 植株进行形态测定分析 (图 7)。结果是根重量未显著改变。预期的根改变是根长度的改变,由于在温室盆中根生长受限所以不能测量根长度。带有 S2A PRO :D8MPL 基因的每种构建体显示出降低的株高,植株高度降低约 25-35%。茎秆重量在二聚化结构域构建体中比在仅 S2A PRO :D8MPL 中低,在 S2A PRO :D8MPL 中继而比原尺寸对照低。相比于原尺寸对照,在 PHP24844、PHP24861 和 PHP17881 中叶重量和种子数目降低;然而 PHP24843(NAS2 PRO :D8 243-331/S2A PRO :D8MPL 堆叠)保持了与全尺寸对照的那些相等的叶重量和种子数目。种子数目是产量的组分而茎秆重量是生物量的组分,从而表明 PHP24843 可增加收获指数。

[0292] 实施例 5. 温室栽培的 D8 二聚化结构域转基因植物

[0293] 在 GS3×GF3 中的第 T0 代测试了四种构建体以确定 D8 二聚化结构域以非堆叠构型在根中表达时的效果。每一种堆叠的构建体 (PHP24711、PHP24712 和 PHP24713) 均利用不同的根优选启动子来驱动 D8 243-331 编码序列的表达。

[0294] • 所测试的基因 (GS3×GF#)

[0295] -Nas2 :DD (根优选的启动子 :亮氨酸拉链二聚化结构域)

[0296] -ZRP2.47 PRO :D8 243-331 (根优选的启动子 :亮氨酸拉链二聚化结构域)

[0297] -ROOTMET2 PRO :D8 243-331 (根优选的启动子 :亮氨酸拉链二聚化结构域)

[0298] • 基因构建体

[0299] -PHP24711-ZRP2.47 PRO :D8 243-331 (25 个事件)

[0300] -PHP24712-ROOTMET2 PRO :D8 243-331 (25 个事件)

[0301] -PHP24713-NAS2 PRO :D8 243-331 (25 个事件)

[0302] -PHP24715-S2A PRO :AC-GFP1 (原尺寸对照) (25 个事件)

[0303] 对来自该试验的成熟 T0 植株进行形态测定分析 (图 8)。在 ROOTMET2 PRO :D8 243-331 和 NAS2 PRO :D8 243-331 构建体中茎秆重量和种子数目增加。

[0304] 实施例 6. 两个地点、3 种构建体的产量和收获指数试验

[0305] 用基因型“Intro EF09B/GR1B5”中的三种不同构建体以及用于比较的它们各自的无效构建体进行了产量和收获指数比较。数据在表 4 中描述。在爱荷华州的约翰斯顿和马里昂以重复实验 (5 个) 测量了产量和收获指数,种植密度为 48,000PPA,以 20 英寸苗幅宽度播种,采用随机化完全区组设计。总体上,对于每种构建体半矮秆植株高度大约为无效构建体 (CN) 的 60-70%。phP29693 和 phP26998 植株高度比 phP24843 高约 65% (高约 12 英寸)。与无效构建体相比,在约翰斯顿的产量几乎等于具有该表中所示的事件的无效构建体。在约翰斯顿收获指数显著更高。在马里昂,数种构建体 / 事件在产量上比它们各自的无效构建体高。收获指数在数值上高于并且在大多数情况中显著高于它们各自的无效构建体。与以 36,000ppa 的较低种群密度栽培时的无效构建体比较,半矮秆转基因植物在高种群密度下具有更好的产量响应。在这两个地点,对于产量 D8mp1+DD 的‘堆叠’组合不显著低于无效构建体而具有较高的收获指数。在约翰斯顿和马里昂,构建体 phP26963 中的组合具有较高的产量潜力,收获指数较高。在约翰斯顿,D8mp1+DD+CesA 10 的组合具有类似的或相等的产量和较高的收获指数,而在爱荷华州的马里昂,三基因堆叠显示出较低的产量,但收获指数较高。尽管存在显示出根和茎倒伏的某些个体栽培盆,但没有一个地点在转基因和它们的无效构建体之间具有显著差异。

[0306]

表 4

基因	PHP 对照	ID 号	JH 产量	占无效构建体的百分数	JH HI (%)	MR 产量	占无效构建体的百分数	MR HI (%)
D8mp/DD	对照	E7216.51.1.1	168	95%	0.57 (110)	152	98%	0.56 (103)
		CN	177		0.51	156		0.54
		E7216.49.1.5	163	92	0.58 (114)	141	105%	0.54 (111)
D8/CesA	26963	E7216.49.2.1	172	97%	0.56 (111)	147	110%	0.58 (112)
		E7216.49.2.2	176	100%	0.56 (111)	152	113%	0.53 (104)
		E7216.49.3.1	176	99%	0.53 (104)	151	113%	0.55 (108)
D8/DD/CesA	26998	CN	177		0.51	134		0.51
		E7216.50.1.1	158	93%	0.56 (109)	133	90%	0.58 (113)
		E7216.50.1.3	168	99%	0.57 (110)	133	90%	0.54 (104)
		CN	169		0.51	149		0.52

JH=约翰斯顿 MR=马里昂 HI=收获指数

[0307] 实施例 7. 转基因植物的转化和再生

[0308] 用质粒轰击来自温室供体植株的未成熟玉米胚, 所述质粒含有可操作地连接至于旱诱导型启动子 RAB17 启动子 (Vilardell 等人, (1990) Plant Mol Biol 14:423-432) 的 Zm 二聚化结构域序列和赋予针对除草剂双丙氨膦的抗性的选择性标记基因。作为另外一种选择, 在单独的质粒上提供该选择性标记基因。如下进行转化。培养基配方见下文。

[0309] 靶标组织的制备:

[0310] 将穗去壳并在 30% Clorox® 漂白剂加 0.5% Micro 去污剂中表面灭菌 20 分钟, 然

后用无菌水漂洗两次。将未成熟胚切下,并以胚轴一侧朝下(盾片一侧朝上)放置,每板 25 个胚,在 560Y 培养基上放置 4 小时,然后在 2.5cm 靶区内排成一行准备进行轰击。

[0311] DNA 的制备:

[0312] 制备质粒载体,该质粒载体包含可操作地连接至泛素启动子的二聚化结构域序列。使用如下的 CaCl_2 沉淀程序将该质粒 DNA 加上含有 PAT 选择性标记的质粒 DNA 沉淀于 $1.1 \mu\text{m}$ (平均直径) 的钨小球上:

[0313] 100 μl 制备的钨粒子水溶液

[0314] 10 μl Tris EDTA 缓冲液中的 (1 μg)DNA (1 μg 总 DNA)

[0315] 100 μl 2.5M CaCl_2

[0316] 10 μl 0.1M 亚精胺

[0317] 将每种试剂依序加到钨粒子悬浮液,同时保持在复式管涡旋机上。将最终的混合物进行短暂超声处理,让其在恒定漩涡混合下温育 10 分钟。在沉淀期后,将各管进行短暂离心,除去液体,用 500ml 100%乙醇洗涤,离心 30 秒。再次除去液体,将 105 μl 100%乙醇加至最终的钨粒子小球。对于粒子枪轰击,将钨/DNA 粒子进行短暂超声处理,并取 10 μl 点滴到每个巨载体 (macrocarrier) 的中央上,让其干燥约 2 分钟后进行轰击。

[0318] 粒子枪处理:

[0319] 将样品板在粒子枪 #HE34-1 或 #HE34-2 中以水平 #4 进行轰击。所有样品接受 650PSI 的单次射击,每管的制备粒子/DNA 共取十个等分试样。

[0320] 后续处理:

[0321] 在轰击之后,将胚保持在 560Y 培养基上 2 天,然后转移到含有 3mg/L 双丙氨膦的 560R 选择培养基,每隔 2 星期进行传代培养。在进行大约 10 个星期的选择后,将抗选择的愈伤组织克隆转移到 288J 培养基以引发植物再生。在体细胞胚成熟后 (2-4 个星期),将发育良好的体细胞胚转移到培养基中进行发芽并转移到有光照的培养室。大约 7-10 天后,将发育的小植株转移到管中的 272V 无激素培养基 7-10 天,直到小植株完全长好。然后将植株转移到含有盆栽土的盘插入孔 (相当于 2.5 英寸盆),在生长室中生长 1 星期,随后在温室中再生长 1-2 个星期,然后转移到典型的 600 个盆 (1.6 加仑) 并生长至成熟。针对增加的耐旱性对植株进行检测和评分。测量改善的耐旱性的测定法是本领域的常规工作,包括例如当与干旱条件下的对照玉米植株比较时在相同环境条件下的核仁-抽穗能力产量增加。作为另一种选择,可针对分生组织发育的调节 (即穗上小穗形成的降低) 监测转化植株。参见例如 Bruce, 等人, (2002) Journal of Experimental Botany 53:1-13。

[0322] 轰击法和培养基:

[0323] 轰击介质 (560Y) 包含 4.0g/l N6 基础盐 (SIGMA C-1416)、1.0ml/l Eriksson 维生素混合物 (1000X SIGMA-1511)、0.5mg/l 盐酸硫胺素、120.0g/l 蔗糖、1.0mg/l 2,4-D 和 2.88g/l L-脯氨酸 (用 KOH 调至 pH 5.8 后用去离子水定容); 2.0g/l Gelrite® (在用去离子水定容后加入) 和 8.5mg/l 硝酸银 (在将培养基灭菌并冷却到室温后加入)。选择培养基 (560R) 包含 4.0g/l N6 基础盐 (SIGMA C-1416)、1.0ml/l Eriksson 维生素混合物 (1000X SIGMA-1511)、0.5mg/l 盐酸硫胺素、30.0g/l 蔗糖和 2.0mg/l 2,4-D (用 KOH 调至 pH 5.8 后用去离子水定容); 3.0g/l Gelrite® (在用去离子水定容后加入) 以及 0.85mg/l 硝酸银和 3.0mg/l 双丙氨膦 (两者均在将培养基灭菌并冷却到室温后加入)。

[0324] 植物再生培养基 (288J) 包含 4.3g/l MS 盐 (GIBCO 11117-074)、5.0ml/l MS 维生素母液 (0.100g 烟酸、0.02g/l 盐酸硫胺素、0.10g/l 盐酸吡哆辛和 0.40g/l 甘氨酸, 用精炼去离子水定容) (Murashige 和 Skoog, (1962) *Physiol. Plant.* 15 :473)、100mg/l 肌醇、0.5mg/l 玉米素、60g/l 蔗糖和 1.0ml/l 的 0.1mM 脱落酸 (在调至 pH 5.6 后用精炼去离子水定容); 3.0g/l Gelrite® (在用去离子水定容后加入) 以及 1.0mg/l 吲哚乙酸和 3.0mg/l 双丙氨膦 (在将培养基灭菌并冷却到 60°C 后加入)。无激素培养基 (272V) 包含 4.3g/l MS 盐 (GIBCO 11117-074)、5.0ml/l MS 维生素母液 (0.100g/l 烟酸、0.02g/l 盐酸硫胺素、0.10g/l 盐酸吡哆辛和 0.40g/l 甘氨酸, 用精炼去离子水定容)、0.1g/l 肌醇和 40.0g/l 蔗糖 (在调至 pH 5.6 后用精炼去离子水定容) 和 6g/l bacto™ 琼脂 (在用精炼去离子水定容后加入), 灭菌并冷却至 60°C。

[0325] 实施例 8. 农杆菌介导的转化

[0326] 对于用本发明的 Zm 二聚化结构域序列的反义序列对玉米进行农杆菌介导的转化, 优选的是采用 Zhao 的方法 (第 5, 981, 840 号美国专利和 PCT 专利公布 W098/32326, 藉此以引用的方式将这两篇参考文献的内容引入本文)。简单而言, 从玉米分离出未成熟胚并使胚与农杆菌的悬浮液接触, 其中该细菌能够将二聚化结构域序列转移到至少一个未成熟胚的至少一个细胞 (步骤 1: 感染步骤)。在该步骤中, 优选将未成熟胚浸入农杆菌悬浮液中用于开始接种。将胚与农杆菌共培养一段时间 (步骤 2: 共培养步骤)。优选地, 在感染步骤之后, 将未成熟胚在固体培养基上培养。在这个共培养期之后, 可设想任选的“静息”步骤。在该静息步骤中, 将胚在至少一种已知能抑制农杆菌生长的抗生素的存在下进行温育, 不添加植物转化体的选择剂 (步骤 3: 静息步骤)。优选将未成熟胚在固体培养基上与抗生素一起培养, 但不加选择剂, 用于消除农杆菌以及为了受感染细胞的静息期。接着, 将接种的胚在含有选择剂的培养基上进行培养, 回收生长出的转化愈伤组织 (步骤 4: 选择步骤)。优选地, 将未成熟胚在固体培养基上与选择剂一起进行培养, 从而导致转化细胞的选择性生长。然后将愈伤组织再生成植株 (步骤 5: 再生步骤), 并优选将在选择性培养基上生长的愈伤组织在固体培养基上进行培养以再生出植株。针对分生组织发育的调节对植株进行监测并评分。例如, 对苗和花分生组织的尺寸和外观的改变和 / 或叶、花和 / 或果实的产量增加进行监测。

[0327] 实施例 9. 甘蔗转化

[0328] 该方案描述了用于产生转基因甘蔗品系的常规条件。相同的条件对于在轰击进甘蔗胚性愈伤组织中后瞬时表达的细胞的数目而言接近最佳。还可参见 Bower 等人, (1996)。Molec Breed 2:239-249; Birch 和 Bower, (1994). Principles of gene transfer using particle bombardment. In Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, Yang 和 Christou 编辑 (New York: Oxford University Press), 第 3-37 页以及 Santosa 等人, (2004), Molecular Biotechnology 28:113-119, 将上述参考文献以引用的方式并入本文。

[0329] 甘蔗转化规程:

[0330] 1. 在轰击前 4 天, 在 MSC3 上对愈伤组织进行传代培养:

[0331] (a) 将活跃生长的胚性愈伤组织 (主要为球状原胚状体而不是更晚的分化阶段) 用于轰击以及通过随后的选择阶段。

[0332] (b) 在传代培养时将愈伤组织分成直径约 5mm 的小块并用镊子在琼脂表面产生小

坑,用于每块转化的愈伤组织块。

[0333] (c) 在 28°C 下在深 (25mm) 培养皿中暗处温育,使用微孔带密封件用于进行气体交换。

[0334] 2. 将胚性愈伤组织块放置在 MSC30sm 培养基上的圆圈 (约 2.5cm 直径) 中。温育 4 小时,然后轰击。

[0335] 3. 将 0.7 μm 直径的钨 (M-10 等级, Bio-Rad#165-2266) 在无水乙醇中灭菌。涡旋该悬浮液,然后在微量离心机中将钨离心约 30 秒。抽去上清液并将粒子以相同的浓度再悬浮于无菌 H₂O 中。用无菌 H₂O 重复该洗涤步骤两次并彻底再悬浮粒子,然后将 50 μl 等分试样转移进微量离心管中。

[0336] 4. 添加沉淀混合物组分:

	组分 (母液)	要添加的体积	混合物中的终浓度
	钨 (100 μg/μl 水溶液)	50 μl	38.5 μg/μl
[0337]	DNA (1 μg/μl)	10 μl	0.38 μg/μl
	CaCl ₂ (2.5M 水溶液)	50 μl	963 mM
	亚精胺游离碱 (0.1M 水溶液)	20 μl	15 mM

[0338] 5. 让混合物立在冰上 5 分钟。在这期间,完成下面的步骤 6-8。

[0339] 6. 通过用乙醇擦拭 '基因枪' 靶室的内部进行消毒,让其干燥。

[0340] 7. 调节氦气筒处的出口压力至所需的轰击压力。

[0341] 8. 调节螺线管定时器至 0.05 秒。使足够的氦气通过以从供气管线除去空气 (2-3 次脉冲)。

[0342] 9. 在冰上 5 分钟后,从沉积的沉淀混合物移出 (并弃去) 100 μl 上清液。

[0343] 10. 将粒子在剩余的溶液中充分分散。

[0344] 11. 立即将 4 μl 分散的钨-DNA 制备物置于 13mm 塑料注射过滤器夹具中的支撑网的中央。

[0345] 12. 将过滤起夹持器附接至靶室中的氦气出口。

[0346] 13. 用无菌保护网替换靶组织上的封盖。将样品放置进靶室内,保持居中在粒子源下 16.5cm,关闭门。

[0347] 14. 打开通向真空源的阀门。当室内真空达到 28 英寸汞柱时,按下按钮以施加加速气体脉冲,该脉冲将粒子排放进入靶室中。

[0348] 15. 关闭通向真空源的阀门。让空气通过灭菌过滤器慢慢返回至靶室内。打开门,用无菌封盖覆盖样品并从室内移出样品。

[0349] 16. 对于连续的靶板,使用相同的沉淀混合物、过滤器和网重复步骤 10-15。

[0350] 17. 在轰击后大约 4 小时,将愈伤组织块从 MSC30sm 转移至 MSC3。

[0351] 18. 在射击后两天,将愈伤组织转移至选择培养基上。在该转移过程中,将愈伤组织分成直径约 5mm 的块,在整个选择过程中每一块保持分离。

[0352] 19. 以 2-3 周的间隔对愈伤组织块进行传代培养。

[0353] 20. 当愈伤组织块生长至直径约 5 至 10mm (通常是轰击后 8 至 12 周) 时,转移至光照下的 28°C 再生培养基上。

[0354] 21. 当再生的苗为 30-60mm 高具有若干发育良好的根时,将它们转移进盆栽混合物 (potting mix) 中,保持惯例的警惕防止机械损伤、病原体攻击和干燥作用,直至在温室

中确立小植株。

[0355] 实施例 10. 大豆胚芽转化

[0356] 如下所述,用含有可操作地连接至泛素启动子的二聚化结构域序列的质粒轰击大豆胚芽。为诱导体细胞胚,将从大豆栽培种 A2872 的经表面灭菌的不成熟种子切取的 3-5mm 长的子叶在适当的琼脂培养基中,在 26°C 下在光照或黑暗中培养六到十周。然后切取产生次级胚的体细胞胚并置于合适的液体培养基中。在反复选择作为早期球状阶段的胚繁殖的体细胞胚的簇之后,如下所述维持悬浮物。

[0357] 大豆胚发生悬浮培养物可在旋转振荡器上在 150rpm、26°C 下维持在 35ml 液体培养基中,以荧光灯按 16 : 8 小时白日 / 黑夜时间表进行维持。每隔两周,通过将大约 35mg 的组织接种到 35ml 的液体培养基中,将培养物进行传代培养。

[0358] 可然后通过粒子枪轰击方法 (Klein 等人, (1987) Nature (London) 327 :70-73、第 4, 945, 050 号美国专利) 转化大豆胚发生悬浮培养物。可使用 Du Pont Biolistic PDS1000/HE 仪器 (氦改型) 进行这些转化。

[0359] 可用于促进大豆转化的选择性标记基因,是由来自花椰菜花叶病毒的 35S 启动子 (Ode11 等人, (1985) Nature 313 :810-812)、来自质粒 pJR225 (来自大肠杆菌; Gritz 等人, (1983) Gene 25 :179-188) 的潮霉素磷酸转移酶基因和来自根瘤农杆菌的 Ti 质粒的 T-DNA 的胭脂碱合酶基因的 3' 区所组成的转基因。包含可操作地连接至泛素启动子的二聚化结构域正义序列的表达盒,可作为限制性片段分离。然后将这个片段插入携带标记基因的载体的独特限制性酶切位点中。

[0360] 向 50 μ l 的 60mg/ml 1 μ m 金颗粒悬浮液加入 (按顺序) : 5 μ l DNA (1 μ g / μ l)、20 μ l 亚精胺 (0. 1M) 和 50 μ l CaCl₂ (2. 5M)。然后将粒子制备物搅动三分钟,在微量离心机中离心 10 秒,移除上清液。然后将 DNA 包被的粒子在 400 μ l 70% 乙醇中洗涤一次并再悬浮于 40 μ l 无水乙醇中。可将 DNA / 粒子悬浮液超声处理三次,每次 1 秒。然后将五微升 DNA 包被的金粒子加载至每个巨载体盘上。

[0361] 将大约 300-400mg 两周龄悬浮培养物置于空的 60 \times 15mm 培养皿中,用移液管将残余液体从组织移除。对于每次转化实验,通常轰击大约 5-10 个板。将膜破裂压力设定为 1100psi,将室抽至 28 英寸汞柱的真空。将组织距离阻滞屏 (retaining screen) 大约 3. 5 英寸放置,轰击三次。轰击后,可将组织一分为二并放回进液体中,如上所述进行培养。

[0362] 轰击后五至七天,可将液体培养基与新鲜培养基交换,轰击后七至十二天与含有 50mg/ml 潮霉素的新鲜培养基交换。可每周更新这个选择培养基。轰击后七至八周,可观察到绿色的转化组织从未转化的坏死的胚发生簇长出来。移出分离的绿色组织并接种进单独的烧瓶中以产生新的、克隆繁殖的、转化的胚发生悬浮培养物。可将每一新品系当作独立的转化事件。然后将这些悬浮物传代培养,并作为未成熟胚簇维持或者通过使各单独体细胞胚成熟和发芽而再生成完整植株。

[0363] 实施例 11. 向日葵分生组织转化

[0364] 如下所述,用含有可操作地连接至泛素启动子的二聚化结构域序列的表达盒转化向日葵分生组织 (另参见第 EP 0 486233 号欧洲专利 (其以引用方式并入本文) 和 Malone-Schoneberg 等人, (1994) Plant Science 103 :199-207)。用单小麦头脱粒机 (single wheat-head thresher) 将成熟的向日葵种子 (*Helianthus annuus* L.) 脱壳。将

种子在 20% Clorox®漂白溶液中进行表面灭菌 30 分钟,每 50ml 溶液加入两滴 Tween®20。将种子在无菌蒸馏水中清洗两次。

[0365] 通过 Schrammeijer 等人所提出的程序 (Schrammeijer 等人, (1990) Plant Cell Rep. 9 :55-60) 的修改方案,制备分裂胚轴外植体。在表面灭菌程序后,将种子在蒸馏水中浸 60 分钟。然后将每个种子的子叶折断,在胚轴的平面产生整齐的断裂。在切除根尖后,将外植体在初叶之间纵向对切。将两半以切面朝上放在 GBA 培养基上,该培养基的组成为: Murashige 和 Skoog 矿物质元素 (Murashige 等人, (1962) Physiol. Plant., 15 :473-497)、Shepard 维生素添加物 (Shepard (1980) in Emergent Techniques for the Genetic Improvement of Crops (University of Minnesota Press, St. Paul, Minnesota)、40mg/l 硫酸腺嘌呤、30g/l 蔗糖、0.5mg/l 6-苄基-氨基嘌呤 (BAP)、0.25mg/l 吲哚-3-乙酸 (IAA)、0.1mg/l 赤霉素 (GA₃), pH 5.6 和 8g/l Phytagar。

[0366] 外植体在进行农杆菌处理之前先进行微粒轰击 (Bidney 等人, (1992) Plant Mol. Biol. 18 :301-313)。将三十至四十个外植体放在 60×20mm 板的中央的圆圈中进行这个处理。将大约 4.7mg 的 1.8mm 钨微射弹悬浮在 25ml 的无菌 TE 缓冲液 (10mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 中,每次轰击使用 1.5ml 等分试样。每个板通过 150mm nytex 屏轰击两次,该屏在 PDS 1000®粒子加速装置中放置在样品上方 2cm 处。

[0367] 在所有的转化实验中使用解除武装的 (disarmed) 根瘤农杆菌菌株 EHA105。如 Holsters 等人, (1978) Mol. Gen. Genet. 163 :181-187 所述,通过冷冻-解冻将包含有可操作地连接至泛素启动子的二聚化结构域基因的表达盒的二元质粒载体引入到农杆菌菌株 EHA105 中。此质粒还包含卡那霉素选择性标记基因 (即 nptII)。将植物转化实验用的细菌在液体 YEP 培养基 (10g/l 酵母膏、10g/l Bacto®蛋白胨和 5g/l NaCl, pH 7.0) 中生长过夜 (28°C 和 100RPM 连续搅拌),该培养基含有细菌菌株和二元质粒维持所需要的适当抗生素。当悬浮液达到约 0.4-0.8 的 OD₆₀₀ 时使用。使农杆菌细胞沉淀并将其以 0.5 的最终 OD₆₀₀ 重悬于由 12.5mm MES pH 5.7、1g/l NH₄Cl 和 0.3g/l MgSO₄ 组成的接种培养基中。

[0368] 将刚轰击的外植体放在农杆菌悬浮液中,混合并让其不受干扰地放置 30 分钟。然后将外植体转移到 GBA 培养基,并以切面朝下在 26°C 下进行共培养 18 小时。在三天的共培养后,将外植体转移到 374B (缺乏生长调节物且蔗糖含量减低为 1% 的 GBA 培养基),该 374B 补加有 250mg/l 头孢噻肟和 50mg/l 硫酸卡那霉素。将外植体在选择上培养两到五周,然后转移到缺乏卡那霉素的新鲜 374B 培养基进行一到两周的连续发育。将具有分化的、耐抗生素的生长区域 (未产生适合切除的苗) 的外植体转移到含有 250mg/l 头孢噻肟的 GBA 培养基进行第二次 3 天植物激素处理。对得自绿色的耐卡那霉素的苗的叶样品,通过 ELISA 分析是否存在 NPTII,并通过分析分生组织发育的调节 (即苗和花分生组织的大小和外观的改变) 来分析是否存在转基因表达。

[0369] 将 NPTII 阳性苗嫁接到 Pioneer® hybrid 6440 试管生长的向日葵苗根茎。使经表面灭菌的种子在 48-0 培养基 (半浓度 Murashige 和 Skoog 盐、0.5% 蔗糖、0.3% gelrite®, pH 5.6) 中发芽,并在对外植体培养所描述的条件下生长。移除苗的上部分,在下胚轴中作出 1cm 垂直切片,并将转化的苗插入到切口中。将整个区域用 parafilm®包裹以对苗进行保护。在体外培养一周后,可将嫁接的植株转移到土壤。将土壤中的嫁接物维持在高湿度条件下,然后慢慢适应温室环境。在温室中成熟的 T₀ 植株 (亲代) 的转化部分通过 NPTII

ELISA 和 / 或通过对叶提取物的二聚化结构域活性分析进行鉴定, 而从 NPTII 阳性 T₀ 植株收获的转基因种子通过对小部分干种子子叶的二聚化结构域活性分析进行鉴定。

[0370] 另选的向日葵转化方案使得可以不使用化学选择压力就能恢复转基因后代。将种子脱壳并在 20% Clorox® 漂白溶液中进行表面灭菌 20 分钟, 每 100ml 溶液加入两到三滴 Tween® 20, 然后用蒸馏水清洗三次。将经灭菌的种子在用水湿润的滤纸上在暗处 26°C 下吸水 20 小时。移除子叶和根, 将分生组织外植体在 374E (由 MS 盐、Shepard 维生素、40mg/1 硫酸腺嘌呤、3% 蔗糖、0.5mg/1 6-BAP、0.25mg/1 IAA、0.1mg/1 GA 和 0.8% Phytagar (pH 5.6) 组成的 GBA 培养基) 上黑暗培养 24 小时。移除初生叶以暴露出顶端分生组织, 将大约 40 个外植体以圆形顶部朝上放在 374M (含有 1.2% Phytagar 的 GBA 培养基) 的中央的 2cm 圆圈中, 然后在培养基上在暗处培养 24 小时。

[0371] 将大约 18.8mg 的 1.8 μm 钨粒子重悬在 150 μl 无水乙醇中。超声处理后, 取 8 μl 滴在巨载体的表面的中央上。每个板用在第一架子中在 26mm Hg 的氦枪真空下用 650psi 保险片 (rupture disc) 轰击两次。

[0372] 如之前所述通过冷冻 - 解冻将目的质粒引入到根瘤农杆菌菌株 EHA105 中。将在液体 YEP 培养基 (10g/1 酵母膏、10g/1 Bacto® 蛋白胨和 5g/1 NaCl, pH 7.0) 中在 50 μg/1 卡那霉素存在下在 28°C 过夜生长的细菌的沉淀重悬于接种培养基 (12.5mm 2-mM 2-(N-吗啉代) 乙磺酸、MES、1g/1 NH₄Cl 和 0.3g/1 MgSO₄ (pH 5.7)), 以达到 4.00D₆₀₀ 的最终浓度。将经粒子轰击的外植体转移到 GBA 培养基 (374E), 并将一小滴细菌悬浮液直接放置到分生组织的顶部上。将外植体在培养基上进行共培养 4 天, 然后将外植体转移到 374C 培养基 (具有 1% 蔗糖而不含 BAP、IAA、GA3 且补加 250 μg/ml 头孢噻肟的 GBA)。将小植株在培养基上在 16 小时白日和 26°C 温育的条件下培养约两周。

[0373] 对来自 374C 培养基中的两星期培养物的外植体 (大约 2cm 长) 筛选分生组织发育的调节 (即苗和花分生组织的大小和外观的改变)。鉴定了阳性 (即二聚化结构域表达的变化) 外植体后, 弃去未显示二聚化结构域活性的改变的苗, 将每个阳性外植体再分成节外植体。一个节外植体含有至少一个潜在的节。将各节段在 GBA 培养基上培养三到四天以促进从每个节形成腋芽。然后将它们转移到 374C 培养基并让其再发育四周。分离发育中的芽, 在 374C 培养基上在培养四周。通过适当的蛋白质活性测定法, 对来自每个新恢复的苗的集中在一起的叶样品再次进行筛选。此时, 从单个节恢复的阳性苗将通常已富集了在节培养之前在初始测定中检测到的转基因部分。

[0374] 将二聚化结构域表达的改变呈阳性的恢复的苗嫁接到 Pioneer® hybrid 6440 试管生长的向日葵苗根茎。根茎按以下方式制备。将种子脱壳并在 20% Clorox® 漂白溶液中进行表面灭菌 20 分钟, 每 100ml 溶液加入两到三滴 Tween® 20, 然后用蒸馏水清洗三次。使经灭菌的种子在用水湿润的过滤器上发芽三天, 然后将它们转移到 48 培养基 (半浓度 MS 盐、0.5% 蔗糖、0.3% gelrite®, pH 5.0) 中, 在 26°C 下暗处生长三天, 然后在 16 小时白日培养条件下进行温育。移除选定的籽苗的上部分, 在每个下胚轴中作出垂直切片, 并将转化的苗插入到 V 形切口中。将切割区域用 parafilm® 包裹。在培养基上培养一周后, 将嫁接的植株转移到土壤。在前两周, 将它们维持在高湿度条件下以使其适应温室环境。

[0375] 实施例 12. 农杆菌介导的草转化

[0376] 可按照 Luo 等人, (2004) Plant Cell Rep (2004) 22 :645-652 的农杆菌介导转化对

草植株进行转化。

[0377] 材料和方法

[0378] 植株材料

[0379] 可使用由 Turf-Seed (Hubbard, Ore.) 供应的本特草 (*Agrostis stolonifera* L., cv. Penn-A-4) 的市售栽培种。将种子在 4℃ 下保藏备用。

[0380] 细菌菌株和质粒

[0381] 使用含有 3 种质粒中的一种的农杆菌菌株。一种质粒包括 pUbi-gus/Act1-hyg 构建体, 其由驱动含内含子的 b- 葡糖醛酸酶 (GUS) 报道基因的玉米泛素 (ubi) 启动子和驱动潮霉素 (hyg) 抗性基因的水稻肌动蛋白 1 启动子组成。另两种 pTAP-arts/35S-bar 和 pTAP-barnase/Ubi-bar 构建体是这样的载体, 其含有驱动水稻绒毡层特异性反义基因 rts (Lee 等人, (1996) *Int Rice Res Newsl* 21 :2-3) 或核糖核酸酶基因 barnase (Hartley, (1988) *J Mol Biol* 202 :913-915) 的水稻绒毡层特异性启动子, 该启动子连接到驱动作为选择性标志物的除草剂抗性的 bar 基因的花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CaMV 35S) 或水稻 ubi 启动子 (Huq 等人, (1997) *Plant Physiol* 113 :305)。

[0382] 胚性愈伤组织和农杆菌介导的转化的诱导

[0383] 用砂纸将成熟种子脱壳, 在 10% (v/v) Clorox® 漂白剂 (6% 次氯酸钠) 加 0.2% (v/v) Tween® 20 (聚山梨醇酯 20) 中剧烈搅拌下进行表面灭菌 90 分钟。在无菌蒸馏水中清洗五次后, 将种子放到愈伤组织诱导培养基上, 该培养基含有 MS 基础盐和和维生素 (Murashige 和 Skoog, (1962) *Physiol Plant* 15 :473-497)、30g/l 蔗糖、500mg/l 酪蛋白水解物、6.6mg/l 3,6- 二氯 -o- 大茴香酸 (dicamba)、0.5mg/l 6- 苄基氨基嘌呤 (BAP) 和 2g/l Phytigel。将培养基的 pH 调至 5.7, 然后在 120℃ 下高压灭菌 20 分钟。将含有制备的种子外植体的培养板在室温下暗处存放 6 周。目视选择胚发生愈伤组织, 将其在进行共培养之前在新鲜的愈伤组织诱导培养基上室温下暗处进行传代培养 1 周。

[0384] 转化

[0385] 转化过程分为五个相连续的步骤: 农杆菌感染、共培养、抗生素处理、选择和植株再生。在进行农杆菌感染前一天, 将胚性愈伤组织分成 1 至 2mm 的片, 放在含有 100 μM 乙酰丁香酮的愈伤组织诱导培养基上。然后将农杆菌悬浮液 (660nm 处 OD = 1.0) 的 10ml 等份试样施加到每片愈伤组织, 接着在 25℃ 下暗处进行共培养 3 天。对于抗生素处理步骤, 然后将愈伤组织转移到愈伤组织诱导培养基加 125mg/l 头孢噻肟和 250mg/l 羧苄西林 (用以抑制细菌生长) 上并进行培养 2 周。随后, 对于选择, 将愈伤组织转移到含有 250mg/l 头孢噻肟和 10mg/l 草胺膦 (PPT) 或 200mg/l 潮霉素的愈伤组织诱导培养基保持 8 周。抗生素处理和整个选择过程都在室温下在暗处进行。选择过程中的传代代培养间隔通常为 3 周。对于植株再生, 首先将增殖的 PPT 抗性或潮霉素抗性愈伤组织转移到补加有头孢噻肟、PPT 或潮霉素的再生培养基 (MS 基础培养基、30g/l 蔗糖、100mg/l 肌醇、1mg/l BAP 和 2g/l Phytigel)。将这些愈伤组织在室温下保持在暗处 1 周, 然后转移到光线中 2-3 周以使苗发育。然后分离小苗, 将其转移到含有 PPT 或潮霉素和头孢噻肟的无激素再生培养基以促进根生长, 同时维持选择压力和抑制任何残余的农杆菌细胞。然后将具有发育良好的根的小植株 (3-5 周) 转移到土壤, 在温室中或田地中进行生长。

[0386] GUS 活性染色

[0387] 通过如 Jefferson, (1987) Plant Mol Biol Rep 5:387-405 中所述, 用 1mm 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶基 -b-d- 葡糖醛酸 (X-Gluc, Biosynth, Staad, 瑞士) 进行组织化学染色, 分析转化的愈伤组织中的 GUS 活性。将从选择存活下来的潮霉素抗性愈伤组织在 100 μ l 含有 X-Gluc 的反应缓冲液中 37°C 温育过夜。然后通过摄影记录 GUS 表达。

[0388] 转基因植株的春化处理和异型杂交

[0389] 将转基因植株在户外维持在防护苗圃中 (3-6 个月), 直到十二月冬至为止。然后将经春化的植株转移到温室并在 25°C 下按 16/8h [白日 / 光线 (人造光)] 光周期进行保持, 在它们周围是非转基因野生型植株, 这些野生型植株将它们与其他花粉来源物理分隔。植株在被转移回到温室后, 将开始开花 3-4 周。将它们与来自周围的野生型植株的花粉进行异型杂交。使从每棵单独的转基因植株收集的种子在土壤中 25°C 下发芽, 将 T1 植株在温室中生长以供进一步分析。

[0390] 种子测试

[0391] 测试转基因植株及其后代的 PPT 抗性

[0392] 评估转基因植株及其后代对草胺磷 (PPT) 的耐性, 这表示 bar 基因的功能表达。给苗喷洒两次浓度 1-10% (v/v) Finale[®] (AgrEvo USA, Montvale, N. J.), 其含有 11% 草胺磷作为活性成分。在所有喷洒处理中, 在施加 Finale[®] 后 1 周, 可清楚区分抗性苗和敏感苗。

[0393] 统计分析

[0394] 通过每 100 个受感染的胚发生愈伤组织回收到的 PPT 抗性事件的数目, 估计给定的实验的转化效率, 而再生效率则用每 100 个尝试过的事件的再生事件数目来确定。平均转化效率和再生效率基于从多个独立实验获得的数据来确定。可使用卡方检验 (Chi-square) 来确定当与来自未转化的野生型植株的花粉异型杂交时, 在 T1 后代当中所观察到的作为单一基因座的 bar 基因的遗传的分离比是否符合预期的 1 : 1 比例。

[0395] DNA 提取和分析

[0396] 基本上如 Luo 等人, (1995) Mol Breed 1:51-63 所述, 从大约 0.5-2g 的新鲜叶提取基因组 DNA。将十微克的 DNA 用 HindIII 或 BamHI 按照供应商说明书 (New England Biolabs, Beverly, Mass.) 进行消化。将各片段按大小分离通过 1.0% (w/v) 琼脂糖凝胶, 并转印到 Hybond-N+ 膜 (Amersham Biosciences, Piscataway, N. J.) 上。将通过限制性消化从 pTAP-arts/35S-bar 分离的 bar 基因用作 Southern 印迹分析的探针。如 Sambrook 等人, (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 中所述, 用 Random Priming Labeling 试剂盒 (Amersham Biosciences) 对 DNA 片段进行放射标记并将 Southern 印迹进行处理。

[0397] 聚合酶链反应

[0398] 两个被设计用来扩增 bar 基因的引物如下: 5' -GTCTGCACCATCGTCAACC-3' (SEQ ID NO:42), 其对应于 bar 基因的 5' 末端的附近, 和 5' -GAAGTCCAGCTGCCAGAAACC-3' (SEQ ID NO:43), 其对应于 bar 编码区域的 3' 末端。使用这对引物扩增 bar 基因应产生出 0.44kb 的产物。反应混合物 (25 μ l 总体积) 的组成为: 50mm KCl, 10mm Tris-HCl (pH 8.8), 1.5mm MgCl₂, 0.1% (w/v) Triton X-100, 各 200 μ M 的 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP, 0.5 μ M 的各引物、0.2 μ g 的模板 DNA 和 1U Taq DNA 聚合酶 (QIAGEN, Valencia, CA)。扩增是在 Stratagene Robocycler Gradient 96 热循环仪 (La Jolla, CA) 中进行, 该热循环仪设定为: 94°C 1 分

钟（变性）、55℃ 2 分钟（杂交）、72℃ 3 分钟（延伸），25 个循环，最后延伸步骤在 72℃ 下 10 分钟。在 1.5%（w/v）琼脂糖凝胶上分离 PCR 产物，通过用溴化乙锭染色进行检测。

[0399] 实施例 13. 植株表征分析 - 温室

[0400] 用两个构建体加比较对照进行温室实验。它们都具有 35s::BAR 作为选择性标志物。Php37407 含有 S2A PRO::D8 MPL+F3.7 PRO::CESA4+FTM1 PRO::DD+NAS2 PRO::DD。Php39175 含有 S2A PRO::D8 MPL S89T(ALT4)。对于每个构建体，种植了 10 个事件。预期有相等数目的阳性和阴性植株（每周 4 株 × 4 周）。由于温室生长条件和随后额外的种植，各样品的结果为：

[0401] 对于 php37407 :28 株阳性植株来自 10 个事件，24 株阴性同胞植株来自 9 个事件。

[0402] 对于 php39175 :25 株阳性植株来自 8 个事件，29 株阴性同胞植株来自 10 个事件。

[0403] 对每一株植株进行观察，并记录测量结果。所收集的数据包括：植株高度、叶宽度和叶长度（穗节的叶 -2、+2、+4）、中心雄花穗测量值（绝对值和归一化到高度）、花粉囊外露长度、雄花穗评分（1-9 :1 为极小，无分支 ;5 为平均大小，大约有 6 个分支，9 为极大，有 20 个或更多个分支）、花粉评分（1-5 :低到高，为收集的花粉的测量值，每个单位相当于在 0.25 英寸宽的装置中 0.7" 的收集的花粉）和叶计数。

[0404] 对各植株的最终分析表明，含有二聚化结构域的堆叠的 php37407 构建体对 php39175 植株中显示的矮秆基因的表型具有缓和作用。与 php39175 相比，php37407 的植株高度增加 8.8%。用 php37407 中的堆叠，php39175 中的矮秆基因的叶宽度的增加和叶长度的减少也得到缓和。在 php37407 植株中，在穗下方两个节处的叶的叶宽度减少 6%，在穗上方两个节处的叶的叶宽度减少 4.2%，而在穗上方四个节处的叶的叶宽度减少 5.4%。php37407 植株的叶长度，在穗下方两个节处和上方两个节处分别增加 2.7% 和 2.8%，而对于在穗上方四个节处的叶没有显示差异。另外，与 php39175 样品相比，php37407 样品的中心雄花穗的绝对长度增加 3%。在 php37407 中，雄花穗长度与高度的百分比降低 6.4%，缓和了矮秆基因的作用以增加与植物植株高度相比的相对雄花穗长度。此外，在各样品的代表性子集上，php37407 植株的外露花粉囊长度（包括花丝加花粉囊）与 php39175 花粉囊相比增加 9.9%。此外，叠堆的 php37407 植株中通过温室获得的雄花穗评分指数（1-9）显示 9.5% 的增加。在各样品的代表性子集上，花粉评分指数（1-5）在各样品之间没有显示差异。php37407 和 php39175 之间叶计数也相似，且发现与它们的阴性同胞植株相比每植株大一个节。总之，php37407 植株中基因的堆叠显示了对 php39175 样品中的矮秆基因表型的缓和作用。缓和矮秆基因的作用包括但不限于：增加植株高度和雄花穗大小、叶长度和花粉囊外露。

[0405] 实施例 14. 拟南芥二聚化结构域研究

[0406] 用含有驱动二聚化结构域（DD）的表达的组成型启动子或组织优选的启动子的构建体转化拟南芥植株生态型。用农杆菌介导的转化方法对植株进行转化，通过除草剂抗性选择阳性转化体。使转基因拟南芥植株在富含营养物的土壤在温室条件下生长。收集种子以测定转基因植株和对照植株之间产量或产量相关性状的改进。对照植株为含有无所述启动子和二聚化结构域的载体骨架的阳性转化体。有效的转基因事件是那些在正常生长条件下显示产量或种子重量的增加的事件。

[0407] 含有驱动二聚化结构域的表达的推定叶优选的启动子的转基因植株，与对照植株

相比显示大约 22% 的种子重量增加。

[0408] 实施例 15. 根生长分析

[0409] 将转基因杂合体和野生型分离的种子种植在充满 Turface MVP 的 Custom 200C 盆中, 然后用含有 1mM KNO₃ 或 4mM KNO₃ 作为氮源以及含有全部以下其他营养物的营养溶液进行浇灌:

营养物	1mM KNO ₃	4mM KNO ₃
10x 微量营养物	400ml	400ml
KH ₂ PO ₄ 分子量 136.02	272g	272g
MgSO ₄ 分子量 120.36	963g	963g
[0410] KNO ₃ 化肥级	400g	1200g
KCl 分子量 74.55	596g	--
*CaCl ₂ 分子量 147.01	588g	588g
Sprint 330	335g	335g
	/ 100 l	/ 100 l

[0411] 加入 84ml H₂SO₄ 以降低 pH。最佳 pH 为 5-5.5。将 200ul 的营养溶液加到 3ml 自来水, 检查 pH, 应为 5-5.8。如果使用蒸馏水, 要用 10M KOH 提高 pH, 而不是降低。

[0412] * 如果使用 Ca⁺⁺ 浓度在 0.5-0.7mM 范围的自来水, 则将此数量减少到 235g。如果将 6mM 生长与任何其他营养物混合物作比较, 则将 CaCl₂ 水平保持在 588g/100l。

10x 微量营养物母液

	mg/l
15mM H ₃ BO ₃	1852m
	g
[0413] 5mM MnCl ₂ ·4H ₂ O	1980m
	g
5mM ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	2874m
	g
0.5mM CuSO ₄ ·5 H ₂ O	250mg
0.5mM H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	242mg

[0414] 在这些培养基中生长 3 周后, 通过对从最年轻的最完全扩展的叶的基部获取的至少 5 个读数取平均值, 作出 SPAD 计测量值。将植株从盆移除, 从根部洗掉 Turface, 并分离成苗和根。将这些样品干燥 (70°C 下 72 小时), 将干燥的根与苗分开进行称重。将干燥的苗磨成细粉, 用该研磨组织的样品测定总氮。对低和高氮肥力下生长的植株的绿色 (SPAD)、总植株重量、苗重量、根重量、根 / 苗比、苗氮浓度和总氮这些参数进行计算。

[0415] 植株在较低氮肥力下生长时具有较高的根 / 苗比。若植株为最小, 则用于生长玉米的农学条件具有较高的土壤硝酸盐条件。较高的土壤硝酸盐条件有助于较低的根 / 冠比, 这个根 / 冠比不有助于根对土壤的大量利用。这些在高或低氮肥力下提高根 / 冠比的转基因将很可能在生长过程早期利用较大部分的土壤而使植株生长最大化。在较高的氮肥力下根 / 冠比将较高。

[0416] 根优选的启动子如 NAS2 和二聚化结构域 (DD) 的使用能在发育早期增强根生长。根生长的变化可在用这个基因转化后在植株再生的组织培养阶段检测到, 具体而言由准备用于生根的试管中出现更多的根和更大直径的根而检测到 (Zhao 的参考文献)。表达 NAS2 : DD 的转基因种子预期将具有增强的早期根生长表型, 与组织培养实验中观察到的类似。上

述测定中的预期的表型将预期能在三周的生长周期结束时产生更大的根干重。转基因植株与非转基因植株相比,在较高的氮条件下改变了的根生长(较高)将特别合乎需要,因为土壤利用能力更大。

[0417] 实施例 16. DD(二聚化结构域)组分与中等矮秆基因(D8MPL)一起使用以改进用于草皮草应用的本特草(Agrostis stolonifera L.)。

[0418] 玉米中 S2a :D8MPL 的半矮秆特性可用来改进草皮草物种如本特草(Agrostis stolonifera L.)。具体而言,宽度增加而长度减少的更紧密的叶是合乎需要的,在玉米中观察到的深绿色叶颜色在草皮草中将特别合乎需要。除了 S2a :D8MPL 所具有的减少的叶长度外,与非转基因本特草相比根还可具有较短的长度。DD 显性阴性转基因与根优选的启动子如 NAS2 的一起使用可在转基因堆叠中进行组合,以相对于在叶中所需的更为紧密的叶表型选择性增加根生长。紧密的叶结构还将在减少维护(割草)方面具有优点,同时所施化肥的数量相似或减少。此外,DD 与根优选的启动子或特异性启动子的一起使用,与具有矮苗/叶表型的较小的根的预期相比,将增加相对的根长度和根密度。增加根长度和密度,尤其在植株发育的较早期,将有助于移植生长且还可缓和商业草皮草种植的移植生长和维护的灌溉要求。对于转基因本特草物种的非商业性家庭用途预期有类似的优点—容易移植生长,因为从苗形成根的能力强且维护更有效,体现在需要较少的割草和灌溉来维护所需的地面上草皮草(即深绿色)外观,根更深和更强大以支持叶生长和草皮质量维护。

[0419] 实施例 17 二聚化结构域序列的变体

[0420] A. 不改变所编码的氨基酸序列的二聚化结构域变体核苷酸序列

[0421] 用二聚化结构域核苷酸序列产生变体核苷酸序列,这些变体核苷酸序列所具有的开发阅读框(ORF)核苷酸序列与相应 SEQ ID NO 的起始的未改变的 ORF 核苷酸序列相比具有约 70%、75%、80%、85%、90% 和 95% 核苷酸序列同一性。这些功能变体是用标准的密码子表产生。虽然变体的核苷酸序列被改变,但开放阅读框所编码的氨基酸序列没有改变。这些变体与二聚化结构域形成缺陷性二聚体的能力有关,从而防止对 GA 的抑制性响应。

[0422] B. 二聚化结构域多肽的变体氨基酸序列

[0423] 产生了二聚化结构域多肽的变体氨基酸序列。在这个实施例中,变更一个氨基酸。具体而言,观察开放阅读框以确定适当的氨基酸变更。通过考虑蛋白质比对(与其他直系同源物或来自各种物种的其他基因家族成员的比对)来选择氨基酸进行改变。选择出这样的氨基酸,其被认为不处在高选择压力下(不高度保守),且相当容易地被具有相似的化学特性(即相似的功能侧链)的氨基酸置换。利用蛋白质比对,可对适当的氨基酸进行改变。一旦鉴别出目标氨基酸,就随后进行如下 C 部分中所述的程序。用这个方法产生了具有约 70%、75%、80%、85%、90% 和 95% 核酸序列同一性的变体。

[0424] C. 二聚化结构域多肽的另外的变体氨基酸序列

[0425] 在这个实施例中,产生出相对于参比蛋白质序列而言具有 80%、85%、90% 和 95% 同一性的人工蛋白质序列。这后一种尝试需要从比对鉴定保守区域和可变区域并然后审慎应用氨基酸置换表。这些部分将在下文中作更详细的讨论。

[0426] 大体上,根据二聚化结构域蛋白当中或其他二聚化结构域多肽当中的保守区域,作出哪些氨基酸序列要进行改变的决定。基于序列比对,二聚化结构域多肽的可能进行改变的不同区域以小写字母表示,而保守区域以大写字母表示。应认识到,可在以下保守区域

中作出保守置换而又不改变功能。另外,本领域技术人员将认识到,本发明的二聚化结构域序列的功能变体可在保守结构域中具有微小的非保守氨基酸改变。

[0427] 然后产生出与原始蛋白质序列相差在 80-85%、85-90%、90-95%和 95-100%同一性范围内的人工蛋白质序列。目标定在这些范围的中点,正负偏差近似幅度例如为 1%。氨基酸置换将通过定制的 Perl 脚本来实现。置换表在下表 5 中提供。

[0428] 表 5. 置换表

氨基酸	强相似的和最佳的置换	改变顺序排列	注释
I	L,V	1	50:50 置换
L	I,V	2	50:50 置换
V	I,L	3	50:50 置换
A	G	4	
G	A	5	
D	E	6	
E	D	7	
W	Y	8	
Y	W	9	
S	T	10	
T	S	11	
K	R	12	
R	K	13	
N	Q	14	
Q	N	15	
F	Y	16	
M	L	17	第一个甲硫氨酸不能改变
H		Na	无好的置换物
C		Na	无好的置换物
P		Na	无好的置换物

[0430] 首先,鉴定出蛋白质中不应改变的任何保守氨基酸并“作上记号”以隔离开来不作置换。起始甲硫氨酸当然将自动被加到这个名单。接着,作出改变。

[0431] H、C 和 P 在任何情况下都不改变。该改变将首先以异亮氨酸开始,从 N 端扫描至 C 端。然后是亮氨酸,如此按列表往下直至达到所需的目标。可作出中数置换 (interim number substitution),以便不造成改变的逆转。名单的顺序是 1-17,因此按需以尽可能多的异亮氨酸变化开始,然后是亮氨酸,一直到甲硫氨酸。显然,按此方式,许多氨基酸将不需要改变。L、I 和 V 将涉及两个交替的最佳置换的 50 : 50 置换。

[0432] 将变体氨基酸序列作为输出写出。用 Perl 脚本计算同一性百分数。使用这个程序,产生出与 SEQ ID NO :9 的起始的未改变的 ORF 核苷酸序列具有约 80%、85%、90%和 95%氨基酸同一性的二聚化结构域多肽变体。

[0433] 所有出版物和专利申请均以引用的方式并入本文,所引用的程度就如同每个单独的出版物或专利申请被具体地和独立地指出以引用的方式并入本文一样。

[0434] 已参考了各种具体的和优选的实施例和技术描述了本发明。但是,应理解,在保持

在本发明的精神和范围内的前提下可作出许多变化和修改。

[0001]

序列表

<110> Pioneer Hi-Bred International, Inc.

<120>使用二聚化结构域组分堆叠以调节植株构造

<130> 2403-PCT

<150> 61/228,195

<151> 2009-07-24

<150> 61/286,061

<151> 2009-12-14

<160> 43

<170> FastSEQ, Windows版本4.0

<210> 1

<211> 879

<212> DNA

<213> 紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)

<400> 1

```

aattcccatg atcttctctc cttcatcaat ggatgccatg tttcataaca ataacaccaa 60
atgtttgatg agctaccaac aattgcgcaa agactatggc taagctcgag ctcgctcgct 120
acaagtgtt gactttcaaa tacaagtttg tttttggaac accaaatatt ctacatgata 180
tttactaag ttgcgcacca ctatcaaaag attatctagg ccattattca agtaaagagt 240
gaacacgtct aagaccacaa accacaccaa atagaatagc calacatgca acatattgtg 300
caagaagtat ccaactggac tcccatgtat tclaaaacta ttttcgtaga gttaaagtta 360
tgacaaactt atcaaataaa aalltgaacg ctggacacaa actttcatct ttcaaateca 420
ccatcgteta lccataaa ttgtttgat tataacacat ctacgtaaata catttgtttt 480
gaacaatact aatttaattt tattaagtca aataacctgc ttagaaaata atccctccac 540
ctcatttaac aatttcttgt caaacacaca ccaagaaaaa aattaatgaa agagaaaaga 600
aatgaaaagg acatggagtt gaatactagc aaaattgatt gaaggaagat tcacaattga 660
aattgaaacc atttaattt ttttcgggtc cataataata aattggtaag aataaaaacc 720
cgatcaagtc cggtagagta caattccact ccaccaactc cttacttaaa cccctattta 780
taccactct catctcact cttcttccac ctctcacact ctcttctctc tctcaaaacc 840
ctcacacaaa cgctgcggtt agtgtaagaa attcaatcc 879

```

<210> 2

<211> 3237

<212> DNA

<213> 玉米 (*Zea mays*)

<400> 2

```

atggacgccg gctcgggtcac cgggtggcctc gccgcgggct cgcacatgcg ggacgagctg 60
catgtcatgc gcgcccgcga ggagccgaac gccaaagtcc ggagcgcgca cgtgaagacg 120
tgccgctgtg gcgcccgcga ggtcgggacg cgggaggacg ggcagccctt cgtggcgtgc 180
gccgagtgcg gcttccccgt ctgccggccc tgctacgagt acgagcgcag cgagggcacg 240
cagtgetgcc cgcagtgcaa caccgcctac aagcgcacga aagggtgccc gagggtggaa 300
ggggacgagg aggagggccc ggagatggac gacttcgagg acgagttccc cgccaagagc 360
cccaagaagc ctcacgagcc tgtcgcgttc gacgtctact cggagaacgg cgagcaccgg 420
gcgcagaaat ggcgacggg tggccagacg ctgtcgtctc tcaccggaag cgtcgcgggg 480
aaggacctgg aggcggagag ggagatggag gggagcatgg agtggaagga ccggatcgac 540

```

[0002]

aagtggaaga	ccaagcagga	gaagaggggc	aagctcaacc	acgacgacag	cgacgacgac	600
gacgacaaga	acgaagacga	gtacatgctg	cttgccgagg	cccacagcc	gctgtggcgc	660
aaggttccga	tcccgtcgag	catgatcaac	ccgtaccgca	tcgtcatcgt	gctccgcctg	720
gtgggtctct	gcttcttcct	caagttccgg	atcacgacgc	ccgccacgga	cgccgtgcct	780
ctgtggctgg	cgcccgatc	ctgcgagctc	tggttcgcc	tctccctggat	cctggaccag	840
ctgccaaagt	gggcgcgggt	gacgcgggag	acgtacctgg	accgcctggc	gctgcggtac	900
gaccgtgagg	gcgagggctg	ccggctgtcc	cccacgact	tcttcgctag	cacgggtggac	960
ccgctcaagg	agccgcccc	catcaccgcc	aacaccgtgc	tgctccatct	cgccgtcgac	1020
taccccgtag	accgcgtag	ctgctacgct	tccgacgacg	gcgcgtccat	gctgtctctc	1080
gacgcgctgt	ccgagaccgc	cgagttcgcg	cgccgctggg	tgcccttctg	caagaagttc	1140
gccgtggagc	cgccgcgccc	ggagttctac	ttctcgcaga	agatcgacta	cctcaaggac	1200
aaggtgcagc	cgacgttcgt	caaggagcgc	cgcccatga	agaggagta	cgaggagttc	1260
aaggtgcgca	tcaacgcgct	ggtggccaag	gcgcagaaga	agcccaggga	gggglgggtc	1320
atgcaggacg	gcacgccgtg	gcccgggaac	aacacgcgcg	accaccggg	tatgatccag	1380
gtctacctcg	gcaaccaggg	cgcgctggac	gtggagggcc	acgagctgcc	gcgectcgtc	1440
tacgtgtccc	gtgagaagcg	ccccgggtac	aaccaccaca	agaaggcggg	cgccatgaac	1500
gcgctggtgc	ggtctctcgc	cgctgctacc	aacgcgccct	tcctctca	cctcgactgc	1560
gaccactacg	tcaacaacag	caaggccgtg	cgcgaggcca	tgtcttct	catggaccgc	1620
cagctgggga	agaagctctg	ctacgtccag	ttcccgcagc	gcttcgatgg	catcgatcgc	1680
caagaccgat	acgccaaccg	caacgtctgc	ttcttcgaca	tcaacatgaa	gggctggac	1740
ggcatccagg	gcccgggtga	cgctggcagc	gggtgcgtgt	tcaaccgcca	ggcgtgtac	1800
ggctacgacc	cgccgcggcc	cgagaagcgg	cccaagatga	cgctcgactg	ctggccctcg	1860
tggtgctgct	gctgctgctg	cttcggcgccg	ggcaagcgcg	gcaaggcgcg	caaggacaag	1920
aaggcgagc	gcggcgagga	gcccgcggcg	gctctacag	gctctacag	gaagcgagc	1980
aagaaggaca	agctcggcgg	cggtcgggtg	gcccgcagca	agaaggcgg	cggtctgtac	2040
aagaagcacc	agcgcgcggt	cgagctggag	gagatcgagg	agggcctgga	gggtacgac	2100
gagctggagc	gctcctcgct	catgtcgcag	aagagcttcg	agaagcgggt	cgccagctcg	2160
cccgtgttea	tcgctccac	gctcgtcgag	gacggcgcc	tgccgcaggg	cgccgcccgc	2220
gaccccgccg	cgctcatcaa	ggaggccatc	cacgtcatca	gctgcggata	cgaggagaag	2280
accgagtggg	gcaaggagat	tgggtggatc	tatgggtcgg	tgacagagga	tatcctgacg	2340
gggttcaaga	tgcaactgccc	ggggtggaag	tccgtgtact	gcacgccgac	acggccggcg	2400
ttcaaggggt	cgccgcccc	caacttgtct	gategtctcc	accaggtgct	gcgctgggcg	2460
ctggggctccg	tggagatctt	catgagccgc	cactgcccgc	tccggtacgc	ctacggcgcc	2520
cggtcaagt	ggctggagcg	cttcgcttac	accaacacca	tcgtgtacce	cttaccctcc	2580
atcccgcctc	tcgctactg	caccatcccc	gccgtctgcc	tgctcaccgg	caagttcatc	2640
attcccacgc	tgaacaacct	cgccagcacc	tggttcatcg	cgctcttct	gtccatcatc	2700
gcgacgagcg	tccctggagct	gcggtggagc	ggggtgagca	tcgaggactg	gtggcgcaac	2760
gagcagttct	gggtcatcgg	cgccgtgtcc	gcgcatctct	tcgcccgtgt	ccagggtctc	2820
ctcaaggttc	tgggcggcgt	ggacaccagc	ttcaccgtca	cctccaaggc	ggccggcgac	2880
gagcccgagc	ccttcgggga	cctctacctc	ttcaagtgga	ccacctgct	ggtgcccccc	2940
accacgctca	tcctcatcaa	catggtgggc	atcgtggccg	gcgtgtccga	cgccgtcaac	3000
aacggctacg	gctcctgggg	cccgtctctc	ggcaagctct	tcttctctt	ctgggtcatc	3060
gtccacctct	accggttctc	caaggggctc	atggggaggc	agaaccggac	gcccaccatc	3120
gtcgtgctct	ggtccatctc	cctcgcctcc	atcttctcgc	tcgtctgggt	caggatcgac	3180
ccgtttatcc	cgaaggccaa	gggccccatc	ctcaagccat	gcggagtcca	gtgctga	3237

<210> 3

<211> 319

<212> DNA

<213>玉米

<400> 3

caacctagac	ttgtccatct	tctggattgg	ccaacttaat	taatgtatga	aataaaagga	60
tgcacacata	gtgacatgct	aatcactata	atgtgggcat	caaagttgtg	tgttatgtgt	120
aattactagt	tatctgaata	aaagagaaag	agatcatcca	tatttcttat	cctaaatgaa	180
tgtaacgtgt	ctttataatt	ctttgatgaa	ccagatgcat	ttcattaacc	aatccatata	240
acatataaat	attaatcata	tataattaat	atcaattggg	ttagcaaaac	aatctagtc	300

[0003]

taggtgtgtt ttgcgaatt 319

<210> 4
<211> 748
<212> DNA
<213> 玉米

<400> 4
catggtggca cagaatcgag ttgatgttgt agctggcggc tagggtttga agtggagaag 60
aggctccggct ggtggcatcc tategtctat tgagggttgg gtccggtggc atcatacttg 120
atgacaattg aaagtaattt taatcaactt gtcattgagta gtgagtcttt tataaaaaat 180
aagctgaaat aagcaccctt tgatgagctt ataggattat cataatctca aatgctaaat 240
tatataattt tattagataa gttgcttgtt tgtttccca ctagcttatt tacattggat 300
tatataatct acataaatta taatctcaaa caaaaaglcc ttaatcagag atcagcgagg 360
tctcacgagt gagaaggcga gagcttgtcc aaacgagcat tttcggcgt gtgaacaccc 420
atllcagcaa agccgtcgtt gtccagttca gcaagcgca ttctgcggt ttggcgtgac 480
ccattctgct agctcagcac tgagaatacg cgtccgctgc agcgttggcg tacaggccgg 540
actacattag ccaacgcgta tcggcagtg caaacctctt cgttctaac tccgctgggc 600
caccagcttt gaccgcegcc tccctcccc tccgctaetg ctctcccca cccactccc 660
ccgcaggagc ggcggcgggc gcggcgaggt cgtacccac atcggcgagc ggcggcgga 720
ccgccggagg caaaggcaag tctagaac 748

<210> 5
<211> 3234
<212> DNA
<213> 玉米

<400> 5
atggaggggc acgcgacgg cgtgaagtc gggaggcgcg gtggcggaca ggtgtgccag 60
atctgcggcg acggcgtggg caccacggcg gagggggacg tcttcgccgc ctgcgacgtc 120
tgccgggttc cgggtgtgccc cccctgctac gactacgagc gcaaggacgg cacgcaggcg 180
tgccccagc gcaagaccaa gtacaagcgc cacaaggga gcccgcgat ccgtggggag 240
gaaggagacg aactgatgc cgatagcgc tcaattacc ttgcatctgg caatgaggac 300
cagaagcaga agattgccga cagaatgcgc agctggcgca tgaacgttg gggcagcggg 360
gatgttggtc gccccagta tgacagtggc gagatcgggc ttaccaagta tgacagtgcc 420
gagattcctc ggggatacat cccatcagtc actaacagcc agatctcagg agaaatccct 480
ggtgcttccc ctgaccatca tatgatgtcc ccaacgggga acattggca gctgctcca 540
ttccctatg tgaaccatt gccaaatccg tcaaggaggt tctctggtag cattgggaat 600
gttgccctgga aagagagggt tgatggctgg aaaatgaagc aggacaagg gacgattccc 660
atgacgaatg gcacaagcat tgcctcctct gagggtcggg gtgttggatg tattgatgca 720
tcaactgatt acaacatgga agatgcctta ttgaacgac aaactcgaca gctctatct 780
aggaaagtcc cacttccttc ctccaggata aatccataca ggatggctcat tgtgctgca 840
ttgattgttc taagcatctt ctgactac cgtatcaca atcctgtgca caatgcatac 900
ccattatggc ttctatctgt tatatgtgag atctggttg ctcttctgt gatattggat 960
cagttcccta agtggtttcc aatcaaccgg gagacgtacc ttgataggct ggcattaagg 1020
tatgaccggg aaggtgagcc atctcagttg gctgctgtt acatttctg cagtacagtc 1080
gaccaatga aggagcctcc tcttctcact gccaataccg tgctatccat tcttctgtg 1140
gattaccctg tggataaggt ctcttctat gtatctgat atggagctgc gatgctgaca 1200
ttgatgcac tagctgagac ttcagagttt gctagaaaat gggtaccatt tgtaagaag 1260
tacaacattg aacctagagc tctgaaatgg tacttctccc agaaaattga ttacttgaag 1320
gacaaagtgc acccttcatt tgttaaagac cgccgggcca tgaagagaga atatgaagaa 1380
ttcaaagtta gggtaaatgg cttgttctg aaggcacaga aagtctctga ggaaggatgg 1440
atcatgcaag atggcacacc atggccagga aacaataccm gggaccatcc tggaatgatt 1500
caggttttcc ttggtcacag tgggtgacct gatactgagg gcaatgagct accccgtttg 1560
gtctatgttt ctctgtaaaa gcgtcctgga tccagcctc acaagaaagc tgggtgcatg 1620
aatgctcttg tctgtgtctc agctgtgctt accaatggac aatacatggt gaatcttgat 1680
tgtgatcact acattaacaa cagtaagctt ctccagggaag ctatgtgctt ccttatggac 1740

[0004]

cctaacctag	gaaggagtgt	ctgctacgtc	cagtttcccc	agagattcga	tggcattgac	1800
aggaatgac	gatatgccaa	caggaacacc	gtgtttttcg	atattaactt	gagaggtctt	1860
gatggcatcc	aaggaccagt	ttatgtcggg	actggctgtg	ttttcaaccg	aacagctcta	1920
tatggttatg	agccccaat	taagcagaag	aagggtgggt	tcttgtcatc	actatgtggc	1980
ggtaggaaga	aggcaagcaa	atcaaagaag	ggctcggaca	agaagaagtc	gcagaagcat	2040
gtggacagtt	ctgtgccagt	attcaacctt	gaagatatag	aggagggagt	tgaaggcgct	2100
ggatttgacg	acgagaaatc	acttcttatg	tctcaaatga	gcctggagaa	gagatttggc	2160
cagteccgag	cgtttgttgc	ctccactctg	atggagtatg	gtgggtgttc	tcagteccga	2220
actecggagt	ctcttctgaa	agaagctatc	catgttataa	gctgtggeta	tgaggacaag	2280
actgaatggg	gaactgagat	cgggtggate	tacggttctg	tgacagaaga	cattctcacc	2340
ggattcaaga	tgcacgcgcg	aggctggcgg	tcgatctact	gcatgcccaa	gcggccagct	2400
ttcaaggggt	ctgcccccat	caatctttcg	gaccgtctga	accaggtgct	ccggtgggct	2460
cttgggtccg	tggagatcct	cttcagccgg	cactgcccc	tgtggtacgg	ctacggaggg	2520
cggtcaagt	tcctggagag	attcgcgtac	atcaacacca	ccatctacc	gctcagctcc	2580
atcccgttc	tcactactg	cactctgcc	gccatctgtc	tgctcaccgg	aaagtctatc	2640
attccagaga	tcagcaactt	cgccagcatc	tggttcatct	ccctcttcat	ctcgatcttc	2700
gccacgggca	tcctggagat	gaggtggagc	ggggtgggca	tcgacgagtg	gtggaggaac	2760
gagcagttct	gggtgatcgg	gggcactctc	gcgcacctct	tcgcccgtgt	ccagggcctg	2820
ctcaaggtgc	tggccggcat	cgacaccaac	ttaccgctca	ctccaaggc	ctcggacgag	2880
gacggcgact	tcgcccagct	gtacatgttc	aagtggacga	cgctctgat	cccgccacc	2940
accatactga	tcatacaact	ggtcggcgct	tcgcgggca	tctctacgc	catcaacagc	3000
gcataccagt	cgtggggccc	gctcttcggc	aagctcttct	tcgcttctg	ggtcacgctc	3060
cacctgtacc	cgttctctca	ggcctctatg	ggcaggcaga	accgcacccc	gacctcgtc	3120
gtcgtctggg	ccatctctg	ggcgtccalc	ttctcttgc	tgtgggttcg	catgcacccc	3180
ttcaccaccc	gcgtcactgg	cccggatacc	cagacgtgtg	gcataactg	ctag	3234

<210> 6

<211> 1578

<212> DNA

<213> 玉米

<400> 6

atgctgtccg	agctcaacgc	gccccagcg	ccgctcccgc	ccgcgacgcc	ggccccaaag	60
ctcgcgtcca	catcgtccac	cgtcacaagt	ggcgcgcgcg	ccggtgctgg	ctacttcgat	120
ctcccgcgcc	ccgtggactc	gtccagcagt	acctacgctc	tgaagccgat	cccctcgccg	180
gtggcggcgc	cgctggccga	cccgtccacg	gactcggcgc	gggagcccaa	gcgaatgagg	240
actggcggcg	gcagcacgtc	ctctctctct	tcctcgtcgt	catccatgga	tggcggctgc	300
actaggagct	ccgtggctga	agctgcgcgc	ccggcgcgcg	aagcctccgc	agcggccaac	360
gggcccgcgg	tgcgggtggt	ggtgggtggac	acgcaggagg	ccgggatecg	gctcgtgcac	420
gcgctgctgg	cgtgcgcgga	ggccgtgcag	caggagaact	tctctgcggc	ggaggcctg	480
gtcaagcaga	tccccatgct	ggcctcgtcg	cagggcgggtg	ccatgcgcaa	ggtcggccgc	540
tacttcggcg	aggeccttgc	ccgcgcgctg	tategcttcc	gcccaccacc	ggacagctcc	600
ctctctgacg	ccgccttcgc	cgacctctta	cacgcgcact	tctacgagtc	ctgcccctac	660
ctgaagtteg	cccacttcac	cgcaaccag	gccactctcg	aggccttcgc	cgctgcccgc	720
cggtccacg	tcgtcgactt	cggcatcaag	caggggatgc	agtggccggc	tcttctccag	780
gcccctegcc	tccgcccctg	cgccccccg	tcgttccggc	tcaccggcgt	cgggccgcgc	840
cagcccagcg	agaccgacgc	cttgcagcag	gtgggctgga	aacttgccca	gttcgcgcac	900
actatcccg	tggacttcca	gtaccgtggc	ctcgtcgcgg	ccacgctcgc	cgacctggag	960
ccgttcatgc	tgcaaccgga	gggcgatgac	acggatgacg	agcccagagt	gatcgcctg	1020
aactccgtgt	tcgagctgca	ccggcttctt	gcgcagcccg	gtgcactcga	gaaggtctctg	1080
ggcacggtgc	gcgcggtgcg	gcccaggatc	gtgaccgtgg	tcgagcagga	ggccaaccac	1140
aactccgga	cgttctctga	ccgcttccac	gagtcgctgc	actactactc	cacctgttct	1200
gattctctcg	agggcgcggg	cgccggctcc	ggccagtcca	ccgacgcctc	cccggcgcgc	1260
gcccggcgca	cggaccaggt	catgtcggag	gtgtacctcg	gcccgcagat	ctgcaacgtg	1320
gtggcgtgcg	agggcgcgga	gcgcacggaa	cgccacgaga	cgctggggca	gtggcgcagc	1380
cgccctggcg	gctccgggtt	cgcccccgtg	cacctgggct	ccaatgccta	caagcaggcg	1440
agcacgctgc	tggcgtcttt	cgccggcggc	gacgggtaca	gggtggagga	gaaggacggg	1500

[0005]

tgccctgacc tgggggtggca tacgcgcccc ctcategcca cctcggcgtg gcgcgtcgcc 1560
gcccgcgccc ctccgtga 1578

<210> 7
<211> 825
<212> DNA
<213> 玉米

<400> 7
aaatcettac agaattgctg tagtttcata gtgctagatg tggacagcaa agcgcgctg 60
tatgcttctg cttttctttt ttgggtgtgtg tagccacatc ctttgttcct gcccggcgcc 120
atcccacttg gttgtttttt tttatgattg aaagccttca tgcttctctg gtcaatcacc 180
ggtgcgcact gggagcatcg ccggaaaaaa aattcttcgg ctaagagtaa cttctttctc 240
cttttcttct ctgatctcgc gagcagtgtc gataacgtgt tgtaatctac ttagcggtaa 300
cgagattgag agagacaaaa tgacagaact attgtcttta ttgcagagtg tcatgtattt 360
alacagggga tacaaagtct cccaaggggt gtgtcccttg ggagtaactg ccagttgatc 420
acaggacaat attttgtaac aaaacgtaca catcgtcaaa atagcgagge atgaaactgg 480
ccttgcccat ggacgcgtga agcgcgccat gcgttgata tgtggtaaat aagtataac 540
aatacaatgt ttaacagagc tgatagtact gctttggcac atttttgtcc acgcttcatg 600
agagalaaaa cacctgcacg taaattcaca tgctgcactg aaggccccat cactgaggag 660
cgaactgcgc taactccctt ctatatatac ccccagtcct tglttcagtt ttcgtcaagc 720
tagcagcacc aagttgtcga tcaactgcct gctcttgagc tcgattaagc tatcatcagc 780
tacagcatcc gatcccaaac tgcaactgta gcagcgacaa ctgcc 825

<210> 8
<211> 162
<212> DNA
<213> 玉米

<400> 8
actgccgtaa ctcccctteta tatatacccc cagtccctgt ttcagttttc gtcaagctag 60
cagcaccaag ttgtcgaatca cttgcctgct cttgagctcg attaagctat catcagctac 120
agcatccgat cccaaactgc aactgtagca gcgacaactg cc 162

<210> 9
<211> 273
<212> DNA
<213> 玉米

<400> 9
atgctcgtgc acgcgctgct ggcgtgcgcg gaggccgtgc agcaggagaa cttctctgcg 60
gcggaggegc tggtaagca gatcccatg ctggcctcgt cgcagggcgg tgccatgcgc 120
aaggtegccg cctacttcgg cgaggecgtt gcccgccgcg tgtatcgctt ccgccgcca 180
ccggacagct cctcctcga cgcgccttc gccgacctc tgcaagcgca cttctacgag 240
tctgccccct aectgaagtt cgcgcccttc tag 273

<210> 10
<211> 277
<212> DNA
<213> 玉米

<400> 10
ctaaagaagg agtgcgtcga agcagatcgt tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga 60
ttgaatcctg ttgccggtct tgcgatgatt atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag 120
catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgattaga 180
gtcccgcaat tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgcc aaactaggat 240
aaattategc gcgcggtgtc atctatgtta ctagate 277

[0006]

<210> 11
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> 玉米

<400> 11

```

atggggcgcg ggaaggtgca gctgaagcgg atcgagaaca agatcaaccg ccaggtgaca 60
ttctccaagc gccgctcggg gctactcaag aaggcgcacg agatctccgt gctctgcgac 120
gccgaggtcg cgctcatcat cttctccacc aagggcaagc tctacgagta ctctaccgat 180
tcatgtatgg acaaaattct tgaacggtat gagecgtact cctatgcaga aaaggttctc 240
atttccgcag aatatgaaac tcagggaat tggtgccatg aatatagaaa actaaaggcg 300
aaggtcgaga caatacagaa atgtcaaaag cacctcatgg gagaggatct tgaactttg 360
aatctcaaag agcttcagca actagagcag cagctggaga gttcactgaa acatatcaga 420
acaaggaaga gccagcttat ggtcagatca atttcagcgc tccaacggaa ggagaagtca 480
ctgcaggagg agaacaaggt tctgcagaag gagctcgcgg agaagcagaa agaccagcgg 540
cagcaagtgc aacgggacca aactcaacag cagaccagtt cgtcttccac gtccttcatg 600
ttaaggggaag ctgccccaac aacaaatgtc agcatcttcc ctgtggcagc aggcgggagg 660
gtggtggaag gggcagcagc gcagccgcag gctcgcgttg gactgccacc atggatgctt 720
agccatctga gctgctga
  
```

<210> 12
 <211> 1554
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)

<400> 12

```

atgaagaggg aacgcgagca gcttggttcc atcgcagga cctcaagctg cggtlattca 60
agcggaaaat cgaatcttlg ggaggaagaa ggaggcatgg acgagcttct tgcggtggtg 120
ggttacaagg ttaggtcatc ggacatggcg gaagtggcgc agaagcttga gcgtctcgaa 180
gaagccatgg gaaatgtcca agatgacctc ccggagattt caaacgacgt cgttcattac 240
aaccttcccg acatctccaa ctggctcgaa accatgcttt ctaattttga cctctcccc 300
tccgaagagc cggaaaagga ctccgcctcg tcggactacg atcttaaggc tattccgggg 360
aaagcaattt atggagctag cgacgcgcta ccaaacccta agcgcgtgaa agccgacgag 420
tcaagggcgc cgggtggtggt cgttgactcg caggagaacg ggatccgcct cgtgcacagc 480
ctcatggcgt gcgcggaggc cgtggagaac aacaacctcg ccgtggcgga ggcctggtg 540
aagcagatcg gcttctctgc tgtgtcgcag gttggagcta tgaggaaagt cgcaatctac 600
ttegccgaag cgctcgcgag gcgaatctac agagtcttcc ctctgcaaca ctctctctcc 660
gattctcttc agattcactt ctacgaaacc tgtccatacc tcaagttcgc acacttcacc 720
gcgaaccagg ttatcctega agcgttccaa ggaaagaacc gcgttcacgt gattgatttc 780
ggtatacaacc aggggatgca gtggccggcg ctgatgcaag ccctagcggg tcgcaccggc 840
ggctctccgg ttttccgact caccggaaatc gggccggcgg cggcggacaa ctccgaccac 900
ctccaggagg tagggtggaa gctcgcgcag ctggcggagg agatcaacgt gcagttcgag 960
taccgtggct tcgtcgcgaa cagcctcgcc gatctcgacg cctccatgct cgatctccgg 1020
gaaggcgaag ccgtcgtgtg gaactctgtc ttcgagtctc acaagctcct cgcccgeccc 1080
ggcgcggttg agaaagtact ctccgctgta cgccagattc ggccggagat tgtcacctgc 1140
gtcgagcaag aagcgaacca caacagactg agttttgtcg accggttcac ggagtcactg 1200
cactattatt caaccctatt cgactcgtcg gagggttcgc ctgtgaacct taacgataag 1260
gccatgtcgg aggtttactt agggaagcaa atctgcaacg tgggtggcgtg cgagggaatg 1320
gaccgcgtgg aaaggcacga gacgctgaac cagtggcggg accggttcgt ttcgaccgga 1380
ttttcttcgg ttcacttggg ttcgaacgcg tacaagcagg ccagcatggt gctcgcgctt 1440
tttgccgggtg gggatgggta tagggtggaa gagaacaatg gttgtctcat gttgggatgg 1500
cacactaggc ccttgattgc cacctccgcg tggcaactcg ctgcaactcg ctga 1554
  
```

<210> 13
 <211> 4215
 <212> DNA

[0007]

<213>玉米

<400> 13

```

gatccctgtg gagaaatddd tacgtcgcgg ggatggtatg gggagttatt cccctgtagg 60
aaatgggtga cgcctaagag ggagggtgaa gtaggacttc taaaactttc actaaactag 120
gccacaaata attccctaga gcaaaaccta tgcaaatagt caaactagaa tgtgcaaac 180
aagttttgtc taagtgttgc tatctctacc gcaatggcta agtttcaate tacactatat 240
aagtatgaat acaagaatga aacttaaata cttaataata atgcggaaac ttaaagagca 300
aggtagagat gcaaattctc gtggatgacg cctgcatttt tatcgaggta tccggaacca 360
cgcaaggtec cgactaatcc tcattgggtgc cctacgcaa agggaagccc acgcgagggc 420
caagcacctc ggtcgagtaa ctctatagag agccgtgggc cttctccacg cgcaagtgg 480
gctctgcttt cagctcctct cagaccctcc ccgctgtctc cactatcgag cttccggctg 540
aaaatgccat gggcctcggt cctcccggtc cacgggtggc gccgtgacac aaatgcgggt 600
atcacggctc cgcaagactc tcacccccac ttggtacaat ttcaatggct cgcacaagag 660
ccgaggggtt gatggtttat ctaatctcac lcaactaact aggattcatt taaagcaagc 720
gctagagcgg tctaactaac ctaagcactt cacaaagcac ctacgtaact caccgagtga 780
ttctatattg cacttgggtg caagagcact tgagaatgtc tactatatgc cttgctatgt 840
ctcttgggct cccaaacttg gaaatggccg gttggtgggt tatttatagc ccccaacaca 900
aaactagccg ttggaggaag ctgctgcttt ttgtggtgca cggacagtc cgggtgggtc 960
accagacagt ccgacgcccc tgccgggtgc cctgtccga tgcgctagt tgttgggtct 1020
gtcagcgtag gtgaccgttg gcgcgcaggc tttttgcacc ggacagtcgg gtggtcttcc 1080
ctcgacagtg ccacctggag ctageccgta gggtactgt tcttgggtgca ccggacagta 1140
gtccgggtct cttgtctgga cagtcagact gtggcaaac ttctctttt cttggacttt 1200
aacttatcat cctgtgaact acaaacacaa atagtagcaa acacattagt ccacaggtta 1320
tgttgatcat caaataccaa aatctattaa gccaaatggc ccagggtcca ttttcttac 1380
atccccgacg aagaattctc cgttgccatc cctatctgtg tacgcaactc tggaatccgg 1440
gtctttgctg agtaccgcac tcggcaaagt cctactctcg gtaacgatgc cttttgccga 1500
gagcaggact ctccgacacag gaatacactc ggcgaaagggc gggctctcggc aaaggccgtt 1560
agccaccgtc caaagctgac ggctgttacc tatgcccagt ggtggaaaga tattgtgaag 1620
gcctaaggcc gatttcgtcc taagcagggc ccaaaggaag gaagtactc agtggatcaa 1680
gatgttgatg tccctgatg ggtatgcagc taacctgagt aggtgggggt aacttatcta 1740
ctctgtgagt cttagggatg aagagtcatg acttccacat atggattgaa cagattctc 1800
tctgtgcatg gacaatctgg ggcggcatcc aacaaccctc atggatcgcc cggccaatcg 1860
ccgaccaggt ccaccgccc acctcgatga gacttatgtt cttagtgttg agacttcaga 1920
acttattgat aatgctgtat tggatactta tgtttgtgtt cgatacttat gtgagaactt 1980
gagacttatg agacttatgt tcttgatact tatgtttgtg ttgagaactt ggalatttat 2040
gtttgtgttg gatacttatg tctgtgatga talalglgat gtatatatgt gatgtatatg 2100
tgacatatgt gatgtatatg tggtatcttt tgtttgtttg gatggaatag agaaagcaaa 2160
taaaaatgtg tatactggtc actttgtcga gtgtaacact cggcaaaaag gtgctttgcc 2220
gagtgttagg gccatagcac tcggtagaga accaatactt aggcaccggt aaagctttt 2280
tgccgagtgt tgtggccctg gcactcagct ttgcccagtg cctcacagag cactcgacaa 2340
agaacctgac aaatggaccg gctggtaaat cctttaccga gtgcaggtea gtagacactc 2400
ggcaaaggta acttctttgc cgagtgcgcg ttagaacatt tgacaaaggg tcactccgt 2460
taccgggtgt cgtgacggcc gcttttcttt gccgagtgcc tgatagaaag tacteggcaa 2520
agaagtcgtt gccaatgtat tgttegtgta ggtctctttg tcaagtatta cacteggcaa 2580
agactgtgcc gactgttttt cagactttgc cgactgtgtt aagcactcag caaagcgtc 2640
gatttcggta gtgacggttg tttggcaata gtaaaatcca gccctctccc gtggggaaaa 2700
aactggtagg atctggctcg tggctaagat tctctttctt cctttglaa aaaaagagaa 2760
gaaaaaaaaa acgactgtca cggctgcttg tctggtaatg atcgcgcggt cggtctgtc 2820
ctaaccctga agatggacgg gagctgatga tagcgtgacc tccaaataaa caacaagggc 2880
gtgttccccg tggctgaata ttttaagggc cactgattag gtgcggttga atacatcaac 2940
ttcaagaaca tcactgtatc tgatctgatt tggctctgata tgatctgggt agtcatttct 3000
gcaatgagca tctatcaggt gaaccaatta atattgatga cattatgagt tcgaagatat 3060
actctaaagt gttatctaaa tacagaagac attcgttcgt tctttgcta taactctaaa 3120
aggcttgtaa caccctcatt catctctat atacgaagac tctctctat ctttttatc 3180
gatttatddd ttttatattt tagacaatgg aattaaatg aactaaaata tatataagaa 3240

```

[0008]

```

tctgaggacc cgagatggta atgggggactc gatcctcgat tctccacgga gaattcctct 3300
aggatatagg taatttgtcc ccacgaggat tgaacgggg taatttggtc cccatgtgcc 3360
cgtecccgga acttctcttg atctaaatta gtctatttcc atgttaaac tatactaaaa 3420
atttaataca cagtctatta taaaatagca aactaaattc taaagttgat gcactttgta 3480
attttaaate tggtttggtc aagttatatt catttgatat aataaatttg aatttgactc 3540
ttaatatcgt attttttccct aacgggggacg gattctccac ggggataaat tccatgatac 3600
agatgggatg aaagaaaaat ctcccgtatg aacttttgca ggaatgggga tgggccagag 3660
aaattttctc cctgcgggga cgggggagcc atatcctcgg tggagaattt cccattatca 3720
tccttatttg tggtagatat atatgcataa tctttttttt ttgactgaca tgtgggaaag 3780
tateccatct caatagtaga aaatcttggg aacggtagga tcgaacacia agatcagcta 3840
gcttgtaate accgagccat atagctagag ggtaatagat catgaatcaa atgtttttt 3900
cataaattat taaggctcta aattattttt aatttaaaaa taataaaaa tatagttcga 3960
ttcttacatt ttatagtgtg aaacttttaa gtctattatt acccctactt attgagttat 4020
ggttcagttc ttgtcgacgg agagtaatga gatatagaat aaggtagcct atagaataaa 4080
gaatctttct ctgaaaagtc tgacgtacgt aaataagata taataaaaa aatacaaga 4140
gaagcgctgg actggagatg ctctatatg cggcaatgcc tgtgcttata aatagccacc 4200
tcggtcggca aggac 4215

```

<210> 14
 <211> 538
 <212> DNA
 <213> 玉米

```

<400> 14
gtccgccttg tttctcctct gtctcttgat ctgactaatc ttggtttatg attcgttgag 60
taattttggg gaaagcttcg tccacagttt ttttttcgat gaacagtgcc gcagtggcgc 120
tgatcttgta tgctatcctg caatcgtggg gaacttattt cttttatac cttcactccc 180
atgaaaagge tagtaatctt tctcgatgta acatcgtcca gcaactgat taccgtgtgg 240
tccatccgac agtctggctg aacacatcat acgatattga gcaaagatc atctatctc 300
cctgtttctt aatgaaagac gtcattttca tcagtatgat ctaagaatgt tgcaacttgc 360
aaggaggcgt ttctttcttt gaatttaact aactcgttga gtggccctgt ttctcggac 420
taaggccttt gctgctccac acatgtccat tcgaatttta ccgtgttag caaggcgaa 480
aagtttgcat cttgatgatt tagcttgact atgcgattgc tttcctggac ccgtgcag 538

```

<210> 15
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> 玉米

```

<400> 15
aattegecct tgtttaaact taatatttgt ttaaactttt tactaaattc atgtaataat 60
taatgtatgc gttatatata tatgtctagg tttataatta ttcatatgaa tatgaacata 120
aaaatctagg gctaaaacga ctactatttt gaaaacggaa ggagtagtaa gttatttaag 180
cggaggggaa ccatgatggg ctagtgattt aatttacata tatatattgg tgttctgggc 240
tettacatga gaagatctag ttaactgttg ttactgaaca gcaagacaa atatataatt 300
taagctcccc aactgctagt gattctgtta agaggtaatg tttaaagtaa atttacaaga 360
gcccgtctag ctcagtcggt agagcgcaag gctcttaacc ttgtggctgt gggltcagc 420
cccacggtgg ggcacaaatt tttgttttt tgacattttt tgtttgctta gttgcagacg 480
gtttttcccc tgctaggaga tttccgagag aaaaaaagg cactacaggt taaccaaac 540
caccaacctt tggagcgtcg aggcgacggg gcatttgcgt agttgaagct tacaagttg 600
catatgagat gagtgcggga catgaagcgg ataacgtttt aaactggcaa caatatctag 660
ctgtttcaaa ttcagcgtg ggaagctacg cctacgcgcc ctggacggcg tgtaaagagc 720
cagcatcggc atcattgtca aacgatcgac aaggccaaga aattccaaat atattattaa 780
taaaaaagaa ggcaccaaatt tagtttttgt ttttttagtat gtgtggcgga ggaaattttg 840
agaacgaacg tatccaaaga aggcacaaga cgatatagat tgacgcggct agaaagttgc 900
agcaagacag tgggtacggt cttatatatc ctaataaata aaaaataaaa ctatagtgtg 960
tcaaatgtca acaagaggag gaggcagcca aattagcaga gggagacaag tagagcacgc 1020

```

[0009]

```

cttattagct tgcttattta tcgtggtggt gtacttggtta attactggca cgcattatca 1080
acaacgcagt tctggatgtg aatctagaca aacatttgtc taggttccgc acgtatagtt 1140
ttttttcttt ttttttgggg ggggggggga acggaagctg taataaacgg tactaggaac 1200
gaaagcaacc gccgcgcgca tgtttttgca atagattacg gtgaccttga tgcaccaccg 1260
cgtgctataa aaaccagtgt ccccgagtct actcatcaac caatccataa ctcgaaacct 1320
tttcttgtgc tctgttctgt ctgtgtgttt ccaaagcaag cgaaagaggt cgagggg 1377

```

<210> 16
<211> 1078
<212> PRT
<213> 玉米

<400> 16

```

Met Asp Ala Gly Ser Val Thr Gly Gly Leu Ala Ala Gly Ser His Met
 1          5          10
Arg Asp Glu Leu His Val Met Arg Ala Arg Glu Glu Pro Asn Ala Lys
 20
Val Arg Ser Ala Asp Val Lys Thr Cys Arg Val Cys Ala Asp Glu Val
 35          40          45
Gly Thr Arg Glu Asp Gly Gln Pro Phe Val Ala Cys Ala Glu Cys Gly
 50          55          60
Phe Pro Val Cys Arg Pro Cys Tyr Glu Tyr Glu Arg Ser Glu Gly Thr
 65          70          75          80
Gln Cys Cys Pro Gln Cys Asn Thr Arg Tyr Lys Arg Gln Lys Gly Cys
 85          90          95
Pro Arg Val Glu Gly Asp Glu Glu Glu Gly Pro Glu Met Asp Asp Phe
 100          105          110
Glu Asp Glu Phe Pro Ala Lys Ser Pro Lys Lys Pro His Glu Pro Val
 115          120          125
Ala Phe Asp Val Tyr Ser Glu Asn Gly Glu His Pro Ala Gln Lys Trp
 130          135          140
Arg Thr Gly Gly Gln Thr Leu Ser Ser Phe Thr Gly Ser Val Ala Gly
 145          150          155          160
Lys Asp Leu Glu Ala Glu Arg Glu Met Glu Gly Ser Met Glu Trp Lys
 165          170          175
Asp Arg Ile Asp Lys Trp Lys Thr Lys Gln Glu Lys Arg Gly Lys Leu
 180          185          190
Asn His Asp Asp Ser Asp Asp Asp Asp Lys Asn Glu Asp Glu Tyr
 195          200          205
Met Leu Leu Ala Glu Ala Arg Gln Pro Leu Trp Arg Lys Val Pro Ile
 210          215          220
Pro Ser Ser Met Ile Asn Pro Tyr Arg Ile Val Ile Val Leu Arg Leu
 225          230          235          240
Val Val Leu Cys Phe Leu Lys Phe Arg Ile Thr Thr Pro Ala Thr
 245          250          255
Asp Ala Val Pro Leu Trp Leu Ala Ser Val Ile Cys Glu Leu Trp Phe
 260          265          270
Ala Phe Ser Trp Ile Leu Asp Gln Leu Pro Lys Trp Ala Pro Val Thr
 275          280          285
Arg Glu Thr Tyr Leu Asp Arg Leu Ala Leu Arg Tyr Asp Arg Glu Gly
 290          295          300
Glu Ala Cys Arg Leu Ser Pro Ile Asp Phe Phe Val Ser Thr Val Asp
 305          310          315          320
Pro Leu Lys Glu Pro Pro Ile Ile Thr Ala Asn Thr Val Leu Ser Ile
 325          330          335
Leu Ala Val Asp Tyr Pro Val Asp Arg Val Ser Cys Tyr Val Ser Asp
 340          345          350

```

[0010]

Asp Gly Ala Ser Met Leu Leu Phe Asp Ala Leu Ser Glu Thr Ala Glu
 355 360 365
 Phe Ala Arg Arg Trp Val Pro Phe Cys Lys Lys Phe Ala Val Glu Pro
 370 375 380
 Arg Ala Pro Glu Phe Tyr Phe Ser Gln Lys Ile Asp Tyr Leu Lys Asp
 385 390 395 400
 Lys Val Gln Pro Thr Phe Val Lys Glu Arg Arg Ala Met Lys Arg Glu
 405 410 415
 Tyr Glu Glu Phe Lys Val Arg Ile Asn Ala Leu Val Ala Lys Ala Gln
 420 425 430
 Lys Lys Pro Glu Glu Gly Trp Val Met Gln Asp Gly Thr Pro Trp Pro
 435 440 445
 Gly Asn Asn Thr Arg Asp His Pro Gly Met Ile Gln Val Tyr Leu Gly
 450 455 460
 Asn Gln Gly Ala Leu Asp Val Glu Gly His Glu Leu Pro Arg Leu Val
 465 470 475 480
 Tyr Val Ser Arg Glu Lys Arg Pro Gly Tyr Asn His His Lys Lys Ala
 485 490 495
 Gly Ala Met Asn Ala Leu Val Arg Val Ser Ala Val Leu Thr Asn Ala
 500 505 510
 Pro Phe Ile Leu Asn Leu Asp Cys Asp His Tyr Val Asn Asn Ser Lys
 515 520 525
 Ala Val Arg Glu Ala Met Cys Phe Leu Met Asp Pro Gln Leu Gly Lys
 530 535 540
 Lys Leu Cys Tyr Val Gln Phe Pro Gln Arg Phe Asp Gly Ile Asp Arg
 545 550 555 560
 His Asp Arg Tyr Ala Asn Arg Asn Val Val Phe Phe Asp Ile Asn Met
 565 570 575
 Lys Gly Leu Asp Gly Ile Gln Gly Pro Val Tyr Val Gly Thr Gly Cys
 580 585 590
 Val Phe Asn Arg Gln Ala Leu Tyr Gly Tyr Asp Pro Pro Arg Pro Glu
 595 600 605
 Lys Arg Pro Lys Met Thr Cys Asp Cys Trp Pro Ser Trp Cys Cys Cys
 610 615 620
 Cys Cys Cys Phe Gly Gly Gly Lys Arg Gly Lys Ala Arg Lys Asp Lys
 625 630 635 640
 Lys Gly Asp Gly Gly Glu Glu Pro Arg Arg Gly Leu Leu Gly Phe Tyr
 645 650 655
 Arg Lys Arg Ser Lys Lys Asp Lys Leu Gly Gly Gly Ser Val Ala Gly
 660 665 670
 Ser Lys Lys Gly Gly Gly Leu Tyr Lys Lys His Gln Arg Ala Phe Glu
 675 680 685
 Leu Glu Glu Ile Glu Glu Gly Leu Glu Gly Tyr Asp Glu Leu Glu Arg
 690 695 700
 Ser Ser Leu Met Ser Gln Lys Ser Phe Glu Lys Arg Phe Gly Gln Ser
 705 710 715 720
 Pro Val Phe Ile Ala Ser Thr Leu Val Glu Asp Gly Gly Leu Pro Gln
 725 730 735
 Gly Ala Ala Ala Asp Pro Ala Ala Leu Ile Lys Glu Ala Ile His Val
 740 745 750
 Ile Ser Cys Gly Tyr Glu Glu Lys Thr Glu Trp Gly Lys Glu Ile Gly
 755 760 765
 Trp Ile Tyr Gly Ser Val Thr Glu Asp Ile Leu Thr Gly Phe Lys Met
 770 775 780
 His Cys Arg Gly Trp Lys Ser Val Tyr Cys Thr Pro Thr Arg Pro Ala
 785 790 795 800
 Phe Lys Gly Ser Ala Pro Ile Asn Leu Ser Asp Arg Leu His Gln Val

[0011]

805 810 815
 Leu Arg Trp Ala Leu Gly Ser Val Glu Ile Phe Met Ser Arg His Cys
 820 825 830
 Pro Leu Arg Tyr Ala Tyr Gly Gly Arg Leu Lys Trp Leu Glu Arg Phe
 835 840 845
 Ala Tyr Thr Asn Thr Ile Val Tyr Pro Phe Thr Ser Ile Pro Leu Leu
 850 855 860
 Ala Tyr Cys Thr Ile Pro Ala Val Cys Leu Leu Thr Gly Lys Phe Ile
 865 870 875 880
 Ile Pro Thr Leu Asn Asn Leu Ala Ser Ile Trp Phe Ile Ala Leu Phe
 885 890 895
 Leu Ser Ile Ile Ala Thr Ser Val Leu Glu Leu Arg Trp Ser Gly Val
 900 905 910
 Ser Ile Glu Asp Trp Trp Arg Asn Glu Gln Phe Trp Val Ile Gly Gly
 915 920 925
 Val Ser Ala His Leu Phe Ala Val Phe Gln Gly Phe Leu Lys Val Leu
 930 935 940
 Gly Gly Val Asp Thr Ser Phe Thr Val Thr Ser Lys Ala Ala Gly Asp
 945 950 955 960
 Glu Ala Asp Ala Phe Gly Asp Leu Tyr Leu Phe Lys Trp Thr Thr Leu
 965 970 975
 Leu Val Pro Pro Thr Thr Leu Ile Ile Ile Asn Met Val Gly Ile Val
 980 985 990
 Ala Gly Val Ser Asp Ala Val Asn Asn Gly Tyr Gly Ser Trp Gly Pro
 995 1000 1005
 Leu Phe Gly Lys Leu Phe Phe Ser Phe Trp Val Ile Val His Leu Tyr
 1010 1015 1020
 Pro Phe Leu Lys Gly Leu Met Gly Arg Gln Asn Arg Thr Pro Thr Ile
 1025 1030 1035 1040
 Val Val Leu Trp Ser Ile Leu Leu Ala Ser Ile Phe Ser Leu Val Trp
 1045 1050 1055
 Val Arg Ile Asp Pro Phe Ile Pro Lys Ala Lys Gly Pro Ile Leu Lys
 1060 1065 1070
 Pro Cys Gly Val Glu Cys
 1075

<210> 17
 <211> 1077
 <212> PRT
 <213> 玉米

<400> 17
 Met Glu Gly Asp Ala Asp Gly Val Lys Ser Gly Arg Arg Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 Gln Val Cys Gln Ile Cys Gly Asp Gly Val Gly Thr Thr Ala Glu Gly
 20 25 30
 Asp Val Phe Ala Ala Cys Asp Val Cys Gly Phe Pro Val Cys Arg Pro
 35 40 45
 Cys Tyr Glu Tyr Glu Arg Lys Asp Gly Thr Gln Ala Cys Pro Gln Cys
 50 55 60
 Lys Thr Lys Tyr Lys Arg His Lys Gly Ser Pro Ala Ile Arg Gly Glu
 65 70 75 80
 Glu Gly Asp Asp Thr Asp Ala Asp Ser Asp Phe Asn Tyr Leu Ala Ser
 85 90 95
 Gly Asn Glu Asp Gln Lys Gln Lys Ile Ala Asp Arg Met Arg Ser Trp
 100 105 110

[0012]

Arg Met Asn Val Gly Gly Ser Gly Asp Val Gly Arg Pro Lys Tyr Asp
 115 120 125
 Ser Gly Glu Ile Gly Leu Thr Lys Tyr Asp Ser Gly Glu Ile Pro Arg
 130 135 140
 Gly Tyr Ile Pro Ser Val Thr Asn Ser Gln Ile Ser Gly Glu Ile Pro
 145 150 155 160
 Gly Ala Ser Pro Asp His His Met Met Ser Pro Thr Gly Asn Ile Gly
 165 170 175
 Lys Arg Ala Pro Phe Pro Tyr Val Asn His Ser Pro Asn Pro Ser Arg
 180 185 190
 Glu Phe Ser Gly Ser Ile Gly Asn Val Ala Trp Lys Glu Arg Val Asp
 195 200 205
 Gly Trp Lys Met Lys Gln Asp Lys Gly Thr Ile Pro Met Thr Asn Gly
 210 215 220
 Thr Ser Ile Ala Pro Ser Glu Gly Arg Gly Val Gly Asp Ile Asp Ala
 225 230 235 240
 Ser Thr Asp Tyr Asn Met Glu Asp Ala Leu Leu Asn Asp Glu Thr Arg
 245 250 255
 Gln Pro Leu Ser Arg Lys Val Pro Leu Pro Ser Ser Arg Ile Asn Pro
 260 265 270
 Tyr Arg Met Val Ile Val Leu Arg Leu Ile Val Leu Ser Ile Phe Leu
 275 280 285
 His Tyr Arg Ile Thr Asn Pro Val Arg Asn Ala Tyr Pro Leu Trp Leu
 290 295 300
 Leu Ser Val Ile Cys Glu Ile Trp Phe Ala Leu Ser Trp Ile Leu Asp
 305 310 315 320
 Gln Phe Pro Lys Trp Phe Pro Ile Asn Arg Glu Thr Tyr Leu Asp Arg
 325 330 335
 Leu Ala Leu Arg Tyr Asp Arg Glu Gly Glu Pro Ser Gln Leu Ala Ala
 340 345 350
 Val Asp Ile Phe Val Ser Thr Val Asp Pro Met Lys Glu Pro Pro Leu
 355 360 365
 Val Thr Ala Asn Thr Val Leu Ser Ile Leu Ala Val Asp Tyr Pro Val
 370 375 380
 Asp Lys Val Ser Cys Tyr Val Ser Asp Asp Gly Ala Ala Met Leu Thr
 385 390 395 400
 Phe Asp Ala Leu Ala Glu Thr Ser Glu Phe Ala Arg Lys Trp Val Pro
 405 410 415
 Phe Val Lys Lys Tyr Asn Ile Glu Pro Arg Ala Pro Glu Trp Tyr Phe
 420 425 430
 Ser Gln Lys Ile Asp Tyr Leu Lys Asp Lys Val His Pro Ser Phe Val
 435 440 445
 Lys Asp Arg Arg Ala Met Lys Arg Glu Tyr Glu Glu Phe Lys Val Arg
 450 455 460
 Val Asn Gly Leu Val Ala Lys Ala Gln Lys Val Pro Glu Glu Gly Trp
 465 470 475 480
 Ile Met Gln Asp Gly Thr Pro Trp Pro Gly Asn Asn Thr Arg Asp His
 485 490 495
 Pro Gly Met Ile Gln Val Phe Leu Gly His Ser Gly Gly Leu Asp Thr
 500 505 510
 Glu Gly Asn Glu Leu Pro Arg Leu Val Tyr Val Ser Arg Glu Lys Arg
 515 520 525
 Pro Gly Phe Gln His His Lys Lys Ala Gly Ala Met Asn Ala Leu Val
 530 535 540
 Arg Val Ser Ala Val Leu Thr Asn Gly Gln Tyr Met Leu Asn Leu Asp
 545 550 555 560
 Cys Asp His Tyr Ile Asn Asn Ser Lys Ala Leu Arg Glu Ala Met Cys

[0013]

				565					570					575			
Phe	Leu	Met	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Arg	Ser	Val	Cys	Tyr	Val	Gln	Phe		
			580					585					590				
Pro	Gln	Arg	Phe	Asp	Gly	Ile	Asp	Arg	Asn	Asp	Arg	Tyr	Ala	Asn	Arg		
		595					600					605					
Asn	Thr	Val	Phe	Phe	Asp	Ile	Asn	Leu	Arg	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile	Gln		
	610					615					620						
Gly	Pro	Val	Tyr	Val	Gly	Thr	Gly	Cys	Val	Phe	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu		
625					630					635					640		
Tyr	Gly	Tyr	Glu	Pro	Pro	Ile	Lys	Gln	Lys	Lys	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser		
				645					650					655			
Ser	Leu	Cys	Gly	Gly	Arg	Lys	Lys	Ala	Ser	Lys	Ser	Lys	Lys	Gly	Ser		
			660					665					670				
Asp	Lys	Lys	Lys	Ser	Gln	Lys	His	Val	Asp	Ser	Ser	Val	Pro	Val	Phe		
		675					680					685					
Asn	Leu	Glu	Asp	Ile	Glu	Glu	Gly	Val	Glu	Gly	Ala	Gly	Phe	Asp	Asp		
	690					695					700						
Glu	Lys	Ser	Leu	Leu	Met	Ser	Gln	Met	Ser	Leu	Glu	Lys	Arg	Phe	Gly		
705					710						715				720		
Gln	Ser	Ala	Ala	Phe	Val	Ala	Ser	Thr	Leu	Met	Glu	Tyr	Gly	Gly	Val		
				725						730				735			
Pro	Gln	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	Ala	Ile	His	Val			
			740					745					750				
Ile	Ser	Cys	Gly	Tyr	Glu	Asp	Lys	Thr	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Ile	Gly		
		755					760					765					
Trp	Ile	Tyr	Gly	Ser	Val	Thr	Glu	Asp	Ile	Leu	Thr	Gly	Phe	Lys	Met		
	770					775					780						
His	Ala	Arg	Gly	Trp	Arg	Ser	Ile	Tyr	Cys	Met	Pro	Lys	Arg	Pro	Ala		
785					790					795					800		
Phe	Lys	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Asn	Leu	Ser	Asp	Arg	Leu	Asn	Gln	Val		
				805					810					815			
Leu	Arg	Trp	Ala	Leu	Gly	Ser	Val	Glu	Ile	Leu	Phe	Ser	Arg	His	Cys		
			820					825					830				
Pro	Leu	Trp	Tyr	Gly	Tyr	Gly	Gly	Arg	Leu	Lys	Phe	Leu	Glu	Arg	Phe		
		835					840					845					
Ala	Tyr	Ile	Asn	Thr	Thr	Ile	Tyr	Pro	Leu	Thr	Ser	Ile	Pro	Leu	Leu		
	850					855					860						
Ile	Tyr	Cys	Ile	Leu	Pro	Ala	Ile	Cys	Leu	Leu	Thr	Gly	Lys	Phe	Ile		
865					870					875					880		
Ile	Pro	Glu	Ile	Ser	Asn	Phe	Ala	Ser	Ile	Trp	Phe	Ile	Ser	Leu	Phe		
				885					890					895			
Ile	Ser	Ile	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Leu	Glu	Met	Arg	Trp	Ser	Gly	Val		
			900					905					910				
Gly	Ile	Asp	Glu	Trp	Trp	Arg	Asn	Glu	Gln	Phe	Trp	Val	Ile	Gly	Gly		
		915					920					925					
Ile	Ser	Ala	His	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Gln	Gly	Leu	Lys	Val	Leu			
	930					935					940						
Ala	Gly	Ile	Asp	Thr	Asn	Phe	Thr	Val	Thr	Ser	Lys	Ala	Ser	Asp	Glu		
945					950					955					960		
Asp	Gly	Asp	Phe	Ala	Glu	Leu	Tyr	Met	Phe	Lys	Trp	Thr	Thr	Leu	Leu		
				965					970					975			
Ile	Pro	Pro	Thr	Thr	Ile	Leu	Ile	Ile	Asn	Leu	Val	Gly	Val	Val	Ala		
			980					985					990				
Gly	Ile	Ser	Tyr	Ala	Ile	Asn	Ser	Gly	Tyr	Gln	Ser	Trp	Gly	Pro	Leu		
		995					1000					1005					
Phe	Gly	Lys	Leu	Phe	Phe	Ala	Phe	Trp	Val	Ile	Val	His	Leu	Tyr	Pro		
	1010					1015						1020					

[0014]

Phe Leu Lys Gly Leu Met Gly Arg Gln Asn Arg Thr Pro Thr Ile Val
 1025 1030 1035 1040
 Val Val Trp Ala Ile Leu Leu Ala Ser Ile Phe Ser Leu Leu Trp Val
 1045 1050 1055
 Arg Ile Asp Pro Phe Thr Thr Arg Val Thr Gly Pro Asp Thr Gln Thr
 1060 1065 1070
 Cys Gly Ile Asn Cys
 1075

<210> 18
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> 玉米

<400> 18

Met Leu Ser Glu Leu Asn Ala Pro Pro Ala Pro Leu Pro Pro Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Ala Pro Arg Leu Ala Ser Thr Ser Ser Thr Val Thr Ser Gly Ala
 20 25 30
 Ala Ala Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Leu Pro Pro Ala Val Asp Ser Ser
 35 40 45
 Ser Ser Thr Tyr Ala Leu Lys Pro Ile Pro Ser Pro Val Ala Ala Pro
 50 55 60
 Ser Ala Asp Pro Ser Thr Asp Ser Ala Arg Glu Pro Lys Arg Met Arg
 65 70 75 80
 Thr Gly Gly Gly Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Met
 85 90 95
 Asp Gly Gly Arg Thr Arg Ser Ser Val Val Glu Ala Ala Pro Pro Ala
 100 105 110
 Thr Gln Ala Ser Ala Ala Ala Asn Gly Pro Ala Val Pro Val Val Val
 115 120 125
 Val Asp Thr Gln Glu Ala Gly Ile Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala
 130 135 140
 Cys Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu
 145 150 155 160
 Val Lys Gln Ile Pro Met Leu Ala Ser Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg
 165 170 175
 Lys Val Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ala Leu Ala Arg Arg Val Tyr Arg
 180 185 190
 Phe Arg Pro Pro Pro Asp Ser Ser Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp
 195 200 205
 Leu Leu His Ala His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala
 210 215 220
 His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Gly Cys Arg
 225 230 235 240
 Arg Val His Val Val Asp Phe Gly Ile Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro
 245 250 255
 Ala Leu Leu Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe
 260 265 270
 Arg Leu Thr Gly Val Gly Pro Pro Gln Pro Asp Glu Thr Asp Ala Leu
 275 280 285
 Gln Gln Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala His Thr Ile Arg Val
 290 295 300
 Asp Phe Gln Tyr Arg Gly Leu Val Ala Ala Thr Leu Ala Asp Leu Glu
 305 310 315 320
 Pro Phe Met Leu Gln Pro Glu Gly Asp Asp Thr Asp Asp Glu Pro Glu

[0015]

325 330 335
 Val Ile Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Leu His Arg Leu Leu Ala Gln
 340 345 350
 Pro Gly Ala Leu Glu Lys Val Leu Gly Thr Val Arg Ala Val Arg Pro
 355 360 365
 Arg Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Ser Gly Thr
 370 375 380
 Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Met Phe
 385 390 395 400
 Asp Ser Leu Glu Gly Ala Gly Ala Gly Ser Gly Gln Ser Thr Asp Ala
 405 410 415
 Ser Pro Ala Ala Ala Gly Gly Thr Asp Gln Val Met Ser Glu Val Tyr
 420 425 430
 Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Cys Glu Gly Ala Glu Arg
 435 440 445
 Thr Glu Arg His Glu Thr Leu Gly Gln Trp Arg Ser Arg Leu Gly Gly
 450 455 460
 Ser Gly Phe Ala Pro Val His Leu Gly Ser Asn Ala Tyr Lys Gln Ala
 465 470 475 480
 Ser Thr Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu
 485 490 495
 Glu Lys Asp Gly Cys Leu Thr Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile
 500 505 510
 Ala Thr Ser Ala Trp Arg Val Ala Ala Ala Ala Pro
 515 520 525

<210> 19
 <211> 90
 <212> PRT
 <213>玉米

<400> 19
 Met Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu
 1 5 10 15
 Asn Phe Ser Ala Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Pro Met Leu Ala
 20 25 30
 Ser Ser Gln Gly Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Ala Tyr Phe Gly Glu
 35 40 45
 Ala Leu Ala Arg Arg Val Tyr Arg Phe Arg Pro Pro Pro Asp Ser Ser
 50 55 60
 Leu Leu Asp Ala Ala Phe Ala Asp Leu Leu His Ala His Phe Tyr Glu
 65 70 75 80
 Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe
 85 90

<210> 20
 <211> 245
 <212> PRT
 <213>玉米

<400> 20
 Met Gly Arg Gly Lys Val Gln Leu Lys Arg Ile Glu Asn Lys Ile Asn
 1 5 10 15
 Arg Gln Val Thr Phe Ser Lys Arg Arg Ser Gly Leu Leu Lys Lys Ala
 20 25 30

[0016]

His Glu Ile Ser Val Leu Cys Asp Ala Glu Val Ala Leu Ile Ile Phe
 35 40 45
 Ser Thr Lys Gly Lys Leu Tyr Glu Tyr Ser Thr Asp Ser Cys Met Asp
 50 55 60
 Lys Ile Leu Glu Arg Tyr Glu Arg Tyr Ser Tyr Ala Glu Lys Val Leu
 65 70 75 80
 Ile Ser Ala Glu Tyr Glu Thr Gln Gly Asn Trp Cys His Glu Tyr Arg
 85 90 95
 Lys Leu Lys Ala Lys Val Glu Thr Ile Gln Lys Cys Gln Lys His Leu
 100 105 110
 Met Gly Glu Asp Leu Glu Thr Leu Asn Leu Lys Glu Leu Gln Gln Leu
 115 120 125
 Glu Gln Gln Leu Glu Ser Ser Leu Lys His Ile Arg Thr Arg Lys Ser
 130 135 140
 Gln Leu Met Val Glu Ser Ile Ser Ala Leu Gln Arg Lys Glu Lys Ser
 145 150 155 160
 Leu Gln Glu Glu Asn Lys Val Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Lys Gln
 165 170 175
 Lys Asp Gln Arg Gln Gln Val Gln Arg Asp Gln Thr Gln Gln Thr
 180 185 190
 Ser Ser Ser Ser Thr Ser Phe Met Leu Arg Glu Ala Ala Pro Thr Thr
 195 200 205
 Asn Val Ser Ile Phe Pro Val Ala Ala Gly Gly Arg Val Val Glu Gly
 210 215 220
 Ala Ala Ala Gln Pro Gln Ala Arg Val Gly Leu Pro Pro Trp Met Leu
 225 230 235 240
 Ser His Leu Ser Cys
 245

<210> 21
 <211> 86
 <212> PRT
 <213>大豆

<400> 21
 Gly Ile Arg Leu Val His Ser Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Val Glu
 1 5 10 15
 Asn Asn Asn Leu Ala Val Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Phe
 20 25 30
 Leu Ala Val Ser Gln Val Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Ile Tyr Phe
 35 40 45
 Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Val Phe Pro Leu Gln His
 50 55 60
 Ser Leu Ser Asp Ser Leu Gln Ile His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr
 65 70 75 80
 Leu Lys Phe Ala His Phe
 85

<210> 22
 <211> 517
 <212> PRT
 <213>大豆

<400> 22
 Met Lys Arg Glu Arg Glu Gln Leu Gly Ser Ile Ala Gly Thr Ser Ser

[0017]

1				5					10					15		
Cys	Gly	Tyr	Ser	Ser	Gly	Lys	Ser	Asn	Leu	Trp	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	
			20					25					30			
Met	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Val	Val	Gly	Tyr	Lys	Val	Arg	Ser	Ser	Asp	
		35						40				45				
Met	Ala	Glu	Val	Ala	Gln	Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Glu	Ala	Met	Gly	
		50				55					60					
Asn	Val	Gln	Asp	Asp	Leu	Pro	Glu	Ile	Ser	Asn	Asp	Val	Val	His	Tyr	
65					70					75					80	
Asn	Pro	Ser	Asp	Ile	Ser	Asn	Trp	Leu	Glu	Thr	Met	Leu	Ser	Asn	Phe	
				85						90					95	
Asp	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Pro	Glu	Lys	Asp	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	
			100					105							110	
Tyr	Asp	Leu	Lys	Ala	Ile	Pro	Gly	Lys	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	
		115					120					125				
Ala	Leu	Pro	Asn	Pro	Lys	Arg	Val	Lys	Ala	Asp	Glu	Ser	Arg	Arg	Ala	
		130				135					140					
Val	Val	Val	Val	Asp	Ser	Gln	Glu	Asn	Gly	Ile	Arg	Leu	Val	His	Ser	
145					150						155				160	
Leu	Met	Ala	Cys	Ala	Glu	Ala	Val	Glu	Asn	Asn	Asn	Leu	Ala	Val	Ala	
				165						170					175	
Glu	Ala	Leu	Val	Lys	Gln	Ile	Gly	Phe	Leu	Ala	Val	Ser	Gln	Val	Gly	
			180					185							190	
Ala	Met	Arg	Lys	Val	Ala	Ile	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	
		195					200					205				
Ile	Tyr	Arg	Val	Phe	Pro	Leu	Gln	His	Ser	Leu	Ser	Asp	Ser	Leu	Gln	
	210					215						220				
Ile	His	Phe	Tyr	Glu	Thr	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys	Phe	Ala	His	Phe	Thr	
225					230					235					240	
Ala	Asn	Gln	Val	Ile	Leu	Glu	Ala	Phe	Gln	Gly	Lys	Asn	Arg	Val	His	
				245					250					255		
Val	Ile	Asp	Phe	Gly	Ile	Asn	Gln	Gly	Met	Gln	Trp	Pro	Ala	Leu	Met	
			260					265						270		
Gln	Ala	Leu	Ala	Val	Arg	Thr	Gly	Gly	Pro	Pro	Val	Phe	Arg	Leu	Thr	
		275					280					285				
Gly	Ile	Gly	Pro	Pro	Ala	Ala	Asp	Asn	Ser	Asp	His	Leu	Gln	Glu	Val	
	290					295					300					
Gly	Trp	Lys	Leu	Ala	Gln	Leu	Ala	Glu	Glu	Ile	Asn	Val	Gln	Phe	Glu	
305					310					315					320	
Tyr	Arg	Gly	Phe	Val	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Ala	Ser	Met	
				325					330					335		
Leu	Asp	Leu	Arg	Glu	Gly	Glu	Ala	Val	Ala	Val	Asn	Ser	Val	Phe	Glu	
			340					345					350			
Phe	His	Lys	Leu	Leu	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Val	Glu	Lys	Val	Leu	Ser	
		355					360					365				
Val	Val	Arg	Gln	Ile	Arg	Pro	Glu	Ile	Val	Thr	Val	Val	Glu	Gln	Glu	
	370					375					380					
Ala	Asn	His	Asn	Arg	Leu	Ser	Phe	Val	Asp	Arg	Phe	Thr	Glu	Ser	Leu	
385					390					395					400	
His	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Glu	Gly	Ser	Pro	Val	Asn	
				405					410					415		
Pro	Asn	Asp	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Val	Tyr	Leu	Gly	Lys	Gln	Ile	Cys	
			420					425					430			
Asn	Val	Val	Ala	Cys	Glu	Gly	Met	Asp	Arg	Val	Glu	Arg	His	Glu	Thr	
		435					440					445				
Leu	Asn	Gln	Trp	Arg	Asn	Arg	Phe	Val	Ser	Thr	Gly	Phe	Ser	Ser	Val	
	450					455					460					

[0018]

His Leu Gly Ser Asn Ala Tyr Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala Leu
 465 470 475 480
 Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Asn Asn Gly Cys Leu
 485 490 495
 Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Gln
 500 505 510
 Leu Ala Ala Thr Arg
 515

<210> 23
 <211> 523
 <212> PRT
 <213>大豆

<400> 23

Met Lys Arg Glu Arg Gln Gln Leu Gly Ser Asn Ala Gly Thr Ser Ser
 1 5 10 15
 Cys Gly Tyr Ser Ser Gly Lys Ser Asn Leu Trp Glu Glu Glu Gly Gly
 20 25 30
 Met Asp Glu Leu Leu Ala Val Val Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Asp
 35 40 45
 Met Ala Glu Val Ala Gln Lys Leu Glu Arg Leu Glu Glu Ala Met Gly
 50 55 60
 Asn Val Gln Asp Asp Leu Thr Asp Leu Ser Asn Asp Ala Val His Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Asp Ile Ser Asn Trp Leu Gln Thr Met Leu Ser Asn Phe
 85 90 95
 Asp Pro Leu Pro Ser Glu Glu Pro Glu Lys Asp Ser Ala Ser Ser Asp
 100 105 110
 Tyr Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Lys Ala Ile Tyr Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Asp Ala Leu Pro Asn Pro Lys Arg Val Arg Thr Asp Glu Ser Thr Arg
 130 135 140
 Ala Val Val Val Val Asp Leu Gln Glu Asn Gly Ile Arg Leu Val His
 145 150 155 160
 Ser Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Val Glu Asn Asn Asn Leu Ala Val
 165 170 175
 Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Leu Ser Gln Val
 180 185 190
 Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg
 195 200 205
 Arg Ile Tyr Arg Val Phe Pro Gln Gln His Ser Leu Ser Asp Ser Leu
 210 215 220
 Gln Ile His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe
 225 230 235 240
 Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Gln Gly Lys Asn Arg Val
 245 250 255
 His Val Ile Asp Phe Gly Ile Asn Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu
 260 265 270
 Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Asn Asp Gly Pro Pro Val Phe Arg Leu
 275 280 285
 Thr Gly Ile Gly Pro Pro Ala Ala Asp Asn Ser Asp His Leu Gln Glu
 290 295 300
 Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Leu Ala Glu Arg Ile His Val Gln Phe
 305 310 315 320
 Glu Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Ser Leu Ala Asp Leu Asp Ala Ser

[0019]

```

                325                330                335
Met Leu Asp Leu Arg Glu Asp Glu Ser Val Ala Val Asn Ser Val Phe
                340                345                350
Glu Phe His Lys Leu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Val Glu Lys Val Leu
                355                360                365
Ser Val Val Arg Gln Ile Arg Pro Glu Ile Leu Thr Val Val Glu Gln
                370                375                380
Glu Ala Asn His Asn Gly Leu Ser Phe Val Asp Arg Phe Thr Glu Ser
385                390                395                400
Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Ser Pro Val
                405                410                415
Asn Pro Asn Asp Lys Ala Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile
                420                425                430
Cys Asn Val Val Ala Cys Glu Gly Met Asp Arg Val Glu Arg His Glu
                435                440                445
Thr Leu Asn Gln Trp Arg Asn Arg Phe Gly Ser Thr Gly Phe Ser Pro
                450                455                460
Val His Leu Gly Ser Asn Ala Tyr Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ser
465                470                475                480
Leu Phe Gly Gly Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Asn Asn Gly Cys
                485                490                495
Leu Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Val Trp
                500                505                510
Gln Leu Ala Thr Lys Ser Val Val Ala Ala His
                515                520

```

<210> 24
 <211> 91
 <212> PRT
 <213>大豆

```

<400> 24
Asn Gly Ile Arg Leu Val His Ser Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Val
 1                5                10                15
Glu Asn Asn Asn Leu Ala Val Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly
                20                25                30
Phe Leu Ala Leu Ser Gln Val Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr
                35                40                45
Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Val Phe Pro Gln Gln
                50                55                60
His Ser Leu Ser Asp Ser Leu Gln Ile His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro
65                70                75                80
Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln
                85                90

```

<210> 25
 <211> 517
 <212> PRT
 <213>大豆

```

<400> 25
Met Lys Arg Glu Arg Glu Gln Leu Gly Ser Ile Ala Gly Thr Ser Ser
 1                5                10                15
Cys Gly Tyr Ser Ser Gly Lys Ser Asn Leu Trp Glu Glu Glu Gly Gly
                20                25                30

```

[0020]

Met Asp Glu Leu Leu Ala Val Val Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Asp
 35 40 45
 Met Ala Glu Val Ala Gln Lys Leu Glu Arg Leu Glu Glu Ala Met Gly
 50 55 60
 Asn Val Gln Asp Asp Leu Pro Glu Ile Ser Asn Asp Val Val His Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Asp Ile Ser Asn Trp Leu Glu Thr Met Leu Ser Asn Phe
 85 90 95
 Asp Pro Leu Pro Ser Glu Glu Pro Glu Lys Asp Ser Ala Ser Ser Asp
 100 105 110
 Tyr Asp Leu Lys Ala Ile Pro Gly Lys Ala Ile Tyr Gly Ala Ser Asp
 115 120 125
 Ala Leu Pro Asn Pro Lys Arg Val Lys Ala Asp Glu Ser Arg Arg Ala
 130 135 140
 Val Val Val Val Asp Ser Gln Glu Asn Gly Ile Arg Leu Val His Ser
 145 150 155 160
 Leu Met Ala Cys Ala Glu Ala Val Glu Asn Asn Asn Leu Ala Val Ala
 165 170 175
 Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Phe Leu Ala Val Ser Gln Val Gly
 180 185 190
 Ala Met Arg Lys Val Ala Ile Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg
 195 200 205
 Ile Tyr Arg Val Phe Pro Leu Gln His Ser Leu Ser Asp Ser Leu Gln
 210 215 220
 Ile His Phe Tyr Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr
 225 230 235 240
 Ala Asn Gln Val Ile Leu Glu Ala Phe Gln Gly Lys Asn Arg Val His
 245 250 255
 Val Ile Asp Phe Gly Ile Asn Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Met
 260 265 270
 Gln Ala Leu Ala Val Arg Thr Gly Gly Pro Pro Val Phe Arg Leu Thr
 275 280 285
 Gly Ile Gly Pro Pro Ala Ala Asp Asn Ser Asp His Leu Gln Glu Val
 290 295 300
 Gly Trp Lys Leu Ala Gln Leu Ala Glu Glu Ile Asn Val Gln Phe Glu
 305 310 315 320
 Tyr Arg Gly Phe Val Ala Asn Ser Leu Ala Asp Leu Asp Ala Ser Met
 325 330 335
 Leu Asp Leu Arg Glu Gly Glu Ala Val Ala Val Asn Ser Val Phe Glu
 340 345 350
 Phe His Lys Leu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Val Glu Lys Val Leu Ser
 355 360 365
 Val Val Arg Gln Ile Arg Pro Glu Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu
 370 375 380
 Ala Asn His Asn Arg Leu Ser Phe Val Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu
 385 390 395 400
 His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Ser Pro Val Asn
 405 410 415
 Pro Asn Asp Lys Ala Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile Cys
 420 425 430
 Asn Val Val Ala Cys Glu Gly Met Asp Arg Val Glu Arg His Glu Thr
 435 440 445
 Leu Asn Gln Trp Arg Asn Arg Phe Val Ser Thr Gly Phe Ser Ser Val
 450 455 460
 His Leu Gly Ser Asn Ala Tyr Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala Leu
 465 470 475 480
 Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Asn Asn Gly Cys Leu

[0021]

Met	Leu	Gly	Trp	His	Thr	Arg	Pro	Leu	Ile	Ala	Thr	Ser	Ala	Trp	Gln
			500					505					510		
Leu	Ala	Ala	Thr	Arg											
			515												

<210> 26
 <211> 91
 <212> PRT
 <213>大豆

<400> 26

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

<210> 27
 <211> 595
 <212> PRT
 <213>大豆

<400> 27

Met	Lys	Arg	Asp	His	Lys	Asp	Ser	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Gly
1				5					10					15	
Gly	Thr	Val	Lys	Gly	Glu	Cys	Ser	Ser	Met	Gln	Ser	Asn	Gly	Lys	Ala
			20					25					30		
Lys	Met	Trp	Glu	Glu	Glu	Gln									
		35					40					45			
Gln	Gln	Gln	Gln	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Tyr	Lys
		50				55					60				
Val	Arg	Ala	Ser	Asp	Met	Ala	Asp	Val	Ala	Gln	Lys	Leu	Glu	Gln	Leu
65					70					75					80
Glu	Met	Val	Met	Gly	Cys	Ala	Gln	Glu	Asp	Gly	Ile	Ser	His	Leu	Ala
				85					90					95	
Ser	Asp	Thr	Val	His	Tyr	Asp	Pro	Thr	Asp	Leu	Tyr	Ser	Trp	Val	Gln
			100					105					110		
Ser	Met	Leu	Thr	Glu	Leu	Asn	Pro	Glu	Pro	Asn	Asn	Asn	Leu	Asp	Pro
		115					120					125			
Ser	Ser	Phe	Leu	Ile	Asp	Asn	Asn	Asn	Asn	Ile	Ile	Asn	Ser	Thr	Ala
		130				135					140				
Pro	Val	Phe	Asn	Asp	Asp	Ser	Glu	Tyr	Asp	Leu	Arg	Ala	Ile	Pro	Gly
145					150					155					160
Ile	Ala	Ala	Tyr	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Asp	Asn	His	Leu	Asp	Glu
				165					170					175	
Ile	Glu	Thr	Ala	Asn	Asn	Ile	Asn	Lys	Arg	Leu	Lys	Pro	Ser	Pro	Ala
			180					185					190		

[0022]

Glu Ser Ala Asp Ser Ala Ala Ser Glu Pro Thr Arg His Val Val Leu
 195 200 205
 Val Asp His Gln Glu Ala Gly Val Arg Leu Val His Thr Leu Leu Ala
 210 215 220
 Cys Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn Leu Lys Leu Ala Asp Ala Leu
 225 230 235 240
 Val Lys His Val Gly Ile Leu Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala Met Arg
 245 250 255
 Lys Val Ala Ser Tyr Phe Ala Gln Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Gly
 260 265 270
 Ile Phe Pro Glu Glu Thr Leu Asp Ser Ser Phe Ser Asp Val Leu His
 275 280 285
 Met His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr
 290 295 300
 Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe Ala Thr Ala Gly Lys Val His
 305 310 315 320
 Val Ile Asp Phe Gly Leu Lys Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Met
 325 330 335
 Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Thr Phe Arg Leu Thr
 340 345 350
 Gly Ile Gly Pro Pro Gln Pro Asp Asn Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val
 355 360 365
 Gly Leu Lys Leu Ala Gln Leu Ala Gln Ile Ile Gly Val Gln Phe Glu
 370 375 380
 Phe Arg Gly Phe Val Cys Asn Ser Leu Ala Asp Leu Asp Pro Asn Met
 385 390 395 400
 Leu Glu Ile Arg Pro Gly Glu Ala Val Ala Val Asn Ser Val Phe Glu
 405 410 415
 Leu His Arg Met Leu Ala Arg Ser Gly Ser Val Asp Lys Val Leu Asp
 420 425 430
 Thr Val Lys Lys Ile Asn Pro Gln Ile Val Thr Ile Val Glu Gln Glu
 435 440 445
 Ala Asn His Asn Gly Pro Gly Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ala Leu
 450 455 460
 His Tyr Tyr Ser Ser Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Ser Ser Ser Ser
 465 470 475 480
 Ser Thr Gly Leu Gly Ser Pro Ser Gln Asp Leu Leu Met Ser Glu Leu
 485 490 495
 Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Tyr Glu Gly Pro Asp
 500 505 510
 Arg Val Glu Arg His Glu Thr Leu Thr Gln Trp Arg Gly Arg Leu Asp
 515 520 525
 Ser Ala Gly Phe Asp Pro Val His Leu Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln
 530 535 540
 Ala Ser Met Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly Gly Asp Gly Tyr Arg Val
 545 550 555 560
 Glu Glu Asn Asn Gly Cys Leu Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu
 565 570 575
 Ile Ala Thr Ser Ala Trp Lys Leu Pro Ser Ser Ser Glu Ser Ser Gly
 580 585 590
 Leu Thr Gln
 595

<210> 28
 <211> 94
 <212> PRT

[0023]

<213>大豆

<400> 28

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

<210> 29

<211> 584

<212> PRT

<213>大豆

<400> 29

Met Lys Arg Asp His Arg Asp Ser Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Gly Glu Cys Ser Ser Met Pro Ser Asn Gly Lys Ala Asn Met
 20 25 30
 Trp Glu Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gly Met Asp Glu Leu Leu Ala
 35 40 45
 Ala Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ala Ser Asp Met Ala Asp Val Ala Gln
 50 55 60
 Lys Leu Glu Gln Leu Glu Met Val Met Gly Cys Ala Gln Glu Glu Gly
 65 70 75 80
 Ile Ser His Leu Ala Ser Asp Thr Val His Tyr Asp Pro Thr Asp Leu
 85 90 95
 Tyr Ser Trp Val Gln Thr Met Leu Thr Glu Leu Asn Pro Glu Pro Asn
 100 105 110
 Asn Asn Asn Asn Ser Leu Leu Gly Pro Ser Ser Leu Leu Ile Asp Asn
 115 120 125
 Asn Thr Ala Pro Val Phe Asn Asp Asp Ser Glu Tyr Asp Leu Arg Ala
 130 135 140
 Ile Pro Gly Ile Ala Ala Tyr Pro Pro Pro Pro Gln Asp Asn Asn
 145 150 155 160
 Asn Asn Asn Asn Asn Leu Asp Glu Ile Glu Thr Ala Asn Asn Ile Asn
 165 170 175
 Lys Arg Leu Lys Pro Ser Pro Val Glu Ser Ala Asp Ser Ala Ser Glu
 180 185 190
 Pro Thr Arg Thr Val Leu Leu Val Asp His Gln Glu Ala Gly Val Arg
 195 200 205
 Leu Val His Thr Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Gln Glu Asn
 210 215 220
 Leu Lys Leu Ala Asp Ala Leu Val Lys His Val Gly Ile Leu Ala Ala
 225 230 235 240
 Ser Gln Ala Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Ser Tyr Phe Ala Gln Ala
 245 250 255
 Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Gly Ile Phe Pro Glu Glu Thr Leu Asp Ser
 260 265 270

[0024]

Ser Phe Ser Asp Val Leu His Met His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr
 275 280 285
 Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Phe
 290 295 300
 Ala Thr Ala Gly Arg Val His Val Ile Asp Phe Gly Leu Arg Gln Gly
 305 310 315 320
 Met Gln Trp Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly
 325 330 335
 Pro Pro Thr Phe Arg Leu Thr Gly Ile Gly Pro Pro Gln Pro Asp Asn
 340 345 350
 Thr Asp Ala Leu Gln Gln Val Gly Trp Lys Leu Ala Gln Leu Ala Gln
 355 360 365
 Asn Ile Gly Val Gln Phe Glu Phe Arg Gly Phe Val Cys Asn Ser Leu
 370 375 380
 Ala Asp Leu Asp Pro Lys Met Leu Glu Ile Arg Pro Gly Glu Ala Val
 385 390 395 400
 Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Leu His Arg Met Leu Ala Arg Pro Gly
 405 410 415
 Ser Val Asp Lys Val Leu Asp Thr Val Lys Lys Ile Lys Pro Lys Ile
 420 425 430
 Val Thr Ile Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Gly Pro Gly Phe Leu
 435 440 445
 Asp Arg Phe Thr Glu Ala Leu His Tyr Tyr Ser Ser Leu Phe Asp Ser
 450 455 460
 Leu Glu Gly Ser Ser Ser Ser Thr Gly Leu Gly Ser Pro Asn Gln Asp
 465 470 475 480
 Leu Leu Met Ser Glu Leu Tyr Leu Gly Arg Gln Ile Cys Asn Val Val
 485 490 495
 Ala Asn Glu Gly Ala Asp Arg Val Glu Arg His Glu Thr Leu Ser Gln
 500 505 510
 Trp Arg Gly Arg Leu Asp Ser Ala Gly Phe Asp Pro Val His Leu Gly
 515 520 525
 Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala Leu Phe Ala Gly
 530 535 540
 Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Asn Asn Gly Cys Leu Met Leu Gly
 545 550 555 560
 Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Lys Leu Pro Ser
 565 570 575
 Pro Asn Asp Leu His Cys Lys Leu
 580

<210> 30

<211> 94

<212> PRT

<213>大豆

<400> 30

Ala Gly Val Arg Leu Val His Thr Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala Val
 1 5 10 15
 Gln Gln Glu Asn Leu Lys Leu Ala Asp Ala Leu Val Lys His Val Gly
 20 25 30
 Ile Leu Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Ser Tyr
 35 40 45
 Phe Ala Gln Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Gly Ile Phe Pro Glu Glu
 50 55 60
 Thr Leu Asp Ser Ser Phe Ser Asp Val Leu His Met His Phe Tyr Glu

[0025]

65					70					75				80
Ser	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys	Phe	Ala	His	Phe	Thr	Ala	Asn	Gln	
				85					90					

<210> 31
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)

<400> 31

Met	Lys	Arg	Asp	His	His	His	His	His	His	Gln	Asp	Lys	Lys	Thr	Met
1				5					10					15	
Met	Met	Asn	Glu	Glu	Asp	Asp	Gly	Asn	Gly	Met	Asp	Glu	Leu	Leu	Ala
			20					25					30		
Val	Leu	Gly	Tyr	Lys	Val	Arg	Ser	Ser	Glu	Met	Ala	Asp	Val	Ala	Gln
		35					40					45			
Lys	Leu	Glu	Gln	Leu	Glu	Val	Met	Met	Ser	Asn	Val	Gln	Glu	Asp	Asp
	50					55					60				
Leu	Ser	Gln	Leu	Ala	Thr	Glu	Thr	Val	His	Tyr	Asn	Pro	Ala	Glu	Leu
65					70					75					80
Tyr	Thr	Trp	Leu	Asp	Ser	Met	Leu	Thr	Asp	Leu	Asn	Pro	Pro	Ser	Ser
				85					90					95	
Asn	Ala	Glu	Tyr	Asp	Leu	Lys	Ala	Ile	Pro	Gly	Asp	Ala	Ile	Leu	Asn
			100					105					110		
Gln	Phe	Ala	Ile	Asp	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Asn	Gln	Gly	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Asp	Thr	Tyr	Thr	Thr	Asn	Lys	Arg	Leu	Lys	Cys	Ser	Asn	Gly	Val	Val
	130					135					140				
Glu	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Glu	Ser	Thr	Arg	His	Val	Val	Leu	Val
145					150					155					160
Asp	Ser	Gln	Glu	Asn	Gly	Val	Arg	Leu	Val	His	Ala	Leu	Leu	Ala	Cys
				165					170					175	
Ala	Glu	Ala	Val	Gln	Lys	Glu	Asn	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Ala	Leu	Val
			180					185					190		
Lys	Gln	Ile	Gly	Phe	Leu	Ala	Val	Ser	Gln	Ile	Gly	Ala	Met	Arg	Lys
		195					200					205			
Val	Ala	Thr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	Ile	Tyr	Arg	Leu
	210					215					220				
Ser	Pro	Ser	Gln	Ser	Pro	Ile	Asp	His	Ser	Leu	Ser	Asp	Thr	Leu	Gln
225					230					235					240
Met	His	Phe	Tyr	Glu	Thr	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys	Phe	Ala	His	Phe	Thr
				245					250					255	
Ala	Asn	Gln	Ala	Ile	Leu	Glu	Ala	Phe	Gln	Gly	Lys	Lys	Arg	Val	His
			260					265					270		
Val	Ile	Asp	Phe	Ser	Met	Ser	Gln	Gly	Leu	Gln	Trp	Pro	Ala	Leu	Met
		275					280					285			
Gln	Ala	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Pro	Pro	Val	Phe	Arg	Leu	Thr
	290					295					300				
Gly	Ile	Gly	Pro	Pro	Ala	Pro	Asp	Asn	Phe	Asp	Tyr	Leu	His	Glu	Val
305					310					315					320
Gly	Cys	Lys	Leu	Ala	His	Leu	Ala	Glu	Ala	Ile	His	Val	Glu	Phe	Glu
				325					330					335	
Tyr	Arg	Gly	Phe	Val	Ala	Asn	Thr	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Ala	Ser	Met
			340					345					350		
Leu	Glu	Leu	Arg	Pro	Ser	Glu	Ile	Glu	Ser	Val	Ala	Val	Asn	Ser	Val
		355					360						365		

[0026]

Phe Glu Leu His Lys Leu Leu Gly Arg Pro Gly Ala Ile Asp Lys Val
 370 375 380
 Leu Gly Val Val Asn Gln Ile Lys Pro Glu Ile Phe Thr Val Val Glu
 385 390 395 400
 Gln Glu Ser Asn His Asn Ser Pro Ile Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu
 405 410 415
 Ser Leu His Tyr Tyr Ser Thr Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Val Pro
 420 425 430
 Ser Gly Gln Asp Lys Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Lys Gln Ile
 435 440 445
 Cys Asn Val Val Ala Cys Asp Gly Pro Asp Arg Val Glu Arg His Glu
 450 455 460
 Thr Leu Ser Gln Trp Arg Asn Arg Phe Gly Ser Ala Gly Phe Ala Ala
 465 470 475 480
 Ala His Ile Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala
 485 490 495
 Leu Phe Asn Gly Gly Glu Gly Tyr Arg Val Glu Glu Ser Asp Gly Cys
 500 505 510
 Leu Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp
 515 520 525
 Lys Leu Ser Thr Asn
 530

<210> 32
 <211> 95
 <212> PRT
 <213>拟南芥

<400> 32
 Asn Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala Val
 1 5 10 15
 Gln Lys Glu Asn Leu Thr Val Ala Glu Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly
 20 25 30
 Phe Leu Ala Val Ser Gln Ile Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr
 35 40 45
 Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Leu Ser Pro Ser Gln
 50 55 60
 Ser Pro Ile Asp His Ser Leu Ser Asp Thr Leu Gln Met His Phe Tyr
 65 70 75 80
 Glu Thr Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln
 85 90 95

<210> 33
 <211> 587
 <212> PRT
 <213>拟南芥

<400> 33
 Met Lys Arg Asp His His Gln Phe Gln Gly Arg Leu Ser Asn His Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ile Ser Lys Asp Lys Met Met Met Val
 20 25 30
 Lys Lys Glu Glu Asp Gly Gly Gly Asn Met Asp Asp Glu Leu Leu Ala
 35 40 45
 Val Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Glu Val Ala Leu

[0027]

Glu Arg His Glu Thr Leu Ser Gln Trp Gly Asn Arg Phe Gly Ser Ser
 515 520 525
 Gly Leu Ala Pro Ala His Leu Gly Ser Asn Ala Phe Lys Gln Ala Ser
 530 535 540
 Met Leu Leu Ser Val Phe Asn Ser Gly Gln Gly Tyr Arg Val Glu Glu
 545 550 555 560
 Ser Asn Gly Cys Leu Met Leu Gly Trp His Thr Arg Pro Leu Ile Thr
 565 570 575
 Thr Ser Ala Trp Lys Leu Ser Thr Ala Ala Tyr
 580 585

<210> 34
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> 拟南芥

<400> 34

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

<210> 35
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> 拟南芥

<400> 35

Met Lys Arg Glu His Asn His Arg Glu Ser Ser Ala Gly Glu Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Met Thr Thr Val Ile Lys Glu Glu Ala Ala Gly Val Asp
 20 25 30
 Glu Leu Leu Val Val Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Asp Met Ala
 35 40 45
 Asp Val Ala His Lys Leu Glu Gln Leu Glu Met Val Leu Gly Asp Gly
 50 55 60
 Ile Ser Asn Leu Ser Asp Glu Thr Val His Tyr Asn Pro Ser Asp Leu
 65 70 75 80
 Ser Gly Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Asp Leu Asp Pro Thr Arg Ile
 85 90 95
 Gln Glu Lys Pro Asp Ser Glu Tyr Asp Leu Arg Ala Ile Pro Gly Ser
 100 105 110
 Ala Val Tyr Pro Arg Asp Glu His Val Thr Arg Arg Ser Lys Arg Thr
 115 120 125
 Arg Ile Glu Ser Glu Leu Ser Ser Thr Arg Ser Val Val Val Leu Asp
 130 135 140
 Ser Gln Glu Thr Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala

[0029]

145 150 155 160
 Glu Ala Val Gln Gln Asn Asn Leu Lys Leu Ala Asp Ala Leu Val Lys
 165 170 175
 His Val Gly Leu Leu Ala Ser Ser Gln Ala Gly Ala Met Arg Lys Val
 180 185 190
 Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Gly Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Ile Tyr
 195 200 205
 Pro Arg Asp Asp Val Ala Leu Ser Ser Phe Ser Asp Thr Leu Gln Ile
 210 215 220
 His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala
 225 230 235 240
 Asn Gln Ala Ile Leu Glu Val Phe Ala Thr Ala Glu Lys Val His Val
 245 250 255
 Ile Asp Leu Gly Leu Asn His Gly Leu Gln Trp Pro Ala Leu Ile Gln
 260 265 270
 Ala Leu Ala Leu Arg Pro Asn Gly Pro Pro Asp Phe Arg Leu Thr Gly
 275 280 285
 Ile Gly Tyr Ser Leu Thr Asp Ile Gln Glu Val Gly Trp Lys Leu Gly
 290 295 300
 Gln Leu Ala Ser Thr Ile Gly Val Asn Phe Glu Phe Lys Ser Ile Ala
 305 310 315 320
 Leu Asn Asn Leu Ser Asp Leu Lys Pro Glu Met Leu Asp Ile Arg Pro
 325 330 335
 Gly Leu Glu Ser Val Ala Val Asn Ser Val Phe Glu Leu His Arg Leu
 340 345 350
 Leu Ala His Pro Gly Ser Ile Asp Lys Phe Leu Ser Thr Ile Lys Ser
 355 360 365
 Ile Arg Pro Asp Ile Met Thr Val Val Glu Gln Glu Ala Asn His Asn
 370 375 380
 Gly Thr Val Phe Leu Asp Arg Phe Thr Glu Ser Leu His Tyr Tyr Ser
 385 390 395 400
 Ser Leu Phe Asp Ser Leu Glu Gly Pro Pro Ser Gln Asp Arg Val Met
 405 410 415
 Ser Glu Leu Phe Leu Gly Arg Gln Ile Leu Asn Leu Val Ala Cys Glu
 420 425 430
 Gly Glu Asp Arg Val Glu Arg His Glu Thr Leu Asn Gln Trp Arg Asn
 435 440 445
 Arg Phe Gly Leu Gly Gly Phe Lys Pro Val Ser Ile Gly Ser Asn Ala
 450 455 460
 Tyr Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ala Leu Tyr Ala Gly Ala Asp Gly
 465 470 475 480
 Tyr Asn Val Glu Glu Asn Glu Gly Cys Leu Leu Leu Gly Trp Gln Thr
 485 490 495
 Arg Pro Leu Ile Ala Thr Ser Ala Trp Arg Ile Asn Arg Val Glu
 500 505 510

<210> 36

<211> 95

<212> PRT

<213>拟南芥

<400> 36

Thr Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala Val
 1 5 10 15
 Gln Gln Asn Asn Leu Lys Leu Ala Asp Ala Leu Val Lys His Val Gly
 20 25 30

[0030]

Leu Leu Ala Ser Ser Gln Ala Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr
 35 40 45
 Phe Ala Glu Gly Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Ile Tyr Pro Arg Asp
 50 55 60
 Asp Val Ala Leu Ser Ser Phe Ser Asp Thr Leu Gln Ile His Phe Tyr
 65 70 75 80
 Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln
 85 90 95

<210> 37
 <211> 547
 <212> PRT
 <213> 拟南芥

<400> 37
 Met Lys Arg Gly Tyr Gly Glu Thr Trp Asp Pro Pro Pro Lys Pro Leu
 1 5 10 15
 Pro Ala Ser Arg Ser Gly Glu Gly Pro Ser Met Ala Asp Lys Lys Lys
 20 25 30
 Ala Asp Asp Asp Asn Asn Asn Ser Met Asp Asp Glu Leu Leu Ala
 35 40 45
 Val Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Glu Met Ala Glu Val Ala Gln
 50 55 60
 Lys Leu Glu Gln Leu Glu Met Val Leu Ser Asn Asp Asp Val Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Val Leu Asn Asp Ser Val His Tyr Asn Pro Ser Asp Leu Ser Asn
 85 90 95
 Trp Val Glu Ser Met Leu Ser Glu Leu Asn Asn Pro Ala Ser Ser Asp
 100 105 110
 Leu Asp Thr Thr Arg Ser Cys Val Asp Arg Ser Glu Tyr Asp Leu Arg
 115 120 125
 Ala Ile Pro Gly Leu Ser Ala Phe Pro Lys Glu Glu Glu Val Phe Asp
 130 135 140
 Glu Glu Ala Ser Ser Lys Arg Ile Arg Leu Gly Ser Trp Cys Glu Ser
 145 150 155 160
 Ser Asp Glu Ser Thr Arg Ser Val Val Leu Val Asp Ser Gln Glu Thr
 165 170 175
 Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Val Ala Cys Ala Glu Ala Ile His
 180 185 190
 Gln Glu Asn Leu Asn Leu Ala Asp Ala Leu Val Lys Arg Val Gly Thr
 195 200 205
 Leu Ala Gly Ser Gln Ala Gly Ala Met Gly Lys Val Ala Thr Tyr Phe
 210 215 220
 Ala Gln Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Asp Tyr Thr Ala Glu Thr
 225 230 235 240
 Asp Val Cys Ala Ala Val Asn Pro Ser Phe Glu Glu Val Leu Glu Met
 245 250 255
 His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala
 260 265 270
 Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Val Thr Thr Ala Arg Arg Val His Val
 275 280 285
 Ile Asp Leu Gly Leu Asn Gln Gly Met Gln Trp Pro Ala Leu Met Gln
 290 295 300
 Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser Phe Arg Leu Thr Gly
 305 310 315 320
 Ile Gly Pro Pro Gln Thr Glu Asn Ser Asp Ser Leu Gln Gln Leu Gly

[0031]

325 330 335
 Trp Lys Leu Ala Gln Phe Ala Gln Asn Met Gly Val Glu Phe Glu Phe
 340 345 350
 Lys Gly Leu Ala Ala Glu Ser Leu Ser Asp Leu Glu Pro Glu Met Phe
 355 360 365
 Glu Thr Arg Pro Glu Ser Glu Thr Leu Val Val Asn Ser Val Phe Glu
 370 375 380
 Leu His Arg Leu Leu Ala Arg Ser Gly Ser Ile Glu Lys Leu Leu Asn
 385 390 395 400
 Thr Val Lys Ala Ile Lys Pro Ser Ile Val Thr Val Val Glu Gln Glu
 405 410 415
 Ala Asn His Asn Gly Ile Val Phe Leu Asp Arg Phe Asn Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Tyr Tyr Ser Ser Leu Phe Asp Ser Leu Glu Asp Ser Tyr Ser Leu
 435 440 445
 Pro Ser Gln Asp Arg Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly Arg Gln Ile
 450 455 460
 Leu Asn Val Val Ala Ala Glu Gly Ser Asp Arg Val Glu Arg His Glu
 465 470 475 480
 Thr Ala Ala Gln Trp Arg Ile Arg Met Lys Ser Ala Gly Phe Asp Pro
 485 490 495
 Ile His Leu Gly Ser Ser Ala Phe Lys Gln Ala Ser Met Leu Leu Ser
 500 505 510
 Leu Tyr Ala Thr Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Asn Asp Gly Cys
 515 520 525
 Leu Met Ile Gly Trp Gln Thr Arg Pro Leu Ile Thr Thr Ser Ala Trp
 530 535 540
 Lys Leu Ala
 545

<210> 38
 <211> 99
 <212> PRT
 <213>拟南芥

<400> 38
 Thr Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Val Ala Cys Ala Glu Ala Ile
 1 5 10 15
 His Gln Glu Asn Leu Asn Lou Ala Asp Ala Leu Val Lys Arg Val Gly
 20 25 30
 Thr Leu Ala Gly Ser Gln Ala Gly Ala Met Gly Lys Val Ala Thr Tyr
 35 40 45
 Phe Ala Gln Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Asp Tyr Thr Ala Glu
 50 55 60
 Thr Asp Val Cys Ala Ala Val Asn Pro Ser Phe Glu Glu Val Leu Glu
 65 70 75 80
 Met His Phe Tyr Glu Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr
 85 90 95
 Ala Asn Gln

<210> 39
 <211> 523
 <212> PRT
 <213>拟南芥

[0032]

<400> 39
 Met Lys Arg Ser His Gln Glu Thr Ser Val Glu Glu Glu Ala Pro Ser
 1 5 10 15
 Met Val Glu Lys Leu Glu Asn Gly Cys Gly Gly Gly Asp Asp Asn
 20 25 30
 Met Asp Glu Phe Leu Ala Val Leu Gly Tyr Lys Val Arg Ser Ser Asp
 35 40 45
 Met Ala Asp Val Ala Gln Lys Leu Glu Gln Leu Glu Met Val Leu Ser
 50 55 60
 Asn Asp Ile Ala Ser Ser Ser Asn Ala Phe Asn Asp Thr Val His Tyr
 65 70 75 80
 Asn Pro Ser Asp Leu Ser Gly Trp Ala Gln Ser Met Leu Ser Asp Leu
 85 90 95
 Asn Tyr Tyr Pro Asp Leu Asp Pro Asn Arg Ile Cys Asp Leu Arg Pro
 100 105 110
 Ile Thr Asp Asp Asp Glu Cys Cys Ser Ser Asn Ser Asn Ser Asn Lys
 115 120 125
 Arg Ile Arg Leu Gly Pro Trp Cys Asp Ser Val Thr Ser Glu Ser Thr
 130 135 140
 Arg Ser Val Val Leu Ile Glu Glu Thr Gly Val Arg Leu Val Gln Ala
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln Leu Glu Asn Leu Ser Leu Ala
 165 170 175
 Asp Ala Leu Val Lys Arg Val Gly Leu Leu Ala Ala Ser Gln Ala Gly
 180 185 190
 Ala Met Gly Lys Val Ala Thr Tyr Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg
 195 200 205
 Ile Tyr Arg Ile His Pro Ser Ala Ala Ala Ile Asp Pro Ser Phe Glu
 210 215 220
 Glu Ile Leu Gln Met Asn Phe Tyr Asp Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe
 225 230 235 240
 Ala His Phe Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala Val Thr Thr Ser
 245 250 255
 Arg Val Val His Val Ile Asp Leu Gly Leu Asn Gln Gly Met Gln Trp
 260 265 270
 Pro Ala Leu Met Gln Ala Leu Ala Leu Arg Pro Gly Gly Pro Pro Ser
 275 280 285
 Phe Arg Leu Thr Gly Val Gly Asn Pro Ser Asn Arg Glu Gly Ile Gln
 290 295 300
 Glu Leu Gly Trp Lys Leu Ala Gln Leu Ala Gln Ala Ile Gly Val Glu
 305 310 315 320
 Phe Lys Phe Asn Gly Leu Thr Thr Glu Arg Leu Ser Asp Leu Glu Pro
 325 330 335
 Asp Met Phe Glu Thr Arg Thr Glu Ser Glu Thr Leu Val Val Asn Ser
 340 345 350
 Val Phe Glu Leu His Pro Val Leu Ser Gln Pro Gly Ser Ile Glu Lys
 355 360 365
 Leu Leu Ala Thr Val Lys Ala Val Lys Pro Gly Leu Val Thr Val Val
 370 375 380
 Glu Gln Glu Ala Asn His Asn Gly Asp Val Phe Leu Asp Arg Phe Asn
 385 390 395 400
 Glu Ala Leu His Tyr Tyr Ser Ser Leu Phe Asp Ser Leu Glu Asp Gly
 405 410 415
 Val Val Ile Pro Ser Gln Asp Arg Val Met Ser Glu Val Tyr Leu Gly
 420 425 430
 Arg Gln Ile Leu Asn Leu Val Ala Thr Glu Gly Ser Asp Arg Ile Glu

[0033]

```

                435                440                445
Arg His Glu Thr Leu Ala Gln Trp Arg Lys Arg Met Gly Ser Ala Gly
   450                455                460
Phe Asp Pro Val Asn Leu Gly Ser Asp Ala Phe Lys Gln Ala Ser Leu
465                470                475                480
Leu Leu Ala Leu Ser Gly Gly Gly Asp Gly Tyr Arg Val Glu Glu Asn
                485                490                495
Asp Gly Ser Leu Met Leu Ala Trp Gln Thr Lys Pro Leu Ile Ala Ala
                500                505                510
Ser Ala Trp Lys Leu Ala Ala Glu Leu Arg Arg
                515                520

```

<210> 40
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> 拟南芥

```

<400> 40
Thr Gly Val Arg Leu Val Gln Ala Leu Val Ala Cys Ala Glu Ala Val
  1                5                10                15
Gln Leu Glu Asn Leu Ser Leu Ala Asp Ala Leu Val Lys Arg Val Gly
                20                25                30
Leu Leu Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala Met Gly Lys Val Ala Thr Tyr
                35                40                45
Phe Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Ile His Pro Ser Ala
                50                55                60
Ala Ala Ile Asp Pro Ser Phe Glu Glu Ile Leu Gln Met Asn Phe Tyr
65                70                75                80
Asp Ser Cys Pro Tyr Leu Lys Phe Ala His Phe Thr Ala Asn Gln
                85                90                95

```

<210> 41
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 共有二聚化结构域序列

<221> 变体
 <222> 21, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 72
 <223> Xaa = Any Amino Acid

<221> 变体
 <222> 21, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 72
 <223> Xaa =任何氨基酸

```

<400> 41
Gly Val Arg Leu Val His Ala Leu Leu Ala Cys Ala Glu Ala Val Gln
  1                5                10                15
Gln Glu Asn Leu Xaa Leu Ala Asp Ala Leu Val Lys Gln Ile Gly Ile
                20                25                30
Leu Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala Met Arg Lys Val Ala Thr Tyr Phe
                35                40                45
Ala Glu Ala Leu Ala Arg Arg Ile Tyr Arg Ile Phe Pro Xaa Xaa Xaa

```

[0034]

	50					55					60					
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Asp	Xaa	Ser	Phe	Ser	Asp	Val	Leu	Gln	Met
	65					70					75					80
	His	Phe	Tyr	Glu	Ser	Cys	Pro	Tyr	Leu	Lys	Phe	Ala	His	Phe	Thr	Ala
					85					90					95	
	Asn	Gln														

<210> 42
 <211> 19
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>引物

<400> 42
 gtctgcacca tegtcaacc 19

<210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213>人工序列

<220>
 <223>引物

<400> 43
 gaagtccagc tgccagaaac c 21

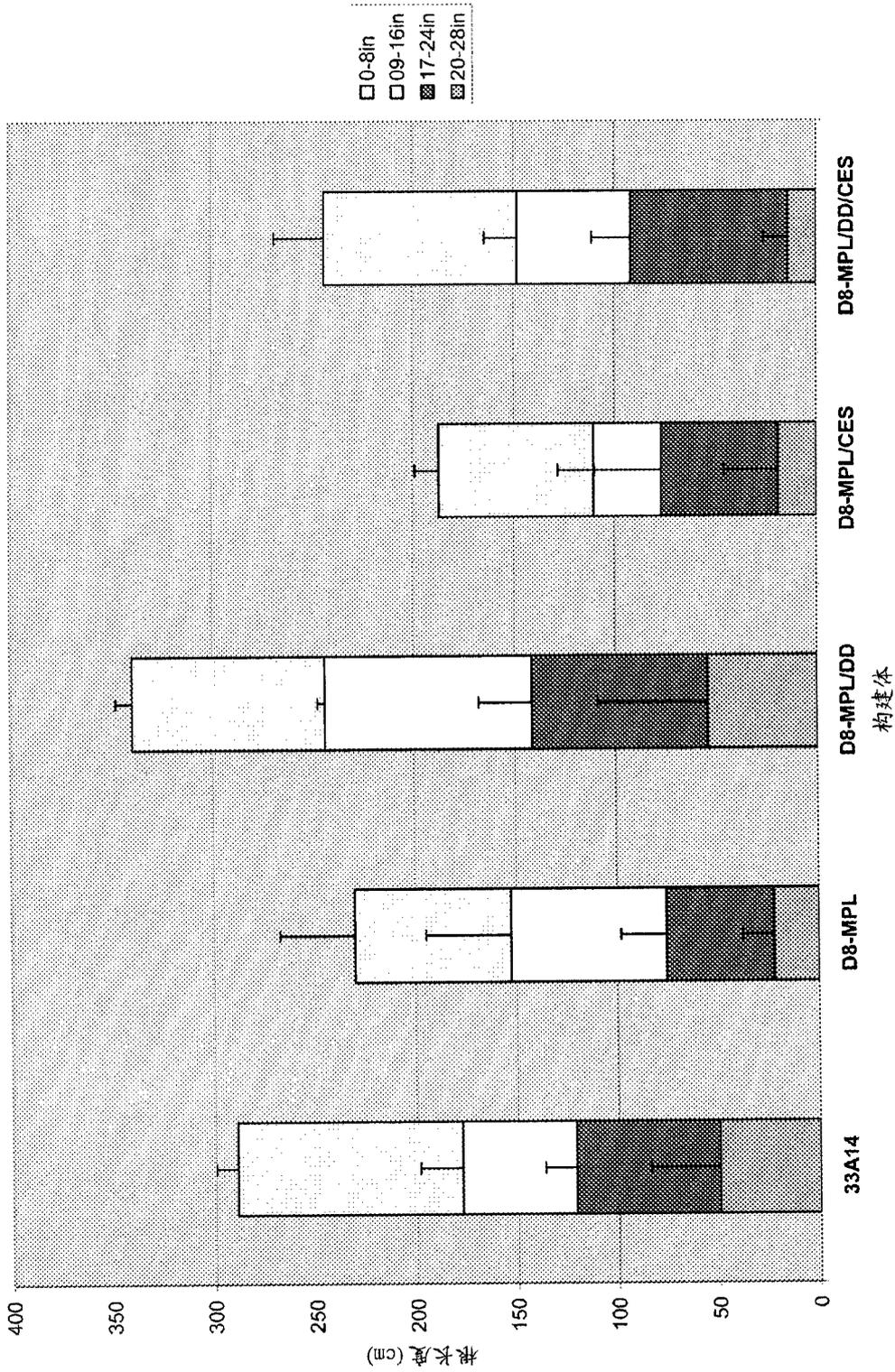


图 1

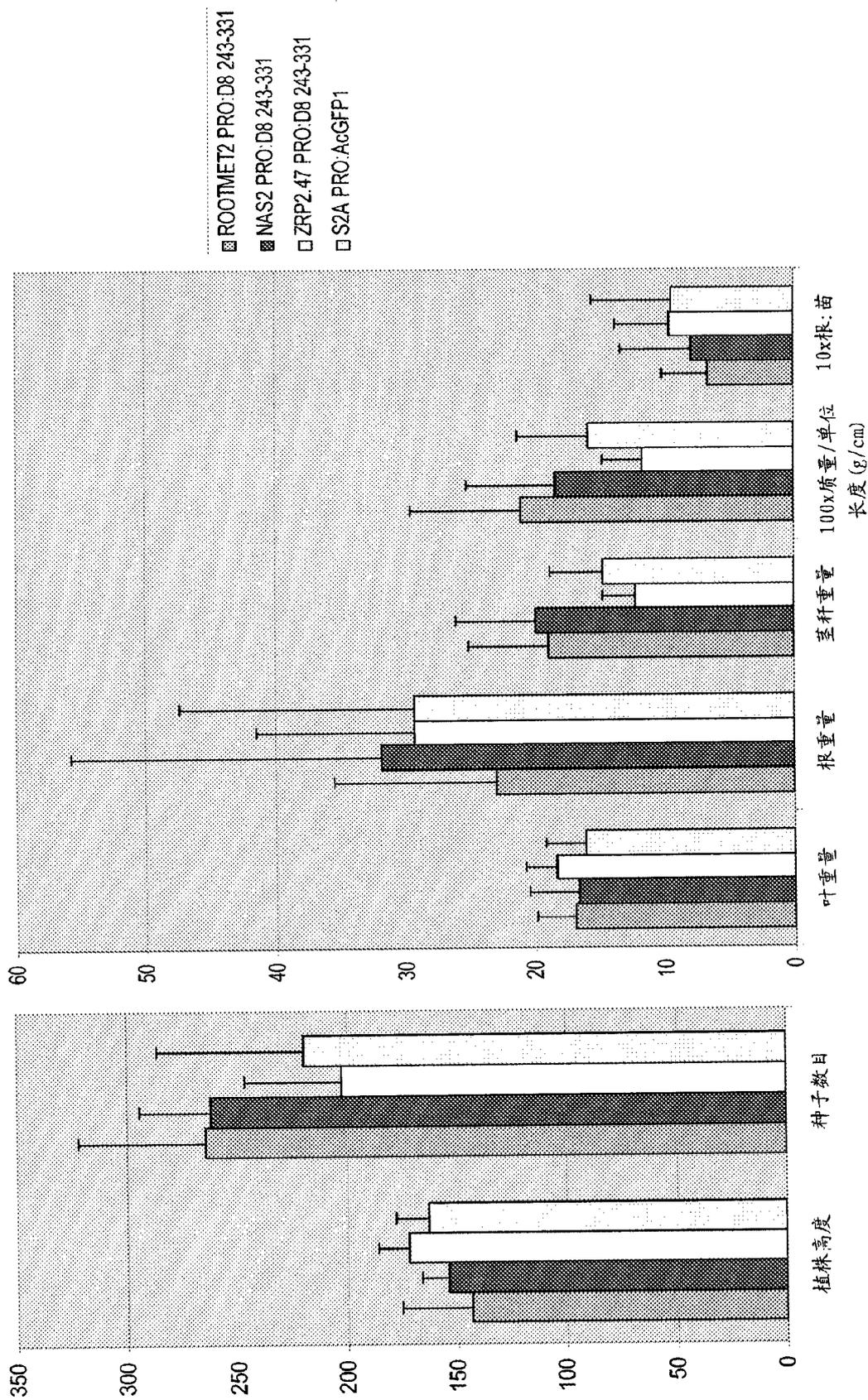


图 2

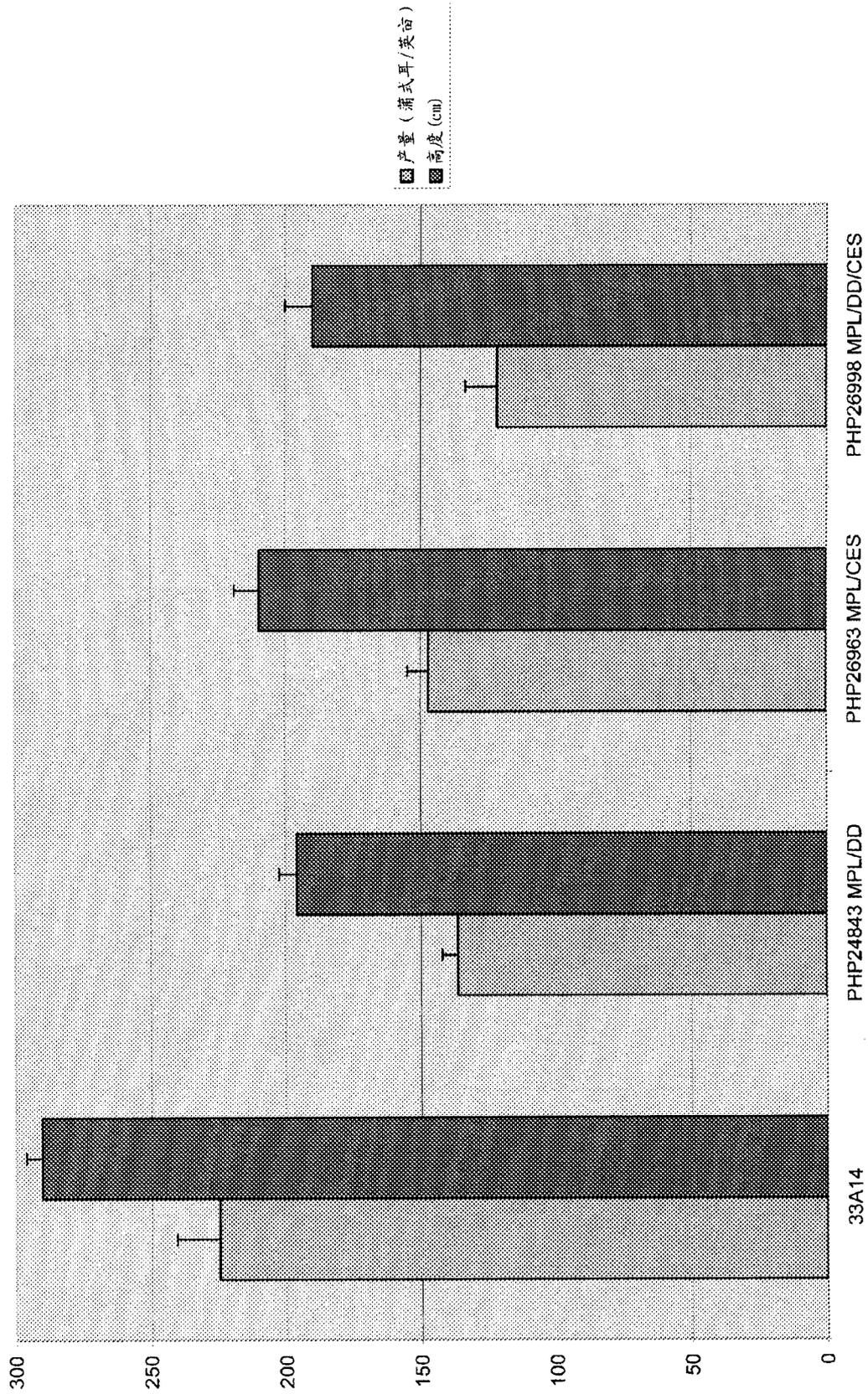


图 3

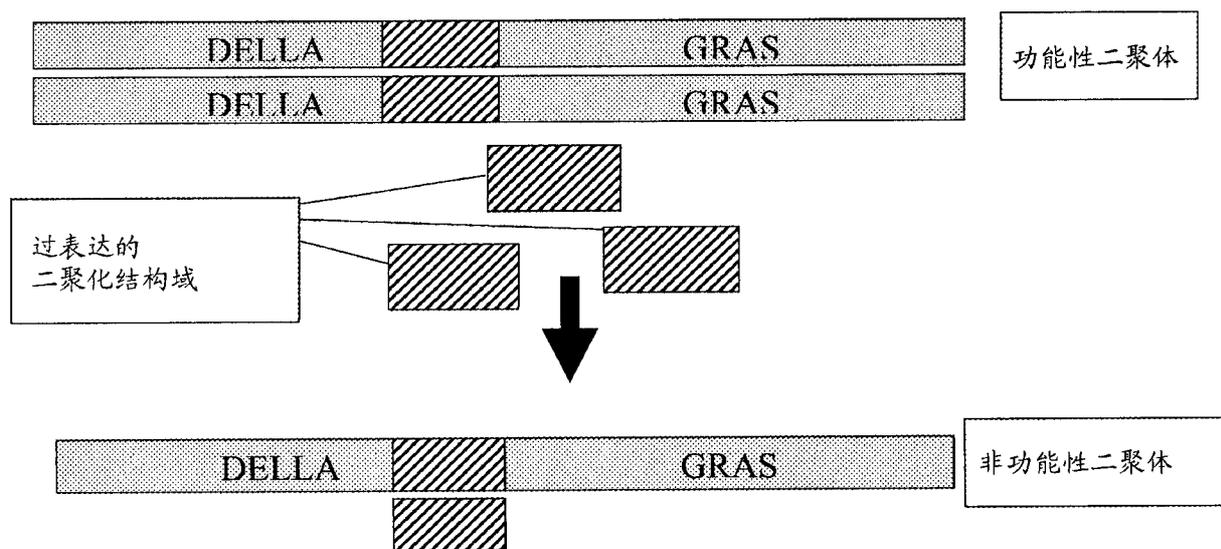


图 4

		238		287
SEQ ID NO: 24	(154)	NGIRLVHSLMACAEAVE MNNLVAEALVKQIGFLALSQVGAMRKVATYFA		
SEQ ID NO: 26	(153)	NGIRLVHSLMACAEAVE MNNLVAEALVKQIGFLAVSQVGAMRKVAIYFA		
SEQ ID NO: 28	(214)	AGVRLVHTLLACAEAVQ QENLKLADALVKHVGILAASQAGAMRKVASYFA		
SEQ ID NO: 30	(205)	AGVRLVHTLLACAEAVQ QENLKLADALVKHVGILAASQAGAMRKVASYFA		
SEQ ID NO: 32	(165)	NGVRLVHALLACAEAVQ KENLTVAEALVKQIGFLAVSQIGAMRKVATYFA		
SEQ ID NO: 34	(217)	NGVRLVHALLACAEAVQ QNNLTLAEALVKQIGCLAVSQAGAMRKVATYFA		
SEQ ID NO: 36	(148)	TGVRLVHALLACAEAVQ QNNLKLADALVKHVGLLASSQAGAMRKVATYFA		
SEQ ID NO: 38	(176)	TGVRLVHALVACAEAVQ QENLNLADALVKRVGTLASSQAGAMGKVATYFA		
SEQ ID NO: 40	(153)	TGVRLVQALVACAEAVQ LENLSLADALVKRVGLLASSQAGAMGKVATYFA		
SEQ ID NO: 19	(1)	---MLVHALLACAEAVQQENFSAEALVKQIPMLASSQGGAMRKVAAYFG		
SEQ ID NO: 41		GVRLVHALLACAEAVQQENLXLADALVKQIGILAASQAGAMRKVATYFA		
		288		336
SEQ ID NO: 24	(204)	EALARRIYRVFP -----QQHSLSDSLQIHFYETCPYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 26	(203)	EALARRIYRVFP -----LQHSLSDSLQIHFYETCPYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 28	(264)	QALARRIYGIFF -----EETLDS SFSVDLHMHFYESC PYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 30	(255)	QALARRIYGIFF -----EETLDS SFSVDLHMHFYESC PYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 32	(215)	EALARRIYRLSP ----SQSPIDHSLSDTLQMHFYETCPYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 34	(267)	EALARRIYRLSPP ----QNQIDHCLSDTLQMHFYETCPYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 36	(198)	EGLARRIYRIYPR ----DDVALS SFSDTLQIHFYESC PYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 38	(226)	QALARRIYRDYTAETDV CAAVNPFEEVLEMHFYESC PYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 40	(203)	EALARRIYRIHPS ----AAAI DPFEEIILQMNFYDSC PYLKFAHFTANQ		
SEQ ID NO: 19	(48)	EALARRVYRFRPPP --DSSL LDAAFADLLHAFHYESC PYLKFAHF----		
SEQ ID NO: 41		EALARRIYRIFPXXXXXXXXL DXS FSDVLQMHFYESC PYLKFAHFTANQ		

图 5