

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580043370.2

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 11 月 28 日

[11] 公开号 CN 101080493A

[22] 申请日 2005.12.19

[21] 申请号 200580043370.2

[30] 优先权

[32] 2004.12.17 [33] EP [31] 04029934.9

[32] 2004.12.21 [33] US [31] 60/637,900

[86] 国际申请 PCT/EP2005/013954 2005.12.19

[87] 国际公布 WO2006/063862 英 2006.6.22

[85] 进入国家阶段日期 2007.6.18

[71] 申请人 拜尔作物科学股份公司

地址 德国蒙海姆

[72] 发明人 G·科克-亚科恩 J·P·温肯
L·CJM·苏尔斯 C·弗罗贝格
R·GF·维瑟

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 凌立

权利要求书 2 页 说明书 34 页 序列表 28 页
附图 2 页

[54] 发明名称

表达右旋葡聚糖蔗糖酶和合成改性淀粉的转化植物

[57] 摘要

本发明涉及遗传修饰的植物细胞和植物，其中该遗传修饰使得在此类植物细胞和植物的质体中表达具有右旋葡聚糖蔗糖酶活性的酶。另外，本发明涉及制备此类植物细胞和植物的方式和方法。此类植物细胞和植物合成改性淀粉。本发明因此还涉及根据本发明的植物细胞和植物合成的淀粉，以及制备淀粉和制备此改性淀粉的淀粉衍生物的方法。

1. 遗传修饰的植物细胞，其特征在于所述植物细胞在其质体中具有右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的酶促活性，并且其中相对于相应的非遗传修饰的野生型植物细胞合成的淀粉，所述的遗传修饰的植物细胞合成改性淀粉。

2. 根据权利要求 1 的遗传修饰的植物细胞，其中所述植物细胞合成改性淀粉，其与相应的非遗传修饰的野生型植物细胞合成的淀粉相比，具有降低的末端黏性和/或增加的消化性。

3. 植物和/或其后代，其包含根据权利要求 1 或 2 中任一项的遗传修饰的植物细胞。

4. 根据权利要求 3 的植物和/或其后代，其是贮存淀粉的植物。

5. 根据权利要求 4 的植物和/或其后代，其是马铃薯植物。

6. 根据权利要求 3 到 5 中任一项的植物的繁殖材料，其包含根据权利要求 1 或 2 中任一项的植物细胞。

7. 根据权利要求 3 到 5 中任一项的植物的可收获部分，其包含根据权利要求 1 或 2 中任一项的植物细胞。

8. 制备根据权利要求 3 到 5 中任一项的遗传修饰植物的方法，其中

a) 用包含右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子的核酸分子转化植物细胞，

b) 从步骤 a) 获得的植物细胞再生植物，以及

c) 如果需要，从步骤 b) 获得的植物产生更多植物。

9. 根据权利要求 8 的方法，其中将步骤 a) 中右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸与质体信号序列的编码核酸分子翻译融合。

10. 根据权利要求 8 的方法，其中将右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子整合到植物的质体基因组中。

11. 根据权利要求 8 到 10 中任一项的方法，或根据权利要求 1 或 2 中任一项的植物细胞，或根据权利要求 3 到 5 中任一项的植物，其中右旋葡

聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子选自：

- a) 核酸分子，其编码包含 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 给出的氨基酸序列的蛋白质；
- b) 编码蛋白质的核酸分子，所述蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 给出的氨基酸序列具有至少 70% 的同一性；
- c) 核酸分子，其包含 Seq ID NO:3 所示的核苷酸序列或其互补序列；
- d) 核酸分子，其核酸序列与 a) 或 c) 所述的核酸序列具有至少 70% 的同一性；
- e) 核酸分子，其核苷酸序列因遗传密码子的简并性而不同于在 a)、b)、c) 或 d) 中鉴定的核酸分子的序列；以及
- f) 核酸分子，其代表 a)、b)、c)、d) 或 e) 中鉴定的核酸分子的片段、等位基因变体和/或衍生物。

12. 制备改性淀粉的方法，其包括从根据权利要求 1 到 2 中任一一项的植物细胞、从根据权利要求 3 到 5 中任一一项的植物，从根据权利要求 7 的植物的可收获部分，或从通过权利要求 8 到 11 中任一一项的方法获得的植物提取淀粉的步骤。

13. 根据权利要求 12 的方法获得的改性淀粉。

14. 产生衍生淀粉的方法，其中根据权利要求 13 的改性淀粉是衍生的。

15. 根据权利要求 14 的方法获得的衍生淀粉。

16. 根据权利要求 1 或 2 中任一一项的植物细胞、根据权利要求 3 到 5 中任一一项的植物，根据权利要求 7 的植物的可收获部分，或权利要求 8 到 11 中任一一项的方法获得的植物的用途，其用于产生改性淀粉。

17. 右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子的用途，其用于制备根据权利要求 1 或 2 中任一一项的遗传修饰的植物细胞，根据权利要求 3 到 5 中任一一项的遗传修饰的植物、根据权利要求 6 的繁殖材料，或根据权利要求 7 的植物的可收获部分。

表达右旋葡聚糖蔗糖酶和合成改性淀粉的转化植物

本发明涉及遗传修饰的植物细胞和植物，其中遗传修饰使得在此类植物细胞和植物的质体中表达具有右旋葡聚糖蔗糖酶活性的酶。另外，本发明涉及制备此类植物细胞和植物的方式和方法。此类植物细胞和植物合成改性淀粉。本发明因此还涉及根据本发明的植物细胞和植物合成的淀粉，以及制备淀粉和制备此改性淀粉的淀粉衍生物的方法。

鉴于目前植物成分作为原材料可再生来源的日益增长的重要性，生物技术研究的目标之一是尝试使这些植物原料适应加工工业需要。为了在尽可能多的领域内使用再生性原材料，更重要的是得到更多种的物质。除了油、脂肪和蛋白质，多糖构成了源自植物的基本再生性原材料。除了纤维素，淀粉在多糖中占重要位置，是高等植物中最重要的贮藏物质之一。

淀粉在绿叶的叶绿体中（暂时淀粉）和块茎、根和种子的造粉体中（贮存淀粉）作为颗粒储存（Kossmann 和 Lloyd 2000）。

多糖淀粉是由化学均一的基础组件——葡萄糖分子构成的聚合物。但是，多种类型的分子构成了高度复杂的混合物，所述分子在它们的聚合程度和葡萄糖链的分支程度上彼此不同。因此，淀粉不是均一的原材料。直链淀粉和支链淀粉之间区别明显，前者是由 α -1,4-糖苷键支化的葡萄糖分子组成的基本不分支的聚合物，而后者是多种分支的葡萄糖链的复杂混合物。分支是由于其他的 α -1,6-糖苷键互连产生的。

在植物贮藏器官中，淀粉的生物合成在造粉体中发生并且是不同反应如合成（葡糖残基的聚合）、重排和降解的结果，在所述反应中多种淀粉合酶（E.C.2.4.1.21）、转移酶（支化酶（E.C.2.4.1.18）和岐化酶（E.C.2.4.1.25））以及水解酶（脱支酶（E.C.3.2.1.41））分别起到关键作用。

为了使淀粉的用途尽可能广，看来需要提供能够合成特别适合于多种用途的改性淀粉的植物。除育种方法外，提供此类植物的一种可能性是通

过重组 DNA 技术对产生淀粉的植物的淀粉代谢进行特异性的遗传修饰。

多年以来,已经进行了一些旨在将造粉体转变成更通用的多糖工厂的研究。为此目的,已经用质体靶向运输装备了一些微生物酶,并且已经研究了它们对于淀粉结构和功能的影响。

一些细菌具有一系列称作葡聚糖蔗糖酶的酶,其可以将 1,6-连接的或 1,3-连接的葡糖残基连接(紧邻)到麦芽糖糊精上。几乎没有例外的,葡聚糖蔗糖酶是由乳酸细菌产生的胞外酶,所述细菌如肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)菌株、口链球菌属(*Oral Streptococci*),乳杆菌属(*Lactobacillus*)和乳球菌属(*Lactococcus*)的一些物种(Roby 1995; van Geel-Schutten 等人 1999)。另外,它们是由其他细菌如一些奈瑟氏球菌属(*Neisseria*)菌株产生的(Hehre 等人, 1949)。这些菌株参与天然的不同过程。一些菌株在人和动物的口腔中建群并且诱导龋齿的形成。其他菌株可以侵袭嗓子,如共生奈瑟氏球菌属物种。一些乳杆菌属物种增加发酵牛奶的黏性。

葡聚糖蔗糖酶催化来自蔗糖的葡萄糖残基的聚合,这使得产生大量不同的 α -葡聚糖,其具有不同大小和结构、并且由不同连接类型组成。

可以根据形成的葡聚糖的结构,特别是合成的糖苷键的性质和频率来划分葡聚糖蔗糖酶。

右旋葡聚糖蔗糖酶(DSR)(E.C.2.4.1.5)合成称作“右旋葡聚糖”的葡聚糖,其主要是由在主直链中的 α -(1 $\rightarrow$ 6)葡糖残基组成并且通过不同比例的 α -(1 $\rightarrow$ 2)、 α -(1 $\rightarrow$ 3)或 α -(1 $\rightarrow$ 4)键来分支(Jeanes 等人, 1954; Sidebotham, 1975; Roby, 1995)。

右旋葡聚糖的生物合成是在蔗糖存在时通过乳杆菌属、明串珠菌属(*Leuconostoc*)和链球菌属(*Streptococcus*)细菌介导的。

编码右旋葡聚糖蔗糖酶的核酸是本领域已知的并且已经鉴别了多种不同右旋葡聚糖蔗糖酶的多种不同序列(GenBank 数据库)。

肠膜明串珠菌 NRRL B-512F 产生的右旋葡聚糖是水溶性的,并且由主链中 95%的 α -(1 $\rightarrow$ 6)键和 5%的 α -(1 $\rightarrow$ 3)侧链组成(van Cleve 等人,

1956)。其生物合成是由右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S (EC 2.4.1.5) 介导的, 所述右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 是 1,527 个氨基酸的葡糖基转移酶 (Wilke-Douglas 等人, 1989; Monchois 等人, 1997)。其催化性质总结如下: 在蔗糖切割后, 通过所谓的双位插入机制将葡萄糖残基转移到增长的右旋葡聚糖链上, 或转移到受体分子上 (Robyt, 1995; Monchois 等人, 1999)。

在 WO 89/12386 中和 Quirasco 等人(1999)报道了来自肠膜明串珠菌 NRRL B-512F 的 Dsr-S 基因序列; GenBank (登录号 AJ271107)。

大多数葡聚糖蔗糖酶共有由四个不同的区域组成的共同结构: 信号肽、可变区、催化结构域和葡聚糖结合结构域 (GBD) (Monchois 等人, 1999, FEMS Microbiology Letters 177, 243-248; Monchois 等人, 1999, FEMS Microbiology Reviews 23, 131-151)。

当通过其天然细菌宿主表达时, 信号肽由 35-38 个氨基酸组成并且用于蔗糖酶的分泌。信号肽之后是 140-261 个氨基酸的可变区。Janecek 等人 (2000)表明保守的、长重复元件 (类 A 重复) 存在于肠膜明串珠菌 NRRL B-512F(DSR-S)、NRRL B-1299(DSR-B)的右旋葡聚糖蔗糖酶此区域的下游部分。已经假设这些重复在葡聚糖结合中起到重要作用。然而, 此区域似乎对于酶活性是不重要的, 因为肠膜明串珠菌 NRRL B-1299 产生的并且催化聚合物 (除 α -(1 $\rightarrow$ 6)酮外还包含 27%到 35%的 α -(1 $\rightarrow$ 2)支化键) 形成的 DSR-A 没有此区域并且仍然是有活性的。

催化结构域是由大约 900 个氨基酸组成并且在明串珠菌属和链球菌属物种中是高度保守的(MacGregor 等人 1996)。催化结构域还被称作蔗糖结合结构域, 这是因为它包含在结合和切割蔗糖分子中起到重要作用的天冬氨酸残基和谷氨酸残基的催化三联体。

葡聚糖结合结构域包含大约 500 个氨基酸, 并且由通过共有序列定义的名称为 A、B、C、D 的重复组成 (Monchois 等人 1998, 1999)。然而, 这些重复的数量和组织状态在葡聚糖蔗糖酶中是不同的, 并且已经表明确保葡聚糖结合性质所必需的这些重复单元的最小数量根据酶而不相同, 并且更特别的是对于产生可溶的葡聚糖的酶和产生不溶葡聚糖的酶是不同的

(Monchois 等人, 1999)。

通过葡聚糖蔗糖酶对葡聚糖链的延长与通过淀粉合酶对葡聚糖链的延长很不相同。首先, 优选的底物是蔗糖而不是 ADP-葡萄糖。其次, 通过所谓的双位插入机制将葡萄糖残基添加到增长的葡聚糖链的还原端 (Robyt 1995)。

另外, 葡聚糖的支化不是如同在淀粉生物合成中通过支化酶进行, 而是通过由葡聚糖蔗糖酶自身催化的所谓的受体反应来发生 (Robyt, 1995)。认为葡聚糖蔗糖酶包含可以结合受体分子如新生的葡聚糖链或麦芽糖糊精的受体结合位点 (Su 和 Robyt, 1994)。

催化受体反应 (特别是用淀粉聚合物或麦芽糖糊精) 的效率仍然是不可预知的, 这是因为并不理解且很少有文献记载受体反应中的结构-功能关系。看起来仍然是相对受体效率取决于受体分子的大小 (Fu 等人 1990), 并且不确定的是支链淀粉和直链淀粉可以是葡聚糖蔗糖酶的受体分子。

淀粉聚合物的改性是通过将大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 糖原合酶 (GLGA) 和糖原支化酶 (GLGB) 靶向到马铃薯造粉体上来实现的 (Shewmaker 等人 1994; Kortstee 等人 1996)。在两种情形中, 链延长和支化的天然平衡被打破, 产生了具有改变的物理性质和具有更多分支的聚合物的淀粉颗粒。

将新葡糖残基连接到淀粉聚合物上也是目标。为此目的, 将枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 果聚糖蔗糖酶 (E.C.2.4.1.10) 引入到马铃薯块茎造粉体中 (Gerrits 等人 2001)。果聚糖蔗糖酶可以将供体底物蔗糖的果糖部分聚合成高分子量的果聚糖。但是, 淀粉产量大幅减少并且淀粉形态显著改变。

也已经尝试了将植物中的淀粉转变成高价值的环状寡糖, 其可以在它们的非极性腔中容纳疏水物质并且可以用于多种食品和药物应用。将来自肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的环糊精葡糖基转移酶 (CGT 酶; E.C.2.4.1.19) 引入到马铃薯造粉体 (Oakes 等人 1991) 用于环糊精产生。只有 0.01% 的内源淀粉转变成目的产物, 并且此产物很难从植物材料中回

收。

这些实施例证明了细菌酶可以是淀粉改性的潜在有力工具，但是它们在植物中的性能是预先不可预知的（Kok-Jacob A.等人, 2003）。

因此本发明的目标是基于提供改性淀粉、合成此类改性淀粉的新植物细胞和/或植物，以及产生所述植物的方法。

附图说明

图 1: 质粒 pBinDsrS 的图谱

图 2: 与野生型 Kardal 植物 (Kardal) 相比，在所选转化体 (dsrS30) 的淀粉上通过进行扫描电子显微镜分析观察到的改性淀粉颗粒形态。

因此，本发明涉及遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物，其特征在于它们在质体中表现出右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的酶促活性，并且其中所述遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物分别合成改性淀粉（与对应的非遗传修饰的野生型植物细胞或野生型植物合成的淀粉相比）。

术语“遗传修饰的”或“转化的”是指在其基因组中稳定整合了至少一种转基因的植物细胞或植物。优选的，转基因包含嵌合核酸序列，其含有至少一种源自转化的植物细胞或转化的植物之外的其他生物的元件（异源转基因）。特别的，转基因是至少包含启动子、编码序列和任选的终止信号的重组转基因。最优选的，重组转基因的编码序列编码右旋葡聚糖蔗糖酶蛋白质，最优选是右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质。

与本发明相关的术语“野生型植物细胞”或“野生型植物”意思是将所考虑的植物细胞或植物用作制备本发明的植物细胞的起始材料，即除了引入的遗传修饰外，它们的遗传信息对应于本发明的植物细胞的遗传信息。

与本发明相关的术语“对应”意思是，一些目标的比较中，相互比较的所考虑的目标保持在相同的条件下。与本发明相关，与“野生型植物细胞”或“野生型植物”相关的术语“对应”意思是相互比较的植物细胞或植物在相同的培养条件下培养并且它们具有相同的培养进程。

在此,在本发明的框架内,术语“活性”意思分别是转基因编码序列的表达和/或转基因编码序列编码的蛋白质的存在,和/或在遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物中转基因编码的蛋白质产生的产物的存在。

转基因编码序列的表达例如可以通过测量转基因转录物的量来确定,例如使用 Northern 印迹分析或 RT-PCR。

例如可以通过免疫学方法如 Western 印迹分析、ELISA (酶联免疫吸附测定) 或 RIA(放射免疫测定)确定转基因编码的蛋白质的存在,其在所考虑的遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物中产生相应的蛋白质活性。在转基因编码右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的情形中,遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物中 DSR-S 蛋白质的存在可以例如借助于天然丙烯酰胺凝胶电泳来证明。在进行其时,首先将包含蛋白质的植物细胞或植物提取物电泳分离,并且在包含蔗糖的相应的缓冲液温育丙烯酰胺凝胶后,将丙烯酰胺凝胶用过碘酸希夫染色法染色 (Miller 和 Robyt, 1986, Analytical Biochemistry 156, 357-363; WO 00 47727)。

例如可以通过根据在本说明书实施例 3 中描述的方法,免疫分析证明在用右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸序列转化的本发明植物细胞或本发明植物中产生的产物右旋葡聚糖的存在。

将与本发明相关的术语“右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质”理解为从蔗糖催化右旋葡聚糖合成的酶。合成的右旋葡聚糖是由主链中的 α -1,6-连接的葡萄糖单元组成的,并且表现出 α 1,3-连接的侧链。优选的,本发明的右旋葡聚糖蔗糖酶蛋白质合成具有大约 5% 的 α -1,3-键的右旋葡聚糖。

将术语“右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质”进一步定义为与在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 下鉴定的氨基酸序列具有至少 70%、优选至少 80%、更优选至少 90%,并且进一步优选是至少 95% 的同一性,并且具有与来自肠膜明串珠菌的 Dsr-S 基因(登录号 AJ271107)编码的酶相同的催化性质。

将与本发明相关的术语“转基因”理解为意思是这样的分子,即其在对应的非遗传修饰的野生型植物细胞或非遗传修饰的野生型植物中非天然存在,或者在非遗传修饰的野生型植物细胞或非遗传修饰的野生型植物中不

以具体的空间排列天然存在，或位于非遗传修饰的野生型植物细胞或非遗传修饰的野生型植物基因组中非天然存在的位置。

与本发明相关的术语“重组”意思是由不同元件组成的核酸分子，它的特异性空间组合排列在植物细胞或植物中非天然存在。

大量的技术可以用于将 DNA 引入到植物宿主细胞中。这些技术包括使用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 或发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 作为转化介质的使用 T-DNA 的植物细胞的转化、原生质体融合、注射、DNA 的电穿孔、通过生物射弹方法及其他可能方法引入 DNA。

农杆菌介导性植物细胞转化的用途已深入研究并且充分描述于 EP 120516; Hoekema, 在 *The Binary Plant Vector System* Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam(1985) 第五章; Fraley 等人, *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 1-46 以及 An 等人, *EMBO J.* 4, (1985), 277-287。对于马铃薯转化, 例如参见 Rocha-Sosa 等人, *EMBO J.* 8, (1989), 29-33。

也已描述通过基于农杆菌属转化的载体对单子叶植物的转化(Chan 等人, *Plant Mol. Biol.* 22, (1993), 491-506; Hiei 等人, *Plant J.* 6, (1994) 271-282; Deng 等人, *Science in China* 33, (1990), 28-34; Wilmink 等人, *Plant Cell Reports* 11, (1992), 76-80; May 等人, *Bio/Technology* 13, (1995), 486-492; Conner 和 Domisse, *Int. J. Plant Sci.* 153(1992), 550-555; Ritchie 等人, *Transgenic Res.* 2, (1993), 252-265)。转化单子叶植物的备选系统是通过生物射弹方法转化(Wan 和 Lemaux, *Plant Physiol.* 104, (1994), 37-48; Vasil 等人, *Bio/Technology* 11(1993), 1553-1558; Ritala 等人, *Plant Mol. Biol.* 24, (1994), 317-325; Spencer 等人, *Theor. Appl. Genet.* 79, (1990), 625-631)、原生质体转化、部分通透性细胞的电穿孔以及通过玻璃纤维的 DNA 引入。具体而言, 对玉米的转化已在文献中多次描述(参考例如 WO95/06128、EP0513849、EP0465875、EP0292435; Fromm 等人, *BioTechnology* 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm 等人, *Plant Cell* 2, (1990), 603-618; Koziel 等人, *Biotechnology* 11(1993), 194-200; Moroc

等人, Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726)。

对其他类型谷类的成功转化也已经描述, 例如对大麦的转化(Wan 和 Lemaux, 见上; Ritala 等人, 见上; Krens 等人, Nature 296, (1982), 72-74)以及对小麦的转化(Nehra 等人, Plant J. 5, (1994), 285-297)。在本发明的框架内以上的全部方法均适合。

与本发明相关的, 可以将引入的核酸整合到核基因组中或整合到植物细胞的质体基因组中。

质体转染的经典方法包括用携带 DNA 分子的微粒轰击叶子 (Svab 等人, 1993)。现今, 质体稳定转染在烟草物种烟草 (*N. tabaccum*) 中常规进行 (Svab 和 Maliga, 1990; Svab 等人, 1993)。在稻 (Khan 和 Maliga, 1999)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) (Sikdar 等人, 1998)、马铃薯 (Sidorov 等人, 1999)、菜籽 (WO 00/39313)、番茄 (Ruf 等人, 2001) 和大豆 (WO 04/053133) 中有新进展。得到转基因植物的方法的实例描述于专利申请 WO 04/055191 中。

其中, 根据本发明的植物细胞和根据本发明的植物可以这样来分别区别于野生型植物细胞和野生型植物, 即它们包含至少一个拷贝的稳定整合到其基因组中的外源核酸分子, 其中外源核酸分子编码右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质。

另外, 根据本发明的植物细胞和根据本发明的植物优选的通过下列特征分别区别于野生型植物细胞或野生型植物: 根据本发明的植物细胞或根据本发明的植物具有引入的核酸分子的转录物。这些可以例如通过 Northern 印迹分析或通过 RT-PCR (反转录聚合酶链式反应) 来确定。优选的, 根据本发明的植物和根据本发明的植物细胞包含引入的核酸分子编码的蛋白质。这可以通过免疫学方法如具体是通过 Western 印迹分析来证明。

另外, 根据本发明的植物细胞和根据本发明的植物可以更优选的通过它们合成右旋葡聚糖的特征来分别区别于野生型植物细胞或野生型植物。优选的, 本发明的植物细胞或本发明的植物在其质体中产生右旋葡聚糖。

术语“与野生型植物细胞合成的淀粉相比被改性的淀粉”或“改性淀粉”意思是与在野生型植物细胞中合成的淀粉相比，例如其物理-化学性质、糊化性质（**pastification**）、淀粉颗粒的大小和/或形状不同的淀粉。

与野生型淀粉相比，此类淀粉特别在其黏性和/或此淀粉胶的凝胶化性质和/或其可以被消化的能力上改变。

黏性方面的修饰可以通过多种方法来测量，并且特别是根据制造商的说明，通过 **Thermo Haake** 可视流变仪（**Thermo Electron** 公司），或通过快速黏度分析仪（**RVA**），例如快速黏度分析仪 **Super3** (**Newport Scientific Pty Ltd, Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, 澳大利亚**)。根据引入本说明书作为参考的制造商的操作手册，将黏性值表示为厘泊（**cP**）。

通过快速黏度分析仪（**RVA**）确定黏性特征的优选的方式和用于对比不同样品的参数描述在本发明的常规方法（方法1）中。

通过 **thermo Haake** 可视流变仪确定黏度性质的另一优选方式描述在本发明常规方法（方法2）中。

淀粉胶的凝胶化性质（或凝胶浓度）的确定可以通过物性分析仪（**Texture Analyser**）确定，例如，根据引入本说明书作为参考的制造商操作手册的物性分析仪 **TA-XT2** (**Stable Micro Systems – Surrey, 英国**)。

通过物性分析仪 **TA-XT2** 确定淀粉胶的凝胶化性质的优选方法描述于本发明常规方法（方法3）中。

被消化的能力可以通过确定消化的淀粉的百分数来确定，这使用引入本说明书作为参考的 **Englyst H.N.**等人，**European Journal of Clinical Nutrition** 4, Suppl.2, S33-S50 的方法，基于抗性淀粉 **RS III** 类的确定，其是例如通过热和/或酶促处理得到并且之后回生的难消化的回生淀粉。

可以根据在本文引入说明书作为参考的 **WO 00/02926** 中 **RS** 含量确定的信息来改变 **Englyst** 的方法。得到的方法描述在本发明常规方法（方法4）中。

另外，本发明涉及本发明的遗传修饰的植物细胞或遗传修饰的植物，

其特征就在于所述的植物细胞或所述的植物分别合成这样的改性淀粉，其与野生型植物细胞合成的淀粉相比，具有减少的末端黏性和/或增加的消化性。

与本发明相关的，可以通过可视流变仪，特别是 Thermo Haake 可视流变仪或快速黏度分析仪来测量末端黏性。确定末端黏性的优选方法描述在本发明常规方法（方法 1 和 2）中。

优选的，通过可视流变仪，特别是 Thermo Haake 可视流变仪测量的末端黏性的减少至少是 15%，优选至少是 20%，更优选至少是 25%，最优选至少是 30%。

与本发明相关的，可以根据 Englyst 方法，或通过根据 WO 00/02926 修改的 Englyst 方法，测量消化性。确定消化性的优选方法描述在本发明常规方法（方法 4）中。

优选的，根据 Englyst 方法或根据依照在 WO 00/02926 中 RS 含量确定的信息修改的 Englyst 方法测量的消化性的增加至少是 12%，优选至少是 13%，更优选至少是 14%，最优选至少是 15%。

另外，本发明涉及本发明的遗传修饰的植物细胞或本发明的遗传修饰的植物，其具有整合到其基因组中的转基因，所述转基因包含在转录方向以功能性方式彼此连接的：

- 在植物细胞中起始转录的启动子序列，
- 编码右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的异源核酸序列，以及
- 任选在植物细胞中有活性的终止序列。

将与本发明相关的术语“基因组”理解为意思是存在于植物细胞中的遗传物质的总体。本领域技术人员已知，与细胞核一样，其他区室（例如质体、线粒体）也包含遗传物质。

在优选的实施方案中，将核酸构建体整合到植物细胞的核基因组中。因此通过使用靶向到目标细胞区室的转运肽，可以实现右旋葡聚糖蔗糖酶蛋白质到具体的细胞区室如质体的转运。将编码转运肽的核酸序列插入到编码序列之前。编码转运肽的序列可以来自任何编码植物蛋白质的核酸序

列, 所述植物蛋白质在胞质中表达并且转运到目标细胞区室中。可以通过对比编码具体多肽的信使 RNA 和成熟蛋白质的氨基酸序列, 来鉴定转运肽。在成熟蛋白质中缺失并且由开始于起始密码子(一般是甲硫氨酸)的对应信使 RNA 编码的氨基酸序列通常是转运肽, 或通常包含转运肽。技术人员能够使用转运肽预测程序, 例如 Chloro 1.1 服务器(Emanuelsson O. 等人, 1999, Protein Science:8:978-984)确定编码转运肽的序列。

转运肽是能够将与转运肽连接的蛋白质定向到目标细胞区室的氨基酸序列, 并且可以是全天然存在(野生型)的转运肽、其功能性片段、其功能性突变体或嵌合转运肽, 其中至少两个转运肽彼此连接或不同转运肽的部分以功能性方式彼此连接。此类嵌合转运肽作为最优的转运肽报道在 EP0508909 和 EP0924299 中。

相对于编码融合到转运肽上的酶的核酸序列, 编码转运肽的核酸可以是异源的, 这意味着编码转运肽的核酸序列和编码待定向到质体的酶的核酸序列来源于不同的基因, 该基因同样可以来源于不同的物种。

作用为将翻译连接其的酶靶向到质体(如叶绿体或造粉体)的转运肽被称作质体转运肽。

本发明另外涉及本发明遗传修饰的植物细胞或本发明遗传修饰的植物, 其具有整合到其基因组中的核酸构建体, 所述核酸构建体包含在转录方向以功能性方式彼此连接的:

- 在植物细胞中起始转录的启动子序列,
- 编码翻译融合的质体转运肽的异源核酸序列
- 编码右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的异源核酸序列, 以及
- 任选在植物细胞中有活性的终止序列。

术语“以功能性方式彼此连接”意思是核酸构建体的元件以这样的方式彼此连接, 即其允许编码区的表达。

与本发明相关的术语“翻译融合的”应当意思是以这样方式的核酸序列融合, 即它们代表单可读框, 其翻译时转录产生编码单蛋白质的单信使 RNA。

质体转运肽可以选自编码蜡质蛋白质 (Klösgen 等人, Mol Gen Genet. 217 (1989), 155-161) / 编码核酮糖二磷酸羧化酶小亚基 (Wolter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 85 (1988), 846-850; Nawrath 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 10 美国 91 (1994), 12760-12764) 的基因转运肽、NADP-苹果酸脱氢酶的基因转运肽 (Gallardo 等人, Planta 197 (1995), 324-332) 、谷胱甘肽还原酶 (Glutathione-reductase) (Creissen 等人, Plant J. 8 (1995), 167-175), EPSPS (US 5,188,642) 的基因转运肽, 并且最优的转运肽描述在 EP0508909 和 E00924299 中。这些实施例是非限制性的。

在优选的实施方案中, 编码铁氧还原蛋白还原酶基因质体转运肽的核酸与右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸序列翻译融合 (Smeekens 等人, 1985; Pilon 等人, 1995) 。

在另一优选的实施方案中, 铁氧还原蛋白还原酶基因质体转运序列来源于菠菜。

在另一优选的实施方案中, 编码在 EP0508909 和 EP0924299 中描述的最优质体转运肽的核酸序列与右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸序列翻译融合。

用于构建本发明核酸构建体的技术是技术人员熟知的。作为非限制性实例, 可能提及在 Sambrook 等人 (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. 编著, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) 中描述的技术。

另外, 包含根据本发明植物细胞的植物和/或其后代也是本发明的主题。此类的植物可以使用本领域技术人员已知的方法, 通过再生从本发明的植物细胞产生, 所述方法如在“plant Cell Culture Protocols” 1999, R.D. Hall 编著, Humana 印刷, ISBN 0-89603-549-2 中描述的方法。

原则上, 根据本发明的植物可以是任何植物物种的植物, 即单子叶植物和双子叶植物。它们优选是有用的植物, 即由人栽培用于食物或技术目的, 特别是工业目的的植物。

在另外优选的实施方案中, 根据本发明的植物是贮存淀粉的植物。术

语“贮存淀粉的植物”包括具有贮存淀粉植物部分的所有植物，例如玉米、稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦、木薯、马铃薯、西米、绿豆、豌豆或高粱。优选的贮存淀粉植物部分是例如块茎、贮藏根、包含胚乳的颖果；块茎是特别优选的；马铃薯植物的块茎是尤其优选的。

在另外优选的实施方案中，本发明涉及根据本发明的贮存淀粉的植物，其是马铃薯植物。

与本发明相关的术语“马铃薯植物”或“马铃薯”意思是指茄属 (*Solanum*) 的植物物种，特别是茄属中产生块茎的物种并且尤其是马铃薯 (*Solanum tuberosum*)。

本发明还涉及本发明植物的繁殖材料，其含有本发明的植物细胞。

在这里，术语“繁殖材料”包括适于通过无性方法或有性方法产生后代的植物的那些部分。例如插条、愈伤组织培养物、根茎或块茎适用于无性繁殖。其他一些繁殖材料包括例如果实、种子、幼苗、原生质体、细胞培养物等。优选的，繁殖材料是种子并且特别优选是块茎。

在另一个实施方案中，本发明涉及本发明植物的可收获植物部分，例如果实、贮藏根、花、芽、苗或茎，优选的是种子或块茎，其中这些可收获部分含有本发明的植物细胞。

本发明还涉及用于制备本发明的遗传修饰的植物的方法，其中：

a) 用包含右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子的核酸分子转化植物细胞，

b) 从步骤 a) 获得的植物细胞再生植物；和

c) 如果需要，从步骤 b) 获得的植物产生更多的植物。

根据技术人员已知的方法，如使用在“plant Cell Culture Protocols” 1999, R.D. Hall 编著, Humana 印刷, ISBN 0-89603-549-2 中描述的方法，将步骤 a) 获得的植物细胞再生成全植物。

在制备本发明遗传修饰的植物的优选的方法中，将步骤 a) 右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子与质体信号序列的编码核酸分子翻译融合。

通过无性繁殖(例如使用插条、块茎或通过愈伤组织培养和全植物再生)或有性繁殖,可产生据本发明方法步骤(c)的更多的植物。在这里,有性繁殖优选在受控条件下进行,即将所选择的具有特定特征的植物彼此间杂交并且繁殖。

本发明还涉及根据上述公开方法制备遗传修饰植物的方法,其中将右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子整合到植物的质体基因组中。

右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子可以是任何需要来源的,优选的编码右旋葡聚糖蔗糖酶的核酸分子源自表达此类蛋白质的细菌。

更优选的,本发明中使用的核酸分子可以编码来自细菌的右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质,所述细菌选自明串珠菌属、乳杆菌属和链球菌属细菌。

最优选的,本发明中使用的核酸分子可以编码来自肠膜明串珠菌(尤其优选是来自肠膜明串珠菌菌株 NRRL B512F)的右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质。

本发明中使用的右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子可以分离自例如任何来源(优选来自细菌)产生的基因组 DNA 或 DNA 文库。备选的,它们可以通过重组 DNA 技术(例如 PCR)或通过化学合成产生。可以使用本发明的分子或这些分子的部分,或根据具体情况使用这些分子的反向互补链(例如通过根据标准方法的杂交,(参见,例如 Sambrook 等人,1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y)),来进行此类核酸分子的鉴定和分离。

作为杂交探针,例如可以使用完全或基本包含在 SEQ ID No.1 下表示的核苷酸序列或其部分的核酸分子。用作杂交探针的片段还可以是合成片段,其是通过常规合成方法产生的并且其序列与本发明核酸分子的序列基本一致。

与本发明中使用的核酸分子杂交的分子还包含编码右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的上述核酸分子的片段、衍生物和等位基因变体。在本文中，将片段定义为足够长能编码蛋白质的核酸分子部分，在本文中，术语衍生物意思是这些分子的序列在一个或多个位置上与上述核酸分子的序列不同，并且它们表现出与这些序列的高度同源性。同源性意思是至少 70% 的序列同一性，并且仍然更优选的是大于 90% 的序列同一性，并且最优选的是大于 95% 的序列同一性。与上述核酸分子相比存在的差异可以是由于缺失、取代、插入或重组引起的。

此外，同源性意思是在不同的核酸分子或它们编码的蛋白质之间存在相同的功能和/或结构。与上述分子同源并且代表这些分子的衍生物的核酸分子通常是这些分子的变异，其构成了执行相同生物学功能的修饰：这些变异可以是天然发生的变异（例如来自其他细菌的序列），或者是突变，其中这些突变可以是天然发生的或它们可以通过特异性诱变引入的。此外，变异可以是合成产生的序列。等位基因变体可以是天然发生的，也可以是合成产生的变体或通过重组 DNA 技术产生的变体。

在本发明优选的实施方案中，右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子选自：

- a) 核酸分子，其编码具有 Seq ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 中给出的氨基酸序列的蛋白质；
- b) 编码蛋白质的核酸分子，所述蛋白质的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 给出的氨基酸序列具有至少 70% 的同一性；
- c) 核酸分子，其包含在 Seq ID NO:3 显示的核苷酸序列或其互补序列；
- d) 核酸分子，其核酸序列与 a) 或 c) 中描述的核酸序列具有至少 70% 的同一性；
- e) 核酸分子，其核苷酸序列因遗传密码子的简并性而不同于在 a)、b)、c) 或 d) 中鉴定的核酸分子的序列；以及
- f) 核酸分子，其代表 a)、b)、c)、d) 或 e) 中鉴定的核酸分子的片段、等位基因变体和/或衍生物。

在本发明另一优选的实施方案中，编码右旋葡聚糖蔗糖酶蛋白质 DSR-S 的核酸分子编码蛋白质，其氨基酸序列与序列 Seq ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%，并且进一步优选至少 95% 的同一性。

在另一优选的实施方案中，编码右旋葡聚糖蔗糖酶蛋白质 DSR-S 的核酸分子具有这样的核酸序列，其与 Seq ID NO:1 或 SEQ ID NO:3 具有至少 70%，优选至少 80%，更优选至少 90%，并且进一步优选至少 95% 的同一性。

将与本发明相关的术语“同一性”理解为意思是表示为百分数的，与其他蛋白质/核酸的氨基酸/核苷酸对应的氨基酸/核苷酸数量。优选借助于计算机程序，通过对比 Seq. ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、Seq. ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 4 与其他蛋白质/核酸来确定同一性。如果彼此对比的序列具有不同的长度，以这样的方式确定同一性，即较短序列与较长序列共有氨基酸的数目决定同一性的百分比率。优选的，通过众所周知而且可公开获得的计算机程序 ClustalW(Thompson 等人, Nucleic Research 22(1994), 4673-4680) 确定同一性。欧洲分子生物学实验室(Meyerhofstrasse 1, D 69117, Heidelberg, 德国)的 Julie Thompson(Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) 和 Toby Gibson(Gibson@EMBL-Heidelberg.DE) 制作了公开可用的 ClustalW。还可从不同的互联网网站下载 ClustalW，包括 IGBMC(Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, 法国; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) 和 EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) 以及 EBI (欧洲生物信息研究所, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, 英国) 的全部镜像互联网网站。

优选使用 ClustalW 计算机程序 1.8 版确定本发明蛋白质与其他蛋白质之间的同一性。在实施中，必须设置如下参数：KTUPLE=1、TOPDIAG=5、WINDOW=5、PAIRGAP=3、GAOPEN=10、GAPEXTEND=0.05、GAPDIST=8、MAXDIV=40、MATRIX=GONNET、

ENDGAPS(关)、NOPGAP、NOHGAP.

优选使用 ClustalW 计算机程序 1.8 版确定例如本发明核酸分子的核苷酸序列与其他核酸分子的核苷酸序列之间的同一性。在实施中, 必须设置如下参数: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: 未加权。

此外, 同一性意思是所提及的核酸分子或由它们编码的蛋白质之间存在相同功能性和/或结构性。与以上所述分子同源并且构成这些分子的衍生物的核酸分子通常是这些分子的变异, 其构成了执行同样生物学功能的修饰。与此同时, 这些变异可天然发生, 例如它们可以是来自其他细菌物种的序列, 或它们可以是突变体, 其中这些突变体以天然方式存在或通过目的性诱变引入。这些变异还可以是合成制备的序列。等位基因变异体既可以是天然存在的变异体, 也可以是合成制备的变异体或通过重组 DNA 技术产生的变异体。因遗传密码子的简并性而从本发明核酸分子衍生的核酸分子构成了特别形式的衍生物。

右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子以及其序列因为遗传密码子的简并性而不同于上述分子的核苷酸序列的核酸分子的用途也是本发明的主题。

本发明还涉及具有与上述序列之一的全部或一部分互补的序列的核酸分子的用途。

为表达上述核酸分子, 优选将这些与确保在植物细胞中转录起始的调节性 DNA 序列连接。具体地, 这些调节性 DNA 序列包括启动子。通常, 在植物细胞中有活性的任意启动子均适合用于表达。

与此同时, 可以选择启动子以便组成型地表达, 或仅在某种组织内、在植物发育地某个阶段或在由外界影响所决定的时间发生表达。相对于植物和相对于核酸分子而言, 启动子可以为同源的或异源的。

适宜启动子是例如: 用于组成型表达的花椰菜花叶病毒 35S RNA 的启动子和来自玉米的遍在蛋白启动子, 用于在马铃薯中进行块茎特异性表达

的 patatin 启动子 B33(Rocha-Sosa 等人, EMBO J. 8(1989), 23-29), 或确保仅在光合活跃组织中表达的启动子如 ST-LS1 启动子(Stockhaus 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 84(1987), 7943-7947; Stockhaus 等人, EMBO J. 8(1989), 2445-2451), 或来自小麦的用于胚乳特异性表达的 HMG 启动子、USP 启动子、菜豆球蛋白启动子、来自玉米的玉米醇溶蛋白基因启动子(Pedersen 等人, Cell 29(1982), 1015-1026; Quatroccio 等人, Plant Mol. Biol. 15(1990), 81-93)、谷蛋白启动子(Leisy 等人, Plant Mol. Biol. 14(1990), 41-50; Zheng 等人, Plant J. 4(1993), 357-366; Yoshihara 等人, FEBS Lett. 383(1996), 213-218)或 shrunken-1 启动子(Werr 等人, EMBO J. 4(1985), 1373-1380)。然而, 还可使用仅在由外界影响所决定的时间活化的启动子(参见例如 WO 9307279)。在这里, 允许进行简单诱导的热休克蛋白启动子特别有用。此外, 还可使用种子特异性启动子, 如来自蚕豆(*Vicia faba*)的确保在蚕豆和另一些植物中种子特异性表达的 USP 启动子(Fiedler 等人, Plant Mol. Biol. 22(1993), 669-679; Bäumlein 等人, Mol. Gen. Genet. 225(1991), 459-467)。

如果本发明的核酸构建体整合到植物细胞的质体基因组中, 可以使用在植物细胞质体中有活性的启动子。在植物细胞质体中有活性的启动子中, 例如特别提及了编码 PSII 的 D1 多肽的 psbA 基因(Staub 等人 1993 EMBO Journal 12(2):601-606)和调节核糖体 RNA 操纵子的组成型 Prn 启动子(Staub 等人 1992 Plant Cell 4:39-45)。

此外, 可以存在用于向转录物添加聚 A 尾的终止序列(多聚腺苷酸化信号)。聚 A 尾在转录物稳定中的功能已经描述。这类元件在文献(参考 Gielen 等人, EMBO J. 8(1989), 23-29)中描述并且可任意互换。

通过制备本发明植物的本发明方法获得的植物是本发明另外的实施方案。

此外, 本发明还涉及载体, 特别是质粒、粘粒、病毒、噬菌体和遗传工程中常用的其他载体, 其包含编码右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的上述核酸分子。此类载体优选是用于转化植物细胞的载体。更优选的, 它们

允许本发明核酸分子（根据需要与侧翼调节区组合）整合到植物细胞的核或质体基因组中。实例是可以用在农杆菌介导的基因转移中的二元载体，例如 pBIN20 二元载体（Hennegan 和 Danna, 1998）。可以用于直接质体转化的载体实例在 WO 04/055191 中给出。

包含待引入到植物中的异源核酸的质粒通常还包含选择性标记或报道基因或其二者，以便促进转化细胞的鉴定和选择。备选的，选择性标记由分离的载体携带并且用在共转化方法中。选择性标记和报道基因可以和适当的调节序列侧翼相连从而使得能够在植物中表达。有用的选择性标记和报道基因是本领域熟知的并且包括例如抗生素和除草剂抗性基因、编码 β -葡萄糖醛酸酶（Staub 等人, 1993）或绿色荧光蛋白（Sidorov 等人, 1999）的基因。

此类基因具体的实例公开在 Weising 等人, 1988, Svab 等人, 1993, White 等人, *Nucleic Acid Res.* 18(4):1062 中。

通过使用右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子，现在可以通过重组 DNA 技术，以目前不可能的方式来干涉植物细胞或植物的淀粉代谢。因此，淀粉代谢可以以这类合成改性淀粉的方式改变，例如分别与在对应的非遗传修饰的野生型植物细胞或非遗传修饰的野生型植物中合成的淀粉相比，所述改性淀粉分别在其物理-化学性质、糊化性质、淀粉颗粒的大小和/或形状中有改变。与野生型淀粉相比，此类淀粉特别在其黏性和/或此淀粉胶的凝胶化性质和/或其被消化的能力方面被改变。

因此本发明还涉及从本发明的植物细胞或本发明的植物中、从本发明的繁殖材料或本发明植物的可收获部分中获得的改性淀粉。

在特别优选的实施方案中，本发明涉及改性的马铃薯淀粉。

本发明另外涉及制备改性淀粉的方法，其包括将淀粉从本发明植物细胞、从本发明植物中、从本发明植物的可收获部分，或从通过制备本发明植物的本发明方法获得的植物提取淀粉的步骤。

优选的，此类方法还包括在提取淀粉前收获培育的植物和/或此类植物的贮存淀粉部分。最优选的，其另外包括在收获前培育本发明植物的步骤。

用于从植物或从植物的贮存淀粉部分提取淀粉的方法为技术人员所知。从玉米种子中提取淀粉的方法描述在例如 Eckhoff 等人 (Cereal Chem. 73 (1996) 54-57) 中。工业水平提取淀粉通常通过所谓的湿磨技术完成。此外, 从多种其他贮存淀粉的植物中提取淀粉的方法描述于例如“Starch: Chemistry and Technology (出版者: Whistler, BeMiller 和 Paschall (1994), 第二版, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; 参见例如第 12 章, 第 412-468 页: maize and sorghum starches: production; 由 Watson 编著; 第 13 章, 第 469-479 页: tapioca, arrowroot and sago starches: production; 由 Corbishley 和 Mille 编著; 第 14 章, 第 479-490 页: potato starch: production and use; 由 Mitch 编著; 第 15 章, 第 491-506 页: wheat starch: production, modification and uses, 由 Knight 和 Oson 编著; 以及第 16 章, 第 507-528 页: rice starch: production and use, 由 Rohmer 和 Klem 编著)。用于从植物材料中提取淀粉的常用装置是分离器、倾析器、水力旋流器、喷雾干燥器和流旋流干燥器。

由于编码右旋葡聚糖蔗糖酶蛋白质的核酸分子的表达, 在本发明中描述的转基因植物细胞和植物合成淀粉, 其与在对应的非遗传修饰的野生植物细胞或非遗传修饰的野生型植物合成的淀粉相比, 分别在例如其物理化学性质、糊化性质、淀粉颗粒的大小和/或形状中有改变。与野生型淀粉相比, 此类淀粉特别在其黏性和/或此淀粉胶的凝胶化性质和/或其被消化的能力方面被改变。

因此, 从本发明方法获得的改性淀粉也是本发明的主题。

在本发明优选的实施方案中, 本发明的淀粉是天然淀粉。

与本发明相关的术语“天然淀粉”意思是从本发明的植物、本发明植物的可收获部分或本发明的植物的繁殖材料中, 通过本领域技术人员已知的方法分离的淀粉。

本领域技术人员已知例如可以通过热衍生、化学衍生、酶促衍生或机械衍生改变淀粉的特征。衍生的淀粉特别适合于在食物和/或非食物业的不同应用。根据本发明的淀粉比常规淀粉更适合于作为制备衍生淀粉的起始

物质。

因此本发明还涉及产生衍生淀粉的方法，其中回溯性(retrospectively)衍生了根据本发明的或通过根据本发明方法获得的改性淀粉。

将与本发明相关的术语“衍生淀粉”理解为意思是根据本发明的改性淀粉，从植物细胞中分离后借助于化学、酶促、热或机械方法其特征已经改变。

在本发明优选的实施方案中，根据本发明的衍生淀粉是热处理和/或酸处理的淀粉。

在另一优选的实施方案中，衍生淀粉是淀粉醚，特别是淀粉烷醚、淀粉 O-烯丙基醚、淀粉羟烷基醚、淀粉 O-羧甲基醚、含氮的淀粉醚、含氮的淀粉醚、含磷酸酯的淀粉醚或含硫的淀粉醚。

在另一优选的实施方案中，衍生淀粉是交联淀粉。

在另一优选的实施方案中，衍生淀粉是淀粉接枝聚合物。

在另一优选的实施方案中，衍生淀粉是氧化的淀粉。

在另一优选的实施方案中，衍生淀粉是淀粉酯，特别是使用有机酸引入淀粉的淀粉酯。特别优选的，这些淀粉酯是磷酸酯淀粉、硝酸酯淀粉、硫酸酯淀粉、黄原酸酯淀粉、乙酸酯淀粉或柠檬酸酯淀粉。

用于制备本发明衍生淀粉的方法为本领域技术人员所知，并且在常见文献中充分描述。例如可在 Orthoefer 的文献(in Corn, Chemistry and Technology, 1987, 编者 Watson 和 Ramstad, 第 16 章, 479-499)中找到制备衍生淀粉的综述。

通过制备衍生淀粉的本发明方法获得的衍生淀粉也是本发明的主题。

本发明的另一实施方案是本发明的改性淀粉用于产生衍生淀粉的用途。

本发明还涉及本发明植物细胞、本发明植物、本发明植物的可收获部分或通过本发明方法获得的植物的用途，其用于产生改性淀粉。

本发明还涉及右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸分子的用途，其用于制备本发明遗传修饰的植物细胞、本发明遗传修饰的植物、本

发明的繁殖材料或本发明植物的可收获部分。

另外,本发明的实施方案是右旋葡聚糖蔗糖酶 DSR-S 蛋白质的编码核酸序列的用途,其用于产生本发明的改性淀粉。

常规方法:

方法 1: 通过快速黏度分析仪 (RVA) 确定黏性特征。

将 3g 样品 (例如面粉) 溶解在 25ml H₂O (VE 型水, 电导率至少是 15 兆欧姆) 中, 并且用于在快速黏度分析仪 Super3 (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, 澳大利亚) 中分析。按照制造商的说明操作仪器。根据在此引入本说明书作为参考的制造商操作手册, 黏性值以厘泊 (cP) 表示。为了确定淀粉水溶液的黏性, 首先将淀粉悬液以 960 转/分钟搅拌 10 秒, 并且随后以 160 转/分钟的搅拌速度在 50℃ 加热, 最初进行 1 分钟 (步骤 1)。之后将温度从 50℃ 升到 95℃, 加热速度为 12℃ 每分钟 (步骤 2)。将温度在 95℃ 保持 2.5 分钟 (步骤 3) 并且之后以 12℃ 每分钟从 95℃ 冷却到 50℃ (步骤 4)。在最后步骤 (步骤 5) 中, 将 50℃ 的温度保持 2 分钟。在整个过程中确定黏性。

在程序结束后, 移除搅拌器并且盖上烧杯。现在胶化的淀粉在室温下温育 24 小时后可以进行物性分析。

RVA 分析的模式包含用来显示不同测量和物质比较的参数。在本发明中, 将下列术语理解如下:

1. 最大黏性 (RVA Max)

将最大黏性理解为意思是以 cP 测量的最高黏性值, 其在步骤 2 或 3 的温度模式下得到。

2. 最小黏性 (RVA Min)

将最小黏性理解为意思是以 cP 测量的最低黏性值, 其在最大黏性后的温度模式中观察到。通常, 这发生在步骤 3 的温度模式中。

3. 最终黏性 (RVA Fin)

将最终黏性 (末端黏性) 理解为意思是在测量最后观察到的以 cP 测量

的黏性值。

4. 后退 (RVA 设定)

已知的“后退”是通过从在曲线中最大黏性后发生的最小黏性值中减去最终黏性值来计算的。

5. 胶化温度 (RVA PT)

将胶化温度理解为意思是黏性温度首次显著增加了短暂时期的温度模式时的点。

方法 2: 通过 Thermo Haake 可视流变仪确定黏性模式

使用 Thermo Haake 可视流变仪, 在频率为 1Hz 时应用小振动剪切形变来确定 2%淀粉悬液的黏性模式。用平行排列板 (typ C70/1 Ti) 装备可视流变仪并且缺口大小为 0.1mm。通过将悬液以 2°C/分钟的速度从 40°C 加热到 90°C, 并且在 90°C 时保持 15 分钟, 随后以 2°C/分钟的速度冷却到 20°C, 并且在 20°C 时再次保持 15 分钟来得到糊状的 2%淀粉-水 (w/v) 悬液。测量 T_g (起始胶化温度)、T_p (峰温度) 和黏性。随后, 在 60 秒内从 10Pa 增加到 1.000Pa 时, 从回生的样品进行振幅扫描以检测测量在线性区域内进行, 其中强度的振幅和张力彼此成比例。

方法 3: 通过物性分析仪 TA-XT2 确定淀粉胶的凝胶化性质。

通过快速黏度分析仪 (RVA), 在水性悬液中在 RVA 仪器中将样品胶化, 并且随后在密封的容器中室温下储存 24 小时。将样品固定在来自 Stable Micro Systems (Surrey, 英国) 的物性分析仪 TA-XT2 的探针 (具有平滑表面的圆活塞) 下并且使用下列参数确定凝胶强度:

- 测试速度 0.5 mm/s
- 进入深度 7 mm
- 接触表面 113 mm²
- 压力 2 g.

方法 4: 基于抗性淀粉 RS III 类的确定, 确定淀粉的消化性。

可以将抗性淀粉 RS 分为下列类型:

RS 1 类: 不易于物理消化的淀粉, 例如部分碾磨的植物细胞 (例如在

穆兹利 (muesli)) 中。

RS 2 类: 不消化的颗粒淀粉 (淀粉粒), 例如来自未加工的马铃薯、未成熟的香蕉等。

RS 3 类: 不消化的回生淀粉, 其是例如通过热处理和/或酶促处理并且之后回生得到的。

RS 4 类: 不消化的、化学改性淀粉, 其是例如通过交联或酯化 (乙酰化等) 形成的。

使用下列步骤得以确定抗性淀粉 RS IIIS 类:

a) 胰酶制剂/淀粉葡萄糖苷酶 (AGS) 处理

使用的胰酶制剂/淀粉葡萄糖苷酶消化缓冲液:

0.1M 乙酸钠 pH 5.2

4mM CaCl₂

酶溶液的制备

将 12g 胰酶制剂 (Merck, 产品号 1.07130.1000) 在 37°C 在 80 ml 脱矿质水 (电导率大约为 18M 欧姆) 中搅拌 10 分钟, 并且之后在 3000 转/分钟离心 10 分钟。

将离心后得到的 54 ml 上清液用 9.86 ml 脱矿质水和 0.14 ml 淀粉葡萄糖苷酶 (6000 u/ml, Sigma, 产品号 A-3042) 处理。

胰酶制剂/淀粉葡萄糖苷酶 (AGS) 消化方法

对于每批待测量的淀粉, 每次制备胰酶制剂/淀粉葡萄糖苷酶 (AGS) 消化的 5 个试样。这 5 个试样中的 2 个在之后不添加酶溶液。将未添加酶溶液的试样表示为参照并且用于确定回收速率。将剩余 3 个试样表示为样品, 随后用酶溶液处理并且用于 RS 含量确定。

平行处理一些不包含淀粉的反应容器 (空白样品)。将这些不包含淀粉的空白样品用于确定共沉淀材料的量 (蛋白质、盐)。

确定 50 ml 反应容器 (Falcon 试管) 的皮重, 并且之后在每种情形中将在 15 ml 乙酸钠缓冲液中称量约 200 mg 的淀粉添加到每种线性不溶于水的聚- α -1,4-D-葡聚糖样品和空白样品中, 并且将 20 ml 乙酸钠缓冲液添

加到每种参照（见上）中。将这些样品预加热到 37℃。

通过向样品和空白样品的每个反应容器中添加 5 ml 酶溶液，之后在 37℃ 将所述样品摇动 2 小时（200 转/分钟）来起始反应。

通过向样品、空白样品和参照中添加 5 ml 冰乙酸（平衡到 pH3.0）和 80 ml 工业乙醇来使反应骤冷。

通过在室温下将骤冷的反应试样温育 1 小时来实现淀粉从反应混合物中的沉淀。

沉降后（2500×g 离心 10 分钟），将得到的个体试样沉降物用 80% 的乙醇洗涤两次以移除短链葡聚糖，然后在冷却到 -70℃ 后冷冻干燥。再次称量样品并且将重量差异用于计算“重量分析”RS 含量。

b) 确定 RS 含量

下列步骤用于确定各批不溶于水的淀粉的 RS 含量：

- a) 确定淀粉的各批样品水含量 (wt.H₂O)；
- b) 对于各个样品 (wt.RGP)、参照 (wt.RGR) 和空白样品 (wt.RGB) 确定各反应容器的皮重；
- c) 向样品 (wt.P) 和参照 (wt.R) 的各个反应容器中称量大约 200mg 的不溶于水的淀粉；
- d) 计算样品 ($\text{wt.Ptr} = \text{wt.P} - \text{wt.H}_2\text{O}$) 和参照的干燥部分重量 ($\text{st Rtr} = \text{wt.P} - \text{wt.H}_2\text{O}$)；
- e) 酶促消化各个样品和空白样品。参照以同样的方式处理，但是不添加酶溶液；
- f) 在 e) 中描述的处理后，沉淀、沉降、洗涤和冷冻干燥在样品、参照和空白样品反应容器中残留的物质；
- g) 在 f) 中描述的处理后，称量在样品 (wt.PRg)、参照 (wt.RPg) 和空白样品 (wt.BRG) 反应容器中残留的物质 (包括反应容器)；
- h) 在 f) 描述的处理后，计算在样品 ($\text{wt.Pnv} = \text{wt.PRg} - \text{wt.RGP}$)、参照 ($\text{wt.Rnv} = \text{wt.RRG} - \text{wt.RGR}$) 和空白样品 ($\text{wt.Bnv} = \text{wt.BRG} - \text{wt.RGB}$) 反应容器中残留的物质重量；

- i) 在 f) 描述的处理后, 确定在样品($\text{wt.H}_2\text{OPnv}$)、参照($\text{wt.H}_2\text{ORnv}$)和空白样品($\text{wt.H}_2\text{OBnv}$)反应容器中残留物质的水含量;
- j) 在 f) 描述的处理后, 计算在样品($\text{wt.Pnvtr} = \text{wt.Pnv} - \text{wt.H}_2\text{OPnv}$)、参照($\text{wt.Rnvtr} = \text{wt.Rnv} - \text{wt.H}_2\text{ORnv}$)和空白样品($\text{wt.Bnvtr} = \text{wt.Bnv} - \text{H}_2\text{OBnv}$)反应容器中残留物质的干燥部分;
- k) 确定样品 ($\text{wt.Pnvkor} = \text{wt.Pnvtr} - \text{wt.Bnvtr}$) 和参照 ($\text{wt.Rnvkor} = \text{wt.Rnvtr} - \text{wt.Bnvtr}$) 的校正重量;
- l) 计算样品在酶促消化后残留的不溶于水的淀粉的校正重量相对于样品起始量的干燥重量的百分数部分 ($\text{RSaP} = \text{wt.Pnvkor} / \text{wt.Ptr} \times 100$), 并且计算参照的残留不溶于水的淀粉的校正重量相对于参照的起始量的干燥重量的百分数部分 ($\text{RSaR} = \text{wt.Rnvkor} / \text{wt.Rtr} \times 100$);
- m) 确定样品在酶促消化后残留的不溶于水的淀粉的百分数部分平均值 ($\text{RSaPMW} = n \times \text{RSaP} / n$) 并且确定参照残留的不溶于水的淀粉的百分数部分平均值 (还原速率; $\text{RSaRMW} = n \times \text{RSaR} / n$), 其中 n 是对于不溶于水的淀粉分批进行的样品和参照测试的数量;
- n) 通过用还原速率校正酶促消化后仍残留的不溶于水的淀粉的百分数部分平均值来确定各批不溶于水的淀粉的百分数 RS 含量 ($\text{RS} = \text{RSaPMW} / \text{RSaRMW} \times 100$).

本发明通过下列不以任何方式限制的实施例具体说明。

实施例 1: 编码来自肠膜明串珠菌的右旋葡聚糖蔗糖酶的成熟基因的克隆。

将包含 *patatin* 启动子 (Wenzler 等人, 1989)、融合了 NOS 终止子的来自叉枝蝇子草 (*Silene pratensis*) 的叶绿体铁氧还原蛋白转运肽 (FD) (Smeekens 等人, 1985; Pilon 等人, 1995) 的表达盒克隆到 pBluescript SK (pBS SK) 质粒中, 得到 pPF。

为了分离编码右旋葡聚糖蔗糖酶的核酸分子,使用包含 *Sma*I 限制性位点的正向引物 (5'-GCCTCATTGCTCCCGGGACACCAAGT-3') 和包含 *Nru*I 限制性位点的反向引物 (5'-TGGTGGTTCGCGAGTTA TGCTGACACA-3'), 使用校正 *Pfu* turbo DNA 聚合酶 (2.5 单位/ μ l; Stratagene, 英国), 通过 PCR, 从来自肠膜明串珠菌 NRRL B-512 F 的基因组 DNA (WO 89/12386) 扩增成熟 *DsrS* 基因, 并且将其克隆到 FD 和 NOS 终止子之间 pPF 的 *Sma*I/*Eco*RV 限制性位点中, 得到 pPFDsrS。将 pPFDsrS 用 *Sac*I 和 *Kpn*I 消化并且连接到 pBIN20 二元载体 (Hennegan 和 Danna, 1998) 中, 得到 pBinDsrS。pBinDsrS 显示在图 1 中。

实施例 2: 马铃薯植物的转化

使用电穿孔 (Takken 等人, 2000), 将 pBinDsrS 转化到根癌农杆菌菌株 LBA 4404 中。使用来自两个四倍体马铃薯栽培种 (cv. Kardal (KD) 和无直链淀粉 (amf) 突变体) 的节间茎段用于农杆菌介导的转化。在具有包含卡那霉素 (100 mg/l) 的 MS30 培养基 (Murashige 和 Skoog, 1962) 的平板上选择转化体。繁殖 30 株根形成的转基因苗并且转移到温室中用于块茎发育。18 周后收获成熟的块茎。

实施例 3: 在块茎汁和胶化淀粉中进行淀粉分离和右旋葡聚糖的免疫检测

将马铃薯块茎剥皮并且在 Sanamat Rotor (Spangenberg, The Netherlands) 中匀浆。将得到的匀浆在 4℃ 放置过夜, 并且将马铃薯汁轻轻倒出并且储存在 -20℃ 用于可溶右旋葡聚糖聚合物的特征鉴定。将淀粉沉淀用水洗涤 3 次并且最终在室温空气干燥至少 3 天。使干燥的淀粉成为粉末并且室温储存。

用 Matsuda 和 Kabat (1989) 描述的酶联免疫吸附测定 (ELISA), 使用单克隆 α -(1,6) 右旋葡聚糖抗体 (4.3F1 (沟型) 和 16.4.12E (洞型)) (Wang 等人, 2002) 研究右旋葡聚糖的存在。

ELISA 分析表明, 在从 Kardal 品系或无直链淀粉突变体得到的转基因马铃薯品系中都检测到了右旋葡聚糖聚合物, 而在野生型 kardal 品系或非转基因的无直链淀粉突变体中没有检测到右旋葡聚糖。

实施例 4: 右旋葡聚糖表达对淀粉颗粒形态、植物形态、块茎数量和产量的影响。

通过装备了 Sony 彩色摄像机 (CCD-Iris/RGB) 和扫描电子显微镜 (SEM, JEOL 6300F, 日本) 的光学显微镜进行淀粉颗粒形态分析。对于 LM, 在观察前用 $2\times$ 稀释的 Lugol 溶液将颗粒染色。

与从野生型品系中分离的淀粉颗粒相比, 一式三份分析每个所选择转化体的 100 个淀粉颗粒群体, 来评分右旋葡聚糖表达的影响。

对于分离自表达右旋葡聚糖的转基因品系的淀粉, 两种技术都显示了改性淀粉颗粒的形态。与分离自野生型品系的淀粉颗粒相比, 这些转化体的颗粒表现出不规则的表面, 以及圆形突出结构。

图 2 显示了与野生型 Kardal 植物 (Kardal) 淀粉相比, 通过对所选择转化体 (dsrS30) 的淀粉进行扫描电子显微镜分析观察到的改性的淀粉颗粒形态。

另一方面, 与 KD 野生型植物相比, 表达右旋葡聚糖的植物形态没有表现出表型改变。另外, 在右旋葡聚糖聚合物表达和块茎数量以及产量的改变之间没有关联。

实施例 5: 右旋葡聚糖表达对淀粉消化性的影响。

使用在常规方法 (方法 4) 中详述的方法确定淀粉的消化性。该确定是基于用于确定抗性淀粉 III 类的 Englyst 方法 (European Journal of Clinical Nutrition (1992) 46 (增刊 2), 第 33-50 页), 其根据 WO 00 02926 中 RS 含量确定的信息而改变。

下列表格显示出, 与野生型 Kardal 植物 (Kardal) 相比, 提取自所选择转化体 (DsrS30) 的样品的消化的淀粉百分数显著增加。

结果:

消化的淀粉百分数(%):

	15	30	45	60	120	180	240	300	360	min
Kardal	3	4	5	7	13	20	27	33	38	
DsrS30	3	5	7	8	15	23	31	37	44	

Kardal: 来自四个独立测量的平均值。

DsrS 30: 来自两个独立测量的平均值。

实施例 6: 右旋葡聚糖表达对淀粉黏性的影响。

通过 Thermo Haake 可视流变仪, 使用在常规方法(方法 2)中描述的方法, 选择从转化体(DsrS30)和野生型 Kardal 植物(Kardal)中得到的淀粉悬液的黏性模式。

下列表格显示: 与野生型 Kardal 植物(Kardal)的淀粉相比, 提取自所选择转化体(DsrS30)的样品的最终黏性显著降低。

Kardal 和 DsrS30: 两个独立分析的平均值, 来自 2%淀粉溶液

淀粉样品	T-开始 (°C)	T-峰 (°C)	峰黏性 (PaS)	谷黏性 (PaS)	最终黏性 (PaS)
Kardal	75.7	78.1	122	27	134
DsrS30	73.8	75.9	135.5	22.5	93

参考文献:

* An 等人 EMBO J. 4, (1985), 277-287

* Bäumlein 等人, Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467

* Chan 等人, Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506;

* van Cleve, J.W.、 Schaefer, W.C. 和 Rist, C.E. 1956. J. Am. Chem. Soc. 78: 4435-4438.

* Conner和Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555

* Creissen 等人, Plant J. 8 (1995), 167-175

* De Vuyst和Degeest 1999 FEMS Microbiol Rev. 23 (2):153-77.

* Deng等人, Science in China 33, (1990), 28-34

* Eckhoff 等人, Cereal Chem. 73 (1996) 54-57

* Emanuelsson O. 等人, 1999, Protein Science:8:978-984

* Englyst H.N. 等人, European Journal of Clinical Nutrition 4, 增刊2, S33-S50

* Fiedler 等人, Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679

* Fraley 等人, Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46

* Fromm 等人, Biotechnology 8, (1990), 833-844;

* Fu D、 Robyt JF (1990) Arch Biochem Biophys 283: 379-387

* Gallardo 等人(1995), Planta 197, 324-332

* Gerrits, N.、 Turk, S.C.H.J.、 van Dun, K.P.M.、 Hulleman, S.H.D.、 Visser, R.G.F.、 Weisbeek, P.J.和Smeekens, S.C.M. 2001. Plant Physiol. 125: 926-934.

* Gielen 等人 1989, EMBO J. 8, 23-29

* Gordon-Kamm等人 1990, Plant Cell 2, 603-618;

* Hiei 等人(1994), Plant J. 6, 271-282

* Hehre EJ、 Hamilton DM, Carlson AS (1949). J Biol Chem 177: 267-279

* Hennegan, K.P. 和 Danna, K.J. (1998). Plant Mol. Biol. Rep. 16: 129-131.

* Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasserdam (1985), 第五章

-
- * Janecek S、Svensson B, Russell RRB (2000). FEMS Microbiol Lett 192: 53-57**
- * Jeanes, A.、Haynes, W.C.、Wilham, C.A.、Rankin, J.C.、Melvin, E.H.、Austin, M.J.、Cluskey, J.E.、Fisher, B.E.、Tsuchiya, H.M.和Rist, C.E. (1954). J. Am. Chem. Soc. 76: 5041-5052.**
- * Khan M.S.和Maliga P. (1999). Nat. Biotechnol. 17, 910-915**
- * Klösgen等人(1989), Mol Gen Genet. 217, 155-161**
- * Kok-Jacob A.、Ji Q.、Vincken JP.和Visser RG. (2003) J. Plant Physiol; 160, 765-777**
- * Kortstee AJ、Vermeesch AM、de Vries BJ、Jacobsen E、Visser RG.(1996), Plant J. 10(1):83-90.**
- * Kossmann和Llyod (2000), Crit. Rev. Bioch. Mol. Biol. 35 : 141-196**
- * Koziel 等人, (1993) Biotechnology 11, 194-200;**
- * Krens 等人, Nature 296, (1982), 72-74**
- * Leisy 等人, Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50**
- * MacGregor EA、Jespersen HM, Svensson B (1996). FEBS lett 378: 263-266**
- * Matsuda, T.和Kabat, E.A. 1989. J. Immunol. 142: 863-870.**
- * May 等人, Bio/Technology 13, (1995), 486-492;**
- * Monchois V、Remaud-Simeon M、Russell RRB、Monsan P和 Willemot RM. 1997. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48 : 465-472**
- * Monchois V、Remaud-Simeon M、Monsan P和Willemot RM. 1998. FEMS Microbiol. Lett. 159 : 307-315**
- * Monchois 等人, 1999, FEMS Microbiology Letters 177, 243-248;**
- * Monchois V, Willemot RM和Monsan P. 1999, FEMS Microbiology Reviews 23, 131-151.**
- * Moroc 等人, Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).**
- * Murashige, T.和Skoog, F. 1962. Physiol. Plant. 15: 473-497.**

-
- * Nawrath 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 10 美国 91(1994), 12760-12764**
 - * Nehra 等人, Plant J. 5, (1994), 285-297**
 - * Oakes JV, Shewmaker CK, Stalker DM (1991). Biotechnol 9: 982-986**
 - * Pedersen 等人, Cell 29 (1982), 1015-1026;**
 - * Pilon, M., Wienk, H., Sips, W., de Swaaf, M., Talboom, I., van 't Hof, R., de Korte-Kool, G., Demel, R., Weisbeek, P.和de Kruijff, B. 1995. J. Biol. Chem. 270: 3882-3893.**
 - * Quatroccio 等人, Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93**
 - * Quirasco等人 (Appl. Environ. Microbiol., 65 (12), 5504-5509, 1999**
 - * Ritala 等人, Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325;**
 - * Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265).**
 - * Robyt, J.F.和Walseth, T.F. 1978. Carbohydr. Res. 61: 433-445.**
 - * Robyt, J.F. 1995. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 51: 133-168.**
 - * Rocha-Sosa 等人, EMBO J. 8, (1989), 29-33**
 - * Ruf S., Hermann M., Berger I.J., Carrer H.,和Bock R. (2001). Nat. Biotechnol. 19 (9):870-875.**
 - * Sambrook 等人 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C.编著, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**
 - * Shewmaker CK、Boyer CD、Wiesenborn DP、Thompson DB、Boersig MR、Oakes JV、Stalker DM. Plant Physiol. 1994年4月;104(4):1159-66.**
 - * Sidebotham, R.L. 1975. Dextran. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 30: 371-444.**
 - * Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T., Staub J.M. 和Nehra N.S. (1999). Plant J. 19(2):209-216.**
 - * Sikdar S. R.等人 (1998). Plant Cell Reports 18:20-24.**
 - * Smeekens, S., van Binsbergen, J.和Weisbeek, P. 1985. Nucleic Acids**

Res. 13: 3179-3194

- * Spencer 等人, Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631)
- * Staub 等人 1992 Plant Cell 4:39-45
- * Staub J.M.和Maliga P. (1993). EMBO J. 12 (2): 601-606.
- * Stockhaus 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 84 (1987), 7943-7947
- * Stockhaus 等人, EMBO J. 8 (1989), 2445-2451
- * Su D.和Robytt JF., Arch Biochem Biophys. 1994年2月

1;308(2):471-6.

* Svab Z.、 Hajdukiewicz P.和Maliga P. (1990). Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 87 (21):8526-8530.

* Svab Z.、 Maliga P. (1993) ; Proc. Natl. Acad. Sci. U S A Feb 1;90(3):913-7.

* Takken, F.L.W.、 Luderer, R.、 Gabriëls, S.H.E.J.、 Westerink, N.、 Lu, R.、 de Wit, P.J.G.M.和Joosten, M.H.A.J. 2000. Plant J. 24: 275-283.

* Thompson 等人, Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680

* Van Geel-Schutten GH、 Faber EJ、 Smit E、 Bonting K、 Smith MR、 Ten Brink B、 Kamerling JP、 Vliegenthart JF、 Dijkhuizen L., Appl Environ Microbiol. 1999 Jul;65(7):3008-14.

* Vasil 等人, Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558;

* Wan和Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48

* Wang, D.、 Liu, S.、 Trummer, B.J.、 Deng, C.和Wang, A. 2002. Nature Biotechnol. 20: 275-281.

* Weising K、 Schell J、 Kahl G., Annu Rev Genet. 1988;22:421-77. 综述

* Wenzler, H.C.、 Mignery, A.、 Fisher, L.M.和Park, W.D. 1989. Plant Mol. Biol. 12: 41-50.

* Werr 等人, EMBO J. 4 (1985), 1373-1380

* Wilmink 等人, Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80;

-
- * White 等人, Nucleic Acid Res. 18(4) :1062.**
 - * Wolter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 美国 85 (1988), 846-850**
 - * Yoshihara 等人, FEBS Lett. 383 (1996), 213-218**
 - * Zheng 等人, Plant J. 4 (1993), 357-366**

<110> 拜尔作物科学股份公司

<120> 表达右旋葡聚糖蔗糖酶和合成改性淀粉的转化植物

<130> BCS 04-5010 PCT

<160> 4

<170> PatentIn 版本 3.1

<210> 1

<211> 4584

<212> DNA

<213> 肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(4584)

<223> 完全 CDS

<400> 1

atg cca ttt aca gaa aaa gta atg cgg aaa aag ctt tat aaa gtt ggg	48
Met Pro Phe Thr Glu Lys Val Met Arg Lys Lys Leu Tyr Lys Val Gly	
1 5 10 15	

aaa agt tgg gta gtt ggt ggg gtt tgt gct ttt gca tta acc gcc tca	96
Lys Ser Trp Val Val Gly Gly Val Cys Ala Phe Ala Leu Thr Ala Ser	
20 25 30	

ttt gct tta gca aca cca agt gtt tta gga gac agt agt gta cct gat	144
Phe Ala Leu Ala Thr Pro Ser Val Leu Gly Asp Ser Ser Val Pro Asp	
35 40 45	

gtg agt gcg aat aac gtt caa tct gct tca gat aat aca acg gat acg	192
Val Ser Ala Asn Asn Val Gln Ser Ala Ser Asp Asn Thr Thr Asp Thr	
50 55 60	

cag cag aac act acg gtt acc gaa gaa aat gat aaa gta cag tct gca	240
Gln Gln Asn Thr Thr Val Thr Glu Glu Asn Asp Lys Val Gln Ser Ala	
65 70 75 80	

gct act aat gac aat gta aca aca gct gca agc gac aca aca caa tct	288
Ala Thr Asn Asp Asn Val Thr Thr Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Ser	
85 90 95	

gct gat aat aat gtg aca gaa aaa cag tca gat gat cat gca ctt gat Ala Asp Asn Asn Val Thr Glu Lys Gln Ser Asp Asp His Ala Leu Asp 100 105 110	336
aat gaa aaa gtc gat aac aaa caa gat gaa gtc gct caa acc aat gtt Asn Glu Lys Val Asp Asn Lys Gln Asp Glu Val Ala Gln Thr Asn Val 115 120 125	384
act agc aaa aat gag gaa tca gca gtt gct tca act gac act gat cct Thr Ser Lys Asn Glu Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Asp Thr Asp Pro 130 135 140	432
gct gaa acg aca act gac gaa aca caa caa gtt agc ggc aag tac gtt Ala Glu Thr Thr Thr Asp Glu Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val 145 150 155 160	480
gaa aaa gac ggt agt tgg tat tat tat ttt gat gat ggc aaa aat gct Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala 165 170 175	528
aaa ggt tta tca acg ata gac aac aat att caa tat ttt tac gag agt Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser 180 185 190	576
ggt aaa caa gcc aaa gga cag tat gtc aca att gat aat caa aca tat Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr 195 200 205	624
tat ttt gat aag ggc tca ggt gat gag tta act ggt ctg caa agc att Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile 210 215 220	672
gat ggg aac ata gtt gct ttt aac gat gaa ggg caa caa att ttt aat Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn 225 230 235 240	720
caa tat tac caa tct gaa aat ggt aca aca tac tac ttt gat gat aaa Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys 245 250 255	768
gga cac gct gct acc ggt att aag aat atc gag ggc aaa aat tat tat Gly His Ala Ala Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr 260 265 270	816
ttt gat aat ctt ggg caa cta aaa aaa ggc ttc tct ggt gtg att gat Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp 275 280 285	864
ggt caa ata atg aca ttt gat cag gaa aca ggg caa gaa gtt tct aac Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn 290 295 300	912

aca act tct gaa ata aaa gaa ggt ttg acg act caa aac acg gat tat Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr 305 310 315 320	960
agc gaa cat aat gca gcc cac ggt acg gat gct gag gac ttt gaa aat Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn 325 330 335	1008
att gac ggc tat tta aca gct agt tca tgg tat cgt cca aca ggt att Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile 340 345 350	1056
tta cgt aac gga aca gac tgg gaa cct tct aca gat aca gat ttc aga Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg 355 360 365	1104
cca ata ttg tca gtg tgg tgg cca gat aag aac acc cag gtc aat tat Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr 370 375 380	1152
tta aat tac atg gct gat tta ggg ttt atc agt aat gcg gac agt ttt Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe 385 390 395 400	1200
gaa act ggg gat agc caa agc tta tta aat gaa gca agt aac tat gtt Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val 405 410 415	1248
caa aaa tca att gaa atg aaa att agt gcg caa caa agt aca gag tgg Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp 420 425 430	1296
tta aag gat gca atg gcg gcc ttc att gtc gcg caa cca cag tgg aat Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn 435 440 445	1344
gaa act agt gaa gat atg agc aat gac cat tta caa aat ggc gca tta Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu 450 455 460	1392
act tat gtc aac agt cca ctg aca cct gac gct aat tca aac ttt aga Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg 465 470 475 480	1440
cta ctt aat cgg aca cca aca aac cag act ggt gaa caa gcg tat aat Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn 485 490 495	1488
tta gat aat tca aaa ggt ggt ttt gaa ttg ttg tta gcc aat cag gaa Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Gln Glu 500 505 510	1536

gat aat tca aac gtt gta gta gaa gca gaa caa ttg aat tgg tta tat Asp Asn Ser Asn Val Val Val Glu Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr 515 520 525	1584
tat tta atg aat ttt ggt acg att acg gcc aac gac gcg gat gct aat Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn 530 535 540	1632
ttt gat ggt att cgt gta gat gca gtc gac aat gtg gat gct gat ttg Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu 545 550 555 560	1680
tta caa att gct gcc gat tat ttc aaa cta gct tac ggt gtt gat caa Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln 565 570 575	1728
aat gat gct act gct aat cag cat ctt tca att ttg gaa gat tgg agt Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser 580 585 590	1776
cac aat gat cct ttg tat gta aca gat caa gga agc aat caa tta acc His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr 595 600 605	1824
atg gat gat tat gtg cac aca caa tta atc tgg tct cta aca aaa tca Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser 610 615 620	1872
tct gac ata cga ggt aca atg cag cgc ttc gtg gat tat tat atg gtg Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val 625 630 635 640	1920
gat cga tct aat gat agt aca gaa aac gaa gcc att cct aat tac agc Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser 645 650 655	1968
ttt gta cgt gca cac gac agc gaa gtg caa acg gtt att gcc caa att Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile 660 665 670	2016
gtt tcc gat ttg tat cct gat gtt gaa aat agt tta gca cca aca aca Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr 675 680 685	2064
gaa caa ttg gca gct gct ttc aaa gta tac aat gaa gat gaa aaa tta Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu 690 695 700	2112
gca gac aaa aag tac aca caa tat aat atg gct agt gct tat gcg atg Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met 705 710 715 720	2160

ttg cta acc aat aag gat act gtt cct cgt gtc tat tat ggc gat tta Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu 725 730 735	2208
tat aca gat gat ggt caa tat atg gca aca aag tca cca tac tat gat Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp 740 745 750	2256
gcg att aac act ttg cta aag gct aga gtt cag tat gtt gct ggt ggc Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly 755 760 765	2304
caa tcg atg tcc gtt gat agt aat gac gtg tta aca agt gtt cgc tat Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr 770 775 780	2352
ggt aaa gat gcc atg aca gct tct gac act gga aca tct gag acg cgt Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg 785 790 795 800	2400
act gaa ggt att gga gtc atc gtc agc aat aac gcg gag cta caa tta Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu 805 810 815	2448
gag gat ggg cat act gtc aca ttg cat atg ggg gca gct cat aag aac Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn 820 825 830	2496
caa gct tat cgt gct ttg tta tca aca act gca gat gga tta gct tat Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr 835 840 845	2544
tat gat act gat gaa aat gca cct gtg gcg tac aca gat gct aac ggc Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly 850 855 860	2592
gat ttg att ttt acg aat gaa tca att tat ggt gta caa aat cca caa Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln 865 870 875 880	2640
gtt tct ggt tac ttg gca gtt tgg gtt ccg gta ggt gcg caa caa gat Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp 885 890 895	2688
caa gat gca cga acg gcc tct gat aca aca aca aac acg agt gat aaa Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys 900 905 910	2736
gtg ttc cat tca aac gct gct ctt gat tct caa gtc atc tac gaa ggt Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly 915 920 925	2784

ttc tca aac ttc caa gca ttt gct aca gac agc agt gaa tat aca aac Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn 930 935 940	2832
gta gtc atc gct cag aat gcg gac caa ttt aag caa tgg ggt gtg aca Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr 945 950 955 960	2880
agc ttc caa ttg gca cca caa tat cgt tca agt aca gat aca agt ttc Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe 965 970 975	2928
ttg gat tca att att caa aac ggg tat gca ttc acg gat cgt tat gac Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp 980 985 990	2976
tta ggt tat ggc aca ccg aca aaa tat gga act gct gat cag ttg cgc Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg 995 1000 1005	3024
gat gct att aaa gcc tta cat gct agc ggt att caa gcc att gcc Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala 1010 1015 1020	3069
gat tgg gtg ccg gac caa att tat aat ttg cca gag caa gaa tta Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu 1025 1030 1035	3114
gct act gtc aca aga aca aat tca ttt gga gat gac gat aca gat Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp Asp Thr Asp 1040 1045 1050	3159
tct gat att gac aat gcc tta tat gtt gta caa agt cgt ggg ggt Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser Arg Gly Gly 1055 1060 1065	3204
ggc caa tat caa gag atg tat ggt ggt gcc ttc tta gaa gag tta Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu 1070 1075 1080	3249
cag gca ctc tat cca tcc cta ttt aaa gtg aat caa atc tca act Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln Ile Ser Thr 1085 1090 1095	3294
ggc gtt cca att gat ggc agt gta aag att act gag tgg gcg gct Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp Ala Ala 1100 1105 1110	3339
aag tac ttc aat ggc tct aac atc caa ggt aaa ggt gct gga tac Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr 1115 1120 1125	3384

gta ttg aaa gat atg ggt tct aat aag tac ttt aag gtc gtt tcg Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser 1130 1135 1140	3429
aac act gag gat ggt gac tac tta cca aaa cag tta act aat gat Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp 1145 1150 1155	3474
ctg tca gaa act ggc ttt aca cac gat gat aaa gga atc atc tat Leu Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly Ile Ile Tyr 1160 1165 1170	3519
tat aca tta agt ggt tat cgt gcc caa aat gca ttt att caa gat Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe Ile Gln Asp 1175 1180 1185	3564
gat gat aat aac tat tac tat ttt gat aaa aca ggt cat tta gta Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly His Leu Val 1190 1195 1200	3609
aca ggt ttg caa aag att aat aac cat acc tac ttc ttc tta cct Thr Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe Phe Leu Pro 1205 1210 1215	3654
aat ggt atc gaa ctg gtc aag agc ttc tta caa aac gaa gat ggt Asn Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp Gly 1220 1225 1230	3699
aca att gtt tat ttc gat aag aaa ggt cat caa gtt ttt gat caa Thr Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val Phe Asp Gln 1235 1240 1245	3744
tat ata act gat caa aat gga aat gcg tat tac ttt gat gat gct Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe Asp Asp Ala 1250 1255 1260	3789
ggt gta atg ctt aaa tca ggg ctt gca acg att gat gga cat caa Gly Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp Gly His Gln 1265 1270 1275	3834
cag tat ttt gat caa aat ggt gtg cag gtt aag gat aag ttt gtg Gln Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp Lys Phe Val 1280 1285 1290	3879
att ggc act gat ggt tat aag tat tac ttt gaa cca ggt agt ggt Ile Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro Gly Ser Gly 1295 1300 1305	3924
aac tta gct atc cta cgt tat gtg caa aat agt aag aat caa tgg Asn Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys Asn Gln Trp 1310 1315 1320	3969

ttc tat ttt gat ggt aat ggc cat gct gtc act ggt ttc caa aca Phe Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly Phe Gln Thr 1325 1330 1335	4014
att aat ggt aaa aaa caa tat ttc tat aat gat ggt cat caa agt Ile Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly His Gln Ser 1340 1345 1350	4059
aaa ggt gaa ttc att gat gca gac ggg gat act ttc tat acg agt Lys Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Thr Ser 1355 1360 1365	4104
gcc act gat ggt cgc cta gta act ggt gtt cag aag att aat ggt Ala Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr Gly Val Gln Lys Ile Asn Gly 1370 1375 1380	4149
att acc tat gct ttt gat aac aca gga aat ttg atc aca aat cag Ile Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly Asn Leu Ile Thr Asn Gln 1385 1390 1395	4194
tat tat caa tta gca gat ggt aaa tat atg ttg tta gat gat agt Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met Leu Leu Asp Asp Ser 1400 1405 1410	4239
ggt cgt gcg aaa aca ggg ttt gta ttg caa gat ggt gta cta aga Gly Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp Gly Val Leu Arg 1415 1420 1425	4284
tac ttc gat caa aac ggt gag caa gtg aaa gat gct atc att gtg Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala Ile Ile Val 1430 1435 1440	4329
gat cca gat act aac ttg agt tat tat ttc aat gca aca caa ggt Asp Pro Asp Thr Asn Leu Ser Tyr Tyr Phe Asn Ala Thr Gln Gly 1445 1450 1455	4374
gtc gct gta aaa aat gat tat ttc gag tat caa ggt aat tgg tat Val Ala Val Lys Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr Gln Gly Asn Trp Tyr 1460 1465 1470	4419
tta aca gat gct aat tat caa ctt atc aaa ggt ttt aaa gca gtt Leu Thr Asp Ala Asn Tyr Gln Leu Ile Lys Gly Phe Lys Ala Val 1475 1480 1485	4464
gac gac agc tta caa cat ttt gat gaa gtc act ggt gta caa aca Asp Asp Ser Leu Gln His Phe Asp Glu Val Thr Gly Val Gln Thr 1490 1495 1500	4509
aaa gat agt gct tta ata agt gct cag ggt aag gtt tac caa ttt Lys Asp Ser Ala Leu Ile Ser Ala Gln Gly Lys Val Tyr Gln Phe 1505 1510 1515	4554

gat aat aat gga aat gct gtg tca gca taa 4584
 Asp Asn Asn Gly Asn Ala Val Ser Ala
 1520 1525

<210> 2

<211> 1527

<212> PRT

<213> 肠膜明串珠菌

<400> 2

Met Pro Phe Thr Glu Lys Val Met Arg Lys Lys Leu Tyr Lys Val Gly
 1 5 10 15

Lys Ser Trp Val Val Gly Gly Val Cys Ala Phe Ala Leu Thr Ala Ser
 20 25 30

Phe Ala Leu Ala Thr Pro Ser Val Leu Gly Asp Ser Ser Val Pro Asp
 35 40 45

Val Ser Ala Asn Asn Val Gln Ser Ala Ser Asp Asn Thr Thr Asp Thr
 50 55 60

Gln Gln Asn Thr Thr Val Thr Glu Glu Asn Asp Lys Val Gln Ser Ala
 65 70 75 80

Ala Thr Asn Asp Asn Val Thr Thr Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Ser
 85 90 95

Ala Asp Asn Asn Val Thr Glu Lys Gln Ser Asp Asp His Ala Leu Asp
 100 105 110

Asn Glu Lys Val Asp Asn Lys Gln Asp Glu Val Ala Gln Thr Asn Val
 115 120 125

Thr Ser Lys Asn Glu Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Asp Thr Asp Pro
 130 135 140

Ala Glu Thr Thr Thr Asp Glu Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val
 145 150 155 160

Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala
 165 170 175

Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser
 180 185 190

Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr

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

Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn
 485 490 495

Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Gln Glu
 500 505 510

Asp Asn Ser Asn Val Val Val Glu Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr
 515 520 525

Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn
 530 535 540

Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu
 545 550 555 560

Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln
 565 570 575

Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser
 580 585 590

His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr
 595 600 605

Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser
 610 615 620

Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val
 625 630 635 640

Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser
 645 650 655

Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile
 660 665 670

Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr
 675 680 685

Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu
 690 695 700

Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met
 705 710 715 720

Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu
 725 730 735

Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp
 740 745 750

Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly
755 760 765

Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr
770 775 780

Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg
785 790 795 800

Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu
805 810 815

Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn
820 825 830

Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr
835 840 845

Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly
850 855 860

Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln
865 870 875 880

Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp
885 890 895

Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys
900 905 910

Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly
915 920 925

Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn
930 935 940

Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr
945 950 955 960

Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe
965 970 975

Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp
980 985 990

Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg
995 1000 1005

Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala
1010 1015 1020

Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu

1025	1030	1035
Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp Asp Thr Asp		
1040	1045	1050
Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser Arg Gly Gly		
1055	1060	1065
Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu		
1070	1075	1080
Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln Ile Ser Thr		
1085	1090	1095
Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp Ala Ala		
1100	1105	1110
Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr		
1115	1120	1125
Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser		
1130	1135	1140
Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp		
1145	1150	1155
Leu Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly Ile Ile Tyr		
1160	1165	1170
Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe Ile Gln Asp		
1175	1180	1185
Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly His Leu Val		
1190	1195	1200
Thr Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe Phe Leu Pro		
1205	1210	1215
Asn Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp Gly		
1220	1225	1230
Thr Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val Phe Asp Gln		
1235	1240	1245
Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe Asp Asp Ala		
1250	1255	1260
Gly Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp Gly His Gln		
1265	1270	1275
Gln Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp Lys Phe Val		
1280	1285	1290

Ile Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro Gly Ser Gly
1295 1300 1305

Asn Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys Asn Gln Trp
1310 1315 1320

Phe Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly Phe Gln Thr
1325 1330 1335

Ile Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly His Gln Ser
1340 1345 1350

Lys Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Thr Ser
1355 1360 1365

Ala Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr Gly Val Gln Lys Ile Asn Gly
1370 1375 1380

Ile Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly Asn Leu Ile Thr Asn Gln
1385 1390 1395

Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met Leu Leu Asp Asp Ser
1400 1405 1410

Gly Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp Gly Val Leu Arg
1415 1420 1425

Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala Ile Ile Val
1430 1435 1440

Asp Pro Asp Thr Asn Leu Ser Tyr Tyr Phe Asn Ala Thr Gln Gly
1445 1450 1455

Val Ala Val Lys Asn Asp Tyr Phe Glu Tyr Gln Gly Asn Trp Tyr
1460 1465 1470

Leu Thr Asp Ala Asn Tyr Gln Leu Ile Lys Gly Phe Lys Ala Val
1475 1480 1485

Asp Asp Ser Leu Gln His Phe Asp Glu Val Thr Gly Val Gln Thr
1490 1495 1500

Lys Asp Ser Ala Leu Ile Ser Ala Gln Gly Lys Val Tyr Gln Phe
1505 1510 1515

Asp Asn Asn Gly Asn Ala Val Ser Ala
1520 1525

<210> 3

<211> 4476

<212> DNA

<213> 肠膜明串珠菌

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(4476)

<223> 成熟 CDS

<400> 3

aca cca agt gtt tta gga gac agt agt gta cct gat gtg agt gcg aat	48
Thr Pro Ser Val Leu Gly Asp Ser Ser Val Pro Asp Val Ser Ala Asn	
1 5 10 15	

aac gtt caa tct gct tca gat aat aca acg gat acg cag cag aac act	96
Asn Val Gln Ser Ala Ser Asp Asn Thr Thr Asp Thr Gln Gln Asn Thr	
20 25 30	

acg gtt acc gaa gaa aat gat aaa gta cag tct gca gct act aat gac	144
Thr Val Thr Glu Glu Asn Asp Lys Val Gln Ser Ala Ala Thr Asn Asp	
35 40 45	

aat gta aca aca gct gca agc gac aca aca caa tct gct gat aat aat	192
Asn Val Thr Thr Ala Ala Ser Asp Thr Thr Gln Ser Ala Asp Asn Asn	
50 55 60	

gtg aca gaa aaa cag tca gat gat cat gca ctt gat aat gaa aaa gtc	240
Val Thr Glu Lys Gln Ser Asp Asp His Ala Leu Asp Asn Glu Lys Val	
65 70 75 80	

gat aac aaa caa gat gaa gtc gct caa acc aat gtt act agc aaa aat	288
Asp Asn Lys Gln Asp Glu Val Ala Gln Thr Asn Val Thr Ser Lys Asn	
85 90 95	

gag gaa tca gca gtt gct tca act gac act gat cct gct gaa acg aca	336
Glu Glu Ser Ala Val Ala Ser Thr Asp Thr Asp Pro Ala Glu Thr Thr	
100 105 110	

act gac gaa aca caa caa gtt agc ggc aag tac gtt gaa aaa gac ggt	384
Thr Asp Glu Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly	
115 120 125	

agt tgg tat tat tat ttt gat gat ggc aaa aat gct aaa ggt tta tca	432
Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser	
130 135 140	

acg ata gac aac aat att caa tat ttt tac gag agt ggt aaa caa gcc	480
---	-----

Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala 145 150 155 160	
aaa gga cag tat gtc aca att gat aat caa aca tat tat ttt gat aag Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys 165 170 175	528
ggc tca ggt gat gag tta act ggt ctg caa agc att gat ggg aac ata Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile 180 185 190	576
gtt gct ttt aac gat gaa ggg caa caa att ttt aat caa tat tac caa Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln 195 200 205	624
tct gaa aat ggt aca aca tac tac ttt gat gat aaa gga cac gct gct Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala 210 215 220	672
acc ggt att aag aat atc gag ggc aaa aat tat tat ttt gat aat ctt Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu 225 230 235 240	720
ggg caa cta aaa aaa ggc ttc tct ggt gtg att gat ggt caa ata atg Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met 245 250 255	768
aca ttt gat cag gaa aca ggg caa gaa gtt tct aac aca act tct gaa Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu 260 265 270	816
ata aaa gaa ggt ttg acg act caa aac acg gat tat agc gaa cat aat Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn 275 280 285	864
gca gcc cac ggt acg gat gct gag gac ttt gaa aat att gac ggc tat Ala Ala His Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr 290 295 300	912
tta aca gct agt tca tgg tat cgt cca aca ggt att tta cgt aac gga Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly 305 310 315 320	960
aca gac tgg gaa cct tct aca gat aca gat ttc aga cca ata ttg tca Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser 325 330 335	1008
gtg tgg tgg cca gat aag aac acc cag gtc aat tat tta aat tac atg Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met 340 345 350	1056
gct gat tta ggg ttt atc agt aat gcg gac agt ttt gaa act ggg gat	1104

Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp	
355 360 365	
agc caa agc tta tta aat gaa gca agt aac tat gtt caa aaa tca att	1152
Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile	
370 375 380	
gaa atg aaa att agt gcg caa caa agt aca gag tgg tta aag gat gca	1200
Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala	
385 390 395 400	
atg gcg gcc ttc att gtc gcg caa cca cag tgg aat gaa act agt gaa	1248
Met Ala Ala Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu	
405 410 415	
gat atg agc aat gac cat tta caa aat ggc gca tta act tat gtc aac	1296
Asp Met Ser Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn	
420 425 430	
agt cca ctg aca cct gac gct aat tca aac ttt aga cta ctt aat cgg	1344
Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg	
435 440 445	
aca cca aca aac cag act ggt gaa caa gcg tat aat tta gat aat tca	1392
Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser	
450 455 460	
aaa ggt ggt ttt gaa ttg ttg tta gcc aat cag gaa gat aat tca aac	1440
Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu Ala Asn Gln Glu Asp Asn Ser Asn	
465 470 475 480	
gtt gta gta gaa gca gaa caa ttg aat tgg tta tat tat tta atg aat	1488
Val Val Val Glu Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn	
485 490 495	
ttt ggt acg att acg gcc aac gac gcg gat gct aat ttt gat ggt att	1536
Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile	
500 505 510	
cgt gta gat gca gtc gac aat gtg gat gct gat ttg tta caa att gct	1584
Arg Val Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala	
515 520 525	
gcc gat tat ttc aaa cta gct tac ggt gtt gat caa aat gat gct act	1632
Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr	
530 535 540	
gct aat cag cat ctt tca att ttg gaa gat tgg agt cac aat gat cct	1680
Ala Asn Gln His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro	
545 550 555 560	
ttg tat gta aca gat caa gga agc aat caa tta acc atg gat gat tat	1728

Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr			
565	570	575	
gtg cac aca caa tta atc tgg tct cta aca aaa tca tct gac ata cga	1776		
Val His Thr Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg			
580	585	590	
ggt aca atg cag cgc ttc gtg gat tat tat atg gtg gat cga tct aat	1824		
Gly Thr Met Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn			
595	600	605	
gat agt aca gaa aac gaa gcc att cct aat tac agc ttt gta cgt gca	1872		
Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala			
610	615	620	
cac gac agc gaa gtg caa acg gtt att gcc caa att gtt tcc gat ttg	1920		
His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu			
625	630	635	640
tat cct gat gtt gaa aat agt tta gca cca aca aca gaa caa ttg gca	1968		
Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala			
645	650	655	
gct gct ttc aaa gta tac aat gaa gat gaa aaa tta gca gac aaa aag	2016		
Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys			
660	665	670	
tac aca caa tat aat atg gct agt gct tat gcg atg ttg cta acc aat	2064		
Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn			
675	680	685	
aag gat act gtt cct cgt gtc tat tat ggc gat tta tat aca gat gat	2112		
Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp			
690	695	700	
ggt caa tat atg gca aca aag tca cca tac tat gat gcg att aac act	2160		
Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr			
705	710	715	720
ttg cta aag gct aga gtt cag tat gtt gct ggt ggc caa tcg atg tcc	2208		
Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser			
725	730	735	
gtt gat agt aat gac gtg tta aca agt gtt cgc tat ggt aaa gat gcc	2256		
Val Asp Ser Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala			
740	745	750	
atg aca gct tct gac act gga aca tct gag acg cgt act gaa ggt att	2304		
Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile			
755	760	765	
gga gtc atc gtc agc aat aac gcg gag cta caa tta gag gat ggg cat	2352		

Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His 770 775 780	
act gtc aca ttg cat atg ggg gca gct cat aag aac caa gct tat cgt Thr Val Thr Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg 785 790 795 800	2400
gct ttg tta tca aca act gca gat gga tta gct tat tat gat act gat Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp 805 810 815	2448
gaa aat gca cct gtg gcg tac aca gat gct aac ggc gat ttg att ttt Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe 820 825 830	2496
acg aat gaa tca att tat ggt gta caa aat cca caa gtt tct ggt tac Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr 835 840 845	2544
ttg gca gtt tgg gtt ccg gta ggt gcg caa caa gat caa gat gca cga Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg 850 855 860	2592
acg gcc tct gat aca aca aca aac acg agt gat aaa gtg ttc cat tca Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser 865 870 875 880	2640
aac gct gct ctt gat tct caa gtc atc tac gaa ggt ttc tca aac ttc Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe 885 890 895	2688
caa gca ttt gct aca gac agc agt gaa tat aca aac gta gtc atc gct Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala 900 905 910	2736
cag aat gcg gac caa ttt aag caa tgg ggt gtg aca agc ttc caa ttg Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu 915 920 925	2784
gca cca caa tat cgt tca agt aca gat aca agt ttc ttg gat tca att Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile 930 935 940	2832
att caa aac ggg tat gca ttc acg gat cgt tat gac tta ggt tat ggc Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly 945 950 955 960	2880
aca ccg aca aaa tat gga act gct gat cag ttg cgc gat gct att aaa Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys 965 970 975	2928
gcc tta cat gct agc ggt att caa gcc att gcc gat tgg gtg ccg gac	2976

Ala Leu His Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp		
980	985	990
caa att tat aat ttg cca gag caa gaa tta gct act gtc aca aga aca	3024	
Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr		
995	1000	1005
aat tca ttt gga gat gac gat aca gat tct gat att gac aat gcc	3069	
Asn Ser Phe Gly Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala		
1010	1015	1020
tta tat gtt gta caa agt cgt ggg ggt ggt caa tat caa gag atg	3114	
Leu Tyr Val Val Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met		
1025	1030	1035
tat ggt ggt gcc ttc tta gaa gag tta cag gca ctc tat cca tcc	3159	
Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser		
1040	1045	1050
cta ttt aaa gtg aat caa atc tca act ggc gtt cca att gat ggc	3204	
Leu Phe Lys Val Asn Gln Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly		
1055	1060	1065
agt gta aag att act gag tgg gcg gct aag tac ttc aat ggc tct	3249	
Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser		
1070	1075	1080
aac atc caa ggt aaa ggt gct gga tac gta ttg aaa gat atg ggt	3294	
Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly		
1085	1090	1095
tct aat aag tac ttt aag gtc gtt tcg aac act gag gat ggt gac	3339	
Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp		
1100	1105	1110
tac tta cca aaa cag tta act aat gat ctg tca gaa act ggc ttt	3384	
Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Phe		
1115	1120	1125
aca cac gat gat aaa gga atc atc tat tat aca tta agt ggt tat	3429	
Thr His Asp Asp Lys Gly Ile Ile Tyr Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr		
1130	1135	1140
cgt gcc caa aat gca ttt att caa gat gat gat aat aac tat tac	3474	
Arg Ala Gln Asn Ala Phe Ile Gln Asp Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr		
1145	1150	1155
tat ttt gat aaa aca ggt cat tta gta aca ggt ttg caa aag att	3519	
Tyr Phe Asp Lys Thr Gly His Leu Val Thr Gly Leu Gln Lys Ile		
1160	1165	1170
aat aac cat acc tac ttc ttc tta cct aat ggt atc gaa ctg gtc	3564	

Asn Asn His Thr Tyr Phe Phe Leu Pro Asn Gly Ile Glu Leu Val	
1175 1180 1185	
aag agc ttc tta caa aac gaa gat ggt aca att gtt tat ttc gat	3609
Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp Gly Thr Ile Val Tyr Phe Asp	
1190 1195 1200	
aag aaa ggt cat caa gtt ttt gat caa tat ata act gat caa aat	3654
Lys Lys Gly His Gln Val Phe Asp Gln Tyr Ile Thr Asp Gln Asn	
1205 1210 1215	
gga aat gcg tat tac ttt gat gat gct ggt gta atg ctt aaa tca	3699
Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe Asp Asp Ala Gly Val Met Leu Lys Ser	
1220 1225 1230	
ggg ctt gca acg att gat gga cat caa cag tat ttt gat caa aat	3744
Gly Leu Ala Thr Ile Asp Gly His Gln Gln Tyr Phe Asp Gln Asn	
1235 1240 1245	
ggt gtg cag gtt aag gat aag ttt gtg att ggc act gat ggt tat	3789
Gly Val Gln Val Lys Asp Lys Phe Val Ile Gly Thr Asp Gly Tyr	
1250 1255 1260	
aag tat tac ttt gaa cca ggt agt ggt aac tta gct atc cta cgt	3834
Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro Gly Ser Gly Asn Leu Ala Ile Leu Arg	
1265 1270 1275	
tat gtg caa aat agt aag aat caa tgg ttc tat ttt gat ggt aat	3879
Tyr Val Gln Asn Ser Lys Asn Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Gly Asn	
1280 1285 1290	
ggc cat gct gtc act ggt ttc caa aca att aat ggt aaa aaa caa	3924
Gly His Ala Val Thr Gly Phe Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Gln	
1295 1300 1305	
tat ttc tat aat gat ggt cat caa agt aaa ggt gaa ttc att gat	3969
Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly His Gln Ser Lys Gly Glu Phe Ile Asp	
1310 1315 1320	
gca gac ggg gat act ttc tat acg agt gcc act gat ggt cgc cta	4014
Ala Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Thr Ser Ala Thr Asp Gly Arg Leu	
1325 1330 1335	
gta act ggt gtt cag aag att aat ggt att acc tat gct ttt gat	4059
Val Thr Gly Val Gln Lys Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Ala Phe Asp	
1340 1345 1350	
aac aca gga aat ttg atc aca aat cag tat tat caa tta gca gat	4104
Asn Thr Gly Asn Leu Ile Thr Asn Gln Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp	
1355 1360 1365	
ggt aaa tat atg ttg tta gat gat agt ggt cgt gcg aaa aca ggg	4149

Gly Lys Tyr Met Leu Leu Asp Asp Ser Gly Arg Ala Lys Thr Gly	
1370 1375 1380	
ttt gta ttg caa gat ggt gta cta aga tac ttc gat caa aac ggt	4194
Phe Val Leu Gln Asp Gly Val Leu Arg Tyr Phe Asp Gln Asn Gly	
1385 1390 1395	
gag caa gtg aaa gat gct atc att gtg gat cca gat act aac ttg	4239
Glu Gln Val Lys Asp Ala Ile Ile Val Asp Pro Asp Thr Asn Leu	
1400 1405 1410	
agt tat tat ttc aat gca aca caa ggt gtc gct gta aaa aat gat	4284
Ser Tyr Tyr Phe Asn Ala Thr Gln Gly Val Ala Val Lys Asn Asp	
1415 1420 1425	
tat ttc gag tat caa ggt aat tgg tat tta aca gat gct aat tat	4329
Tyr Phe Glu Tyr Gln Gly Asn Trp Tyr Leu Thr Asp Ala Asn Tyr	
1430 1435 1440	
caa ctt atc aaa ggt ttt aaa gca gtt gac gac agc tta caa cat	4374
Gln Leu Ile Lys Gly Phe Lys Ala Val Asp Asp Ser Leu Gln His	
1445 1450 1455	
ttt gat gaa gtc act ggt gta caa aca aaa gat agt gct tta ata	4419
Phe Asp Glu Val Thr Gly Val Gln Thr Lys Asp Ser Ala Leu Ile	
1460 1465 1470	
agt gct cag ggt aag gtt tac caa ttt gat aat aat gga aat gct	4464
Ser Ala Gln Gly Lys Val Tyr Gln Phe Asp Asn Asn Gly Asn Ala	
1475 1480 1485	
gtg tca gca taa	4476
Val Ser Ala	
1490	
<210> 4	
<211> 1491	
<212> PRT	
<213> 肠膜明串珠菌	
<400> 4	
Thr Pro Ser Val Leu Gly Asp Ser Ser Val Pro Asp Val Ser Ala Asn	
1 5 10 15	
Asn Val Gln Ser Ala Ser Asp Asn Thr Thr Asp Thr Gln Gln Asn Thr	
20 25 30	
Thr Val Thr Glu Glu Asn Asp Lys Val Gln Ser Ala Ala Thr Asn Asp	

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

Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser
 325 330 335

Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met
 340 345 350

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

Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile
 370 375 380

Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala
 385 390 395 400

Met Ala Ala Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu
 405 410 415

Asp Met Ser Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn
 420 425 430

Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg
 435 440 445

Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser
 450 455 460

Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Gln Glu Asp Asn Ser Asn
 465 470 475 480

Val Val Val Glu Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn
 485 490 495

Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile
 500 505 510

Arg Val Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala
 515 520 525

Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr
 530 535 540

Ala Asn Gln His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro
 545 550 555 560

Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr
 565 570 575

Val His Thr Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg
 580 585 590

Gly Thr Met Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn
 595 600 605

Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala
 610 615 620

His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu
 625 630 635 640

Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala
 645 650 655

Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys
 660 665 670

Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn
 675 680 685

Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp
 690 695 700

Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr
 705 710 715 720

Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser
 725 730 735

Val Asp Ser Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala
 740 745 750

Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile
 755 760 765

Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His
 770 775 780

Thr Val Thr Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg
 785 790 795 800

Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp
 805 810 815

Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe
 820 825 830

Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr
 835 840 845

Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg
 850 855 860

Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser

865	870	875	880
Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe			
885	890	895	
Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala			
900	905	910	
Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu			
915	920	925	
Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile			
930	935	940	
Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly			
945	950	955	960
Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys			
965	970	975	
Ala Leu His Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp			
980	985	990	
Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr			
995	1000	1005	
Asn Ser Phe Gly Asp Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala			
1010	1015	1020	
Leu Tyr Val Val Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met			
1025	1030	1035	
Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser			
1040	1045	1050	
Leu Phe Lys Val Asn Gln Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly			
1055	1060	1065	
Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser			
1070	1075	1080	
Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly			
1085	1090	1095	
Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp			
1100	1105	1110	
Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Phe			
1115	1120	1125	
Thr His Asp Asp Lys Gly Ile Ile Tyr Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr			
1130	1135	1140	

Arg Ala	Gln Asn Ala Phe Ile	Gln Asp Asp Asp Asn	Asn Tyr Tyr
1145	1150	1155	
Tyr Phe	Asp Lys Thr Gly His	Leu Val Thr Gly Leu	Gln Lys Ile
1160	1165	1170	
Asn Asn	His Thr Tyr Phe Phe	Leu Pro Asn Gly Ile	Glu Leu Val
1175	1180	1185	
Lys Ser	Phe Leu Gln Asn Glu	Asp Gly Thr Ile Val	Tyr Phe Asp
1190	1195	1200	
Lys Lys	Gly His Gln Val Phe	Asp Gln Tyr Ile Thr	Asp Gln Asn
1205	1210	1215	
Gly Asn	Ala Tyr Tyr Phe Asp	Asp Ala Gly Val Met	Leu Lys Ser
1220	1225	1230	
Gly Leu	Ala Thr Ile Asp Gly	His Gln Gln Tyr Phe	Asp Gln Asn
1235	1240	1245	
Gly Val	Gln Val Lys Asp Lys	Phe Val Ile Gly Thr	Asp Gly Tyr
1250	1255	1260	
Lys Tyr	Tyr Phe Glu Pro Gly	Ser Gly Asn Leu Ala	Ile Leu Arg
1265	1270	1275	
Tyr Val	Gln Asn Ser Lys Asn	Gln Trp Phe Tyr Phe	Asp Gly Asn
1280	1285	1290	
Gly His	Ala Val Thr Gly Phe	Gln Thr Ile Asn Gly	Lys Lys Gln
1295	1300	1305	
Tyr Phe	Tyr Asn Asp Gly His	Gln Ser Lys Gly Glu	Phe Ile Asp
1310	1315	1320	
Ala Asp	Gly Asp Thr Phe Tyr	Thr Ser Ala Thr Asp	Gly Arg Leu
1325	1330	1335	
Val Thr	Gly Val Gln Lys Ile	Asn Gly Ile Thr Tyr	Ala Phe Asp
1340	1345	1350	
Asn Thr	Gly Asn Leu Ile Thr	Asn Gln Tyr Tyr Gln	Leu Ala Asp
1355	1360	1365	
Gly Lys	Tyr Met Leu Leu Asp	Asp Ser Gly Arg Ala	Lys Thr Gly
1370	1375	1380	
Phe Val	Leu Gln Asp Gly Val	Leu Arg Tyr Phe Asp	Gln Asn Gly
1385	1390	1395	

Glu Gln Val Lys Asp Ala Ile	Ile Val Asp Pro Asp Thr Asn Leu
1400	1405 1410
Ser Tyr Tyr Phe Asn Ala Thr	Gln Gly Val Ala Val Lys Asn Asp
1415	1420 1425
Tyr Phe Glu Tyr Gln Gly Asn	Trp Tyr Leu Thr Asp Ala Asn Tyr
1430	1435 1440
Gln Leu Ile Lys Gly Phe Lys	Ala Val Asp Asp Ser Leu Gln His
1445	1450 1455
Phe Asp Glu Val Thr Gly Val	Gln Thr Lys Asp Ser Ala Leu Ile
1460	1465 1470
Ser Ala Gln Gly Lys Val Tyr	Gln Phe Asp Asn Asn Gly Asn Ala
1475	1480 1485
Val Ser Ala	
1490	

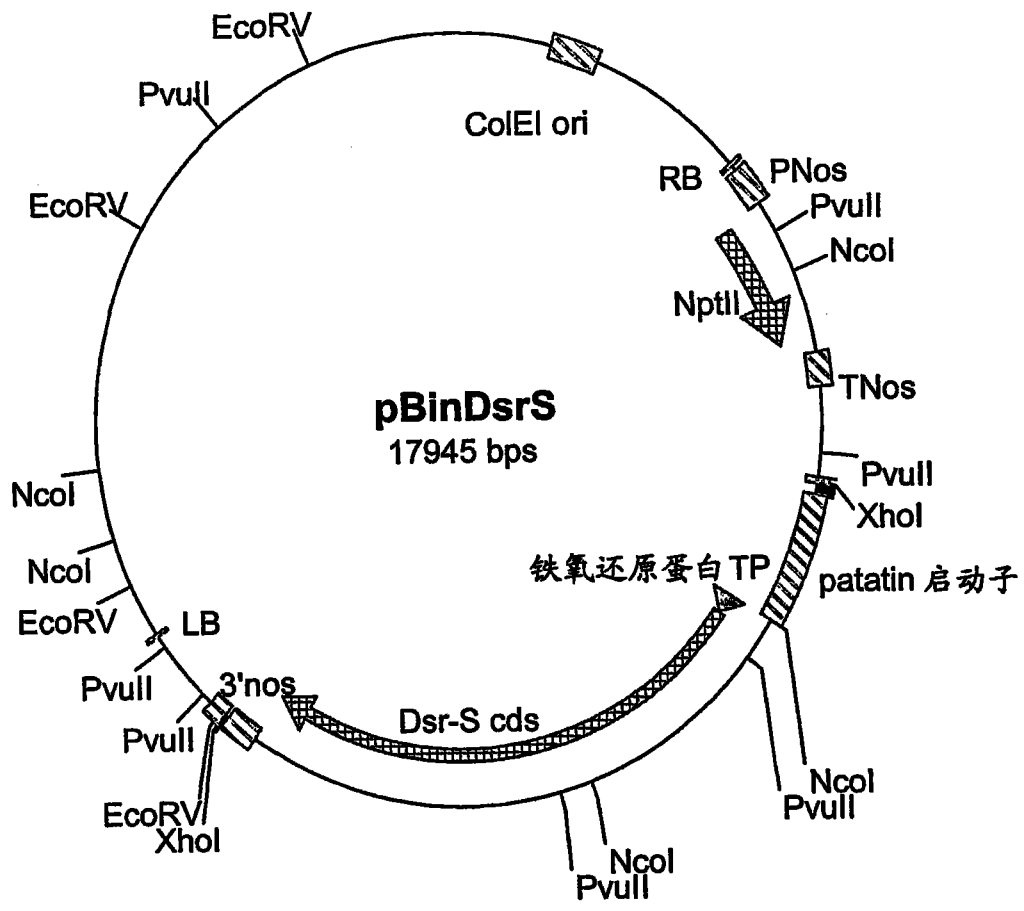
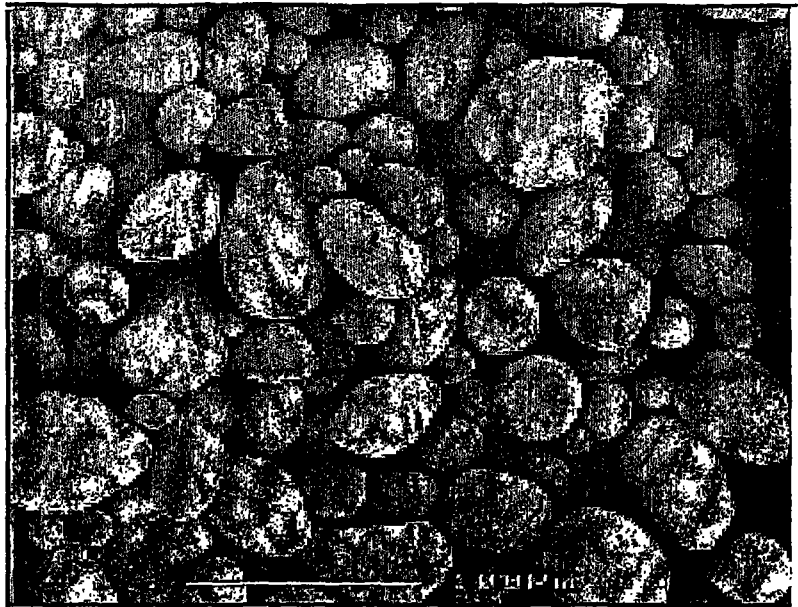
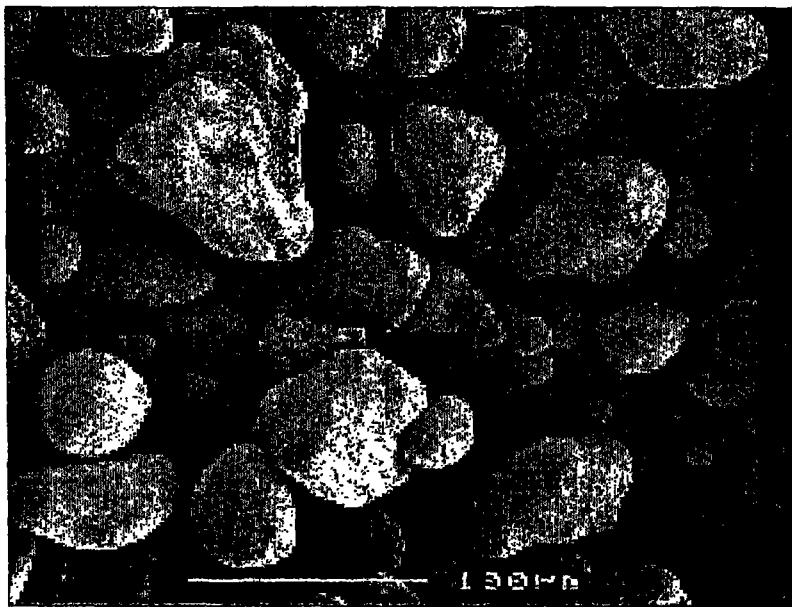


图 1



kardal



DsrS 30

图 2