



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00818906.4

[43] 公开日 2003 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 1434866A

[22] 申请日 2000.12.20 [21] 申请号 00818906.4

[30] 优先权

[32] 1999.12.20 [33] JP [31] 361608/1999

[86] 国际申请 PCT/JP00/09037 2000.12.20

[87] 国际公布 WO01/46434 日 2001.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.9

[71] 申请人 独立行政法人农业生物资源研究所

地址 日本茨城县

共同申请人 理化学研究所

[72] 发明人 田中宥司 萱野晓明 矢野昌裕

松冈信 小林正智

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

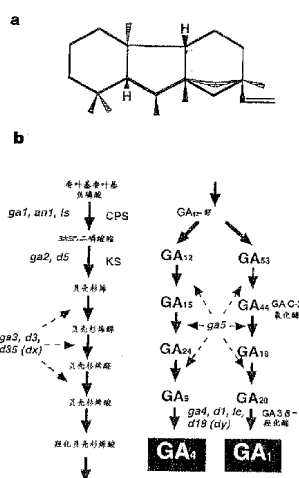
代理人 巫肖南 黄益芬

权利要求书 1 页 说明书 19 页 序列表 14 页
附图 10 页

[54] 发明名称 来自稻赤霉素 3β - 羟化酶的基因及其用途

[57] 摘要

从稻中分离编码 GA 3β - 羟化酶的基因组 DNA 和 cDNA。当这些基因在稻植株中的表达受到抑制时, 该植株与野生型植株相比矮化。



- 1、一种 DNA，该 DNA 编码有赤霉素 3 β -羟化酶活性的蛋白，并从下面(a)-(c)中任选：
- 5 (a)一种 DNA，该 DNA 编码由 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列组成的蛋白；
- (b)一种 DNA，其包含 SEQ ID NO:3 或 4 所示核苷酸序列的编码区；和
- (c)一种 DNA，该 DNA 编码由 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列中的一个或多个氨基酸残基被取代，缺失，添加，和/或插入形成的氨基酸序列
- 10 组成的蛋白。
- 2、一种编码反义 RNA 的 DNA，该反义 RNA 与权利要求 1 中的 DNA 或其转录产物互补。
- 3、一种编码 RNA 的 DNA，该 RNA 具有能特异性剪切权利要求 1 中 DNA 的转录产物的核酶活性。
- 15 4、一种编码 RNA 的 DNA，该 RNA 通过共抑制，抑制内源的权利要求 1 所述的 DNA 在植物细胞中的表达。
- 5、一种载体，其中包含权利要求 1-4 中任一项所述的 DNA。
- 6、一种转化植物细胞，其中包含权利要求 1-4 中任一所述的可表达的 DNA。
- 20 7、一种转基因植物体，其中包含权利要求 6 所述的转化植物细胞。
- 8、一种权利要求 7 所述转基因植物体的繁殖材料。
- 9、一种由权利要求 1 所述 DNA 编码的蛋白。
- 10、一种产生权利要求 9 所述蛋白的方法，其中所述方法包括培养权利要求 1 所述 DNA 的可表达的转化植物细胞，从所述细胞或其培养物上清中
- 25 回收表达的蛋白。
- 11、一种改变植物生长的方法，其特征在于，控制植物细胞内权利要求 1 所述 DNA 的表达水平。
- 12、一种改变植物株型的方法，其特征在于，控制植物细胞内权利要求 1 所述 DNA 的表达水平。

来自稻赤霉素 3 β -羟化酶的基因及其用途

5 技术领域

本发明涉及关于赤霉素生物合成的来自于稻的基因以及该基因的用途。

发明背景

10 多细胞有机体由众多特化的组织和器官所构成，这些特化的组织和器官组装形成一个功能单元。有机体各部分的协作通过一类被称为激素的化学信使实现。植物激素是天然产生的物质，极小的量就可以有效发挥作用，刺激或抑制生长，或调节发育。现今，以下的植物生长物质通常被看作植物激素：生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸、油菜素内酯和乙烯。

15 动物中，激素通常在特殊的腺体合成，通过血流在有机体内分布。因此，它们到达靶点和可以反应的应答组织。在那里，它们引发特异性的调节过程。现在这些最初在动物中产生的经典的激素概念被使用到高等植物中。许多情况下，植物激素在特定的靶组织中是活动的，该靶组织通常与产生激素的组织不同。然而，在多细胞植物的组织中也可发现所有的植物激素。这表明，植物激素的合成部位和作用部位间并无绝对的区别。如果需要，它们也可以作用于产生其自身的相同细胞(组织)。

20 因此，理解植物激素合成的控制对于确定合成和作用之间的关系非常重要。

25 赤霉素(GA)由日本植物病理学家在 20 世纪 20 年代发现，最初认为是植物毒素。病原真菌 *Gibberella fujikuroi* 感染禾本科植物，并分泌一种引起病理性的纵向生长(Bakanae “恶苗病”)的化合物。1935 到 1938 年间，这种活性物质被分离并纯化结晶。被称为“赤霉素”。后来的研究表明高等植物也合成赤霉素，并在生长调节和分化过程中非常重要。

30 至 1992 年被鉴定的约 80 种赤霉素的基本结构是内-赤霉素烷(ent-gibberellan)的四环结构(图 1a)。赤霉素包含双萜碳酸，主要由甲羟

戊酸通过·牛儿基·牛儿基焦磷酸环化产生的(图1b)。多数赤霉素对于促进植物发育是没有活性的。许多植物中,作为植物生长调节剂的生物活性赤霉素是GA₁和GA₄。它们可以控制许多发育过程,包括种子发芽,茎伸长,开花以及果实发育。因此,可通过改变GA的生物合成获得各种生产中有益的改良植物。

GA作为环境刺激介体的角色早已确立。物理因素,如光照和温度,通过改变GA代谢途径中的特定步骤可以改变其流量来修饰GA代谢。例如,光的性质(红光或红外线)和光强(高或低)可以影响GA的生物合成。在莴苣种子和豇豆上胚轴中,GA₂₀的3β-羟基化作用因远红外处理而增强(Toyomasu等,1992, *Plant Cell Physiol.* 33, 695-701)。此外,豌豆幼苗在低光照下生长(40 μmol/m²s),GA₂₀的含量增加到高光强下生长植物的7倍(386 μmol/m²s),而生长在黑暗中的植物,GA₂₀的含量与高光强下生长的植物相比较低(Gawronska等,(1995) *Plant Cell Physiol.* 36, 1361-1367)。

尽管许多人企图表明GA代谢有光敏色素介导的或光强介导的生长率的改变,支持的证据仍很少。GA生物合成的分子生物学的快速发展,将最终导致对于这些调节过程机理的理解。

尽管对此的大量努力,对于具有生物活性的赤霉素合成部位以及其在特定细胞和组织中的作用模式仍未得到阐明。基于给植物添加¹⁴C标记的赤霉素的实验,认为它们以一种非极性的方式在整个植物体转移。最近,矮化和野生型豌豆植物的嫁接实验显示,GA₁,一种具有生物活性的赤霉素,与其前体GA₂₀不同,在植物中不转移(Proebsting等,(1992) *Plant Physiol.* 100, 1354-1360; Reid等,(1983) *J. Exp. Bot.* 34, 349-364)。对矮化豌豆植物的GC-MS量化分析以及生物学分析显示,赤霉素主要存在于活性生长以及延伸的组织,如芽顶体,幼叶及花中(Jones & Phillips,(1966) *Plant Physiol.* 41, 1381-1386; Potts等,(1982) *Physiol. Plant*, 55, 323-328; Kobayashi等,(1988) *Agric. Biol. Chem.* 52, 1189-1194)。然而,由于多数赤霉素以很小的量存在,而且多数是不具有生物活性的,各赤霉素在特定组织中的特定量难以确定。因此需要一种新的方法以阐明具有生物活性的赤霉素的合成部位。

由于分子生物学和遗传工程的发展,目前从多种植物种属中克隆出

了编码赤霉素生物合成酶的基因。对于这些激素的研究表明 GA 应答性矮化突变体缺乏相应的 GA 生物合成酶(图 1b)。其表达模式表明该途径在发育中是受到严格调控的。这些基因中, 来自拟南芥的 GA1 编码在 GA 生物合成早期活性的酶——焦磷酸合成酶(CPS), 在快速生长的组织中高量表达, 如苗端, 根尖和花中(Silverstone 等, (1997) Plant J. 12, 9-19)。GA C-20 氧化酶, 催化 GA 生物合成途径的最后一步, 并包含一个小的基因家族, 在拟南芥、豌豆和蚕豆的茎干和发育中的种子中特异地表达, 而这些时期 GA 对于发育是必须的。GA₃ 处理可对其产生负调节作用(Phillips 等, (1995) Plant Physiol. 108, 1049-1057; Garcia-Martinez 等, (1997) Plant Mol. Biol. 33, 1073-1084)。

这些观察使本发明的发明人设想 GA 在各种器官中的活性可能依赖于存在的内源 GA 量, 而内源 GA 量反过来又依赖 GA 生物合成酶表达的调节, 而非生物活性 GA 对于 GA 作用位点的转移。然而, 由于生物活性赤霉素由 3 β -羟化酶催化的 3 β -羟化作用产生, CPS 或 GA C-20 氧化酶表达的分析不能对生物活性 GA 的合成位点以及生物活性赤霉素量的调节提供直接的证据。

如上所述, 3 β -羟化酶在生物活性赤霉素合成的最后一步分别催化 GA₂₀ 和 GA₉ 转变为 GA₁ 和 GA₄(图 1b)。对于 3 β -羟化酶的酶学机理并未完全阐明。然而, 2-酮戊二酸结合区域对其活性是必要的, 表明 GA 3 β -羟化酶具有 2-酮戊二酸依赖的双加氧酶的典型特征。某些 GA 3 β -羟化酶可能具有多种功能; 来自南瓜胚乳的该酶可催化 2 β 和 3 β 的羟化(Lange 等, (1997) Plant Cell, 9, 1459-1467)。玉米矮化的 1, 3 β -羟化酶也被认为是多功能的, 其在玉米 GA 生物合成途径中催化三个羟化步骤(Spray 等, (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 10515-10518)。但对于这些 GA 3 β -羟化酶的性质仍不完全清楚。

发明内容

本发明提供来自水稻的新的 GA 3 β -羟化酶基因, 以及这些基因的用途, 特别是所述基因用于生产改变了株型的植物。

本发明的发明人首先基于双子叶植物 GA 3 β -羟化酶的保守区设计简并引物, 以稻基因组 DNA 作为模板进行 PCR, 从稻中分离 GA 3 β -

羟化酶基因。接着，用以上获得的编码 GA 的基因组 DNA 片段作为探针，本发明的发明人筛选了稻基因组文库，获得几个克隆。根据这些克隆的限制性酶切图将其分成两个组，各组的一个克隆被完整测序。结果，本发明的发明人发现这两个克隆都编码一种稻 GA 3 β -羟化酶。

5 接着，为了获得基于各克隆核苷酸序列的 cDNA 片段，本发明的发明人用从稻幼苗(稻苗端)或蓓蕾中分离的总 RNA 进行 RT-PCR，获得编码 GA 3 β -羟化酶的全长 DNA 克隆(分别指定为“Os3 β -1”和“Os3 β -2”)。此外，基于以上获得的基因组 DNA 序列设计引物，本发明的发明人用从稻幼苗(稻苗端)或蓓蕾中分离的总 RNA 做模板，进行 RT-PCR，
10 成功地获得了编码完整稻 GA 3 β -羟化酶的 cDNA 克隆。

由于稻 d18 被认为是 GA 应答性的矮化品种，本发明的发明人检测了此法分离的稻 GA 3 β -羟化酶克隆是否相应于 D18 基因。对 RFLP(限制性片段扩增长度多态性)分析和 d18 等位基因核苷酸序列的直接分析
15 证明，两个分离的稻基因中，Os3 β -2 基因是引起 d18 突变的基因。此外，Os3 β -1 基因和 Os3 β -2 基因表达的植物部分的差异表明，Os3 β -1 蛋白和 Os3 β -2 蛋白参与生物活性 GA 的不同的生物合成途径。

此外，本发明的发明人通过用该基因的反义 DNA 抑制 Os3 β -2 在稻植株中表达，成功地获得了与野生型植株相比矮化的稻植株。

如上所述，本发明的发明人成功地从稻中分离了一种新的 GA 3 β -
20 羟化酶基因，并发现可通过抑制该基因的表达获得比野生型植物矮化的植物。

更详细的，本发明将提供：

(1) 一种 DNA，该 DNA 编码有赤霉素 3 β -羟化酶活性的蛋白，并从
下面(a)-(c)中任选：

25 (a) 一种 DNA，该 DNA 编码由 SEQ ID NO:1 或 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白；

(b) 一种 DNA，其包含 SEQ ID NO:3 或 4 所示核苷酸序列的编码区；和

(c) 一种 DNA，该 DNA 编码由 SEQ ID NO:1 或 2 所示氨基酸序列
30 中的一个或多个氨基酸残基被取代，缺失，添加，和/或插入的氨基酸序列形成的蛋白；

- (2) 一种编码反义 RNA 的 DNA, 该反义 RNA 与(1)中 DNA 或其转录产物互补;
- (3) 一种编码 RNA 的 DNA, 该 RNA 具有核酶活性, 可特定剪切(1)中 DNA 的转录产物;
- 5 (4) 一种编码 RNA 的 DNA, 该 RNA 通过共抑制, 抑制内源的(1)中 DNA 在植物细胞中的表达;
- (5) 一种载体, 其含有(1)到(4)中任何一种 DNA;
- (6) 一种转化植物细胞, 其含有(1)到(4)中所述任何一种的可表达的 DNA;
- 10 (7) 一种转基因植物体, 其含有(6)中转化的植物细胞;
- (8) 一种(7)中所述转基因植物体的繁殖材料;
- (9) 一种编码(1)中所述 DNA 的蛋白;
- (10) 一种产生(9)中所述蛋白的方法, 其中所述方法包括培养含有(1)中所述 DNA 的可表达的转化细胞, 从所述细胞或其培养上清中获得表
- 15 达的蛋白;
- (11) 一种改变植物生长的方法, 其特征在于, 控制(1)中所述 DNA 在植物中的表达水平; 以及
- (12) 一种改变株型的方法, 其特征在于, 控制(1)中所述 DNA 在植物细胞中的表达水平。
- 20 本发明提供从稻植物中分离的新的 GA 3 β -羟化酶, 以及编码该酶的 DNA。稻的 GA 3 β -羟化酶基因的 cDNA 的核苷酸序列, Os3 β -1 和 Os3 β -2, 由本发明的发明人分离, 并包括在本发明的 DNA 中, 其序列分别显示于 SEQ ID NO: 3 和 4, 基因组 DNA 的核苷酸序列分别显示在 SEQ ID NO: 5 和 6。此外, Os3 β -1 蛋白和 Os3 β -2 蛋白的氨基酸序列
- 25 分别列表示在 SEQ ID NO: 1 和 2。
- 与先前将 3 β -羟化酶分类为 2-酮戊二酸依赖的双加氧酶(2-ODD)一致, 稻中的“Os3 β -1”和“Os3 β -2”蛋白都含有植物 2-ODD 特有的所有结构域(Prescott, A. G.(1993) J. Exp. Bot. 44, 849-861; de Carolis & Luca (1994) Phytochemistry 36, 1093-1107)。在所有发表过的序列中, 这
- 30 些克隆的编码区都和 GA 3 β -羟化酶有最高的同源性。特别地, 这些区域非常保守(Os3 β -1 中从 240 到 247, 302 到 307, Os3 β -2 中从 222 到

229, 285 到 290), 并可能是铁以及辅因子 2-酮戊二酸的结合位点。这些蛋白也含有 GA 所独有的(Os3 β -1 中从 144 到 150, Os3 β -2 中从 127 到 133)保守基元(Met-Trp-X-Glu-Gly-X-Thr)。与双子叶植物 GA 3 β -羟化酶以及其他双加氧酶的序列对比暗示, 本发明的发明人分离的两个
5 cDNA 克隆都编码稻 GA 3 β -羟化酶。

Os3 β -2 的基因图谱和基因组 Southern 分析表明, Os3 β -2 相应于 D18 基因稻 d18 突变体是 GA 应答性的矮化品种, 包括丰雪-矮化, 秋晴-矮化, 小文-玉锦和矮稻-C(图 2)。目前已识别了许多矮化等位基因。认为 Os3 β -2 蛋白通过生物活性 GA 的合成, 也参与植物的节间生长。

10 对于内源 GA 在不同生长时期、不同器官表达水平的分析显示, 13-羟化赤霉素(GA₁₉, GA₂₀, GA₁)在营养性器官中占主导地位, 而非 13-羟化赤霉素(GA₂₄, GA₉, GA₄)尤其在繁殖性生长器官中累积, 特别在花药中。这表明生物活性 GA 的生物合成途径是器官特异性的(Kurogouchi, S. 等(1979) *Planta* 146, 185-191; Kobayashi, M. 等(1984) *Agric. Biol. Chem.* 48, 2725-2729; Kobayashi, M. 等(1988) *Agric. Biol. Chem.* 52, 1189-1194)。Os3 β -2(D18)和 Os3 β -1 的表达方式符合这一推测。事实上, Os3 β -2 mRNA 大量存在于茎干、幼叶及花序分生组织中, 而 Os3 β -1 mRNA 特定地存在花中。这些一致性表明 Os3 β -2 和 Os3 β -1 的产物分别具有对 GA₂₀ 和 GA₉ 的底物特异性。

20 Os3 β -2 和 Os3 β -1 的表达也与生物活性 GA 在稻中的分布一致。育种和量化分析表明, GA₁ 在赤霉素生物合成最活跃的幼叶组织中含量高(Choi, Y-H. 等(1995) *Plant Cell Physiol.* 36(6), 997-1001), Os3 β -2 在幼叶中也有最高量的表达。有趣的是, Os3 β -2 在苗端的表达与稻其他器官相比处于中等水平, 然而 GA 生物合成的许多基因, 如拟南芥的 GA1
25 和烟草的 Nty 基因, 在分裂旺盛不断延伸的组织中(如苗端和根)是高量表达的(Silverstone 等 (1997) *Plant J.* 12, 9-19)。这种不一致性暗示, 器官合成 GA 的活性可能在单子叶和双子叶植物中有差异。另一方面, 内源 GA₄ 在花期的花药中含量极高(Kobayashi, M. 等(1988) *Agric. Biol. Chem.* 52, 1189-1194; Kobayashi, M. 等(1990) *Plant Cell Physiol.* 31(2),
30 289-293)。这一事实与 Os3 β -1 的花特异性表达一致。这种一致性表明 GA₄ 是通过 Os3 β -1 蛋白的活化在花药中合成。因此, Os3 β -2 和 Os3

β -1 蛋白可能参与生物活性 GA 的不同生物合成途径。

事实上, Os3 β -1 蛋白以 GA₉ 为底物催化产生 GA₄(3 β -羟化), GA₇(2, 3-不饱和和 3 β -羟化)和 GA₃₄(2 β -羟化)(图 9), 以 GA₂₀ 为底物也得到了同样的结果。此外, 以 GA₅ 和 GA₄₄ 为底物, 该蛋白分别相应地产生 3 β 羟化的赤霉素 GA₃ 和 GA₈₈。进一步的, Os3 β -2 蛋白分别以 GA₅, GA₉, GA₂₀, GA₄₄ 为底物, 催化产生 3 β -羟化赤霉素(GA₃, GA₄, GA₁, GA₃₈)。(图 10)(实施例 5)。

几个报道提及, 生物活性 GA 不仅对于茎干的延长是必须的, 对于植物的多种其他生长过程也是必须的。例如, 对于花器官, 有报道说, 拟南芥 GA 缺陷型 gal-3 表现雄性不育表型(Koornneef, M. & Van der Veen, J. H. (1980) Theor. Appl. Genet. 58, 257-263), 在番茄突变体, stamenless-2 和 gib-1 导致花药生长在早期终止, 不形成可育花粉粒(Sawhney (1974) J. Exp. Bot. 25, 1004-1009; Jacobsen & Olszewski (1996) Proc. Natl. Sci. U. S. A. 93, 9292-9296)。

由于本发明的蛋白被认为参与生物活性 GA 的生物合成, 它们可被用于生产生物活性 GA。此外, 如上所述, 植物的生长可以通过调节这些蛋白在植物中的表达而改变。例如, 可以获得与野生型不同的植株型。

本发明的蛋白可通过本领域技术人员根据公知方法, 利用基因重组技术以重组蛋白形式表达, 也可表达为天然蛋白。重组蛋白的制备, 如下所述, 可通过将编码本发明蛋白的 DNA(如 SEQ ID NO: 3 和 4)插入适当的表达载体, 并从转化该载体的细胞中纯化该蛋白。天然蛋白的获得, 例如, 可用该制备的重组蛋白或其部分的肽免疫动物, 将制备的抗体与亲和层析柱结合, 将表达本发明蛋白的烟草和稻组织提取物过柱, 纯化结合到柱上的蛋白。

本发明蛋白包括部分氨基酸被改变了的野生型蛋白(SEQ ID NO: 1 和 2), 但其仍然保留野生型蛋白的功能。制备这种突变蛋白的方法是本领域技术人员所熟知的, 包括定点突变(Kramer, W. & Fritz, H-J. Oligonucleotide-directed Construction of mutagenesis via gapped duplex DNA. Methods in Enzymology, 154: 350-367, 1987)。氨基酸突变也可能天然产生。因此, 本发明蛋白包括保留有天然型蛋白 GA 3 β -羟化酶活性的蛋白, 以及天然型蛋白的氨基酸序列经一个或多个氨基酸残基的替代、

缺失、添加和/或插入所产生的蛋白。只要该突变蛋白仍保留 GA 3 β -羟化酶活性, 则对于该蛋白中氨基酸突变的位点和数量并无特别的限制。通常可被突变的氨基酸数量不超过 50 个氨基酸残基, 优选不超过 30 个, 更优选不超过 10 个, 最优选不超过 3 个氨基酸残基。

- 5 此处, “GA 3 β -羟化酶活性”是指当 GA₂₀ 或 GA₉ 作为底物, 铁离子和 2-酮戊二酸作为辅因子时, 合成反应产物 GA₁ 或 GA₄ 的活性。该活性可被检测, 例如下法。通常, 获得的 cDNA 插入表达载体, 在大肠杆菌中作为融合蛋白过量表达。利用获得的细胞提取物(作为酶溶液), 反应在存在辅因子铁离子和 2-酮戊二酸的条件下, 以 GA₂₀ 或 G₉ 作为反应
- 10 底物, 在体外进行, 最终得到的反应产物(GA₁ 或 G₄)通过 GC-MS 证实。

本发明的发明人分离了编码以上蛋白的 cDNA 和基因组 cDNA。因此, 编码本发明蛋白的 DNA 包括 cDNA 和基因组 cDNA, 只要其编码这些蛋白。编码 Os3 β -2 和 Os3 β -1 蛋白的 DNA 如果是 cDNA, 这些 DNA 可通过 RT-PCR 制备, 使用基于 SEQ ID NO: 3 和 4 中确定的核苷酸序列信息设计的引物, 以及从幼苗(稻苗端)或花的蓓蕾中分离的总

15 RNA 做模板。此外, 基因组 DNA 可用根据 SEQ ID NO: 5 和 6 中确定的核苷酸序列信息设计的引物, 以及以稻基因组 DNA 为模板进行 PCR 获得。

- 编码本发明蛋白的 DNA 可用于, 例如, 生产重组蛋白。重组蛋白
- 20 的产生可用以下方法。首先, 利用包含限制性酶切位点的引物进行 RT-PCR 合成全长 cDNA, 亚克隆到表达载体 pMAL-c2(NEB)的多克隆位点。通过标准方法将该构建体转化大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 BL21 细胞(蛋白酶缺陷型)。使用获得的转化体诱导蛋白合成。*E.coli* 在含有 0.2%葡萄糖的 2xYT 培养基中, 37°C 震荡培养。OD₆₀₀ 达到 0.6 左右时,
- 25 加入 IGTP 至终浓度为 1mM, 进一步在 18°C 继续培养 24 小时。酶溶液的抽提依照以下方法。培养完成后, 收集细胞并在悬浮缓冲液(包含 10%甘油, 2 mM DTT, 1 mg/ml 溶菌酶的 50 mM Tris-Hcl(pH8.0)中裂解。细胞悬液在 4°C 放置 30 分钟, 接着放置在 -80°C 直到完全冷冻。冷冻的细胞悬液融化后, 超声波处理, 最大强度处理两次, 间隔 5 分钟, 处理时
- 30 间为 30 秒(Heat Systems-Ultrasonics, Inc., Model W-225R)。将处理后的悬液离心(15000rpm, 4°C 20 分钟), 该悬液被用做粗提的酶溶液。

进一步的，制备纯化蛋白，在 *E. coli* 中(或类似系统中)表达带有组氨酸标记，麦芽糖结合蛋白或谷胱甘肽 S 转移酶(GST)的本发明蛋白，然后分别通过镍柱，淀粉酶柱或 GST-谷胱甘肽柱。接着，纯化后，上述标记可用限制性的蛋白酶切除，如凝血酶和 Xa 因子。

- 5 如上所述，本发明的发明人所分离的基因被认为通过生物活性 GA 的表达参与植物的生长。因此，植物的生长可能通过调节这些基因的表达进行控制。由于 Os3 β -2 特别被认为参与植物的节间生长，该基因可能被用于控制植物的高度。植物高度的控制有多种的工业用途。

10 例如，抑制本发明基因在植物中的表达从而控制植物高度，可以抗倒伏，因而增加果实重量。此外，植物的矮化使每棵植株更密集，因此单位面积上可种植的植株数量得以增加。这种密集种植对于特别是如稻，小麦，玉米等农作物的产量是非常重要的。另外，编码本发明蛋白的 DNA 可考虑如何应用于矮生花卉，矮生果树等。通过抑制 Os3 β -1 基因在花中的表达可诱导产生雄性不育性状。

- 15 另一方面，通过本发明基因在植物中增强的表达，使植物更高，从而增加植物整体的产量也是可能的。这对于饲料作物的整体产量非常有用。

20 本发明中，有多种本领域技术人员所熟知的方法可用来抑制本发明基因的表达，控制植物的生长。此处，“基因表达的抑制”包括转录的抑制，蛋白翻译的抑制，不仅包括完全的抑制，还包括表达的降低。

25 植物中特定内源基因的表达可利用反义技术，用常规方法抑制。Ecker 等利用瞬时的基因表达，最先表明在植物中通过电穿孔引入反义 RNA 的效果(Ecker, J. R. & Davis, R. W. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5372)。之后，报道表明烟草和矮牵牛中靶基因的表达因反义 RNA 的引入而显著降低(van der Krol, A. R.等, (1988) Nature 333, 866)。反义技术现在已确立为一种抑制植物中靶基因表达的方式。

30 多种因素可抑制反义核酸对靶基因表达的抑制。包括三链形成抑制转录的起始；在 RNA 聚合酶形成局部开环结构的位点形成杂交，抑制转录；合成的 RNA 与之形成杂交抑制转录；内含子和外显子连接位点形成杂交抑制剪切；在剪切体形成的位点有杂交形成，抑制剪切；与 mRNA 杂交抑制 mRNA 从细胞核到细胞质的转运；在加帽位点或多聚 A

尾的位点形成杂交抑制剪切；翻译起始因子的结合位点形成杂交抑制翻译的起始；起始密码子附近的核糖体结合位点形成杂交抑制翻译；mRNA的翻译区和多核糖体结合位点处形成杂交抑制肽链的延伸；核酸和蛋白质相互作用位点形成杂交抑制基因的表达。这些因素通过抑制转录、剪切、或翻译，抑制靶基因的表达(Hirashima & Inoue, "Shin Seikagaku Jikken Koza (New Biochemistry Experimentation Lectures) 2, Kakusan (Nucleic Acids) IV, Idenshi No Fukusei To Hatsugen (Replication and Expression of Genes)," Nihon Seikagakukai Hen (The Japanese Biochemical Society Ed.), Tokyo Kagaku Dozin, pp. 319-347, (1993))。

10 本发明中使用的反义序列可通过上述任何方法抑制靶基因的表达，如果反义序列设计为与基因 mRNA 5' 末端不翻译区互补，则其可有效地抑制该基因的翻译。此外，也可能使用与编码区或 3' 末端不翻译区互补的反义序列。因此，本发明中使用的反义序列包括含有与该基因翻译区和不翻译区互补的反义序列的 DNA。反义 DNA 连接于适当启动子的下游，优选含有转录终止信号的序列连接在 3' 端。这样制备的 DNA 15 可通过已知方法转染需要的植物。反义 DNA 的序列优选是与转化植物的内源基因(或同源基因)或内源基因的部分互补的序列，但只要其能有效抑制该基因的表达，并不需要完全与之互补。转录的 RNA 优选的与靶基因的转录产物互补性不少于 90%，更优选地不少于 95%，为了有效 20 抑制靶基因的表达，反义 DNA 至少应为 15 个核苷酸或更长，优选 100 个核苷酸或更长，更优选 500 个核苷酸或更长。使用的反义 DNA 通常小于 5kb，优选地短于 2.5kb。

也可使用编码核酶的 DNA 抑制内源基因的表达。核酶被定义为具有催化活性的 RNA 分子。目前已知多种核酶，其各有不同的催化活性。25 对作为 RNA 剪切酶的核酶的研究使能够设计位点特异性剪切 RNA 的核酶。第一组内含子类型或 RNA 酶 P 中所含 M1RNA 的核酶由 400 或更多个核苷酸组成，其他属于榔头状和发夹型核酶的活性结构域约为 40 个核苷酸 (Koizumi, Makoto & Ohtsuka, Eiko(1990) *Tranpakushitsu Kakusan Kohso (Protein, Nucleic acid, and Enzyme)* 35, 2191)。

30 榔头状核酶的自我剪切结构域剪切 C15 的 3' 末端序列 G13U14C15。在第 9 位点 U14 和 A 之间形成的核苷酸对被认为对核酶的活性重要。此

- 外, 结果表明当 15 位点处的核苷酸是 A 或 U 而非 C 时, 也发生剪切 (Koizumi, M.等(1988). FEBS Lett. 228, 225)。如果核酶的底物结合位点设计为与靶点附近的 RNA 序列互补, 则可获得一种类似限制性酶的 RNA 剪切核酶, 其识别靶 RNA 内的 UC, UU, 或 UA 序列 (Koizumi, M.等(1988). FEBS Lett. 239, 285; Koizumi, Makoto & Ohtsuka, Eiko(1990) Tranpakushitsu Kakusan Kohso (Protein, Nucleic acid, and Enzyme) 35, 2191; Koizumi, M.等(1989) Nucleic Acid Res.17, 7059)。例如, 在 Nty 基因, 本发明的发明人分离的 Os3 β -1 基因或 Os3 β -2 基因 (SEQ ID NO: 3 或 4) 的编码区有多个位点可用做核酶的靶点。
- 10 发夹类型的核酶也可用于本发明。例如, 在烟草环斑病毒卫星 RNA 的负链中可发现发夹类型的核酶 (Buzayan, J. M. (1986) Nature 323, 349)。这种核酶被发现可以以靶特异性的方式剪切 RNA (Kikuchi, Y. & Sasaki, N. (1992) Nuclei Acids Res. 19, 6751; Kikuchi, Yo (1992) Kagaku To Seibutsu (Chemistry and Biology) 30, 112)。
- 15 被设计用于剪切靶的核酶与一个启动子融合, 如花椰菜花叶病毒 35S 启动子, 并与一个转录终止序列相融合才能在植物细胞中转录。然而, 如果在转录 RNA 5' 末端或 3' 末端加入额外序列, 核酶的活性有可能丧失。这种情况下, 可以将顺式发挥剪切功能的其他的剪切核酶放置在核酶部分的 5' 或 3' 端, 因而可以从含有该核酶的转录 RNA 精确地剪切出核酶部分 (Taira, K. 等(1990) Protein Eng. 3, 733; Dzaianott, A. M. & Bujarski, J. J. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 4823; Grosshands, C. A. & Cech, R. T. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 3875; Taira, K. 等(1991) Nucleic Acids Res. 19, 5125)。通过串联地将这些结构单元连接, 靶基因中的多个位点都可以被剪切, 获得最大的效果 (Yuyama, N. 等(1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 186, 1271)。使用这些核酶就可能特异地剪切本发明靶基因的转录产物, 从而抑制该基因的表达。
- 25 内源基因的表达也可通过具有与靶基因序列相同或类似的序列的 DNA 的转化, 被共抑制地抑制。此处所用“共抑制”指这种现象: 具有与靶内源基因序列相同或类似的序列的基因通过转化进入植物中时, 被引入的外源基因和靶内源基因的表达都受到抑制。尽管对于共抑制的详细机理还不清楚, 这种现象在植物中是常见的 (Curr. Biol. (1997) 7, R793,
- 30

Curr. Biol. (1996) 6, 810)。例如, 如果希望获得一种本发明基因被共抑制的植物体, 可能将表达本发明基因或具有相似序列的 DNA 制作形成的载体 DNA 转化该植物。用于共抑制的基因不需要与靶基因完全相同。但优选的, 其具有 70%或更高的序列相似性, 更优选 80%或更高的序列相似性, 最优选具有 90%或更高的序列相似性(如 95%或更高)。

氨基酸序列或核苷酸序列之间的相同性可通过 Karlin 和 Altschl 等的 BLAST 算法确定(Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1993) 90, 5873-5877)。如 BLASTN 和 BLASTX 等程序是基于此算法(Altschul 等(1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410)发展而来。根据基于 BLAST 的 BLASTN 来分析核苷酸序列, 例如参数的设定为 score=100, 语句长度为 12。另一方面, 基于 BLAST 的 BLASTX 分析氨基酸序列时的参数包括, 例如 score=50, 语句长度为 3。使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时一般用默认值。这些分析的特定技术是本领域所熟知的(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

利用抑制本发明基因表达的 DNA 改变植物的生长, 可以通过将该 DNA 插入合适的载体, 将载体转入植物细胞, 转化植物细胞再生而获得。只要载体能在植物细胞中表达插入的基因, 则对载体是没有限制的。

例如, 可以使用本发明分离的基因的启动子。也可使用含有在植物细胞中组成型表达的启动子(如花椰菜花叶病毒的 35S 启动子)的载体。此外, 植物的组织特异性启动子可特定地改变特化的植物组织, 如花, 果实等。这些组织特异性启动子有如: 种子特异性启动子, 如菜豆蛋白启动子(Bustos 等,(1991) EMBO J.10, 1469-1479), 大豆的大豆球蛋白启动子(Lelievre 等 (1992) Plant Physiol 98, 387-391); 叶特异性启动子如豌豆 RbcS 基因启动子(Lam & Chua (1990) Science 248, 471-474), 以及小麦 Cab1 基因启动子(Gotorn 等,(1993) Plant J.3, 509-518); 根特异性的启动子如烟草 TobRB7 基因(Yamamoto 等,(1991) Plant Cell 3,371-382), 以及发根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)的 rolD 基因(Elmayan & Tepfer (1995) Transgenic Res.4,388-396)。也可能使用包含外源刺激诱导活化性启动子的载体。

尽管对于载体插入何种植物细胞没有特别的限制, 但优选本发明基因来源的是稻和烟草植物。此处所述“植物细胞”包括各种形式的植物细胞, 如细胞的悬浮培养物, 原生质体, 叶的切片, 愈伤组织等。载体

可通过多种方式转移到细胞中，这些都是本领域技术人员所知的，包括聚丙烯酰胺凝胶法，电穿孔法，农杆菌介导的方法以及基因枪法等。从转化植物细胞中再生植物体的方法是本领域技术人员所知的标准方法。一旦转化的植物细胞再生，就可能从植物体获得繁殖性材料(如种子，块茎，枝等)，并大规模生产本发明的转化植物。

此外，本发明中也可能通过促进本发明的发明人分离的 DNA 的表达，增强植物的生长。这种情况，该 DNA 被插入合适的载体，产生的重组载体转入植物细胞，从而获得转化的植物细胞。在植物细胞中表达所用的载体，载体转入的植物细胞，以及植物再生的方法与以上所述使用反义 DNA 和其他同类情况是相似的。

附图说明

图 1a 显示了赤霉素(内赤霉素)的一般结构。

图 1b 显示了高等植物中一条主要的 GA 生物合成途径。斜体字是 GA-应答性的矮化突变，其缺乏特定的 GA 生物合成途径：ga1, ga2, ga3, ga5 和 ga4 来自拟南芥；an1, d5, d3 和 d1 来自玉米；ls 和 le 来自豌豆；d35(dx)和 d18(dy)来自稻。

图 2 是几幅照片，表明 d18 矮化植物的各种表型。从左到右，台中(Taichuu)-65(wt:最终高度为 1 米)，古丈玉锦(Kotake-tamanishiki)矮化株(d18^k约 65 厘米)，矮稻(Waito)-C(约 55 厘米)，丰雪(Hosetsu)矮化株(d18^k约 15 厘米)以及秋晴(Akibare)矮化株(Bar=10 cm)。

图 3 表明 GA 3 β -羟化酶(Os3 β -1 和 Os3 β -2)基因和各种 RFLP 标记基因在稻第一第五染色体上的基因座位。

图 4a 对 D18 和 d18 等位基因 RFLP 分析结果的电泳图谱。DNA 分离自 D18(Shiokari)和秋晴(Akibare)和 d18 等位基因(d18^h, ld18^k, d18-AD)植物的叶组织，DNA 用 ApaI 消化，电泳分离，结合到尼龙膜，接着进行杂交。分子大小标记以 kb 表示于左边。

图 4b 是基因组 Os3 β -2 克隆和其亚克隆的限制性酶切图谱。基因组克隆是通过 PCR 产物为探针，筛选基因组文库获得的。2.3kb 片段 BglII 的亚克隆包含 D18 的完整编码区。

图 5 是 GA 3 β -羟化酶在野生型 *Oryza sativa* 植物中表达模式的电泳

图谱。该模式通过将 3 β -羟化酶 cDNA D18 和 Os3 β -1 与从 SA(苗端), ST(茎干), LB(叶片), Ra(叶轴), FL(花)YL(幼叶), IFM(花序分生组织)以及 Sh(2 周的种苗)中提取的 10 μ g 总 RNA 进行 northern 杂交获得的。

图 6 是照片, 在肌动蛋白启动子控制下反义组成型表达 Os3 β -2 (D18) cDNA 的转化植物。左边是野生型日本晴植物, 中间为半矮化植物, 右边为矮化植物。

图 7 表示插入全长 Os3 β -2 cDNA 的质粒 pBS-SK⁺。

图 8 显示插入反义 Os3 β -2 (D18)基因的质粒 pAct-NOS/Hm2。

图 9 表示以 GA₉ 为底物, 经 Os3 β -1 融合蛋白催化产生 GA₄, GA₇ 和 GA₃₄ 的途径。

图 10 表示以 GA₅, GA₉, GA₂₀ 和 GA₄₄ 为底物, 在 Os3 β -2 融合蛋白的催化下, 分别产生 3 β -羟化赤霉素(GA₃, GA₄, GA₁, GA₃₈)的途径。

实施本发明的最佳模式

以下将以实施例详细地解释本发明, 但并不应该认为是对本发明的限制。稻种子(*Oryza sativa*, Japonica-type 品种: “日本晴”, “秋晴”, “Shiokari” 和其他)在 1%的 NaClO 中灭菌 1 小时, 在无菌蒸馏水中充分润洗, 种植于土壤中, 温室生长。

实施例 1 分离编码 GA 3 β -羟化酶的 cDNA 克隆

目前没有从单子叶植物中分离 GA 3 β -羟化酶的报道。从双子叶植物中克隆出了几种 GA 3 β -羟化酶(Chiang 等, 1995; Martin 等, 1997; Lester 等, 1997)。

为了分离编码 GA 3 β -羟化酶的部分片段, 以稻基因组 DNA 为模板, 根据已知双子叶植物 GA 3 β -羟化酶序列保守区设计简并引物(5' 引物: 5' -GTNGTNAARGTNGGNGARRT-3' /SEQ ID NO:7; 3' 引物: 5' -AYYTARTCRTTGGANGTNAC-3' /SEQ ID NO:8), 进行 PCR。获得了根据已知 GA 3 β -羟化酶序列所预期的片段大小的 210bp DNA 片段。

为了分离全长克隆, 本发明的发明人用该片段做探针, 筛选稻基因组文库。分离了几个克隆, 根据各基因组克隆的限制性图谱将其分为两组。最终将各组的一个克隆完全测序, 并命名为 Os3 β -1 和 Os3 β -2(Os3

β -1 和 Os3 β -2; *Oriza sativa* GA 3 β -羟化酶 - 1, -2)。这些克隆的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 5 和 6。Os3 β -1 与作为探针的片段序列相同, 但 Os3 β -2 与该片段在相应区域有不同的序列。

5 基于各克隆的序列, 本发明的发明人用幼苗(稻苗端)或未开花的蓓蕾中分离总 RNA, 进行 RT-PCR, 以获得 cDNA 片段。结果获得了编码 GA 3 β -羟化酶的全长 cDNA 克隆。Os3 β -1 或 Os3 β -2 的 cDNA 包含一个开放阅读框, 分别编码 379 或 373 个氨基酸的多肽。SEQ ID NO: 3 和 4 为这些克隆的核苷酸序列。Os3 β -2 基因组 DNA 包含一单独的短内含子(110bp), 该内含子的位置与先前报道的双子叶植物中 GA 3 β -羟化酶的位置相同。另一个克隆 Os3 β -1 的基因组 DNA 包含两个内含子。一个与 Os3 β -2 的基因组 DNA 位置相同, 大小也与 Os3 β -2 的类似(110bp)。另一个位于辅因子 2-酮戊二酸结合位点(400bp)的位置上(未显示数据)。这两个克隆推导出的氨基酸序列与其他 GA 3 β -羟化酶非常相似, 而且这二者之间的相似性也很高(56.6%相同, 88.2%相似性)。

15 利用自动测序系统(ABI373A), 双脱氧核苷酸链终止法确定核苷酸序列。用 GENETYX 计算机软件(Software Kaihatsu Co., Japan)进行序列分析。

实施例 2 d18 等位基因的识别及定性

20 先前对稻植物的量化分析和生物学分析表明 D18 基因编码 GA 3 β -羟化酶。D18 的基因位点确定在 1 号染色体, 其处于位于该染色体底端的 FS-2 位点的侧翼。为了研究相应于 D18 基因的分离的 GA 3 β -羟化酶克隆, 本发明的发明人利用 RFLP(限制性片段长度多态性)分析在稻基因组上标记了两个克隆。

25 Os3 β -1 或 Os3 β -2 的 RFLP 分别存在与用 EcoRI 消化的 Asominori(一种日本稻)和 ApaI 消化的 IR24(一种印度稻)DNA 中。对于 Asominori 和 IR24 杂交的 F2 子代的消化基因组 DNA 进行连锁性分析。Os3 β -1 和 Os3 β -2 分别被标记于第 5 号染色体的顶端和第 1 号染色体的底端(图 3)。该结果暗示 Os3 β -2 的基因座位相应于 D18 的基因座位。

30 进行了进一步的分析, 以证实 Os3 β -2 定位在 D18 的基因座位上。D18 基因功能丧失产生了四种独立的一般突变。这些突变可能是通过 γ 射线的诱发突变, 导致 D18 基因的 DNA 重排和/或缺失而产生的。因此,

如果 Os3 β -2 是 D18 基因, 则在野生型和这些突变型 Os3 β -2 位置上的 RFLP 可被观察出来。

进行野生型 DNA(Shiolari 和 Akibare)和 d18 等位基因(1d18^k, 1d18^h, d18-AD)的 DNA 凝胶印记分析。1d18^k和 1d18^h是 Shiokari 背景的同型基因系, d18-AD 来自乙烯亚胺(EI)诱变产生的 Akibare 突变体。DNA 凝胶印记分析, 限制性酶消化稻基因组(每泳道 1 μ g), 琼脂糖凝胶电泳分离, 转移到 Hybond N+ nylon 膜(Amersham)(Sambrook 等, 1989), 在 65°C 的 0.25 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 7% SDS 溶液中进行杂交。65°C 的 2X SSC, 0.1% SDS 冲洗滤膜两次, 15 分钟, 再用 65°C 的 0.1X SSC, 0.1% SDS 冲洗滤膜一次, 15 分钟。

使用 8 种酶(BamHI, BglII, ApaI, KpnI, DraI, EcoRV, EcoRI, HindIII)消化这些基因组 DNA, 以发现野生型和突变型之间的 RFLP。用 ApaI 消化来自 d18-AD 和 1d18^h的 DNA 时, 观察到多形性, 而 1d18^k用任何酶消化都不表现多形性(图 4)。

RFLP 分析的结果强烈暗示, d18-AD 在 D18 基因作为有一段长的缺失, 而 1d18^h有一段包含 ApaI 位点的短的缺失。为证实这一结果, 本发 15 明的发明人分析了所有 d18 等位基因的完整编码序列, 并将其与野生型 Os3 β -2 对比。

特别地使用源于 D18 5' 和 3' 末端非编码序列寡核苷酸引物, 扩 20 增包含来自 D18, d18^h, d18^k和 d18-w 的完整编码区的 1.6kb 片段, 接着对扩增片段进行测序。

正如预期, Os3 β -2 编码序列在所有 d18 等位基因的各个位置都改变(表 1), 而 d18-AD 没有产生 PCR 产物。

表 1

等位基因	突变的性质 a	在编码序列 中的位置	突变结果
d18-AD(秋晴矮化)	7-kb 缺失		不存在全长 D18 ORF
d18 ^h (丰雪矮化)	GGG 单碱基缺失为 GG	Gly ²⁵¹	38 个新氨基酸的移码, 添加, 删减的多肽前端
d18 ^k (古丈玉锦)	CGC 突变为 TGC	Arg ¹⁴⁵	氨基酸替代, 将 Asp 替代为 Cys,

			产物改变
d18-w(矮稻-C)	9个碱基缺失	Val ⁵⁷ 突变为	由于阅读框内的缺失导致3个
		Arg ⁵⁹	氨基酸片段缺失,产物改变

a 下划线表明在 d18^K 等位基因中的核苷酸替代。

这支持以上结果,即 d18-AD 几乎完全丧失编码序列(数据未显示)。来自 1d18^K 的序列中,从起始密码子计算的第 433 核苷酸处的 C 到 T 的替代,将 168 精氨酸转化为半胱氨酸。d18-w 中,169 到 177 处符合读框的 9 个核苷酸的缺失导致 57 处缬氨酸到 59 处精氨酸的 3 个氨基酸缺失。Ld18^h 中核苷 G 的缺失导致阅读框移位。这些结果表明 Os3 β -2 基因位于 D18 座位,并编码 GA 3 β -羟化酶。

实施例 3 Os3 β -2(D18)和 Os3 β -1 基因在植物生长中的调节

为了研究 D18 和 Os3 β -1 基因在植物生长中的表达,进行 RNA 凝胶印记分析。标准方法从各种器官或组织中制备总 RNA(Sambrook 等, 1989)。凝胶电泳分离 RNA(每样品 10 μ g),转移到 Hybond N+ nylon 膜(Amersham),在 65 $^{\circ}$ C 的 5XSSC, 10%(w/v)硫酸葡聚糖,0.5% (w/v)SDS, 0.1 mg/ml 变性鲑精 DNA 溶液中进行杂交。65 $^{\circ}$ C 的 2X SSC, 0.1% SDS 冲洗滤膜两次, 15 分钟,再用 65 $^{\circ}$ C 的 0.1X SSC, 0.1% SDS 冲洗滤膜一次, 15 分钟。来自全长 D18 cDNA 的 BssHIII-PvuII(519bp)片段和来自 Os3 β -1 的 KpnI-PvuII(310bp)片段被用做探针。

在各检测的器官中表达 D18 基因(图 5)。表达水平在茎干、幼叶和花序分生组织中高,在叶片和叶轴中低。作为对比, Os3 β -1 mRNA 在花中高量表达,而在叶片和叶轴中表达量低。

由于 D18 和 Os3 β -1 互相非常相似,本发明的发明人通过基因组 southern 分析检测了其相互杂交的程度。当基因组 southern 杂交使用各自特异性的探针时,没有出现交叉杂交(数据未显示)。

实施例 4 抑制 Os3 β -2(D18)基因表达产生矮化植物

克隆于质粒 pBS-SK⁺ 的 BamHI-HindIII 位点的全长 Os3 β -2 cDNA(图 7),经 BamHI-HindIII 消化从载体上剪切下来,以收集 cDNA,接着将其两末端钝化。将这种钝化的全长 cDNA 插入质粒 pAct-NOS/Hm2 的 SmaI 位点,构建表达反义 Os3 β -2 基因的载体(图 8)。

电穿孔法将这种重组质粒转化农杆菌菌株的 EHA101。稻发芽的种子与农杆菌菌株接触，在含有卡那霉素和潮霉素的选择培养基中培养 3 周，选择抗性细胞，将抗性细胞转移到再分化培养基以获得更多的转基因植物。结果表达反义 Os3 β -2 基因的植物与野生型稻植物相比变得矮化(图 6)。

5 实施例 5 重组 GA 3 β -羟化酶的功能

Os3 β -1 和 Os3 β -2 基因预测编码区的 cDNA 分别正向插入表达载体 pMAL-c2(New England Biolabs, Beverly, MA)，以获得融合的翻译产物。获得的构建体，pMAL-Os3 β -1 和 pMAL-Os3 β -2，在 *E. coli* 菌株 JM109 中表达。细菌细胞在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 2 \times YT 培养基中震荡，37 $^{\circ}$ C 过夜培养，接着培养物由含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 2 \times YT 培养基稀释 100 倍，进一步在 30 $^{\circ}$ C 震荡培养。4 小时后，在培养液中加入 IPTG 至终浓度为 1mM，混合液 17 $^{\circ}$ C 震荡培养 18 小时。培养结束后，收集细菌细胞，洗涤缓冲液(包含 50 mM Tris-HCl(pH8.0), 10% (w/v) 甘油和 2mM DTT)，用含有溶菌酶(1 mg/ml)的洗涤缓冲液悬浮，冰上放置 30 分钟。

将获得的细胞裂解液超声处理，离心，上清进行 SDS-PAGE 以证实融合蛋白的表达。上清与各种赤霉素和辅因子(抗坏血酸，二价铁，和 2-酮戊二酸)以检测 Os3 β -融合蛋白的酶活。对于 Os3 β -2 融合蛋白的活性分析，根据手册中所述方法，上清在淀粉凝胶柱中纯化，获得的纯化蛋白同以上方法孵育。GC-MS 可识别代谢的赤霉素。对于 Os3 β -1 融合蛋白，当底物为 GA₉(图 9)，证实了 GA₄(3 β 羟化)，GA₇(2, 3-不饱和和 3 β 羟化)，以及 GA₃₄(2 β 羟化)的生成。GA₄ 和 GA₇ 在反应产物中为主导。使用 GA₂₀ 做底物也获得同样的结果。此外，GA₅ 和 GA₄₄ 为底物时，仅获得相应的 3 β 羟化的赤霉素(GA₃ 和 GA₈₈)。另一方面，GA₅，GA₉，GA₂₀，GA₄₄ 作为底物时，Os3 β -2 融合蛋白产生相应的 3 β 羟化的赤霉素(GA₃，GA₄，GA₁，和 GA₃₈)(图 10)。

这些结果表明 Os3 β -1 基因编码催化 2-, 3-去饱和，2 β -羟化以及 3 β -羟化核反应的酶。此外，显然 Os3 β -1 基因编码催化 3 β -羟化的酶。

30

工业应用

5 本发明提供参与植物赤霉素活化的新的蛋白和基因，也提供通过控制这些基因的表达改变了赤霉素活性的植物。本发明使植物中的赤霉素活性能够被改变，从而人为地改变植株类型。对植物中赤霉素活性的抑制，抑制了植物的纵向生长，诱导植物矮化的表型。例如，当大量施肥促进植物过度生长时，其可以防止稻植物倒伏。由于叶片对光照的吸收效率增加，也将使作物产量有显著增加。还可能改善收获和育种管理的效率。本发明的另一个效果是，通过提高本发明基因在植物中的表达，促进赤霉素活性，从而增加植物的整体产量。这种策略对于饲料作物整体的产量尤其有用。

<110> 农林水产省农业生物资源研究所所长代表的日本国(JAPAN as represented by Director General of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, National Institute of Agrobiological Resources)
理化学研究所(RIKEN)

<120> 来自稻赤霉素 3β -羟化酶的基因及其用途

<130> MOA-103PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-361608

<151> 1999-12-20

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 379

<212> PRT

<213> 稻(Oryza sativa)

<400> 1

```

Met Thr Ser Ser Ser Thr Ser Pro Thr Ser Pro Leu Ala Ala Ala Ala
  1                5                10                15

His Asn Gly Val Thr Ala Ala Tyr Phe Asn Phe Arg Gly Ala Glu Arg
      20                25                30

Val Pro Glu Ser His Val Trp Lys Gly Met His Glu Lys Asp Thr Ala
      35                40                45

Pro Val Ala Ala Ala Asp Ala Asp Gly Gly Asp Ala Val Pro Val Val
      50                55                60

Asp Met Ser Gly Gly Asp Asp Ala Ala Val Ala Ala Val Ala Arg Ala
      65                70                75                80

Ala Glu Glu Trp Gly Gly Phe Leu Leu Val Gly His Gly Val Thr Ala
      85                90                95

```

Glu Ala Leu Ala Arg Val Glu Ala Gln Ala Ala Arg Leu Phe Ala Leu
 100 105 110

Pro Ala Asp Asp Lys Ala Arg Gly Ala Arg Arg Pro Gly Gly Gly Asn
 115 120 125

Thr Gly Tyr Gly Val Pro Pro Tyr Leu Leu Arg Tyr Pro Lys Gln Met
 130 135 140

Trp Ala Glu Gly Tyr Thr Phe Pro Pro Pro Ala Ile Arg Asp Glu Phe
 145 150 155 160

Arg Arg Val Trp Pro Asp Ala Gly Asp Asp Tyr His Arg Phe Cys Ser
 165 170 175

Ala Met Glu Glu Tyr Asp Ser Ser Met Arg Ala Leu Gly Glu Arg Leu
 180 185 190

Leu Ala Met Phe Phe Lys Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Asp Ala Pro
 195 200 205

Gly Gly Glu Thr Glu Arg Lys Ile Arg Glu Thr Leu Thr Ser Ser Thr
 210 215 220

Ile His Leu Asn Met Phe Pro Arg Cys Pro Asp Pro Asp Arg Val Val
 225 230 235 240

Gly Leu Ala Ala His Thr Asp Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ile Leu Gln
 245 250 255

Ser Pro Val Pro Gly Leu Gln Leu Leu Arg His Arg Pro Asp Arg Trp
 260 265 270

Val Thr Val Pro Gly Thr Pro Gly Ala Leu Ile Val Val Val Gly Asp
 275 280 285

Leu Phe His Val Leu Thr Asn Gly Arg Phe His Ser Val Phe His Arg
 290 295 300

Ala Val Val Asn Arg Glu Arg Asp Arg Ile Ser Met Pro Tyr Phe Leu
 305 310 315 320

Gly Pro Pro Ala Asp Met Lys Val Thr Pro Leu Val Ala Ala Gly Ser

	325	330	335
Pro Glu Ser Lys Ala Val Tyr Gln Ala Val Thr Trp Pro Glu Tyr Met	340	345	350
Ala Val Arg Asp Lys Leu Phe Gly Thr Asn Ile Ser Ala Leu Ser Met	355	360	365
Ile Arg Val Ala Lys Glu Glu Asp Lys Glu Ser	370	375	
<p><210> 2 <211> 373 <212> PRT <213> 稻(Oryza sativa)</p>			
<p><400> 2</p>			
Met Pro Thr Pro Ser His Leu Lys Asn Pro Leu Cys Phe Asp Phe Arg	1	5	10
Ala Ala Arg Arg Val Pro Glu Thr His Ala Trp Pro Gly Leu Asp Asp	20	25	30
His Pro Val Val Asp Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Asp Ala Val Pro	35	40	45
Val Val Asp Val Arg Ala Gly Asp Ala Ala Ala Arg Val Ala Arg Ala	50	55	60
Ala Glu Gln Trp Gly Ala Phe Leu Leu Val Gly His Gly Val Pro Ala	65	70	75
Ala Leu Leu Ser Arg Val Glu Glu Arg Val Ala Arg Val Phe Ser Leu	85	90	95
Pro Ala Ser Glu Lys Met Arg Ala Val Arg Gly Pro Gly Glu Pro Cys	100	105	110
Gly Tyr Gly Ser Pro Pro Ile Ser Ser Phe Phe Ser Lys Leu Met Trp	115	120	125
Ser Glu Gly Tyr Thr Phe Ser Pro Ser Ser Leu Arg Ser Glu Leu Arg	130	135	140

Arg Leu Trp Pro Lys Ser Gly Asp Asp Tyr Leu Leu Phe Cys Asp Val
 145 150 155 160
 Met Glu Glu Phe His Lys Glu Met Arg Arg Leu Ala Asp Glu Leu Leu
 165 170 175
 Arg Leu Phe Leu Arg Ala Leu Gly Leu Thr Gly Glu Glu Val Ala Gly
 180 185 190
 Val Glu Ala Glu Arg Arg Ile Gly Glu Arg Met Thr Ala Thr Val His
 195 200 205
 Leu Asn Trp Tyr Pro Arg Cys Pro Glu Pro Arg Arg Ala Leu Gly Leu
 210 215 220
 Ile Ala His Thr Asp Ser Gly Phe Phe Thr Phe Val Leu Gln Ser Leu
 225 230 235 240
 Val Pro Gly Leu Gln Leu Phe Arg Arg Gly Pro Asp Arg Trp Val Ala
 245 250 255
 Val Pro Ala Val Ala Gly Ala Phe Val Val Asn Val Gly Asp Leu Phe
 260 265 270
 His Ile Leu Thr Asn Gly Arg Phe His Ser Val Tyr His Arg Ala Val
 275 280 285
 Val Asn Arg Asp Arg Asp Arg Val Ser Leu Gly Tyr Phe Leu Gly Pro
 290 295 300
 Pro Pro Asp Ala Glu Val Ala Pro Leu Pro Glu Ala Val Pro Ala Gly
 305 310 315 320
 Arg Ser Pro Ala Tyr Arg Ala Val Thr Trp Pro Glu Tyr Met Ala Val
 325 330 335
 Arg Lys Lys Ala Phe Ala Thr Gly Gly Ser Ala Leu Lys Met Val Ser
 340 345 350
 Thr Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Glu His Asp Asp Val Ala Ala Ala
 355 360 365
 Ala Asp Val His Ala

370

<210> 3

<211> 1187

<212> DNA

<213> 稻(*Oryza sativa*)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1137)

<400> 3

```

atg aca tcg tcg tcg acc tcg ccg acc tcg ccg ctg gcc gcc gcc gca 48
Met Thr Ser Ser Ser Thr Ser Pro Thr Ser Pro Leu Ala Ala Ala Ala
  1           5           10           15

cac aat ggc gtc acc gcc gcc tac ttc aac ttc cgc ggg gcg gag cgc 96
His Asn Gly Val Thr Ala Ala Tyr Phe Asn Phe Arg Gly Ala Glu Arg
           20           25           30

gtg ccg gag tcg cac gtg tgg aag ggg atg cac gag aag gac acc gcg 144
Val Pro Glu Ser His Val Trp Lys Gly Met His Glu Lys Asp Thr Ala
           35           40           45

ccg gtg gcg gcg gcg gac gcg gac ggc ggc gac gcg gtg ccg gtg gtg 192
Pro Val Ala Ala Ala Asp Ala Asp Gly Gly Asp Ala Val Pro Val Val
           50           55           60

gac atg agc ggc ggc gac gac gcc gcg gtg gcg gcg gtg gcg cgc gcg 240
Asp Met Ser Gly Gly Asp Asp Ala Ala Val Ala Ala Val Ala Arg Ala
           65           70           75           80

gcg gag gag tgg ggc ggg ttc ctg ctc gtc ggg cac ggc gtg acc gcg 288
Ala Glu Glu Trp Gly Gly Phe Leu Leu Val Gly His Gly Val Thr Ala
           85           90           95

gag gcc ctg gcg cgc gtc gag gcg cag gcg gcg cgg ctg ttc gcg ctg 336
Glu Ala Leu Ala Arg Val Glu Ala Gln Ala Ala Arg Leu Phe Ala Leu
           100          105          110

ccg gcg gac gac aag gcg cgc ggg gcg cgg cgg ccc ggc ggc ggg aac 384
Pro Ala Asp Asp Lys Ala Arg Gly Ala Arg Arg Pro Gly Gly Gly Asn
           115          120          125

```

acc ggc tac ggc gtg ccg ccg tac ctc ctc cgg tac ccg aag cag atg 432
 Thr Gly Tyr Gly Val Pro Pro Tyr Leu Leu Arg Tyr Pro Lys Gln Met
 130 135 140

tgg gcc gag ggc tac acc ttc cct ccc cct gcc atc cgc gac gag ttc 480
 Trp Ala Glu Gly Tyr Thr Phe Pro Pro Pro Ala Ile Arg Asp Glu Phe
 145 150 155 160

cgc cgc gtc tgg ccc gac gcc ggc gac gac tac cac cgc ttc tgc tcc 528
 Arg Arg Val Trp Pro Asp Ala Gly Asp Asp Tyr His Arg Phe Cys Ser
 165 170 175

gcc atg gag gag tac gac tcg tcg atg aga gct ctg ggc gag agg ctc 576
 Ala Met Glu Glu Tyr Asp Ser Ser Met Arg Ala Leu Gly Glu Arg Leu
 180 185 190

ctc gcc atg ttc ttc aag gcg ctc ggg ctc gcc ggc aac gat gcc ccc 624
 Leu Ala Met Phe Phe Lys Ala Leu Gly Leu Ala Gly Asn Asp Ala Pro
 195 200 205

ggc ggc gag acc gag cgg aag atc cgc gaa acg ttg acg tcg tcg acg 672
 Gly Gly Glu Thr Glu Arg Lys Ile Arg Glu Thr Leu Thr Ser Ser Thr
 210 215 220

att cac ctc aac atg ttc cct agg tgt cca gat cca gac cgg gtg gtc 720
 Ile His Leu Asn Met Phe Pro Arg Cys Pro Asp Pro Asp Arg Val Val
 225 230 235 240

ggg ctg gcg gcg cac acg gac tca ggc ttc ttc acc ttc atc ctg cag 768
 Gly Leu Ala Ala His Thr Asp Ser Gly Phe Phe Thr Phe Ile Leu Gln
 245 250 255

agc ccc gtg ccg ggg ttg cag ctg ctc cgc cac cgg ccg gac cgg tgg 816
 Ser Pro Val Pro Gly Leu Gln Leu Leu Arg His Arg Pro Asp Arg Trp
 260 265 270

gtg acg gtt ccg ggg acg ccg ggg gcg ctc atc gtc gtc gtc ggc gat 864
 Val Thr Val Pro Gly Thr Pro Gly Ala Leu Ile Val Val Val Gly Asp
 275 280 285

ctc ttc cat gtg ctc acc aac ggg cgc ttc cac agc gtg ttc cac cgc 912
 Leu Phe His Val Leu Thr Asn Gly Arg Phe His Ser Val Phe His Arg
 290 295 300

```

gcc gtc gtg aac cgg gag aga gac cgg atc tcc atg ccc tac ttc ctc 960
Ala Val Val Asn Arg Glu Arg Asp Arg Ile Ser Met Pro Tyr Phe Leu
305          310          315          320

ggt ccg ccg gcc gac atg aag gtg aca cct ctc gtg gcg gcg ggg tcg 1008
Gly Pro Pro Ala Asp Met Lys Val Thr Pro Leu Val Ala Ala Gly Ser
          325          330          335

ccg gag agc aag gcc gtg tat cag gcc gtg aca tgg ccg gag tac atg 1056
Pro Glu Ser Lys Ala Val Tyr Gln Ala Val Thr Trp Pro Glu Tyr Met
          340          345          350

gct gta agg gat aag ttg ttc ggg aca aat ata tcg gcg ttg agc atg 1104
Ala Val Arg Asp Lys Leu Phe Gly Thr Asn Ile Ser Ala Leu Ser Met
          355          360          365

att cga gta gcg aag gaa gag gac aag gag agt tagaactatg gtatgattgc 1157
Ile Arg Val Ala Lys Glu Glu Asp Lys Glu Ser
          370          375

aattatccat gccagaaaaa aaaaaaaaaa 1187

<210> 4
<211> 1122
<212> DNA
<213> 稻(Oryza sativa)

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1119)

<400> 4
atg ccg acg ccg tcg cac ttg aag aac ccg ctc tgc ttc gac ttc cgg 48
Met Pro Thr Pro Ser His Leu Lys Asn Pro Leu Cys Phe Asp Phe Arg
 1          5          10          15

gcg gcg agg cgg gtg ccg gag acg cac gcg tgg ccg ggg ctg gac gac 96
Ala Ala Arg Arg Val Pro Glu Thr His Ala Trp Pro Gly Leu Asp Asp
          20          25          30

cac ccg gtg gtg gac ggc ggc ggc ggc ggc ggc gag gac gcg gtg ccg 144
His Pro Val Val Asp Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Asp Ala Val Pro

```

gtg	gtg	gac	gtc	agg	gcg	ggc	gac	gcg	gcg	gcg	cgg	gtg	gcg	cgg	gcg	192
Val	Val	Asp	Val	Arg	Ala	Gly	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Val	Ala	Arg	Ala	
50						55					60					
gcg	gag	cag	tgg	ggc	gcg	ttc	ctt	ctg	gtc	ggg	cac	ggc	gtg	ccg	gcg	240
Ala	Glu	Gln	Trp	Gly	Ala	Phe	Leu	Leu	Val	Gly	His	Gly	Val	Pro	Ala	
65					70					75					80	
gcg	ctg	ctg	tcg	cgc	gtc	gag	gag	cgc	gtc	gcc	cgc	gtg	ttc	tcc	ctg	288
Ala	Leu	Leu	Ser	Arg	Val	Glu	Glu	Arg	Val	Ala	Arg	Val	Phe	Ser	Leu	
				85					90						95	
ccg	gcg	tcg	gag	aag	atg	cgc	gcc	gtc	cgc	ggc	ccc	ggc	gag	ccc	tgc	336
Pro	Ala	Ser	Glu	Lys	Met	Arg	Ala	Val	Arg	Gly	Pro	Gly	Glu	Pro	Cys	
			100						105						110	
ggc	tac	ggc	tcg	ccg	ccc	atc	tcc	tcc	ttc	ttc	tcc	aag	ctc	atg	tgg	384
Gly	Tyr	Gly	Ser	Pro	Pro	Ile	Ser	Ser	Phe	Phe	Ser	Lys	Leu	Met	Trp	
			115						120						125	
tcc	gag	ggc	tac	acc	ttc	tcc	cct	tcc	tcc	ctc	cgc	tcc	gag	ctc	cgc	432
Ser	Glu	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Leu	Arg	
			130												140	
cgc	ctc	tgg	ccc	aag	tcc	ggc	gac	gac	tac	ctc	ctc	ttc	tgt	gac	gtg	480
Arg	Leu	Trp	Pro	Lys	Ser	Gly	Asp	Asp	Tyr	Leu	Leu	Phe	Cys	Asp	Val	
145						150									160	
atg	gag	gag	ttt	cac	aag	gag	atg	cgg	cgg	cta	gcc	gac	gag	ttg	ctg	528
Met	Glu	Glu	Phe	His	Lys	Glu	Met	Arg	Arg	Leu	Ala	Asp	Glu	Leu	Leu	
					165					170					175	
agg	ttg	ttc	ttg	agg	gcg	ctg	ggg	ctc	acc	ggc	gag	gag	gtc	gcc	gga	576
Arg	Leu	Phe	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	Thr	Gly	Glu	Glu	Val	Ala	Gly	
					180					185					190	
gtc	gag	gcg	gag	agg	agg	atc	ggc	gag	agg	atg	acg	gcg	acg	gtg	cac	624
Val	Glu	Ala	Glu	Arg	Arg	Ile	Gly	Glu	Arg	Met	Thr	Ala	Thr	Val	His	
															195	
															200	
															205	
ctc	aac	tgg	tac	ccg	agg	tgc	ccg	gag	ccg	cgg	cga	gcg	ctg	ggg	ctc	672
Leu	Asn	Trp	Tyr	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Pro	Arg	Arg	Ala	Leu	Gly	Leu	

210	215	220	
atc gcg cac acg gac tcg ggc ttc ttc acc ttc gtg ctc cag agc ctc Ile Ala His Thr Asp Ser Gly Phe Phe Thr Phe Val Leu Gln Ser Leu 225	230	235	720 240
gtc ccg ggg ctg cag ctg ttc cgt cga ggg ccc gac cgg tgg gtg gcg Val Pro Gly Leu Gln Leu Phe Arg Arg Gly Pro Asp Arg Trp Val Ala 245	250	255	768 270
gtg ccg gcg gtg gcg ggg gcc ttc gtc gtc aac gtc ggc gac ctc ttc Val Pro Ala Val Ala Gly Ala Phe Val Val Asn Val Gly Asp Leu Phe 260	265	270	816 285
cac atc ctc acc aac ggc cgc ttc cac agc gtc tac cac cgc gcc gtc His Ile Leu Thr Asn Gly Arg Phe His Ser Val Tyr His Arg Ala Val 275	280	285	864 300
gtg aac cgc gac cgc gac cgg gtc tcg ctc ggc tac ttc ctc ggc ccg Val Asn Arg Asp Arg Asp Arg Val Ser Leu Gly Tyr Phe Leu Gly Pro 290	295	300	912 320
ccg ccg gac gcc gag gtg gcg ccg ctg ccg gag gcc gtg ccg gcc ggc Pro Pro Asp Ala Glu Val Ala Pro Leu Pro Glu Ala Val Pro Ala Gly 305	310	315	960 335
ccg agc ccc gcc tac cgc gct gtc acg tgg ccg gag tac atg gcc gtc Arg Ser Pro Ala Tyr Arg Ala Val Thr Trp Pro Glu Tyr Met Ala Val 325	330	335	1008 350
cgc aag aag gcc ttc gcc acc ggc ggc tcc gcc ctc aag atg gtc tcc Arg Lys Lys Ala Phe Ala Thr Gly Gly Ser Ala Leu Lys Met Val Ser 340	345	350	1056 365
acc gac gcc gcc gcc gcc gcc gac gaa cac gac gac gtc gcc gcc gcc Thr Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Glu His Asp Asp Val Ala Ala Ala 355	360	365	1104 370
gcc gac gtc cac gca taa Ala Asp Val His Ala 370			1122

<210> 5

<211> 1948
 <212> DNA
 <213> 稻(*Oryza sativa*)

<220>
 <223> 基因组 DNA 序列

<220>
 <221> 内含子
 <222> (811)..(909)

<220>
 <221> 内含子
 <222> (1072)..(1461)

<400> 5
 ctcgaggatc gaaacccaaa ttaagggagc acaaaaaact atgacaaatg tttagttctg 60
 acaatgaact aaattagaac aaagcttgat cggatcctat ccatttctga ttttgtgccg 120
 aacgatgcgg agagaagtta gttttttgta gataatgcaa gcccaaattt agccatgcta 180
 tctcgttatt aatcacgcga aagaaatggt catgccaca aattaattta tcgtacatca 240
 ctagtcacag gcttttgtgc gttagccaac gagttcatgc agatcatgac atcgtcgtcg 300
 acctcgccga cctcgaccgc tggccgccgc cgcacacaat ggcgtcaccg ccgcctactt 360
 caacttccgc ggggcggagc gcgtgccgga gtcgcacgtg tggaagggga tgcacgagaa 420
 ggacaccgcg ccggtggcgg cggcggacgc ggacggcggc gacgcggtgc cgggtgtgga 480
 catgagcggc ggcgacgacg ccgcggtggc ggcggtggcg cgcgcggcgg aggagtgggg 540
 cgggttcttg ctcgtcgggc acggcgtgac cgcggaggcc ctggcgcgcg tcgaggcgca 600
 ggcggcgcgg ctgttcgcgc tgccggcgga cgacaaggcg cgcggggcgc ggcggcccgg 660
 cggcgggaac accggtacg gcgtgccgcc gtacctctc cggtagccga agcagatgtg 720
 ggccgagggc tacaccttcc ctccccctgc catccgcgac gagttccgcc gcgtctggcc 780
 cgacgccggc gacgactacc accgcttctg gtacgcgttt accgccgatc gatcgcgca 840

tccgccattg cttgcatgca actaacctag ctagcttccg cgcgtgttcg tccgatccgg 900
 cccggccagc tccgccatgg aggagtacga ctctcgatg agagctctgg gcgagaggct 960
 cctcgccatg ttcttcaagg cgctcgggct cgccggcaac gatgccccg gcggcgagac 1020
 cgagcgggaag atccgcgaaa cgttgacgtc gtcgacgatt cacctcaaca tgtatgtaaa 1080
 ctcatatgga tgtggatfff ctatgcatag atgcatagc actgcacca tcattacat 1140
 acgattttga gaaaatataa gtttataaac aagctatatt taatctaca ctaaaaaaac 1200
 aaaaataata aatcaggca ataaatacta gtaaaattg ttatffffac ttcgtgtgta 1260
 ggtcgaattt aatffffacat atttatatag tgtffffatac tattattgta atctatctta 1320
 tcaaattcta tgatffffta taactatffa aactacatgt atgatacaca attagaaaat 1380
 actffffcat acaaataat cttcacatgc aatgggtgtt ggagctgac gacacgtgtc 1440
 actctgacat ggccacacgc aggttcccta ggtgtccaga tccagaccgg gtggtcgggc 1500
 tggcggcgca cacggactca ggcttcttca ctttcatcct gcagagcccc gtgccggggt 1560
 tgcagctgct ccgccaccgg ccggaccggt ggggtgacggt tccggggacg ccgggggcgc 1620
 tcatcgtcgt cgtcggcgat ctcttccatg tgctcaccaa cgggcgcttc cacagcgtgt 1680
 tccaccgcgc cgtcgtgaac cgggagagag accggatctc catgccctac ttctcggtc 1740
 cgccggccga catgaagggt acacctctcg tggcggcggg gtcgccggag agcaaggccg 1800
 tgtatcaggc cgtgacatgg ccggagtaca tggctgtaag ggataagttg ttcgggaaa 1860
 atatatcggc gttgagcatg attcgagtag cgaaggaaga ggacaaggag agttagaact 1920
 atggtatgat tgcaattatc catgccag 1948

<210> 6

<211> 2112

<212> DNA

<213> 稻 (*Oryza sativa*)

cggcgagcgc tggggctcat cgcgcacacg gactcgggct tcttcacctt cgtgctccag 1140
 agcctcgtcc cggggctgca gctgttccgt cgagggcccc accggtgggt ggcggtgccg 1200
 gcggtggcgg gggccttcgt cgtcaacgtc ggcgacctct tccacatcct caccaacggc 1260
 cgcttcacaca gcgtctacca ccgcgccgtc gtgaaccgcg accgcgaccg ggtctcgtctc 1320
 ggctacttcc tcggccccgcc gccggacgcc gaggtggcgc cgctgccgga ggccgtgccg 1380
 gccggccgga gccccgccta ccgcgctgtc acgtggccgg agtacatggc cgtccgcaag 1440
 aaggccttcg ccaccggcgg ctccgccctc aagatggtct ccaccgacgc cgccgccgcc 1500
 gccgacgaac acgacgacgt cgccgccgcc gccgacgtcc acgcataagc tatagctact 1560
 agctacctcg atctcagca aaaaaaaaaa gaaacaatta atagagcaaa aaaaaaaaaa 1620
 aacaattaat agagcaaaaa aaaaaagaag agaaaatggt ggtacttgtg ttaaggttt 1680
 cctccatgca aaatggtttg catgcatgca tgcaaagcta gcatctgcag ctgcaagaat 1740
 tacaagagca gagaagcaga cagctagatg gagataatta attaattaat taatctaatt 1800
 aagcatgcaa taattaagat tattattctg atttcagaac tgaaaaaaaa agtgtgggta 1860
 attaattatt ggtaggctt aattttatct agatgtagaa aaagaatcaa gatcttcaag 1920
 caagagagaa gaggatcgaa gaagaaggaa aagaaaacga aaaggacatg ctgtgttgtc 1980
 tcttctagtt gtaccctggc tgctgattaa gtgctttggt ttgttgctgc aagcttgctg 2040
 ttactgatta ttagttagtt atgcatctaa ttgattaaac taatctgttt ggcattttgg 2100
 ctcgaggtcg ac 2112

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：人工序列的引物序列

<220>

<223> 基因组 DNA 序列

<220>

<221> 内含子

<222> (789)..(899)

<400> 6

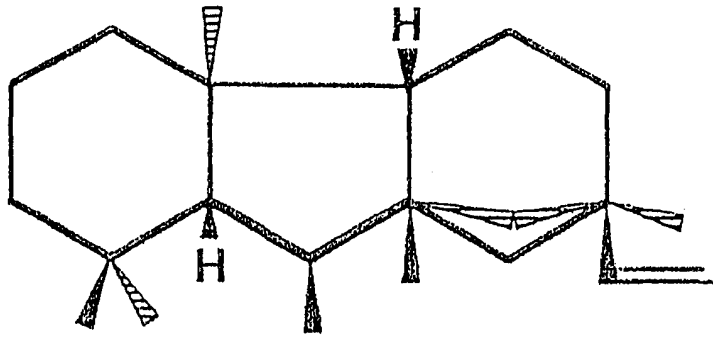
```

ttttttcctc tccaaatcta ttaattaatg atccattca attcttcac actgatttat 60
tcaccaatta attctctctt ttttttttct tccactacgc tccaaaactt ctctccctat 120
atatacctct cccttgact tgtccagttc ttacactcgt ctcactttac tactcattcc 180
actattgtaa agtcatagaa aaaatttata tagagagaaa aaattagtgt ttgttattgt 240
tactggcttt ctgccagacg agacgagcga gcgcgcgagt gtgttcctct ctgagtcac 300
tcgtcgtcgt cggcgatgcc gacgccgtcg cgcttgaaga acccgctctg cttcgacttc 360
cgggcggcga ggcgggtgcc ggagacgcac gcgtggccgg ggctggacga ccaccgggtg 420
gtggacggcg gcggcggcgg cggcgaggac gcggtgccgg tgggtggacgt cagggcgggc 480
gacgcggcgg cgcgggtggc gcgggcggcg gagcagtggg gcgcgttctt tctggtcggg 540
cacggcgtgc cggcggcgct gctgtcgcgc gtcgaggagc gcgtcgcgccg cgtgttctcc 600
ctgccggcgt cggagaagat gcgcgccgtc cgcggccccg gcgagccctg cggctacggc 660
tcgccgccca tctctcctt cttctccaag ctcatgtggt ccgagggcta caccttctcc 720
ccttctccc tccgctccga gctccgccg ctctggcca agtccggcga cgactacctc 780
ctcttctggt atatatacat atatatac tctccatgc attccatgca catacactct 840
acgtatatat ctaccttac gtatatatct acgtattgat ctacgtataa tatacgcagt 900
gacgtgatgg aggagtttca caaggagatg cggcggctag ccgacgagtt gctgaggttg 960
ttcttgaggg cgctggggct caccggcgag gaggtcgcgg gagtcgaggc ggagaggagg 1020
atcggcgaga ggatgacggc gacggtgcac ctcaactggt acccgaggtg cccggagccg 1080

```

<400> 7	
gtngtnaarg tngngarrt	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述：人工序列的引物序列	
<400> 8	
aytartcrt tggangnac	20

a



b

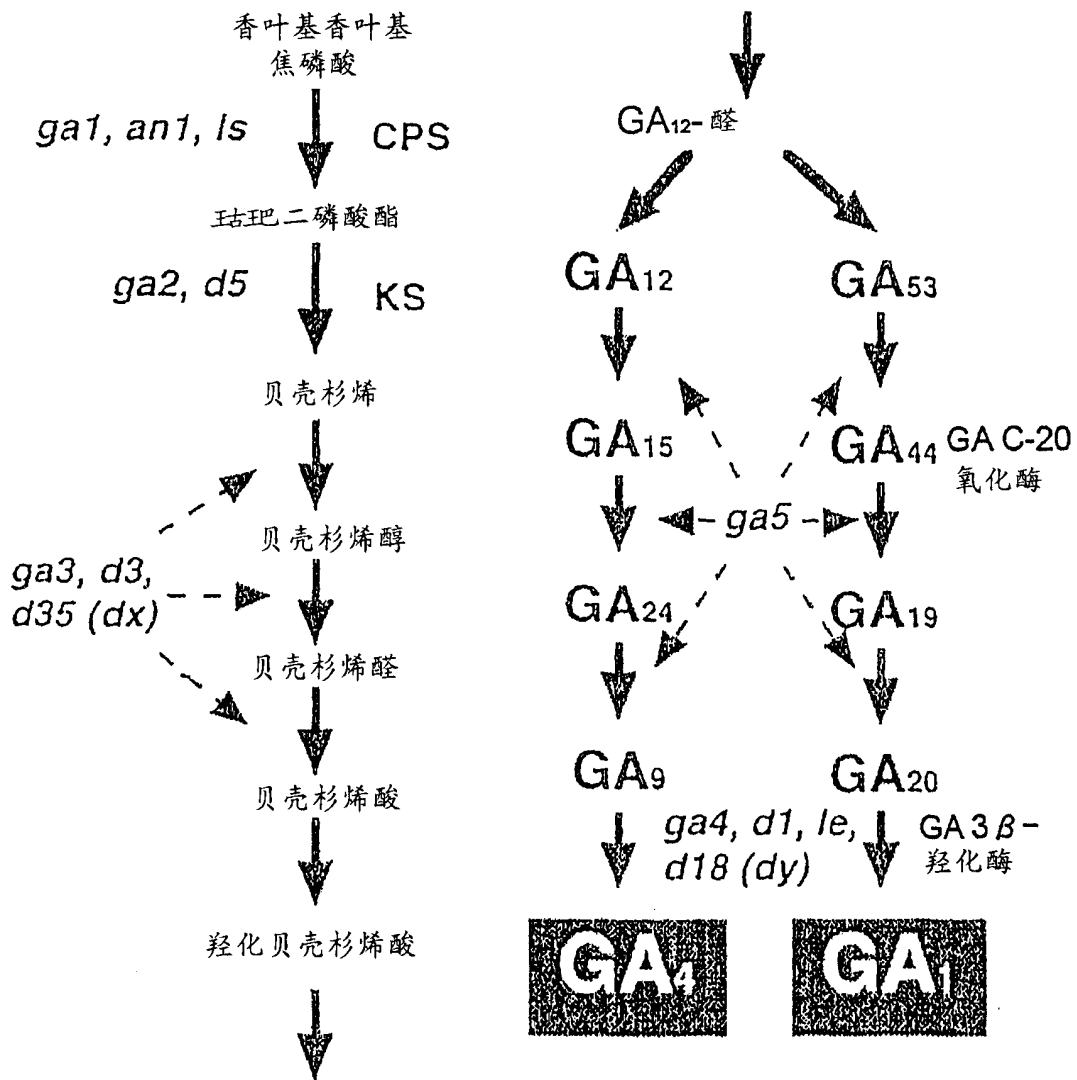


图 1

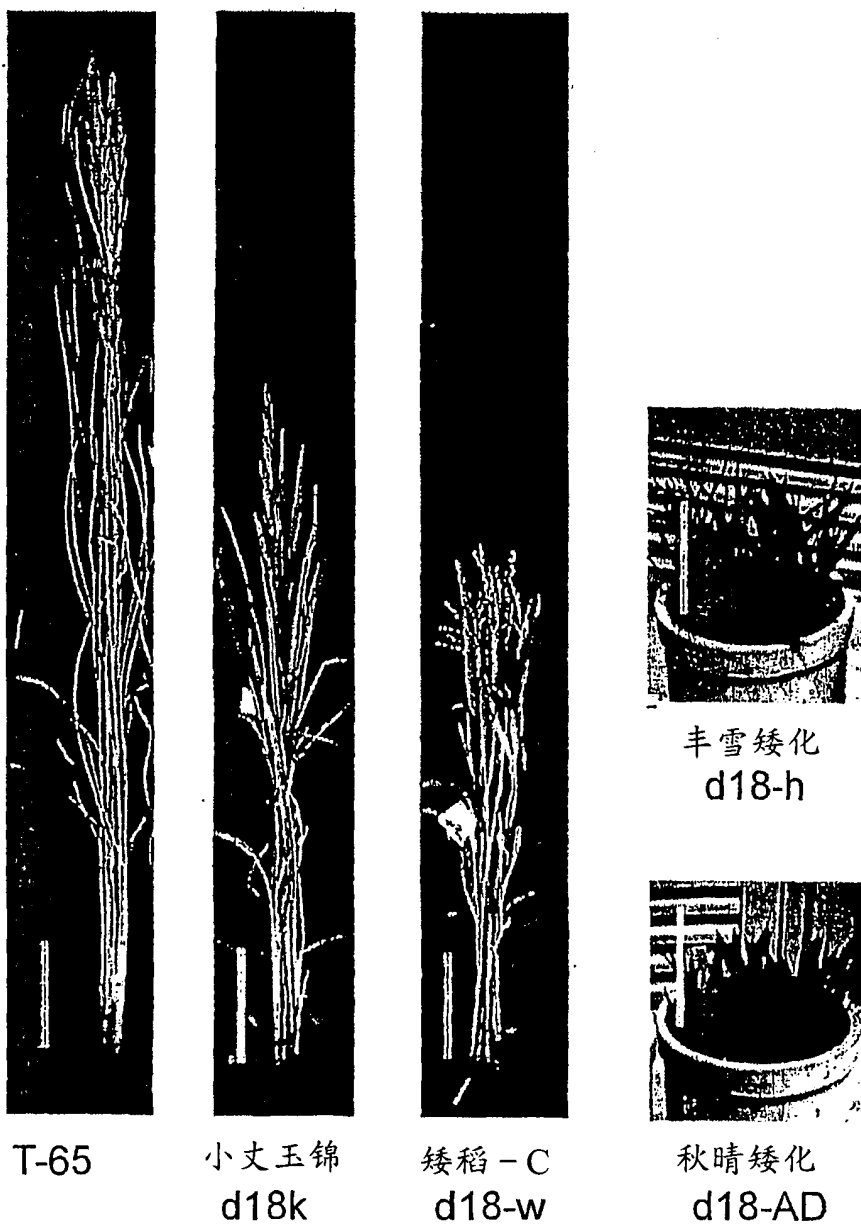
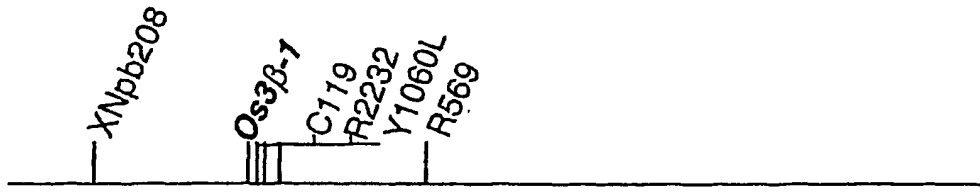


图 2

5号染色体



1号染色体

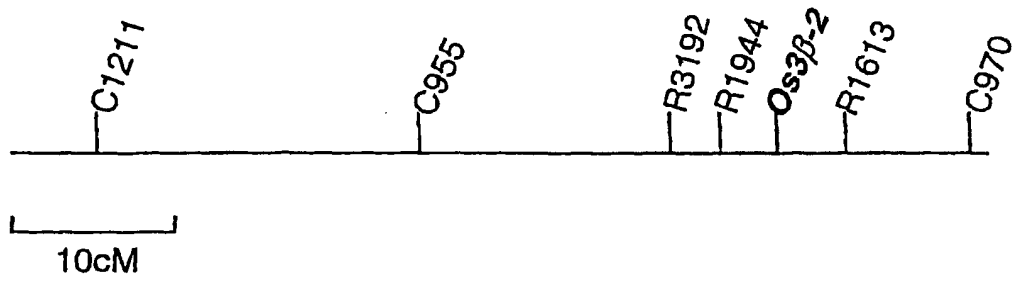


图 3

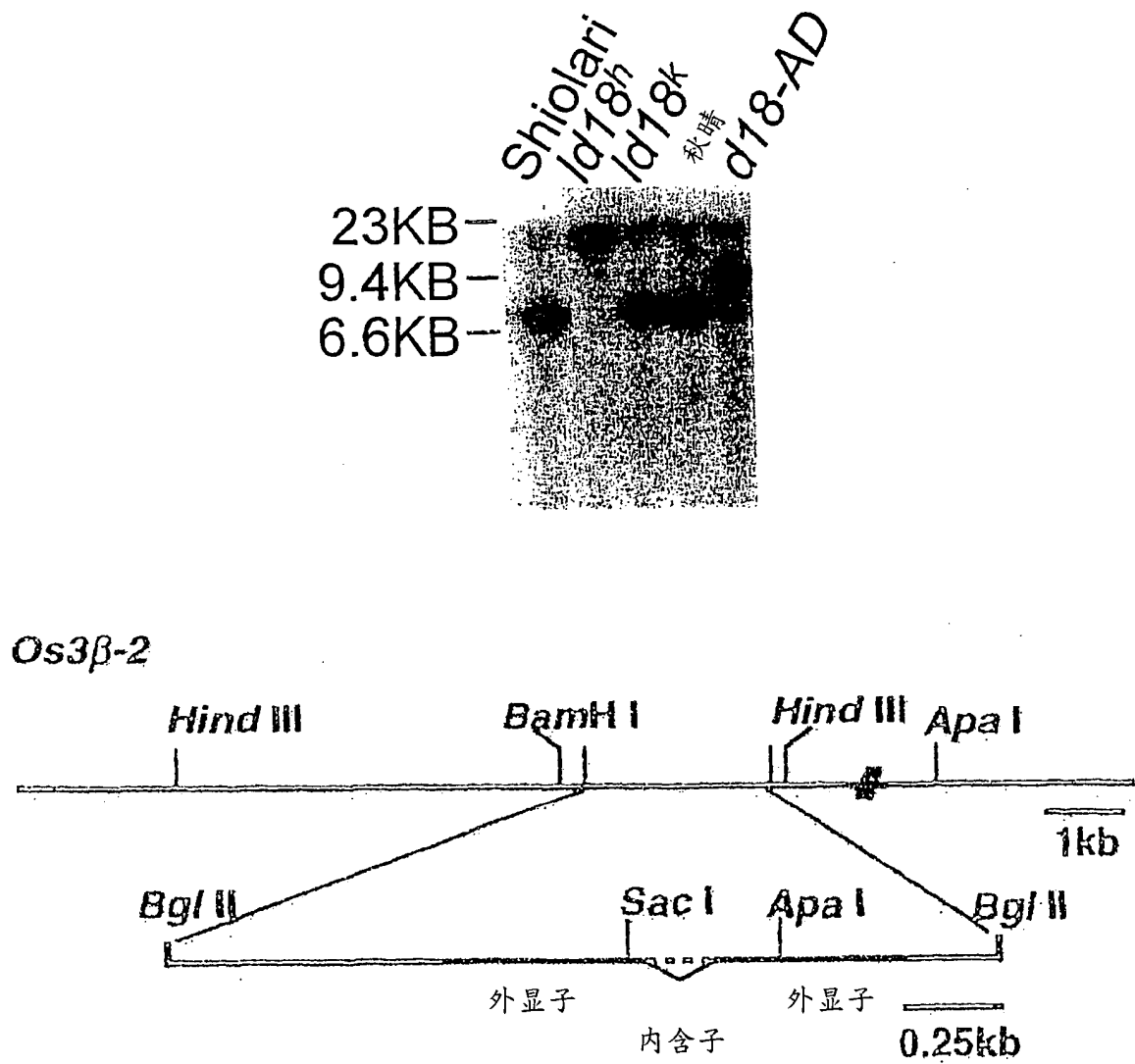


图 4

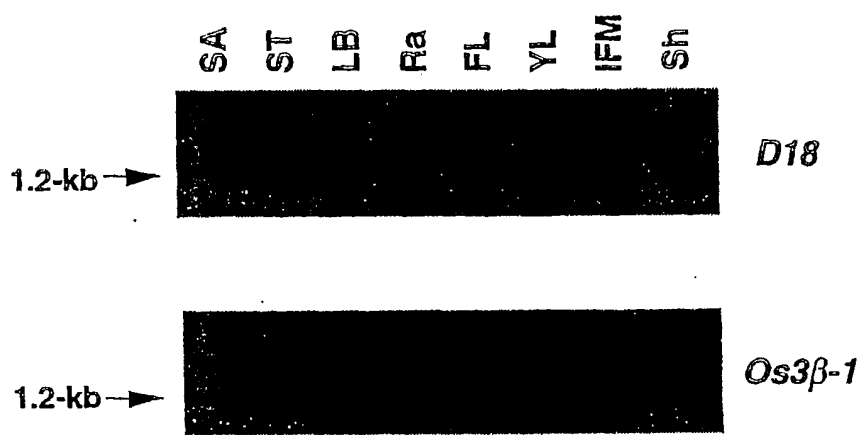


图 5



对照
(日本晴)

含有反义 3β -羟化酶基因的
转基因重组体

图 6

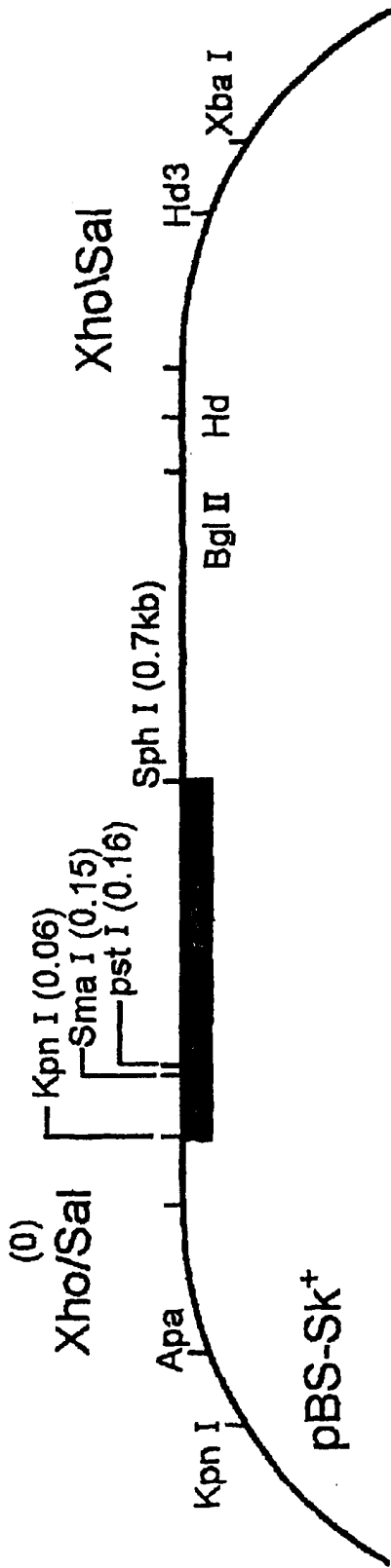


图 7

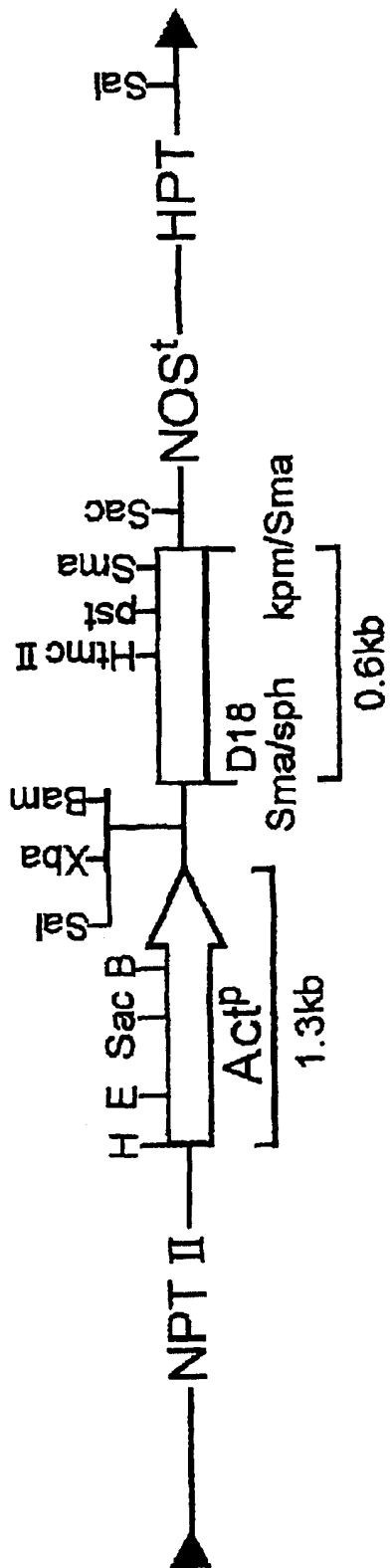


图 8

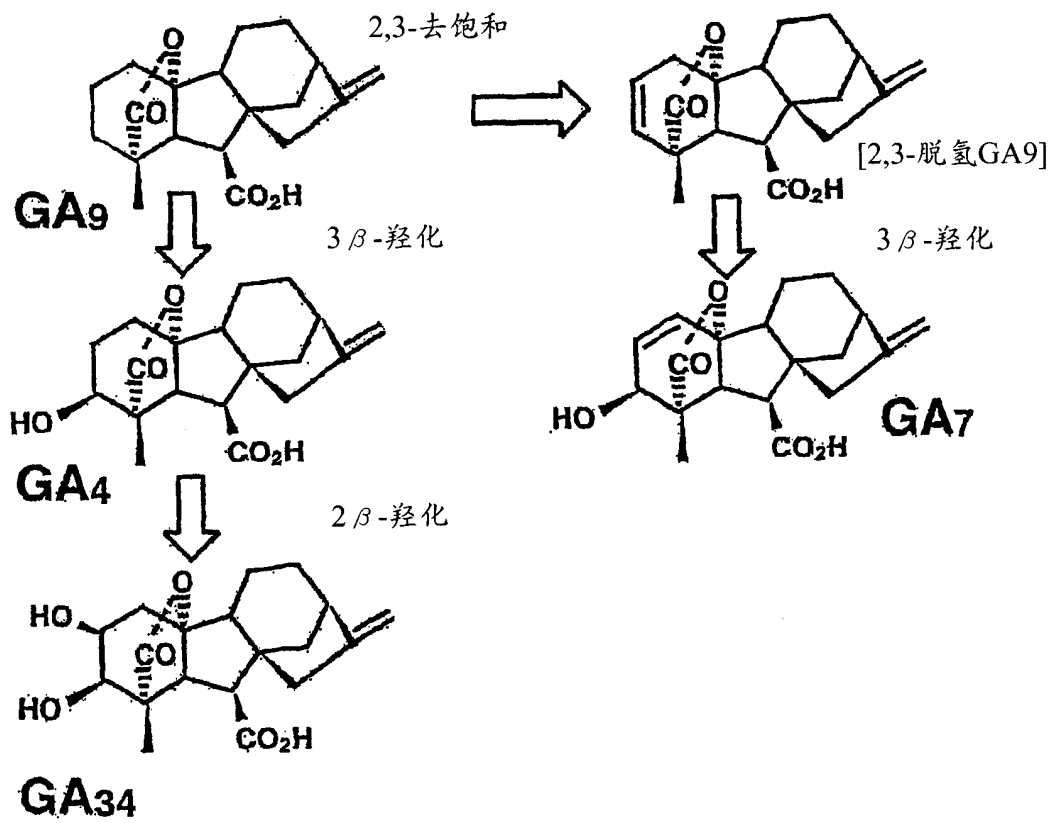


图 9

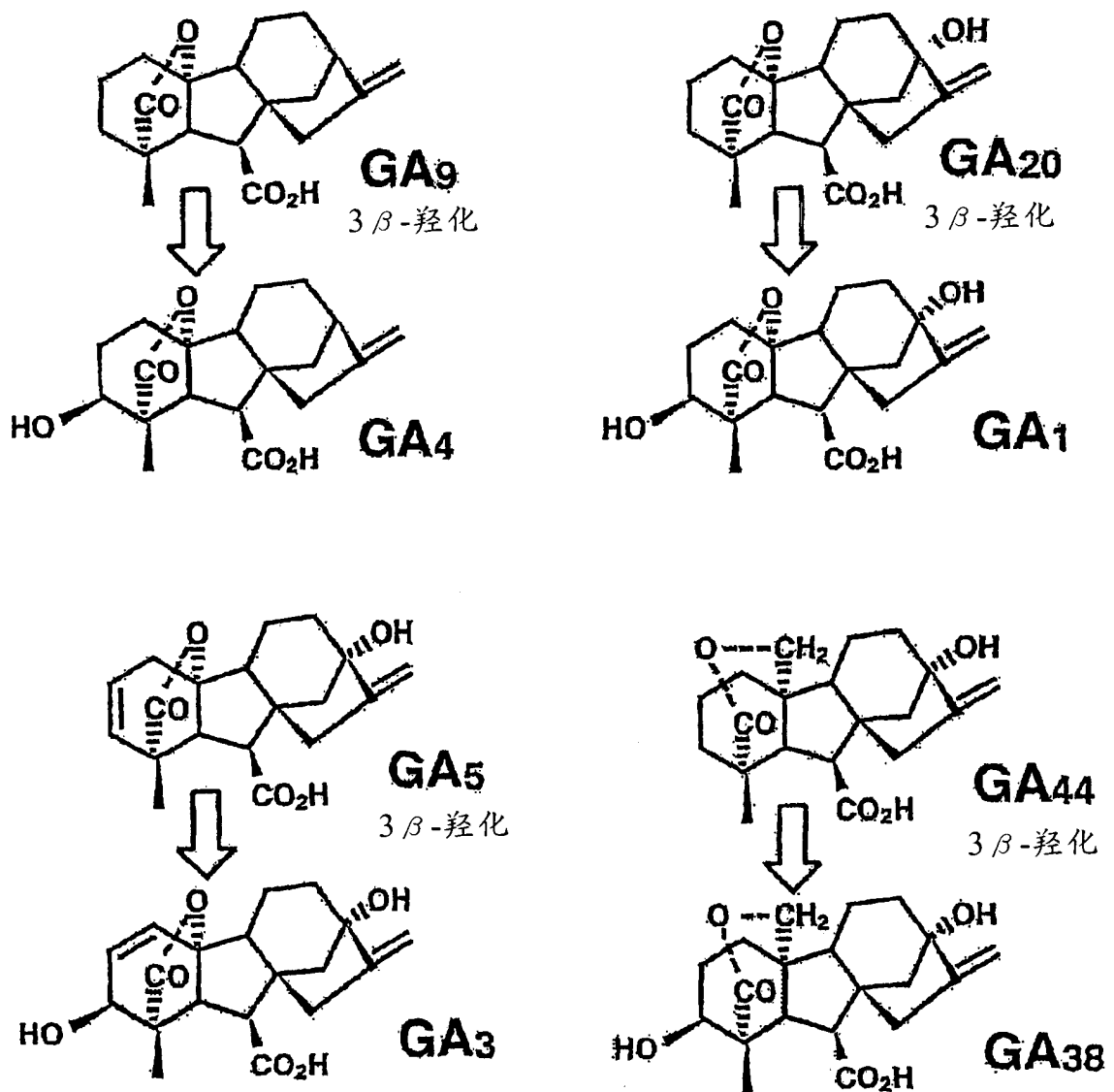


图 10