



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110678552 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201880029875.0

(22)申请日 2018.03.07

(30)优先权数据

62/467,993 2017.03.07 US

15/913,395 2018.03.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.05

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/021295 2018.03.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/165259 EN 2018.09.13

(71)申请人 由农业部部长代表的美利坚合众国

地址 美国哥伦比亚特区华盛顿

(72)发明人 唐纳德·R·奥尔特

保罗·F·索思 伯克利·沃克

(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

代理人 钟海胜 宋琴芝

(51)Int.Cl.

C12N 15/82(2006.01)

权利要求书3页 说明书34页

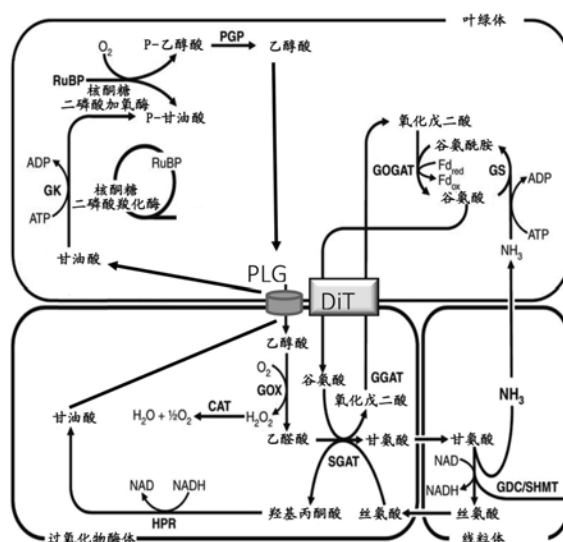
序列表30页 附图20页

(54)发明名称

具有提高的光呼吸效率的植物

(57)摘要

本文提供的是具有改变的光呼吸特性的植物。破坏涉及穿梭乙醇酸和/或甘油酸的转运蛋白导致光合作用速率降低,植物生长降低以及基因表达和光合作用代谢产物谱改变。此类破坏还与引入的表达可供选择的光呼吸酶途径的组件的基因组合,以提高光合作用效率。



1. 一种遗传改变的植物, 包含一种或多种遗传改变, 所述遗传改变包括所述植物从至少一部分叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失或降低并且包括在所述植物的至少一部分叶绿体中将乙醇酸转化为能量的能力的获得。

2. 根据权利要求1所述的植物, 其中, 所述叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失包括与SEQ ID NO:6具有至少70%序列同一性、至少75%序列同一性、至少80%序列同一性、至少85%序列同一性、至少90%序列同一性或至少95%序列同一性的内源蛋白质的水平降低、活性降低、部分活性丧失、或活性完全丧失。

3. 根据权利要求1或2所述的植物, 其中, 所述叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失包括由与SEQ ID NO:46至少95%相同的RNA分子的表达所诱导的RNA干扰。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的植物, 其中, 所述叶绿体中将乙醇酸转化为能量的能力的获得包括在叶绿体中产生转基因苹果酸合酶和转基因乙醇酸脱氢酶。

5. 根据权利要求4所述的植物, 其中, 所述苹果酸合酶与SEQ ID NO:43的第41至607位氨基酸残基至少95%相同。

6. 根据权利要求4或5所述的植物, 其中, 所述乙醇酸脱氢酶与SEQ ID NO:45的第41至1136位氨基酸残基至少95%相同。

7. 根据权利要求4所述的植物, 其中, 所述苹果酸合酶包含SEQ ID NO:43, 并且所述乙醇酸脱氢酶包含SEQ ID NO:45。

8. 根据权利要求1所述的植物, 其中, 所述叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失包括缺乏产生与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的蛋白质和缺乏产生与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的蛋白质, 并且其中, 所述叶绿体中将乙醇酸转化为能量的能力的获得包括产生与SEQ ID NO:43具有至少95%同一性的蛋白质以及产生与SEQ ID NO:45具有至少95%同一性的蛋白质。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的植物, 其中所述植物选自由水稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦和木薯组成的组。

10. 一种生产具有增加的生长或生产力的植物的方法, 包括以下步骤:

a. 向植物引入遗传改变, 所述遗传改变包括从植物的至少一部分叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失; 和

b. 向植物引入遗传改变, 所述遗传改变包括在叶绿体中将乙醇酸转化为能量的能力的获得, 从而增加植物的生长或生产力。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中, 所述从植物的至少一部分叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失包括与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的内源蛋白质的水平降低、活性降低、活性的部分丧失、或活性的完全丧失, 还包括与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的第二内源蛋白质的水平降低、活性降低、活性部分丧失、或活性完全丧失, 或两者。

12. 根据权利要求10或11所述的方法, 其中, 所述叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失包括由与SEQ ID NO:46至少95%相同的RNA分子的表达来诱导RNA干扰。

13. 根据权利要求10至12中任一项所述的方法, 其中, 在所述叶绿体中将乙醇酸转化为能量的能力的获得包括在叶绿体中产生转基因苹果酸合酶和转基因乙醇酸脱氢酶。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 所述苹果酸合酶与SEQ ID NO:43的第41至607位氨基酸残基至少95%相同, 并且其中, 所述乙醇酸脱氢酶与SEQ ID NO:45的第41至1136

位氨基酸残基至少95%相同。

15. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 所述苹果酸合酶包含SEQ ID NO:43, 所述乙醇酸脱氢酶包含SEQ ID NO:45。

16. 根据权利要求13所述的方法, 其中, 所述叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失是: 由于缺乏产生与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的蛋白质, 由于缺乏产生与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的蛋白质, 或两者; 并且其中, 所述叶绿体中将乙醇酸转化为能量的能力的获得包括产生与SEQ ID NO:43具有至少95%同一性的蛋白质以及产生与SEQ ID NO:45具有至少95%同一性的蛋白质。

17. 根据权利要求10至16中任一项所述的方法, 其中, 所述植物选自由水稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦和木薯组成的组。

18. 一种遗传改变的植物, 包含编码苹果酸合酶的第一异源多核苷酸和编码乙醇酸脱氢酶的第二异源多核苷酸, 其中, 所述苹果酸合酶和所述乙醇酸脱氢酶定位于植物的叶绿体。

19. 根据权利要求18所述的植物, 其中, 所述植物在植物的叶绿体中将乙醇酸转化为能量。

20. 根据权利要求18或19所述的植物, 其中, 所述苹果酸合酶来自西洋南瓜 (*Cucurbita maxima*)。

21. 根据权利要求18至20中任一项所述的植物, 其中, 所述苹果酸合酶与SEQ ID NO:43的第41至607位氨基酸残基至少95%相同。

22. 根据权利要求18至21中任一项所述的植物, 其中, 所述乙醇酸脱氢酶来自莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)。

23. 根据权利要求18至22中任一项所述的植物, 其中, 所述乙醇酸脱氢酶与SEQ ID NO:45的第41至1136位氨基酸残基至少95%相同。

24. 根据权利要求18至23中任一项所述的植物, 其中, 所述第一异源多核苷酸编码SEQ ID NO:43的氨基酸序列, 并且所述第二异源多核苷酸编码SEQ ID NO:45的氨基酸序列。

25. 根据权利要求18至24中任一项所述的植物, 其中, 所述植物还包括在所述植物的叶绿体中一种或多种内源性乙醇酸转运蛋白的水平降低、活性降低、活性部分丧失或活性完全丧失。

26. 根据权利要求25所述的植物, 其中, 所述植物具有从所述植物的叶绿体中转运乙醇酸的减少或丧失。

27. 根据权利要求25或26所述的植物, 其中, 一种或多种乙醇酸转运蛋白包括PLGG1和BASS6。

28. 根据权利要求25至27中任一项所述的植物, 其中, 一种或多种乙醇酸转运蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:6具有至少70%的序列同一性、至少75%的序列同一性、至少80%的序列同一性、至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性。

29. 根据权利要求28所述的植物, 其中, 所述一种或多种乙醇酸转运蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:6具有至少95%的序列同一性。

30. 根据权利要求25至29中任一项所述的植物, 其中, 所述植物包含编码抑制所述乙醇酸转运蛋白表达的RNA分子的异源多核苷酸。

31. 根据权利要求25至29中任一项所述的植物,其中,使用选自由CRISPR/Cas、TALEN、锌指核酸酶和RNAi组成的组中的技术来产生一种或多种乙醇酸转运蛋白中的至少一种的水平降低、活性降低、活性的部分丧失或活性的完全丧失。

32. 根据权利要求30所述的植物,其中,所述RNA分子与SEQ ID NO:46至少95%相同。

33. 根据权利要求18至32中任一项所述的植物,其中,所述植物选自由水稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦和木薯组成的组。

34. 一种遗传改变的植物,包含编码苹果酸合酶的第一异源多核苷酸和编码乙醇酸脱氢酶的第二异源多核苷酸,其中,所述苹果酸合酶和乙醇酸脱氢酶定位于所述植物的叶绿体。

35. 一种遗传改变的植物,其中,所述植物包含编码与SEQ ID NO:43具有至少95%同一性的第一多肽的第一异源多核苷酸和编码与SEQ ID NO:45具有至少95%同一性的第二多肽的第二异源多核苷酸,其中所述第一多肽和所述第二多肽定位于所述植物的叶绿体。

36. 一种产生具有增加的生长或生产力的植物的方法,包括将编码苹果酸合酶的第一异源多核苷酸和编码乙醇酸脱氢酶的第二异源多核苷酸引入所述植物,其中,所述苹果酸合酶和所述乙醇酸脱氢酶定位于所述植物的叶绿体,其中所述植物具有在叶绿体中将乙醇酸转化为能量的增加的能力,从而增加所述植物的生长或生产力。

具有提高的光呼吸效率的植物

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C§119(e) 要求于2017年3月7日提交的美国临时序列号62/467,993的优先权,并且其通过引用在此并入。

技术领域

[0003] 本公开提供了具有改变的光呼吸特征的植物。参与穿梭乙醇酸和/或甘油酸的转运蛋白的破坏导致光合作用速率降低、植物生长减少以及基因表达和光合代谢物谱的改变。这种破坏在与引入的表达另外的光呼吸酶途径的组分的基因组合时,提高了光合作用效率。

背景技术

[0004] 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO)催化核酮糖-1,5-二磷酸(RuBP)与CO₂的固定,产生两个分子的3-磷酸甘油酸(3-PGA)。然而,在25℃和当前的CO₂水平下,具有C₃光合作用代谢的植物中约25%的核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RubisCO)催化活性是对竞争性底物氧气而非二氧化碳的固定,导致RuBP转化为一个分子的1-PGA和一个分子的2-磷酸乙醇酸(2-PG)(Bowes等人,Biochem Bioph. Res. Co (1971) 45:716-22;Ogren和Bowes,Nature-New Biol. (1971) 230:159-60;Lorimer,G.H.,Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol. (1981) 32:349-83;Ogren,W.L.,Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol. (1984) 35:415-42;Sharkey,T.D.,植物生理学(Physiologia Plantarum) (1988) 73:147-52)。叶绿体基质中的2-PG积累可以抑制磷酸丙糖异构酶和磷酸果糖激酶,从而降低RuBP再生能力(Anderson,L.E.,Biochim Biophys Acta (1971) 235:237-44;Kelly和Latzko,Febs Lett (1976) 68:55-58)。尽管2-PG被2-磷酸甘油酸磷酸酶快速去磷酸化,但产生的乙醇酸还可以抑制叶绿体中的光合作用速率,并且被认为对细胞有毒(Kelly和Latzko,同上;GonzalezMoro等人,J.Plant Physiol. (1997) 150:388-94)。防止2-PG/乙醇酸对光合作用的抑制,并通过涉及叶绿体、过氧化物酶体、线粒体和细胞质中的步骤的C₂光呼吸途径实现还原碳的部分回收(Somerville和Ogren,Plant Physiol (1979) 63:152;Eisenhut等人,Plant Biol. (2013) 676-85)。光呼吸将两个分子的2-PG转化为一个分子的3-PGA并释放一个分子的CO₂。

[0005] 此外,光呼吸循环利用ATP,并且作为甘氨酸转化为丝氨酸的副产物,在线粒体中产生氨(NH₃)。然后植物使用还原当量NAD(P)H再循环NH₃。结果,在当前大气CO₂浓度下的光呼吸导致取决于区域生长季温度的季节性C₃光合作用效率的约15至50%的降低(Ogren,同上;Peterhansel等人,Photorespiration.The Arabidopsis Book (2010),20130)。仅在美国中西部的大豆和小麦生产中,由于光呼吸导致的产量损失每年增加高达约150万亿卡路里(Walker等人,Ann.Rev.Plant Biol. (2016) 107-29),并对其他主要的C₃作物如水稻和马铃薯具有类似的负面影响(Sharkey,T.D.,同上,Zhu等人,Ann.Rev.Plant Biol. (2010) 61:235-61)。

[0006] 光呼吸对于C3植物来说是必不可少的,但是以固定的二氧化碳和能量为代价进行运转。当光合作用的初始酶,核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)与氧气而不是二氧化碳反应并产生有毒的化合物乙醇酸,然后乙醇酸通过光呼吸再循环时,光呼吸开始。可以在冠层和区域尺度上对光呼吸进行建模,以确定其在当前和未来气氛下的成本。区域尺度模型显示光呼吸目前使美国大豆和小麦产量下降36%和20%。仅在美国,即使是这种光呼吸损失的适度改善也可能每年价值1亿美元,这使得光呼吸成为提高作物产量的目标方法(Annu.Rev.Plant Biol.2016.67:107-29)。合成生物学的进步使得能够将几种新途径引入植物叶绿体中,旨在通过使用较少的能量引入代谢叶绿体中的乙醇酸的酶并且将光呼吸CO₂产生的位置从线粒体转移至叶绿体,使天然途径短路,从而使得通过核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶快速重新固定(Kebeish等人,Nat Biotechnol (2007) 25:593-599; Maurino和Peterhansel,Curr Opin Plant Biol (2010) 13:249-256)。

[0007] 在过去四十年中已经充分研究了涉及光呼吸的可溶性酶,提供了关于控制光呼吸代谢的生物化学和遗传学的大量信息(Peterhansel等人,同上;Timm和Bauwe,Plant Biol. (2013) 15:737-47)。相反,尽管光呼吸中碳的再循环涉及至少有25个提出的运输步骤,但只有少数转运蛋白被证明参与光呼吸(Eisenhut等人,同上)。重要的是,光呼吸是与包括氮循环和氨基酸生物合成的多种其他代谢途径相互作用的高通量途径(Fernie等人,Plant Biol. (2013) 15:748-53)。

[0008] 鉴定参与光呼吸的第一种转运蛋白是叶绿体二羧酸转运蛋白DiT1和DiT2(Woo等人,Plant Physiol. (1987) 84:624-32)。DiT2.1中的单点突变和随后的生物化学表征揭示DiT2是位于叶绿体内包膜中的谷氨酸/苹果酸转运蛋白(Renne等任,Plant J. (2003) 35:316-31)。DiT1的反义抑制表现出在环境CO₂下生长减少的经典光呼吸突变表型以及通过二氧化碳浓度([CO₂])升高进行的互补作用,并且由于叶绿体中2-氧戊二酸运输的减少而导致硝酸再同化作用减少(Schneidereit等人,Plant J. (2006) 45:206-24)。DiT1和DiT2一起是从光呼吸代谢中的甘氨酸脱羧反应中适当地再固定释放的氨所必需的。

[0009] 最近,共表达分析用于鉴定参与光呼吸的其他潜在转运蛋白(Bordych等人,Plant Biol. (2013) 15:686-93)。共表达分析鉴定了A BOUT DE SOUFFLE(BOU),正常甘氨酸脱羧酶(GDC)活性和分生组织生长所需的线粒体转运蛋白,其中无效突变体通过升高的[CO₂]的互补表现出光呼吸突变表型(Eisenhut等人,Plant J. (2013) 73:836-49)。目前,转运出直接来自乙醇酸的碳的唯一已被鉴定出的光呼吸途径转运蛋白是质体乙醇酸/甘油酸转运蛋白,PLGG1。Plgg1与参与光呼吸的许多酶共表达(Pick等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA (2013) 110:3185-90)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的Plgg1 T-DNA敲除品系(plgg1-1)揭示了PLGG1在光呼吸途径的第一个和最后一个转运步骤中的作用,即从叶绿体输出乙醇酸和向叶绿体中输入乙醇酸(Pick等人,同上)。在分子鉴定PLGG1之前近30年,在纯化的菠菜叶绿体中证实了乙醇酸的输出与甘油酸的输入同时发生(Howitz和McCarty,Biochem. (1985) 24:3645-50;Howitz and McCarty,Plant Physiol. (1986) 80:390-95;Howitz和McCarty,Plant Physiol. (1991) 96:1060-69;Young和McCarty,Plant Physiol. (1993) 101:793-99)。此外,PLGG1在蛋白质组学研究中被鉴定为叶绿体蛋白,并且最初被认为参与程序性细胞死亡,尽管目前的证据表明该表型与光呼吸中间产物的积累有关(Yang等人,New Phytol. (2012) 193:81-95;Pick等人,同上)。然而,显示拟南芥的plgg1-1品系显示在

低光照条件下测试时,与野生型相比,CO₂同化的量子效率没有差异,或者光呼吸CO₂补偿点没有变化(Walker等,Photosyn Res. (2016) 129:93-103)。结合起来,这些数据表明PLGG1蛋白参与光呼吸代谢,但也提示乙醇酸离开叶绿体的额外途径,以及证明表型鉴定在光呼吸途径中的转运蛋白的困难(Hodges等人,J.Exp.Bot. (2016) 3015-26)。

[0010] 尽管遗传和共表达方法都成功地鉴定了涉及光呼吸代谢的基因,但涉及光呼吸中间产物流出的许多转运蛋白仍是未知的。共表达分析的一种提点方法是从叶绿体包膜蛋白质组学研究中鉴定候选叶绿体内膜转运蛋白,并使用叶绿素荧光筛选光呼吸突变表型候选基因的tDNA插入突变体(Badger等人,Funct.Plant Biol. (2009) 36:867-73;Sun等人,Nucleic Acids Res., (2009) 37:D969-D974)。当暴露于低CO₂水平下的照度时,由于光系统II(PSII)的功能受损,光呼吸缺陷的突变体显示Fv/Fm叶绿素荧光降低(Kozaki和Takeba,Nature (1996) 384:557-60;Wingler等人,Philosoph.Trans.Royal Soc.B-Biol.Sci. (2000) 355:1517-29;Takahashi等人,Plant Physiol. (2007) 144:487-94)。

[0011] 使用这种高通量荧光基方法结合正向遗传学靶向推定的转运蛋白样叶绿体内包膜蛋白,有可能识别对光呼吸代谢物转运重要的其他基因。胆汁酸钠同向转运蛋白是首先在哺乳动物肝脏中被鉴定为胆汁酸转运蛋白的一个转运蛋白家族。进一步的分析表明,BASS转运蛋白家族表现出广泛的底物特异性,包括非胆汁酸有机化合物,例如丙酮酸、类固醇和异生素(Furumoto等人,Nature (2011) 476:472-75;Claro da Silva等人,Mol.Aspects of Med. (2013) 34:252-69)。尽管胆汁酸不在植物中产生,但BASS家族基因存在于单子叶植物和双子叶植物中(Gigolashvili等人,The Plant Cell (2009) 21:1813-29;Sawada等人,Plant and Cell Physiol. (2009) 50:1579-86;Furumoto等人,同上)。

[0012] 如本文详述的,已经鉴定了胆汁酸钠同向转运蛋白6蛋白(BASS6)作为参与光呼吸的乙醇酸转运蛋白。对拟南芥中的bass6敲除的T-DNA品系(bass6-1和bass6-2)的分析显示,Bass6的缺失导致光呼吸突变表型以及光呼吸代谢中间产物甘氨酸和乙醇酸的积累。此外,BASS6蛋白定位于叶绿体包膜,并通过组合酵母互补和转运分析证明了BASS6转运乙醇酸的能力.bass6-plgg1双突变体显示另外的生长缺陷。

[0013] 我们的发现表明,由于通过位于叶绿体包膜中的两种乙醇酸转运蛋白快速从叶绿体输出乙醇酸,光呼吸短路或旁路途径只是适度有效。PLGG1(Proc Natl Acad Sci U S A (2013) 110 (8) :3185-90)是质体乙醇酸甘油酸酯转运蛋白,其穿过叶绿体包膜将乙醇酸交换成甘油酸。PLGG1完全负责输入甘油酸,而BASS6和PLGG1则共同负责从叶绿体输出乙醇酸。因此,BASS6和PLGG1的组合活性与乙醇酸的合成光呼吸旁路途径竞争,从而限制旁路在提高光合作用效率和植物生长/产量方面的有效性。

[0014] 光呼吸中核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶氧化反应和甘氨酸转化的有毒副产物(分别是乙醇酸和氨)在三种细胞器:叶绿体、过氧化物酶体和线粒体中被重新固定并转化为高能量需求和固定碳净损失的可用产物(Bauwe等人,Trends Plant Sci. (2010) 15:330-6)。一些光合作用的藻类、细菌和植物已经进化出通过碳浓缩机制(CCM)和C₄光合作用来降低光呼吸应力的方法(Price等,J.Exp.Bot. (2013) 64:753-68)。作为替代方案,使用替代代谢途径绕过光呼吸可以减少能量需求并更有效地重新捕获过程中损失的碳(Betti等人,J.Exp.Bot. (2016) 67:2977-88)。三个不同的光呼吸旁路已在植物中被证明,例如在拟南芥、亚麻荠(Camelina sativa)以及马铃薯中(Dalal等人,Biotechnol.Biofuels (2015))

8;Kebeish等人,Nat.Biotechnol. (2007) 593-9;Maier等人,Front.Plant Sci. (2012) 3:12;Nolke等人,Plant Biotechnol.J. (2014) 12:734-42)。尽管这些旁路(包括一些修改)显示出植物生产力的提高,但没有证明它们在农业条件下的有效性,并且目前没有尝试完全优化农民田间光呼吸的旁路。

[0015] 为了解决这些问题,本文提出了缺乏叶绿体乙醇酸输出能力的植物及其生产方法,以及包含一个或多个替代的光呼吸旁路途径以提高光合作用效率的方法。两种方法的组合可提高效率。

发明内容

[0016] 本文提供了一种遗传改变的植物,所述植物包含一种或多种遗传改变,所述遗传改变导致植物从至少一部分叶绿体转运乙醇酸的能力的丧失或降低,并导致获得在植物的至少一部分叶绿体中将乙醇酸转化为能量的能力的获得。在一种实施方式中,叶绿体乙醇酸转运能力的丧失是由于缺乏产生与SEQ ID NO:6具有至少70%同一性的功能性蛋白质。在其他实施方式中,叶绿体乙醇酸转运能力的丧失包括通过表达与SEQ ID NO:46至少95%相同的RNA分子来诱导RNA干扰。在另外的其它实施方式中,获得在叶绿体内将乙醇酸转化为能量的能力包括在叶绿体中产生转基因苹果酸合酶和转基因乙醇酸脱氢酶。在具体实施方式中,苹果酸合酶与SEQ ID NO:43的第41至607位氨基酸残基至少95%相同,并且乙醇酸脱氢酶与SEQ ID NO:45的第41至1136位氨基酸残基至少95%相同。在具体实施方式中,苹果酸合酶包含SEQ ID NO:43,并且乙醇酸脱氢酶包含SEQ ID NO:45。在另一种具体实施方式中,叶绿体乙醇酸转运能力的丧失包括缺乏产生与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的蛋白质,并且缺乏产生与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的蛋白质;并且其中获得在叶绿体内将乙醇酸转化为能量的能力包括产生与SEQ ID NO:43具有至少95%同一性的蛋白质和产生与SEQ ID NO:45具有至少95%同一性的蛋白质。遗传改变的植物可以是任何C3植物。例如,在一些实施方式中,本公开的植物是稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦或木薯。

[0017] 本文还公开了通过以下方法生产具有增加的生长或生产力的植物的方法:a)向植物引入遗传改变,包括丧失从植物的至少一部分叶绿体转运乙醇酸的能力;b)向植物引入遗传改变,包括获得在叶绿体内将乙醇酸转化为能量的能力,从而增加植物的生长或生产力。在一些实施方式中,从植物的至少一部分叶绿体转移乙醇酸的能力的丧失包括缺乏产生与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的功能性蛋白质、缺乏产生与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的功能性蛋白质、或这两者。在另外的实施方式中,获得在叶绿体内将乙醇酸转化为能量的能力包括在叶绿体中产生转基因苹果酸合酶和转基因乙醇酸脱氢酶。在一些实施方式中,苹果酸合酶与SEQ ID NO:43的第41至607位氨基酸残基至少95%相同,并且乙醇酸脱氢酶与SEQ ID NO:45的第41至1136位氨基酸残基至少95%相同。在具体的实施方式中,苹果酸合酶包含SEQ ID NO:43,并且乙醇酸脱氢酶包含SEQ ID NO:45。根据特别的实施方式中,叶绿体乙醇酸转运能力的丧失包括缺乏产生与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的蛋白质;缺乏产生与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的蛋白质,或这两者;并且其中获得在叶绿体内将乙醇酸转化为能量的能力包括产生与SEQ ID NO:43具有至少95%同一性的蛋白质和产生与SEQ ID NO:45具有至少95%同一性的蛋白质。任何C3植物可以与本公开的方法一起使用。在一些实施方式中,植物是稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦或木薯。

[0018] 本文提供的另一种实施方式是遗传改变的植物,其包含编码苹果酸合酶的第一异源多核苷酸和编码乙醇酸脱氢酶的第二异源多核苷酸,其中苹果酸合酶和乙醇酸脱氢酶定位于植物的叶绿体。在优选的实施方式中,植物在植物的叶绿体内将乙醇酸转化为能量。在一些实施方式中,苹果酸合酶来自本文提供的任何来源,包括西洋南瓜 (*Cucurbita maxima*)。在特别的实施方式中,苹果酸合酶与SEQ ID NO:43的第41至607位氨基酸残基至少95%相同。在进一步的实施方式中,任何这些植物均从选自本文提供的任何来源的生物体,包括莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 表达乙醇酸脱氢酶。在具体的实施方式中,乙醇酸脱氢酶与SEQ ID NO:45的第41至1136位氨基酸残基至少95%相同。在特别的实施方式中,第一异源多核苷酸编码SEQ ID NO:43的氨基酸序列,第二异源多核苷酸编码SEQ ID NO:45的氨基酸序列。在一些实施方式中,植物还包括在植物的叶绿体中一种或多种内源乙醇酸转运蛋白的水平降低、活性降低、活性部分丧失或活性完全丧失。在一些实施方式中,植物从植物叶绿体进行的乙醇酸转运减少或丧失。在具体的实施方式中,一种或多种乙醇酸转运蛋白包括PLGG1和BASS6。在进一步的实施方式中,一种或多种乙醇酸转运蛋白与SEQ ID NO:6具有至少70%的序列同一性、至少75%的序列同一性、至少80%的序列同一性、至少85%的序列同一性、至少90%的序列同一性或至少95%的序列同一性。在更进一步的实施方式中,一种或多种乙醇酸转运蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:3具有至少70%的序列同一性、至少75%的序列同一性、至少80%的序列同一性、至少85%的序列同一性或至少90%的序列同一性。在其他实施方式中,一种或多种乙醇酸转运蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:3具有至少95%的序列同一性。在一些实施方式中,植物在编码乙醇酸转运蛋白的DNA分子中包含突变。在另外的实施方式中,植物包含编码抑制乙醇酸转运蛋白表达的RNA分子的异源多核苷酸,所述RNA分子例如与SEQ ID NO:46至少95%相同。在进一步的实施方式中,使用选自由CRISPR/Cas、TALEN、锌指核酸酶和RNAi组成的组中的技术来产生一种或多种乙醇酸转运蛋白中的至少一种的水平降低、活性降低、活性部分丧失或活性完全丧失。

[0019] 本公开的另一方面是遗传改变的植物,其中所述植物包含编码第一多肽的第一异源多核苷酸和编码第二多肽的第二异源多核苷酸,所述第一多肽与SEQ ID NO:43具有至少95%同一性,所述第二多肽与SEQ ID NO:45具有至少95%同一性,其中第一多肽和第二多肽定位于植物的叶绿体。在另外的实施方式中,植物还包含水平降低或活性降低的与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的第三多肽,以及水平降低或活性降低的与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的第四多肽。示例性植物包括水稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦和木薯。

[0020] 本公开的另一方面提供了一种生产具有增加的生长或生产力的植物的方法,包括:将编码苹果酸合酶的第一异源多核苷酸和编码乙醇酸脱氢酶的第二异源多核苷酸引入植物,其中苹果酸合酶和乙醇酸脱氢酶定位于植物的叶绿体,其中植物具有增加的在叶绿体内将乙醇酸转化为能量的能力,从而增加植物的生长或生产力。在一些实施方式中,该方法还具有将遗传改变引入植物的步骤,其中植物具有降低的从植物的至少一部分叶绿体转运乙醇酸的能力。在另外的实施方式中,苹果酸合酶来自本文提供的生物体,包括西洋南瓜。在具体的实施方式中,苹果酸合酶与SEQ ID NO:43的第41至607位氨基酸残基至少95%相同。在进一步的实施方式中,乙醇酸脱氢酶来自本文提供的生物体,包括莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)。在特别的实施方式中,乙醇酸脱氢酶与SEQ ID NO:45的第41至1136位氨基酸残基至少95%相同。在具体的实施方式中,苹果酸合酶包含SEQ ID NO:43

的氨基酸序列,乙醇酸脱氢酶包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列。在一些实施方式中,将遗传改变引入植物的步骤导致植物的叶绿体中一种或多种内源乙醇酸转运蛋白水平降低、活性降低、活性部分丧失或活性完全丧失。在该方法的一些实施方式中,一种或多种内源乙醇酸转运蛋白中至少一种的水平降低、活性降低、活性部分丧失或活性完全丧失包括将突变引入编码内源乙醇酸转运蛋白的内源DNA分子中。在另外的实施方式中,一种或多种内源乙醇酸转运蛋白中的至少一种的水平降低、活性降低、活性部分丧失或活性完全丧失包括引入编码抑制内源乙醇酸转运蛋白表达的RNA分子的异源多核苷酸,例如其中RNA分子与SEQ ID NO:46至少95%相同。在具体的实施方式中,一种或多种内源乙醇酸转运蛋白中的至少一种是PLGG1或BASS6。在一些实施方式中,一种或多种内源乙醇酸转运蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:6具有至少70%的序列同一性、至少75%的序列同一性、至少80%的序列同一性、至少85%的序列同一性、或至少90%的序列同一性。在具体的实施方式中,一种或多种内源乙醇酸转运蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:6具有至少95%的序列同一性。在其他实施方式中,一种或多种内源乙醇酸转运蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:3具有至少70%的序列同一性、至少75%的序列同一性、至少80%的序列同一性、至少85%的序列同一性、或至少90%序列同一性。在具体的实施方式中,一种或多种内源乙醇酸转运蛋白中的至少一种与SEQ ID NO:3具有至少95%的序列同一性。在具体的实施方式中,一种或多种内源乙醇酸转运蛋白是与SEQ ID NO:6具有至少95%同一性的第一乙醇酸转运蛋白和与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的第二乙醇酸转运蛋白。在特定的实施方式中,植物是水稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦或木薯。

[0021] 以参考方式加入

[0022] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被具体和单独地指出通过引用并入。

附图说明

[0023] 专利申请文件包含至少一个彩色附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本将在请求以及支付必要费用后由主管局提供。

[0024] 在权利要求中具体阐述了本公开的新颖特征。在以下详细描述和附图中提及本公开的特征和优点,附图中:

[0025] 图1提供了光呼吸C2循环的描述。

[0026] 图2提供了在环境CO₂下生长的bass6和plgg1突变体各自相对于野生型拟南芥的照片(在生长室中以250μmol·m⁻²·s⁻¹的光照强度下在8小时光照/16小时黑暗循环(22℃/18℃)下8周400ppm的CO₂)

[0027] 图3提供了bass6和plgg1突变体各自相对于野生型拟南芥的照片,照片显示了在低CO₂和恒定照射24小时后Fv/Fm的变化。数字代表来自三次重复实验的12株植物的平均值。

[0028] 图4A和图4B提供了显示在不同CO₂浓度下与野生型拟南芥相比,bass6-1和plgg1-1突变体的相对生长速率的图。在图4A中,误差条表示标准偏差,星号(*)表示CO₂处理之间的显著差异。双星号(**)表示T-DNA品系和WT之间生长速率的显著变化。基于学生T检验的统计学差异p<0.05。

[0029] 图5提供了显示缺乏Bass6的拟南芥突变体中同化(A)、内部CO₂浓度(C_i)和气孔导度(g_s)降低的图。在400ppm CO₂和饱和光(1000μmol·m⁻²·s⁻¹)下对于指定的菌株记录的光合作用测量结果,同化(A)、内部CO₂浓度(C_i)和气孔导度(g_s)。字母表示基于ANOVA分析的统计学差异,N=3。

[0030] 图6A和图6B提供了对bass6、plgg1双突变体拟南芥的分析,其显示出附加的光呼吸表型效应。图6A提供了显示代表性野生型、bass6、plgg1和双突变体bass6、plgg1的生长和叶绿素荧光的Fv/Fm变化的照片。照片代表在2000ppm CO₂下生长4周,然后转移至环境CO₂ 5天的指定植物。Fv/Fm图像显示由于叶片上形成褪绿病害导致的叶绿素荧光的变化。图像代表5次重复。图6B提供了显示这些植物中褪绿病斑形成程度的图。基于使用照片软件(Adobe)测量的像素密度的叶病变大小的以cm²计的面积。

[0031] 图7提供了分离的本生烟(Nicotiana benthamiana)原生质体的共聚焦显微镜图像,该图像表示GFP标记的PLGG1(图D至F)和GFP标记的BASS6(图G至I)定位至叶绿体包膜。这些图像是4个连续平面的最大投影,并显示PLGG1和BASS6都定位在叶绿体包膜(箭头)中,在叶绿体包膜中它们形成了质体微管结构(stromules)(星形箭头)。所有原生质体还表达P19和mCherry标记的ER标志物,未示出。比例尺:10μm。图J至L提供瞬时表达从35s启动子表达的Bass6-eGFP的本生烟叶组织的光片图像。箭头指示与叶绿素自发荧光无关的GFP荧光。空心箭头指示与叶绿素包膜相关的GFP荧光。比例尺:50μm。在所有图中,GFP信号以绿色示出,而叶绿体自发荧光以品红色示出。

[0032] 图8A和图8B提供了bass6、plgg1双突变体拟南芥的分析,其显示出附加的光呼吸表型效应。图8A是显示指定的拟南芥T-DNA品系的相对生长速率以及2000ppm(深色)或400ppm CO₂(浅)灰色条形的图。误差条表示每3个生物学重复中至少5株植物的标准偏差。星号(*)表示CO₂处理之间的显著差异。双星号(**)表示T-DNA品系和WT之间生长速率的显著变化。统计学差异基于学生T检验p<0.05。图8B是针对指定的菌株在指定的CO₂浓度和饱和光(1000μmol·m⁻²·s⁻¹)下记录的光合作用测量结果的图。字母代表来自ANOVA分析和Tukey事后比较检验的显著差异。误差条表示标准偏差。

[0033] 图9提供了显示在升高的CO₂下生长6周的拟南芥野生型、bass6、plgg1和双突变体bass6、plgg1植物中各种光呼吸中间产物的积累的图。黑色条表示2000ppm,灰色条表示150ppm CO₂。X轴数字表示基于内标的指定光呼吸代谢物的相对差异。误差条表示平均值的标准误。字母表示基于ANOVA分析的统计差异;N=3。

[0034] 图10提供了证明BASS6和PLGG1在拟南芥野生型、bass6、plgg1和双突变体bass6、plgg1中的乙醇酸代谢中的作用的图。指定的植物品系在升高的CO₂(2000ppm)中生长4周,然后转移至环境空气(400ppm CO₂) 24小时。在8小时光照周期结束时,收集组织作为时间0。其后的每个时间点是在黑暗期间进行样品采集。X轴数字表示基于内标的指定光呼吸代谢物的相对差异。误差条表示平均值的标准误。星号表示基于比较WT对照与T-DNA品系的ANOVA分析的统计学差异;N=3。

[0035] 图11提供了表达拟南芥PLGG1或BASS6的各种酵母菌株的照片,并显示了两种蛋白质转运乙醇酸的能力。

[0036] 图12提供了显示表达拟南芥PLGG1或BASS6的各种酵母菌株摄取放射性标记的乙醇酸的能力的图。误差条表示标准偏差,字母表示基于ANOVA分析的统计学差异,N=3。

[0037] 图13提供了证明控制BASS6和PLGG1表达的一些遗传调节机制的图。通过qRT-PCR分析在plgg1-1和bass6-1突变体中确定叶组织中Bass6和Plgg1的表达。在左图中,误差条表示来自3个生物学重复的平均值的标准误,每个所述生物学重复包括3个技术重复。星号表示显著变化($p < 0.05$)。右图显示了所示拟南芥转基因品系的相对生长速率。误差条表示每3个生物学重复中至少5株植物的标准偏差。星号(*)表示在环境空气条件下生长的转基因品系之间的显著差异。根据学生T检验得出的统计差异。

[0038] 图14光呼吸旁路的合成生物学方式。三种光呼吸旁路设计模型。旁路1(橙色)使用大肠杆菌乙醇酸途径的5种基因,3种基因(即DEF乙醇酸脱氢酶、乙醛酸羧化酶和糖醛酸半醛还原酶)中的将乙醇酸转化为甘油酸。旁路2(红色/紫色)利用三种基因,乙醇酸氧化酶、苹果酸合酶和过氧化氢酶来去除乙醇酸氧化酶产生的过氧化氢。旁路3(蓝色/紫色)使用2种基因,莱茵衣藻乙醇酸脱氢酶和西洋南瓜苹果酸合酶。

[0039] 图15A至15B.图15A提供了在通过低CO₂和恒定照射24小时后Fv'/Fm'的变化针对改善的光呼吸旁路进行基于荧光的筛选期间9日龄转基因烟草品系的代表性照片。图15B提供了具有和不具有靶向乙醇酸/甘油酸转运蛋白PLGG1的RNAi的三种旁路构建体设计的组合值。误差条表示SEM。*表示基于单因素ANOVA与WT相比的统计学差异, $P \leq 0.05$ 。

[0040] 图16A至16B旁路3品系的基因表达和蛋白质分析。图16A.对旁路3中的两种转基因和RNAi构建体的靶基因PLGG1进行qRT-PCR分析。图16B.使用针对指定靶基因产生的定制抗体进行蛋白质印迹分析。除RbcS对照(1.5 μ g)外,每条泳道中加样3 μ g蛋白质。箭头(►)表示基于分子量检测到的蛋白质。误差条表示SEM。*表示基于单因素ANOVA与WT相比的统计学差异, $P \leq 0.05$ 。

[0041] 图17A至17B旁路1和2的基因表达分析。图17A.指定转基因和靶向旁路1的RNAi的天然PLGG1的qRT-PCR分析。乙醇酸脱氢酶亚基D、E、F(GDH)、亚酒石酸半醛还原酶(TSR)、乙醛酸聚醛酶(GCL)、质体乙醇酸/甘油酸转运蛋白(PLGG1)。图17B.指定的转基因和靶向旁路2的RNAi的天然PLGG1的qRT-PCR分析。乙醇酸氧化酶(GO)、过氧化氢酶(CAT)、苹果酸合酶(MS)。误差条表示SEM。

[0042] 图18A至18B.田间试验茎高和生物量。图18A.基于发芽后7周记录的测量值的茎高度分析。误差条表示SD,*表示基于单因素ANOVA的显著性, $N=8$ 。图18B.在具有和不具有PLGG1 RNAi组件的情况下,与WT对照相比,组合的茎、叶和总干重生物量的百分比差异。误差条表示SEM,*表示基于单因素ANOVA的显著性, $N=8$ 。

[0043] 图19A至19C.田间试验光合作用效率。图19A.基于可用的光响应曲线和在指定[CO₂]下的CO₂同化的饱和速率,通过同化的线性回归确定旁路1的光合作用(Φ_a)的组合表观量子效率。图19B.基于可用光响应曲线和在指定[CO₂]下的CO₂同化的饱和速率,通过同化的线性回归确定旁路2的光合作用(Φ_a)的组合表观量子效率。图19C.基于可用光响应曲线和在指定[CO₂]下的CO₂同化的饱和速率,通过同化的线性回归确定旁路3的光合作用(Φ_a)的组合表观量子效率。误差条表示SEM,*表示基于单因素ANOVA的显著性, $P \leq 0.05$ 。

[0044] 图20A至20D.在温室条件下测试的光合作用效率。图20A.核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶羧化的组合最大速率(V_{cmax})。图20B.电子传递的组合最大速率(J_{max})。使用PS-Fit模型,在改变CO₂浓度下的光合作用响应来模拟最大的烷氧基化和电子传输速率。图20C.组合表观CO₂补偿点:使用常规截距法和斜率回归计算的伽玛星号(Γ^*)。图20D.基于

内部[CO₂] (Ci) 的CO₂同化。误差条表示SEM。*表示基于单因素ANOVA与WT相比的统计学差异，指出了P值。

[0045] 图21A至21E. 2017年田间试验的植物生产力和光合作用效率。图21A. 在具有和不具有PLGG1 RNAi组件的情况下，与旁路3的WT对照相比，组合的叶（左条）、茎（中间条）和总（右条）生物质的百分比差异。字母表示基于双因素ANOVA的统计差异， $P \leq 0.05$ 。图21B. 针对指定品系的总组合积累的叶淀粉。图21C. 基于可用光响应曲线，通过同化的线性回归确定光合作用的组合表观量子效率(Φ_a)。图21D. 基于光合作用日分析的CO₂ (A') 的组合同化累积。图21E. 基于日光合作用的由同化确定的电子传递中使用的组合累积电子。误差条表示基于ANOVA分析指示SD和P值。

[0046] 图22. 通过RNAi敲低PLGG1导致在从CO₂升高为环境空气的转变后Fv'/Fm'增加。仅表达PLGG1 RNAi组件的5种转基因阳性植物的组合值与转基因阴性植物从相同T0转化事件开始比较。在从CO₂升高为环境空气的转变后3天测量Fv'/Fm'。误差条表示标准偏差。

[0047] 图23. 光呼吸旁路导致在温室条件下生物质增加。指定的植物品系的总干重生物质的差异%。EV, 空载体; AP1, 旁路1; AP2, 旁路2; AP3, 旁路3。*表示基于单因素ANOVA的统计差异。误差条是SEM。

具体实施方式

[0048] 光呼吸是一种能量密集型过程，该过程回收有毒代谢物2-磷酸甘油酸，即核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶氧合反应的产物。光呼吸途径是高度区室化的，涉及叶绿体、过氧化物酶体、胞质溶胶和线粒体(图1)。尽管参与光呼吸的可溶性酶已被良好表征，但迄今为止已鉴定出的涉及光呼吸的膜转运蛋白很少。在光呼吸条件下，靶向胆汁酸钠同向转运蛋白Bass6的拟南芥T-DNA插入物抑制光合作用并导致环境空气缓慢生长表型，该表型在升高的CO₂下被拯救。此外，酵母中乙醇酸转运的代谢物分析和遗传互补表明，BASS6能够进行乙醇酸转运，这与其参与从拟南芥叶绿体中乙醇酸的光吸收输出一致。与单独的单突变相比，包括Bass6和乙醇酸/甘油酸转运蛋白Plgg1 (bass6-1-plgg1-1) 的双敲除拟南芥品系导致另外的生长缺陷、乙醇酸积累增加和光合作用速率降低。数据表明，BASS6是定位于叶绿体内包膜的乙醇酸转运蛋白，Bass6的外源表达可以补充光呼吸突变表型。了解负责从C3植物的叶绿体中输出乙醇酸的转运蛋白是引入更有能量效率的光呼吸途径从而提高光合作用效率的设计策略中的关键信息。

[0049] 通过多种可能绕过光呼吸的潜在设计，计算机建模表明，需要优化非天然基因的表达和通过旁路的通量，以在田间条件下最大限度地提高作物的益处。另外，在植物中减少或关闭天然光呼吸途径将进一步增加表达光呼吸旁路途径的益处。我们假设使用合成生物学方法生成表达不同光呼吸旁路策略的基因构建体文库，在减少从叶绿素中转运乙醇酸的同时，可以提供对光呼吸旁路的益处的了解，并可以用于设计优良的植物品系以提高作物生产力(图14)。

[0050] 因此，本文还提供了含有重组dsRNA (SEQ ID NO:46) 的植物，该重组dsRNA导致PLGG1蛋白产生的RNAi敲低与旁路途径的表达相结合。鉴于数据显示这些菌株之间的类似结果，预期敲低或敲除菌株的功能相似。因此，在一些实施方式中，不具有功能性PLGG1蛋白的植物与旁路3蛋白(来自莱茵衣藻的苹果酸合酶和乙醇酸脱氢酶)组合，以产生具有增加

的光合作用效率的植物。其他实施方式提供表达旁路3蛋白并缺乏功能性BASS6蛋白的植物。本文进一步考虑了表达旁路3蛋白并且缺乏功能性BASS6蛋白和功能性PLGG1蛋白(通过敲除或敲低)的转基因植物。

[0051] 本文中示出和描述了本公开的优选实施方式。对于本领域技术人员显而易见的是,这些实施方式仅作为示例提供。在不脱离本公开的情况下,本领域技术人员将想到许多变化、改变和替换。在实践本公开时可以采用本文描述的本公开的实施方案的各种替代方案。所附权利要求旨在限定本公开的范围,并且由此覆盖这些权利要求及其等同物范围内的方法和结构。

[0052] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有本公开所属领域的普通技术人员通常理解的含义。这里参考本领域技术人员已知的各种材料和方法。阐述重组DNA技术的一般原理的标准参考文献包括Sambrook等人,“分子克隆:实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)”,第二版,冷泉港实验室出版社,普莱恩维尤,N.Y.,1989;Kaufman等人编,“生物学和医学分子和细胞方法手册(Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine)”,CRC出版社,博卡拉顿,1995;和McPherson编,“直接突变形:实践方法(Directed Mutagenesis:A Practical Approach)”,IRL出版社,牛津,1991。指导真菌遗传学通用方法论和原理的标准参考文献可用于本公开的选定方面,包括:Sherman等人“实验课程方法·酵母遗传学方法(Laboratory Course Manual Methods in Yeast Genetics)”,冷泉港实验室,冷泉港,N.Y.,1986和Guthrie等人,“酵母遗传学和分子生物学指南(Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology)”,学术出版社,纽约,1991。

[0053] 可以使用本领域技术人员已知的任何合适的材料和/或方法来实施本公开。描述了用于实践本公开的材料和/或方法。除非另有说明,否则在以下描述和实施例中参考的材料、试剂等可从商业来源获得。

[0054] 除非上下文另有明确说明,如说明书和权利要求书中所使用的,单数“一种/一个(a/an)”和“该(the)”的使用包括复数指代。

[0055] 如本文所用,术语分离的、纯化的或生物学纯的是指基本上或本质上不含通常伴随天然状态的参考材料的组分材料。

[0056] 无论是否具体说明,术语“约”定义为所述值的正负百分之十。例如,大约1.0g意味着0.9g至1.1g及该范围内的所有值。

[0057] 术语“基因”是指参与产生RNA或多肽或其前体的DNA序列。多肽或RNA可以由全长编码序列或编码序列的内含子中断部分(例如外显子序列)编码。

[0058] 术语“引物”是指置于引发引物延伸的条件下时能够充当合成起始点的寡核苷酸。寡核苷酸“引物”可以天然存在,如在纯化的限制性消化中,或可以合成产生。

[0059] 选择引物使得与模板的特定序列的链“基本上互补”。引物必须足够互补以与模板链杂交以发生引物延伸。引物序列不需要反映模板的确切序列。例如,非互补核苷酸片段可以连接到引物的5'末端,引物序列的其余部分基本上与链互补。非互补碱基或更长序列可以穿插在引物中,条件是引物序列与模板序列充分互补以杂交,从而形成用于合成引物延伸产物的模板引物复合物。

[0060] 出于本公开的目的,以百分比表示的两个相关核苷酸或氨基酸序列的“序列同一

性”是指两个最佳比对序列中具有相同残基(x100)除以比较的位置的数目。间隙,即在一个序列中存在残基而在另一个序列中不存在的比对中的位置被认为是具有不相同残基的位置。通过Needleman和Wunsch算法(Needleman和Wunsch, J Mol Biol, (1970) 48:3, 443-53)进行两个序列的比对。计算机辅助序列比对可以使用标准软件程序如GAP方便地进行, GAP是Wisconsin Package Version 10.1 (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, 美国)的一部分, 使用缺省评分矩阵, 其中缺口产生罚分为50分和缺口延长罚分为3分。

[0061] 在两个或更多个多核苷酸或多肽序列的上下文中, 术语“相同”或“同一性”百分比及其语法变体是指, 当在使用序列比较算法或通过手动比对和目视检查测量的指定区域上比较和以最大对应性比对时, 两个或更多个序列或子序列相同或具有特定百分比的相同的核苷酸或氨基酸(分别地)(例如, 80%、85%同一性、90%同一性、99%或100%同一性)。

[0062] 在两个多核苷酸或多肽的上下文中, 短语“高百分比相同”或“高百分比同一性”及其语法变体是指, 当在使用序列比较算法或通过手动比对和目视检查测量的指定区域上比较和以最大对应性比对时, 两个或更多个序列或子序列具有至少约80%的同一性, 至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核苷酸或氨基酸同一性。在示例性实施方式中, 在长度为至少约16个核苷酸或氨基酸的序列的区域上存在高百分比同一性。在另一种示例性实施方式中, 在长度为至少约50个核苷酸或氨基酸的序列的区域上存在高百分比同一性。在又另一种示例性实施方式中, 在长度为至少约100个核苷酸或氨基酸的序列的区域上存在高百分比同一性。在一个示例性实施方式中, 序列在多核苷酸或多肽序列的整个长度上是高度百分比相同的。

[0063] 术语“BASS6”及其大写和斜体形式是指如本文所述的植物基因和蛋白质。在一些实施方式中, 如本文所述, 该术语可以指拟南芥基因和蛋白质。在其他实施方式中, 该术语可以指任何C3植物的基因和蛋白质的一种或多种同源物或直系同源物。在一些实施方式中, 该术语可以指任何C3植物的基因和蛋白质的一种或多种旁系同源物。在一些实施方式中, C3植物是稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦或木薯。SEQ ID NO:1提供拟南芥BASS6基因的基因组序列。SEQ ID NO:2提供拟南芥BASS6基因的cDNA序列。SEQ ID NO:3提供拟南芥Bass6蛋白。当所有字母用小写斜体表示时, 意图是基因/蛋白质的突变体(例如敲除)版本。在拟南芥中, 突变形式可以是单个基因/蛋白质。在其他C3植物中, 突变形式可以是基因/蛋白质的一个、一些或所有同源物、直系同源物和/或旁系同源物。

[0064] 术语“PLGG1”及其大写和斜体形式是指如本文所述的植物基因和蛋白质。在一些实施方式中, 如本文所述, 该术语可以指拟南芥基因和蛋白质。在其他实施方式中, 该术语可以指任何C3植物的基因和蛋白质的一种或多种同源物或直系同源物。在一些实施方式中, 该术语可以指任何C3植物的基因和蛋白质的一个或多个旁系同源物。在一些实施方式中, C3植物是稻、大豆、马铃薯、豇豆、大麦、小麦或木薯。SEQ ID NO:4提供拟南芥PLGG1基因的基因组序列。SEQ ID NO:5提供拟南芥PLGG1基因的cDNA序列。SEQ ID NO:6提供拟南芥Plgg1蛋白。当所有字母用小写斜体表示时, 意图是基因/蛋白质的突变体(例如敲除)版本。在拟南芥中, 突变形式可以是单个基因/蛋白质。在其他C3植物中, 突变形式可以是基因/蛋白质的一个、一些或所有同源物、直系同源物和/或旁系同源物。SEQ ID NO:46提供了在本发明的一些转基因植物中通过产生dsRNA用于RNAi敲低的PLGG1编码序列的一部分。

[0065] 除非另有明确说明,术语“CMMS”或“MS”是指西洋南瓜苹果酸合酶基因和蛋白质。SEQ ID NO:43提供与核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基信号肽(第1至40个氨基酸残基)融合的苹果酸合酶蛋白(第41至607个氨基酸残基)。SEQ ID NO:42提供了编码该具有信号肽的蛋白质并用于产生本文所述的旁路3植物的DNA序列。包括这些核酸和蛋白质序列的变体,例如编码与SEQ ID NO:43具有95%或更高同一性的蛋白质的DNA和利用交替信号肽序列的蛋白质。

[0066] 术语“CrGDH”或“GDH”是指莱茵衣藻乙醇酸脱氢酶基因和蛋白质。SEQ ID NO:45提供与核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基信号肽(第1至40个氨基酸残基)融合的苹果酸合酶蛋白(第41至1136个氨基酸残基)。SEQ ID NO:44提供了编码该具有信号肽的蛋白质并用于产生本文所述的旁路3植物的DNA序列。包括这些核酸和蛋白质序列的变体,例如编码与SEQ ID NO:43具有95%或更高同一性的蛋白质的DNA和利用交替信号肽序列的蛋白质。

[0067] 本文所用的术语“旁路”是指被引入重组植物细胞并由重组植物细胞表达的转基因酶途径。三个旁路通路(1、2和3)如表1所示。这些在下文实施例部分中进一步详述。

[0068] 表1.旁路1、旁路2和旁路3酶

	质粒编码的酶	来源	表达的转基因的基因
旁路 途径 1	乙醛酸聚醛酶 (GCL)、 亚酒石酸半醛还原酶 (TSR)、乙醇酸脱氢酶 亚基 D、E 和 F (GdD、 GdE、GdF)	大肠杆菌	示例性基因: KU512948.1、 WP_001415790.1、 KU512945.1、KU512946.1、 KU512947.1
旁路 途径 2	乙醇酸氧化酶 (GO)、苹 果酸合成酶 (CmMS) 和 过氧化氢酶 HPII (CAT)	拟南芥 (GOX1)、西洋 南瓜 (MS)、大 肠杆菌 (katE)	示例性基因: NM_112302.4、 HM755991.1、M55161.1
旁路 途径 3	苹果酸合成酶 (CmMS)、 乙醇酸脱氢酶 (CrGDH)	西洋南瓜 (MS)、莱茵衣 藻 (GYD1)	SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 44

[0070] “dsRNA”是指包含选定靶基因的有义和反义部分的双链RNA(或与其具有高序列同一性的序列,从而可发生基因沉默),以及由其通过RNA酶或dicer酶活性形成的任何较小的双链RNA。此类dsRNA可包括单链RNA的部分,但含有至少19个核苷酸的双链RNA。在本公开的一种实施方式中,dsRNA包含在靶基因的有义和反义序列之间含有环或间隔序列的发夹RNA,优选地,这种发夹RNA间隔区含有内含子,具体是rolA基因内含子(Pandolfini等人., 2003, BioMedCentral (BMC) Biotechnology 3:7 (www.biomedcentral.com/1472-6750/3/7))、来自pHellsgate 11或12的双取向内含子(参见W0 02/059294和其中的SEQ ID NO:25和15)或pdk内含子(黄花菊丙酮酸正磷酸二激酶内含子2;参见W099/53050)。SEQ ID NO:46

提供了在本公开的一些实施方式中用于敲低PLGG1产生的RNA序列。

[0071] 表1中提供的酶名称,乙醇酸羧化酶、2-羟基-3-氧代丙酸还原酶、亚酒石酸半醛还原酶、乙醇酸脱氢酶D、E和F亚基、乙醇酸氧化酶、苹果酸合酶、过氧化氢酶HPII和乙醇酸脱氢酶,是指以所提供的酶和序列为例的酶的类别。这些术语包括这些酶的同系物以及可以催化相同反应的酶。

[0072] 如本文所用,术语“增加生长”和“增加生产力”及其语法变体是指在给定时间点生长速率或植物大小增加,或与同一物种的未改变植物相比遗传改变植物的光合作用效率增加。

[0073] 分子生物学方法

[0074] 分离的核酸是其结构与任何天然存在的核酸的结构不同的核酸。因此,该术语包括,例如,(a)具有天然存在的基因组DNA分子的一部分序列但侧翼没有位于其天然存在的生物体的基因组中的分子的部分的侧翼的编码或非编码序列的DNA;(b)以使得所得分子与任何天然存在的载体或基因组DNA不同的方式掺入载体或原核生物或真核生物的基因组DNA中的核酸;(c)单独的分子,例如cDNA、基因组片段、通过聚合酶链式反应(PCR)产生的片段或限制性片段;(d)作为杂合基因的一部分的重组核苷酸序列,所述杂合基因即编码融合蛋白的基因。特别地排除在该定义之外的是存在于(i)DNA分子、(ii)转化或转染的细胞和(iii)细胞克隆的混合物中的核酸,例如它们存在于DNA文库如cDNA或基因组DNA文库中。

[0075] 术语重组核酸是指通过基因工程技术或通过化学合成对多核苷酸的分离片段进行人工操作而实现的序列的两个另外分离的片段的组合来制备的多核苷酸。在这样做时,可以将所需功能的多核苷酸片段连接在一起以产生所需的功能组合。

[0076] 在实施本文公开的本公开的一些实施方式中,修饰宿主细胞的重组株的基因组DNA、叶绿体DNA或线粒体DNA以排除一种或多种靶蛋白(例如BASS6或PLGG1)的功能性表达和/或引入允许表达导入基因的遗传元件是有用的。在优选的实施方式中,这种宿主细胞是植物细胞。

[0077] 旨在排除靶蛋白的功能性表达或靶蛋白的表达降低或活性降低的修饰可涉及编码靶蛋白的DNA或基因的突变,包括缺失靶基因的全部或部分(包括但不限于靶基因座的开放阅读框、转录调节因子(如靶基因座的启动子)和位于开放阅读框5'或3'的任何其他调节性核酸序列)、在开放阅读框中插入过早终止密码子、以及插入或缺失改变阅读框从而导致翻译过早终止。可以使用本领域技术人员已知的任何技术实现这种缺失突变。通过在编码靶蛋白的DNA或基因中进行点突变或插入,也可以实现靶蛋白的水平降低或靶蛋白的活性降低。所公开的核苷酸序列和基因的突变、插入和缺失变体可以通过本领域技术人员熟知的方法容易地制备。用于实现靶蛋白质的水平降低和/或活性降低的技术可包括CRISPR/Cas、TALEN和锌指核酸酶。制备在功能上与本文公开的具体突变相同的突变、插入和缺失突变完全在本领域受过训练的人的技能范围内。另外,对功能性蛋白质产生的这种修饰可以通过蛋白质“敲低”方法,例如由双链RNA(dsRNA)、siRNA或本领域已知的其他技术介导的RNA干扰(RNAi)实现。抑制靶蛋白表达的RNA分子可以降低编码蛋白质的基因的表达,或者可以降低蛋白质的翻译。

[0078] 当重组核酸用于特定序列的表达、克隆或复制时,为引入宿主细胞而制备的DNA构建体通常将包含宿主识别的复制系统(即载体),所述复制系统包括编码所需多肽的预期

DNA片段,并且所述DNA构建体还可以包括可操作地连接至编码多肽的片段的转录和翻译起始调控序列。另外,此类构建体可包括细胞定位信号(例如叶绿体定位信号)。在优选实施方式中,将此类DNA构建体引入宿主细胞的基因组DNA、叶绿体DNA或线粒体DNA中。

[0079] 在一些实施方式中,非整合表达系统可用于诱导一种或多种导入基因的表达。表达系统(表达载体)可包括,例如复制起点或自主复制序列(ARS)和表达控制序列、启动子、增强子和必需的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点、转录终止子序列和mRNA稳定序列。适当时,还可包含来自相同或相关物种的分泌多肽的信号肽,这些信号肽可使蛋白质穿过和/或滞留在细胞膜、细胞壁中或从细胞中分泌出来。

[0080] 可用于实施本文公开的本公开的方法的选择标记物可以是阳性选择标记物。通常,阳性选择是指只有当感兴趣的重组多核苷酸存在于细胞内时,遗传改变的细胞才能在有毒物质存在下存活的情况。阴性选择标记物和可筛选标记也是本领域熟知的,并且是本公开内容所考虑的。本领域技术人员将认识到,可用的任何相关标记物可用于实施本文公开的发明。

[0081] 可以利用核酸杂交技术进行本公开的重组株的筛选和分子分析。杂交方法可用于鉴定与如本文所教导的有用的主题调控序列具有足够同源性的多核苷酸,例如使用本文所述技术修饰的多核苷酸。特定的杂交技术对于本公开内容不是必需的。随着杂交技术的改进,本领域技术人员可以容易地应用它们。杂交探针可以用本领域技术人员已知的任何合适的标签进行标记。可以改变杂交条件和洗涤条件,例如温度和浓度,以改变检测阈值的严格性。参见,例如,Sambrook等人(1989)见下文或Ausubel等人.(1995)分子生物学通用方案(Current Protocols in Molecular Biology),John Wiley&Sons,NY,N.Y.,以获得关于杂交条件的进一步指导。

[0082] 另外,可以使用聚合酶链式反应(PCR)进行遗传改变的株系的筛选和分子分析,以及产生所需的分离的核酸。PCR是核酸序列的重复性、酶促性、引发性的合成。该方法是本领域技术人员熟知的并且通常使用(参见Mullis,美国专利号4,683,195、4,683,202和4,800,159;Saiki等人(1985)Science 230:1350-1354)。PCR基于目的DNA片段的酶促扩增,所述目的DNA片段侧翼为与靶序列的相反链杂交的两个寡核苷酸引物。引物定向为3'末端彼此指向。模板的热变性、引物退火到其互补序列以及退火的引物与DNA聚合酶的延伸的重复循环导致由PCR引物的5'末端限定的片段的扩增。因为每个引物的延伸产物可以作为其它引物的模板,所以每个循环本质上使前一个循环中产生的DNA模板的量加倍。这导致特定靶片段的指数积累,在几小时内达到数百万倍。通过使用热稳定DNA聚合酶(如从嗜热细菌水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)中分离的Taq聚合酶),扩增过程可以完全自动化。可以使用的其他酶是本领域技术人员已知的。

[0083] 本公开的核酸和蛋白质还可以包括具体公开的序列的同源物。同源性(例如序列同一性)可以是50%至100%。在一些情况下,这种同源性大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。本领域技术人员容易识别序列的任何预期使用所需的同源性或同一性程度。如本文所用,使用本领域已知的算法确定两种核酸的百分比序列同一性,例如Karlin和Altschul(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268,其在Karlin和Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877被修改。这种算法被并入Altschul等人.(1990)J.Mol.Biol.215:402-410的NBLAST和XBLAST算法。用NBLAST程序进行BLAST核苷酸搜索,得

分=100,字长=12,以获得具有所需百分比序列同一性的核苷酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,如Altschul等人(1997)Nucl.Acids.Res.25:3389-3402所描述地使用间隔的(Gapped)BLAST。当使用BLAST和间隔的BLAST程序时,使用相应程序(NBLAST和XBLAST)的默认参数。参见www.ncbi.nih.gov。

[0084] 优选的宿主细胞是植物细胞。在本文中,重组宿主细胞是经遗传修饰以含有分离的核酸分子、含有一种或多种通常在宿主细胞中存在并具有功能的缺失的或非功能性基因、或含有一种或多种产生至少一种重组蛋白的基因的宿主细胞。编码本公开的蛋白质的核酸可以通过本领域已知的任何适合于特定类型细胞的方法引入,包括但不限于转化、脂质转染、电穿孔或本领域技术人员已知的任何其他方法。

[0085] 转基因植物和植物细胞(t-dna和叶绿体表达)

[0086] 本公开的一种实施方式提供了包含一种或多种修饰的植物基因和/或引入的基因的植物或植物细胞。例如,本公开提供了缺乏编码定位在叶绿体的转运蛋白BASS6和/或PLGG1的基因的功能性表达的转基因植物。另外,本文提供的一些植物或植物细胞还表达非天然基因,例如由细菌来源的、植物来源的和藻类来源的基因编码的酶。可供选择地,本文提供的一些植物或植物细胞可以如下的方式表达天然基因,即所产生的蛋白质定位于细胞器(例如叶绿体)或该蛋白质不天然定位的其他亚细胞区室。本文还预期并描述了其他遗传元件(例如,导致PLGG1蛋白产生敲低的dsRNA)的表达。

[0087] 遗传改变的单子叶植物细胞和双子叶植物细胞的转化和产生是本领域熟知的。参见例如Weising等人,Ann.Rev.Genet.22:421-477(1988);美国专利号5,679,558;土壤杆菌属方案(Agrobacterium Protocols),编辑:Gartland,Humana出版社公司(1995);和Wang等人.Acta Hort.461:401-408(1998)。方法的选择随待转化植物的类型、特定的应用和/或所需的结果而变化。技术人员很容易选择合适的转化技术。

[0088] 本领域已知的缺失、插入或以其他方式修饰细胞DNA(例如基因组DNA和细胞器DNA)的任何方法可用于实施本文公开的发明。例如,在根癌土壤杆菌(Agrobacterium tumefaciens)中含有用于缺失或插入靶基因的遗传构建体的弱化(disarmed)Ti-质粒可以用于转化植物细胞,之后,可以使用本领域描述的程序(例如EP 0116718、EP 0270822、PCT公开W0 84/02913和公布的欧洲专利申请(“EP”)0242246)从转化的植物细胞再生转化的植物。Ti质粒载体每个都包含该Ti质粒的T-DNA的边界序列之间的基因,或至少位于该Ti质粒的T-DNA的右侧边界序列的左侧的基因。当然,使用例如以下的程序,其他类型的载体可用于转化植物细胞:直接基因转移(如EP 0233247中所述)、花粉介导的转化(如EP 0270356、PCT公开W0 85/01856和美国专利号4,684,611中所述)、植物RNA病毒介导的转化(如例如,在EP 0 067 553和美国专利号4,407,956中所述)、脂质体介导的转化(例如在美国专利号4,536,475中进行了描述),以及其他方法,例如用于转化某些玉米品系的方法(例如,美国专利号6,140,553;Fromm等人,生物/技术(Bio/Technology)(1990)8,833-839);Gordon-Kamm等人,植物细胞(The Plant Cell), (1990)2,603-618)和大米(Shimamoto等人,自然(Nature), (1989)338,274-276;Datta等人,生物/技术, (1990)8,736-740)和通常用于转化单子叶植物的方法(PCT公开号W0 92/09696)。对于棉花转化,可以使用PCT专利公开号W0 00/71733中描述的方法。对于大豆转化,参考本领域已知的方法,例如,Hinchee等人(生物/技术, (1988)6,915)和Christou等人(Trends Biotech, (1990)8,145)或W0 00/42207的方

法。

[0089] 在本公开的一些实施方式中,一种或多种基因已被从宿主植物细胞“敲除”。通常,这意味着缺失靶基因的所有功能性拷贝(例如,两个或更多个拷贝,取决于靶基因的拷贝数)。导致靶基因或等位基因不能产生功能性蛋白质的天然序列的任何修饰都被包括在术语“敲除”中。此类修饰包括但不限于错义突变、无义突变、终止密码子突变、插入突变、缺失突变、移码突变和剪接位点突变。

[0090] 本公开的转基因植物可以用于常规植物育种方案中以产生具有相同特征的更多转基因植物,或者在相同或相关植物物种的其他品种中引入遗传改变。从转化植物获得的种子优选含有遗传改变作为染色体或细胞器DNA中的稳定插入体。包含根据本公开的一种或多种遗传改变的植物包括如下的植物,所述植物包含有或源自含有本公开的一种或多种遗传改变的植物的根茎(root stock),所述植物例如果树或观赏植物。因此,插入转化植物或植物部分的任何非转基因嫁接植物部分都包括在本公开内容中。

[0091] 引入的遗传元件无论是在表达载体还是表达盒中均导致导入基因的表达,所述引入的遗传元件通常利用植物可表达的启动子。如本文所用的“植物可表达的启动子”是指确保在植物细胞中表达本公开的一种或多种遗传改变的启动子。在植物中指导组成型表达的启动子的实例是本领域已知的,并且包括:花椰菜花叶病毒(CaMV)的强组成型35S启动子(“35S启动子”),例如分离株CM1841的强组成型35S启动子(Gardner等人,Nucleic Acids Res, (1981) 9,2871-2887)、CabbB-S的强组成型35S启动子(Franck等人,细胞(Cell) (1980) 21,285-294)、CabbB JI的强组成型35S启动子(Hull和Howell,病毒学(Virology), (1987) 86,482-493);来自泛素家族的启动子(例如Christensen等人,Plant Mol Biol, (1992) 18,675-689)的玉米反义启动子,gos2启动子(de Pater等人,The Plant J (1992) 2,834-844),Emu启动子(Last等人,Theor Appl Genet, (1990) 81,581-588),肌动蛋白启动子,例如由An等人所描述的启动子。(The Plant J, (1996) 10,107),Zhang等人描述的水稻肌动蛋白启动子(The Plant Cell, (1991) 3,1155-1165);木薯脉花叶病毒的启动子(WO 97/48819,Verdaguer等人(Plant Mol Biol, (1998) 37,1055-1067),来自地三叶草矮化病毒的pPLEX系列启动子(WO 96/06932,特别是S4或S7启动子),醇脱氢酶启动子(例如pAdh1S (GenBank登录号X04049、X00581)),以及分别驱动T DNA的1'和2'基因的表达的TR1'启动子和TR2'启动子(分别为“TR1'启动子”和“TR2'启动子”)(Velten等人,EMBO J, (1984) 3,2723-2730)。

[0092] 可供选择地,植物可表达的启动子可以是组织特异性启动子,即在植物的一些细胞或组织中,例如在绿色组织(例如PEP羧化酶的启动子)中指导更高水平表达的启动子。植物PEP羧化酶启动子(Pathirana等人,Plant J, (1997) 12:293-304)已被描述为用于在微管组织中表达的强启动子,并且可用于本公开的一种实施方式中。可供选择地,植物可表达的启动子也可以是伤口诱导型启动子,例如豌豆细胞壁转化酶基因的启动子(Zhang等人,Plant Physiol, (1996) 112:1111-1117)。本文所用的“伤口诱导型”启动子是指在植物机械受伤或由昆虫摄食而受伤时,这种植物中在启动子控制下的编码序列的表达显著增加。这些植物可表达的启动子可以与增强子元件组合,它们可以与最小的启动子元件组合,或者可以包含重复的元件以确保所需的表达谱。

[0093] 在一些实施方式中,可以使用遗传元件来增加植物细胞中的表达。例如,引入基因的5'末端或3'末端的内含子,或引入基因的编码序列中的内含子,例如hsp70内含子。其他

此类遗传元件可包括但不限于启动子增强子元件、二重或三重启动子区域,与另一转基因不同或与内源(植物宿主)基因前导序列不同的5'前导序列,与用于相同植物中的另一转基因不同或与内源(植物宿主)尾随序列不同的3'尾随序列。

[0094] 可以将本公开的导入基因插入宿主细胞DNA中,使得插入的基因部分是合适的3'末端转录调节信号(即转录物形成和多腺苷酸化信号)的上游(即5')。这优选通过将基因插入植物细胞基因组(核或叶绿体)中来实现。优选的多聚腺苷酸化和转录物形成信号包括胭脂碱合酶基因的那些信号(Depicker等人,J.Molec Appl Gen, (1982) 1,561-573)、章鱼碱合酶基因的那些信号(Gielen等人,EMBO J, (1984) 3:835-845)、SCSV或Malic酶终止子(Schunmann等人,Plant Funct Biol, (2003) 30:453-460)和T-DNA基因7(Velten和Schell, Nucleic Acids Res, (1985) 13,6981-6998),它们在转化的植物细胞中充当3'-未翻译的DNA序列。

[0095] 蛋白质同系物

[0096] 本领域技术人员将理解,本文公开的特定蛋白质的各种同源物可以被靶向用于缺失或敲低方法,或者用于产生旁路途径。以下是本公开中提供的特定蛋白质的示例性但非限制性的蛋白质同源物,它们可用于实践本文公开的实施方式。

[0097] BASS6同源物包括以下(物种和登录号):拟南芥(NP_567671.1)、拟南芥(CAA16569.1)、琴叶拟南芥(A.lyrata)(XP_002867746.1)、山嵛菜(Eutrema salsugineum)(XP_006413612.1)、荠菜(Capsella rubella)(XP_006282633.1)、亚麻荠(Camelina sativa)(XP_010433982.1)、亚麻荠(XP_010448822.1)、高山南芥(Arabis alpine)(KFK39256.1)、甘蓝(Brassica oleracea var.oleracea)(XP_013593377.1)、欧洲油菜(Brassica napus)(XP_013737613.1)、芜菁(Brassica rapa)(XP_009137288.1)和萝卜(Raphanus sativus)(XP_018484108.1)。

[0098] PLGG1同源物包括以下的(物种和登录号):拟南芥(NP_564388.1)、拟南芥(AAM65181.1)、琴叶拟南芥(XP_020868671.1)、琴叶拟南芥(EFH69957.1)、荠菜(XP_006307262.1)、亚麻荠(XP_010478626.1)、亚麻荠(XP_010461027.1)、亚麻荠(XP_010499753.1)、欧洲油菜(XP_013733826.1)、萝卜(XP_018457661.1)、甘蓝(XP_013587088.1)、欧洲油菜(XP_013731498.1)、芜菁(XP_009114919.1)、山嵛菜(XP_006415255.1)、甘蓝(XP_013587305.1)、欧洲油菜(XP_022559249.1)、欧洲油菜(CDY35540.1)、芜菁(XP_009145211.1)、萝卜(XP_018486680.1)、高山南芥(KFK44969.1)、欧洲油菜(CDY59206.1)、欧洲油菜(XP_013731491.1)、欧洲油菜(CDY22583.1)、醉蝶花(Tarenaya hassleriana)(XP_010518925.1)、蓖麻(Ricinus communis)(XP_002519004.1)、巴西橡胶树(Hevea brasiliensis)(XP_021652349.1)、橙(Citrus sinensis)(XP_006471454.1)、欧洲油菜(XP_022575243.1)和普通胡桃(Juglans regia)(XP_018843901.1)。

[0099] 苹果酸合酶的同源物包括如下(物种和登录号):西洋南瓜(XP_023000792.1)、美国南瓜(Cucurbita pepo)(XP_023519701.1)、中国南瓜(Cucurbita moschata)(XP_022923624.1)、苦瓜(Momordica charantia)(XP_022137538.1)、黄瓜(Cucumis sativus)(XP_004152519.1)、厚皮甜瓜(Cucumis melo)(XP_008439505.1)、可可树(Theobroma cacao)(EOY22418.1)、普通胡桃(XP_018821986.1)、大桉(Eucalyptus grandis)(XP_

010037447.1)、大桉(*Eucalyptus grandis*) (KCW49165.1)、哥伦比亚锦葵(*Herrania umbratica*) (XP_021286625.1)、可可树(XP_007037917.2)、蔓花生(*Arachis duranensis*) (XP_020997255.1)、海岛棉(*Gossypium barbadense*) (PPR87616.1)、欧洲甜樱桃(*Prunus avium*) (XP_021800964.1)、酿酒葡萄(*Vitis vinifera*) (XP_002279452.1)、西班牙栓皮栎(*Quercus suber*) (XP_023901530.1)、西班牙栓皮栎(*Quercus suber*) (POF20494 0.1)、雷蒙德氏棉(*Gossypium raimondii*) (XP_012468378.1)、土瓶草(*Cephalotus follicularis*) (GAV68244.1)、海岛棉(PPD76680.1)、风铃辣椒(*Capsicum baccatum*) (PHT53703.1)、烟草(*Nicotiana tabacum*) (XP_016464464.1)、黄灯笼辣椒(*Capsicum chinense*) (PHU23662.1)、蓖麻(*Ricinus communis*) (XP_002511225.1)、辣椒(*Capsicum annuum*) (XP_016563806.1)、树棉(*Gossypium arboreum*) (XP_017604788.1)、克里曼丁红橘(*Citrus clementina*) (XP_006440060.1)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*) (XP_013444720.1)、榴莲(*Durio zibethinus*) (XP_022737455.1)、红车轴草(*Trifolium pretense*) (PNY13237.1)、蒺藜苜蓿(ACJ85740.1)、茸毛烟草(*Nicotiana tomentosiformis*) (XP_009595632.1)、温州蜜柑(*Citrus unshiu*) (GAY51023.1)、梅(*Prunus mume*) (XP_008239432.1)、西伯利亚杏(*Prunus sibirica*) (AIU64851.1)、桃(*Prunus persica*) (XP_020420471.1)、番茄(*Solanum lycopersicum*) (XP_004236345.1)、糙叶山黄麻(*Parasponia andersonii*) (PON64176.1)、蓖麻(NP_001310646.1)、橙(*Citrus sinensis*) (XP_006476991.1)、大豆(*Glycine max*) (NP_001347240.1)、野生烟草(*Nicotiana attenuate*) (XP_019261379.1)、黄胡萝卜(*Daucus carota* subsp.Sativus) (XP_017250345.1)、洛矶山耧斗菜(*Aquilegia coerulea*) (PIA33657.1)、异色山黄麻(*Trema orientalis*) (PON95652.1)、向日葵(*Helianthus annuus*) (XP_022038983.1)、博落回(*Macleaya cordata*) (OVA17558.1)、美花烟草(*Nicotiana sylvestris*) (XP_009776635.1)、麻疯树(*Jatropha curcas*) (XP_012079884.1)、狭叶羽扇豆(*Lupinus angustifolius*) (XP_019463065.1)、赤豆(*Vigna angularis*) (XP_017425062.1)、潘那利番茄(*Solanum pennellii*) (XP_015070973.1)、野大豆(*Glycine soja*) (KHN14088.1)、醉蝶花(XP_010555537.1)、番茄(XP_010319064.1)、马铃薯(*Solanum tuberosum*) (XP_006351486.1)、潘那利番茄(XP_015070972.1)、马铃薯(XP_006351485.1)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*) (XP_004510708.1)、绿豆(*Vigna radiata* var.radiata) (XP_022639201.1)、莴苣(*Lactuca sativa*) (XP_023732731.1)、胡杨(*Populus euphratica*) (XP_011024067.1)、毛果杨(*Populus trichocarpa*) (PNT01248.1)、番木瓜(*Carica papaya*) (XP_021909023.1)、木豆(*Cajanus cajan*) (XP_020216385.1)、烟草(XP_016435566.1)、野生油橄榄树(*Olea europaea* var.sylvestris) (XP_022878435.1)、苹果(*Malus domestica*) (XP_008374272.1)、野生油橄榄树(XP_022878436.1)、巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*) (XP_021681023.1)、川桑(*Morus notabilis*) (XP_010103099.1)、石榴(*Punica granatum*) (OWM90581.1)、拟南芥(NP_196006.1)、琴叶拟南芥(*Arabidopsis lyrata*) (XP_002873119.1)、牵牛花(*Ipomoea nil*) (XP_019198829.1)、黄色猴面花(*Erythranthe guttata*) (XP_012854673.1)、山萵菜(XP_006398845.1)、亚麻荠(XP_010490879.1)、芝麻(*Sesamum indicum*) (XP_011073010.1)、枣(*Ziziphus jujube*) (XP_015878765.1)、茺菁(XP_009125524.1)、野草莓(*Fragaria vesca* subsp.Vesca) (XP_004297548.1)、亚麻荠

(XP_010423656.1)、大豆(XP_003525685.1)、荠菜(XP_006286626.1)、欧洲油菜(XP_013720273.1)、萝卜(XP_018468682.1)、欧洲油菜(CDY14170.1)、高山南芥(KFK24848.1)、甘蓝(XP_013621105.1)、马铃薯(XP_006351487.1)、旋蒴苣苔(*Dorcoceras hygrometricum*) (KZV21744.1)、黄麻(*Corchorus capsularis*) (OM084006.1)、木薯(*Manihot esculenta*) (OAY30724.1)和欧洲油菜(CAA73793.1)。

[0100] 乙醇酸氢化同源物包括以下的(物种和登录号):莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*) (XP_001695381.1)、莱茵衣藻(ABG36932.1)、团藻(*Volvox carterii* f.nagariensis) (XP_002946459.1)、胸状盘藻(*Gonium pectoral*) (KXZ46746.1)、秀柱花衣藻(*Chlamydomonas eustigma*) (GAX77289.1)、小球藻(*Chlorella variabilis*) (XP_005852216.1)、胶球藻(*Coccomyxa subellipsoidea*) (XP_005648725.1)、普通微胞藻(*Micromonas commoda*) (XP_002506446.1)、产油微藻(*Auxenochlorella protothecoides*) (XP_011399156.1)、*Ostreococcus tauri* (XP_003074362.2)、绿色鞭毛藻(*Ostreococcus lucimarinus*) (XP_001415862.1)、金牛微球藻(*Ostreococcus tauri*) (OUS42650.1)、绿藻(*Bathycoccus prasinos*) (XP_007511439.1)、细小微胞藻(*Micromonas pusilla*) (XP_003063153.1)、金色藻属(*Chrysochromulina* sp.) (K0033603.1)和蓝隐藻(*Guillardia theta*) (XP_005827919.1)。

[0101] 已经一般性地描述了本发明,通过参考某些具体实施例将更好地理解本发明,这些实施例被包括在本文中以进一步说明本发明,而不意图限制由权利要求限定的本发明的范围。

[0102] 实施例

[0103] 实施例1:材料和方法

[0104] 植物材料和生长条件

[0105] 拟南芥哥伦比亚(Col-0)用作野生型参考。Salk_03569C(plgg1-1)、CS859747(bass6-1)和Salk_052903C(bass6-2)从拟南芥生物资源中心(abrc.osu.edu)获得。植物在升高的(2000ppm CO₂)或环境(400ppm CO₂)中以8小时光照/16小时黑暗循环(22°C/18°C),于250μmol·m⁻²·s⁻¹PAR和65%相湿度(RH)下在使用LC1 Sunshine Mix的生长室(Conviron,美国)中生长。

[0106] 叶绿素荧光测量

[0107] 拟南芥植物在环境空气条件下生长,并被移动到低CO₂条件下在恒定光照下的密封的透明塑料容器中保持24小时,类似于(Badger等人,2009)然后进行叶绿素荧光测量。如前所述进行叶绿素荧光测量(Oxborough和Baker,Plant,Cell&Environ.(1997)20:1473-83;Badger等人,同上)。简言之,使用CF Imager Technologica(www.technologica.co.uk)在4周龄植物暗适应15分钟后拍摄Fv/Fm图像。最大闪光强度为6800μmol·m⁻²·s⁻¹,进行800毫秒。通过检测定义每个位置的荧光成像软件程序内的群落,获得每个单独植物的图像值。

[0108] 克隆

[0109] 所有表达载体描述于表2中。基于从拟南芥信息资源(TAIR)获得的序列合成启动子和开放阅读框。根据植物合成生物学中的常规语法设计限制性位点和4个碱基对同源区域(Patron等人,New Phytol.(2015)208:13-19)。然后使用Golden Gate克隆方案组装构建

体,然后亚克隆到二元载体(EC50505)中(Werner等人,Bioengineered(2012)3:38-43;Engler等人,ACS Synth.Biol.(2014)3:839-43;Marillonnet和Werner,在糖工程化中(In Glyco-engineering),A.Castilho编(纽约Springer),pp.269-84(2015)。为了稳定转化,通过电穿孔将二元载体转化到根癌土壤杆菌C58C1中,然后通过浸花法(Clough和Bent,Plant J.(1998)16:735-43)转化到Col-0野生型菌株、plgg1-1或bass6-1T-DNA插入品系中。基于BASTA抗性选择转化的品系,并通过PCR分析验证基因插入。对于瞬时表达,如上设计构建体,该构建体由CaMV35s启动子驱动并且在C-末端GFP融合。

[0110] 表2. 质粒

质粒	插入的基因	启动子	载体	来源
EC50505	无		EC50505	ENSA (项目 ensa.ac.uk)
EC27349	<i>p19, eGFP</i>	<i>2X35S</i>	EC50505	该研究
EC27357	<i>p19</i> , <i>BASS6-eGFP</i>	<i>2X35S</i>	EC50505	该项研究
p415	无		p415 ADH1	ATCC-87374
[0111] ADH1	<i>BASS6</i>	<i>ADH1</i>	p415 ADH1	该研究
	<i>PLGG1</i>	<i>ADH1</i>	p415 ADH1	该研究
	<i>EC15325</i>	<i>BAR</i>	<i>NOS</i>	EC50505 ENSA (项目 ensa.ac.uk)
EC27403	<i>BAR, PLGG1</i>	<i>NOS, PLGG1</i>	EC15325	该研究
EC27404	<i>BAR, BASS6</i>	<i>NOS, BASS6</i>	EC15325	该研究
EC27406	<i>BAR, BASS6</i>	<i>NOS, PLGG1</i>	EC15325	该研究

[0112] 对于分离的原生质体的瞬时表达工作,如下克隆BASS6-GFP构建体。拟南芥Bass6(AT4G22840)的编码序列由GENEWIZ Inc.合成,其带有包含mGFP6(Haseloff,J.,Method Cell Biol.(1999)58:139-51)、6xHis和MYC的C-末端标签,被插入至修饰的通道相容性(gateway-compatible)pUC57质粒,从该质粒,拟南芥Bass6编码序列在pMDC32中重组。AtPLGG1-GFP构建体在之前发表(Rolland等人,Front.Plant Sci.(2016)7:185)。

[0113] 本生烟的土壤杆菌渗入法(Agro-infiltration)和显微镜检

[0114] 生长和渗入实验描述于(Rolland等人,同上)。简言之,用感兴趣的质粒转化根癌土壤杆菌GV3101(pMP90),并在含有利福平(50μg/ml)和卡那霉素(30μg/ml)的LB培养基中生长。培养物在28至30℃孵化器中生长约24小时,并用于转化本生烟叶。将含有P19的细菌(OD600=0.3)与含有感兴趣的质粒和/或ER区室标记物的细菌(OD600=0.5)混合(质粒CD3-959来自拟南芥生物资源中心,http://abrc.osu.edu,(Nelson等人,2007))。将细胞以2150×g离心8分钟并重悬(10mM MES pH 5.6,10mM MgCl₂和150μM乙酰丁香酮)。将细胞在室温下温育2小时,并渗入到3-4周龄本生烟叶。

[0115] 如前所述完成原生质体制备 (Rolland等人, 同上)。渗入后两天, 用解剖刀切割 4cm^2 的渗入叶片面积并转移到5ml注射器中, 注射器中添加2ml消化溶液并手动施加温和真空。将渗入溶液和叶组织转移到2ml微量离心管中并在室温下温育1小时。除去叶碎片并使原生质体沉淀, 然后用成像溶液 (0.4M甘露醇, 20mM KCl, 20mM MES pH 5.6, 10mM CaCl_2 , 0.1% [w/v] BSA) 替换溶液。

[0116] 使用直立的Zeiss LSM780共聚焦激光扫描显微镜 (Carl Zeiss), $40\times$ 水浸物镜 (NA=1.1) 和Zen 2011软件包 (Carl Zeiss) 观察原生质体并成像。GFP和叶绿素在488nm激发并分别在499至534nm和630至735nm处记录。mCherry在561nm激发并在579至633nm处在不同的轨道中记录 (尽管在该研究中未显示)。

[0117] 使用光片 (Light sheet) Z1 (Carl Zeiss INC. Oberkochen, Germany) 显微镜从所述渗入的叶组织观察切片的全叶组织, 使用Zen光片软件包 (Carl Zeiss), 使用 $40\times$ 物镜 (NA=1.0)。GFP和叶绿素在488nm激发, 发射选择分别在505-545和660nm处记录。

[0118] 代谢谱化

[0119] 对于代谢物分析, 将约40mg新鲜叶组织在液氮中冷冻, 粉碎, 然后用500 μL 100%甲醇提取。然后将样品提交给伊利诺伊大学厄巴纳-香槟分校的Roy J. Carver生物技术中心的代谢组学中心, 然后在此进行两次额外的提取: 异丙醇: 乙腈: 水 (3:3:2v/v) 和氯仿: 甲醇 (2:2v/v)。使用GC-MS系统 (Agilent Inc., CA, 美国) 分析代谢物, 所述GC-MS系统由Agilent 7890气相色谱仪, Agilent 5975质量选择性检测器和HP 7683B自动进样器组成。在ZB-5MS (60m $\times$ 0.32mm ID, 膜厚0.25 μm) 毛细管柱 (Phenomenex, CA, 美国) 上进行气相色谱。入口和MS界面温度为250 $^{\circ}\text{C}$, 离子源温度调节至230 $^{\circ}\text{C}$ 。注入1 μL 的等分试样, 分流比为10:1。氦载气保持在2ml/min的恒定流速。温度程序为: 在70 $^{\circ}\text{C}$ 下等温加热5分钟, 然后将炉温以5 $^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ 升高至310 $^{\circ}\text{C}$, 最后在310 $^{\circ}\text{C}$ 下加热10分钟。质谱仪在正电子轰击模式 (EI) 下以69.9eV电离能在m/z 30-800扫描范围内操作。将所有色谱峰的光谱与电子撞击质谱库NIST08 (NIST, MD, 美国)、W8N08 (Palisade Corporation, NY, 美国) 和定制数据库 (464种独特代谢物) 进行比较。鉴定并除去所有已知的人工峰。为了在样品之间进行比较, 将所有数据标准化为每个色谱图中的内标和样品湿重。使用AMDIS 2.71 (NIST, MD, 美国) 程序来评估所有色谱峰的光谱。代谢物浓度报告为相对于内标的每克湿重的浓度 (即, 目标化合物峰面积除以三十一烷酸的峰面积: $N_i = X_i \cdot X^{-1} \text{IS}$)。仪器可变性在标准接受限度5%范围内。

[0120] 光合作用测量

[0121] 在升高的 $[\text{CO}_2]$ 下生长的30至40日龄拟南芥植物的最嫩的完全展开的叶片用于通过气体交换分析光合作用。使用带有2 cm^2 荧光测量头的Li-COR 6400XT进行气体交换测量, 其中垫片泄露如手册 (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, 美国) 中所述地进行校正。在25 $^{\circ}\text{C}$ 的叶温和饱和光 (1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) 下, 在指定的 CO_2 浓度下获得 A_g 和 C_i 测量值。在环境 CO_2 下适应后, 在上述相同温度和光照条件下, 在一定范围的 CO_2 (50至2000ppm) 中测量 A_{C_i} 曲线。使用 A_{C_i} 数据和PsFit模型 (Bernacchi等人, Plant Cell Environ (2003) 26:1419-1430) 测定 $V_{c \text{ Max}}$, J_{MaxRd} 和 g_s 。

[0122] RT-PCR

[0123] 使用植物RNeasy提取试剂盒和Quantitect逆转录试剂盒 (QIAGEN USA) 从在8小时/16小时的日夜循环, 65%RH下, 180 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR和22 $^{\circ}\text{C}$ /18 $^{\circ}\text{C}$ 温度范围内生长的4周龄

拟南芥植物中提取的RNA产生cDNA。对所有样品均使用三个生物学重复,每个生物学重复包括三个技术重复。使用Bio-Rad CFX连接实时PCR系统(Bio-Rad laboratories,美国)分析样品,并且使用针对紫黄质脱环氧酶(VDE),Plgg1和Bass6转录物的引物,使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法确定转录物的相对变化。使用SS0高级SYBR预混液(green master mix)(Bio-Rad)扩增cDNA,并且引物序列描述于表3中。

[0124] 表3. 引物

引物名称	SEQ ID NO:	序列
p35s seq F.	SEQ ID NO: 7	CTCTCTGCCGACAGTGGT
t35s seq R.	SEQ ID NO: 8	CTTATATGCTCAACACATGAGCG
Salk_053469 LP	SEQ ID NO: 9	ATAACCGCGAGATAGAGAGGC
Salk_053469RP	SEQ ID NO: 10	CCCATGGCTACTCTTTTAGCC
LBb1.3	SEQ ID NO: 11	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
Plgg1-005F	SEQ ID NO: 12	GCCGGATCCATGGCTTCGTGCTCTAAGATCCGTT TCGGT
[0125] Plgg1-006R	SEQ ID NO: 13	GCCCTCGAGTCAGCCGACGACCGCTAGC
Bass6-001F	SEQ ID NO: 14	GCTCTAGAATGAGCGTGATCACAACCTCC
Bass6-002R	SEQ ID NO: 15	GACTCGAGTTAAAATGTGTTACTCTTTTC
Plgg1-RT 1F	SEQ ID NO: 16	CTACTCTTTTAGCCACTCCTATCTTC
Plgg1-RT 2R	SEQ ID NO: 17	AGATTCAACTTCTGGGCACC
Bass6-RT 1F	SEQ ID NO: 18	TCGCAGTCAACGGATTCAAG
Bass6-RT-2R	SEQ ID NO: 19	TCTACGCCACAAATTCCTCG
VDE-RT-1F	SEQ ID NO: 20	TGAGTTCAACGAGTGTGCTG
VDR-RT-2R	SEQ ID NO: 21	ACTTGTAATGTACCACTTCCCC

[0126] 酵母互补和乙醇酸摄取

[0127] 如前所述组装酵母质粒(South等人,J.Biol.Chem.(2010)285:595-607)。简而言之,从Col-0野生型拟南芥中获得RNA,并通过RNeasy提取试剂盒和Quantitec逆转录试剂盒(QIAGEN,Hilden,德国)转换成cDNA。使用表3中所述的引物通过PCR扩增全长Bass6和Plgg1减掉叶绿体定位信号(1-24)的CDS序列。使用BamHI和XhoI限制性位点将PCR产物克隆到pRS415-ADH1载体(ATCC,VA USA)中。如先前所述用BY4741 mat野生型和ady2 Δ 菌株(GE Dharmacon)进行酵母转化(South等人,同上;South等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA(2013)110:E1016-E1025)。

[0128] 通过比较使用乙醇酸作为碳源的生长分析,进行ady2 Δ 菌株的互补。用Bass6、Plgg1或空载体表达质粒转化的野生型和ady2 Δ 菌株在缺少亮氨酸的合成完全培养基(SC-Leu)中的50mL培养物中生长,直至OD₆₀₀的光密度达到0.6至0.8。然后将细胞在水中洗涤两次并重悬于水中。在含有作为碳源的2%葡萄糖、乳酸或乙醇酸的SC-Leu平板上进行斑点测定。将5 μ L斑点滴加到从0.1的OD₆₀₀开始5次10倍连续稀释的平板上。然后将平板在30℃下温育。在1d(葡萄糖)、2d(乳酸)、7d(乙醇酸)下拍摄平板的照片。

[0129] 乙二醇摄取测量与先前描述的甘油摄取类似地进行(Oliveira等人,FEMS Microbiol.Lett.(1996)142:147-53)。酵母菌株在SC-Leu中的30mL培养物中于30℃下生长,直至OD₆₀₀的光密度达到0.6至0.8。收获细胞并用水洗涤两次,并以30mg/ml干重的浓度重悬于100mM Tris/柠檬酸缓冲液pH 5.0中。在25℃下温育2分钟后,反应从添加150 μ L含有1 μ L 50mCi/mmol [¹⁴C]-乙醇酸(总共 3.7×10^3 [Bq]) (American Radiolabeled chemicals, MO USA)的水溶液的(SC-Leu/乙醇酸)开始。10分钟后,通过添加5mL冰冷水终止反应。然后

将反应混合物在玻璃纤维过滤器 (Fisher Scientific USA) 上过滤,并用5mL冰冷的水洗涤3次。使用Packard Tri-Carb液体闪烁计数器 (Perkin Elmer USA),用过滤器加4mL闪烁液 (RPI Bio-safe II) 通过闪烁法来测量 $[^{14}\text{C}]$ -乙醇酸摄取。

[0130] 统计分析

[0131] 所有实验至少有3个生物学重复,数据表明平均值。相对生长分析和mRNA水平的相对变化包括使用学生T检验的标准偏差和显著性。通过单因素ANOVA (基因型) 或双因素ANOVA (通过 CO_2 处理的基因型) 分析代谢物分析和光合作用测量,显著性阈值 $P < 0.05$ 。所有ANOVA均进行Tukey's事后检验,并使用统计软件 (OriginPro 9.1, OriginLab, MA USA) 确定。

[0132] 实施例2:拟南芥bass6突变表型的分析

[0133] 分析了靶向基因At4g22840的两个独立的T-DNA插入品系,该插入品系缺乏推定的叶绿体内膜蛋白BASS6的表达。为了确定BASS6是否参与光呼吸,在环境 CO_2 (400ppm) 条件下生长了两个T-DNA品系 (bass6-1和bass6-2)。与野生型对照相比,bass6突变品系显示出较小的花结 (rosset) 大小,类似于光呼吸plgg1-1中涉及的乙醇酸/甘油酸转运蛋白突变体 (图2-与环境 CO_2 生长 ((在生长室中以 $250\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照强度在8h光照/16h黑暗循环 ($22^\circ\text{C}/18^\circ\text{C}$) 下8周400ppm CO_2) 的WT相比,bass6和plgg1突变体的代表性照片)。在低浓度的 CO_2 下照射光呼吸突变体导致暗适应的 F_v/F_m 叶绿素荧光降低,这可能是由于对光系统II的光损伤造成的 (Badger等人,同上)。在恒定光照下24小时后,与野生型相比,plgg1-1和bass6-1品系均显示 F_v/F_m 显著降低,尽管在低 $[\text{CO}_2]$ 处理之前未观察到 F_v/F_m 降低 (图3)。为了验证光呼吸突变表型,在低的、环境和升高的 CO_2 下进行bass6-1突变体的生长分析。与经典的光呼吸突变表型一致,bass6-1和plgg1-1突变体都不能在125ppm CO_2 下生长 (图4B)。与野生型对照相比,在环境 CO_2 条件下,bass6-1和plgg1-1T-DNA品系均表现出缓慢的生长表型 (图4A和4B)。重要的是,当在高 $[\text{CO}_2]$ 条件下生长时,缓慢生长表型在bass6-1和plgg1-1突变体中均恢复为野生型表型 (图4A和4B)。

[0134] 对于野生型或接近野生型的生长,光呼吸途径的突变体通常需要高水平的 CO_2 ,这是核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶氧化反应被抑制到非常低水平的条件 (Timm和Bauwe, 同上)。在环境 $[\text{CO}_2]$ 下,光呼吸突变体通常表现出光合作用降低,其特征不在于碳同化作用 (A),核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 $V_{c \max}$ 和 $J_{\max}$ 参数降低。类似于先前的报道 (Pick等人,同上;Walker等人,Photosyn Res. (2016) 129:93-103),plgg1-1与野生型相比表现出较低的光合作用速率 (图5)。与WT相比,bass6-1植物在环境 $[\text{CO}_2]$ 下还表现出光合作用的轻微降低,内部 CO_2 浓度 (C_i) 或气孔导度 (g_s) 没有可检测的变化 (图5)。为了评估对bass6-1和plgg1-1品系光合作用的生化限制,研究了碳同化作用 (A) 对叶片 (C_i) 内细胞间 $[\text{CO}_2]$ 的响应。与单点光合作用的测量结果一致,bass6-1和plgg1-1的 $V_{c \max}$ 和 $J_{\max}$ 值均降低 (表3)。对于图4,字母表示基于方差 (ANOVA) 分析的统计差异 $p \leq 0.5$ 。 $V_{c \max}$,核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶允许的最大羧化速率; $J_{\max}$,光合作用电子传输的最大速率; R_d ,白天呼吸; g_s ,气孔导度。bass6-1品系中光合作用的速率的减少幅度不如plgg1-1突变体大,这与bass6-1与plgg1-1突变体植物相当的花环大小以及生长速率一致 (比较图2和图4A与图5和表4)。

[0135] 表4. 使用PsFit模型基于 $A C_i$ 数据的光合作用参数。

		$V_{c \text{ Max } 25^{\circ}\text{C}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	$J_{\text{Max } 25^{\circ}\text{C}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	R_d ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
[0136]	Col-0 WT	$58.64^A \pm 0.93$	$121.98^A \pm 1.61$	$1.44^A \pm 0.16$	$0.24^A \pm 0.04$
	<i>bass6-1</i>	$49.60^B \pm 1.62$	$107.38^B \pm 1.18$	$1.20^{AB} \pm 0.33$	$0.22^A \pm 0.05$
	<i>plgg1-1</i>	$38.37^C \pm 3.12$	$97.33^C \pm 2.18$	$2.24^B \pm 0.5$	$0.16^A \pm 0.04$

[0137] 先前对*plgg1-1*的表征证明,当*plgg1-1*突变体在高水平的 CO_2 下生长,然后转移到环境空气时,它们的叶片上发生褪绿病害(Pick等人,同上)。使用叶绿素荧光Fv/Fm检测,在环境空气条件下3天后可检测到褪绿病害。与先前的研究一致,*plgg1-1*突变体在转移至环境空气后在叶片上发生病害(图6A)。虽然单独的*bass6-1*突变体在转移到环境 CO_2 后在转移后三天或长达七天的时间并没有在叶片上发生可观察到的褪绿病害(图6A),与单独的*plgg1-1*品系相比,*bass6-1*和*plgg1-1*杂交的纯合子F3世更严重地发生了褪绿病害,这与加性光呼吸突变体表型相一致(图6A和图6B)。随着观察到的*bass6*、*plgg1*双重突变体中褪绿病害严重程度的翻倍,我们假设还会有累加的生长缺陷并光合作用速率的进一步降低。如所预测的,在F3双突变植物中观察到的生长表型进一步降低,并且当缺少PLGG1和BASS6功能时,光合作用速率的降低似乎是累加的(图8A和图8B)。

[0138] 实施例3:BASS6蛋白定位在叶绿体包膜中

[0139] 尽管先前的研究表明BASS6蛋白定位于叶绿体包膜,但亚细胞定位预测程序更强烈地支持BASS6的线粒体定位(Gigolashvili等人,同上)。为了确定BASS6蛋白的定位,在这两个原生质体和本生烟全叶组织分析BASS6-GFP融合蛋白的瞬时表达。叶绿素自发荧光用于鉴定叶绿体(图7的图B、E、H和K)。BASS6-GFP信号包围叶绿体自发荧光(图7,图G至I),类似于已知的乙醇酸/甘油酸转运蛋白PLGG1(图7,图D至F),表明BASS6定位于叶绿体包膜。此外,BASS6-GFP或PLGG1-GFP的表达诱导质体微管结构(stromule)的形成(图7,图D至I中的星形箭头),质体微管结构的形状是位于叶绿体内包膜中的蛋白质的典型形式(Breuers等人,Frontiers Plant Sci., (2012) 3:7)。来自全叶组织的光片显微镜实验也显示定位于叶绿体包膜和另外的非叶绿体区域,尽管这可能是由瞬时过表达引起的(图7,图J至L)。作为另外的对照,将GFP对照蛋白与BASS6-GFP进行比较,显示出BASS6不位于胞质溶胶。

[0140] 实施例4:*bass6-1*代谢物谱的分析

[0141] 当核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶氧合速率可观时,具有光呼吸缺陷的突变植物在光呼吸途径中积累各种代谢物中间体。为了帮助确定光呼吸途径中BASS6的转运步骤,在暴露于高(2000ppm)或低(150ppm) [CO_2] 的叶组织中分析代谢物谱。与高 [CO_2] 条件下的野生型对照相比,*bass6-1*品系显示氨基酸丝氨酸增加,而之前报道的*plgg1-1*品系,甚至在高 CO_2 浓度下,也积累多种光呼吸中间体,如乙醇酸、甘氨酸和甘油酸(图9)。当叶暴露于低水平的 CO_2 下使核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶氧合速率增加时,与野生型相比,*bass6-1*中甘氨酸和乙醇酸的水平显著增加(图9)。作为比较,当叶暴露于低水平的 CO_2 时,*bass6-1*累积甘氨酸的水平类似于*plgg1-1*植物(图9)。

[0142] 为了确定BASS6和PLGG1的组合损失是否导致光呼吸中间体水平的累加增加,将*plgg1-1*和*bass6-1*品系之间杂交的纯合F3与野生型和相应的单突变体进行比较。与野生型

和单突变品系相比,F3双突变体的乙醇酸积累显著增加,与plgg1-1单突变体类似地,其他中间体(如甘油酸)则有所增加(图9)。代谢物谱数据表明,BASS6功能丧失可导致光呼吸代谢物积聚。此外,BASS6和PLGG1的功能丧失导致乙醇酸积累进一步增加。暴露于低CO₂条件下的光呼吸代谢物的积累与缓慢的生长表型一致,并且与BASS6在光呼吸代谢中的作用一致。

[0143] 光呼吸是一种光依赖途径。plgg1-1拟南芥品系的代谢物分析显示乙醇酸、甘氨酸、丝氨酸和甘油酸的轻度依赖性积累(Pick等人,同上),这与叶绿体中乙醇酸输出和甘油酸输入的损害一致。在环境空气下的夜晚,plgg1-1突变体中的乙醇酸和甘氨酸水平恢复到野生型水平,并且甘油酸显著减少(Pick等,同上)。为了确定bass6-1和F3双突变体植物中的乙醇酸、甘油酸和甘氨酸水平与野生型和plgg1-1相比的变化,在生长光周期结束时在从高[CO₂]转变为环境空气后并且从光到暗转变后立即进行代谢物分析。在光照期结束后,plgg1-1突变体显示乙醇酸水平降低(图10)。bass6-1植物的代谢物谱显示在光照期结束时乙醇酸和甘油酸的积累,该积累在10分钟内显著减少(图10)。与plgg1-1植物相比,F3的bass6、plgg1双突变体中乙醇酸的积累显著增加,而F3突变体中的甘氨酸和甘油酸水平与plgg1突变体非常相似。这些与BASS6在叶绿体内被膜上的定位相结合,强烈暗示PLGG1和BASS6共同负责从叶绿体中输出乙醇酸。

[0144] 实施例5:BASS6和PLGG1拯救酵母在作为碳源的乙醇酸上的生长

[0145] 酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中没有已知的乙醇酸转运蛋白,但乙醇酸转运蛋白ADY2与已知转运乙酸和乙醇酸的大肠杆菌(*Escherichia coli*) yjcG同源(Gimenez等人,Bacteriol., (2003) 185:6448-55)。因此,我们生成了表达BASS6和PLGG1的酵母载体,并在野生型BY4741和同基因ady2 Δ 菌株中表达它们。用于测量生长的斑点测定证明,仅表达空载体的ady2 Δ 菌株不能在作为唯一碳源的乙醇酸上生长(图11)。正如预测的那样,在ady2 Δ 酵母菌株中表达PLGG1拯救生长回到使用乙醇酸作为唯一碳源的野生型水平(图11)。Bass6基因的表达还在ady2 Δ 菌株中拯救生长,证明BASS6也可以补充为乙醇酸运输(图11)。使用葡萄糖和乳酸作为碳源的对照显示在酵母中BASS6和PLGG1的表达不会对生长产生负面影响,并且ady2 Δ 菌株可以利用两种碳源(图11)。

[0146] 基于BASS6和PLGG1可以补充酵母在作为碳源的乙醇酸中的生长的发现,我们试图确定两种蛋白质的转运能力。为了测试在酵母中表达的BASS6和PLGG1的转运特征,我们使用[¹⁴C]-乙醇酸进行摄取实验。将[¹⁴C]-乙醇酸温育10分钟,然后进行猝灭和闪烁计数。PLGG1蛋白的表达显示野生型和ady2 Δ 菌株中乙醇酸摄取的能力增加(图12),BASS6蛋白的表达也是如此(图12)。数据表明在酵母中表达的BASS6和PLGG1两者均促进跨膜乙醇酸转运,导致拯救乙醇酸摄取缺陷型ady2 Δ 突变体的生长(图12)。

[0147] 实施例6:对基因表达的影响

[0148] 拟南芥中Bass6或Plgg1的缺失导致在环境或较低[CO₂]空气中光呼吸突变体表型的生长速度与野生型相比降低(图2)。此外,缺乏BASS6和PLGG1表达的双重突变植物进一步降低了植物的生长能力(图6A)。尽管BASS6或PLGG1的缺失导致光呼吸表型,但与其他许多光呼吸突变体观察到的一样,在环境空气中生长时,T-DNA插入品系均无致命性。这可能是由于运输过程中的冗余,以及由于一个基因表达的增加而补偿了另一个基因的损失。为了测试Bass6或Plgg1的缺失是否导致其他基因表达的改变,进行了实时PCR(RT-PCR)实验。与

野生型相比,在plgg1-1品系中,Bass6表达没有可检测的差异(图13)。然而,在bass6-1品系中,Plgg1的表达是野生型的4.8倍,表明Plgg1的表达显著增加以补偿由BASS6的丧失引起的代谢变化(图13)。在确定bass6-1植物中Plgg1表达增加后,假设Plgg1表达的变化是在bass6-1中观察到的严重表型低于plgg1-1的原因。这导致测试Bass6或Plgg1的表达是否可能与每个单个突变体的缓慢生长表型互补。

[0149] 此外,为了排除plgg1-1或bass6-1品系表型是由于另一个突变引起的可能性,Plgg1和Bass6也在其天然启动子的控制下转化为plgg1-1和bass6-1品系。在Bass6自身启动子的控制下或在Plgg1启动子的控制下表达Bass6拯救了bass6-1品系中的生长速率表型,证实了BASS6的丧失是光呼吸表型的原因(图13)。另外,在Plgg1自身启动子的控制下表达Plgg1,拯救其光呼吸表型(图13)。然而,与bass6-1突变体相比,将Plgg1的表达质粒转化到bass6-1品系中显示生长速率没有显著变化(图13)。这可能是由于PLGG1的过多表达可能对植物生长产生负面影响,并且与野生型相比内源性Plgg1基因的表达已经增加(Yang等,同上;图13)。有趣的是,与空载体相比,在Bass6的天然启动子控制下的Bass6表达略微提高了plgg1-1品系的生长速率,但并未完全拯救回到野生型水平。(图13)。

[0150] 实施例7:通过合成旁路途径增强乙醇酸通量以增加植物生长和产量

[0151] 植物材料

[0152] 使用根癌农杆菌介导的转化,使用标准方法转化烟草(*Nicotiana tabacum* c.v. “Petite Havana”),其中如表5所描述和列出地组装18种二元质粒。该表中使用以下缩写:(TSR)糖脂半醛还原酶、(Spm)玉米抑制增变转座子启动子、(RbcS)核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶小亚基启动子和信号肽、(Ocs)土壤杆菌酸合酶、(GdD)大肠杆菌乙醇酸脱氢酶亚基D、(Act2)肌动蛋白2启动子和终止子、(35s)花椰菜花叶病毒35s启动子和终止子、(Pgm)磷酸葡萄糖突变酶信号肽、(GdE)大肠杆菌乙醇酸脱氢酶亚基E、(GdF)大肠杆菌乙醇酸脱氢酶F亚基、(Gcl)乙醛酸羧化酶、(GO)乙醇酸氧化酶、(MS)苹果酸合酶、(Cat)过氧化氢酶、(Nos)土壤杆菌Nopine合酶启动子和终止子、(2x35S)双35s启动子、(Ubi)泛素启动子。

[0153] 如先前报道,旁路途径1基因源自大肠杆菌和旁路途径2基因源自植物和大肠杆菌源(Kebeish的人,Nat.Biotechnol.(2007) 25:593-99;Maier等人,Front.Plant Sci.,(2012))。我们开发了一条不同的途径,即旁路途径3,利用来自莱茵衣藻的乙醇酸脱氢酶(SEQ ID NO:44)基因和来自西洋南瓜的苹果酸合酶(SEQ ID NO:42)基因。与这些基因一起,我们开发了一种RNAi组件,该组件靶向拟南芥中的质体乙醇酸/甘油酸转运蛋白PLGG1,该组件使用来自Sol基因组网络(solgenomics.net)的300bp外显子序列(SEQ ID NO:46)设计。所有二元质粒均包含BASTA抗性(bar)基因作为植物转化的选择标记物。产生至少10个独立的T₀转化体以产生T₁后代。通过数字液滴PCR分析或qRT-PCR分析(iDNA Genetics, Norwich UK)在T₁上确定T-DNA拷贝数。从这些结果中,至少选择了5个独立的转化事件以自我产生T₂后代。再次进行拷贝数分析,以验证每个转化事件的单插入纯合品系。

[0154] 表5.合成乙醇酸利用途径

[0155] 旁路1

[0156]

质粒	插入基因	启动子	信号肽	终止子
EC27180	TSR	Spm	RbcS	Ocs
	GdD	RbcS	Pgm	Mas
	GdE	Act2	RbcS	Act2
	GdF	35s	Pgm	Act2
	Gcl	2x35s	Pgm	35s
EC27181	Gcl	Spm	RbcS	Ocs
	TSR	RbcS	Pgm	Mas
	GdD	Act2	RbcS	Act2
	GdE	35s	Pgm	Act2
	GdF	2x35s	Pgm	35s
EC27182	GdF	Spm	RbcS	Ocs
	Gcl	RbcS	Pgm	Mas
	TSR	Act2	RbcS	Act2
	GdD	35s	Pgm	Act2
	GdE	2x35s	Pgm	35s
EC27183	GdE	Spm	RbcS	Ocs
	GdF	RbcS	Pgm	Mas
	Gcl	Act2	RbcS	Act2
	TSR	35s	Pgm	Act2

[0157]

	GdD	2x35s	Pgm	35s
EC27184	GdD	Spm	RbcS	Ocs
	GdE	RbcS	Pgm	Mas
	GdF	Act2	RbcS	Act2
	Gcl	35s	Pgm	Act2
	TSR	2x35s	Pgm	35s
EC27186	TSR	Spm	RbcS	Ocs
	GdD	RbcS	Pgm	Mas
	GdE	Act2	RbcS	Act2
	GdF	35s	Pgm	Act2
	Gcl	2x35s	Pgm	35s
	PLGG1 RNAi	Ubi		
EC27187	Gcl	Spm	RbcS	Ocs
	TSR	RbcS	Pgm	Mas
	GdD	Act2	RbcS	Act2
	GdE	35s	Pgm	Act2
	GdF	2x35s	Pgm	35s
	PLGG1 RNAi	Ubi		
EC27188	GdF	Spm	RbcS	Ocs
	Gcl	RbcS	Pgm	Mas
	TSR	Act2	RbcS	Act2
	GdD	35s	Pgm	Act2
	GdE	2x35s	Pgm	35s
	PLGG1 RNAi	Ubi		
EC27189	GdE	Spm	RbcS	Ocs
	GdF	RbcS	Pgm	Mas
	Gcl	Act2	RbcS	Act2
	TSR	35s	Pgm	Act2
	GdD	2x35s	Pgm	35s
	PLGG1 RNAi	Ubi		
EC27194	GdD	Spm	RbcS	Ocs
	GdE	RbcS	Pgm	Mas
	GdF	Act2	RbcS	Act2
	Gcl	35s	Pgm	Act2
	TSR	2x35s	Pgm	35s
	PLGG1 RNAi	Ubi		
旁路 2				
质粒	插入基因	启动子	信号肽	终止子
EC27171	GO	Nos	pgm	Nos
	MS	Spm	RbcS	Ocs
	CAT	2x35s	pgm	35s
EC27172	CAT	Nos	pgm	Nos
	GO	Spm	RbcS	Ocs
	CmMS	2x35s	pgm	35s
EC27173	CmMS	Nos	pgm	Nos

[0158]

	CAT	Spm	RbcS	Ocs
	GO	2x35s	pgm	35s
EC27174	GO	Nos	pgm	Nos
	CmMS	Spm	RbcS	Ocs
	CAT	2x35s	pgm	35s
	PLGG1 RNAi			
EC27175	CAT	Nos	pgm	Nos
	GO	Spm	RbcS	Ocs
	CmMS	2x35s	pgm	35s
	PLGG1 RNAi			
EC27176	CmMS	Nos	pgm	Nos
	CAT	Spm	RbcS	Ocs
	GO	2x35s	pgm	35s
	PLGG1 RNAi	Ubi		
旁路 3				
质粒	插入基因	启动子	信号肽	终止子
EC27200	CrGDH	Act2	RbcS	Act2
	CmMS	Spm	RbcS	Ocs
EC27201	CrGDH	Act2	RbcS	Act2
	CmMS	Spm	RbcS	Ocs
	PLGG1 RNAi	Ubi		

[0159] 叶绿素荧光测量

[0160] 在环境空气条件下,在受控环境室(环境生长室,Chagrin Falls,Ohio,USA)的含有必需维生素的Murashige和Skoog (MS) 平板上使烟草种子发芽,受控环境室为14小时白天(25℃)/10小时夜晚(22℃),光强度为 $500\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。发芽后8天,将幼苗平板转移到受控环境生长室内的定制组装的低CO₂室中。将光照水平增加至 $1200\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 持续24小时,并且CO₂浓度保持在35μbar以下。使用CF Imager Technologica(www.technologica.co.uk)在每个平板上测定Fv'/Fm'。最大闪光强度为 $6800\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$,持续800毫秒。通过检测定义每个位置的fluorimager软件程序中的菌落,获得每个单独植物的图像值,如前所述(South等人,Plant Cell (2017) 29:808-823;Badger等人,Funct.Plant Biol. (2009) 36:867-73;Schmidt和Delaney,Mol.Genet.Genomics (2010) 283:233-41)。

[0161] 基因表达和蛋白质检测

[0162] 植物在下述温室或田间条件下生长。从每个品系的三株植物中收获五片叶盘(2.9cm^2 , ~100mg)。使用NucleoSpin RNA/蛋白质试剂盒(Macherey-Nagel GmbH&Co.KG,Düren,德国)从相同的叶子样品中提取RNA和蛋白质。使用Quantinova逆转录酶试剂盒(QIAGEN,美国)从提取的RNA产生cDNA。所有样品至少使用三次生物学重复,每个生物学重复包括三次技术重复。使用Bio-Rad CFX连接实时PCR系统(Bio-Rad Laboratories,美国)分析基因表达。使用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 方法,使用针对转基因转录物的引物,并使用L25基因作为标准对照基因(Brooks和Farquhar,Planta (1985) 165:397-406)确定转录物的相对变化。使用SSO高级SYBR预混液(green master mix)(Bio-Rad)扩增cDNA,表6中描述了引物序列。

[0163] 表6:用于基因表达分析的引物

引物名称	SEQ ID NO:	序列
L25 RT F	SEQ ID NO: 22	CCCCTCACCACAGAGTCTGC
L25 RT R	SEQ ID NO: 23	AAGGGTGTGTGTTGTCCTCAATCTT
PLGG1 Nt RT-1F	SEQ ID NO: 24	CTCAAATAAAGTTGAAATCCTTACAAAC
PLGG1 Nt RT-2R	SEQ ID NO: 25	TCTTGGTAGGGATGAATTGGAC
RT-MS-001F	SEQ ID NO: 26	GGGAATCTGAGTGGACATGTG
RT-MS-002R	SEQ ID NO: 27	CCAGAATTGAGTGC GTTGATG
RT-GO-001F	SEQ ID NO: 28	ACAGAAACGCTTTTGCAAGG
RT-GO-002R	SEQ ID NO: 29	GGTGAGCCATCTTTTGCATG
[0164] RT-CAT-001F	SEQ ID NO: 30	GCGAGAAAATCACCCACTTTG
RT-CAT-002R	SEQ ID NO: 31	TGGCTGGAAATAACCGTGAG
RT-TSR-001F	SEQ ID NO: 32	TGAATTACTGTCGCTGGGC
RT-TSR-002R	SEQ ID NO: 33	GTACAACCATTTTCACCGAACAG
RT-GCL-001F	SEQ ID NO: 34	ATCAATCCGTTCTACTCAGCG
RT-GCL-002R	SEQ ID NO: 35	GACATACGCCGATATTCCCTG
RT-GdD-001F	SEQ ID NO: 36	GGAGGTAGCATCTTGTACGAAG
RT-GdD-002R	SEQ ID NO: 37	CGGTATGCAGGATCTCAAGTC
RT-GdE-001F	SEQ ID NO: 38	CGAGTGTGATTACAGCCAGG
RT-GdE-002R	SEQ ID NO: 39	TGACAACGAACATCCAGCG
RT-GdF-001F	SEQ ID NO: 40	CTGTGTTCACTGCGGATTTTG
RT-GdF-002R	SEQ ID NO: 41	CTCCTGTGTTTTAAGCGTGAC

[0165] 使用上述Nucleospin蛋白/RNA试剂盒或从在液氮中研磨的冷冻叶材料中提取来自旁路3的总蛋白,并重悬于添加了植物蛋白酶抑制剂混合物(Sigma-Aldrich)的裂解缓冲液(50mM Hepes pH 7.6,300mM蔗糖,2mM MgCl₂)中。使用蛋白质定量测定法(Macherey-Nagel GmbH&Co.KG,Düren,德国)定量蛋白质。每个泳道加载3μg蛋白质,并通过SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)分离。使用Bio-Rad半干转移系统将PAGE凝胶转移至PVDF膜(Immobilon-P,Millipore,美国)。在6%牛奶TBS-T溶液中封闭后,将膜与针对苹果酸合酶(MS)和PLGG1(Agrisera,Vännäs, Sweden)和乙醇酸脱氢酶(GDH)(Genscript,美国)产生的定制抗体一起温育。作为蛋白质上样对照,使用针对核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RbcL)大亚基产生的商业抗体(Agrisera,Vännäs,瑞典)。在随后用抗兔二抗(Bio-Rad,美国)洗涤和温育后,使用ImageQuant LAS4010扫描仪(GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh,美国)检测化学发光。

[0166] 生长分析(温室)

[0167] 为了确定三个到达光呼吸的旁路是否会导致生长能力和生长速率增加,确定茎高和干重生物物质。将单插入体T₂种子在LC1 sunshine mix(Sun Gro 202Horticulture, Agawam,MA,美国)上发芽。发芽10天后,将幼苗转移到4L(400C,Hummert International, Earth City,MO,美国)盆中,盆中有补充了缓释肥料的LC1阳光混合物(sunshine mix)(Osmocote Plus 15/9/12,The Scotts Company LLC,Marysville,OH,USA)。在温室内随机分配盆,并在每次浇水前改变位置。使用量子传感器(LI-190R,LI-COR, Lincoln,Nebraska,美国)测量温室内的光强度。使用组合的温度和湿度传感器(HMP60-L,Vaisala Oyj, Helsinki,Finland)和红外气体分析仪(SBA-5,PPsystems,Amesbury,MA,美国)测量空气温度、相对湿度和[CO₂]。使用数据记录器(CR1000,Campbell Scientific Inc,Logan,UT,美

国)记录所有气候数据。使用的温室生长条件类似于先前在文献中报道的那些(Kromdijk等人,同上)。在测定茎高度后7周,收获地上生物质并干燥2周并测定每个部分的干重。

[0168] 2016年田间实验

[0169] 作为概念验证实验,2016年在伊利诺伊州中部在田间条件下评估了每种光呼吸旁路设计的效果。旁路3的五个独立转化事件和旁路1的四个事件和旁路2的仅两个独立转化(由于与WT相比性能差)以及两个野生型(WT)和两个空载体(EV)对照被种植在随机地块设计中。在2016年5月14日,将纯合的单插入体T₂种子在含有土壤混合物(Sun Gro 202 Horticulture, Agawam, MA, 美国)的盆中发芽并生长7天,然后如前所述转移到浮动托盘(Kromdijk等人, Science (2016) 354:857–61)。按照描述的准备田地(Kromdijk等人, 同上)之后,于2016年6月6日将植物移植到伊利诺伊大学能源农场大学野外站(40.11°N, 88.21 261°W, Urbana, IL, 美国)。每个地块为6x 6, 间距为30cm。每地块内部的16株植物是被WT边界包围的指定转基因植物品系。WT植物的另外两行边界包围了实验。根据需要从放在样地内的六个水塔中浇水。如上所述,测量了2016年田间季节的天气数据,包括光照强度、气温和降水量(数据未显示)。

[0170] 在移植到田间后的14至20天后,对最嫩的完全展开的叶片进行了光合作用的表观量子效率(Φ_a)的测量,表观量子效率包括在环境400 μ bar和低100 μ bar CO₂浓度下的光合作用的光饱和水平。根据指定[CO₂]处的光照水平,通过同化测量确定 Φ_a 。使用具有2cm²荧光测量比色杯的LI-COR 6400XT,并根据手册(LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, 美国)中的说明对垫片密封进行校正来进行气体交换测量。在1200、380、120、65、40、30、25、18和10 μ mol $\cdot$ m⁻² $\cdot$ s⁻¹的光强度下进行CO₂同化的测量,在每个光照水平下在至少120秒后记录同化。根据低照度下同化的初始响应的斜率计算 Φ_a 。由1200 μ mol $\cdot$ m⁻² $\cdot$ s⁻¹测量结果确定在指定的[CO₂]下的同化的饱和水平(A_{sat})。在种植后7周,确定每块样地8株植物的茎高、叶和茎生物质。在评估茎高后,收获地上生物质并将其分为叶和茎部分。在进行生物质测量之前,将植物材料干燥至少2周。

[0171] 2017年田间实验

[0172] 为了更准确地评估旁路3对农业条件下植物生产力的影响,在2017年田间季节使用了重复的随机地块设计。该田间样地由五个重复地块组成,每个地块具有七个随机化的6 $\times$ 6样地。中央16株植物是由WT边界包围的测试的转基因品系或WT。整个35个样地被另外几排WT作为边界包围。将来自相同收获物的单插入纯合品系播种在LC1阳光混合物上并发芽7天。七天后,如上所述将幼苗移植到浮动托盘上。移植到漂浮托盘后14天,植物于2017年6月21日被移植到伊利诺伊大学能源农场大学野外站。根据需要使用平行滴灌(滴灌管线)提供浇水。记录了2017年田间季节的天气数据,包括光照强度、气温和降水量。用于确定 Φ_a 的光合作用测量于2017年7月2日至5日进行,同时在最嫩的完全展开的叶片上同时收获光合作用色素。

[0173] 如前所述进行 Φ_a (Kromdijk, 同上)。简要地,使用如上所述的具有2cm²荧光测量比色皿的LI-COR 6400XT进行气体交换测量。黎明前开始测量对光的CO₂同化响应,并在0、10、18、25、30、40、65、120、380、1200和2000 μ mol mol⁻¹的光强度下进行。从7月14日黎明开始进行光合作用的昼夜测量,每两小时测量每个地块的两株植物一次。在测量之前,使用LI-COR 6400上的PAR传感器和内置温度传感器根据入射光水平确定光水平和温度。CO₂浓度保

持在400ppm。昼夜测量一直持续到黄昏之后。发芽后49天,从所有五个重复的地块中收获每个样中的八株植物。将地上的生物质分为叶和茎部分,并干燥2周,然后再进行生物质测量。为了进行淀粉分析,将7月14日收集的10mg叶片材料在液氮中冷冻,并在-80℃下储存直至加工。使用Enzychrom淀粉测定试剂盒(生物测定系统, Hayward, CA, 美国)测定淀粉。比色法测量是在Biotek synergy HT读板仪(Biotek Winooski, VT, 美国)上进行的。

[0174] 气体交换

[0175] 为了确定来自CO₂剂量响应的净光合作用同化速率,将来自七周龄烟草植物的基部的第五片叶片夹在LI-COR 6800红外气体分析仪的荧光比色皿中(Li-Cor Biosciences, 美国内布拉斯加州林肯市),叶温控制在25℃,光照强度设定在1500μmol m⁻²s⁻¹。使叶子在400μmol mol⁻¹下适应以达到稳态。将响应曲线的CO₂浓度设定为400、200、100、50、30、400、600、800、1000、1500、2000μmolmol⁻¹,并在同化达到稳态时进行测量。为了确定最大羧化速率(V_{cmax})、最大电子传输速率(J_{max})和线粒体呼吸速率,使用了具有温度校正功能的叶片光合作用模型,并假设来自收集的CO₂响应曲线的叶肉导度(mesophyll conductance)无限。使用公共交点法测量Γ*和R_d,使用LI-COR6800(LI-COR Biosciences)和荧光室进行气体交换。使用公共交点法通过在各种次饱和辐照度下测量光合作用的CO₂响应来测量Γ*。使用斜率-截距回归法确定公共交点,以产生更准确和一致的Ci*和R_d值(Walker等人, Plant Cell Environ. (2016) 39:1198-1203)。使植物在150μBar CO₂在250μmol m⁻²s⁻¹光照下适应,直到光合作用稳定,并在250、165、120、80和50μmol m⁻²s⁻¹的辐照度下在150、120、90、70、50和30 μBar CO₂下进行测量。如先前报道(Walker等人,同上),将x-交点转换为Γ*。

[0176] 统计分析

[0177] 所有统计分析均使用Origin pro 2016(版本9.3.226, Origin lab corporation Northampton, MA, 美国)进行。对于Fv'/Fm'测量,每个平板包含最少10个幼苗,数据表示平均值。通过单因素方差分析(ANOVA)评估显著性。通过单因素ANOVA分析基因表达的相对变化,其中温室或田间生长样品中每个生物学重复有三个技术重复。通过具有最少8个生物学重复的单因素ANOVA分析温室生物质和茎高度实验。通过具有8个生物学重复的单因素ANOVA分析2016年田间季节的生物质和茎高度实验。通过双因素ANOVA(基因型x区块)分析来自2017田间季节的生物质数据,每个地块每个基因型具有8个生物学重复。通过单因素ANOVA分析温室光合作用测量结果,并且每次测量进行三次生物学重复,并且通过双因素ANOVA分析田间光合测量结构,每个样地具有两个植物重复,具有五个随机化的重复块。如图所示,进行所有ANOVA测试,P<0.05或更小。所有ANOVA分析均遵循Tukey事后检验,用于进行平均值比较。

[0178] 结果和分析

[0179] 用三种不同的光呼吸旁路设计转化烟草,从而表达多达5个基因(图14,表5)。先前在文献中报道了旁路1和旁路2。然而,新开发的旁路3是利用莱茵衣藻乙醇酸脱氢酶(SEQ ID NO:45)而不是乙醇酸氧化酶设计的,乙醇酸脱氢酶在乙醇酸转化为乙醛酸的过程中有利地不产生过氧化氢作为副产物(Abolemy等人, Plant Physiol. Biochem. (2014) 79:25-30)。

[0180] 与单基因插入物的测试不同,多基因构建体可能需要增加基因表达的协调以优化通过设计途径的通量。在没有优化光呼吸旁路效果的启动子基因组合的先验知识的情况

下,我们利用多个启动子基因组合用于报告的光呼吸旁路设计,旁路1的五次迭代、旁路2的三次迭代和旁路3的单次迭代(表5)。除了光呼吸旁路基因的表达式外,还设计了长发夹RNAi构建体(SEQ ID NO:46)并将其添加到多基因构建体文库中以降低叶绿体乙醇酸/甘油酸转运蛋白PLGG1的表达,目的是增加通过旁路通路的通量(图14,表5)。总共,设计的18个独立构建体中的17个被成功转化并检查,以在具有或不具有靶向PLGG1转运蛋白的RNAi组件的情况下测试旁路1、2和3的功能。

[0181] 可以用叶绿素荧光通过光中PSII的最大工作效率(即 F_v'/F_m')的降低来可视化光呼吸应激对光系统II造成的损害(South等人,同上;Badger等人,同上)。使用这些荧光的变化作为表观光呼吸效率的指标,在强光($1200\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)和接近零浓度的 CO_2 下生长24小时后,对每个光呼吸旁路设计进行了筛选,并与野生型(WT)和空载体(EV)对照进行了比较(图15A和15B)。总体而言,与WT和EV对照相比,用旁路1和旁路3的版本转化的植物显示出改善的表观光呼吸效率(图15B)。从该初始筛选中,从每个设计中选择表现出增强的表观光呼吸效率的品系,以在温室和田间环境中进一步表征。

[0182] 在多基因构建体设计的初始评估期间和之后,许多原型表现出差的表型,这是由于独立插入或亚最佳设计的启动子基因组合带有具有相同的有害表型的多个插入事件。

[0183] 在成功筛选后,在温室和田间试验中验证了进一步测试的每种构建体的光呼吸旁路途径的基因表达(图16A和图17A和17B)。在温室条件下评估每种构建体设计的最少三次独立转化。我们观察到所有三种旁路设计中干重生物物质的增加,表明类似于先前报道的在其他植物物种中的发现的成功的光呼吸旁路(Dalal等人,Biotechnol Biofuels (2015) 8; Kebeish等人,同上;Maier等人,同上;Nolke等人,Plant Biotechnol.J. (2014) 12:734-42; Ahmad等人Plant Biotechnol.Rep. (2016) 10:269-76)。总体而言,在温室条件下,来自新的旁路3的植物比来自旁路1和2品系的植物表现出预料不到的更大的生物物质差异,并且我们观察到当存在靶向PLGG1的RNAi组件时旁路3的进一步增强,总生物物质增加相比于WT增加多达23%,相比于旁路1和2品系分别增加13%和7%(图23)。当在田间条件下测试时,用靶向PLGG1的RNAi,旁路3再次显示,与WT对照相比,总干重生物物质增加最显著,多达27%(图18B)。

[0184] 然后,在2016年单块重复园地实验中,在农业条件下测试了来自温室试验的有希望的品系的提高的光合作用效率和植物生产力。我们假设采用旁路设计的植物由于其通过天然光呼吸途径的代谢通量减少而会表现出光合作用的量子效率(Φ_a)增加。总之,我们观察到来自所有旁路品系的植物中 Φ_a 的增加,包括含有靶向PLGG1转运蛋白的RNAi组件的那些(图19A-19C)。我们还测量了光呼吸应激下的性能(即低 $[\text{CO}_2]$)条件,并发现旁路3品系的植物具有增加的光饱和速率和光合作用的量子效率,再次表明光呼吸应激的减少,这与成功的旁路设计相关。

[0185] 联合荧光屏、温室和2016年田间季节研究表明,在总植物生长上,旁路3能够胜过WT、EV和旁路1和2,并且该设计继续用于进一步表征。使用蛋白质印迹分析验证旁路3设计以确定CrGDH和MS的存在以及使用定制产生的抗体来确定PLGG1蛋白的减少(图16B)。我们进一步表征了在温室条件下光呼吸旁路3在植物中的生理影响。我们通过对基于内部 CO_2 浓度(C_i)的光合作用速率(A)建模,确定了最大羧化速率(V_{cmax})和RuBP限制的电子传递速率(J_{max})。在有和没有PLGG1 RNAi组件的情况下,旁路3显示 V_{cmax} 和 J_{max} 的增加,表明在光呼吸

应激最高的较低[CO₂]下,光合作用更有效(图20A,20B,20D)。我们假设光呼吸旁路应该降低光合作用补偿点,或可用于光合作用的内部[CO₂]等于白天呼吸中产生的CO₂的点。实际上,与WT对照相比,我们在旁路3植物中观察到的Γ*测量值较低,这表明光呼吸旁路可以在较低[CO₂]值下提高光合作用效率,这可能是由于在引入的途径中的脱羧步骤之后所预测的叶绿体中CO₂浓度增加所致(图14)。

[0186] 为了更好地评估旁路3在农业条件下的表现如何,在2017季节期间使用了更大的重复地块设计。测试了五个随机化的重复地块,其中包括具有和不具有靶向PLGG1的RNAi组件的三个独立的转化的旁路品系。在2017年的田间季节期间,我们评估了叶、茎和总干重生物质、日中淀粉含量、光合作用的表观量子效率(Φ_a)。总体而言,旁路3显示总干重生物质增加25%(叶增加22%,茎增加44%),而旁路3与PLGG1 RNAi显示总干重生物质增加41%(叶增加33%,茎增加50%)(图21A)。此外,与仅旁路3相比,旁路3设计中包含PLGG1 RNAi组件显示了叶片和总干重生物质的显著增加(图21A)。与WT对照相比,两种旁路3设计中的总日中淀粉含量分别提高了约70%和42%(图21B)。两种旁路设计中光合作用的表观量子效率增加,而仅在旁路3中显著增加(图21C)。

[0187] 在旁路3设计中,随着光合作用的量子效率的增加和补偿点的降低,我们假设整个光照期间的总净光合作用将比WT对照更高,导致观察到的生物质增加(图18B和图21A)。为了确定这一点,我们测量了CO₂的组合昼夜同化,并观察到两种旁路设计总净同化(A')和用于光合作用的电子总数(J')与WT相比显著增加(图21D和图21E)。

[0188] 总的来说,我们的合成生物学方法让我们设计、构建和测试多个光呼吸旁路设计,并比较不同的启动子基因组合。此外,这是描述在农业相关条件下光呼吸旁路的影响的第一个研究,在该条件下最终结果无法明确预测。旁路1设计是第一个且当前报道最多的设计,确实显示出植物生长和干重生物质的改善(图18B)。相比之下,当在温室和田间环境中都添加PLGG1 RNAi组件时,旁路1出人意料地比旁路3具有更低的生产力,相应位置的旁路1的改善降低(图18A和18B)。这些数据表明,当通过天然光呼吸途径的通量减少时,即当PLGG1表达被靶向沉默或不在敲除菌株中表达时,旁路1代谢途径不能有效地转化乙醇酸。旁路2显示植物生产力的改善最小,并且许多转基因品系导致生长发育迟缓和黄叶。以前已经提出过氧化氢作为副产物的产生和过氧化氢酶的非优化表达,这可能是旁路2表型的原因(Maier等人,同上)。

[0189] 包含西洋南瓜苹果酸合酶和莱茵衣藻乙醇酸脱氢酶的光呼吸旁路3,显著增加了植物生物质,并且相对于先前文献中报道的潜在旁路途径显示出令人惊讶的光合作用效率改善。此外,与单独的旁路3相比,包含RNAi组件减少了PLGG1叶绿体乙醇酸甘油酸转运蛋白的表达,导致类似于PLGG1敲除菌株的作用(图22),显著增加了收获后干重生物质(图18B)。

[0190] 虽然已经参考所示实施方式的细节描述了本发明,但是这些细节并不旨在限制所附权利要求中限定的本发明的范围。要求排他性质或特权的本发明的实施方式如下定义。

序列表

<110>	唐纳德·R·奥尔特 保罗·F·索思 伯克利·沃克	
<120>	具有提高的光呼吸效率的植物	
<130>	0198.16	
<160>	46	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	2274	
<212>	DNA	
<213>	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	
<400>	1	
	gaatctctcc ctctttcttc catttcccag aactctcaga gtttcgccac ttcttctgaa	60
	gaatctgaaa gatcacaaag tccaaagaaa aaaaatgagc gtgatcacia ctccaataga	120
	gacctgcac ctaaagtcaa cacttcgtct tctaccacga gctgtttatc gcagtcaacg	180
	gattcaagtt ttcccgecca acatcttctc gaacacttct ctgagttctc cacttcgcat	240
[0001]	cgaccaatc tctcaagggt tgttcattct actctcatcg atcctcaggc gtttatgctt	300
	gttgggtacc tgcaaaattt acactttctt ctctcatggt tttcttcaac ctactatata	360
	cacagttggc ggatcgagga atttgtggcg tagatatgca tctgataatt tctcggagat	420
	gggtttggat cctggagctg atccattcaa ggtgtgcgct atgggatctt tccttttcca	480
	ttctatgtta tgttgggttt gaatagtctt ctcaaaatgt gtcatcttta atgtcaaaat	540
	gtgattttgc actattgaag acttgtaaat tctctactt ttgaatctga ttagctaaaa	600
	atcatcctg gatcacagtt ttgctacttt gttcttcggt tgctgatgat ttcagttggt	660
	aagaatttta tgttacttcc gagaaccaac atgaatctag taagtggctt gcaggttatt	720
	gagaagcctt ctatagtga tagaatgaag aaagcaaact caattcttcc tcatgtagtg	780
	ttggcgagta caatattagc tcttatctat cctccttctt tcaattgggt tacgtcgagg	840
	ttcttcccat tggaacaagg tcaaattgat ctaagacttt gaattgtaga catgaggttt	900
	gctaaaaagc tcttctttac tctcctgtta ttttaggtac tttgtgcccg ctttaggttt	960
	tttgatgttt gcggttggt tcaattcaaa cgagaaagac tttcttgaag ctttcaaaag	1020
	acaaaaagct atcctcctcg gttatgttgg acaatatctc gtaaagcctg tcctaggttt	1080
	catctttggc ctagctgctg tttctctttt ccaactccca actccaattg gtaaaagctc	1140

	cctgtctctc atcattcaag actcttaacc tatctctcac attaaccaat ctttctcaat	1200
	ctctcaggtg ctggaatcat gttggtatca tgtgttagtg gagctcagtt gtcaaactat	1260
	gcgacattcc taactgatcc agcattggca cctcttagca tcgtcatgac atctctatca	1320
	accgctactg cggttcttgt cacaccgatg ctatcactcc tgctcattgg gaagaaacta	1380
	cccgttgatg taaaaggaat gatatccagc attcttcagg ttgtaatcgc accaatcget	1440
	gcaggattgc tactaaacaa gtgagagata tagctacaag cctacaacta gaaataacca	1500
	caagttgttt ctctaagtat aaccatTTTT atctcctttt tgtttcttct tttacaggtt	1560
	gttcccaaaa gtatcaaatg caatccgacc atttctcccg attctatcgg ttctcgacac	1620
	agcttgctgc gttggagcac cactcgcatt gaacataaac tcggtcattgt ctccatttgg	1680
	agccaccata ttgttactag taacaatgtt tcactctctca gctttcctcg ctggatactt	1740
	ccttaccggt tctgtcttta gaaacgctcc agacgctaaa gccatgcaaa gaacattgtc	1800
	ctatgaaact ggtactaact ctttatggta ttggaaaatc ttatcaagaa agtacaattt	1860
	ggtttaaaga tttgagaaga gaaatgtgtt tgtgaatata tcaggaatgc agagtagcct	1920
	tttggtctta gcgcttgcta ctaagttctt tcaagatcct cttgtgggga ttctcctgc	1980
[0002]	tatatctgta agtctcatat ccttttgaca tagcataatc ttttattgat gatgattata	2040
	gagatTTTTg ttttgTTTTg cagacggtgg taatgtcatt gatgggggtc actctcgttt	2100
	tgatctggtc taaggaaaag agtaacacat tttaacattt tgattttgtt tcaactccaca	2160
	ttttgattat acatatatat atgtactaca aataattgga aaattcttct tgtaatataa	2220
	ataattcaat acagaatttg agatttttaa tgtactaatc tccattttgt cttt	2274
	<210> 2	
	<211> 1463	
	<212> DNA	
	<213> 拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	
	<400> 2	
	gaatctctcc ctctttcttc catttcccag aactctcaga gtttcgccac ttcttctgaa	60
	gaatctgaaa gatcacaaag tccaaagaaa aaaaatgagc gtgatcaca ctccaataga	120
	gacctgcac ctaaagtcaa cacttcgtct tctaccagca gctgtttatc gcagtcaacg	180
	gattcaagtt ttcccgccca acatcttctc gaacacttct ctgagttctc cacttcgcat	240
	cgacceaatc tctcaagttg gcggatcgag gaatttgtgg cgtagatatg catctgataa	300
	tttctcggag atgggttttg atcctggagc tgatccattc aaggttattg agaagccttc	360

	tatagtggat agaatgaaga aagcaaactc aattcttcct catgtagtgt tggcgagtac	420
	aatattagct cttatctatc ctccttcttt cacttgggtt acgtcgaggt actttgtgcc	480
	cgcttttaggt tttttgatgt ttgcggttgg tatcaattca aacgagaaag actttcttga	540
	agctttcaaa agacaaaaag ctatcctcct cggttatgtt ggacaatatc tcgtaaagcc	600
	tgtcctaggt ttcactcttg gcctagctgc tgtttctctt ttccaactcc caactccaat	660
	tggtgctgga atcatgttgg tatcatgtgt tagtggagct cagttgtcaa actatgcgac	720
	attcctaact gatccagcat tggcacctct tagcatcgtc atgacatctc tatcaaccgc	780
	tactgcggtt cttgtcacac cgatgctatc actcctgctc attgggaaga aactaccgct	840
	tgatgtaaaa ggaatgatat ccagcattct tcaggttgta atcgcaccaa tcgctgcagg	900
	attgctacta aacaagttgt tcccaaaagt atcaaatgca atccgaccat ttctcccgat	960
	tctatcggtt ctcgacacag cttgctgcgt tggagcacca ctgcattga acataaactc	1020
	ggatcatgtct ccatttggag ccaccatatt gttactagta acaatgtttc atctctcagc	1080
	tttctcgtct ggatacttcc ttaccggttc tgtctttaga aacgtccag acgctaaagc	1140
	catgcaaaga acattgtcct atgaaactgg aatgcagagt agccttttgg ctctagcgct	1200
[0003]	tgctactaag ttctttcaag atcctcttgt ggggattcct cctgctatat ctacggtggt	1260
	aatgtcattg atggggttca ctctcgtttt gatctgggtc aaggaaaaga gtaacacatt	1320
	ttaacatttt gatTTTgttt cactccacat ttTgattata catatatata Tgtactacaa	1380
	ataattggaa aattcttctt gtaatataaa taattcaata cagaatttga gatttttaat	1440
	gtactaatct ccattttgtc ttt	1463

<210> 3
 <211> 409
 <212> PRT
 <213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 3

Met Ser Val Ile Thr Thr Pro Ile Glu Thr Leu His Leu Lys Ser Thr
1 5 10 15

Leu Arg Leu Leu Pro Arg Ala Val Tyr Arg Ser Gln Arg Ile Gln Val
20 25 30

Phe Pro Pro Asn Ile Phe Ser Asn Thr Ser Leu Ser Ser Pro Leu Arg
35 40 45

Ile Asp Pro Ile Ser Gln Val Gly Gly Ser Arg Asn Leu Trp Arg Arg
50 55 60

Tyr Ala Ser Asp Asn Phe Ser Glu Met Gly Leu Asp Pro Gly Ala Asp
65 70 75 80

Pro Phe Lys Val Ile Glu Lys Pro Ser Ile Val Asp Arg Met Lys Lys
85 90 95

Ala Asn Ser Ile Leu Pro His Val Val Leu Ala Ser Thr Ile Leu Ala
100 105 110

Leu Ile Tyr Pro Pro Ser Phe Thr Trp Phe Thr Ser Arg Tyr Phe Val
115 120 125

Pro Ala Leu Gly Phe Leu Met Phe Ala Val Gly Ile Asn Ser Asn Glu
130 135 140

Lys Asp Phe Leu Glu Ala Phe Lys Arg Pro Lys Ala Ile Leu Leu Gly
145 150 155 160

[0004]

Tyr Val Gly Gln Tyr Leu Val Lys Pro Val Leu Gly Phe Ile Phe Gly
165 170 175

Leu Ala Ala Val Ser Leu Phe Gln Leu Pro Thr Pro Ile Gly Ala Gly
180 185 190

Ile Met Leu Val Ser Cys Val Ser Gly Ala Gln Leu Ser Asn Tyr Ala
195 200 205

Thr Phe Leu Thr Asp Pro Ala Leu Ala Pro Leu Ser Ile Val Met Thr
210 215 220

Ser Leu Ser Thr Ala Thr Ala Val Leu Val Thr Pro Met Leu Ser Leu
225 230 235 240

Leu Leu Ile Gly Lys Lys Leu Pro Val Asp Val Lys Gly Met Ile Ser
245 250 255

Ser Ile Leu Gln Val Val Ile Ala Pro Ile Ala Ala Gly Leu Leu Leu
260 265 270

Asn Lys Leu Phe Pro Lys Val Ser Asn Ala Ile Arg Pro Phe Leu Pro
275 280 285

Ile Leu Ser Val Leu Asp Thr Ala Cys Cys Val Gly Ala Pro Leu Ala
290 295 300

Leu Asn Ile Asn Ser Val Met Ser Pro Phe Gly Ala Thr Ile Leu Leu
305 310 315 320

Leu Val Thr Met Phe His Leu Ser Ala Phe Leu Ala Gly Tyr Phe Leu
325 330 335

Thr Gly Ser Val Phe Arg Asn Ala Pro Asp Ala Lys Ala Met Gln Arg
340 345 350

Thr Leu Ser Tyr Glu Thr Gly Met Gln Ser Ser Leu Leu Ala Leu Ala
355 360 365

Leu Ala Thr Lys Phe Phe Gln Asp Pro Leu Val Gly Ile Pro Pro Ala
370 375 380

[0005]

Ile Ser Thr Val Val Met Ser Leu Met Gly Phe Thr Leu Val Leu Ile
385 390 395 400

Trp Ser Lys Glu Lys Ser Asn Thr Phe
405

<210> 4
<211> 2459
<212> DNA
<213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

<400> 4
gtgccgtctc ttagaatcac atccacgtcg tcgtctccat acccatggct actcttttag 60
ccactcttat cttctctcct ttagcttctt ctccagcaag gaaccgtctt tcttgetcta 120
agatccgttt cggttccaaa aatgggaaaa ttctcaattc tgatggtgcc cagaagtga 180
atctctcaaa attccgtaaa cccgatggcc aaagatttct acaaatgggt tcttctaaag 240
agatgaactt tgagagaaaa ctctcagtcc aagctatgga tgggtgcagga acaggaaaca 300
catcaacgat ctctcgtaac gtaagcttca cgatgttggt tatttaccat tttattgtaa 360
cagcttttta aagttttgaa ttttcgttc aggtaattgc gataagtcac ttgttggtat 420

	cacttgggat cattcttgct gcagactatt tcttgaagca ggcgtttgta gcagcgtcta	480
	ttaagttccc aagtgccttg tttgggatgt tctgtatctt ctctgttctt atgatatttg	540
	attcggttgt tcctgctgct gcaaattggt tgatgaattt cttegagcct gcgtttctgt	600
	ttatccaaag atggcttctt ttgttctatg ttccttctct tgttgttctt cctctttctg	660
	ttagagatat tccggctgct tcagggtgca aaatctgcta cattgtaggt atgaactga	720
	tcttcacttg gttaatgata ttgtgttctc tggtagcttt tatgggtttt ttgtctaatt	780
	gctctgtttt gtttattatt taatgctgat ctgatgtcaa tgttgatttg aatgtttgtt	840
	tgtatagccg gtggatggtt ggcgtcactt tgtgtagcag ggtacacagc tattgcagtg	900
	agaaaaatgg tgaaaaccga aatgacggaa gccgagccta tggcaaaacc atcaccattt	960
	tcaacacttg agctatggag ttggagtgga atctttgttg tgcgtttgt tgggtgctctg	1020
	ttttacccta attcattggg gacaagtgca agaacttctc tccctttctt tctttcttca	1080
	actgtgctag gttacattgt aggttctggg taatattcaa aaaccttctt ttgttctcca	1140
	tctttaagcc tctctatctc gcggttatct tcagtgtctt atctttcttt cttccaggtt	1200
	gccatcttct attaagaaag ttttccatcc gataatctgc tgcgcgtat ctgcagtact	1260
[0006]	tgctgcteta gcttttgggt atgcttcagg atctggactt gatcctgttt taggtaaaagt	1320
	taccttcaat atgaaagaaa ctatagagaa accctttttt gacctaaaac agaaagtaaa	1380
	agcattttgt taactgctct ttaatggtga caggaaacta ccttaccaaa gtagcatcag	1440
	atcctggtgc tggtgacatc ttaatgggtt ttcttggtc tgcattctc tctttcgtt	1500
	tctccatgtt caaacaaga aaggtaaaac aaacaacaaa cttgttctgt tttgctttag	1560
	aaaactggta acaatcgctt tggtttgctt ctgtcttctt cagctcgtga agaggcacgc	1620
	agctgagatc ttcacatctg tgatagtctt aacggtatct tcgctctact ccaatgctct	1680
	tgttgacgtt ttagtcggtt tagaaccttc tttaacggtt tcaatcctac ctcgctgcat	1740
	cacggttgca ttggccctta gcattgtatc actctttgaa ggtatatatg tttcttcttc	1800
	ttctcaacac attaaagaac atccctaacg aatttgttgg acattttcag ggaccaattc	1860
	gtctcttaca gcagctgtag tcgttgtagc tggctctgatt ggagctaact ttgtacaagt	1920
	tgttcttgac aaactgcgtt tacgtgatcc aattgctcgg ggaattgcaa ctgcttcaag	1980
	gtgactccat tacaaaagat ctttcacatt ttgaattaaa attatgcatt aatgccatta	2040
	ggatcaaaag acatgacctt tctatttttt atggacagtg ctcatggact tggaacagca	2100
	gctttgtcgg ctaaggagcc agaggctctt cccttttgtg caatagctta tgctcttacc	2160

	ggaatcttcg gatcgttact gtgttctgtt cctgccgtcc gacagagttt gctagcggtc	2220
	gtcggctgag gattgatgat gtggcgaaac acgattgatg gtctcaaagc tggcgagtta	2280
	cttaaaatat gagagcagtt tgctttggat gtcaaataag cttgtattaa tgaaaaagat	2340
	gatggaaaat gtttatttat tttattttat atatgtaaat gttgtgagat ttgtacaaca	2400
	tacataaatt ttatatagga gtaggatgtc ccagctttcc aaaaatttgt cacaaaggt	2459
	<210> 5	
	<211> 1813	
	<212> DNA	
	<213> 拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	
	<400> 5	
	gtgccgtctc ttagaatcac atccacgtcg tegtctccat acccatggct actcttttag	60
	ccactcctat cttctctcct ttagcttctt ctccagcaag gaaccgtctt tcttgcctta	120
	agatccgttt cggttccaaa aatgggaaaa ttctcaattc tgatgggtgcc cagaagtga	180
	atctctcaaa attccgtaaa cccgatggcc aaagatttct acaaatgggt tcttctaaag	240
	agatgaactt tgagagaaaa ctctcagtc aagctatgga tgggtcagga acaggaaaca	300
[0007]	catcaacgat ctctcgtaac gtaattgcga taagtcactt gttggtatca cttgggatca	360
	ttcttgcctc agactatttc ttgaagcagg cgttttagc agcgtctatt aagttcccaa	420
	gtgctttgtt tgggatgttc tgtattttct ctgttcttat gatatttgat tcggttggtc	480
	ctgctgctgc aaatggtttg atgaatttct tcgagcctgc gtttctgttt atccaaagat	540
	ggcttccttt gttctatgtt cttctcttg ttgttcttcc tctttctgtt agagatattc	600
	cggctgcttc aggtgtcaaa atctgctaca ttgtagccgg tggatggttg gcgtcacttt	660
	gtgtagcagg gtacacagct attgcagtga gaaaaatggg gaaaaccgaa atgacggaag	720
	ccgagcctat ggcaaaacca tcaccatttt caacacttga gctatggagt tggagtggaa	780
	tctttgttgt gtcgtttgtt ggtgctctgt ttaccctaa ttcattgggg acaagtgcaa	840
	gaacttctct ccttttctt ctttcttcaa ctgtgctagg ttacattgta ggttctgggt	900
	tgccatcttc tattaagaaa gttttccatc cgataatctg ctgcgcgcta tctgcagtac	960
	ttgctgctct agcttttggg tatgcttcag gatctggact tgatcctgtt ttaggaaact	1020
	accttaccaa agtagcatca gatcctgggt ctggtgacat cttaatgggt tttcttggct	1080
	ctgtcattct ctcttctgct ttctccatgt tcaaacaaag aaagctcgtg aagaggcacg	1140
	cagctgagat cttcacatct gtgatagttt caacggtatt ctgctctac tccactgctc	1200

```

ttgttggacg tttagtcggt ttagaacctt ctttaacggt ttcaatccta cctcgctgca 1260
tcacggttgc attggccctt agcattgtat cactctttga agggaccaat tcgtctctta 1320
cagcagctgt agtcgttgtg actggctctga ttggagctaa ctttgtacaa gttgttcttg 1380
acaaactgcg tttacgtgat ccaattgctc ggggaattgc aactgcttca agtgctcatg 1440
gacttggAAC agcagctttg tcggctaagg agccagaggc tcttcccttt tgtgcaatag 1500
cttatgctct taccggaatc ttcggatcgt tactgtgttc tgttcctgcc gtccgacaga 1560
gtttgctagc ggtcgtcggc tgaggattga tgatgtggcg aaacacgatt gatggtctca 1620
aagctggcga gttacttaaa atatgagagc agtttgcttt ggatgtcaaa taagcttgta 1680
ttaatgaaaa agatgatgga aaatgtttat ttattttatt ttatatatgt aaatgttgtg 1740
agatttgtac aacatacata aattttatat aggagtagga tgtcccagct ttccaaaaat 1800
ttgtcacaaa ggt 1813

```

<210> 6
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)

[0008]

<400> 6

```

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

```

```

Pro Ala Arg Asn Arg Leu Ser Cys Ser Lys Ile Arg Phe Gly Ser Lys
          20           25          30

```

```

Asn Gly Lys Ile Leu Asn Ser Asp Gly Ala Gln Lys Leu Asn Leu Ser
          35           40          45

```

```

Lys Phe Arg Lys Pro Asp Gly Gln Arg Phe Leu Gln Met Gly Ser Ser
          50           55          60

```

```

Lys Glu Met Asn Phe Glu Arg Lys Leu Ser Val Gln Ala Met Asp Gly
65           70           75          80

```

```

Ala Gly Thr Gly Asn Thr Ser Thr Ile Ser Arg Asn Val Ile Ala Ile
          85           90          95

```

```

Ser His Leu Leu Val Ser Leu Gly Ile Ile Leu Ala Ala Asp Tyr Phe
          100          105          110

```

Leu Lys Gln Ala Phe Val Ala Ala Ser Ile Lys Phe Pro Ser Ala Leu
115 120 125

Phe Gly Met Phe Cys Ile Phe Ser Val Leu Met Ile Phe Asp Ser Val
130 135 140

Val Pro Ala Ala Ala Asn Gly Leu Met Asn Phe Phe Glu Pro Ala Phe
145 150 155 160

Leu Phe Ile Gln Arg Trp Leu Pro Leu Phe Tyr Val Pro Ser Leu Val
165 170 175

Val Leu Pro Leu Ser Val Arg Asp Ile Pro Ala Ala Ser Gly Val Lys
180 185 190

Ile Cys Tyr Ile Val Ala Gly Gly Trp Leu Ala Ser Leu Cys Val Ala
195 200 205

Gly Tyr Thr Ala Ile Ala Val Arg Lys Met Val Lys Thr Glu Met Thr
210 215 220

[0009]

Glu Ala Glu Pro Met Ala Lys Pro Ser Pro Phe Ser Thr Leu Glu Leu
225 230 235 240

Trp Ser Trp Ser Gly Ile Phe Val Val Ser Phe Val Gly Ala Leu Phe
245 250 255

Tyr Pro Asn Ser Leu Gly Thr Ser Ala Arg Thr Ser Leu Pro Phe Leu
260 265 270

Leu Ser Ser Thr Val Leu Gly Tyr Ile Val Gly Ser Gly Leu Pro Ser
275 280 285

Ser Ile Lys Lys Val Phe His Pro Ile Ile Cys Cys Ala Leu Ser Ala
290 295 300

Val Leu Ala Ala Leu Ala Phe Gly Tyr Ala Ser Gly Ser Gly Leu Asp
305 310 315 320

Pro Val Leu Gly Asn Tyr Leu Thr Lys Val Ala Ser Asp Pro Gly Ala
325 330 335

Gly Asp Ile Leu Met Gly Phe Leu Gly Ser Val Ile Leu Ser Phe Ala
340 345 350

Phe Ser Met Phe Lys Gln Arg Lys Leu Val Lys Arg His Ala Ala Glu
355 360 365

Ile Phe Thr Ser Val Ile Val Ser Thr Val Phe Ser Leu Tyr Ser Thr
370 375 380

Ala Leu Val Gly Arg Leu Val Gly Leu Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser
385 390 395 400

Ile Leu Pro Arg Cys Ile Thr Val Ala Leu Ala Leu Ser Ile Val Ser
405 410 415

Leu Phe Glu Gly Thr Asn Ser Ser Leu Thr Ala Ala Val Val Val Val
420 425 430

Thr Gly Leu Ile Gly Ala Asn Phe Val Gln Val Val Leu Asp Lys Leu
435 440 445

[0010]

Arg Leu Arg Asp Pro Ile Ala Arg Gly Ile Ala Thr Ala Ser Ser Ala
450 455 460

His Gly Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ser Ala Lys Glu Pro Glu Ala Leu
465 470 475 480

Pro Phe Cys Ala Ile Ala Tyr Ala Leu Thr Gly Ile Phe Gly Ser Leu
485 490 495

Leu Cys Ser Val Pro Ala Val Arg Gln Ser Leu Leu Ala Val Val Gly
500 505 510

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)

<220>
<223> 化学合成的

<400> 7
ctctctgccg acagtgg

[0011]	<210>	8	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>		
	<223>	化学合成的	
	<400>	8	
		cttatatgct caacacatga gcg	23
	<210>	9	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>		
	<223>	化学合成的	
	<400>	9	
		ataaccgcga gatagagagg c	21
	<210>	10	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>		
	<223>	化学合成的	
	<400>	10	
		cccatggcta ctcttttagc c	21
	<210>	11	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>		
	<223>	化学合成的	
	<400>	11	
		attttgccga tttcggaac	19
	<210>	12	
	<211>	39	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>		
	<223>	化学合成的	
	<400>	12	

	gccgatcca tggcttcgtg ctctaagatc cgtttcgg	39
	<210> 13	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 13	
	gccctcgagt cagccgacga ccgctagc	28
	<210> 14	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 14	
	gctctagaat gagcgtgatc acaactcc	28
[0012]	<210> 15	
	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 15	
	gactcgagtt aaaatgtgtt actcttttc	29
	<210> 16	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 16	
	ctactctttt agccactcct atcttc	26
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	

	<223> 化学合成的	
	<400> 17 agattcaact tctgggcacc	20
	<210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220> <223> 化学合成的	
	<400> 18 tcgcagtcaa cggattcaag	20
	<210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220> <223> 化学合成的	
	<400> 19 tctacgccac aaattcctcg	20
[0013]	<210> 20 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220> <223> 化学合成的	
	<400> 20 tgagttcaac gagtgtgctg	20
	<210> 21 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220> <223> 化学合成的	
	<400> 21 acttgtaatg taccacttcc cg	22
	<210> 22 <211> 20 <212> DNA	

	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 22	
	cccctcacca cagagtctgc	20
	<210> 23	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 23	
	aagggtgttg ttgtcctcaa tctt	24
	<210> 24	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
[0014]	<223> 化学合成的	
	<400> 24	
	ctcaaataaa gttgaaatcc ttacaaac	28
	<210> 25	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 25	
	tcttgtagg gatgaattgg ac	22
	<210> 26	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 26	
	gggaatctga gtggacatgt g	21

	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 27	
	ccagaattga gtgcgttgat g	21
	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 28	
	acagaaacgc ttttgcaagg	20
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0015]	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 29	
	ggtgagccat cttttgcatg	20
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 30	
	gcgagaaaat caccacttt g	21
	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220>	
	<223> 化学合成的	
	<400> 31	

	tggtctggaaa taaccgtgag	20
	<210> 32 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE) <220> <223> 化学合成的 <400> 32 tgaattactg tcgctgggc	19
	<210> 33 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE) <220> <223> 化学合成的 <400> 33 gtacaacccat tttcaccgaa cag	23
[0016]	<210> 34 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE) <220> <223> 化学合成的 <400> 34 atcaatccgt tctactcagc g	21
	<210> 35 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE) <220> <223> 化学合成的 <400> 35 gacatacgcc gatattccct g	21
	<210> 36 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE) <220>	

	<223> 化学合成的	
	<400> 36 ggaggtacga tcttgtagca ag	22
	<210> 37 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220> <223> 化学合成的	
	<400> 37 cggtagtcag gatctcaagt c	21
	<210> 38 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220> <223> 化学合成的	
[0017]	<400> 38 cgagtgtgat tacagccagg	20
	<210> 39 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220> <223> 化学合成的	
	<400> 39 tgacaacgaa catccagcg	19
	<210> 40 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
	<220> <223> 化学合成的	
	<400> 40 ctgtgttcac tgcgatttt g	21
	<210> 41 <211> 21 <212> DNA	

<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
<220>	
<223> 化学合成的	
<400> 41	
ctcctgtgtt ttaagcgtga c	21
<210> 42	
<211> 1828	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)	
<220>	
<223> 化学合成的	
<400> 42	
atggcttcct ctatgctctc ttccgctact atggttgcct ctccggtca ggccactatg	60
gtcgtctctt tcaacggact taagtcctcc gctgccttcc cagccacccg caaggctaac	120
ggaggtggat cgctgggaat gtattctgaa tcggcagtaa ggaagaaaag tagccgaggc	180
tacgatgttc cagagggagt ggacattcgg ggacgttatg atgaagaatt tgccaggatt	240
ctcaacaagg aagccttgct gtttgtggct gatttacaga ggactttcag aaaccacata	300
[0018] aggtattcga tggaatgccg cagagaagcc aaaaggaggt acaatgaagg ggcggtgccg	360
gggtttgatc cggcgaccaa gtatataagg gaatctgagt ggacatgtgc atcagtcccc	420
ccggcagttg ctgatcggag agtggagatc accggacctg tggagcggaa gatgatcatc	480
aacgcactca attctggagc taaagttttc atggcggact ttgaagatgc actatcacca	540
aactgggaga atttgatgag ggggcaaatt aatctgaagg atgcagttga tgggactata	600
agcttccatg acaaagctag aaacaagggt tataaactga acgatcagac agccaagctc	660
tttgttcgcc ctcgaggttg gcacttcgct gaggtcata tcttcatcga cggcgagcct	720
gccaccggt gtcttgtgga cttcgggctc tacttttttc acaacctatgc caatttccgg	780
cgctctcaag gtcaaggttc tggccctttc ttttaccttc caaaatgga gcaactccagg	840
gaagcaaaaa tatggaacag tgtatttgag agagcagaga agatggcagg gatagagagg	900
ggcagcatca gggccactgt gctgattgaa acacttcag cagtgtttca aatggatgaa	960
atactctatg agctgaggga tcattctgtg ggattgaact gtggtagatg ggattacata	1020
ttcagctatg tcaagacctt ccaggtcac ctagatcgcc tgttaccga ccgagtccaa	1080
gtcggtatgg cacaacattt catgaggagt tattctgac tccttatcag gacttgtcat	1140
acggttgtgt gccacgtggg aggcattggt gctcaaattc caattaggga tgaccgaag	1200

gcaaatgaga tggcacttga gctagtgagg aaggacaaat tgagagaggc aaaggcagga 1260
 catgatggaa catgggcagc acatccagga ttaatcccag catgtatgga agtgtttacc 1320
 aacagcatgg gaaatgcccc caatcagatc cgatctgcaa gacgcgatga tgctgcaaac 1380
 ctaactgagg atgacctctt gcagcaaccg aggggtgttc gtacattgga agggctccgg 1440
 ttgaacaccc gagtcggaat tcagtaccta gcagcatggc taaccgggac aggctctgtg 1500
 cctctctaca accttatgga agatgcagcc acagctgaaa tcagcagggt tcaaaactgg 1560
 caatggctga agtatggagt ggaattggat ggagatgggc ttggagtgag agtgaacaag 1620
 gaactgttcg caagagtggg ggaagaagaa atggaaagga ttgaaagaga agtggggaag 1680
 gagaaattca ggaagggaat gtacaaagag gcttgcaaga tgttcacaag gcaatgcaca 1740
 gcgccaacct tggatgattt tctgaccttg gatgcgtaca accacatagt catacatcat 1800
 cccagggagc tgtccaggct ctgagctt 1828

<210> 43
 <211> 607
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)

[0019]

<220>
 <223> 化学合成的

<400> 43

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

Gln Ala Thr Met Val Ala Pro Phe Asn Gly Leu Lys Ser Ser Ala Ala
20 25 30

Phe Pro Ala Thr Arg Lys Ala Asn Gly Gly Gly Ser Leu Gly Met Tyr
35 40 45

Ser Glu Ser Ala Val Arg Lys Lys Ser Ser Arg Gly Tyr Asp Val Pro
50 55 60

Glu Gly Val Asp Ile Arg Gly Arg Tyr Asp Glu Glu Phe Ala Arg Ile
65 70 75 80

Leu Asn Lys Glu Ala Leu Leu Phe Val Ala Asp Leu Gln Arg Thr Phe
85 90 95

Arg Asn His Ile Arg Tyr Ser Met Glu Cys Arg Arg Glu Ala Lys Arg
100 105 110

Arg Tyr Asn Glu Gly Ala Val Pro Gly Phe Asp Pro Ala Thr Lys Tyr
115 120 125

Ile Arg Glu Ser Glu Trp Thr Cys Ala Ser Val Pro Pro Ala Val Ala
130 135 140

Asp Arg Arg Val Glu Ile Thr Gly Pro Val Glu Arg Lys Met Ile Ile
145 150 155 160

Asn Ala Leu Asn Ser Gly Ala Lys Val Phe Met Ala Asp Phe Glu Asp
165 170 175

Ala Leu Ser Pro Asn Trp Glu Asn Leu Met Arg Gly Gln Ile Asn Leu
180 185 190

Lys Asp Ala Val Asp Gly Thr Ile Ser Phe His Asp Lys Ala Arg Asn
195 200 205

[0020]

Lys Val Tyr Lys Leu Asn Asp Gln Thr Ala Lys Leu Phe Val Arg Pro
210 215 220

Arg Gly Trp His Phe Ala Glu Ala His Ile Phe Ile Asp Gly Glu Pro
225 230 235 240

Ala Thr Gly Cys Leu Val Asp Phe Gly Leu Tyr Phe Phe His Asn His
245 250 255

Ala Asn Phe Arg Arg Ser Gln Gly Gln Gly Ser Gly Pro Phe Phe Tyr
260 265 270

Leu Pro Lys Met Glu His Ser Arg Glu Ala Lys Ile Trp Asn Ser Val
275 280 285

Phe Glu Arg Ala Glu Lys Met Ala Gly Ile Glu Arg Gly Ser Ile Arg
290 295 300

Ala Thr Val Leu Ile Glu Thr Leu Pro Ala Val Phe Gln Met Asp Glu
305 310 315 320

	Ile	Leu	Tyr	Glu	Leu	Arg	Asp	His	Ser	Val	Gly	Leu	Asn	Cys	Gly	Arg	
					325					330					335		
	Trp	Asp	Tyr	Ile	Phe	Ser	Tyr	Val	Lys	Thr	Phe	Gln	Ala	His	Leu	Asp	
				340					345					350			
	Arg	Leu	Leu	Pro	Asp	Arg	Val	Gln	Val	Gly	Met	Ala	Gln	His	Phe	Met	
			355					360					365				
	Arg	Ser	Tyr	Ser	Asp	Leu	Leu	Ile	Arg	Thr	Cys	His	Thr	Val	Val	Cys	
		370					375					380					
	His	Val	Gly	Gly	Met	Ala	Ala	Gln	Ile	Pro	Ile	Arg	Asp	Asp	Pro	Lys	
	385					390					395					400	
	Ala	Asn	Glu	Met	Ala	Leu	Glu	Leu	Val	Arg	Lys	Asp	Lys	Leu	Arg	Glu	
					405					410					415		
	Ala	Lys	Ala	Gly	His	Asp	Gly	Thr	Trp	Ala	Ala	His	Pro	Gly	Leu	Ile	
				420					425					430			
[0021]	Pro	Ala	Cys	Met	Glu	Val	Phe	Thr	Asn	Ser	Met	Gly	Asn	Ala	Pro	Asn	
			435					440					445				
	Gln	Ile	Arg	Ser	Ala	Arg	Arg	Asp	Asp	Ala	Ala	Asn	Leu	Thr	Glu	Asp	
		450					455					460					
	Asp	Leu	Leu	Gln	Gln	Pro	Arg	Gly	Val	Arg	Thr	Leu	Glu	Gly	Leu	Arg	
	465					470					475					480	
	Leu	Asn	Thr	Arg	Val	Gly	Ile	Gln	Tyr	Leu	Ala	Ala	Trp	Leu	Thr	Gly	
					485					490					495		
	Thr	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Tyr	Asn	Leu	Met	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	
				500					505					510			
	Glu	Ile	Ser	Arg	Val	Gln	Asn	Trp	Gln	Trp	Leu	Lys	Tyr	Gly	Val	Glu	
			515					520					525				
	Leu	Asp	Gly	Asp	Gly	Leu	Gly	Val	Arg	Val	Asn	Lys	Glu	Leu	Phe	Ala	
		530					535					540					
	Arg	Val	Val	Glu	Glu	Glu	Met	Glu	Arg	Ile	Glu	Arg	Glu	Val	Gly	Lys	

	545	550	555	560
	Glu Lys Phe Arg Lys Gly Met Tyr Lys Glu Ala Cys Lys Met Phe Thr	565	570	575
	Arg Gln Cys Thr Ala Pro Thr Leu Asp Asp Phe Leu Thr Leu Asp Ala	580	585	590
	Tyr Asn His Ile Val Ile His His Pro Arg Glu Leu Ser Arg Leu	595	600	605
<210>	44			
<211>	3410			
<212>	DNA			
<213>	人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)			
<220>				
<223>	化学合成的			
<400>	44			
	aatggcttcc tctatgctct cttccgctac tatggttgcc tctccggctc aggccactat			60
	ggtegctcct ttcaacggac ttaagtcctc cgtgccttc ccagccaccc gcaaggctaa			120
[0022]	cggaggtcca cgcgccagg gcaagcgctt ggctcagctc cttggagctc agctgaagca			180
	gtacgcagcg gaggtgcgtg gcatcagcac agctggtggc gcttctcgcg gtggagctcg			240
	aggacctgca tccccctagct cgctagagca gcagacgcgc caggtcgctc aggttgctgt			300
	tcagcagtcg actcagcagg cagtgaaggt cgttgtgccc gccatcaaag tagacctggt			360
	tggtgcggtc agctcggtgt ctgagagcga caaggtggag ccgggtgtgt tcaagaacgt			420
	ggatggccac cgcttcgagg acggtcgcta tgccgctttt gttgaggaga ttacaaagtt			480
	tatccccaag gagegccagt actcggaccc cgtgcgcaca ttcgcgtatg gcacggatgc			540
	ctcctttctac cgcttaacc cgaagctggt agtgaaggtg cacaacgagg acgaggtccg			600
	ccgcatcatg cccatcgagg agcggctgca ggtccctatc accttcgcg cggccggcac			660
	gtcgtgtctt gggcaggcaa ttaccgactc ggtgctcatt aagctgagcc acacgggcaa			720
	gaacttccgc aactttaccg tgcacggcga cggtagcgtg atcacgggtg agccgggctt			780
	cattggcggc gaggtgaacc gcatcctggc ggcacaccag aagaagaaca agctgcccac			840
	ccagtacaag atcggacccg accctcctc catcgacagc tgcattgatc gcggcatcgt			900
	gtccaacaac agcagcggca tgtgtgcgg cgtgagccag aacacctacc acacgtgaa			960
	ggacatgcgg gtggtgttcg tagacggaac ggtgctggac acggccgacc ccaactcgtg			1020

[0023]	caccgccttc atgaagagcc accgctcgct ggtggatggc gtcgtgagcc tggcgcgccg	1080
	cgtgcaggcc gacaaggagc tgacggcgct catccgccgc aagttcgcca tcaagtgcac	1140
	caccggtac tccctgaacg cgctgggtga cttcccggtg gacaacccca ttgagatcat	1200
	caagcacctc atcatcgga gcgagggcac gctgggcttc gtcagccgcg ccacctacaa	1260
	caccgtgccc gagtggccca acaaggcctc ggccttcata gtgttcccgg acgtgcgcgc	1320
	cgctgcacc ggcgcctcgg tgctgcgcaa cgaaacctcc gtggacgcgg tggagctgtt	1380
	tgaccgcgcc agcctgcgcg agtgcgagaa caacgaggac atgatgcgcc tgggtcccca	1440
	catcaagggc tgcgacccca tggcggcagc gctgctgata gactgccgcg gccaggacga	1500
	ggccgcactg cagagccgca ttgaggaggt ggtgcgcgtg ctgacggcgg cgggcctgcc	1560
	cttcggcgcc aaggccgcgc agcccatggc catcgacgcc tacccttcc accacgacca	1620
	gaagaacgcc aaggtctttt gggacgtgcg caggggcctg atccccattg tgggcgcggc	1680
	gcgcgagccc ggcacatcca tgctgatcga ggacgtggcc tgccccgtgg acaagctggc	1740
	cgacatgatg atcgacctga tcgacatgtt ccagcgccac ggctaccacg acgcctcctg	1800
	cttcggccac gcgctcgagg gcaaccttca tttggtattc tcgcagggt tccgcaacaa	1860
	ggaggaggtg cagcgcttca gcgacatgat ggaggagatg tgccatctgg tagccaccaa	1920
	gcactcgggc agcctcaagg gcgagcacgg cacgggccgc aacgtggcgc cgttcgtgga	1980
	gatggagtgg ggcaacaagg cgtacgagct gatgtgggag ctcaaggcgc tgttcgaccc	2040
	cagccacacc ctcaaccgga gcgtcatcct caaccgcgac caggacgcgc acatcaagtt	2100
	cctgaagccc tcgcccgcgg cctcgcccat cgtcaaccgc tgcacgagt gcggcttctg	2160
	cgagtccaac tgcccctcgc gcgacatcac gctcacgccg cgccagcgca tctccgtgta	2220
	ccgcgagatg taccgcctca agcagctggg cccgggcgcc agcaggagg agaagaagca	2280
	gctggcggcc atgagcagct cgtacgccta cgacggcgag cagacgtgcg cggcggacgg	2340
	catgtgccag gagaagtgcc ccgtcaagat caacacgggc gatctgatca agtcgatgcg	2400
	tgccgagcac atgaaggagg agaaaaccgc cagcggcatg gcagactggc tggccgcca	2460
	cttcggcgct atcaactcca acgtgccgcg ctctctcaac atcgtcaacg ccatgcatag	2520
	cgtagtgggc tcggcgctc tgtccgcat cagccgcgcg ctcaacgccg ccaccaacca	2580
	tttcgtaccg gtgtggaacc cctacatgcc caaggcgcg gcgccgctca aggtgcccgc	2640
	cccgcggcg ccggcagctg ctgaggcctc gggcatcccg cgcaaggtgg tgtacatgcc	2700

```

cagctgcgtg acgcgcatga tgggccccgc cgcctccgac accgaaaccg cggcggtgca      2760
cgagaaggtg atgagcctgt tcggcaaggc cggctacgag gtgatcatcc ccgagggcgt      2820
ggccagccag tgctgcggca tgatgttcaa cagccgcggc ttcaaggacg ccgccgccag      2880
caagggcgcg gagctggagg cggcgctgct caaggcctcg gacaatggca agatccccat      2940
cgtcatcgac acctcgccct gcctggcgca ggtgaagagc cagatcagcg agccgtcgct      3000
gcgcttcgcg ctgtacgagc cggttgagtt catccggcac ttcctggtgg acaagctgga      3060
gtggaagaag gtgcgcgacc aggtggccat ccacgtgcc tgcctctcca agaagatggg      3120
catcgaggag tccttcgcga agctggcggg cctgtgcgcc aacgaggtgg tgccctcggg      3180
cattccttgc tgcggcatgg cgggcgaccg cggcatgcgc ttccccgagc tgaccggcgc      3240
ctcgtcgcag cacctcaacc tgcccaagac ctgcaaggac ggctactcca ccagccgcac      3300
ctgcgagatg tcgtcagca accacgccgg catcaacttc aggggcctgg tgtacctggt      3360
ggatgaggcc acggcgcccta agaagcaggc cgccgctgcc aagaccgcgt      3410

```

[0024] <210> 45
 <211> 1136
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)

<220>
 <223> 化学合成的

<400> 45

```

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

```

```

Gln Ala Thr Met Val Ala Pro Phe Asn Gly Leu Lys Ser Ser Ala Ala
              20              25              30

```

```

Phe Pro Ala Thr Arg Lys Ala Asn Gly Gly Pro Arg Gly Gln Gly Lys
              35              40              45

```

```

Arg Leu Ala Gln Leu Leu Gly Ala Gln Leu Lys Gln Tyr Ala Ala Glu
50              55              60

```

```

Val Arg Gly Ile Ser Thr Ala Gly Gly Ala Ser Arg Gly Gly Ala Arg
65              70              75              80

```

```

Gly Pro Ala Ser Pro Ser Ser Leu Glu Gln Gln Thr Arg Gln Val Ala
              85              90              95

```

Gln Val Ala Val Gln Gln Ser Thr Gln Gln Ala Val Lys Val Val Val
100 105 110

Pro Ala Ile Lys Val Asp Leu Val Gly Ala Val Ser Ser Val Ser Glu
115 120 125

Ser Asp Lys Val Glu Pro Gly Val Phe Lys Asn Val Asp Gly His Arg
130 135 140

Phe Glu Asp Gly Arg Tyr Ala Ala Phe Val Glu Glu Ile Thr Lys Phe
145 150 155 160

Ile Pro Lys Glu Arg Gln Tyr Ser Asp Pro Val Arg Thr Phe Ala Tyr
165 170 175

Gly Thr Asp Ala Ser Phe Tyr Arg Leu Asn Pro Lys Leu Val Val Lys
180 185 190

Val His Asn Glu Asp Glu Val Arg Arg Ile Met Pro Ile Ala Glu Arg
195 200 205

[0025]

Leu Gln Val Pro Ile Thr Phe Arg Ala Ala Gly Thr Ser Leu Ser Gly
210 215 220

Gln Ala Ile Thr Asp Ser Val Leu Ile Lys Leu Ser His Thr Gly Lys
225 230 235 240

Asn Phe Arg Asn Phe Thr Val His Gly Asp Gly Ser Val Ile Thr Val
245 250 255

Glu Pro Gly Leu Ile Gly Gly Glu Val Asn Arg Ile Leu Ala Ala His
260 265 270

Gln Lys Lys Asn Lys Leu Pro Ile Gln Tyr Lys Ile Gly Pro Asp Pro
275 280 285

Ser Ser Ile Asp Ser Cys Met Ile Gly Gly Ile Val Ser Asn Asn Ser
290 295 300

Ser Gly Met Cys Cys Gly Val Ser Gln Asn Thr Tyr His Thr Leu Lys
305 310 315 320

Asp Met Arg Val Val Phe Val Asp Gly Thr Val Leu Asp Thr Ala Asp
325 330 335

Pro Asn Ser Cys Thr Ala Phe Met Lys Ser His Arg Ser Leu Val Asp
340 345 350

Gly Val Val Ser Leu Ala Arg Arg Val Gln Ala Asp Lys Glu Leu Thr
355 360 365

Ala Leu Ile Arg Arg Lys Phe Ala Ile Lys Cys Thr Thr Gly Tyr Ser
370 375 380

Leu Asn Ala Leu Val Asp Phe Pro Val Asp Asn Pro Ile Glu Ile Ile
385 390 395 400

Lys His Leu Ile Ile Gly Ser Glu Gly Thr Leu Gly Phe Val Ser Arg
405 410 415

Ala Thr Tyr Asn Thr Val Pro Glu Trp Pro Asn Lys Ala Ser Ala Phe
420 425 430

[0026]

Ile Val Phe Pro Asp Val Arg Ala Ala Cys Thr Gly Ala Ser Val Leu
435 440 445

Arg Asn Glu Thr Ser Val Asp Ala Val Glu Leu Phe Asp Arg Ala Ser
450 455 460

Leu Arg Glu Cys Glu Asn Asn Glu Asp Met Met Arg Leu Val Pro Asp
465 470 475 480

Ile Lys Gly Cys Asp Pro Met Ala Ala Ala Leu Leu Ile Glu Cys Arg
485 490 495

Gly Gln Asp Glu Ala Ala Leu Gln Ser Arg Ile Glu Glu Val Val Arg
500 505 510

Val Leu Thr Ala Ala Gly Leu Pro Phe Gly Ala Lys Ala Ala Gln Pro
515 520 525

Met Ala Ile Asp Ala Tyr Pro Phe His His Asp Gln Lys Asn Ala Lys
530 535 540

	Val	Phe	Trp	Asp	Val	Arg	Arg	Gly	Leu	Ile	Pro	Ile	Val	Gly	Ala	Ala	
	545					550					555					560	
	Arg	Glu	Pro	Gly	Thr	Ser	Met	Leu	Ile	Glu	Asp	Val	Ala	Cys	Pro	Val	
					565					570					575		
	Asp	Lys	Leu	Ala	Asp	Met	Met	Ile	Asp	Leu	Ile	Asp	Met	Phe	Gln	Arg	
				580					585					590			
	His	Gly	Tyr	His	Asp	Ala	Ser	Cys	Phe	Gly	His	Ala	Leu	Glu	Gly	Asn	
			595					600					605				
	Leu	His	Leu	Val	Phe	Ser	Gln	Gly	Phe	Arg	Asn	Lys	Glu	Glu	Val	Gln	
	610						615					620					
	Arg	Phe	Ser	Asp	Met	Met	Glu	Glu	Met	Cys	His	Leu	Val	Ala	Thr	Lys	
	625					630					635					640	
	His	Ser	Gly	Ser	Leu	Lys	Gly	Glu	His	Gly	Thr	Gly	Arg	Asn	Val	Ala	
					645					650					655		
[0027]	Pro	Phe	Val	Glu	Met	Glu	Trp	Gly	Asn	Lys	Ala	Tyr	Glu	Leu	Met	Trp	
				660					665					670			
	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	Asp	Pro	Ser	His	Thr	Leu	Asn	Pro	Gly	Val	
			675					680					685				
	Ile	Leu	Asn	Arg	Asp	Gln	Asp	Ala	His	Ile	Lys	Phe	Leu	Lys	Pro	Ser	
		690					695					700					
	Pro	Ala	Ala	Ser	Pro	Ile	Val	Asn	Arg	Cys	Ile	Glu	Cys	Gly	Phe	Cys	
	705					710					715					720	
	Glu	Ser	Asn	Cys	Pro	Ser	Arg	Asp	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Arg	Gln	Arg	
					725					730					735		
	Ile	Ser	Val	Tyr	Arg	Glu	Met	Tyr	Arg	Leu	Lys	Gln	Leu	Gly	Pro	Gly	
				740					745					750			
	Ala	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	Met	Ser	Ser	Ser	Tyr	
			755					760					765				
	Ala	Tyr	Asp	Gly	Glu	Gln	Thr	Cys	Ala	Ala	Asp	Gly	Met	Cys	Gln	Glu	

770 775 780

Lys 785	Cys	Pro	Val	Lys	Ile 790	Asn	Thr	Gly	Asp	Leu 795	Ile	Lys	Ser	Met	Arg 800
Ala	Glu	His	Met	Lys 805	Glu	Glu	Lys	Thr	Ala	Ser	Gly	Met	Ala	Asp	Trp 815
Leu	Ala	Ala	Asn 820	Phe	Gly	Val	Ile	Asn 825	Ser	Asn	Val	Pro	Arg 830	Phe	Leu
Asn	Ile	Val 835	Asn	Ala	Met	His	Ser 840	Val	Val	Gly	Ser	Ala 845	Pro	Leu	Ser
Ala	Ile 850	Ser	Arg	Ala	Leu	Asn 855	Ala	Ala	Thr	Asn	His 860	Phe	Val	Pro	Val
Trp 865	Asn	Pro	Tyr	Met	Pro 870	Lys	Gly	Ala	Ala	Pro 875	Leu	Lys	Val	Pro	Ala 880
[0028]	Pro	Pro	Ala	Pro	Ala 885	Ala	Ala	Glu	Ala	Ser 890	Gly	Ile	Pro	Arg	Lys Val 895
	Val	Tyr	Met	Pro 900	Ser	Cys	Val	Thr	Arg 905	Met	Met	Gly	Pro	Ala 910	Ala Ser
	Asp	Thr	Glu	Thr	Ala	Ala	Val	His 920	Glu	Lys	Val	Met 925	Ser	Leu	Phe Gly
	Lys	Ala	Gly	Tyr	Glu	Val	Ile 935	Ile	Pro	Glu	Gly	Val 940	Ala	Ser	Gln Cys
	Cys	Gly	Met	Met	Phe	Asn 950	Ser	Arg	Gly	Phe	Lys 955	Asp	Ala	Ala	Ala Ser 960
	Lys	Gly	Ala	Glu	Leu 965	Glu	Ala	Ala	Leu	Leu 970	Lys	Ala	Ser	Asp	Asn Gly 975
	Lys	Ile	Pro	Ile 980	Val	Ile	Asp	Thr	Ser 985	Pro	Cys	Leu	Ala	Gln 990	Val Lys
	Ser	Gln	Ile	Ser	Glu	Pro	Ser	Leu	Arg	Phe	Ala	Leu	Tyr	Glu	Pro Val 1000 1005

Glu Phe Ile Arg His Phe Leu Val Asp Lys Leu Glu Trp Lys Lys
1010 1015 1020

Val Arg Asp Gln Val Ala Ile His Val Pro Cys Ser Ser Lys Lys
1025 1030 1035

Met Gly Ile Glu Glu Ser Phe Ala Lys Leu Ala Gly Leu Cys Ala
1040 1045 1050

Asn Glu Val Val Pro Ser Gly Ile Pro Cys Cys Gly Met Ala Gly
1055 1060 1065

Asp Arg Gly Met Arg Phe Pro Glu Leu Thr Gly Ala Ser Leu Gln
1070 1075 1080

His Leu Asn Leu Pro Lys Thr Cys Lys Asp Gly Tyr Ser Thr Ser
1085 1090 1095

Arg Thr Cys Glu Met Ser Leu Ser Asn His Ala Gly Ile Asn Phe
1100 1105 1110

[0029]

Arg Gly Leu Val Tyr Leu Val Asp Glu Ala Thr Ala Pro Lys Lys
1115 1120 1125

Gln Ala Ala Ala Ala Lys Thr Ala
1130 1135

<210> 46
<211> 694
<212> RNA
<213> 人工序列 (ARTIFICIAL SEQUENCE)

<220>
<223> 化学合成的

<400> 46
uacuaaucca gcaguaagac agagccuacu ggcaaucguc ggcugagcug gcagucgcgau 60
ccaucuuucu ucuaaccaau ucgaucuuuc uguuggaagu gccagcaaaa ucacccgagu 120
ugauguucag aaggcaauca augacgugcu guuucuugac agagaagaug caugauggug 180
uuuauaaagu uaaguuuuca cuguuucucg aucaacucua ugauuaggaa cucuccuguc 240
uaucuaguuu ugguuuuaca uaggaucua auagagguaa auguccaucc caccuuugua 300

	uuuucuggaa gaaagaaaga uaagacacug agaauaacg cgagauagag aggcuuuaag	360
	auggagaaca aagaaggguu uuugaauuu acaaaaauaca aaggugggau ggacauuuac	420
	cucuauauag auccuaugua aacccaaaac uagauagaca ggagaguucc uaaucauuga	480
[0030]	guugaucgag aaacagugaa aacuuacu uauaaacacc aucaugcauc uucucuguca	540
	agaaacagca cgucuuugau ugccuucuga acaucaacuc gggugauuuu gcuggcacuu	600
	ccaacagaau gaucgaauug guaugaagaa agauggaugc gacugccagc ucagccgacg	660
	auugccagua ggcucugucu uacugcugga augc	694

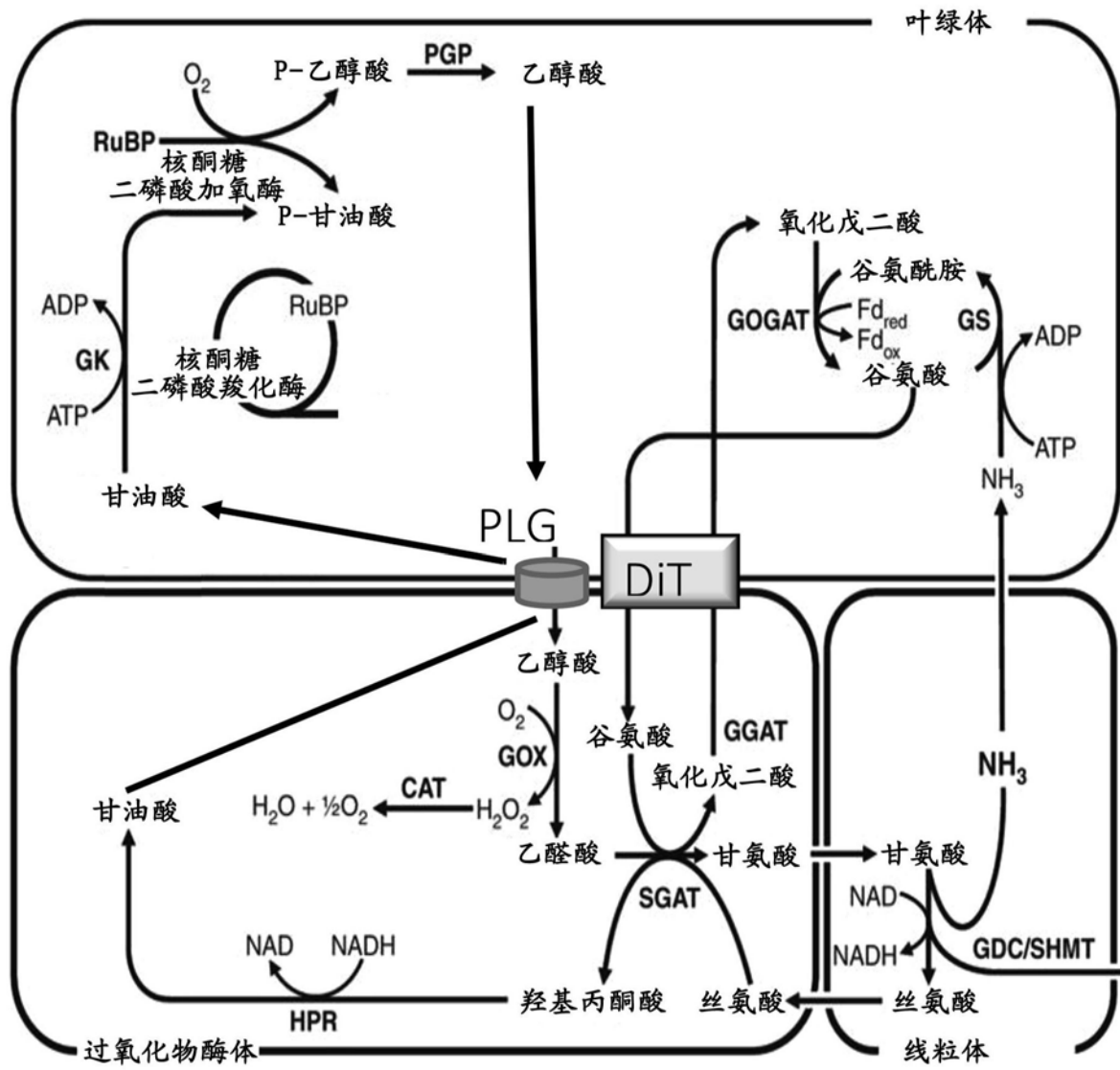


图1

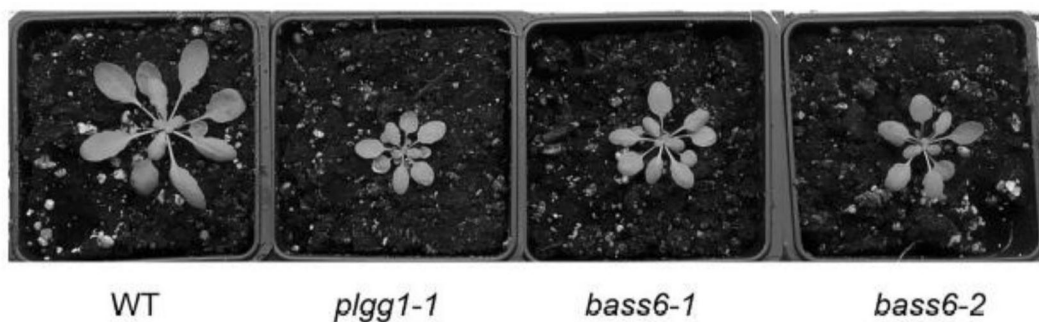


图2

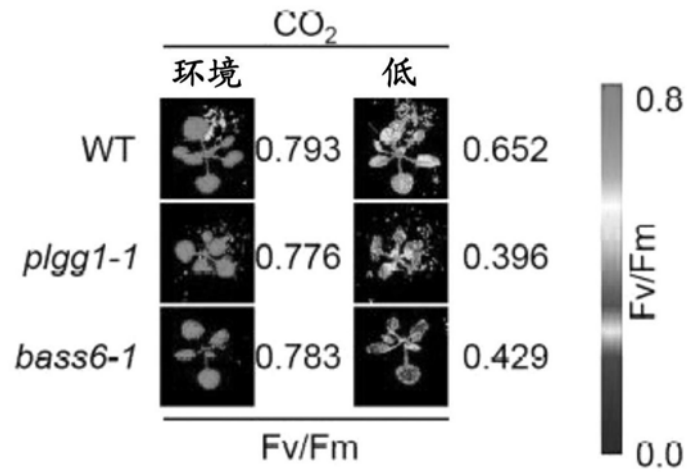


图3

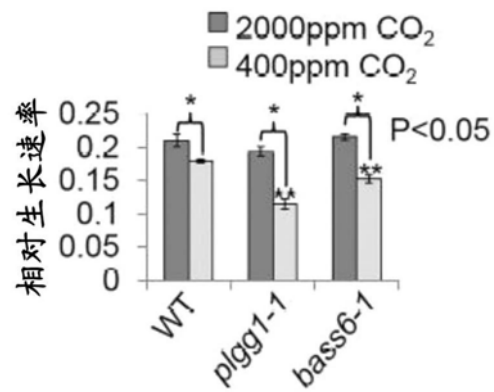


图4A

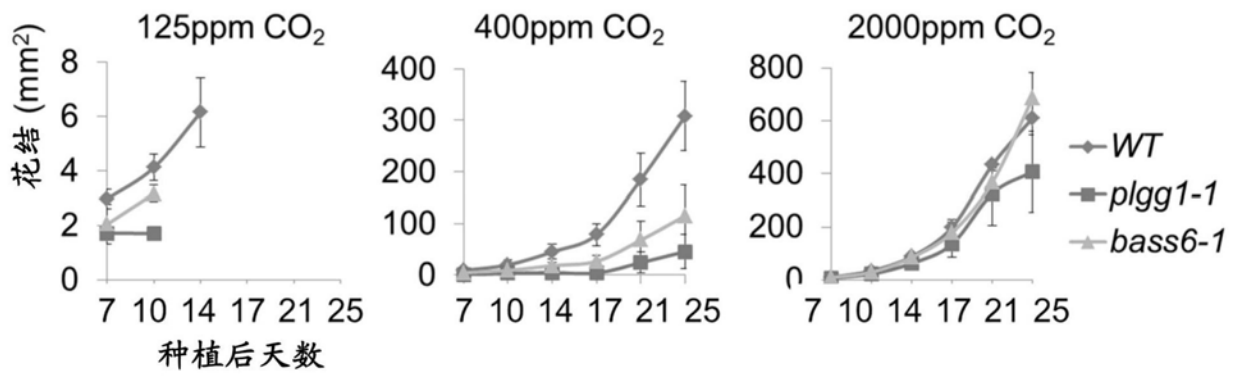


图4B

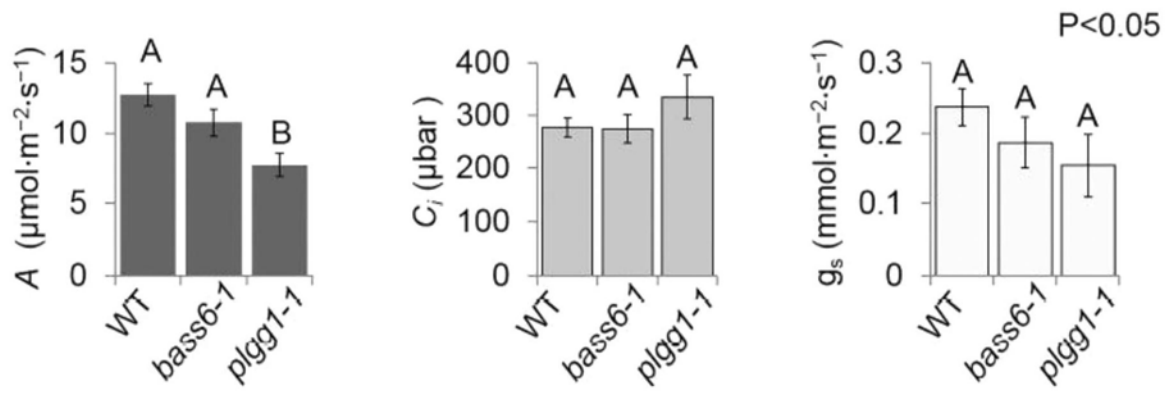


图5

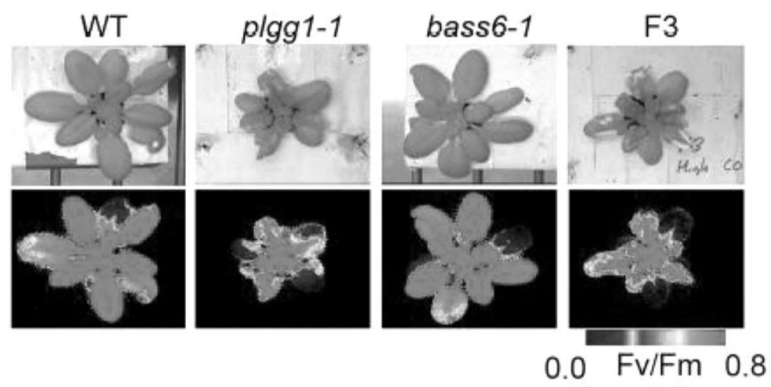


图6A

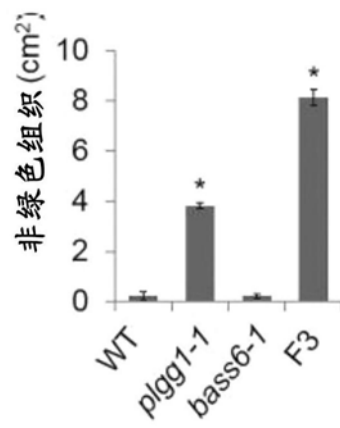


图6B

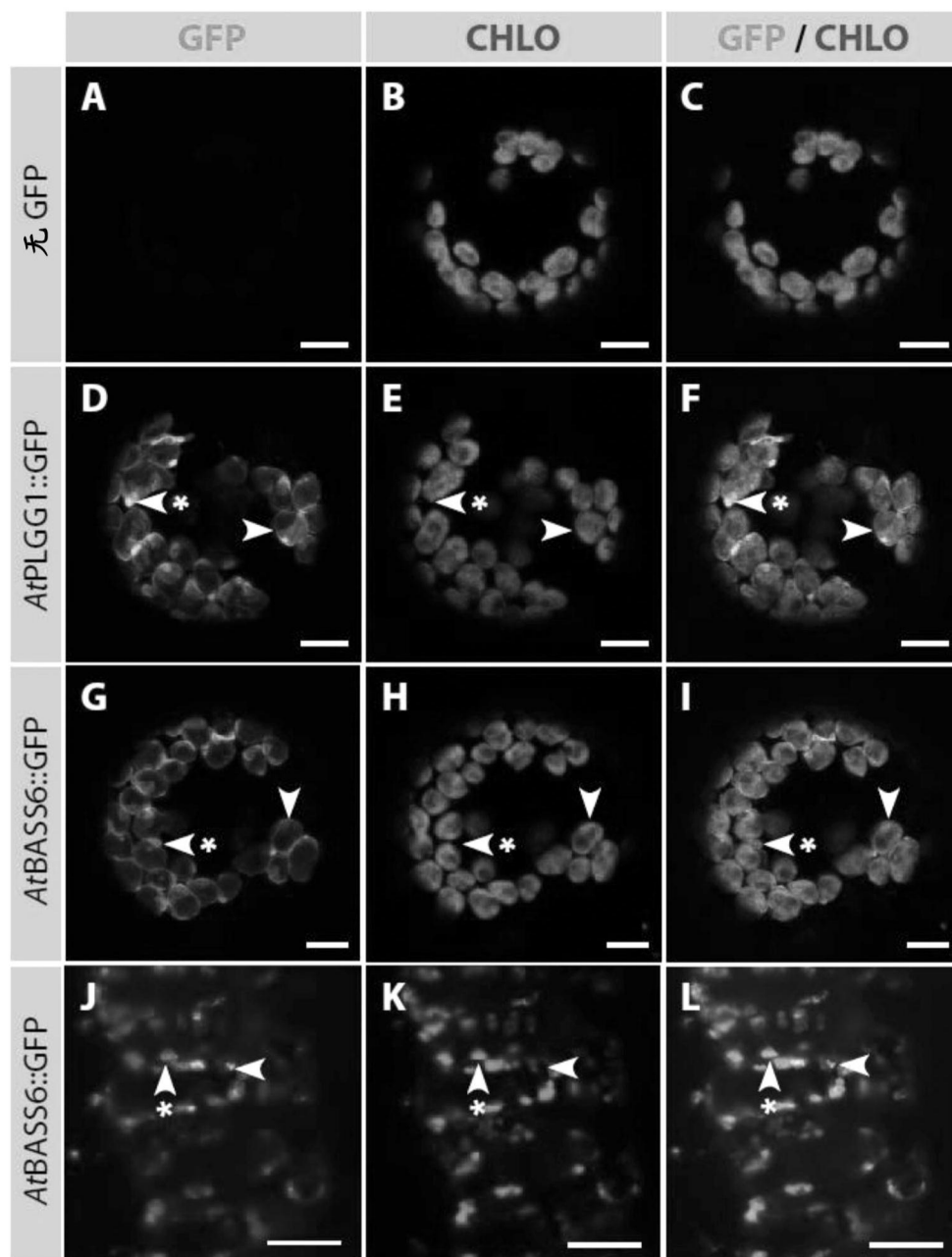


图7

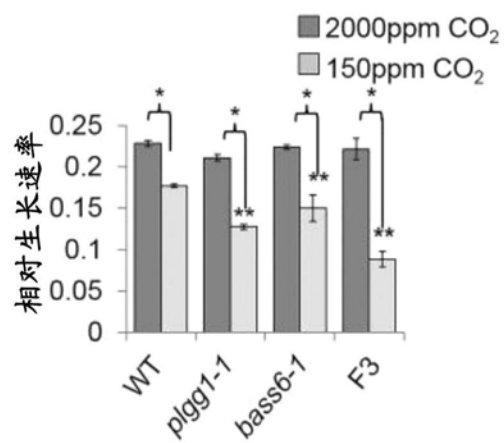


图8A

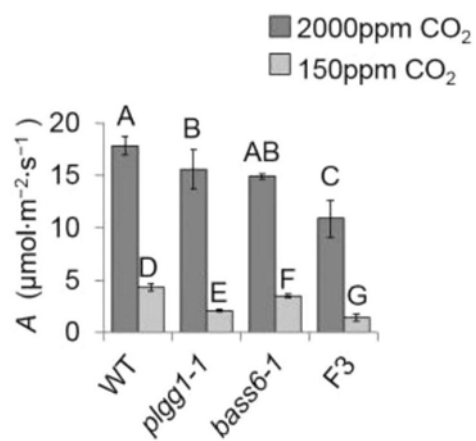


图8B

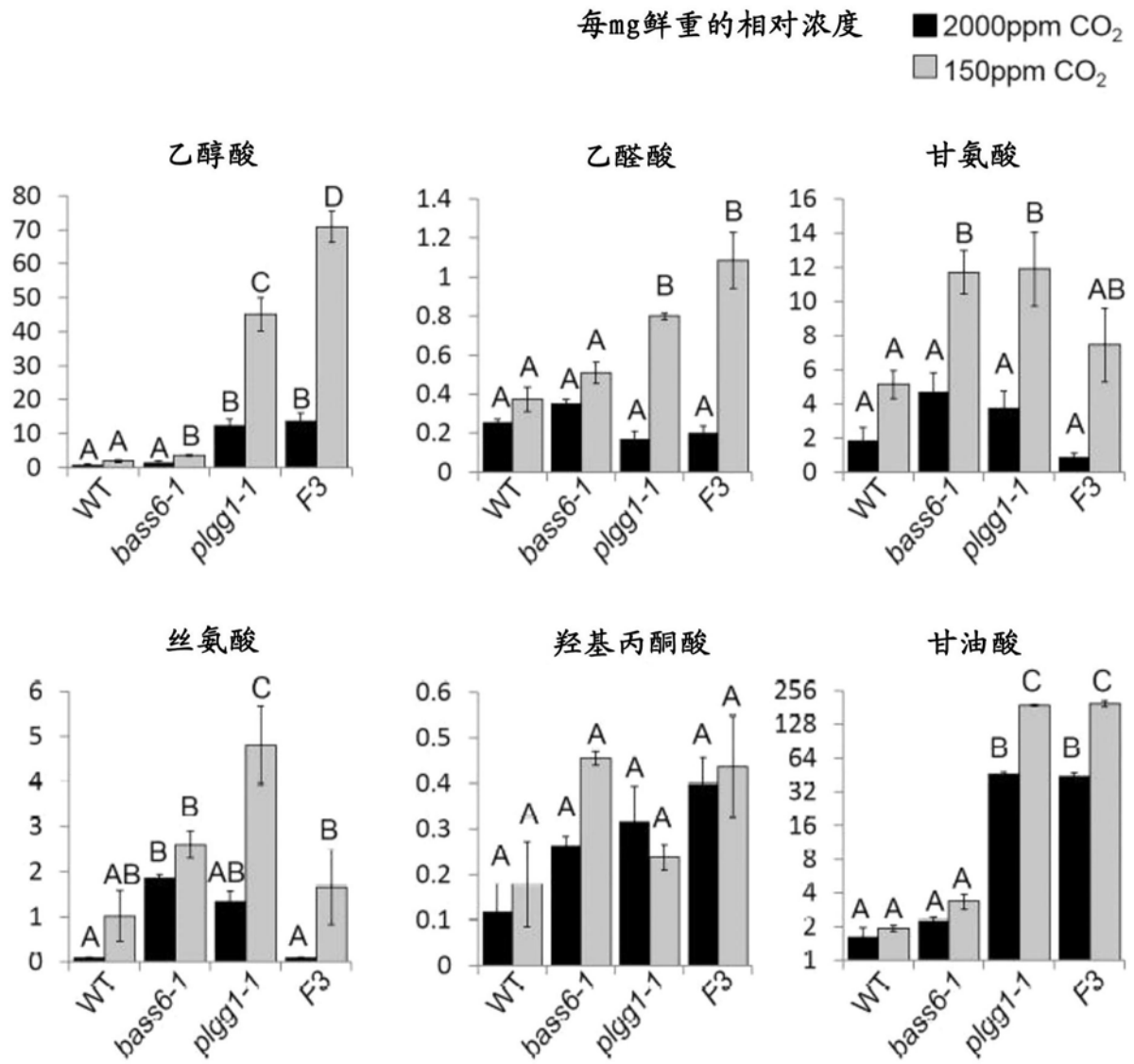


图9

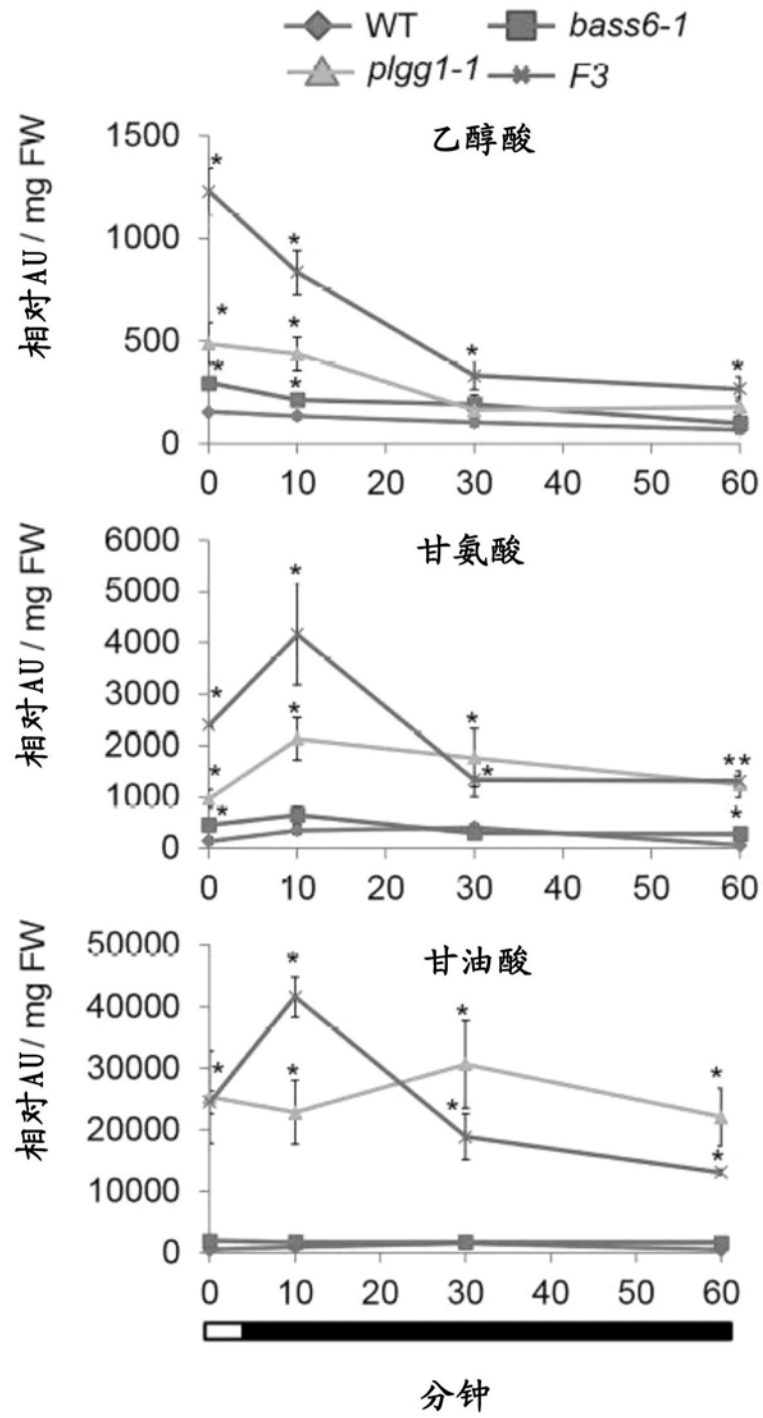


图10

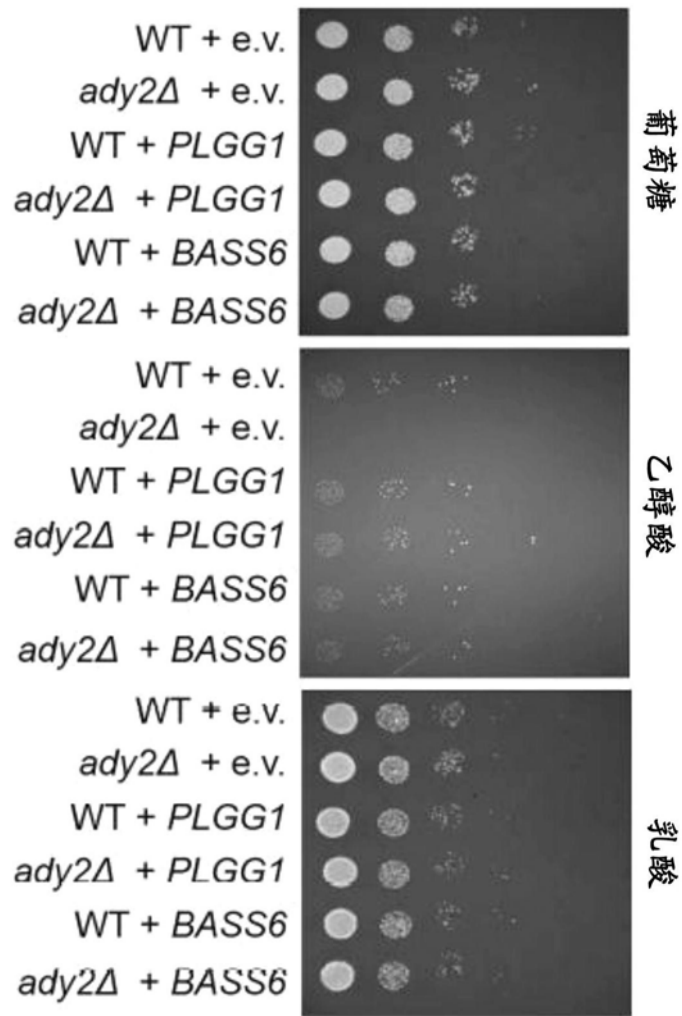


图11

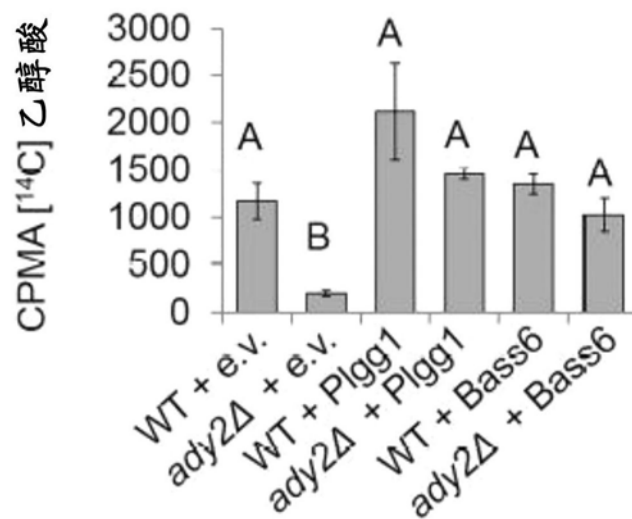


图12

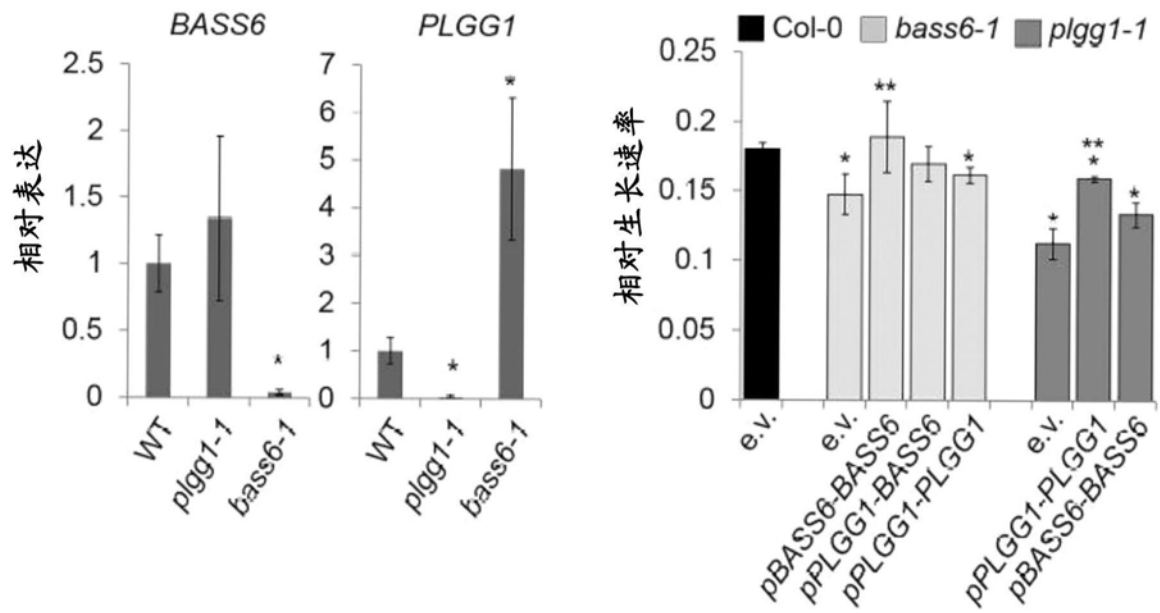


图13

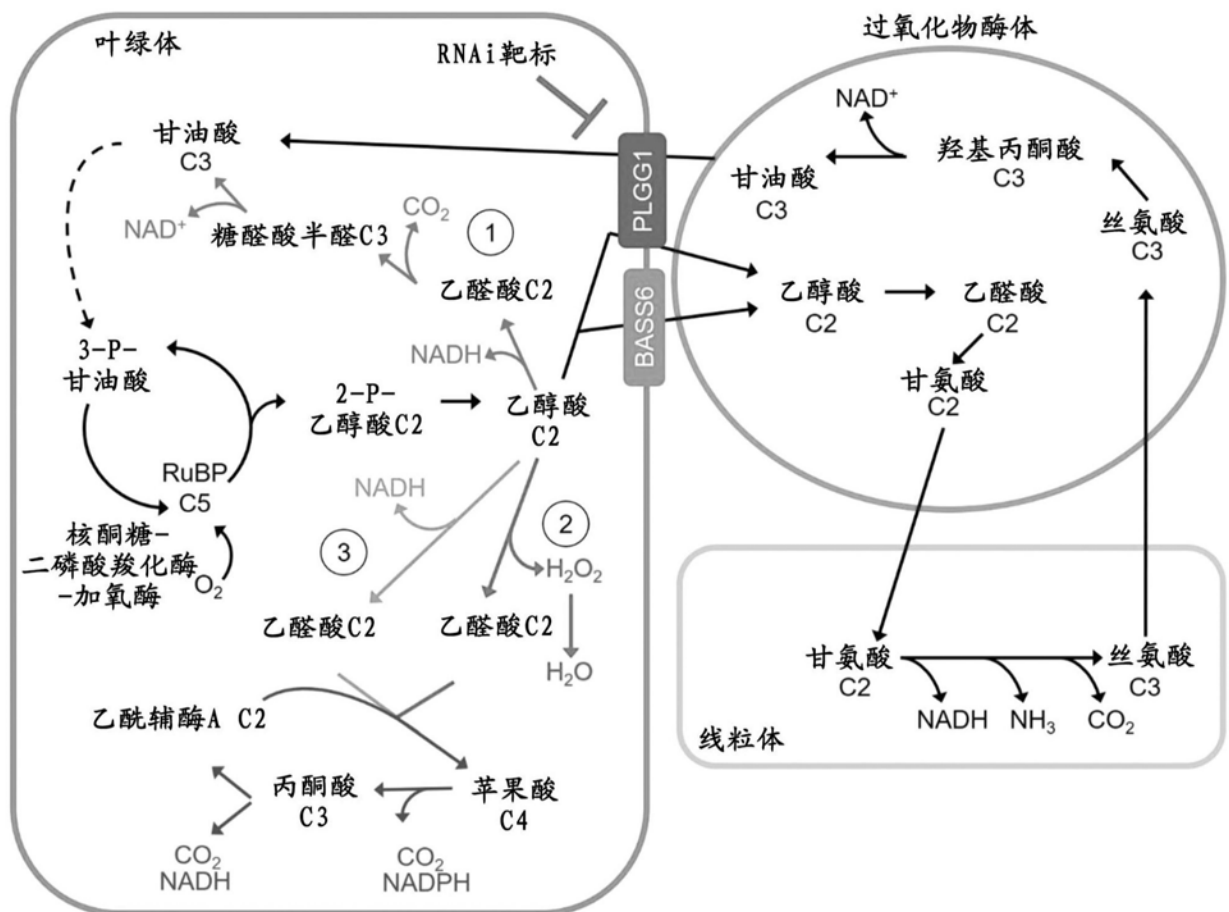


图14

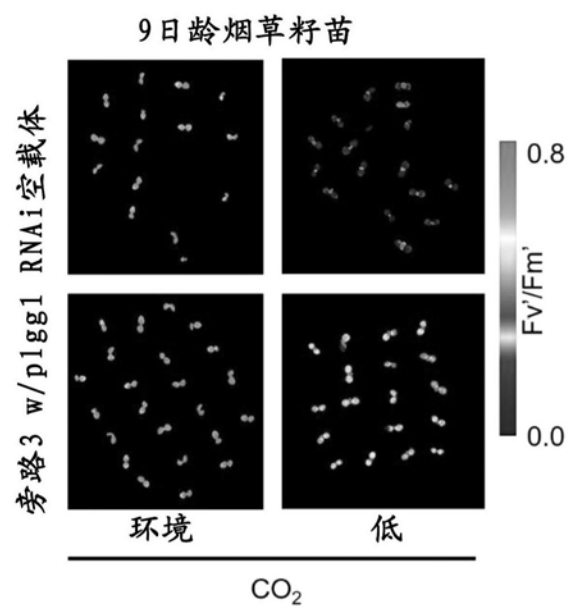


图15A

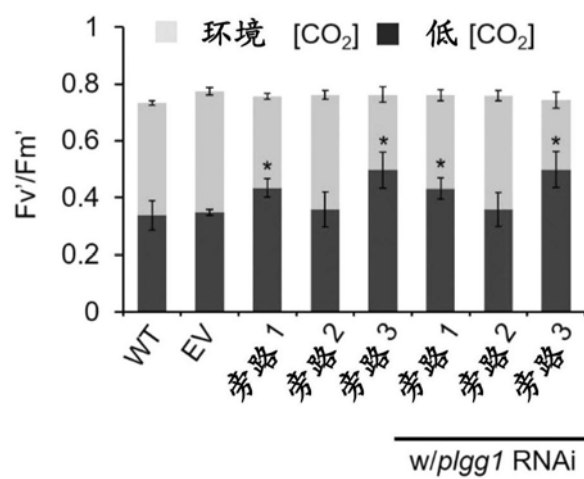


图15B

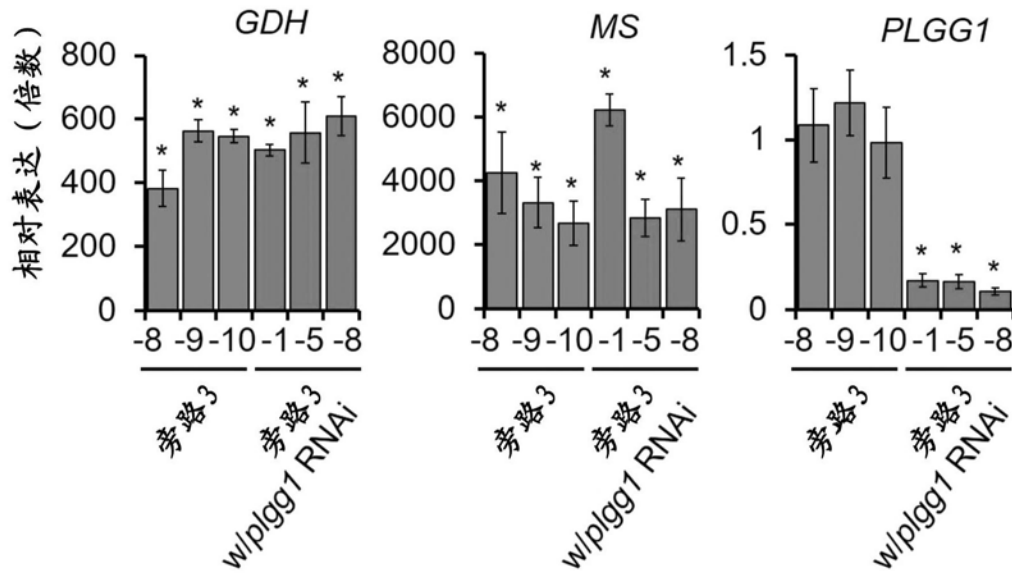


图16A

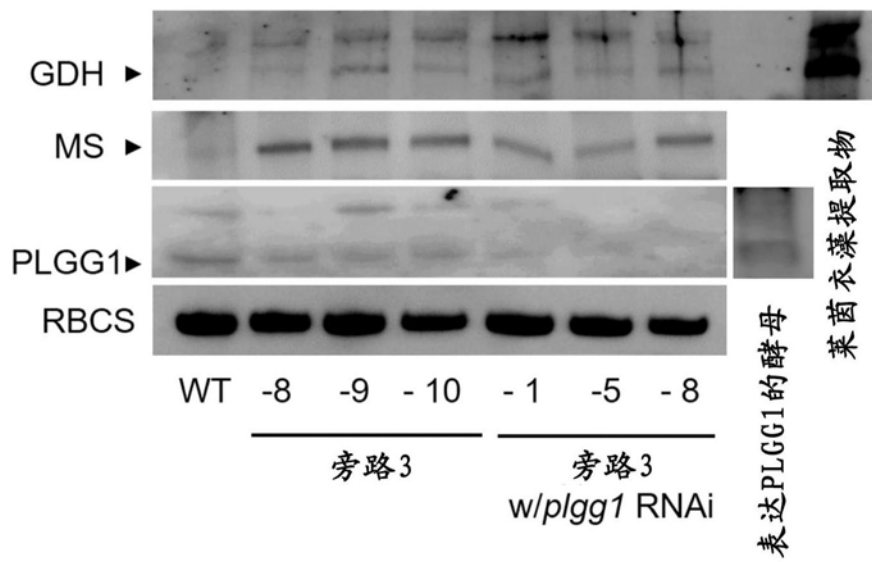


图16B

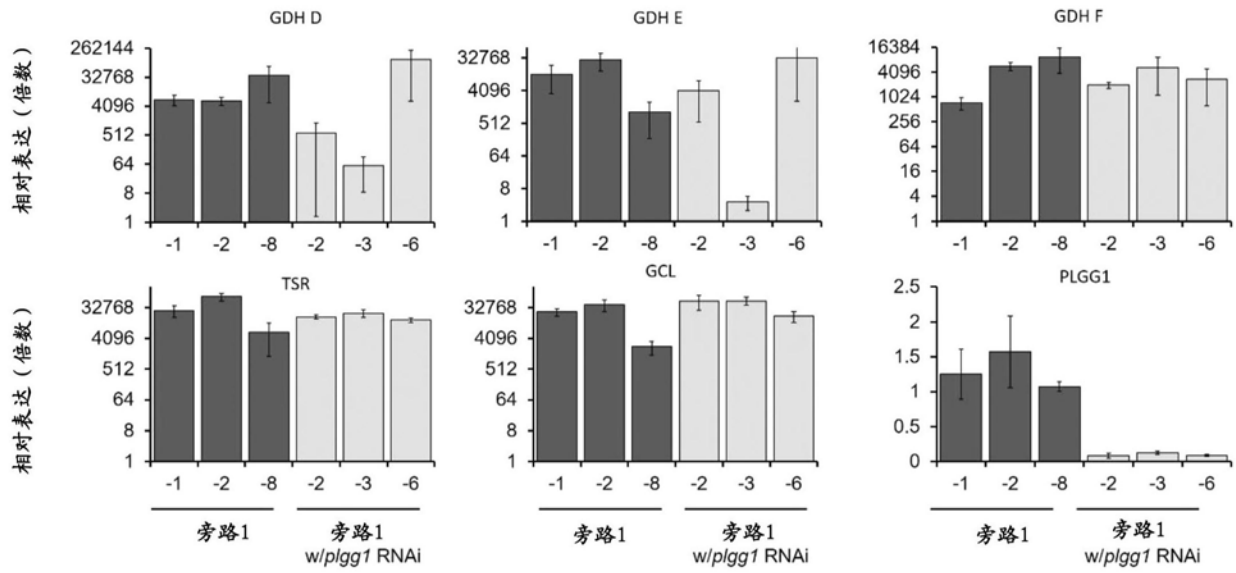


图17A

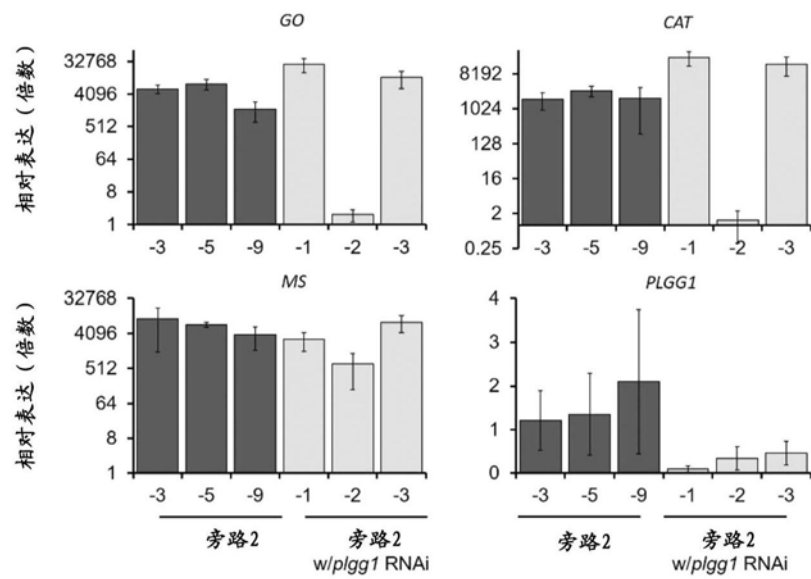


图17B

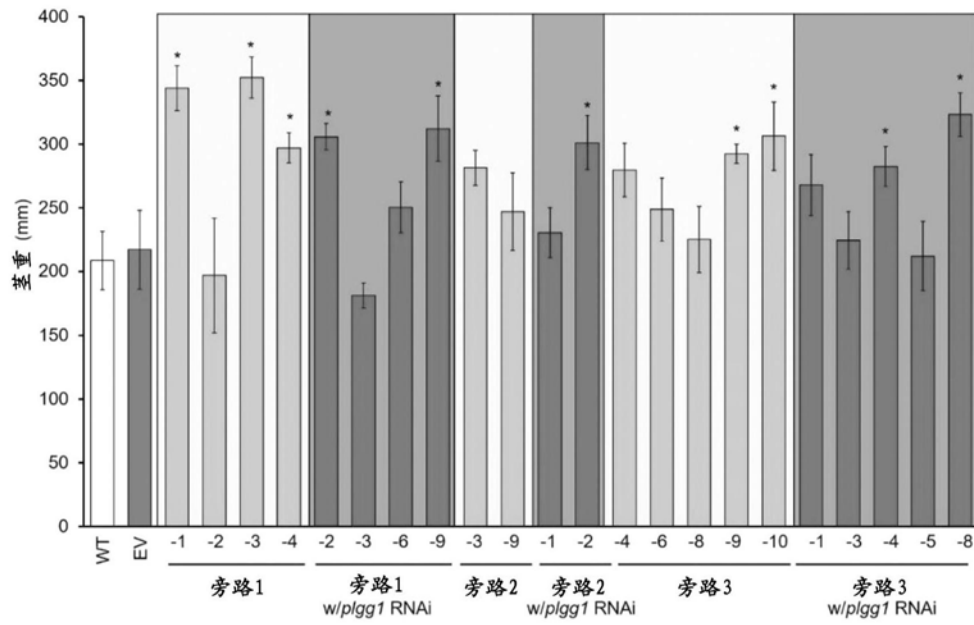


图18A

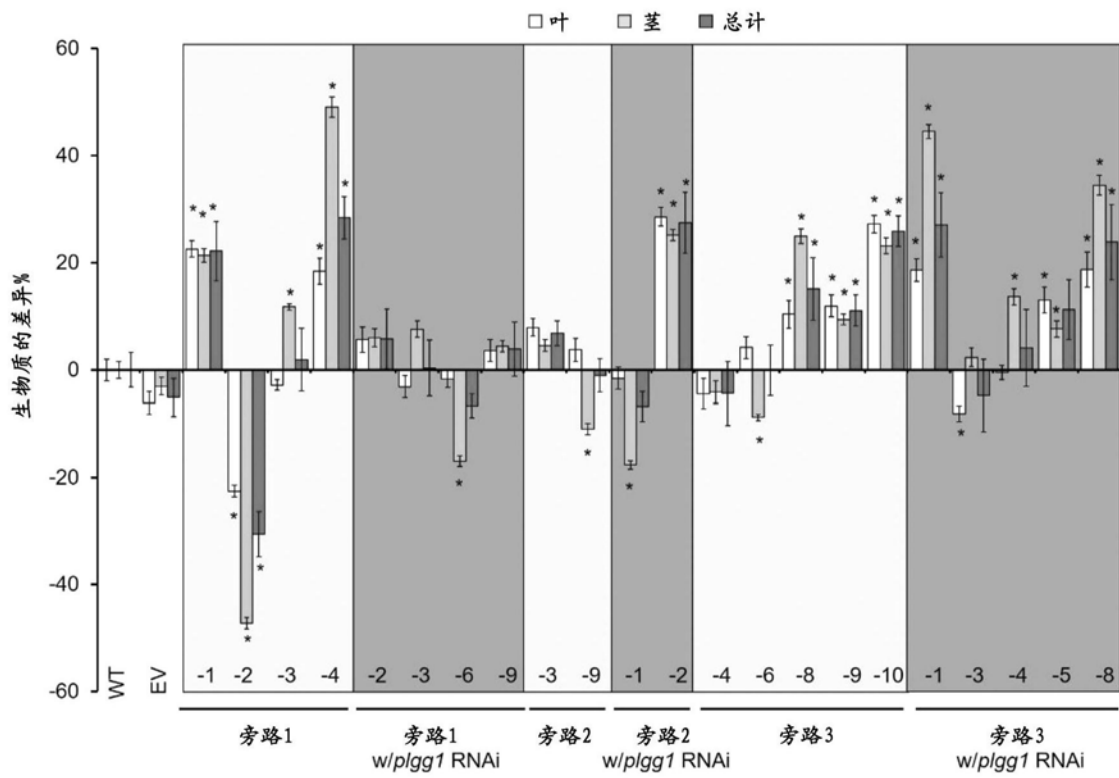


图18B

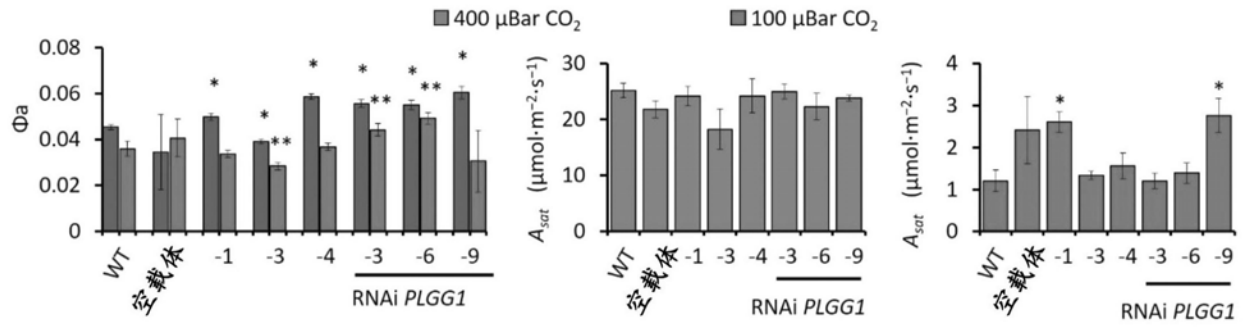


图19A

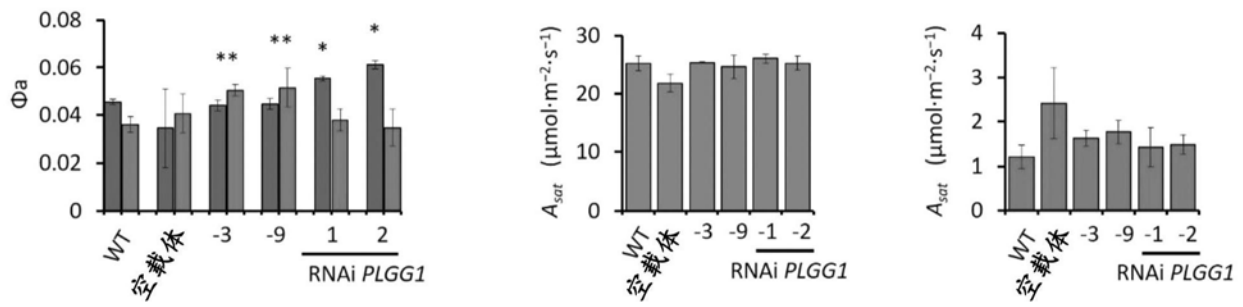


图19B

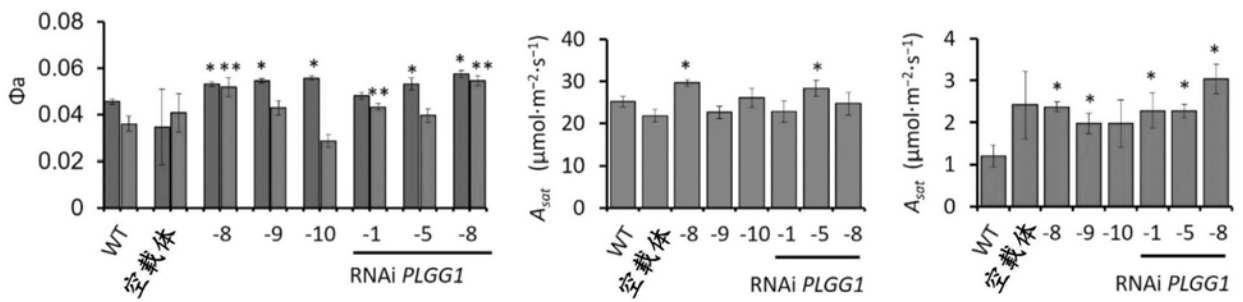


图19C

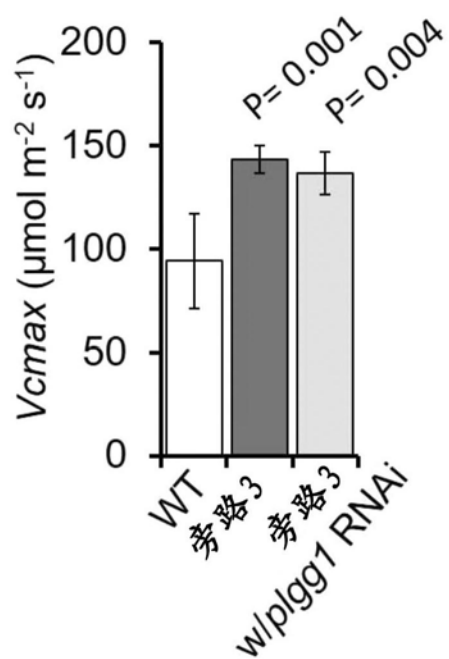


图20A

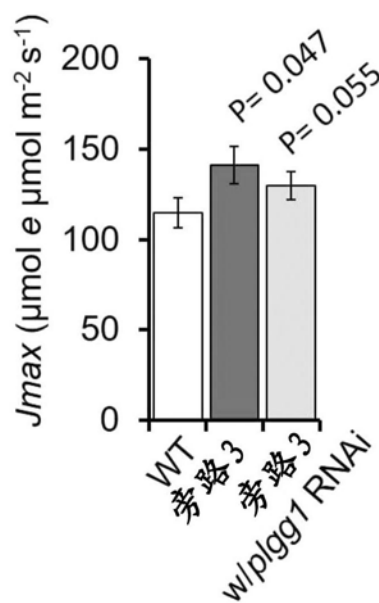


图20B

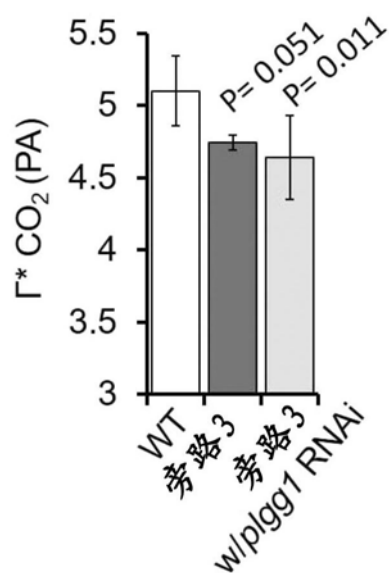


图20C

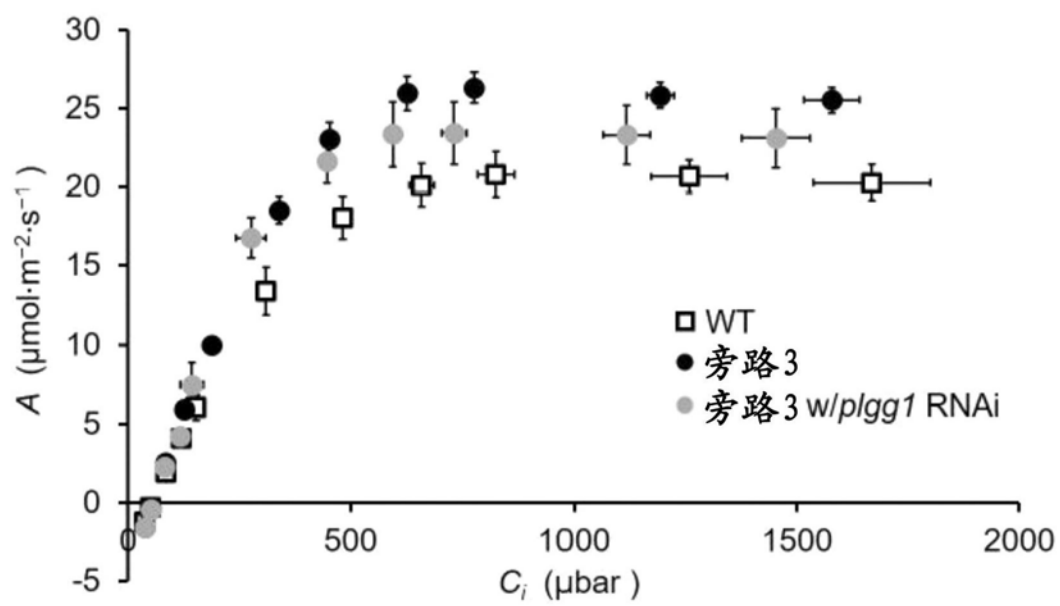


图20D

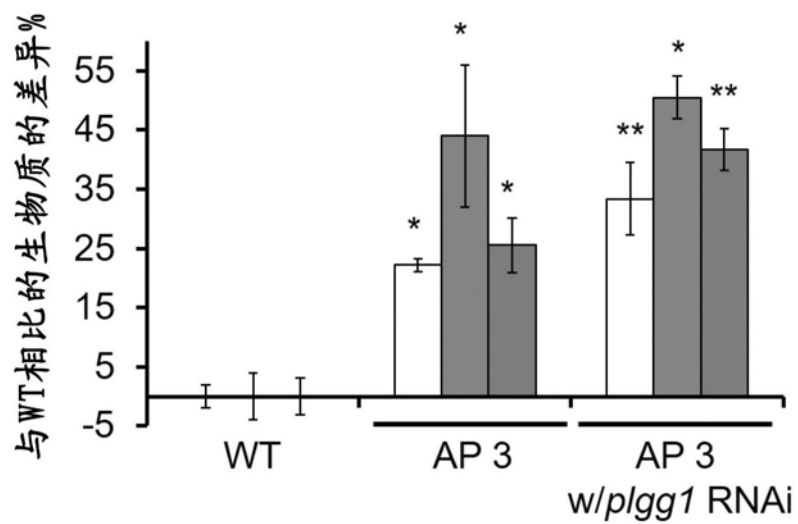


图21A

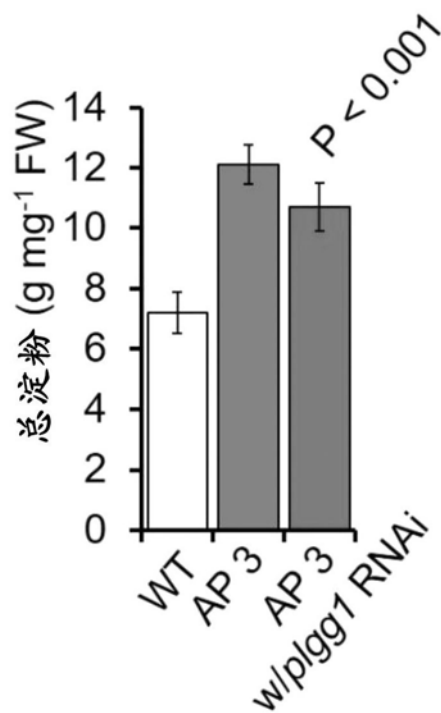


图21B

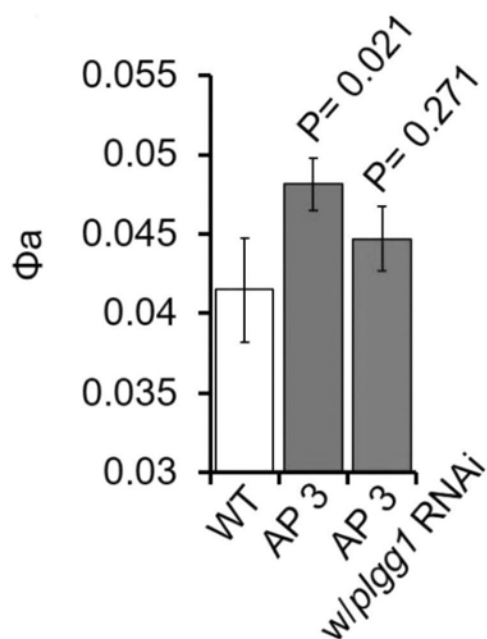


图21C

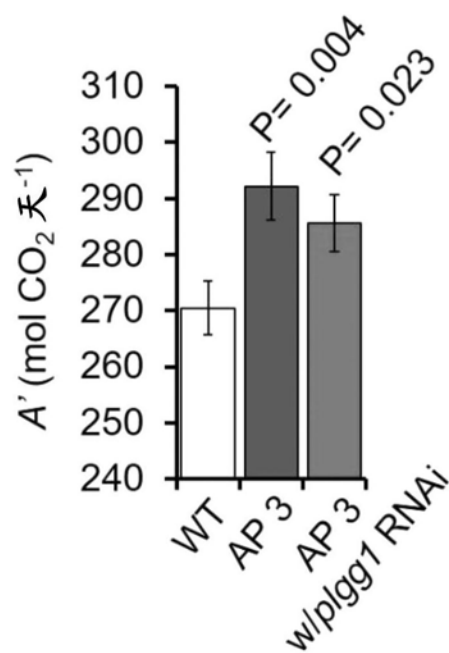


图21D

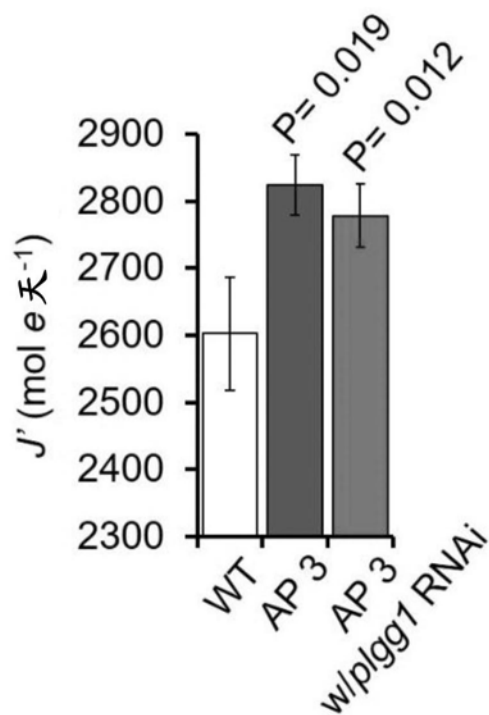


图21E

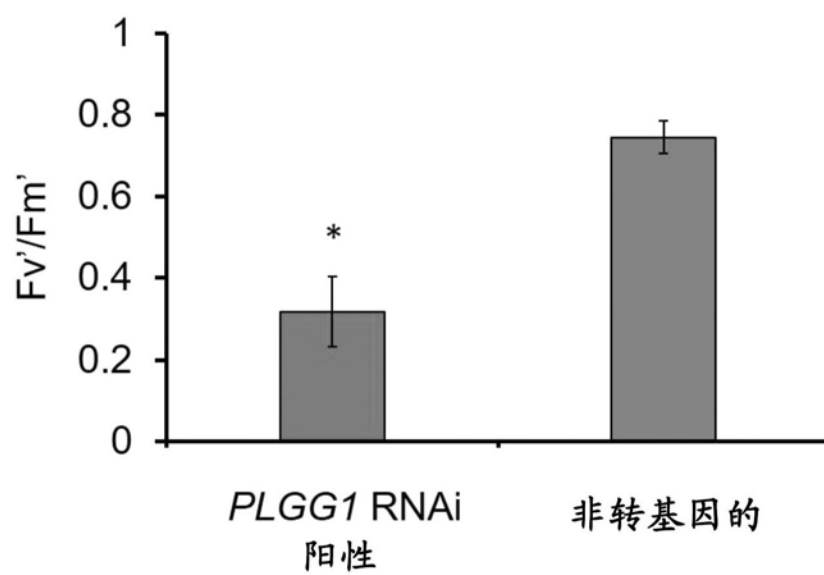


图22

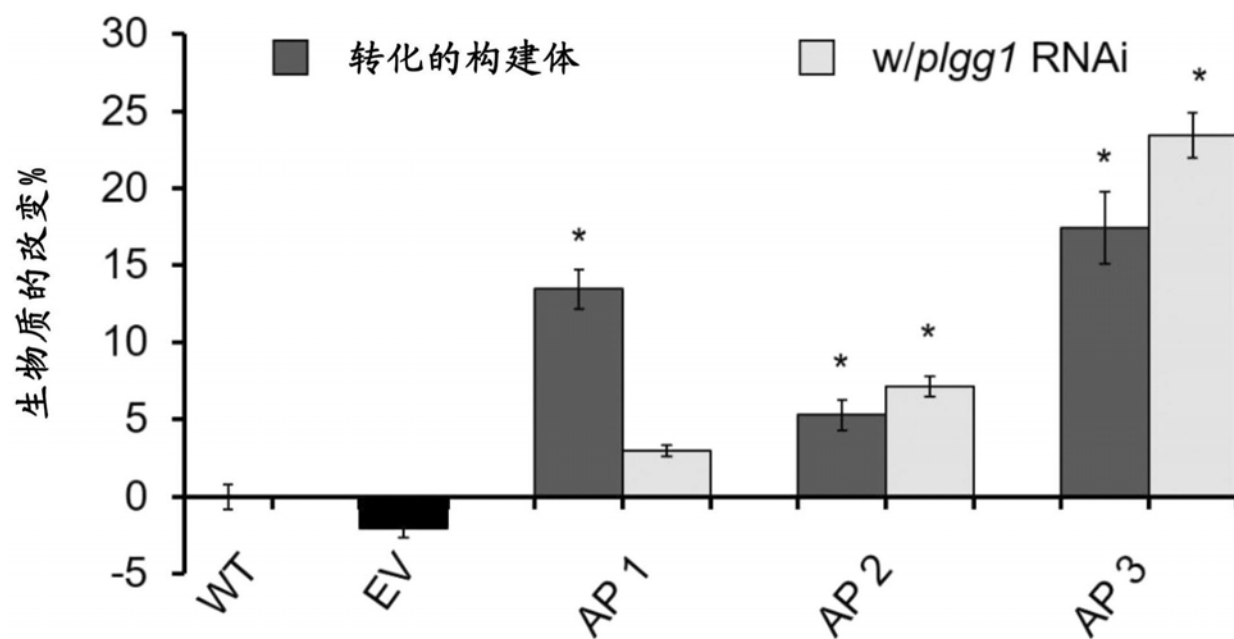


图23