

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01822489. X

[51] Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 3 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100372930C

[22] 申请日 2001.1.22 [21] 申请号 01822489. X

[30] 优先权

[32] 2000.12.29 [33] US [31] 09/751,687

[32] 2000.12.29 [33] WO [31] PCT/IB00/02045

[86] 国际申请 PCT/IB2001/000207 2001.1.22

[87] 国际公布 WO2002/053721 英 2002.7.11

[85] 进入国家阶段日期 2003.8.4

[73] 专利权人 卡尔斯伯格研究实验室

地址 丹麦哥本哈根

共同专利权人 海尼根技术服务有限公司

科诺布格啤酒公司

[72] 发明人 A·C·多玛 A·杜德勒

V·卡梅隆-米尔斯

B·斯嘉德豪格 L·M·贝克

N·施密特 J·C·海斯泰克

J·R·范麦其伦

[56] 参考文献

WO9713851A 1997.4.17

What's brewing in barley biotechnology. David McElroy and Jake Jacobsen. BIO/TECHNOLOGY, Vol. 13. 1995

审查员 马秋娟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 程泳

权利要求书 4 页 说明书 65 页 附图 29 页

[54] 发明名称

低脂氧化酶 1 大麦

[57] 摘要

本发明提供了具有降低的脂氧化酶 -1 酶活的大麦植物, 例如, 表达突变型 LOX -1 蛋白质的大麦植物。本发明的大麦植物用于具有提高的稳定性和降低的 T2N 潜力的植物产品的生产, 例如麦芽和酿制的饮料, 具体的是啤酒。

1. 一种包含突变型 LOX-1 蛋白质的大麦植物细胞,其中与非突变的对照相比,所述植物细胞的 LOX-1 活性减少或缺乏。
2. 如权利要求 1 所述的大麦植物细胞,其中所述 LOX-1 活性包括催化游离和酯化的多不饱和脂肪酸和多不饱和十八烷脂肪酸的氧化,以形成 9-过氧羟基脂肪酸衍生物。
3. 如权利要求 1 所述的大麦植物细胞,其中所述 LOX-1 蛋白质由具有一个或多个突变之突变的 *lox-1* 核酸序列编码。
4. 如权利要求 3 所述的大麦植物细胞,其中所述一个或多个突变由化学诱变或辐射诱导。
5. 如权利要求 3 所述的大麦植物细胞,其中所述一个或多个突变由定点诱变诱导。
6. 如权利要求 3 所述的大麦植物细胞,其中所述一个或多个突变定位于 *lox-1* 核酸序列的转录区或启动子中。
7. 如权利要求 3 所述的大麦植物细胞,其中所述突变是在 *lox-1* 基因+2347 位置上的核苷酸置换。
8. 如权利要求 1-7 中任一项所述的大麦植物细胞,其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含在沿野生型大麦 LOX-1 的底物腔排列的一个或多个保守的中性或疏水性氨基酸残基上的酸性的、碱性的、或极性氨基酸置换。
9. 如权利要求 1-7 任一项所述的大麦植物细胞,其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含在一个或多个如下野生型大麦 LOX-1 的氨基酸残基之非保守性氨基酸置换: Y₂₂₄, L₂₆₈, W₃₅₅, E₃₆₄, G₃₆₈, V₃₆₉, N₃₇₀, I₃₇₄, L₄₂₄, L₄₉₉, K₅₀₁, A₅₀₂, V₅₀₄, D₅₀₈, S₅₀₉, H₅₁₂, Q₅₁₃, L₅₁₄, H₅₁₇, W₅₁₈, H₅₂₂, I₅₅₆, L₅₅₉, A₅₆₀, L₅₆₄, I₅₆₅, I₅₇₀, T₅₇₄, S₅₈₅, Q₇₁₅, Y₇₁₈, N₇₂₄, R₇₂₅, P₇₂₆, T₇₂₇, L₇₇₂ 和 I₈₆₂。
10. 如权利要求 9 所述的大麦植物细胞,其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包括 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列,其中 Xaa 是酸性、碱性、

或极性氨基酸。

11. 如权利要求 10 所述的大麦植物细胞, 其中所述 Xaa 是谷氨酸或天冬氨酸。

12. 如权利要求 11 所述的大麦植物细胞, 其中所述 Xaa 是天冬氨酸。

13. 如权利要求 1 所述的大麦植物细胞, 其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含在一个或多个如下野生型大麦 LOX-1 的氨基酸残基之非保守性氨基酸置换: H₅₁₇, H₅₂₂, H₇₀₈, N₇₁₂ 和 I₈₆₂。

14. 如权利要求 1 所述的大麦植物细胞, 其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含在一个或多个如下野生型大麦 LOX-1 的氨基酸残基之非保守性氨基酸置换: H₂₆₁, H₅₁₂, H₇₇₅, F₂₅₉, F₂₆₇, F₇₁₃, W₅₁₈, R₅₅₁, R₇₂₅, D₇₇₈ 和 K₂₇₃。

15. 如权利要求 1 所述的大麦植物细胞产生的麦芽。

16. 利用含有权利要求 1 的大麦植物细胞的植物制备的饮料。

17. 使用含有权利要求 1 的大麦植物细胞的植物生产的啤酒。

18. 含有如权利要求 1 所述的大麦植物细胞的植物的用途, 其用于制备具有器官感觉特性的饮料, 所述器官感觉特性与从非突变的对照植物产物制备的饮料相比, 在经过一段有限时间阶段后或在提高储藏温度的条件下保持稳定。

19. 如权利要求 1 所述的大麦植物细胞用于生产饮料的用途。

20. 如权利要求 1 所述的大麦植物细胞用于生产麦芽或啤酒的用途。

21. 如权利要求 1 所述的大麦植物细胞的用途, 其用于与使用非突变的大麦植物或其部分、谷粒或植物后代、或植物产物生产的对照酿制产品相比, 在经过一段有限的时间阶段后稳定酿制产品的器官感觉特性。

22. 如权利要求 1 所述的一种大麦植物细胞的用途, 其用于生产经过一段有限的时间阶段后或在提高储藏温度的条件下, 与使用

非突变的大麦植物或其部分、谷粒或植物后代、或植物产物生产的对照酿制产品相比，具有降低水平的游离反式-2-壬烯醛的酿制产品。

23. 一种饮料，其由根据如权利要求 1 所述的大麦植物细胞制成，与从非突变的大麦植物或其部分、谷粒或植物后代、或植物产物生产的对照饮料相比，经过一段有限的时间阶段后或在提高储藏温度的条件下，所述饮料具有减少的反式-2-壬烯醛含量。

24. 如权利要求 23 所述的饮料，其中所述饮料是啤酒。

25. 一种用于由大麦制备啤酒的工艺，其中大麦或其部分包含一种突变型 LOX-1 蛋白质，与非突变的对照相比，所述植物或植物部分的 LOX-1 活性减少或缺乏。

26. 如权利要求 25 的工艺，其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含在沿野生型大麦 LOX-1 的底物腔排列的一个或多个保守的中性或疏水性氨基酸残基上的酸性的、碱性的、或极性氨基酸置换。

27. 如权利要求 25 或权利要求 26 的工艺，其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含在一个或多个如下野生型大麦 LOX-1 的氨基酸残基之非保守性氨基酸置换：Y₂₂₄，L₂₆₈，W₃₅₅，E₃₆₄，G₃₆₈，V₃₆₉，N₃₇₀，I₃₇₄，L₄₂₄，L₄₉₉，K₅₀₁，A₅₀₂，V₅₀₄，D₅₀₈，S₅₀₉，H₅₁₂，Q₅₁₃，L₅₁₄，H₅₁₇，W₅₁₈，H₅₂₂，I₅₅₆，L₅₅₉，A₅₆₀，L₅₆₄，I₅₆₅，I₅₇₀，T₅₇₄，S₅₈₅，Q₇₁₅，Y₇₁₈，N₇₂₄，R₇₂₅，P₇₂₆，T₇₂₇，L₇₇₂ 和 I₈₆₂。

28. 如权利要求 25 的工艺，其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列，其中 Xaa 是酸性、碱性、或极性氨基酸。

29. 如权利要求 28 的工艺，其中所述 Xaa 是谷氨酸或天冬氨酸。

30. 如权利要求 29 的工艺，其中所述 Xaa 是天冬氨酸。

31. 如权利要求 25 的工艺，其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含在一个或多个如下野生型大麦 LOX-1 的氨基酸残基之非保守性氨基酸置换：H₅₁₇，H₅₂₂，H₇₀₈，N₇₁₂ 和 I₈₆₂。

32. 如权利要求 25 的工艺，其中所述突变型 LOX-1 蛋白质包含在一个或多个如下野生型大麦 LOX-1 的氨基酸残基之非保守性氨基

**酸置换：H₂₆₁，H₅₁₂，H₇₇₅，F₂₅₉、F₂₆₇，F₇₁₃，W₅₁₈，R₅₅₁，R₇₂₅，D₇₇₈
和 K₂₇₃。**

低脂氧化酶 1 大麦

本申请是于 2001 年 1 月 22 日, 指定所有的国家, 以一个丹麦公司——嘉士伯研究实验室 (Carlsberg Research Laboratory) 的名义作为 PCT 国际专利申请提出申请的。

发明领域

本申请是在植物生物技术领域。更具体地说, 本申请涉及编码具有剧烈降低的 9-过氧羟基十八烷酸形成活性之酶的突变型大麦脂氧化酶 1 基因 (*lox-1*)。本发明还涉及在酿酒过程中 *lox-1* 纯合的大麦品种用于减少酿制成的产品例如啤酒在贮藏过程中异味(off-flavor)的形成的用途。

发明背景

脂氧化酶是催化游离的和酯化的多不饱和脂肪酸的双氧化作用的一个酶家族 (EC 1.13.11.12), 该多不饱和脂肪酸含有 1 (Z)、4 (Z)-戊二烯构型。长期以来, 脂氧化酶催化反应的产物被怀疑为在植物谷粒/种子和从谷粒/种子获得的食物中腐败味出现的主要原因 (Robinson 等, 1995, *Food Chem.*, 54: 33-43)。脂氧化酶涉及在大豆加工过程中产生的挥发性己醛的生产, 它具有不受欢迎的香气, 限制了在食品中大豆蛋白的使用。人们认为三种在大豆种子中表达的脂氧化酶同工酶有助于脂类氧化和己醛形成。为了减少己醛形成和改善它们的香味稳定性, 已生产了缺乏一种或多种这些同工酶的大豆突变体。这一方法的成果已由 Hildebrand 等, 1990, *J. Agric. Food Chem.* 38: 1934-1936 所评估。缺乏大豆脂氧化酶 3 的突变体产生较高的己醛水平, 表明该同工酶转化由脂类氧化产生的 13-过氧羟基十八烷酸为非挥发性的产物。缺乏所有三种种子脂氧化酶的三-零大豆品系 (triplenull

soybean line)的野外使用特性显示这些酶对于正常的农学和种子特性不是必需的 (Narvel 等, 1998, *Crop Sci.* 38: 926-928)。

脂氧化酶还涉及水稻异味的产生, 这可在谷物贮藏过程中发生。在贮藏的谷物中可检测到游离脂肪酸的释放, 这是甘油三酯储备代谢的表现。发现水稻品种 Daw Dam 累积低水平的戊醛和己醛, 该戊醛和己醛在贮存中给予较好的香味稳定性 (Susuki 等, 1999, *J. Agric. Food Chem.* 47: 1119-1124)。这一希望的表型归因于水稻酯氧化酶-3 的缺乏, 该酯氧化酶-3 氧化不饱和脂酰基链以形成 9-羟基过氧化十八烷酸定位异构体。

人们认为脂氧化酶途径与许多分支途径结合, 并且它在植物生长和生理等许多方面的作用尚未完全了解。建议使用在种子作物中改变 9-氢过氧化作用活性的修饰的脂氧化酶途径, 调节它们对由曲霉属真菌 (*Aspergillus spp.*) 引起的真菌毒素的污染的敏感性 (WO 9726364), 这与植物病原体抗性中包含的这种途径一致, 但与这里描述的本发明的目的无关。

在许多促成啤酒香味的植物香味挥发物中, 具有 6-12 个碳链的高度不饱和醛具有特别低的器官感觉香味阈 (Meilgaard 1975, *MBAA Tech. Quart.* 12: 151-168)。反式-2-壬烯醛, 是该类群的一个成员, 具有极低的 0.01 ppb 的香味阈值并赋予啤酒令人不快的稻草样、“硬纸板”味道。由反式-2-壬烯醛引起的特征性异味是贮存 1-3 个月或更长的啤酒的普遍特征, 并对于窖藏啤酒的香味特别有害, 该窖藏啤酒是用浅色麦芽酿制并具有柔和的香味。

人们早已知道亚硫酸盐改善啤酒的香味稳定性, 其不仅通过结合氧并充当抗氧化剂, 并且还通过形成存在于啤酒中的具有醛和酮的挥发性亚硫酸氢盐加成化合物。啤酒中亚硫酸盐的两个主要的来源是通过发酵过程中酵母经硫的同化途径产生亚硫酸盐, 和在包装前将亚硫酸盐加入啤酒。增强酵母亚硫酸盐生产和分泌的发酵条件将允许从存在于麦芽汁中的羰基形成亚硫酸盐-羰基加合物, 并防止它们通过酵母的进一步代谢 (Dufour 1991, *Proc. Eur. Brew. Congr.*, Lisbon,

209-216 页) 以这种形式羰基 (例如乙醛和双乙酰) 可转移到啤酒中。在啤酒熟化过程中, 亚硫酸盐防止羰基化合物反式-2-壬烯醛出现的能力已通过使用一个酵母菌株酿造啤酒得以证实, 其中所述酵母的硫同化途径被阻断 (Johannesen 等, 1999, *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.*, Nice, 655-662)。装瓶后, 通过在 37°C 贮存 7 天强制熟化啤酒, 这以后发现反式-2-壬烯醛的水平大大超过味觉阈限。如果在装瓶前向低亚硫酸盐的啤酒中加入 10ppm 的亚硫酸盐, 在强制熟化过程中反式-2-壬烯醛的出现明显减少。亚硫酸盐和羰基化合物之间的反应是可逆的, 并且在热力学和动力学的控制下。亚硫酸盐化合物的表观平衡常数从羰基化合物的 10^{-6} M (例如乙醛、己醛、和癸醛), 到双乙酰和丙酮酸盐的 10^{-3} (Dufour 1991, 出处同前)。在啤酒贮藏过程中, 由包装而产生的气体交换将允许氧气进入啤酒造成亚硫酸盐损失, 这样较弱的亚硫酸氢盐加合物将分解, 使游离羰基出现在啤酒中。而亚硫酸盐毫无疑问地增强啤酒香味稳定性, 特别是在短期内, 在包装的啤酒中其保持力极大程度上取决于由包装而产生的气体交换和温度。在酿制的啤酒中, 发酵过程中生产的亚硫酸盐的自然水平是可变的, 并且装瓶前亚硫酸盐的加入不是一个普遍接受的方法。由于这些原因, 亚硫酸盐独自不能提供在全世界所使用的不同的啤酒贮藏条件下增强啤酒长期的香味稳定性的可靠方法。

通常公认在啤酒中发现的反式-2-壬烯醛产生自从大麦谷粒脂类衍生的多不饱和脂肪酸的氧化, 其中 18-碳链脂肪酸, 亚油酸[分类为 18;2, n-6 多不饱和脂肪酸 (Broun, Gettner 和 Sommerville 1999, *Annu. Rev. Nutr.* 19: 197-216)]是最丰富的。然而, 由此形成反式-2-壬烯醛的机制在文献中很少一致。已提出导致反式-2-壬烯醛从多-不饱和脂肪酸形成的酶促途径的存在, 但是从没有在大麦谷粒中或麦粒发芽的过程中实验证明各个酶促步骤 (Gardner 1988, *Adv. Cereal Sci. Technol.* 9: 161-215)。已提出将使用反义或共抑制基因技术减少大麦谷粒中的脂氧化酶-1 的水平, 并因此控制 9-羟基过氧化和在制成的大麦谷粒中减少乙醛和乙醇的水平概念作为控制异味形成的方法, 但

是没有报道这种方法的结果 (McElroy 和 Jacobsen, 1995, *Bio / Technology* 13: 245-249)。

已开发了一种强制试验作为评估啤酒反式-2-壬烯醛效能的方法, 其中在麦芽汁或啤酒中反式-2-壬烯醛的形成是通过在减低的 pH 的条件下提高样品温度诱导的 (100°C, pH 4.0 持续 2 小时)。把麦芽汁和酿制的啤酒中的反式-2-壬烯醛的效能与干麦芽中的脂氧化酶活性的总水平联系起来努力显示, 脂氧化酶可促成反式-2-壬烯醛在熟化啤酒中的出现 (Drost 等, 1990, *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 48: 124-131)。然而, 大麦麦芽中的脂氧化酶活性在麦粒发芽过程结束时由窑干过程中酶失活的程度所调节的事实严格限制了从这一研究得出的结论。因此, 仅检测了残余的麦芽脂氧化酶活性对得到的麦芽汁和酿制的啤酒中的反式-2-壬烯醛效能的影响。该研究没能评估在大麦谷粒的发育和麦粒发芽过程中催化脂氧化酶酶促途径中第一步的脂氧化酶, 以及它们作为在啤酒中发现的反式-2-壬烯醛水平的决定因素的作用。实际上, 缺失一种或多种脂氧化酶同工酶的大麦栽培变种的缺乏造成不可能提供关于在大麦麦芽中控制反式-2-壬烯醛的形成之脂氧化酶途径的作用的令人信服的证据。当与自动氧化/化学途径比较时, 需要这样的实验以评估酶促途径对啤酒中反式-2-壬烯醛形成的贡献。酿酒过程包括麦芽汁沸腾的高温步骤, 其中提出会发生这些非酶促反应 (Noel 等, 1999, *J. Agric. Food Chem.* 47: 4323-4326)。

发明综述

本发明提供了一种具有大大降低的脂氧化酶-1 活性的大麦栽培变种。在一个实施方案中, 本发明的大麦植物含有一个表达水平大大降低了的异构酶脂氧化酶-1 的突变型 *lox-1* 基因。在另一个实施方案中, 大麦植物含有表达野生型 *lox-1* 之反义序列的异源核酸序列, 因此降低了酶的活性。

如本文所显示的, 从本发明的降低了脂氧化酶的大麦生产的麦芽和麦芽汁 (例如, 从纯合突变型 *lox-1* 基因的大麦栽培变种生产的),

可用于生产具有明显增强的香味稳定性和反式-2-壬烯醛水平降低的啤酒，特别是在已知促进 T2N 出现的条件下。本发明证实大麦麦芽脂氧化酶-1 生产 9-羟过氧化-十八双酸 (9-HPOD) 的能力，与啤酒中反式-2-壬烯醛的存在之间的关系。本发明进一步证实在酿酒过程中纯合突变型 *lox-1* 基因的大麦，在贮存过程中和暴露于提高的贮存温度的条件下，改善了啤酒的香味稳定性的用途。这些特性提高了啤酒的质量，并用于延长货架期和减少在转运和贮存过程中制冷啤酒的需要。

本发明提供了具有降低的脂氧化酶-1 活性的大麦植物及其部分，包括表达本文所描述的突变型 LOX-1 蛋白质的大麦植物，以及用于生产这些大麦植物、植物部分、植物产品的方法，和具体的从本发明的大麦植物生产的麦芽和啤酒产品。

附图简述

图 1 是显示抑制剂去甲二氢愈创木酸 (NDGA) 对从发芽 3 天的大麦谷粒的胚纯化的脂氧化酶 1 和 2 的活性之免疫亲和性的影响的曲线图。

图 2 是显示从开花后 5 天到完全成熟 (FM) 的过程中，品系 G 和栽培变种 Vintage 发育中的谷粒之鲜重的曲线图。每个测定是取自 6 个穗状花序的平均单个谷粒重。

图 3 是显示从开花后 5 天到完全成熟 (FM) 的过程中，品系 G 和栽培变种 Vintage 的发育中的谷粒的干重的曲线图。每个测定是取自 5 个谷粒中的三个样品的平均单个谷粒重。

图 4 是显示从开花后 5 天到完全成熟 (FM) 的过程中，品系 G 和栽培变种 Vintage 的发育中谷粒中的总脂氧化酶活性的曲线图。

图 5 是显示在品系 G 之发育中的谷粒中由脂氧化酶活性氧化亚油酸的 9-HPOD 和 13-HPOD 产物的曲线图。

图 6 是显示品系 G 和栽培变种 Vintage 的发芽谷粒的胚中的总脂氧化酶活性，表达为 $\mu\text{mol}/\text{min}/10$ 个胚 (U/10 个胚) 的曲线图。

图 7 是显示在品系 G 和栽培变种 Vintage 的发芽谷粒的胚中由脂

氧化酶活性氧化亚油酸的 9-HPOD 和 13-HPOD 产物, 显示 9-HPOD 和 13-HPOD 水平的曲线图。

图 8 是显示脂氧化酶 1 的免疫检测的蛋白质印迹, 该脂氧化酶存在于从开花后 5 天到完全成熟(FM)的品系 G 和栽培变种 Vintage [wt] 的发育谷粒的胚中。

图 9 是显示在发芽 0-6 天的品系 G 和栽培变种 Vintage [野生型] 的谷粒胚中脂氧化酶-1 的免疫检测的蛋白质印迹。

图 10 是用 *lox-1* cDNA 的 3'非转录区探测的 Northern 印迹, 显示在从开花后 5 天到完全成熟(FM)的品系 G 和栽培变种 Vintage [wt] 的发育谷粒中检测的脂氧化酶 1 转录物。

图 11 是用 *lox-1* cDNA 的 3'非转录区探测的 Northern 印迹, 显示在发芽 0-6 天的品系 G 和栽培变种 Vintage [w-t]的谷粒胚中检测的脂氧化酶 1 转录物。

图 12A-12G 是 *lox-1* 野生型栽培变种 Vintage 等位基因 (WT) 和品系 G 等位基因 (LG) 的启动子和转录区的核苷酸序列比对。在基因序列中的转录起始位点 (+1)、ATG 起始密码子 (+69) 和翻译终止密码子 (+4231) 下面划线。在品系 G 等位基因中鉴别的核苷酸突变以粗斜体显示并用星号指出。

图 13 是栽培变种 Vintage (野生型) 的 *lox-1* 基因和品系 G 的突变型 *lot-1* 基因的示意图。从 +1 到 +4375 的转录物由 7 个外显子 (画点的框) 和 6 个内含子 (白色框) 组成。显示了 *lox-1* 基因中的两个突变

图 14 是用于野生型 *lox-1* cDNA 和 *lox-1* 基因以及品系 G 的突变型 *lox-1* 基因的瞬时表达的基因盒的示意图。在具有内含子 1 (Ubi-1) 的组成型玉米泛素启动子和 nos 终止子之间克隆脂氧化酶编码序列。

图 15 是显示用包含野生型 *lox-1* cDNA、来自品系 G 的突变型 *lox-1* 基因、WT *lox-1* 基因和一个对照 GUS 报道基因的基因盒转染的大麦糊粉原生质体中的脂氧化酶活性的条线图。通过 KI 的氧化和分光光度计确定数量在微量滴定板中分析转染的原生质体提取物中的脂氧化酶活性。提取物中脂氧化酶 1 的活性表示为单位/ μg 蛋白质, 并显示 2

份重复试验的 3 次测定的平均值。

图 16 是一个序列比对，该序列比对显示野生型和突变型 *lox-1* 基因之间的 RFLP 是由于在核苷酸 2347 位点上的点突变，产生一个额外的 *AatII* 限制位点。

图 17 是在聚合酶链反应-切割扩增的多态位点 (PCR-CAPS) 分析中，扩增和切割的 *lox-1* PCR 片段的示意图。PCR 引物的位置由箭头指示，*AatII* 位点显示于基因之上 (序列位置)。PCR 产物中的外显子和内含子区域分别通过点和白色框区分，并给出 *AatII* 消化片段的大小。

图 18 是一个电泳的琼脂糖凝胶，该凝胶显示在 PCR-CAPS 分析的第一步中从品系 G 和栽培变种 Vintage 基因组 DNA 扩增的 *lox-1* PCR 片段 (652bp)。

图 19 是一个电泳的琼脂糖凝胶，该凝胶显示在野生型和突变型 *lox-1* 基因中由 PCR-CAPS 检测的 RFLP。突变型基因的 *AatII* 消化片段包括唯一的 313bp 的限制性片段，用星号指示。

图 20 是一个表格，该表格显示品系 G 对栽培变种 Alexis 的单隐性基因对 *ll* (低脂氧化酶特性) 的回交程序。*LL* 基因型是表达野生型脂氧化酶活性 (显性等位基因) 的植物，*ll* 基因型是表达低脂氧化酶 (隐性等位基因) 的植物。*Ll* 是含有野生型和低脂氧化酶等位基因的杂合植物。既然低脂氧化酶特性是一种隐性特性，*Ll* 植物显示野生型脂氧化酶活性。在每一轮回交后 (包括自授粉)，预期 *ll* 子代占 25% 的子代。显示了观察到的低脂氧化酶活性的频率。具有杂合的低脂氧化酶等位基因的栽培变种 Alexis 遗传背景的计算百分比以 %Alexis 表示。

图 21 是一个电泳的琼脂糖凝胶，该凝胶显示在品系 G-Alexis 回交程序的 *ll* 子代中的突变型 *lox-1* 基因的 PCR-CAPS 检测。对品系 G (泳道 2)、栽培变种 Vintage (泳道 3)、第三 (泳道 4) 和第四次回交 (泳道 5-9) 的 *ll* 子代的基因组 DNA 进行 PCR-CAPS 分析。对照，回交的高 *lox* 品系 (泳道 10)。

图 22A-22B 是大豆脂氧化酶 LOX-1(Gm1)、LOX-2(Gm2)、LOX-3(Gm3) 和大麦脂氧化酶 LOX-1(Hv1) 和 LOX-2(Hv2) 的氨基酸序列的比较性比对。

发明的详细描述

根据本发明，提供了用于生产例如啤酒的一种饮料的植物原料、植物产物和方法，该饮料具有降低含量的异味化合物反式-2-壬烯醛，这样，在贮藏过程中和暴露于提高温度的条件下的饮料，例如啤酒，相对于对照饮料，香味稳定性得到改善。更具体地说，本发明提供的大麦品种，其发育和发芽的谷粒产生酶的活性水平大大降低的脂氧化酶-1，称之为 LOX-1。这种大麦品种，例如，当在啤酒酿造过程中使用时，与对照的大麦品种相比较，产生具有降低的反式-2-壬烯醛水平的啤酒。

下文描述了用于生产、表征、和证实具有大大降低的 LOX-1 活性的大麦品种的方法，以及这种类型的大麦用于生产香味稳定的啤酒的用途。

1. 定义

如本文所使用的，下列术语具有指示的定义：

“植物部分”是指植物或植物的特定部分，例如茎、叶、根、花、种子、谷粒、果实或芽。

“LOX-1”是指脂氧化酶-1 蛋白质；“lox-1”是指编码 LOX-1 的基因。

“突变型大麦 lox-1”是指编码突变型脂氧化酶 1 多肽的诱变处理的大麦基因。

“未突变对照”是指植物、核酸、基因、多肽、植物部分、或包含野生型基因或蛋白质的植物产品。

“异源的”是指非天然序列，例如衍生自另一种类的序列，或基因工程重组的序列或不同于天然序列的合成序列。

“植物产物”是指从植物或植物部分加工得来的产物，包括例如麦芽和麦芽汁。

“酸性氨基酸”是指天冬氨酸或谷氨酸。

“碱性氨基酸”是指组氨酸、赖氨酸或精氨酸。

“极性氨基酸”是指苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬酰胺、或谷氨酰胺。

“器官感觉的特性”是指吸引嗅觉和味觉的特性，例如训练有素的品尝小组分析它。

“酿造的产品”是指通过捣碎、煮沸和发酵制成的产品，例如啤酒。

“减少的反式-2-壬烯醛”是指与野生型（对照）的情况相比少于约 50%。

2. 脂氧化酶活性

脂氧化酶催化多不饱和脂肪酸的氧化。在大麦中，已知异构酶 LOX-1 和 LOX-2。LOX-1 主要催化多不饱和十八烷脂肪酸的 9-氢过氧化作用，而 LOX-2 主要催化多不饱和十八烷脂肪酸的 13-氢过氧化作用。下面的实施例中显示的数据表明大麦 LOX-1 9-氢过氧化活性和啤酒中反式-2-壬烯醛存在之间的关系。因此，具有降低了 LOX-1 活性的大麦可用于生产与对照相比具有减少的反式-2-壬烯醛水平和/或效力的啤酒。

3. 低脂氧化酶大麦的生产

可使用已知的各种遗传学方法生产本发明的植物，即，以稳定的、可遗传的形式降低在大麦植物中表达的脂氧化酶 1 的酶活水平。这些方法包括，但不限于反义技术和突变，例如化学和辐射诱导的突变，以及定点突变。

大麦转化。可用设计用于操纵 *lox-1* 基因表达或改变 *lox-1* 基因结构的多种核酸分子转化大麦。各种方法例如，根癌农杆菌介导的转移

(Tingay 等, 1997, *Plant J.* 11: 1369-1376), 粒子轰击(Wan 和 Lemaux, 1994, *Plant Physiol.*, 104: 37-48, 或聚乙二醇(PEG)-介导的 DNA 摄入(Funatsuki 和 Kihara, 1995, *Theor. Appl. Genet.*, 91: 707-712), 可用于成功引导核酸进入大麦细胞, 例如进入原生质体、愈伤组织或胚。

可使用各种启动子驱动感兴趣的基因的表达。对于包括反义序列之包含 *lox-1* 的载体表达, 可使用天然 *lox-1* 启动子区域。*Lox-1* 的启动子序列包含于核苷酸 2602-3511, 它包括编号为 U83904 的 EMBL 的 5'UTR。换句话说, 可使用组成型驱动感兴趣的基因表达的启动子, 例如 Ubi.1 玉米遍在蛋白启动子(Wan 和 Lemaux, 出处同前; Kjaerulff 等, P. Mathis, 编, 1995, *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, II 卷, 151-154)。表达载体还可含有一个转录终止区, 例如胭脂碱合酶基因的 3'终止子(3'-nos)(Bevan, 等, 1983, *Nuci. Acids Res.*, 11: 369-358)与在转基因大麦中表达的基因融合(Wan 和 Lemaux, 出处同前; Funatsuki 和 Kihara, 出处同前)。

表达载体还可包含一个基因, 该基因允许当载体成功整合进入细胞时, 经转化细胞的筛选。这些基因可编码抗生素或除草剂抗性基因, 例如新霉素磷酸转移酶(*npt*)或膦丝菌素乙酰基转移酶(*bar*)基因。当表达时, 这些抗性基因允许转化的细胞在分别含有新霉素或 bialaphos 的培养基中生长(见例如, Wan 和 Lemaux, 出处同前; Funatsuki 和 Kihara, 出处同前; Kjaerulff 等, 在 P. Mathis 中, 出处同前)。

转化后, 细胞可在选择性培养基中生长一段时间, 然后培养以使苗形成, 然后是根系统, 而后形成小植株。Funatsuki 和 Kihara 开发了成功的大麦转化方法(出处同前), 其中用含有新霉素磷酸转移酶的表达载体经 PEG 转化大麦原生质体, 随后在新霉素中选择, 产生含有转基因的可育植物。显示转基因整合进入基因组, 并且大多数转基因植物表达由转基因编码的蛋白质。这些转基因植物杂交后还能传递和表达转基因。

应当理解各种转化方法、表达载体、启动子、选择性标记等是已知的并对大麦的转化是有用的。

大麦诱变。使用嵌合的 RNA/DNA 寡核苷酸, *lox-1* 基因可被定向用于位点专一诱变。这些嵌合的 RNA/DNA 寡核苷酸已显示在希望的位点成功引导突变进入植物细胞 (Zhu 等, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8768-8773; 和 Beetham 等, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 8774-8778) 和哺乳动物细胞 (Yoon 等, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 2071-2076)。可以各种方法将嵌合的 RNA/DNA 寡核苷酸转化进入大麦原生质体或感兴趣的细胞, 例如使用上文描述的 PEG 介导的或粒子轰击介导的转化方法。然后可通过组织培养使各个原生质体或细胞再生至完整的可育植物, 并可例如使用下文实施例中详细描述的方法为基础的方法证实和跟踪突变的发生。

这种定点诱变的方法可用于 *lox-1* 基因中的突变特异性残基。*Lox-1* 基因可在启动子区域的一个或多个核苷酸位置突变, 以下调或消除 *lox-1* 的转录。特异性诱变还可用于向 *lox-1* 编码区导入改变, 例如, 降低酶的活性。这种突变包括, 但不限于, 导致移码的插入、缺失和取代, LOX-1 蛋白的截短、和/或酶底物腔的中性或疏水性特征的改变。

反义表达。*Lox-1* 表达的减少还可通过在大麦细胞中的 *lox-1* 反义构建物的表达完成。已报道了在大麦中反义构建物的表达以减少靶蛋白质表达的方法, 例如, Gilpin, M. J. 等, 1998, 在: 光合作用: 机制和效应 (Photosynthesis: Mechanisms and Effect), G. Garab, 编, IV 卷, 2983-2986 中; Kjaerulff 等, 1995 在: 光合作用: 从光到生物圈 (Photosynthesis: from Light to Biosphere), P. Mathis, 编, II 卷, 151-154 中。

大麦细胞可以用含有反义核酸序列的表达构建物转化。该表达构建物产生一种反义 RNA 分子, 该反义 RNA 分子能够通过互补碱基配对, 特异性地与从野生型 *lox-1* 基因产生的至少一部分的 mRNA 结合,

并能够打断前一 mRNA 的剪接或这种 mRNA 的翻译。一个组成型或组织/时序特异性启动子，例如，上文描述的大麦 *lox-1* 启动子能够驱动反义核酸序列的表达。

化学诱变。化学诱变剂叠氮化钠 (NaN_3) 通常用于大麦的诱变，并已知在大麦基因组的 DNA (脱氧核糖核酸) 序列中诱导稳定的突变 (Olsen 等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8043-8047)。其它化学诱变剂，例如，甲磺酸乙酯 (EMS)、叠氮化甘油 (AG, 3-叠氮-1,2-丙二醇)、甲硝脲 (MNU)、和马来酰肼 (MH) 也可用于诱导 DNA 突变 (Rank, J.等, 1997, Mutat. Res. 390: 121-7)，也可使用紫外线照射。

如下文实施例中所显示的，大麦栽培变种 (cv) Vintage 和栽培变种 Caruso 的谷粒用叠氮化钠处理并通过自体受精繁殖到第三代 (M3)。

4. 低脂氧化酶大麦的鉴定和选择。

例如可通过脂氧化酶活性的分析实现在谷粒中具有降低的脂氧化酶异构酶活性的大麦植物的鉴定和选择。酶促分析可用于确定已知存在于成熟或发芽谷粒中的两种主要的脂氧化酶 LOX-1 和 LOX2 的活性。这种分析可区别 LOX-1 和 LOX-2 的活性。

LOX-1 和 LOX2 的一种选择性分析是基于通过脂氧化酶的多不饱和脂肪酸的氧化作用，和这种氧化作用的氢过氧化产物的分光光度计检测。相对于 LOX-2，LOX-1 的这种分析之特异性是利用了 LOX-1 对于抑制剂的比较不敏感性，例如对 NDGA。

选择性分析还可通过使用免疫沉淀选择性地从试验中除去 LOX-1 或 LOX-2 完成。特异性抗-LOX-1 和抗-LOX-2 抗体，例如，单克隆抗体，可如 Holtman 等, 1996, 出处同前，中描述的从纯化的 LOX-1 或 LOX-2 中制备。

可使这些分析方法适合于微滴定板试验步骤，或其它已知允许许

多样品的快速筛选的可重复的、高通量的试验形式。这些试验可有效地以非破坏性形式筛选发芽谷粒的叶尖，使得在筛选中选择的籽苗可进一步繁殖。

在推定的突变中 LOX-1 活性的损失可通过酶活分析证实。例如，谷粒提取物可与亚油酸一起培养，并且例如使用反向 HPLC 分析亚油酸氧化产物。从亚油酸形成的 9-HPOD 和 13-HPOD 的相对含量提供了 LOX-1 活性的测定方法，其主要产物是 9-HPOD。

如下文实施例所显示的，通过抑制剂存在的情况下的氧化分析及通过免疫沉淀分析，筛选诱变处理的栽培变种 Vintage 和栽培变种 Caruso 的 M3 代的约 20,000 颗谷粒的 LOX-1 和 LOX-2 的活性。使用这些筛选方法，发现在栽培变种 Vintage 中具有一个 LOX-1 活性较大降低的突变体，并称之为品系 G (Line G)。该突变体的表型可在 M4 和 M5 代遗传。

国立工业和海洋微生物保藏有限公司 (National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria) (NCIMB), 23 St. Machar Drive, Avberdeen, AB243RY, Scotland, UK, 在布达佩斯条约的条款下，于 2001 年 1 月 4 日保藏了从品系 G 大麦生产的种子，保藏号为：NCIMB 41078。

5. 遗传序列

用于说明在本发明大麦植物中低脂氧化酶表型的基因型改变的精确描述，在育种计划中对于鉴定具有这种遗传改变的植物和对于使这种遗传特性杂交进入其它大麦栽培变种是有用的。可使用各种已知的分子和生物化学方法确定低脂氧化酶表型的遗传基础。

通常认为顺式作用和反式作用遗传序列均可决定给定的基因在基因组中的表达以及该基因产物的活性。基因表达中的控制点包括时程调节、组织特异性和基因转录速度、转录物的稳定性和转录物翻译的速度。基因表达和稳定性的水平以及编码的酶的比活性水平将决定在组织中检测的酶活水平。

植物基因序列的改变可通过已知的基因组相关部分的 DNA 测序确定, 而 Northern 印迹分析提供了一个在给定的植物组织中监测稳定的转录物水平的方法。可通过从组织中提取酶并测定酶活评估在植物组织中表达的酶。

如下文实施例所显示的, 决定在栽培变种 Vintage 中诱导的品系 G 突变体之低脂氧化酶表型的遗传改变的同源性可以下面的方式确定。存在于亲本栽培变种 Vintage 和品系 G 中的编码 LOX-1 蛋白的结构基因通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增, 并且测定调节基因表达的上游启动子序列以及含有内含子和外显子的整个编码序列。

来自品系 G 和来自野生型栽培变种 Vintage 的 *lox-1* 基因的核苷酸序列的比较揭示在 2 个外显子中的 2 个核苷酸取代, 其中之一 (在位置+2347) 导致在表达的蛋白质中非保守性氨基酸替换 (甘氨酸³⁶⁸ 变为天冬氨酸)。

图 22 显示大豆 (Gm: *Glycine max* L) 脂氧化酶 LOX-1 (编号 P08170)、LOX-2 (编号 P08170)、LOX-3 (编号 AAB41272) 和大麦 (hv: *Hordeum vulgare*) 脂氧化酶 LOX-1 (编号 P29114) 和 LOX-2 (编号 AAB70865.1) 的序列对比。保守的氨基酸残基和带电残基的保守性替换以粗体显示。在序列比对之上显示了大豆 *Glycine max* 的 LOX-3 的二级结构排布, 其中 H= α 螺旋, E= β 链, 并且显示了与酶功能相关的残基 (通过箭头或实心圆识别), 如 Skrzypczak-Jankun 等, 1997, *Proteins* 29: 15-31 所描述的。

在大豆 LOX-3 中参与非血红素铁结合或催化作用所必须的氨基酸残基 (*) 包括: H₅₁₈、H₅₂₃、H₇₀₉[3N 原子]; N₇₁₃、I₈₅₇。大麦 LOX1 中的等同残基是 H₅₁₇、H₅₂₂、H₇₀₈、N₇₁₂ 和 I₈₆₂。在催化中具有预测作用的大豆 LOX-3 残基是 (●): H₂₆₆、H₅₁₃、H₇₇₆、F₂₆₄、F₂₇₂、F₇₁₄、W₅₁₉、R₅₅₂、R₇₂₆、D₇₆₆、D₇₇₉、K₂₇₈。大麦 LOX1 中的等同残基是 H₂₆₁、H₅₁₂、H₇₇₅、F₂₅₉、F₂₆₇、F₇₁₃、W₅₁₈、R₅₅₁、R₇₂₅、D₇₇₈ 和 K₂₇₃。

位于蛋白质二级结构的环和螺旋-加帽位置的脯氨酸 (P₈₆、109、167、171、223、234、291、311、324、343、345、371、381、382、486、541、548、600、616、627、685、726、734、788、

829, 833, 839, 857) 和甘氨酸 (G_{49, 67, 68, 70, 91, 107, 137, 187, 192, 210, 217, 218, 260, 306, 307, 336, 392, 409, 458, 474, 490, 569, 607, 674, 676, 720, 736, 783, 828, 850, 855}) 残基 (+), 可促进肽主链的急剧扭转和折叠。

相关植物的脂氧化酶的序列比对显示大麦 LOX-1 中的甘氨酸-368 是强烈保守的。而且, 对应于大豆 LOX-1 中的甘氨酸-353 的这一残基是全部 58 个残基中的 35 个高度保守的残基之一, 从其晶体结构可见, 所述 58 个残基沿酶的底物腔 II 排列。在图 22 所显示的植物脂氧化酶序列比对中用框突出显示了这些保守残基 (Minor 等, 1996, *Biochemistry* 35: 10687-10701), 包括如下大麦 LOX-1 残基: Y₂₂₄, L₂₆₈, W₃₅₅, E₃₆₄, G₃₆₈, V₃₆₉, N₃₇₀, I₃₇₄, L₄₂₄, L₄₉₉, K₅₀₁, A₅₀₂, V₅₀₄, D₅₀₈, S₅₀₉, H₅₁₂, Q₅₁₃, L₅₁₄, H₅₁₇, W₅₁₈, H₅₂₂, I₅₅₆, L₅₅₉, A₅₆₀, L₅₆₄, I₅₆₅, I₅₇₀, T₅₇₄, S₅₈₅, Q₇₁₅, Y₇₁₈, N₇₂₄, R₇₂₅, P₇₂₆, T₇₂₇, L₇₇₂ 和 I₈₆₂。35 个保守性残基中除 7 个外全部是中性或疏水性残基。大麦中甘氨酸-368 位置上的带电残基或在另一个沿底物腔 II 排列的保守性中性或疏水性残基的置换, 可能扰乱酶的结构和功能特性。大麦品系 G LOX1 (◆) 中 G 变为 D₃₆₈ 的突变位于 α -螺旋 H6 和 β -链 E12 之间。

如图 22 所示, 脂氧化酶家族的酶具有高度的序列保守性, 这反映在对于包括大豆 LOX1 和 LOX3 的植物脂氧化酶家族的一些成员测定的保守的二级结构中, (Skrzypczak-Jankun 等, 1997, 出处同前)。大麦 LOX1 与大豆 LOX3 具有 56.9% 的序列同一性, 和 67.8% 的序列相似性。在大豆 LOX3 异构酶中的一些氨基酸残基被鉴定为非血红素铁的配体, 或表明对它的活性是必须的 (表示为*●)。由于大麦 LOX1 和大豆 LOX3 之间高度的序列保守性, 有理由预测存在于与鉴定的对于 LOX3 的功能是重要的序列同源之大麦 LOX1 序列中的残基, 对酶的活性也是关键的。因此, 在任何这些位置上的非保守的氨基酸置换, 包括对应于沿底物腔排列的大豆 LOX3 的 35 个高度保守残基的大麦 LOX1 中的那些残基的置换, 以及在对酶活必需的其它位置上的置换, 很可能降低脂氧化酶的活性。

已知当它们位于二级结构元件之间时, 氨基酸残基脯氨酸和甘氨酸

酸促进肽主链的扭转，这使蛋白质呈现折叠的三级结构。在螺旋加帽基序中脯氨酸和甘氨酸残基也是常见的 (Parker 和 Hefford, 1997, *Protein Eng.*, 10: 487-496, <http://www.expasy.ch>)。在品系 G LOX1 中的单一非保守置换，其中位于两个预测的结构元件之间的甘氨酸为天冬氨酸取代，则导致酶活性的明显损失。因此预测：位于结构元件外部的区域中，引起大麦 LOX1 中在一个或多个脯氨酸或甘氨酸残基上的非保守性氨基酸置换的 LOX-1 基因中的突变，可同样地防止天然蛋白质的折叠并因此降低编码的酶的活性。

因此，在一个实施方案中，具有降低是脂氧化酶 1 活性的本发明的有用的突变型大麦植物包含一个突变的核酸序列，该序列通过插入一个或多个酸性、碱性或极性氨基酸改变酶之底物腔的中性或疏水特性。例如，一个有用的核酸序列 [SEQ ID NO: 11 编码大麦 LOX-1 蛋白质 [SEQ ID NO: 12] 包含在氨基酸 368 从甘氨酸到 Xaa 的置换，其中 Xaa 是一个酸性、碱性、或极性氨基酸。本发明的大麦突变型 LOX-1 的一个特异性氨基酸序列是其中 Xaa 为天冬氨酸，例如品系 G。

如下文实施例中所显示的，品系 G 中基因型的改变对 *lox-1* 基因的表达没有可察觉的影响，但是在品系 G 成熟和发芽谷粒中检测到的 LOX-1 活性约为亲本品系栽培变种 Vintage 的谷粒中检测到的 9%。为了提供在品系 G 的 LOX-1 中的氨基酸突变是造成低-*lox-1* 表型之原因的直接证据，在取自大麦糊粉的原生质体中，品系 G *lox-1* 和栽培变种 Vintage *lox-1* 的编码序列被瞬时表达，并且与野生型 LOX-1 酶相比显示出突变型 LOX-1 酶的活性大大降低了。

6. 繁殖品系之间的转移

本发明基因型的大麦植物的遗传特征改变之检测用于鉴定在大麦品系中特定遗传特征的存在，并用于促进育种计划中繁殖品系之间该特征的转移。可利用各种分子方法检测染色体组序列中的改变。这些方法包括，但不限于，限制性片段长度多态性的检测 (Gebhardt 和 Salamini 1992, *Int. Rev. Cytology.*, 135: 201-237) 和基于定量 PCR

的检测方法，例如使用荧光引物进行扩增，例如，TaqMan 引物探测系统（Ibrahim 等，1998，Anal. Chem 70，2013-2017）。检测方法的选择将取决于特定遗传特征，但较佳地应是快速的并提供清晰的可解释的数据。

如下文中实施例所显示的，提供了一个 PCR-切割扩增的多态位点试验（PCR-Cleavage Amplified Polymorphic Site assay）（PCR - CAPS）用于品系 G 的突变型脂氧化酶-1 基因的检测。在品系 G 的 *lox-1* 基因中位置+2347 上核苷酸的置换导入由 *AatII* 限制性内切酶识别的额外的位点，这可通过 PCR - CAPS 试验检测到。适当的 *Lox-1* 检测方法不限于本试验，但可同样地基于 TaqMan 技术，以及其它已知的检测方法。

如下文的实施例所显示的，PCR - CAPS 分析应用于来自回交程序的 4 代繁殖材料，其中品系 G 中低脂氧化酶表型系统地回交进入栽培变种 Alexis。显示低脂氧化酶的表型随 *lox-1* 基因的遗传而遗传，并且该表型被鉴定为隐性的并只在对 *lox-1* 基因纯合的品系中见到。

因此，本发明的植物子代包括例如在回交程序中获得的、含有突变型 *lox-1* 和表达一个低脂氧化酶表型的繁殖品系。

7. 酿造

本文证实本发明的大麦植物，包括具有低的脂氧化酶 1 活性的植物部分、植物子代、谷粒和例如麦芽和麦芽汁的植物产物，与由野生型对照大麦种类产生的饮料相比，可用于制备对于在一段有限的时间期限内，或在提高了贮藏温度的条件下，具有降低水平的游离反式-2-壬烯醛的饮料的生产。为了这些比较的目的，啤酒的亚硫酸盐含量控制在 5ppm 或以下，因为认为装瓶时较高的亚硫酸盐水平将暂时延缓游离反式-2-壬烯醛的出现。例如，从本发明描述的突变的大麦品系 G 得来的麦芽酿造的啤酒，与从对照的、非突变的大麦获得的麦芽酿造的啤酒相比，在一段有限的时间里具有稳定的器官感觉特性。

酿造试验和瓶装啤酒的评估提供了评估不同成分对成品啤酒的质

量和稳定性的影响的最好的方法。为了检测不同大麦麦芽的影响，需要足够的大麦谷粒进行麦粒发芽和在中试规模和半生产规模上的酿造试验。在大麦增殖过程中，可评估大麦品系的野外使用特性。大麦品系的发芽特性可在中试或工业生产规模的发芽过程中评估，并较佳地应基于国家麦芽制造的质量推荐，例如欧洲酿酒协定（European Brewing Convention）对于麦芽制造质量的推荐（Analytica-EBC/European Brewing Convention, 1998, Publ. Hans Carl Getranke-Fachverlag, Nurnberg, Germany）。中试或半工业生产规模酿造后，啤酒装入棕色瓶子中并冷却至 5℃ 以最佳保存。在这一阶段，可由经过培训的、能够检测包括异味化合物反式-2-壬烯醛的特定啤酒风味的品尝小组分析鲜啤酒。另外，对于包括反式-2-壬烯醛的主要风味成分采用化学方法分析啤酒。然后在已知显示啤酒的长期贮藏稳定性的各种贮藏条件下，对啤酒重复这些啤酒质量分析的方法，例如强制熟化处理。

如下文实施例所显示的，为了在一个工业化麦芽制造坊获得 10 吨该品系的麦芽，经几个季节在野外增殖品系 G 的大麦。均具有野生型 LOX-1 表型的对照大麦品种栽培变种 Vintage 和栽培变种 Nevada 在相似的条件下进行发芽。从品系 G 和对照的大麦栽培变种获得的烘干的麦芽属于半工业酿酒试验所需的规格范围。

以 30-hl 的规模进行酿造试验，新装瓶啤酒的评估显示从品系 G 和对照栽培变种的麦芽酿造的啤酒含有的反式-2-壬烯醛的含量低于味觉阈，并且品尝小组认为是满意的。两种强制熟化处理（在 37℃ 贮藏 7 天或在 30℃ 贮藏 6-12 周）用于评估啤酒的香味稳定性。对于品尝小组的评价以及游离反式-2-壬烯醛的水平而言，发现从品系 G 的麦芽酿造的啤酒的香味稳定性比对照麦芽生产的啤酒的香味稳定性好，并发现该改进具有统计学显著性。

实施例

在下文的实施例中进一步详细说明本发明。应理解当所示优选的

实施方案时，这些实施例仅以举例说明的方式给出。

实施例 1 从诱变处理的大麦筛选和选择脂氧化酶异构酶突变体

1. 大麦诱变

根据公开的方法用叠氮化钠诱变处理大麦 *Hordeum vulgare* 栽培变种 *Vintage* 和栽培变种 *Caruso* 的谷粒 (Kleinhofs 等, 1978 突变研究 (Mutation Research) 51: 29-35)。突变处理将点突变导入基因组 DNA, 例如, 可在编码的蛋白质中产生氨基酸的变化。突变的 M1 谷粒在温室中经过两代而增殖, 收集 M3 谷粒用于筛选。根据 Kleinhofs 等, 1978, 出处同前, 在 M2 代中观察到的单个基因形状突变的频率为每 10,000 个 M2 代的谷粒 1.0-2.7 个突变。既然大多数基因突变是隐性的并且仅在纯合状态下可被检测到, 在 M3 代中筛选突变诱导的类群, 其中预期的纯合突变体谷粒的比例将比较高。在 M3 突变诱导的材料中预期每 10,000 谷粒中 0.9-2.3 的突变频率。

2. 在 M3 突变诱导的谷粒中脂氧化酶 1 (LOX-1) 和脂氧化酶 2 (LOX-2) 的活性的非破坏性分析

开发了一种用于检测具有降低的 LOX-1 活性的突变型大麦谷粒的快速筛选方法, 并具有如下标准: 筛选步骤应不阻止谷粒/籽苗的增殖; 选择的谷粒/籽苗组织应表达可以计量的脂氧化酶活性水平; 该试验应区别 LOX-1 活性和 LOX-2 的活性; 试验步骤应包含多重样本。

发芽谷粒的不同组织中, 即枝条、根、和胚的盾片组织以及胚乳, 总脂氧化酶活性水平如下进行分析: 通过在含有 2mM NaN_3 , 和 0.5mM 苯甲基磺酰基氟 (PMSF) 的冰冷的 20mM Tris-HCl, pH 7.5 中匀浆化制备大麦籽苗组织的提取物, 随后通过在 1000g 离心 10 分钟除去不溶解的物质。在 25℃, 通过加入 2.9ml 的 20mM 亚油酸底物分析 100 μ l 提取物中脂氧化酶的活性, 该亚油酸 (游离酸, L-1376, Sigma, USA) 底物通过在 5ml 含有 1% 的 Tween 20 的水中扩散 35 μ l 的亚油酸制备。随后进行分光光度反应, 其中由于在氢过氧化物的产物中共轭二烯的

形成, 在 234nm 处吸光度 ($A_{234\text{nm}}$) 增加的速度与存在的酶活性成比例。一个单位的脂氧化酶活性定义为 ΔA_{234} =在 3-ml 的反应中每分钟 0.001, 等价于 0.12 微摩尔亚油酸的氧化。

在黑暗中发芽 4 天的谷粒的叶组织具有可检测的脂氧化酶活性的最高水平 (Holtman 等, 1996, 植物生理 *Plant Physiology* 111: 569-576)。这样选择 4-天籽苗的叶尖用于非破坏性脂氧化酶筛选分析。在 pH4.5 和 pH 9.0 之间测定总大麦脂氧化酶活性的最适 pH, 发现为 pH 6.5。因此, 选择含有 0.2M 硼酸的 25mM HEPES 缓冲液 (pH6.5) 用于筛选分析。

既然在 4 日龄籽苗的枝条中免疫检测到 LOX-1 和 LOX-2 酶 (Holtman 等, 1996, 出处同前), 使用 LOX-1 和 LOX-2 特异性分析试验。发现由 Eskin 等, 1977, *Crit. Rev. Food, 科学与营养 Science and Nutrition* 9: 1-40 所鉴定的脂氧化酶抑制剂去甲二氢愈创木酸 (NDGA) 是大麦脂氧化酶的一个选择性的抑制剂。NDGA 在 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 时, 强烈地抑制纯化的大麦 LOX-2, 而 LOX-1 保留了 47% 的活性 (图 1)。通过测定分别由 LOX-1 和 LOX-2 的亚油酸氧化产生的 9-过氧羟基十八烷酸 (9-HPOD) 与 13-过氧羟基十八烷酸 (13-HPOD) 的比, 在叶尖分析中检验这种抑制剂的选择。在栽培变种 Vintage 叶尖的脂氧化酶分析中, 加入 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ NDGA, 形成的 13-HPOD 的比例从 24.5% 下降至 9.5%。

叶尖提取物中的 LOX-2 活性的选择性分析基于 LOX-1-特异性单克隆抗体 (5D2) 的使用 (Holtman 等, 1996, 出处同前) 以免疫沉淀存在于提取物中的 LOX-1。LOX-1 沉淀后在提取物中检测到的残余的脂氧化酶活性提供了 LOX-2 活性的测定方法。使用 LOX-1 和 LOX-2 的特异性单克隆抗体 (分别表示为 5D2 和 5.8), 通过用 ELISA 分析定量提取物上清液中残余的 LOX-1 和 LOX-2 来评估该免疫沉淀的效率 (Holtman 等, 1996, 出处同前)。栽培变种 Vintage 叶尖提取物的 LOX-1 免疫沉淀除去了 85% 的 LOX-1 蛋白质和 15% 的 LOX-2 蛋白质。

在 V 底的 96 孔平板中, 通过向 20 μ l 的各个叶尖提取物加入 5 μ l 5D2-包被的 Dynabeads (Dynal) 和 75 μ l 缓冲液[20mM Tris-HCl pH 7.5, 1% v/v, 胎牛血清 (HyClone)]进行免疫沉淀。该平板在滴定板摇床上 (MTS4, IKA, Labor Technik) 4 $^{\circ}$ C 下培养 1 小时。通过在 Sigma 302-K 离心机上以 2000rpm、4 $^{\circ}$ C 下离心 10 分钟得到免疫沉淀的沉淀。如下文所述, 但要加入 100 μ l 分析缓冲液 (25mM HEPES, 0.2M 硼酸, pH 6.5), 在平底 96 孔平板中分析从各个样本获得的上清液 (70 μ l) 的脂氧化酶活性。

使 LOX-1 和 LOX-2 分析适合于高通量筛选方法。从 8 个 4 天龄发芽谷粒得到的叶尖 (1cm) 在 150 μ l 冰冷缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH 7.5) 中, 在多孔匀浆器中分别匀浆化 2 \times 30 秒 (Berg 等, 1992, Electrophoresis 13: 76-81)。3000rpm 离心 15 分钟后, 40 μ l 的各个提取物的上清液转移到平底 96 孔平板上。向各个孔中加入 170 μ l 缓冲液 (25mM HEPES, 0.2M、pH 6.5 的硼酸, 1×10^{-5} M NDGA) 和 10 μ l 的底物 (20mM 亚油酸), 然后在 25 $^{\circ}$ C 培养 20 分钟。通过加入 20 μ l 饱和的碘化钾溶液 (KI) 使该反应终止并在 25 $^{\circ}$ C 进一步培养 8 分钟。过氧羟二烯和 KI 之间的氧化还原反应产生 I₂, 它通过在一个微量培养板读数器的 350nm 处的消光最大值得以监控 (Multiskan MCC/340)。

3. 诱变处理大麦的 M3 和 M4 谷粒中潜在的脂氧化酶 1 突变型的鉴定

栽培变种 Vintage 和栽培变种 Caruso 的 M3 代的谷粒在 45 $^{\circ}$ C 贮存 6.5 天以打破休眠, 保证 95% 的发芽频率。使栽培变种 Vintage (9318) 和栽培变种 Caruso (9633) 的 M3 谷粒发芽并筛选品系, 该品系的 LOX-1 活性为 15% 或少于野生型谷粒。增殖推定的突变型品系 (50 栽培变种 Vintage 和 42 栽培变种 Caruso 品系) 到 M4 代, 收获之, 并重新筛选发芽的谷粒。经过在从各个品系中获得的 5 个叶尖的提取物中测定脂氧化酶活性后, 在一个栽培变种 Vintage 品系和六个栽培变种 Caruso 品系中证实了突变体 LOX-1 表型。当检验这 7 个推定的突变型的发芽胚中的 LOX-1 和 LOX-2 的活性时, 只有栽培变种 Vintage

突变型（表示为品系 G）显示 LOX-1 的大量减少。在成熟休眠的谷粒中，存在于胚中的脂氧化酶活性几乎全部为 LOX-1 的活性，归因于两种异构酶的不同表达形式（Schmitt 和 van Mechelen, 1997, Plant Sci. 128: 141-150）。取自品系 G 成熟干谷粒（M5 代）的胚提取物中总脂氧化酶活性与在栽培变种 Vintage 胚提取物中 $0.74 \pm 0.44 \text{U/mg}$ 蛋白质相比为 $0.06 \pm 0.04 \text{U/mg}$ 蛋白质，如实施例 1 的部分 2 中描述的使用分光光度法的脂氧化酶分析进行测定。发现品系 G 的 M4 和 M5 代的成熟胚中残余的脂氧化酶活性约为亲本品系的 9%。

实施例 2 品系 G 是具有低脂氧化酶表型的栽培变种 Vintage 突变体

在 M5 代材料中分析品系 G 的农学特性和突变体表型。进行最初的分析以证实所分析的 M5 的材料为突变体表型纯合。在 M3 代检测到的品系 G 中低 LOX-1 表型可产生显性或隐性突变。如果在 M3 代选择的品系 G 对显性突变是杂合的，那么在其随后的几代中将显示表型的分离。测定取自 M5 代的休眠谷粒之 26 个品系 G 胚的脂氧化酶活性，并与栽培变种 Vintage 野生型胚比较。在所有的品系 G 胚中的脂氧化酶活性非常低，平均为每毫克蛋白质 $0.06 \pm 0.04 \text{U}$ 脂氧化酶，与之相比较在野生型栽培变种 Vintage 胚中平均为每毫克蛋白质 $0.74 \pm 0.44 \text{U}$ 脂氧化酶。这些数据证实 M5 代中的品系 G 对于低脂氧化酶的性状是纯合的。

1. 品系 G 具有野生型植物生长生理学和谷粒发育

使品系 G 和栽培变种 Vintage 谷粒发芽并在人工气候室中，相对湿度为 80% 时，在有光照的条件下 15°C 培育 16 小时，及在黑暗的条件下 12°C 培育 8 小时。就植物的高度、每棵植物上分蘖枝的数量、开花的起始和每棵穗状花序上的谷粒数量而言，品系 G 和栽培变种 Vintage 植物的生长特征相似。从开花后 (DAF) 5 天直到完全成熟 (约 90DAF) 的发育过程中，品系 G 和野生型栽培变种 Vintage 的谷粒的鲜重 (图 2) 和干重 (图 3) 非常相近。

2. 在整个发育过程中品系 G 的谷粒具有低脂氧化酶 1 表型

测定了品系 G (M5 代) 和野生型栽培变种 Vintage 的发育大麦谷粒提取物中的脂氧化酶活性。谷粒在含有 0.1% (v/v) Nonidet P-40 (一种增强脂氧化酶提取的非离子去污剂) 的冰冷的、pH 7.5 的 20mM Tris-HCl 缓冲液中匀浆, 并在 15,000g 离心 20 分钟除去不溶解的物质。提取物中脂氧化酶活性通过极谱分析方法, 在含有 1.2mM 亚油酸的 200 μ l 氧饱和缓冲液 (0.2M 硼酸、25mM HEPES、pH 6.5) 中, 25 $^{\circ}$ C 时, 使用 Clark 型电极测定氧消耗而测定。在品系 G 和野生型谷粒的谷粒发育的最初 20 天脂氧化酶活性增加, 但是在谷粒突变的过程中只有品系 G 的脂氧化酶的活性水平下降 (图 4)。

在亚油酸氧化的过程中形成的 9-HPOD 和 13-HPOD 的相对含量提供了在谷物提取物中测定 LOX-1 和 LOX-2 活性水平的方法。在这种情况下, 从谷物提取缓冲液中略去 Nonidet P-40, 以避免氢过氧化物-消耗酶的共提取。100 μ l 的该提取物与含有 200 μ M 亚油酸的 10ml 50mM pH 6.5 的磷酸缓冲液混合, 培养 20 分钟。通过调整 pH 到 3.5 终止反应, 加入一个内标物。试验中形成的氢过氧化物结合到一个十八烷基固相柱上 (Bakerbond, Baker) 并用甲醇洗提。然后, 以由 Aarle 等, 1991, FEBS Letters 280: 159-162 描述的方法, 0.5ml/min 的流速, 通过在 C-18 柱上的反相 HPLC 分离 9-HPOD 和 13-HPOD, 该 C-18 柱采用恒溶剂洗脱溶液 (四氢呋喃: 甲醇: H₂O: 乙酸; 25: 30: 44.9: 0.1 (v/v) 用浓氨水调节到 pH 5.5) 洗脱。在 234nm 检测到氢过氧化物, 依照内标物前列腺素 B2 校正 HPOD 峰值。

图 5 显示在最初 20 DAF 过程中 13-HPOD 是存在于谷粒中的脂氧化酶活性的主要产物, 而在谷粒成熟过程中由脂氧化酶活性形成 9-HPOD。而品系 G 和野生型谷粒的提取物都具有相似的 13-HPOD 合成活性的特征, 品系 G 在 9-HPOD 合成活性上没有显示野生型的增加。这些数据与品系 G 大麦谷粒成熟过程中 LOX-1 活性的损失是一致的。

3. 品系 G 谷粒在发芽时具有低脂氧化酶 1 表型

如实施例 1 所描述的在 15℃ 时分析发芽谷粒的胚提取物中总脂氧化酶的活性。存在于休眠的野生型谷粒中的脂氧化酶活性在发芽的最初 4 天下降，然后提高（图 6）。在品系 G 中，休眠谷粒中的脂氧化酶活性非常低，但 4 天后提高。

在发芽中的胚中由脂氧化酶活性形成的 HPOD 的分析显示，9-HPOD 是存在于休眠野生型谷粒中的脂氧化酶的主要产物（图 7）。随着提取物中脂氧化酶活性的减少 9-HPOD 形成的水平下降。4 天后脂氧化酶活性的提高伴随 9-HPOD 和 13-HPOD 的形成。品系 G 休眠谷粒中低脂氧化酶活性与 HPOD 形成的缺乏有关，而 4 天后活性的提高主要产生 13-HPOD。这些数据提供了如下证据：导致 9-HPOD 形成的 LOX-1 活性在品系 G 的发育、休眠和发芽的大麦谷粒的胚中大大减少，而导致 13-HPOD 形成的 LOX-2 活性在品系 G 中没有变化。

实施例 3 品系 G 具有引起低脂氧化酶表型的突变型脂氧化酶 1 基因 (lox-1)

为了提供突变体的完整的描述，调查研究了品系 G 的低-LOX -1 表型的分子基础。进行下面的分析以提供完整的表型特征：

1. 在正在发育和正在发芽的品系 G 的谷粒中合成脂氧化酶-1

如实施例 2 所描述的，取自发育中和发芽中的大麦谷粒的胚提取物的蛋白质印迹分析与脂氧化酶活性的测定平行进行。根据 Laemmli, 1970, Nature 227: 680-685, 使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离粗提物。根据 Towbin 等,(1979)Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354, 使用半干印迹将分离的蛋白质转移到硝化纤维。如 Holtman 等, 1996, Plant Physiology 111: 569-576 所描述的, 以 500 倍稀释的 LOX-1 特异性单克隆抗体 5D2 探测印迹, 随后用与碱性磷酸酶偶联的山羊抗-小鼠抗体培养, 并如 Holtman 等, 1996, Plant Physiology 111: 569-576 所描述的, 用碱性磷酸酶底物硝基蓝四

唑和 5-溴-4-氯-3 吡啶-磷酸盐检测。蛋白质印迹分析显示在栽培变种 Vintage 胚中从 10 DAF 开始, 在发育的谷粒只能检测到 LOX-1 蛋白质, 并且其水平在谷物成熟的过程中增长(图 8)。该蛋白质也存在于栽培变种 Vintage 休眠的谷粒的胚中, 但在发芽过程中缓慢下降(图 9)。尽管在品系 G 胚的提取物中识别出 LOX-1, 并且作为与栽培变种 Vintage LOX-1 相似大小的蛋白质在 SDS-PAGE 中迁移, 品系 G 中蛋白质的免疫可检测水平比栽培变种 Vintage 中的略低。

2. 在发育和发芽的品系-G 的谷粒中表达 *lox-1* 基因

根据 Hensgens 和 van Os-Ruygrok, 1989, Rice Genet. Newslett, 6: 163-168, 的方法从发育中和发芽中的大麦谷粒的胚分离总 RNA, 同时如实施例 2 中描述的平行测定脂氧化酶的活性。在变性琼脂糖凝胶上分离 RNA 样品 (7.5 μ g), 并如 Sambrook 等, 1989, 在分子克隆 (Molecular Cloning), 实验室手册 (Laboratory Manual), Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY, 所描述的进行 Northern 印迹分析。如 Holtman 等, 1996 Plant Physiol. 111: 569-576 所描述的, 使用 Amersham Random Prime Kit, 使印迹与从大麦 3' 未翻译区, *lox1* cDNA (EMBL 编号: L35931) 的核苷酸 2659-2801[SEQ ID NO: 1] 产生的 32 P-标记的探针杂交。

从 30DAF 开始, 在发育中的和成熟栽培变种 Vintage 和品系 G 谷粒的胚中检测编码 LOX-1 的 *lox-1* 转录物(图 10)。在栽培变种 Vintage 和品系 G 的胚中, 发芽过程中 *lox-1* 转录物的水平增加, 表明 *lox-1* 基因的从头表达(图 11)。因为 *lox-1* 转录物可检测的水平在品系 G 和栽培变种 Vintage 胚中是相似的, *lox-1* 转录的减少或转录物稳定性的降低都不能解释品系 G 的低脂氧化酶表型。

3. 品系 G 的 *lox-1* 基因编码一个脂氧化酶-1 的突变型

分析并比较品系 G 和栽培变种 Vintage 的 *lox-1* 基因的核苷酸序列以测定品系 G 的低-LOX-1 表型的分子基础, 其特征是 *lox-1* 基因正常

转录，但减少谷粒中表达的脂氧化酶的累积和活性。

根据 Pich 和 Schubert 1993, *Nucleic Acids Res.* 21: 3328 描述的方法，从籽苗的叶组织中分离品系 G 和野生型栽培变种 Vintage 基因组 DNA。使用基于大麦 *lox-1* 基因的序列的引物，通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增基因组 DNA 制剂中的 *lox-1* 基因 (van Mechelen 等, 1995, *BBA* 1254: 221-225; Rouster 等, 1997, *Plant J.* 11: 513-523)。在图 12 中表示的用于扩增 *lox-1* 启动子和编码区的寡核苷酸引物的位置和序列如下：

正向引物 5'-GAA AAG CTT GGA GGT AGA CGC TGC-3'[SEQ ID NO: 2] 和反向引物 5'-TAT AGG ATC CTT GTT CTT GGC CTC CTC TCC TCG-3'[SEQ ID NO: 3] 用于 PCR 扩增品系 G 和栽培变种 Vintage *lox-1* 的 *lox-1* 启动子结构域 (-361 到 +68)。

正向引物 5'-AGT GAA AAA CAG TGT GCT GGT G-3'[SEQ ID NO: 4] 和反向引物 5'-GGC TTA AAG AGC AAC TGC TGA-3'[SEQ ID NO: 5] 用于 PCR 扩增品系 G *lox-1* 编码区。

正向引物 5'-CAA GAT GCA TAT GCT GCT GGG AG-3'[SEQ ID NO: 6] 和反向引物 5'-CGA TGG TTT AAA TTA GAT GGA GAT GCT GT-3'[SEQ ID NO: 7] 用于 PCR 扩增栽培变种 Vintage *lox-1* 编码区。

根据酶提供者的说明，PCR 反应由含有 50pmol 引物的 50 μ l 体积中的 250ng 基因组 DNA 和 2U *Pfu* DNA 聚合酶 (Promega) 组成。在 Stratagene Robocycler 中进行 PCR 扩增：94 $^{\circ}$ C 1 分钟，1 轮；94 $^{\circ}$ C 1 分钟、62 $^{\circ}$ C 2 分钟和 72 $^{\circ}$ C 5 分钟，30 轮；72 $^{\circ}$ C 10 分钟，1 轮。在 1.2% 的琼脂糖凝胶上分离 PCR 产物。在长度上对应于扩增区域的 DNA 片段使用 Qiax II 凝胶提取试剂盒 (Qiagen) 纯化，并克隆进入质粒 pcDNA2.1 (Invitrogen)。用特异性寡核苷酸引物，使用双脱氧核苷酸链终止反应测定克隆的 *lox-1* 启动子和编码区的链的核苷酸序列，并在 ABI PRISM $^{\circ}$ 310 Genetic Analyzer (PE Biosystems) 上分析。使用 DNA STAR 序列分析软件包 (DNA STAR Inc., USA) 进行序列比较。

大麦 *lox-1* 编码区的启动子区和内含子-外显子结构显示于图 13

中，并从野生型 *lox-1* 基因组的核苷酸序列与 cDNA 序列的比较推断得到（图 12）。从-363 到+68 的 *lox-1* 启动子区的测定序列的区域（相对于测定的转录起始位点编号；van Mechelen 等，1995，*BBA* 1254: 221-225）足以指导天然基因的胚特异性和时序调节的基因表达特征（Rouster 等，1998，*Plant J.* 15: 435-440）。野生型 *lox-1* 基因的启动子和转录的区域[SEQ ID NO: 8]长度为 4663 nt，并含有长度在 82nt 和 634 nt 之间的 6 个内含子，它们不存在于各自的 cDNA 中[SEQ ID NO: 10]，因此在 RNA 转录剪接过程中必须除去。

品系 G 的 *lox-1* 的核苷酸序列与野生型的核苷酸序列比较（图 12）显示品系 G *lox-1* 等位基因具有两个点突变。一个是在外显子 1 中的位置 221 上沉默型 C 到 T 的置换，第二个是在外显子 3 中的位置 2347 上 G 到 A 的置换（图 13）。野生型大麦 *lox-1* 基因编码具有 862 个氨基酸残基的蛋白质[SEQ ID NO: 9]，而在品系 G 的 *lox-1* 等位基因的位置 2347 上的突变引起在编码的蛋白质中残基 368 上甘氨酸到天冬氨酸的氨基酸置换。

相关植物的脂氧化酶的序列比对显示，大麦 LOX-1 中的甘氨酸-368 是强烈保守的。而且，对应于大豆 LOX-1 中的甘氨酸 353 的该残基是 51 个中性或疏水性残基之一，从其晶体结构上看，该中性或疏水性残基沿酶的底物腔排列（Minor 等，1996，*Biochemistry* 35: 10687-10701）并在图 22 中显示。因此，在该位置上带电氨基酸残基的插入可能扰乱该酶的结构和功能特性。

4. 由品系 G 的 *lox-1* 等位基因编码的突变的 LOX-1 蛋白质具有低酶活，并是品系 G 的低脂氧化酶表型的原因。

在品系 G 中诱导突变的 *lox-1* 等位基因的栽培变种 Vintage 谷粒的叠氮化钠的诱变处理，可能在品系 G 的基因组中诱导了额外的突变。使用了两个实验方法以证实品系 G 中突变型 *lox-1* 等位基因，而不是基因组中的其它突变，是其低脂氧化酶表型的原因。为了证实在突变的酶中甘氨酸到天冬氨酸的置换引起稳定性和活性的降低，测定了由

突变体和野生型 *lox-1* 等位基因编码的 LOX-1 的酶活性。在从吸涨的成熟谷粒中分离的糊粉原生质体中瞬时表达两个 *lox-1* 基因, 因为预期在这些细胞中内源脂氧化酶的表达的水平低于检出限。在糊粉组织中没有检测到任何在发芽大麦中表达的经鉴定的大麦脂氧化酶基因(van Mechelen 等, 1999, 出处同前)。为了指导在糊粉原生质体中 *lox-1* 基因的瞬时表达, 其编码区域与已知在这些原生质体中有活性的组成型启动子翻译性融合。

在质粒 pcDNA2.1 中克隆的突变体编码区(序列位置+1 到+4350)和野生型 *lox-1* 基因的编码区(序列位置+69 到+4230)以及野生型 *lox-1*cDNA 的编码区(序列位置+69 到+2654)(见部分 3)在载体的多位点接头中通过 KpnI 和 EcoRV 的酶切消化切除。在 pUBARN 质粒中(Jensen 等, 1998, *Hereditas* 129: 215-225), 组成型活化的玉米泛素 Ubi 启动子(如美国专利 005510474A 中所描述的)和 Nos 终止子之间克隆编码区, 取代编码膦丝菌素乙酰基转移酶的 bar 基因。

根据 Skriver 等, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7266-7270 的方法从吸涨的大麦喜马拉雅栽培变种(*Hordeum vulgare* cv Himalaya)的糊粉组织中分离原生质体。在 0℃ 时, 用 100μg 质粒 DNA (等摩尔量的各个质粒)通过聚乙二醇(PEG)介导的 DNA 吸收转染等分试样的 2×10^5 个原生质体(Lee 等, 1997, *Plant Mol. Biol.* 13: 21-29), 然后如前面所描述的(Skriver 等, 1991, 出处同前)在 25℃ 下, 培养于糊粉原生质体培养基中。经过 48 小时的培养后, 仔细地除去培养基, 重悬浮原生质体, 并在 300μl 的脂氧化酶分析缓冲液中(0.2mM 硼酸、25mM HEPES、pH6.5)匀化。匀浆液以 15,000g 离心 5 分钟以沉淀不溶解的物质, 随后使用实施例 1 中第 1 节描述的快速筛选方法(但除去 NDGA 抑制剂), 分析上清液(10μl)的总脂氧化酶活性。原生质体提取物中的蛋白质含量通过由 Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA 提供的 Bradford 染料-结合实验测定(Bradford 1976, *Anal. Biochem.*, 72: 248), 并且脂氧化酶活性表达为提取物中每毫克蛋白质的活性。

用对照的质粒, pUBI-GUS 转染的原生质体(其中玉米泛素-1 启动子指导 β -葡糖醛酸酶报道基因的表达)没有给出任何可检测的脂氧化酶活性。野生型 *lox-1* 基因和原生质体中的 cDNA 的瞬时表达都在原生质体提取物中给出高水平的脂氧化酶活性(图 15)。与基因组序列相比, 野生型 *lox-1* cDNA 较高的表达可能是由于对于较小的 *lox-1* cDNA 表达质粒较高的转染频率(4929bp 对 6505bp 的 *lox-1* 基因构建物)。突变型 *lox-1* 基因的瞬时表达给出低水平的脂氧化酶活性, 是野生型脂氧化酶活性的~10%。这些数据清楚表明品系 G 中的突变型 *lox-1* 基因编码具有大大降低活性的脂氧化酶, 这是低脂氧化酶表型的原因。

实施例 4 扩增的 PCR-切割多态性位点(PCR-CAPS)分析:

用于突变型 *lox-1* 基因鉴定的一种方法

基于 PCR-CAPS 分析, 开发了在任何遗传背景下鉴别品系 G 突变型 *lox-1* 基因的分析方法。该分析方法包括基因组 DNA 片段的 PCR 扩增, 随后通过用特异性的限制性内切核酸酶消化扩增的序列, 显示限制性片段的长度多态性(RFLP)。

突变型 *lox-1* 基因的编码序列包含两个点突变(见实施例 3), 其中在位置 2347 的突变(图 12)引入一个附加的 *Aat* II 限制性内切核酸酶切割位点, 这在野生型 *lox-1* 基因中没有发现(图 16)。基于由在 *lox-1* 基因中的该限制性位点的存在产生的多态性, 显示随后的 PCR-CAPS 分析, 以区别野生型 *lox-1* 基因和突变的 *lox-1* 基因。

根据 Pich 和 Schubert(1993, 出处同前)的方法从大麦(*Hordeum vulgare*, L.)栽培变种 Vintage 和品系 G 的 M6 籽苗的嫩叶分离基因组 DNA。使用对 *lox-1* 基因特异性的引物通过 PCR 扩增包含位置 2347 的 DNA 序列(品系 G 的 *lox-1* 基因突变位点)[SEQ ID NO: 8]。通过选择的正向引物 5'-CGCTACGACGTCTACAACGA-3'[SEQ ID NO: 13]和反向引物 5'-CAGACTACTTTTTGGCGGGA-3'扩增的 DNA 片段显示于图 17 中。根据提供者的说明, 使用存在于含有 50pmol

的各个引物和 1 单位 Taq DNA 聚合酶 (Promega) 的 50 μ l 体积中的 250ng 基因组 DNA 进行 PCR 反应。在 Stratagene Robocycler 上进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 1 轮; 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C 1.5 分钟, 72 $^{\circ}$ C 2 分钟, 30 轮; 72 $^{\circ}$ C 10 分钟, 1 轮。突变体和野生型 *lox-1* 基因的扩增的片段为 ~ 650bp(图 18), 对应于预期的大小(图 17)。在自旋柱(Qiagen)上纯化的 PCR 产物在 37 $^{\circ}$ C 用 25 单位的 *AatII* 限制性内切酶消化 24 小时, 并在 1.2% 的琼脂糖凝胶上分析。

野生型 *lox-1* PCR 产物的消化产生 10, 179 和 462bp 的 DNA 片段, 从突变型 *lox-1* PCR 产物得到的片段为 10, 149, 179 和 313 bp, 其中额外的 DNA 片段是由于 *lox-1* PCR 产物的部分消化(图 19)。该片段型式与从这一突变产生的预期的 RFLP 一致, 其中 313bp 的片段对于突变型 *lox-1* 是独特的。该 PCR-CAPS 分析提供了用于在大麦中鉴定 *lox-1* 等位基因的可重复的和特异性的手段, 并因此能够用于以引导该基因进入新的大麦品种为目的的大麦育种计划。

实施例 5 回交品系 G 的低脂氧化酶表型到栽培变种 Alexis

显示对突变型 *lox-1* 基因的遗传连锁

重复回交用于从品系 G 转移低脂氧化酶表型进入回归亲本(在这种情况下是 cv.Alexis)。图 20 中显示了该回交程序, 与低脂氧化酶表型的选择结合, 使用回归亲本基因组渐进置换品系 G 的基因组。而且, 将除去叠氮化钠诱变处理过程中引入品系 G 基因组的其它突变。在纯合的低脂氧化酶品系 G(表示为基因型 *ll*) 与栽培变种 Alexis(表示为基因型 *LL*) 的第一次回交中, 子代品系将是杂合的(表示为基因型 *Ll*)。归因于隐性突变的低脂氧化酶表型在杂合品系中将检测不到突变。该后代自花传粉并将给出正常的孟德尔分离种群, 即 1*LL*: 2*Ll*: 1*ll*。从第一次回交产生的低 *lox* 杂合 *ll* 基因型将具有 50% 的栽培变种 Alexis 遗传背景。经过 10 轮的回交, 回归亲本的背景将达到约 99.9%。

大麦 (*Hordeum vulgare*, L.) 栽培变种 Alexis 和品系 G 在温室中通过回交程序增殖。回交的子代谷粒在培养皿中滤纸上发芽, 用 4ml

的水浸泡，在 22℃ 黑暗中 3 天。如实施例 1 中描述的，通过测定取自发芽籽苗的胚鞘（顶端 7mm）的提取物中总脂氧化酶活性筛选低脂氧化酶品系。还使用实施例 4 中描述的 PCR-CAPS 试验分析第三次和第四次回交的子代的突变型 *lox-1* 基因的遗传。

四次回交后代的分离子代中低脂氧化酶表型的预期的频率对于隐性突变是 25%。观察到的四次回交后代的子代（24 个谷粒）中低脂氧化酶活性的频率与预期的频率一致（图 20）。当使用 PCR-CAPS 试验分析具有低 *lox* 纯合 *ll* 基因型的第三次和第四次回交子代时，发现它们都具有诊断性 313 bp 的片段，而具有野生型脂氧化酶活性的子代缺乏这一片段（图 21）。

该回交程序证实突变型 *lox-1* 等位基因可转移到新的遗传背景，并在孟德尔分离后以隐性单因子形式遗传。既然在第四次回交子代中回归亲本的背景是 93.8%，突变型 *lox-1* 基因和低脂氧化酶表型的共遗传提供了它们遗传连锁的证据。

实施例 6 从品系 G 的大麦麦芽酿造的啤酒在贮藏过程中

累积较少的反式-2-壬烯醛，给予改善的风味稳定性

为了提供充足的谷粒用于工业化发麦芽，大麦栽培变种 *Vintage* 和品系 G 野外增殖几个季节。随后进行工业规模的麦芽制造和酿造试验以及制成啤酒的分析有以证实品系 G 低脂氧化酶大麦对于改善香味稳定性的评价。

1. 品系 G 和栽培变种 *Vintage* 的工业化发麦芽和焙烤

在一个工业的麦芽坊中以如下两个试验进行 10 吨范围的麦芽制造：

试验 1：品系 G 大麦谷粒（1996 年收获）

浸泡条件：8 小时湿润；14 小时干燥；8 小时湿润；10 小时干燥；在 16℃ 的浸泡水中 4 小时湿润。发芽条件：18℃ 12 小时；16℃ 24 小时；14℃ 24 小时；12℃ 60 小时。焙烤条件：60℃ 12 小时；68℃ 3 小时；74℃ 4 小时；80℃ 3 小时。

试验 2: 栽培变种 Vintage 和品系 G (1996 年/1997 年收获)

浸泡条件: 8 小时湿润; 10 小时干燥; 6 小时湿润; 15 小时干燥; 在 15℃ 的浸泡水中 4 小时湿润。发芽条件: 在 15℃ 使用入口空气 5 天并喷雾保持湿气水平。焙烤条件: 50℃ 10 小时; 60℃ 2 小时; 80℃ 2.5 小时。

从试验 1 获得的品系 G 麦芽的 2 个样本与对照麦芽栽培变种 Nevada(表 1)比较和从试验 2 获得的品系 G 麦芽与栽培变种 Vintage 比较的发芽分析证实品系 G 麦芽适合于酿造试验。

表 1

发麦芽试验 1				
大麦品种		栽培变种 Nevada	品系 G	品系 G
收割年份		1996	1996	1996
麦芽分析				
水分含量	%	4.7	4.3	4.4
提取物 fine as is	% ai.	76.9	76.1	75.3
提取物 fine d.m.	%dm.	81.4	79.5	78.7
糖化作用时间	分钟	<10	<10	<10
糖化力	%WK	252	373	365
颜色	EBC	2.8	4.4	3.8
pH		6.16	5.97	5.99
混浊度	EBC	9.0	2.5	2.4
总蛋白 d.m.	%	10.35	10.74	12.03
可溶性氮	mg/l	647	787	765
可溶性蛋白质%麦芽 d.m.	%dm.	3.7	4.4	4.3
Kolbach		35.3	40.8	35.4
游离氨基氮	mg/l	97	125	118
易碎性	%	89.5	85.6	89.5
完全未修饰谷粒	%	1.1	0.6	0.5
部分未修饰谷粒	%	2.3	1.0	0.6
麦芽汁中的 β -葡聚糖	mg/l	114	66	36
麦芽中的 β -葡聚糖	% w/w	0.24	0.11	0.05
S-甲基甲硫氨酸/DMS eq	$\mu\text{g/g}$	2.4	6.4	8.4
游离 DMS	$\mu\text{g/g}$	1.0	6.6	4.7
HDNA	$\mu\text{g/kg}$	n.d.	0.3/0.6	0.3/0.3

表 2

发麦芽试验 2				
大麦品种		Vintage	品系 G	品系 G
收割年份		1996	1996	1997
水分含量	%	4.1	4.1	4.3
提取物 fine as is	% ai.	77.0	75.6	77.5
提取物 fine d.m.	%dm.	80.3	78.8	80.9
精细/粗糙差别	%dm.	0.7	1.6	1.7
糖化作用时间	分钟	-	-	<10
糖化力	%WK	343	342	268
颜色	EBC	2.5	2.8	3.4
pH		6.05	6.01	6.12
混浊度	EBC	1.5	1.3	2.5
总蛋白 d.m.	%	10.98	12.22	9.82
可溶性氮	mg/l	696	741	610
可溶性蛋白质%麦芽 d.m.	%dm.	3.9	4.1	3.4
Kolbach		35.2	33.7	34.6
游离氨基氮	mg/l	110	117	100
易碎性	%	91.3	81.8	89.5
完全未修饰谷粒	%	0.7	1.1	1.3
部分未修饰谷粒	%	1.0	2.7	2.7
麦芽汁中的 β -葡聚糖	mg/l	97	172	117
麦芽中的 β -葡聚糖	% w/w	-	-	0.3
S-甲基甲硫氨酸/DMS eq	$\mu\text{g/g}$	-	-	-
游离 DMS	$\mu\text{g/g}$	-	-	-

2. 用品系 G、栽培变种 Vintage 麦芽和对照麦芽栽培变种 Nevada 进行工业酿造

使用从试验 1 中的品系 G 和对照麦芽栽培变种 Nevada 麦芽以及试验 2 中的品系 G 和对照麦芽栽培变种 Vintage 制备的麦芽汁进行两批酿造试验。

根据如下方案使用 475kg 麦芽以 30-hl 的工业规模酿造啤酒：在 50℃ 捣碎；50℃ 30 分钟；从 50℃ 加热到 70℃，30 分钟；70℃ 15 分钟。一部分麦芽汁从 70℃ 加热到 100℃ 20 分钟，并在 100℃ 5 分钟，而主要部分的麦芽汁再在 70℃ 保持 25 分钟，然后两部分麦芽汁混合并在 76℃ 保持 10 分钟。麦芽汁的沸腾、余下谷粒的涡流分离、冷却、发酵、窖藏和包装入棕色玻璃瓶中等酿酒步骤是根据标准酿造方法进行的。

3. 品系 G、栽培变种 Vintage 麦芽和对照麦芽栽培变种 Nevada 酿制的啤酒的风味稳定性和 T2N 的含量

新装瓶的啤酒在 5℃ 贮存，并在生产 2 个月内分析。遵循两个不同类型的啤酒贮藏条件，在两个独立的实验室中评估新鲜啤酒和贮藏啤酒的香味稳定性。在实验室 A 中使啤酒经过强制熟化过程，即该啤酒在 37℃ 贮藏 7 天的时间，而在试验室 B 中该啤酒在 30℃ 贮藏 6 和 12 周。基本上如 Gronqvist 等，1993, *Proceedings of the 24th EBC Congress, Oslo*, 421-428 所描述的，在用 O-（2,3,4,5,6-五氟苯甲基）-羟胺的羰基衍生作用后，使用气相色谱分析和质谱检测测定啤酒中反式-2-壬烯醛水平。一个经过培训的啤酒品尝小组评估了啤酒全面的味道得分，包括显示啤酒中游离反式-2-壬烯醛存在的纸板味的检测。

实验室 A：强制熟化耐受性

在第一次酿酒试验中，从品系 G 酿制的啤酒与对照麦芽，栽培变种 Nevada 酿制的啤酒的比较（表 3）证明从品系 G 酿制的啤酒具有更强的香味稳定性，并且强制熟化后当与对照比较时，具有较低的反式-2-壬烯醛含量。第二个试验，比较从品系 G 麦芽酿制的啤酒和从栽

培变种 **Vintage** 麦芽酿制的啤酒, 该亲本栽培变种证实了原始数据(表 4)。

表 3

酿造试验 1		
大麦麦芽	栽培变种 Nevada	品系 G
SO ₂ 含量 (mg/ml)	1	1
T2N** (ppb) -新鲜啤酒	0.009	0.005
T2N** (ppb) -熟化啤酒 (37℃/7 天)	0.117	0.025
香味*-新鲜啤酒	5.9	5.3
香味*-熟化啤酒 (37℃/7 天)	1.3	5.1

*增加质量的香味评估范围 1-10; **反式-2-壬烯醛。

表 4

酿造试验 2		
大麦麦芽	栽培变种 Vintage	品系 G
SO ₂ 含量 (mg/ml)	2	2.5
T2N** (ppb) -新鲜啤酒	0.023	0.019
T2N** (ppb) -熟化啤酒 (37℃/7 天)	0.078	0.035
香味*-新鲜啤酒	5.9	6.1
香味*-熟化啤酒 (37℃/7 天)	2.9	5.9

*增加质量的香味评估范围 1-10; **反式-2-壬烯醛。

实验室 B: 30℃ 贮藏耐受性

在贮藏温度提高到 30℃ 的条件下放置 6 和 12 周后, 当与从任何两个参考麦芽酿制的啤酒比较时, 从品系 G 麦芽酿制的啤酒具有较低的反式-2-壬烯醛水平(表 5 和 6), 并且由品尝小组判定具有较好的香味稳定性。在这些分析的啤酒中, 反式-2-壬烯醛的味觉阈接近 0.08ppb。

表 5

酿造实验 1		
大麦麦芽	栽培变种	品系 G
	Nevada	
反式-2-壬烯醛 (ppb) — 新鲜啤酒	0.050	0.044
反式-2-壬烯醛 (ppb) — 30℃/6 周	0.072	0.037
反式-2-壬烯醛 (ppb) — 30℃/12 周	0.095	0.046
反式-2-壬烯醛味道*—新鲜啤酒	0.6	0.3
反式-2-壬烯醛味道*—30℃/6 周	3.7	1.4
反式-2-壬烯醛味道*—30℃/12 周	2.5	0.6

*反式-2-壬烯醛味道检测范围在 1-10 的范围内。

表 6

酿造实验 2		
大麦麦芽	栽培变种	品系 G
	Vintage	
反式-2-壬烯醛 (ppb) — 新鲜啤酒	0.070	0.062
反式-2-壬烯醛 (ppb) — 30℃/6 周	0.093	0.070
反式-2-壬烯醛 (ppb) — 30℃/12 周	0.133	0.080
反式-2-壬烯醛味道*—新鲜啤酒	0.3	0.9
反式-2-壬烯醛味道*—30℃/6 周	2.5	1.7
反式-2-壬烯醛味道*—30℃/12 周	2.2	1.3

*反式-2-壬烯醛味道检测范围在 1-10 的范围内。

从组合的酿造实验数据可见，如通过在 30℃ 贮存后检测啤酒中反式-2-壬烯醛的水平测定的从品系 G 麦芽酿制的啤酒的改进的香味稳定性，显示了统计学的显著性（表 7）。

表 7
贮藏啤酒中的反式-2-壬烯醛

新鲜啤酒	平均值	标准 偏差	差异	2-tailed p	显著性 ($p < 0.05$)
参考	0.060	0.012	0.007	0.34	无
品系 G	0.053	0.011			

6 周, 30℃	平均值	标准 偏差	差异	2-tailed p	显著性 ($p < 0.05$)
参考	0.083	0.013	0.029	0.031	有
品系 G	0.054	0.021			

12 周, 30℃	平均值	标准 偏差	差异	2-tailed p	显著性 ($p < 0.05$)
参考	0.114	0.023	0.051	0.003	有
品系 G	0.063	0.020			

因为在两个酿造试验中天然亚硫酸盐的水平很低, 熟化啤酒中游离反式-2-壬烯醛水平将密切反映不同啤酒的反式-2-壬烯醛的潜能, 即存在于新鲜啤酒中的反式-2-壬烯醛加合物的水平。通过与游离反式-2-壬烯醛混合, 添加亚硫酸盐可暂时延缓熟化过程, 直到通过包装的气体交换造成的氧化作用使亚硫酸盐的水平下降。

该描述的用低-LOX-1 大麦麦芽进行的酿酒试验提供了第一次明确的证据, 即在发芽和酿造过程中, 大麦中 LOX-1 的活性是熟化啤酒中异味化合物反式-2-壬烯醛出现的关键性决定因素。

上述说明包括引用大量的发表的文献。如充分阐明的, 为了本发明的全部目的, 本文引用每一篇发表的文献作为参考。

序列表

<110> Douma, Anneke

Doderer, Albert

Cameron-Mills, Verena

Skadhauge, Birgitte

Bech, Lene

<120> **低脂氧化酶 1 大麦**

<130> 11225.12W001

<160> 18

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 143

<212> DNA

<213> **大麦** (Hordeum vulgare)

<400> 1

ctaagccatc ggcaaccatg gatgaataaa gggcgttcgc cacgtacgaa acttgtcgag 60

agattggtgt agtgtgtgtc tgtgacagta ctatgtcagc agttgctctt taagccgaat 120

aaataaagca gatttgcttc caa 143

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> **大麦**

<400> 2

gaaaagcttg gaggtagacg ctgc 24

<210>	3	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	大麦	
<400>	3	
	tataggatcc ttgttcttgg cctcctctcc tcg	33
<210>	4	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	大麦	
<400>	4	
	agtgaaaaac agtgctgctgg tg	22
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	大麦	
<400>	5	
	ggcttaaaga gcaactgctg a	21
<210>	6	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	大麦	
<400>	6	
	caagatgcat atgctgctgg gag	23
<210>	7	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	大麦	

<400> 7		
cgatggttta aattagatgg agatgctgt		29
<210> 8		
<211> 4663		
<212> DNA		
<213> 大麦		
<400> 8		
cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg		60
atggggcgatc acccgtcacg ggaccggagc gcgccatgcg aagcacgagg agggcacgctc		120
accgtccgcg cgcagcacgt ggagagcagc tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga		180
gcgccacacc accgggaccg gaccgggacc ggcctataaa ttgcccgac cgagctgcaa		240
gcagctcctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag		300
tgtgctggtg ccattggttg gagcagtga agcgaggaga ggaggccaag aacaagatgc		360
tgctgggagg gctgatcgac accctcacgg gggcgaacaa gagcgcccgg ctcaagggca		420
cggtggtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg		480
acggcatcgg cgagttcctc ggcaaggcg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccc		540
tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ccttctcctc tgtttacaag atatagtatt		600
tctttcgtgt gggccggcgg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat		660
aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcatatgcc atcgaaaaaa		720
gagacaacag catgcatgca tggtgcgcg accagaccac gcagagcacc ggatgctcga		780
gacaaagcaa cacaacaagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg		840
cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaagagca agcacacaat		900
cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa		960
gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgcctt tgcccaacaa ttaatcaagc		1020
agggtacgtg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtacg		1080
tgggtggtgca gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggcgcg gaggcggagc tggagcagtg		1140
ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg		1200
ggaggtggag aagctcgggg tgccgggcg catcgtcgtc aacaactacc acagctccga		1260
gttcctgctt aaaaccatca cctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt		1320
cgtcgccaac tcatggatct accccgccc caactaccga tacagccgcg tcttcttcgc		1380
caacgacgtg cgtggatctt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca		1440

ttcattggtcg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca 1500
 cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga 1560
 tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat 1620
 aactgttgca cggatccacc cacatgattg ttttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt 1680
 cttagccacat cttagatgcat gtcacataat tattgcatac caaaacgatt aaattaagca 1740
 taaaaagaaa aggaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt 1800
 agatatgcaa tatttatctt acatctaac ctttcttcat tcttaaataat aagacatttg 1860
 taagatttca ctatggacaa catacgaac aaaatcagtg gatctctcta tgcattcatt 1920
 atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca 1980
 taacttttta atagtaatgt tgcacgctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga 2040
 tgccggcggc gctgaagccg taccgcgacg acgagctccg gaacctgcgt ggcgacgacc 2100
 agcagggccc gtaccaggag cacgaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg 2160
 gcgagggccg ccccatcctc ggcggaact ccgaccacc ttaccgcgc cgcgccgca 2220
 cggagcgcaa gcccacgcc agcgaccga gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc 2280
 agatctacgt gccgcgggac gagaagttcg gccacctca gacgtccgac ttcttgggt 2340
 actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca 2400
 cccccggcga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcataagc 2460
 tgcccaaggt ggccgccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg 2520
 acctcctccc cgtcggcggc gactccctgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg 2580
 agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgacg ggaggtgctc gccggcgtca 2640
 acccggatcat gatcacgctc ctacaggtga gtcagcgatt atttgttcat tgtgtgtgta 2700
 tgggtgtccat ggtgagaaag tgcagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct 2760
 gcatgcatgc aggagtccc gccaaaaagt agtctggacc cttagcaagt ttggtgaccac 2820
 accagacca tcacggcggg gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag 2880
 gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta 2940
 gataatttgg cttcgttgca attaatgtga tgctggccga tcaagtgatc gtattgggtt 3000
 tgaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc 3060
 atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc cacgaggacc 3120
 ctcttcttcc tgcgcccga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc 3180
 atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaaggttt acacgccggt gccagcggc 3240
 tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcggc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg 3300
 tggcaccagc tcgtcagcca ctggtacttt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga 3360

tgcacaaca ctgatcgaaa tatgatgat tgaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420
 gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cgggtgcacaa 3480
 gctgctgagc ccgcactacc gcgacaccat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540
 catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccg ggcaagtccg cgttggggat 3600
 gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagtt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660
 caagaggtac gtacctggta aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgctca 3720
 ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggacct gtcgagcccc 3780
 tacaaggtgc ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg 3840
 cagccattg agcagtagct gagcgagtac ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900
 ctgcagggcg atacggaggt gcaggcgtgg tgggaaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960
 gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020
 tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtac 4080
 ccctacgcgg ggttccctcc gaaccggccg acggtgagcc ggcgccgcat gccggagccc 4140
 ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccgcggagc gggccttcat ccacaccatc 4200
 acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260
 tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgcccggagt ggacctcggc cccaaaggcc 4320
 ctggaggtgt tcaagcggtt cagcgaccgg ctggtggaga tcgagagcaa ggtggtgggc 4380
 atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggcccgg ctaagtctcc ctacatgctg 4440
 ctctaccca acacctccga ccacaagggc gccgctgccc ggcttaccgc caagggcattc 4500
 cccaacagca tctccatcta atctaacca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560
 gccacgtacg aaacttgctg agagattggt gtagtggtg tctgtgacag tactatgtca 4620
 gcagttgctc ttttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc 4663

<210> 9

<211> 862

<212> PRT

<213> 大麦

<400> 9

Met Leu Leu Gly Gly Leu Ile Asp Thr Leu Thr Gly Ala Asn Lys Ser
 1 5 10 15
 Ala Arg Leu Lys Gly Thr Val Val Leu Met Arg Lys Asn Val Leu Asp
 20 25 30

370		375		380
Ser 385	Leu Asp Pro Ser	Lys 390	Phe Gly Asp His	Thr Ser Thr Ile Thr Ala 395 400
Glu His Ile Glu	Lys 405	Asn Leu Glu Gly	Leu Thr Val Gln Gln Ala Leu 410 415	
Glu Ser Asn Arg	Leu Tyr Ile Leu	Asp 425	His His Asp Arg Phe Met Pro 430	
Phe Leu Ile Asp Val	Asn Asn Leu Pro Gly	Asn Phe Ile Tyr Ala Thr 445		
Arg Thr Leu Phe Phe	Leu Arg Gly Asp Gly Arg	Leu Thr Pro Leu Ala 450 460		
Ile Glu Leu Ser Glu	Pro Ile Ile Gln Gly Gly	Leu Thr Thr Ala Lys 470 480		
Ser Lys Val Tyr Thr	Pro Val Pro Ser Gly	Ser Val Glu Gly Trp Val 485 495		
Trp Glu Leu Ala Lys	Ala Tyr Val Ala Val	Asn Asp Ser Gly Trp His 500 510		
Gln Leu Val Ser His	Trp Leu Asn Thr His Ala Val	Met Glu Pro Phe 515 525		
Val Ile Ser Thr Asn	Arg His Leu Ser Val Thr	His Pro Val His Lys 530 540		
Leu Leu Ser Pro His	Tyr Arg Asp Thr Met Thr	Ile Asn Ala Leu Ala 545 560		
Arg Gln Thr Leu Ile	Asn Ala Gly Gly Ile Phe Glu Met Thr Val Phe 565 575			
Pro Gly Lys Phe Ala	Leu Gly Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp Trp 580 590			
Lys Phe Thr Glu Gln	Gly Leu Pro Asp Asp Leu Ile Lys Arg Gly Met 595 605			
Ala Val Glu Asp Pro	Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser 610 620			
Asp Tyr Pro Tyr Ala	Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu 625 640			
Gln Tyr Val Ser Glu	Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val 645 655			
Leu Gln Gly Asp Thr	Glu Val Gln Ala Trp Trp Lys Glu Thr Arg Glu 660 670			
Val Gly His Gly Asp	Leu Lys Asp Ala Pro Trp Trp Pro Lys Met Gln 675 685			
Ser Val Pro Glu Leu	Ala Lys Ala Cys Thr Thr Ile Ile Trp Ile Gly 690 700			
Ser Ala Leu His Ala	Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly 705 720			

acccgagcct ggagagccgg ctgtcgtgc tggagcagat ctacgtgccg cgggacgaga 840
 agttcggcca cctcaagacg tccgacttcc tgggctactc catcaaggcc atcacgcagg 900
 gcacacctgc ggccgtgctc acctacgtgg acaccacccc cggcgagttc gactccttcc 960
 aggacatcat caacctctat gagggcggca tcaagctgcc caaggtggcc gccctggagg 1020
 agctccgtaa gcagttcccg ctccagctca tcaaggacct cctccccgtc ggcggcgact 1080
 ccctgcttaa gctccccgtg cccacatca tccaggagaa caagcaggcg tggaggaccg 1140
 acgaggagt cgcacgggag gtgctcggcg gcgtcaaccg ggtcatgatc acgcgtctca 1200
 cggagttccc gccaaaaagt agtctggacc ctacgaagtt tggtagacc accagcacca 1260
 tcacggcggg gcacatagag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag gcgctggaaa 1320
 gcaacaggct gtacatcctt gatcaccatg accggttcat gccgttcttg atcgacgtca 1380
 acaacctgcc cggcaacttc atctacgccg cgaggacctt cttcttcttg cgcggcgacg 1440
 gcaggctcac gccgctcggc atcgagctga gcgagcccat catccagggc ggccttacca 1500
 cggccaagag caaggtttac acgccggtgc ccagcggctc cgtcgaaggc tgggtgtggg 1560
 agctcgccaa ggcctacgtc gccgtcaatg actccgggtg gcaccagctc gtcagccact 1620
 ggctgaacac tcacgcggtg atggagcctg tcgtgatctc gacgaaccgg caccttagcg 1680
 tgacgcaccc ggtgcacaag ctgctgagcc cgcactaccg cgacaccatg accatcaacg 1740
 cgctggcggc gcagacgctc atcaacgccc gcggcatctt cgagatgacg gtgttcccgg 1800
 gcaagttcgc gttggggatg tcggccgagg tgtacaagga ctggaagttc accgagcagg 1860
 gactgccgga cgatctcctc aagaggggca tggcgggtga ggaccgctcg agcccgtaca 1920
 aggtgcgggt gctgggtgctg gactaccctg acgcggcgga cgggctggcg atctggcacg 1980
 ccattgagca gtacgtgagc gagtacctgg ccatctacta cccgaacgac ggcgtgctgc 2040
 agggcgatac ggaggtgacg gcgtggtyga aggagacgcg cgaggtcggg cacggcgacc 2100
 tcaaggacgc cccatggtgg cccaagatgc aaagtgtgcc ggagctggcc aaggcgtgca 2160
 ccaccatcat ctggatcggg tcggcgtgc atgcggcagt caacttcggg cagtaccctt 2220
 acgcgggggt cctcccgaac cggccgacgg tgagccggcg ccgcatgccg gagcccggca 2280
 cggaggagta cgcggagctg gagcgcgacc cggagcgggc cttcatccac accatcacga 2340
 gccagatcca gaccatcatc ggcgtgtcgc tgctggaggt gctgtcgaag cactcctccg 2400
 acgagctgta cctcgggacg cgggacacgc cggagtggac ctccggacca aaggccctgg 2460
 aggtgttcaa gcggttcagc gaccggctgg tggagatcga gagcaagggtg gtgggcatga 2520
 accatgaccg ggagctcaag aaccgcaacg gcccggttaa gtttccctac atgctgctct 2580
 accccaacac ctccgaccac aagggcggcg ctgccgggct taccgccaag ggcattccca 2640
 acagcatctc catctaactt aagccatcgg caaccatgga tgaataaagg gcgttcgcca 2700

cgtacgaaac ttgtcgagag attggtgtag tgtgtgtctg tgacagtact atgtcagcag 2760
 ttgctcttta agccgaataa ataaagcaga tttgcttcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2818

<210> 11

<211> 4663

<212> DNA

<213> 大麦

<220>

<221> variation

<222> (2346)..(2348)

<223> "n" is a, c, t, or g encoding an acidic, basic, or polar amino ac
 i

<400> 11

cagccccatg catgcacatg cacatgcaca tgcacatgca gtgcagccaa gcaccgctcg 60
 atgggcgatc acccgtcacg ggaccggagc ggcctatgcg aagcacgagg agggcacgtc 120
 accgtccgcg cgcagcacgt ggagagcacg tcgccgtccg atccatctct ccaaagccga 180
 gcgccacacc accgggaccg gacccggacc ggcctataaa tgcccggac cgagctgcaa 240
 gcagctcctc acacacactc acgcaacaca catccatctt cactgaaaag tgaaaaacag 300
 tgtgctggtg ccattggttg gagcagtgaa agcagaggaga ggaggccaag aacaagatgc 360
 tgctgggagg gctgatcgac accctcaagg gggcgaacaa gagcggcccg ctcaagggca 420
 cggtggtgct catgcgcaag aacgtgctgg acctcaacga cttcggcgcc accatcatcg 480
 acggcatcgg cgagttcctc ggcaagggtg tcacctgcca gcttatcagc tccaccgccg 540
 tcgaccaagg taatcactac cctcctccgg ccttctcctc tgtttacaag atatagtatt 600
 tctttcgtgt gggccggcgg ccatggatgg atggatgtgt ctggatcggc taaagaagat 660
 aggatagcta gccctggccg gtcgtcttta cctgagcatg ggcatatgcc atcgaaaaaa 720
 gagacaacag catgcatgca tggtgcgcg accagaccac gcagagcacc ggatgctcga 780
 gacaaagcaa cacaaacagc aaggacgaca cgtcaaaagc aacacaacaa gcaaggacgg 840
 cacgtcaaaa gcaacacaaa cctaaactaa agcacaaga cgtaagagca agcacacaat 900
 cagcaggcta taaacagttg tcatcaaaaa caacgctgga agagagagag aaggaaggaa 960
 gtagtagcca tgaaaaatta aatcaccggg cgttgctctt tgcccaacaa ttaatcaagc 1020
 aggttacgtg gcatgtatag ttcttgtaag taaactaagc atgtgatatg agaaggtagc 1080

tgggtggtgca gacaacggcg gtcgcgggaa ggtgggcgcg gaggcggagc tggagcagtg 1140
 ggtgacgagc ctgccgtcgc tgacgacggg ggagtccaag ttcggcctca ccttcgactg 1200
 ggaggtggag aagctcgggg tgccgggagc catcgtcgtc aacaactacc acagctccga 1260
 gttcctgctt aaaaccatca ccctccacga cgtccccggc cgcagcggca acctcacctt 1320
 cgtcgccaac tcatggatct accccgccgc caactaccga tacagccgag tcttcttcgc 1380
 caacgacgtg cgtggathtt cctctacttt cctctccttt cattttcacc gccttcgtca 1440
 ttcattggtcg atcattaagt cttgccagga caatagatga tgagctagga gtggttacca 1500
 cttagcagta cgtacattat ttattccgtg ttggtagaaa aggatatggt ttggtgcaga 1560
 tcgacacaag attgaatgaa agttgcaccg tggcaccgtg gcagcgtggt aggtgaaaat 1620
 aactgttgca cggatccacc cacatgattg tttcatgaa taaacttttt aaggatgtgt 1680
 ctagccacat ctagatgcat gtcacataat tattgcatac caaacgatt aaattaagca 1740
 taaaaagaaa aggaaaaaaaa tactcacata tctcgacgta agatcaatga tatagtattt 1800
 agatatgcaa tatttatctt acatctaac ctttcttcat tcttaaatat aagacatttg 1860
 taagatttca ctatggaca catacgaac aaatcagtg gatctctcta tgcattcatt 1920
 atgtagtcta taataaaatc tttaaaagat cgtatatttt gcaacggagg gagtaaaaca 1980
 taacttttta atagtaatgt tgcacggctc cacactcgca gacgtacctg ccgagccaga 2040
 tgccggcggc gctgaagccg taccgagcg acgagctccg gaacctgagt ggcgacgacc 2100
 agcagggccc gtaccaggag cagcaccgca tctaccgcta cgacgtctac aacgacctcg 2160
 gcgagggccc ccccatcctc ggcggcaact ccgaccacc ttaccgagc cgcggccgca 2220
 cggagcga gccaacgcc agcagccgca gcctggagag ccggctgtcg ctgctggagc 2280
 agatctacgt gccgcgggac gagaagtctg gccacctcaa gacgtccgac ttcttgggct 2340
 actccatcaa ggccatcacg cagggcatcc tgccggccgt gcgcacctac gtggacacca 2400
 cccccggcga gttcgactcc ttccaggaca tcatcaacct ctatgagggc ggcataagc 2460
 tgcccaaggt ggccgcccctg gaggagctcc gtaagcagtt cccgctccag ctcatcaagg 2520
 acctctccc cgtcggcggc gactccccgc ttaagctccc cgtgccccac atcatccagg 2580
 agaacaagca ggcgtggagg accgacgagg agttcgacg ggaggtgctc gccnngtca 2640
 acccggcat gatcacgct ctcacgggga gtcagcgatt atttgttcat tgtgtgtgta 2700
 tgggttccat ggtgagaaag tgcagatctt gatttgcgtt gggtcgcatg cacgcatgct 2760
 gcatgcatgc aggagttccc gccaaaaagt agtctggacc ctagcaagtt tggtagaccac 2820
 accagacca tcacggcggg gcacataag aagaacctcg agggcctcac ggtgcagcag 2880
 gtaattggtc caagccatcg acatcaacta tgatttacct aggagtaatt ggtagctgta 2940
 gataatttgg cttcgttgca attaatttga tgctggccga tcaagtgatc gtattgggtt 3000

```

tgaaatttgc aggcgctgga aagcaacagg ctgtacatcc ttgatcacca tgaccggttc 3060
atgccgttcc tgatcgacgt caacaacctg cccggcaact tcatctacgc caccgaggacc 3120
ctcttcttcc tgcgcggcga cggcaggctc acgccgctcg ccatcgagct gagcgagccc 3180
atcatccagg gcggccttac cacggccaag agcaaggttt acacgccggt gccagcggc 3240
tccgtcgaag gctgggtgtg ggagctcgcc aaggcctacg tcgccgtcaa tgactccggg 3300
tggcaccagc tcgtcagcca ctggtactgt ctccacggtc gatgtgattc agtcagtcga 3360
tgacaacaa ctgatcgaaa tatgattgat tgaaacgcgc aggctgaaca ctcacgcggt 3420
gatggagccg ttcgtgatct cgacgaaccg gcaccttagc gtgacgcacc cggtgacaaa 3480
gctgctgagc ccgcaactacc gcgacacat gaccatcaac gcgctggcgc ggcagacgct 3540
catcaacgcc ggcggcatct tcgagatgac ggtgttcccc ggcaagttcg cgttggggat 3600
gtcggccgtg gtgtacaagg actggaagt caccgagcag ggactgccgg acgatctcat 3660
caagaggtac gtacctgga aatgttatga atgtgtaaaa caaattgggc gtctcgtc 3720
ctgacaggaa cgtggtaaaa aaaatgcagg ggcattggcg tggaggacct gtcgagcccc 3780
tacaagggtc ggttgctggt gtcggactac ccgtacgcgg cggacgggct ggcgatctgg 3840
cacgccattg agcagtacgt gagcgagtac ctggccatct actaccgaa cgacggcgtg 3900
ctgcagggcg atacggagg gacggcgtgg tgggaaggaga cgcgcgaggt cgggcacggc 3960
gacctcaagg acgccccatg gtggcccaag atgcaaagtg tgccggagct ggccaaggcg 4020
tgcaccacca tcatctggat cgggtcggcg ctgcatgcgg cagtcaactt cgggcagtac 4080
ccctacgcgg ggttctctcc gaaccggcgc acggtgagcc ggcgcgcgat gccggagccc 4140
ggcacggagg agtacgcgga gctggagcgc gaccggagc ggccttcat ccacaccatc 4200
acgagccaga tccagaccat catcggcgtg tcgctgctgg aggtgctgtc gaagcactcc 4260
tccgacgagc tgtacctcgg gcagcgggac acgcccggagt ggacctcga cccaaaggcc 4320
ctggaggtgt tcaagcgggt cagcgaccgg ctgggtggaga tcgagagcaa ggtgggtgggc 4380
atgaaccatg acccggagct caagaaccgc aacggcccgg ctaagtttcc ctacatgctg 4440
ctctaccca acacctccga ccacaaggc gccgctgccg ggcttaccgc caagggcatc 4500
cccaacagca tctccateta atctaagcca tcggcaacca tggatgaata aagggcgttc 4560
gccacgtacg aaacttgtcg agagattggt gtagtgtgtg tctgtgacag tactatgtca 4620
gcagttgctc ttaagccga ataaataaag cagatttgct tcc 4663

```

<210> 12

<211> 862

<212> PRT

<213> 大麦

<220>

<221> variation

<222> (368)..(368)

<223> "Xaa" is an acidic, basic, or polar amino acid

<400> 12

```

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

```

260					265					270					
Lys	Ala	Ile	Thr	Gln	Gly	Ile	Leu	Pro	Ala	Val	Arg	Thr	Tyr	Val	Asp
		275					280					285			
Thr	Thr	Pro	Gly	Glu	Phe	Asp	Ser	Phe	Gln	Asp	Ile	Ile	Asn	Leu	Tyr
		290				295					300				
Glu	Gly	Gly	Ile	Lys	Leu	Pro	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg
305					310					315					320
Lys	Gln	Phe	Pro	Leu	Gln	Leu	Ile	Lys	Asp	Leu	Leu	Pro	Val	Gly	Gly
				325					330					335	
Asp	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	His	Ile	Ile	Gln	Glu	Asn	Lys
			340					345					350		
Gln	Ala	Trp	Arg	Thr	Asp	Glu	Glu	Phe	Ala	Arg	Glu	Val	Leu	Ala	Xaa
		355					360					365			
Val	Asn	Pro	Val	Met	Ile	Thr	Arg	Leu	Thr	Glu	Phe	Pro	Pro	Lys	Ser
	370					375					380				
Ser	Leu	Asp	Pro	Ser	Lys	Phe	Gly	Asp	His	Thr	Ser	Thr	Ile	Thr	Ala
385					390					395					400
Glu	His	Ile	Glu	Lys	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Thr	Val	Gln	Gln	Ala	Leu
				405					410						415
Glu	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr	Ile	Leu	Asp	His	His	Asp	Arg	Phe	Met	Pro
			420					425					430		
Phe	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Asn	Leu	Pro	Gly	Asn	Phe	Ile	Tyr	Ala	Thr
		435					440					445			
Arg	Thr	Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Gly	Asp	Gly	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Ala
						455					460				
Ile	Glu	Leu	Ser	Glu	Pro	Ile	Ile	Gln	Gly	Gly	Leu	Thr	Thr	Ala	Lys
465					470					475					480
Ser	Lys	Val	Tyr	Thr	Pro	Val	Pro	Ser	Gly	Ser	Val	Glu	Gly	Trp	Val
				485					490					495	
Trp	Glu	Leu	Ala	Lys	Ala	Tyr	Val	Ala	Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Trp	His
			500					505					510		
Gln	Leu	Val	Ser	His	Trp	Leu	Asn	Thr	His	Ala	Val	Met	Glu	Pro	Phe
		515					520					525			
Val	Ile	Ser	Thr	Asn	Arg	His	Leu	Ser	Val	Thr	His	Pro	Val	His	Lys
	530					535					540				
Leu	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Arg	Asp	Thr	Met	Thr	Ile	Asn	Ala	Leu	Ala
545					550					555					560
Arg	Gln	Thr	Leu	Ile	Asn	Ala	Gly	Gly	Ile	Phe	Glu	Met	Thr	Val	Phe
				565					570					575	
Pro	Gly	Lys	Phe	Ala	Leu	Gly	Met	Ser	Ala	Val	Val	Tyr	Lys	Asp	Trp
			580					585					590		
Lys	Phe	Thr	Glu	Gln	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Leu	Ile	Lys	Arg	Gly	Met
		595					600					605			

Ala Val Glu Asp Pro Ser Ser Pro Tyr Lys Val Arg Leu Leu Val Ser
 610 615 620
 Asp Tyr Pro Tyr Ala Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp His Ala Ile Glu
 625 630 635
 Gln Tyr Val Ser Glu Tyr Leu Ala Ile Tyr Tyr Pro Asn Asp Gly Val
 645 650 655
 Leu Gln Gly Asp Thr Glu Val Gln Ala Trp Trp Lys Glu Thr Arg Glu
 660 665 670
 Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Pro Trp Trp Pro Lys Met Gln
 675 680 685
 Ser Val Pro Glu Leu Ala Lys Ala Cys Thr Thr Ile Ile Trp Ile Gly
 690 695 700
 Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Ala Gly
 705 710 715
 Phe Leu Pro Asn Arg Pro Thr Val Ser Arg Arg Arg Met Pro Glu Pro
 725 730 735
 Gly Thr Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Arg Ala Phe
 740 745 750
 Ile His Thr Ile Thr Ser Gln Ile Gln Thr Ile Ile Gly Val Ser Leu
 755 760 765
 Leu Glu Val Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Leu Tyr Leu Gly Gln
 770 775 780
 Arg Asp Thr Pro Glu Trp Thr Ser Asp Pro Lys Ala Leu Glu Val Phe
 785 790 795 800
 Lys Arg Phe Ser Asp Arg Leu Val Glu Ile Glu Ser Lys Val Val Gly
 805 810 815
 Met Asn His Asp Pro Glu Leu Lys Asn Arg Asn Gly Pro Ala Lys Phe
 820 825 830
 Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Lys Gly Ala Ala
 835 840 845
 Ala Gly Leu Thr Ala Lys Gly Ile Pro Asn Ser Ile Ser Ile
 850 855 860

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 大麦

<400> 13

cgctacgacg tctacaacga

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 大麦

<400> 14
cagactactt tttggcggga

20

<210> 15

<211> 839

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 15

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

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

<400> 16

```

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

```


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

Ile Thr Lys Glu His Leu Glu Pro Asn Leu Glu Gly Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Glu Ala Ile Gln Asn Lys Arg Leu Phe Leu Leu Asp His His Asp Pro
 420 425 430
 Ile Met Pro Tyr Leu Arg Arg Ile Asn Ala Thr Ser Thr Lys Ala Tyr
 435 440 445
 Ala Thr Arg Thr Ile Leu Phe Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Arg Pro
 450 455 460
 Leu Ala Ile Glu Leu Ser Leu Pro His Pro Gln Gly Asp Gln Ser Gly
 465 470 475 480
 Ala Phe Ser Gln Val Phe Leu Pro Ala Asp Glu Gly Val Glu Ser Ser
 485 490 495
 Ile Trp Leu Leu Ala Lys Ala Tyr Val Val Val Asn Asp Ser Cys Tyr
 500 505 510
 His Gln Leu Val Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Val Glu Pro
 515 520 525
 Phe Ile Ile Ala Thr Asn Arg His Leu Ser Val Val His Pro Ile Tyr
 530 535 540
 Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Gly Leu
 545 550 555 560
 Ala Arg Leu Ser Leu Val Asn Asp Gly Gly Val Ile Glu Gln Thr Phe
 565 570 575
 Leu Trp Gly Arg Tyr Ser Val Glu Met Ser Ala Val Val Tyr Lys Asp
 580 585 590
 Trp Val Phe Thr Asp Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg Gly
 595 600 605
 Met Ala Ile Glu Asp Pro Ser Cys Pro His Gly Ile Arg Leu Val Ile
 610 615 620
 Glu Asp Tyr Pro Tyr Thr Val Asp Gly Leu Glu Ile Trp Asp Ala Ile
 625 630 635 640
 Lys Thr Trp Val His Glu Tyr Val Phe Leu Tyr Tyr Lys Ser Asp Asp
 645 650 655
 Thr Leu Arg Glu Asp Pro Glu Leu Gln Ala Cys Trp Lys Glu Leu Val
 660 665 670
 Glu Val Gly His Gly Asp Lys Lys Asn Glu Pro Trp Trp Pro Lys Met
 675 680 685
 Gln Thr Arg Glu Glu Leu Val Glu Ala Cys Ala Ile Ile Ile Trp Thr
 690 695 700
 Ala Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr Gly
 705 710 715 720
 Gly Leu Ile Leu Asn Arg Pro Thr Leu Ser Arg Arg Phe Met Pro Glu
 725 730 735
 Lys Gly Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Leu Arg Lys Asn Pro Gln Lys Ala

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

Trp Ile Trp Gln Leu Ala Lys Ala Tyr Ala Ser Val Asn Asp Tyr Gly
 500 505 510

Trp His Gln Leu Ile Ser His Trp Leu Asn Thr His Ala Val Met Glu
 515 520 525

Pro Phe Val Ile Ala Thr Asn Arg Gln Leu Ser Val Thr His Pro Val
 530 535 540

Tyr Lys Leu Leu His Pro His Tyr Arg Asp Thr Met Asn Ile Asn Ala
 545 550 555 560

Arg Ala Arg Gly Leu Leu Ile Asn Ala Gly Gly Val Ile Glu Met Thr
 565 570 575

Val Phe Pro His Lys His Ala Met Pro Met Ser Ser Met Val Tyr Lys
 580 585 590

His Trp Asn Phe Thr Glu Gln Ala Leu Pro Ala Asp Leu Ile Lys Arg
 595 600 605

Gly Met Ala Val Glu Asp Ala Ser Ser Pro His Lys Val Arg Leu Leu
 610 615 620

Ile Lys Asp Tyr Pro Tyr Ala Thr Asp Gly Leu Ala Val Trp Asp Ala
 625 630 635 640

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

Gly Val Leu Gln Gly Asp Val Glu Leu Gln Ala Trp Trp Lys Glu Val
 660 665 670

Arg Glu Val Gly His Gly Asp Leu Lys Asp Ala Ala Trp Trp Pro Lys
 675 680 685

Met Gln Thr Val Ala Glu Leu Ile Lys Ala Cys Ala Thr Ile Ile Trp
 690 695 700

Thr Gly Ser Ala Leu His Ala Ala Val Asn Phe Gly Gln Tyr Pro Tyr
 705 710 715 720

Ser Gly Tyr His Pro Asn Lys Pro Ser Ala Ser Arg Arg Pro Met Pro
 725 730 735

Val Gln Gly Ser Glu Glu Tyr Ala Glu Leu Glu Arg Asp Pro Glu Lys
 740 745 750

Ala Phe Ile Arg Thr Ile Thr Ser Gln Phe His Ala Leu Val Gly Ile
 755 760 765

Ser Leu Met Glu Ile Leu Ser Lys His Ser Ser Asp Glu Val Tyr Leu
 770 775 780

Gly Gln His Asp Thr Pro Ala Trp Thr Ser Asp Ala Lys Ala Leu Glu
 785 790 795 800

Ala Phe Lys Arg Phe Gly Ala Lys Leu Glu Gly Ile Glu Lys Gln Val
 805 810 815

Val Ala Met Asn Ser Asp Pro Gln Leu Lys Asn Arg Thr Gly Pro Ala
 820 825 830

Lys Phe Pro Tyr Met Leu Leu Tyr Pro Asn Thr Ser Asp His Thr Gly

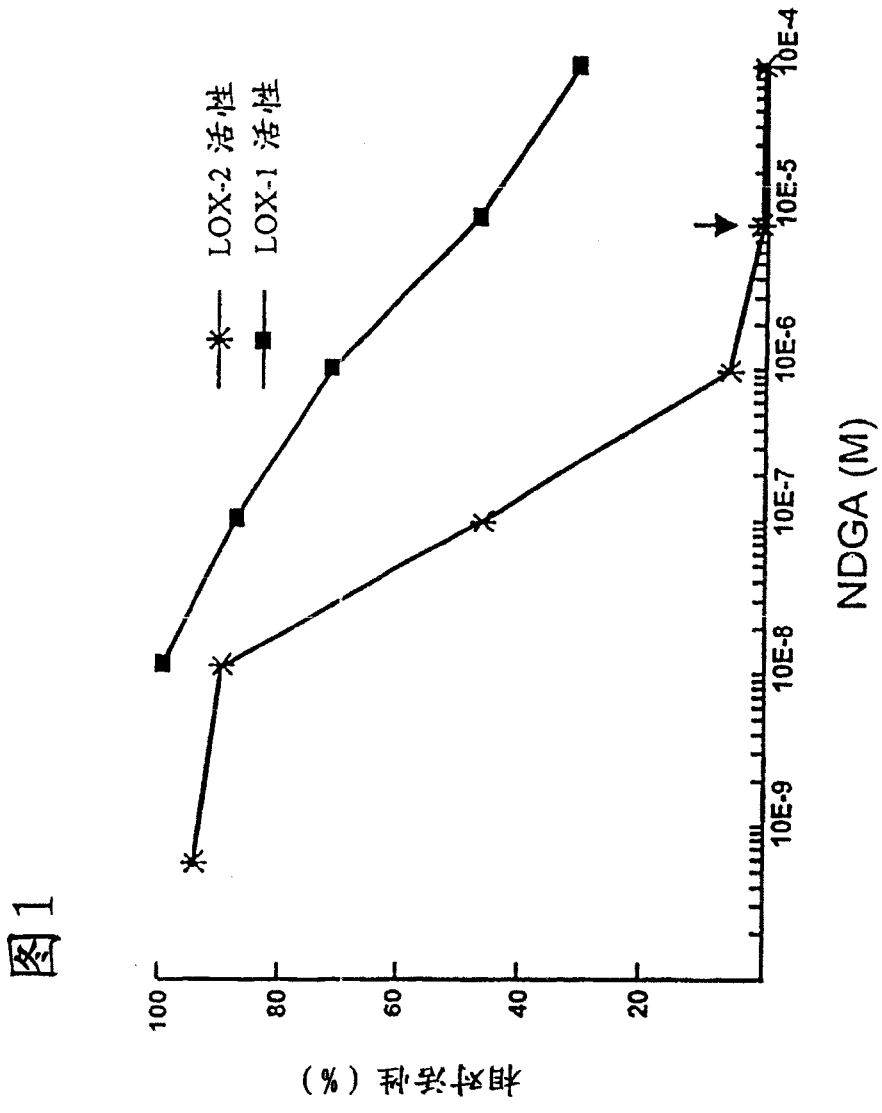


图2

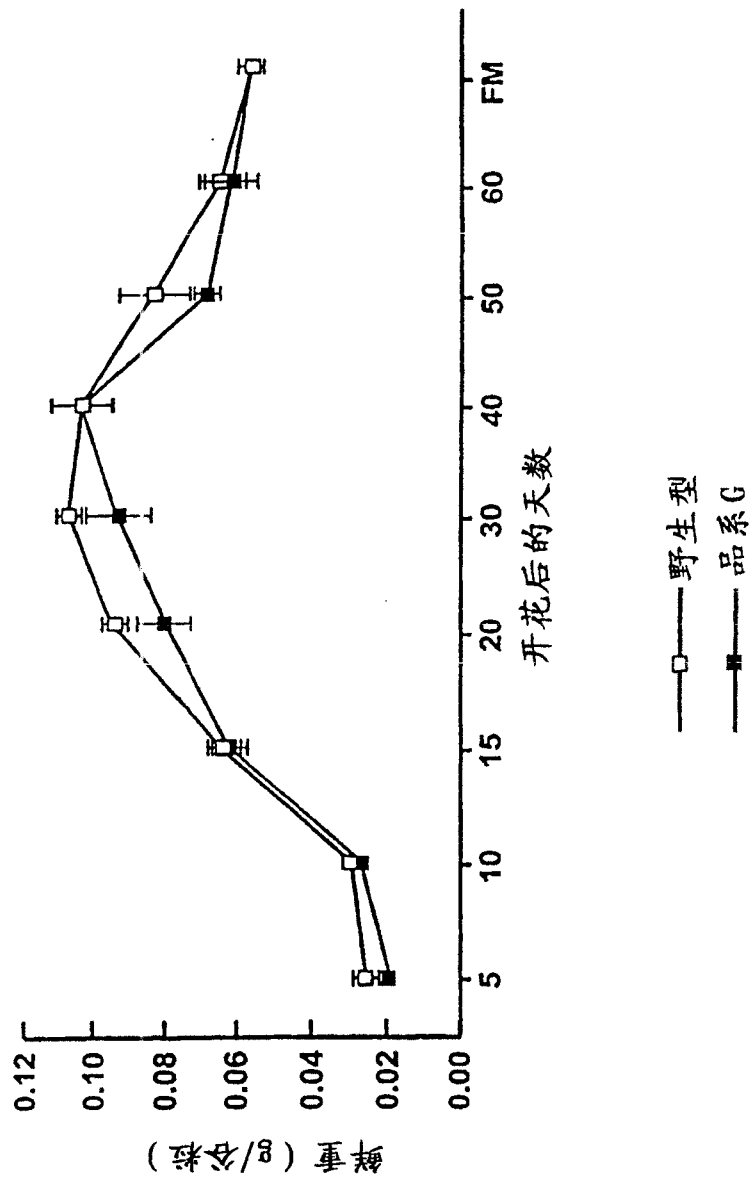


图 3

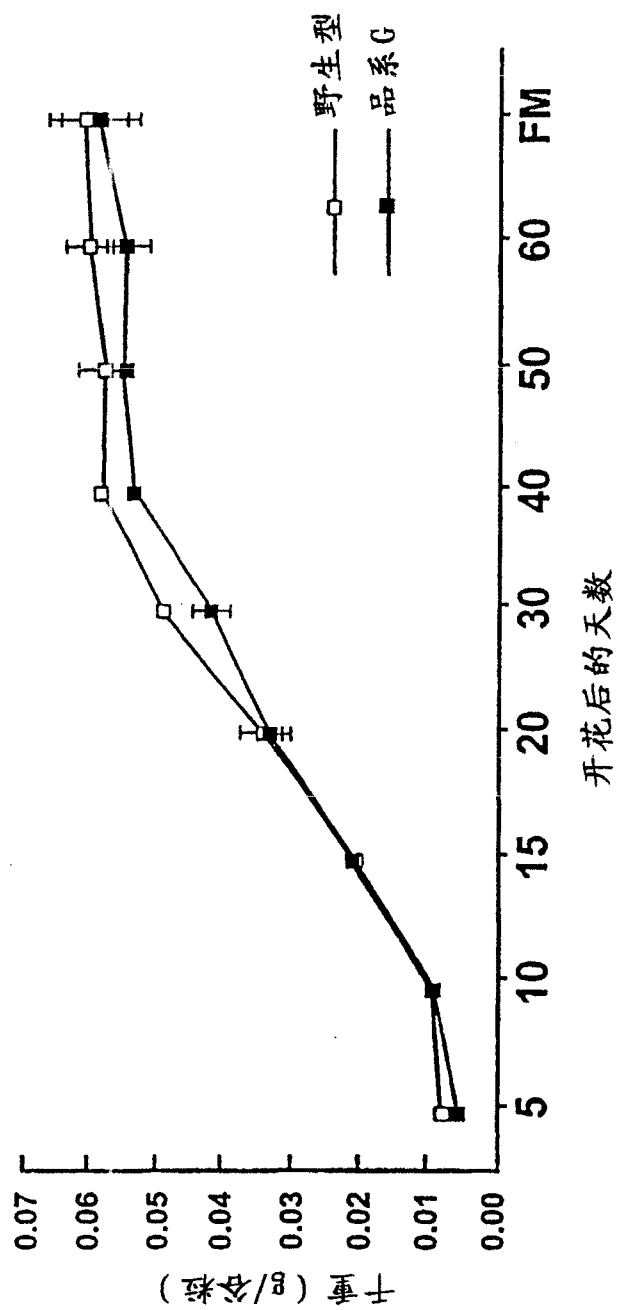


图 4

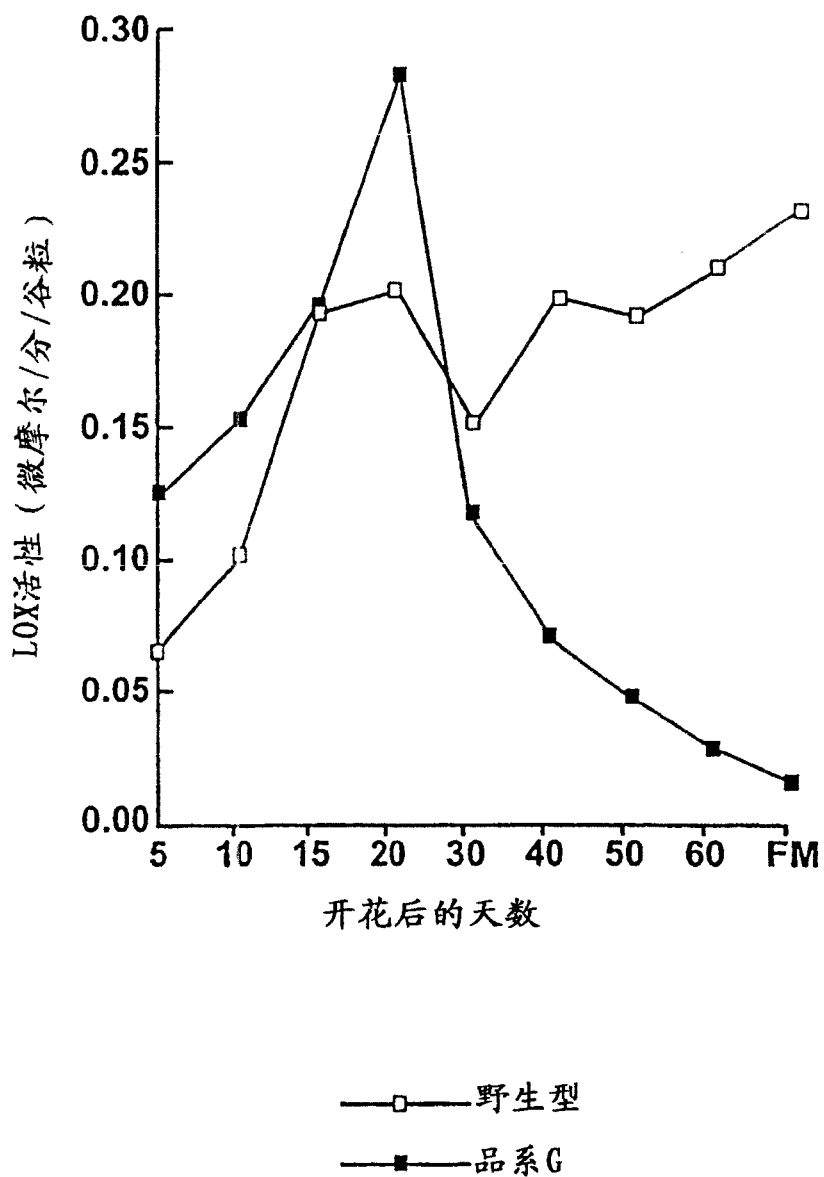


图5

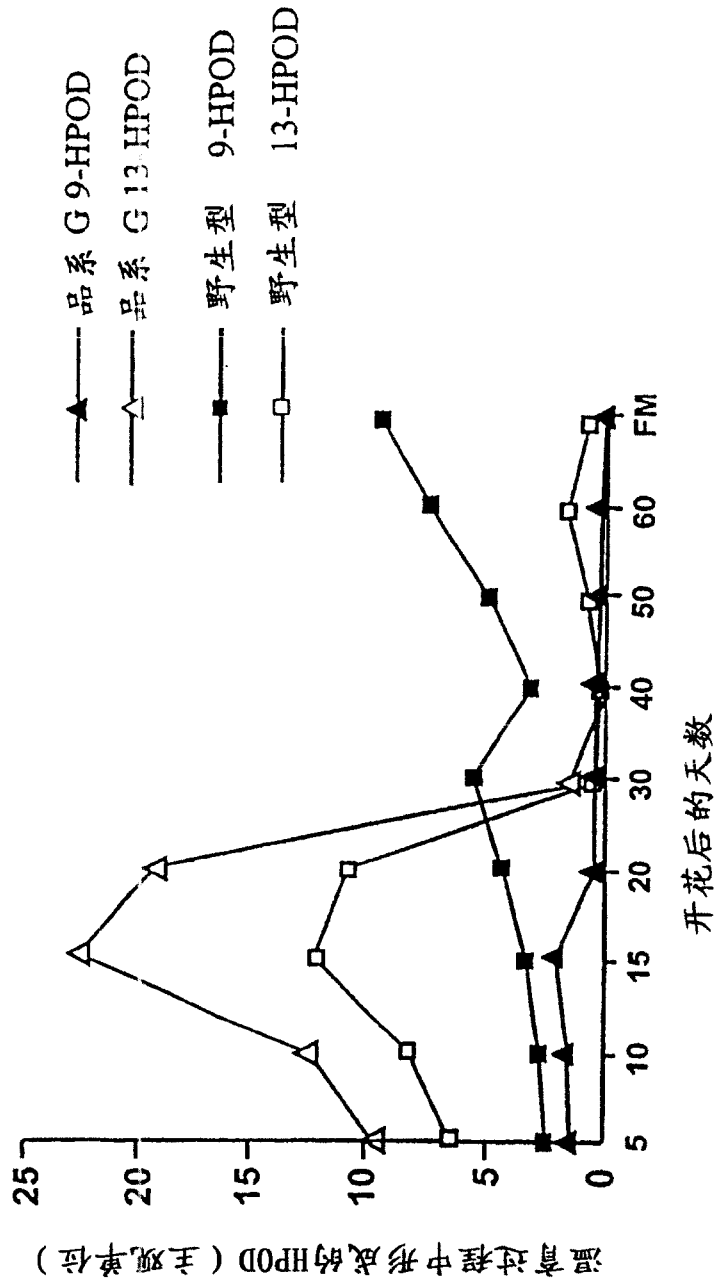


图6

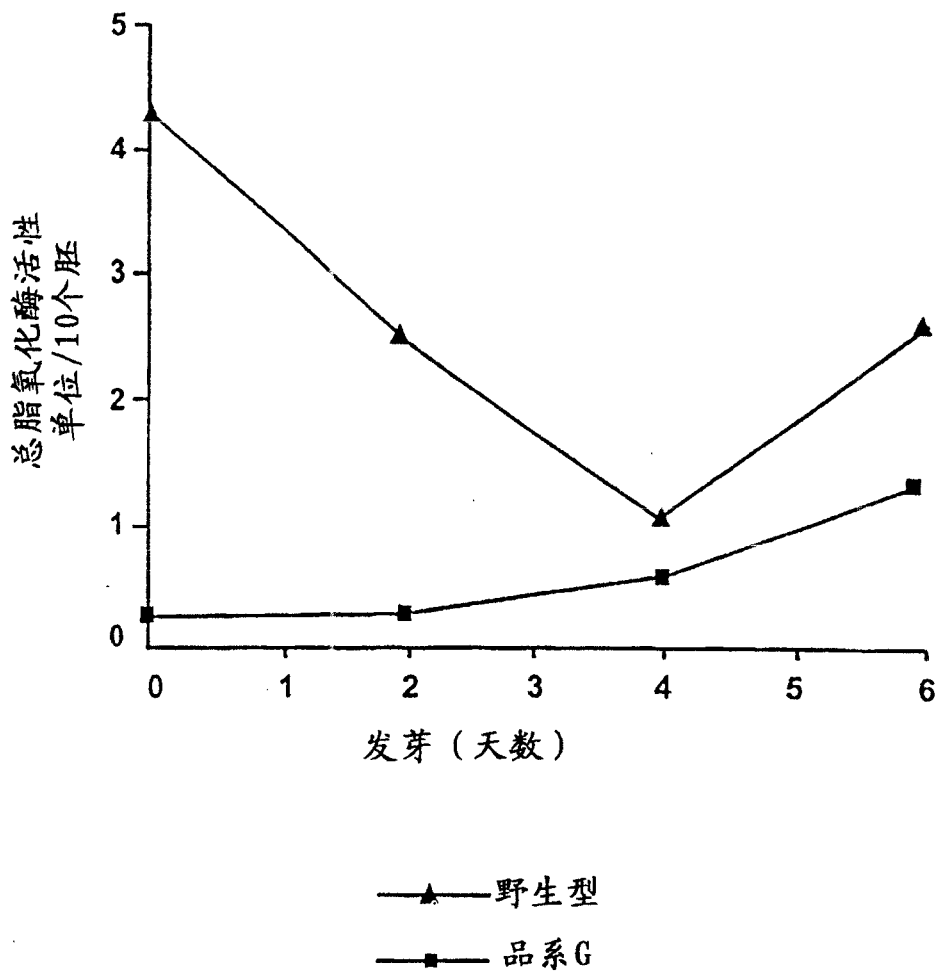
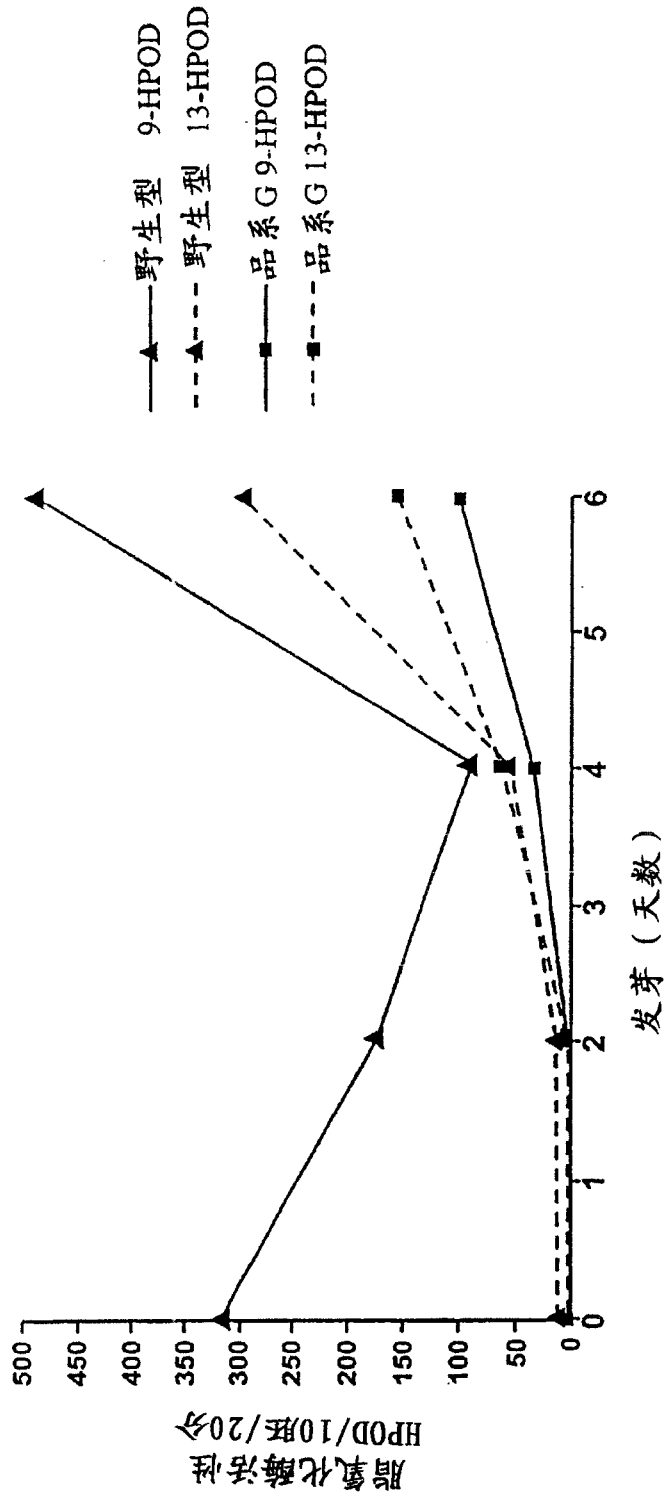
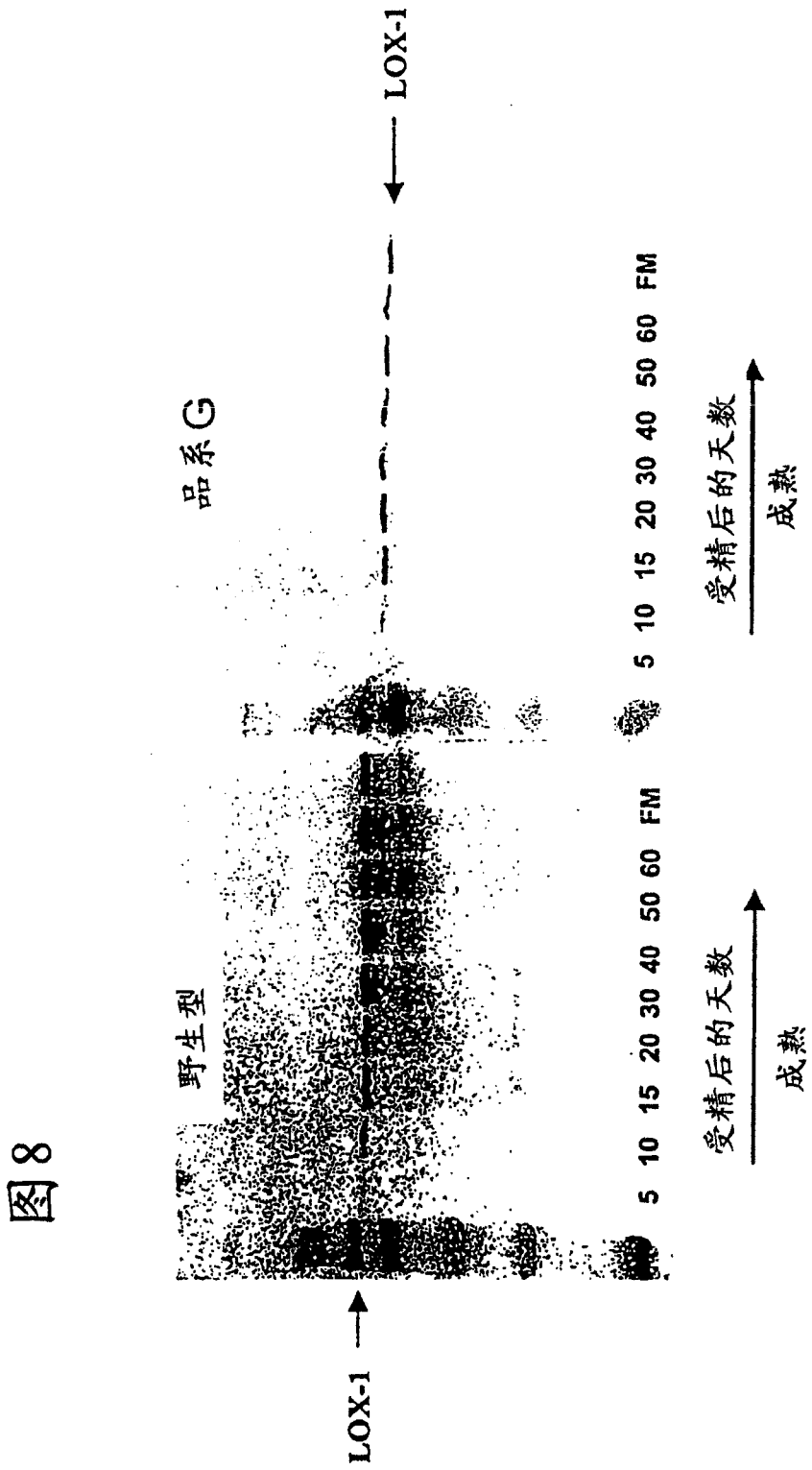


图7





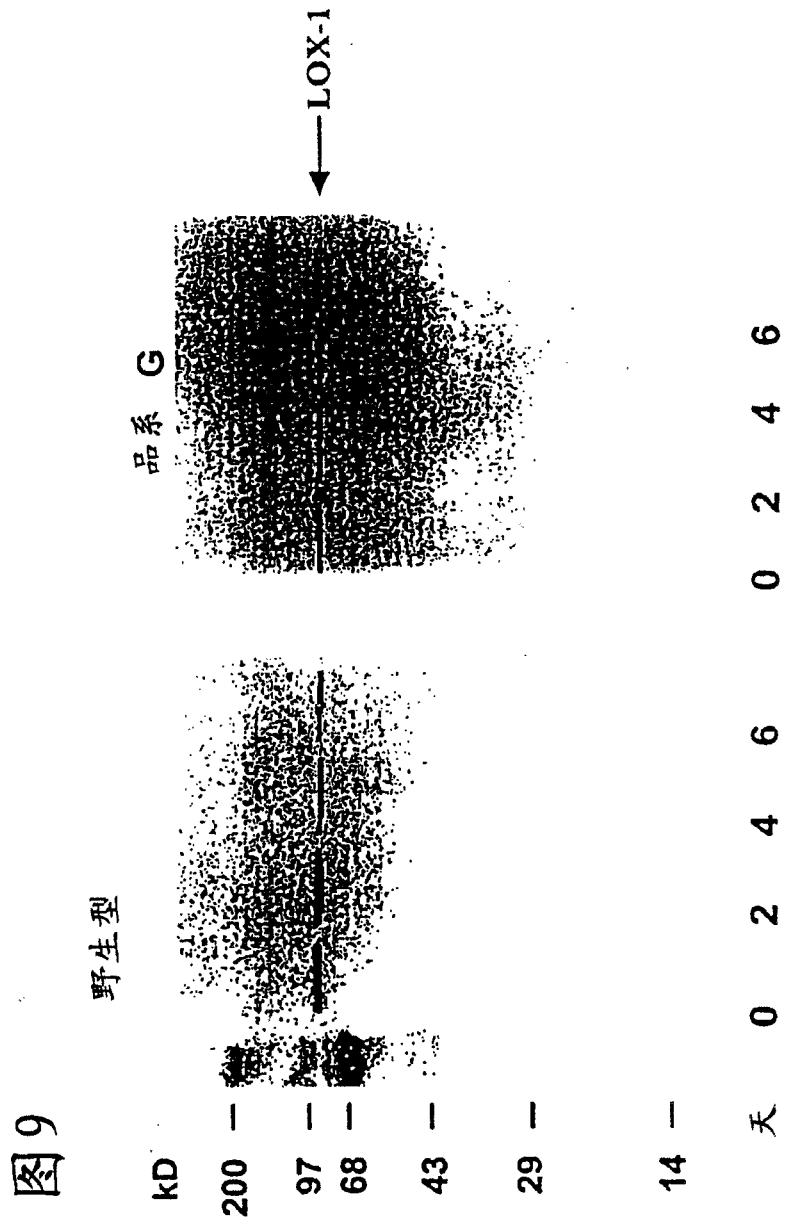


图9

图10

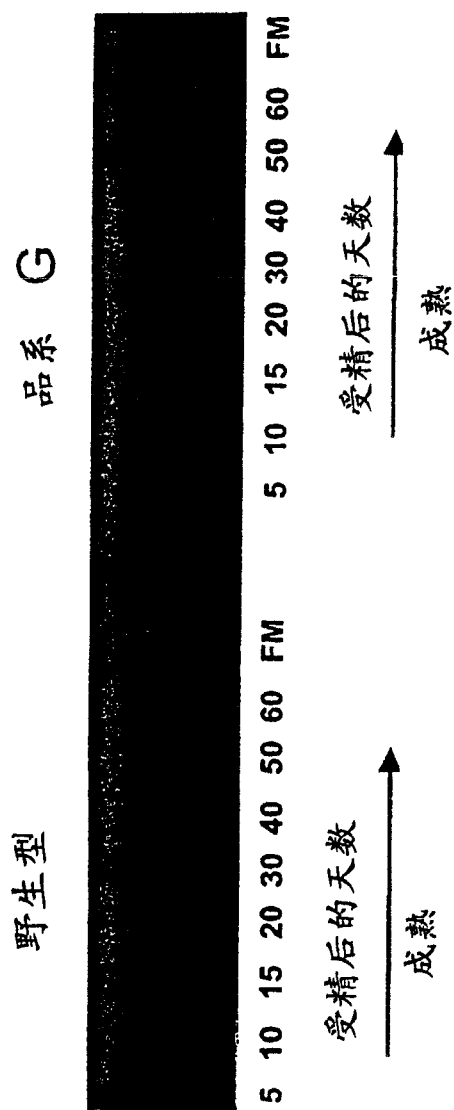


图11

品系G

野生型



天 0 2 4 6 0 2 4 6

图 12A

(-288) 启动子

LG CAGCCCCATGCATGCACATGCACATGCATGCATGCAGTGCAGCCAAAGCACCGCTCGATGGGGGATCACCCCGTCACG -208
WT CAGCCCCATGCATGCACATGCACATGCACATGCAGTGCAGCCAAAGCACCGCTCGATGGGGGATCACCCCGTCACG

LG GGACCGGAGCGGCCCATGCGAAGCACGAGGAGGACAGTCAACCGTCCGGCCGACGACGTTGGAGAGCACGTCGCCGTCGG -128
WT GGACCGGAGCGGCCCATGCGAAGCACGAGGAGGACAGTCAACCGTCCGGCCGACGACGTTGGAGAGCACGTCGCCGTCGG

LG ATCCATCTCCAAAGCCGAGGCCACACCACCGGGACCCGGACCCGGCCTATAAAATGCCCCGGACCGAGCTGCAA -48
WT ATCCATCTCCAAAGCCGAGGCCACACCACCGGGACCCGGACCCGGCCTATAAAATGCCCCGGACCGAGCTGCAA

转录起始位点 (+1)

LG GCAGTCTCCACACACTCACGCAACACACATCCATCTTCACTGAAAGTGAANAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG 32
WT GCAGTCTCCACACACTCACGCAACACACATCCATCTTCACTGAAAGTGAANAACAGTGTGCTGGTGCCATTGGTTG

翻译起始位点 (+69) →

LG GAGCAGTGAAAGCGAGGAGGAGGCCAAGAACAAAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTCACGGGGCGAACA 112
WT GAGCAGTGAAAGCGAGGAGGAGGCCAAGAACAAAGATGCTGCTGGGAGGGCTGATCGACACCCCTCACGGGGCGAACA

LG GAGCGCCGGCTCAAGGGCACGGTGGTCTATGCGCAAGAACGTGTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG 192
WT GAGCGCCGGCTCAAGGGCACGGTGGTCTATGCGCAAGAACGTGTGGACCTCAACGACTTCGGCGCCACCATCATCG

沉默突变 *

LG ACGGCATCGGCGAGTTCCTCGGCAAGGGTGTCACTGCCAGCTTATCAGCTCCACCCCGCTCGACCAAGGTAATCACTAC 272
WT ACGGCATCGGCGAGTTCCTCGGCAAGGGCGTCACTGCCAGCTTATCAGCTCCACCCCGCTCGACCAAGGTAATCACTAC

LG CCTCCTCGGCGCTTCCTCTGTGTTACAAGATATAGTATTCTTTTCGTGTGGCCGGCCATGGATGGATGGTGT 352
WT CCTCCTCGGCGCTTCCTCTGTGTTACAAGATATAGTATTCTTTTCGTGTGGCCGGCCATGGATGGATGGATGGTGT

图 12B

LG CTGGATCGGCTAAAGAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTGGTCTTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCATCGAAAAAAA 432
WT CTGGATCGGCTAAAGAAGATAGGATAGCTAGCCCTGGCCGGTGGTCTTTTACCTGAGCATGGGCATATGCCATCGAAAAAAA

LG GAGACAAACAGCATGCATGCAATGGTGGCGCACAGACCCAGAGACCCGGATGCTCGAGACAAAAGCAACAACAAGC 512
WT GAGACAAACAGCATGCATGCAATGGTGGCGCACAGACCCAGACCCGGATGCTCGAGACAAAAGCAACAACAAGC

LG AAGGACGACCGTCAAAAAGCAACAACAAGCAAGGACGGCACGTCAAAAGCAACAACAACCTAAACTAAAGCACAAGA 592
WT AAGGACGACCGTCAAAAAGCAACAACAAGCAAGGACGGCACGTCAAAAGCAACAACAACCTAAACTAAAGCACAAGA

LG CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTCAATCAAAAACAACCGCTGGAAGAGAGAGAAAGGAA 672
WT CGTAAGAGCAAGCACACAATCAGCAGGCTATAAACAGTTGTCAATCAAAAACAACCGCTGGAAGAGAGAGAAAGGAA

LG GTAGTAGCCATGAAAAATTAAATCACCCGGGGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGTACGTGGCATGTATAG 752
WT GTAGTAGCCATGAAAAATTAAATCACCCGGGGTTGCTCTTTGCCCAACAATTAATCAAGCAGGTACGTGGCATGTATAG

LG TTCTTGTAAGTAACTAAGCATGTGATATGAGAAGGTACGTGGTGTGCAGACAAACGGCGGTCCGGGAAGGTGGGCGCG 832
WT TTCTTGTAAGTAACTAAGCATGTGATATGAGAAGGTACGTGGTGTGCAGACAAACGGCGGTCCGGGAAGGTGGGCGCG

LG GAGGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGACGACGGGGAGTCCAAGTTCGGCCTCACCTTCGACTG 912
WT GAGGCGGAGCTGGAGCAGTGGGTGACGAGCCTGCCGTGACGACGGGGAGTCCAAGTTCGGCCTCACCTTCGACTG

LG GGAGGTGGAGAAGCTCGGGGTGCGGGGGCCCATCGTCGTCAACAACTACCACAGCTCCGAGTTCCTGTAAAAACCATCA 992
WT GGAGGTGGAGAAGCTCGGGGTGCGGGGGCCCATCGTCGTCAACAACTACCACAGCTCCGAGTTCCTGTAAAAACCATCA

LG CCCTCCACGACGTCCCCGGCCGAGCGGCAACCTCACCTTCGTGCCCCAACTCATGGATCTACCCCGCCGCAACTACCGA 1072
WT CCCTCCACGACGTCCCCGGCCGAGCGGCAACCTCACCTTCGTGCCCCAACTCATGGATCTACCCCGCCGCAACTACCGA

图 12C

LG TACAGCCGGCTTCTTCGCCAAACGACGGTGGATTTTCCTCTACTTTCCCTCCTCCTTTCATTTTCACCCGCCCTTCGGTCA 1152
 WT TACAGCCGGCTTCTTCGCCAAACGACGGTGGATTTTCCTCTACTTTCCCTCCTCCTTTCATTTTCACCCGCCCTTCGGTCA

 LG TTCATGGTCGATCAATTAAGTCTTGCCAGGACAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACCTTAGCAGTACGTACATTAT 1232
 WT TTCATGGTCGATCAATTAAGTCTTGCCAGGACAATAGATGATGAGCTAGGAGTGGTTACCACCTTAGCAGTACGTACATTAT

 LG TTATTCCGGTGTGGTAGAAAAGGATATGGTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAGTTGCACCCGTGGCACCCGTG 1312
 WT TTATTCCGGTGTGGTAGAAAAGGATATGGTTGGTGCAGATCGACACAAGATTGAATGAAAGTTGCACCCGTGGCACCCGTG

 LG GCAGCGGTAGGTGAAAAATAACTGTTCACGGATCCACCACATGATTTTCATGAATAAACTTTTAAAGGATGTG 1392
 WT GCAGCGGTAGGTGAAAAATAACTGTTCACGGATCCACCACATGATTTTCATGAATAAACTTTTAAAGGATGTG

 LG CTAGCCACATCTAGATGCATGTCAATAATTATTGCATACCAAAAACGATTAATAATTAAGCATAAAAAAGGAAAAAAA 1472
 WT CTAGCCACATCTAGATGCATGTCAATAATTATTGCATACCAAAAACGATTAATAATTAAGCATAAAAAAGGAAAAAAA

 LG TACTCACATACTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATAATTTATCTTACATCTAAACCTTCTTTCAT 1552
 WT TACTCACATACTCGACGTAAGATCAATGATATAGTATTTAGATATGCAATAATTTATCTTACATCTAAACCTTCTTTCAT

 LG TCTTAAATAAAGACATTTGTAAGATTTCACTATGGACAACATACGAAACAATAATCAGTGGATCTCTCTATGCATTCAAT 1632
 WT TCTTAAATAAAGACATTTGTAAGATTTCACTATGGACAACATACGAAACAATAATCAGTGGATCTCTCTATGCATTCAAT

 LG ATGTAGCTATAATAAAATCTTTAAAAGATCGTATAATTTGCAACGGAGGGAGTAAAAACATAACTTTTAAATAGTAATGT 1712
 WT ATGTAGCTATAATAAAATCTTTAAAAGATCGTATAATTTGCAACGGAGGGAGTAAAAACATAACTTTTAAATAGTAATGT

图 12D

```

LG TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACCTGCCGAGCCAGATGCCGGCGCGCTGAAGCCGTACCGCGACGACGAGCTCCG 1792
WT TGCACGGCTCCACACTCGCAGACGTACCTGCCGAGCCAGATGCCGGCGCGCTGAAGCCGTACCGCGACGACGAGCTCCG

LG GAACCTGCGTGGCAGCAGCCAGGSCCGTACAGGAGCAGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCG 1872
WT GAACCTGCGTGGCAGCAGCCAGGSCCGTACCAGGAGCAGACCGCATCTACCGCTACGACGTCTACAACGACCTCG

LG GCGAGGGCCGCCCATCCTCGGGGCAACTCCGACCACCCCTTACCCCGCGCGCCGCA CGGAGCGCAAGCCCAACGCC 1952
WT GCGAGGGCCGCCCATCCTCGGGGCAACTCCGACCACCCCTTACCCCGCGCGCCGCA CGGAGCGCAAGCCCAACGCC

LG AGCGACCCGAGCCTGGAGACCGGCTGTGCTGTGGAGCAGATCTACGTGCCGGGACGAGAAGTTCGGCCACCTCAA 2032
WT AGCGACCCGAGCCTGGAGACCGGCTGTGCTGTGGAGCAGATCTACGTGCCGGGACGAGAAGTTCGGCCACCTCAA

LG GACGTCCGACTTCCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCACGAGGGCATCCTGCCGGCCGTGCCACCTACGTGGACACCA 2112
WT GACGTCCGACTTCCTGGGCTACTCCATCAAGGCCATCACGAGGGCATCCTGCCGGCCGTGCCACCTACGTGGACACCA

LG CCCCCGGGAGTTCGACTCCTTCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCAAGGTGGCCGCCCTG 2192
WT CCCCCGGGAGTTCGACTCCTTCAGGACATCATCAACCTCTATGAGGGCGGCATCAAGCTGCCCAAGGTGGCCGCCCTG

LG GAGGACTCCGTAAGCAGTTCCTCCGCTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGCTGGGGGCGACTCCTCTGCTTAAGCTCCC 2272
WT GAGGACTCCGTAAGCAGTTCCTCCGCTCCAGCTCATCAAGGACCTCCTCCCGCTGGGGGCGACTCCTCTGCTTAAGCTCCC

LG CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACAGCAGCCGTGGAGCACCGACGAGGAGTTCGCACGGGAGGTGCTCGCCGA CGTCA 2352
WT CGTGCCCCACATCATCCAGGAGAACAGCAGCCGTGGAGCACCGACGAGGAGTTCGCACGGGAGGTGCTCGCCGGCGTCA

```

(突变位点) *

图 12F

LG TGCACAACACTGATCGAAATATGATTGATGAAACGGCAGGCTGAACACTACCGCGGTGATGGAGCCGTTCCGTGATCT 3152
 WT TGCACAACACTGATCGAAATATGATTGATGAAACGGCAGGCTGAACACTACCGCGGTGATGGAGCCGTTCCGTGATCT

LG CGACGAA CCGGCACCTTAGCGTGACGCCACCCGGTGACAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCCATGACCATCAAC 3232
 WT CGACGAA CCGGCACCTTAGCGTGACGCCACCCGGTGACAAGCTGCTGAGCCCGCACTACCGCGACACCCATGACCATCAAC

LG GCGCTGGCGGCGAGACGCTCATCAACCGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCGCCGGCAAGTTCGCGTTGGGGAT 3312
 WT GCGCTGGCGGCGAGACGCTCATCAACCGCCGGCGGCATCTTCGAGATGACGGTGTTCGCCGGCAAGTTCGCGTTGGGGAT

LG GTCGGCCGTGGTGTACAAGGACTGGAAGTTCA CCGAGCGGACTGCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA 3392
 WT GTCGGCCGTGGTGTACAAGGACTGGAAGTTCA CCGAGCGGACTGCCGGACGATCTCATCAAGAGGTACGTACCTGGTA

LG AATGTTATGAAATGTATAAACAAAT TGGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAAATGCAGGGGCATGGCGG 3472
 WT AATGTTATGAAATGTATAAACAAAT TGGGCGTCTCGCTCACTGACAGGAACGTGGTAAAAAAAATGCAGGGGCATGGCGG

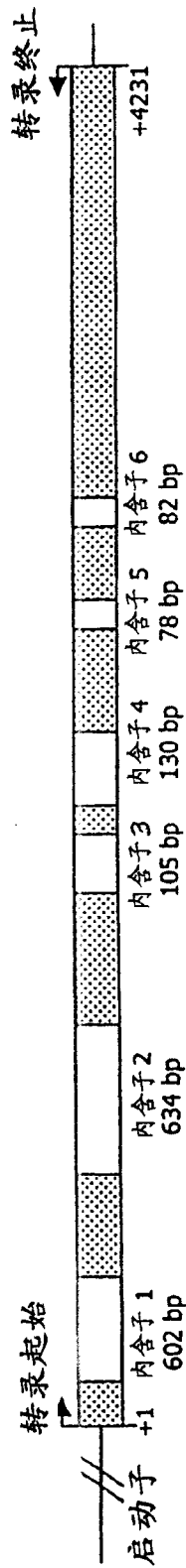
LG TGGAGGACCCGTCGAGCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTGTCCGACTACCCGTACGCGCGGACCGGGCTGGCGATCTGG 3552
 WT TGGAGGACCCGTCGAGCCCGTACAAGGTGCGGTTGCTGGTGTCCGACTACCCGTACGCGCGGACCGGGCTGGCGATCTGG

LG CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGTGCAGGGCGGATACGGAGGT 3632
 WT CACGCCATTGAGCAGTACGTGAGCGAGTACCTGGCCATCTACTACCCGAACGACGGCGTGTGCAGGGCGGATACGGAGGT

LG GCAGGCGTGGTGAAGGAGACCGCGGAGGTGGGGCACGGCGACCTCAAGGACGCCCCCATGGTGGCCCAAGATGCAAAAGTG 3712
 WT GCAGGCGTGGTGAAGGAGACCGCGGAGGTGGGGCACGGCGACCTCAAGGACGCCCCCATGGTGGCCCAAGATGCAAAAGTG

图13

野生型LOX-1基因结构:



品系GLOX-1基因结构

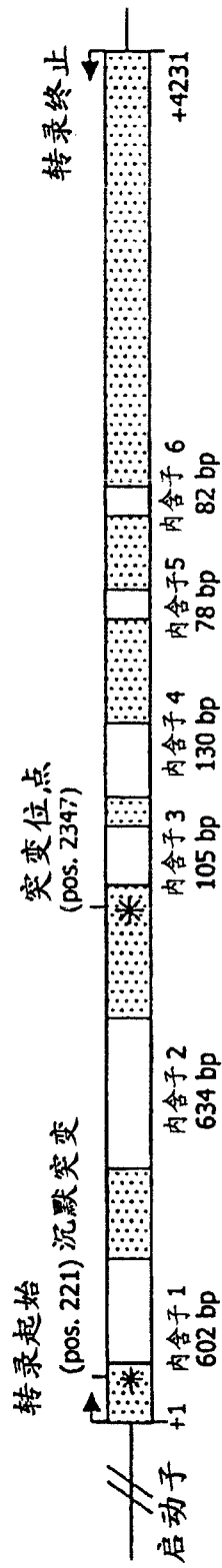
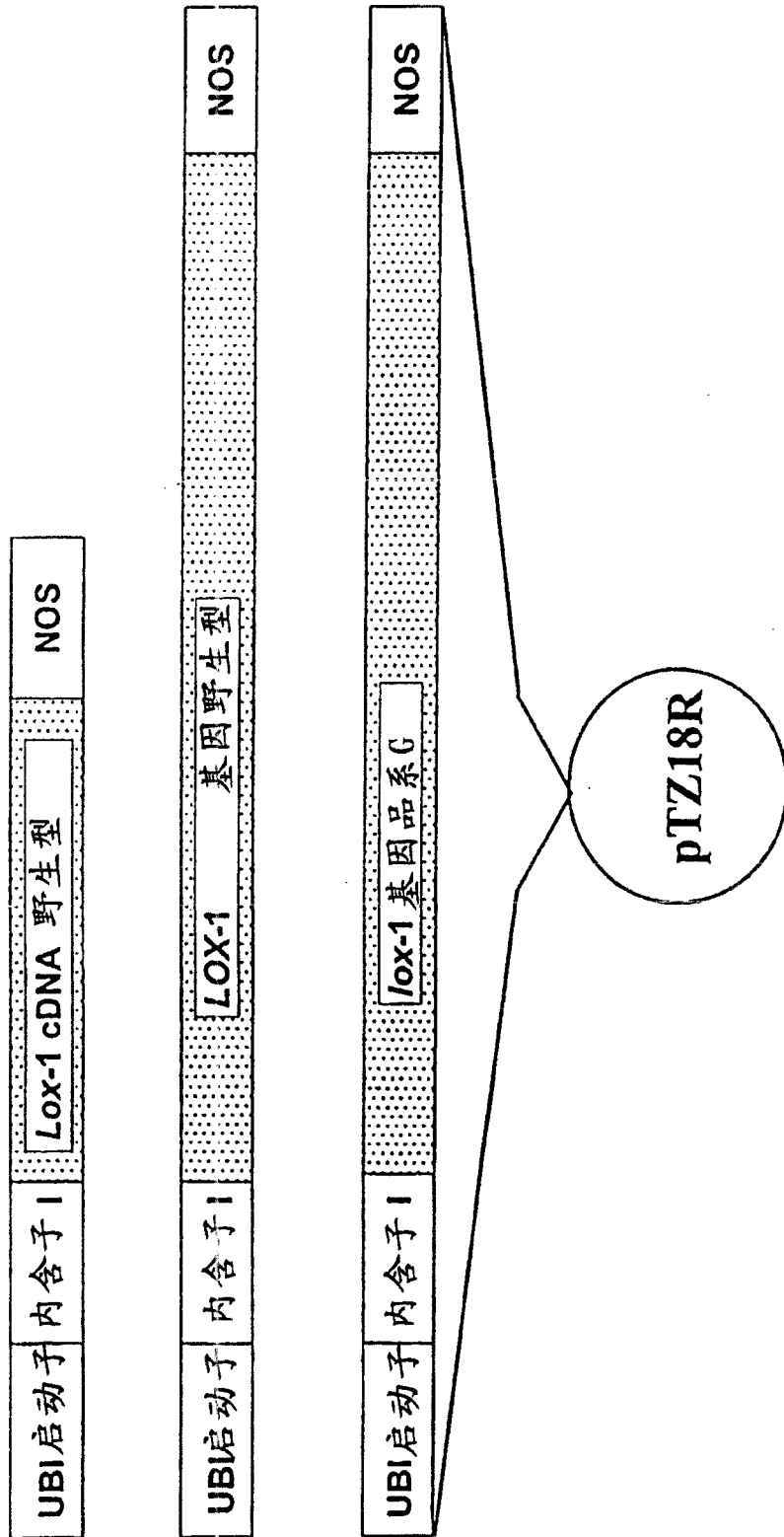


图14



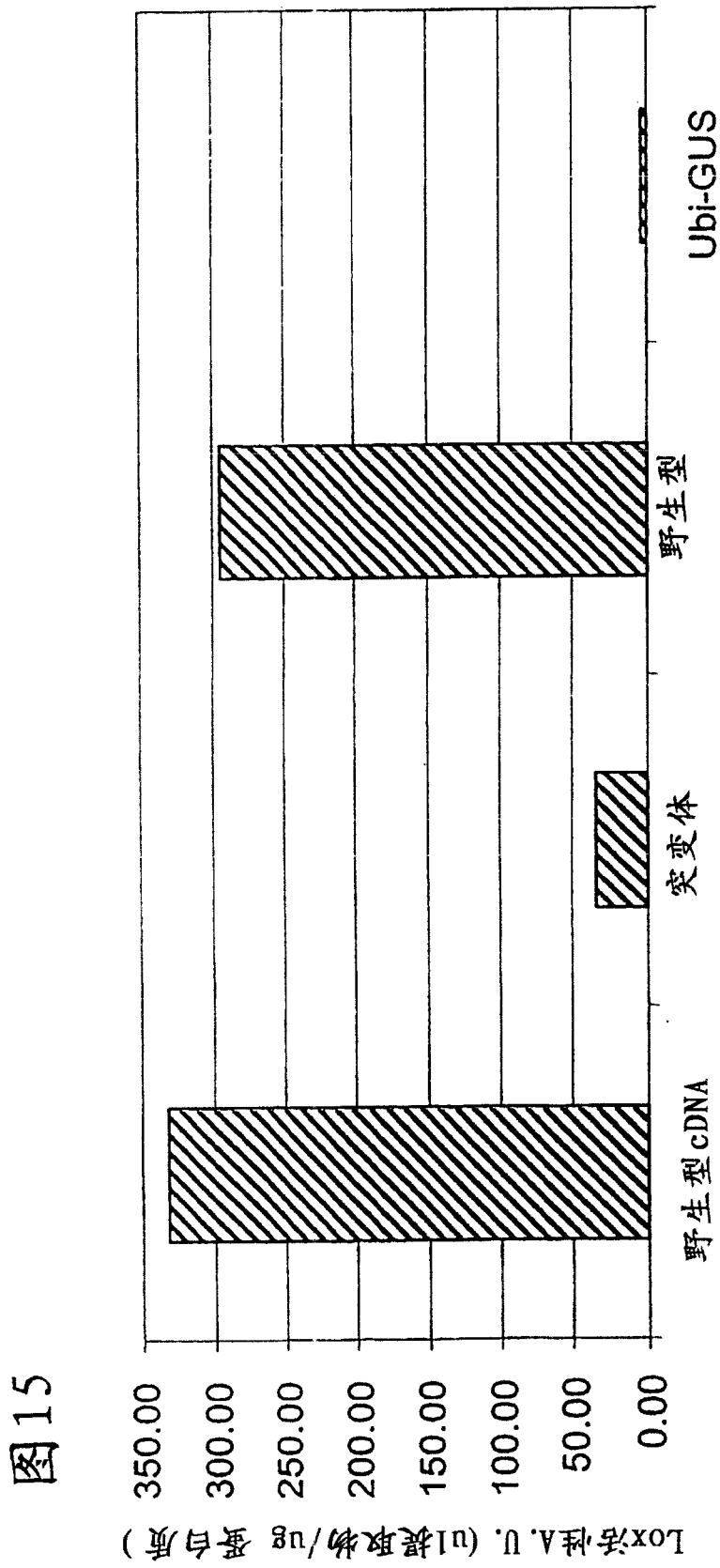


图16

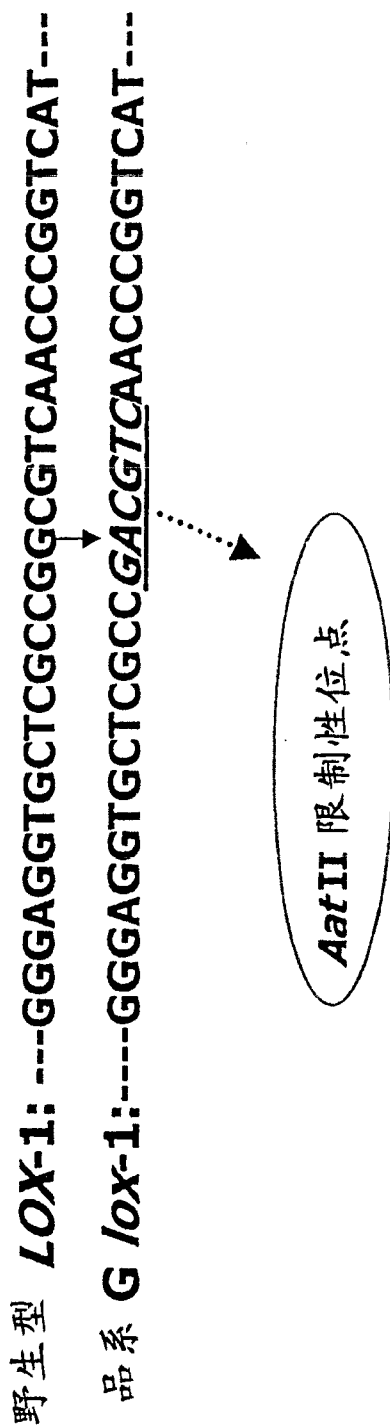
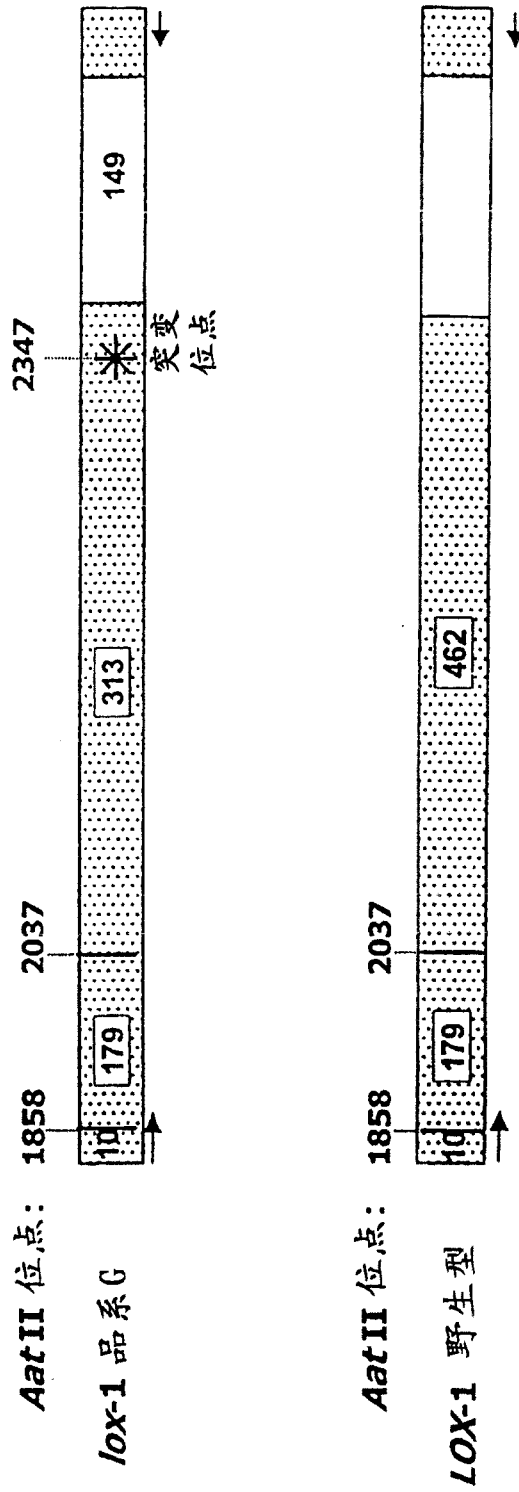


图17



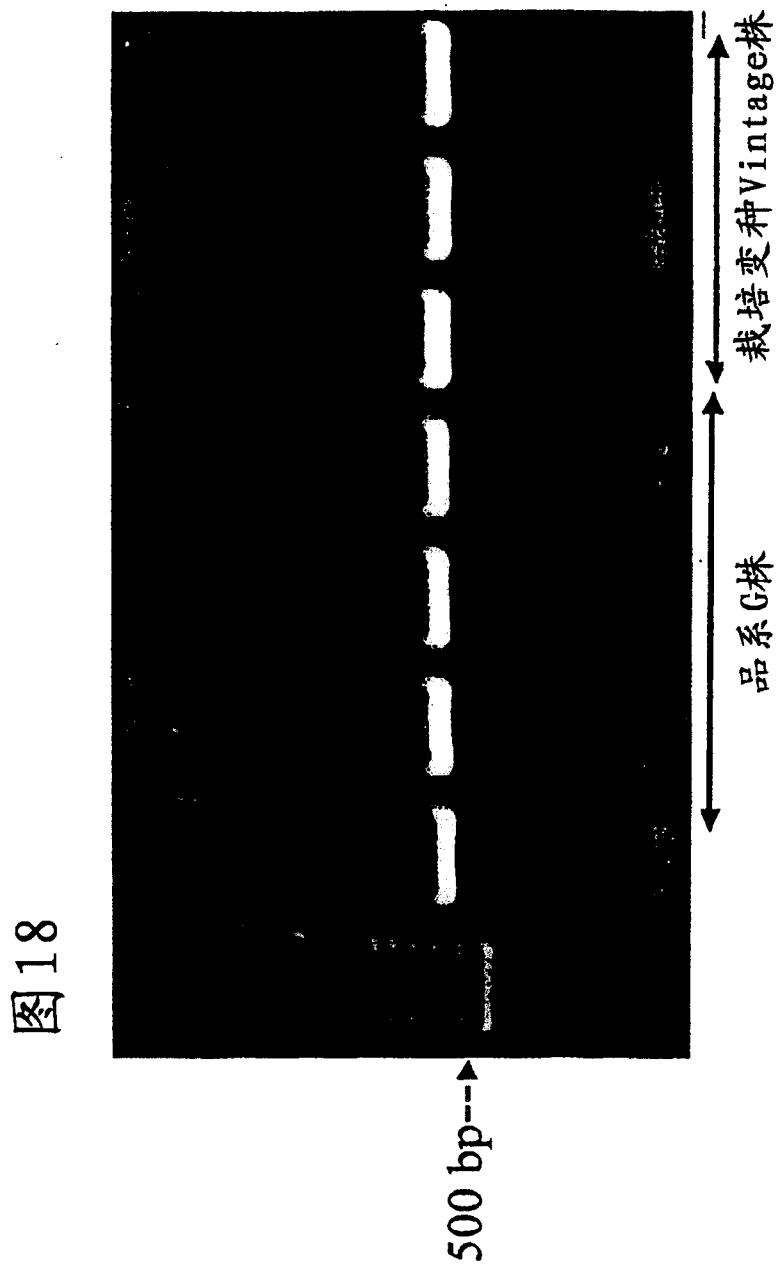


图19

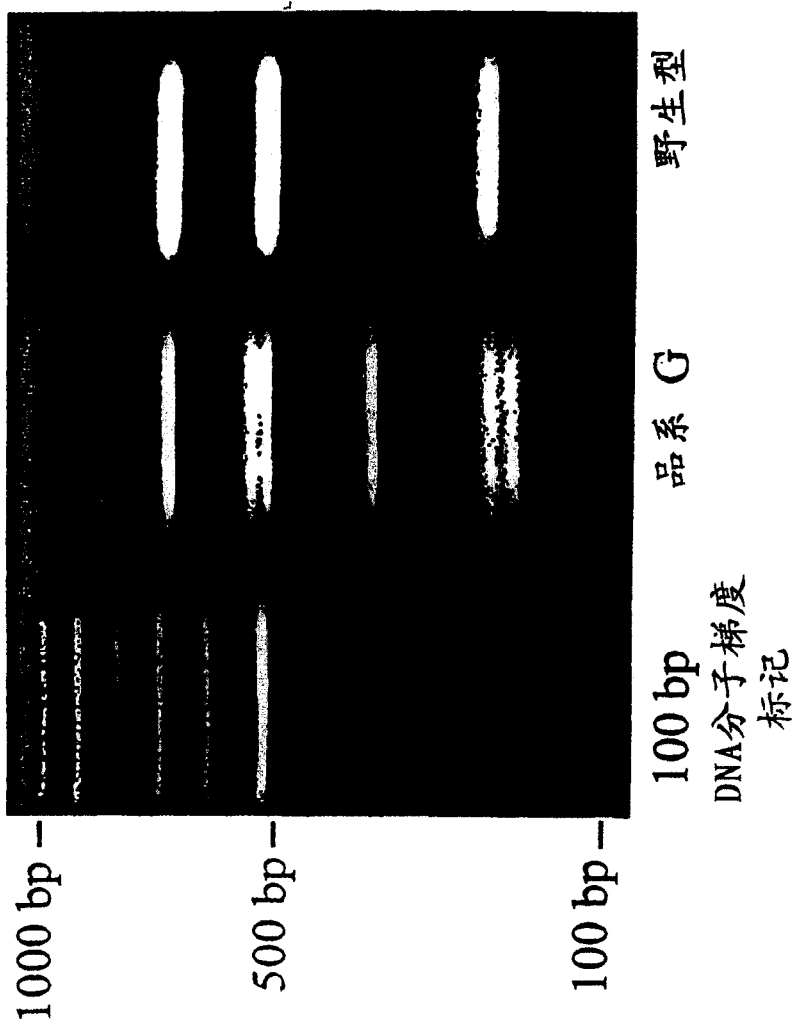
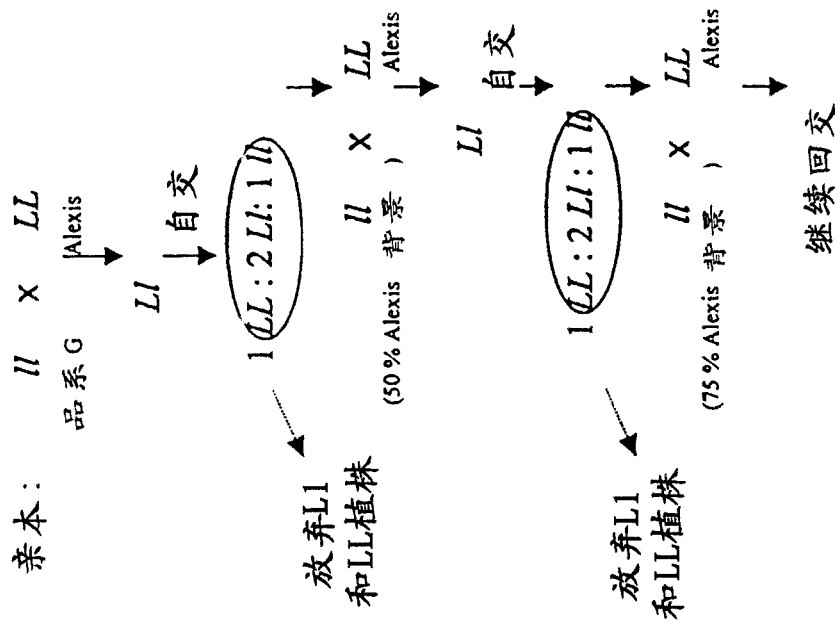


图20

品系G到栽培变种Alexis的回交程序



亲本	预期% Alexis中的ll	预期ll频率	测量的ll频率
回交 1	0%	25%	5/24 ~ 21%
回交 2	50%	25%	6/24 ~ 25%
回交 3	75%	25%	6/24 ~ 25%
回交 4	87.5%	25%	5/24 ~ 21%
回交 10	99.9%	25%	

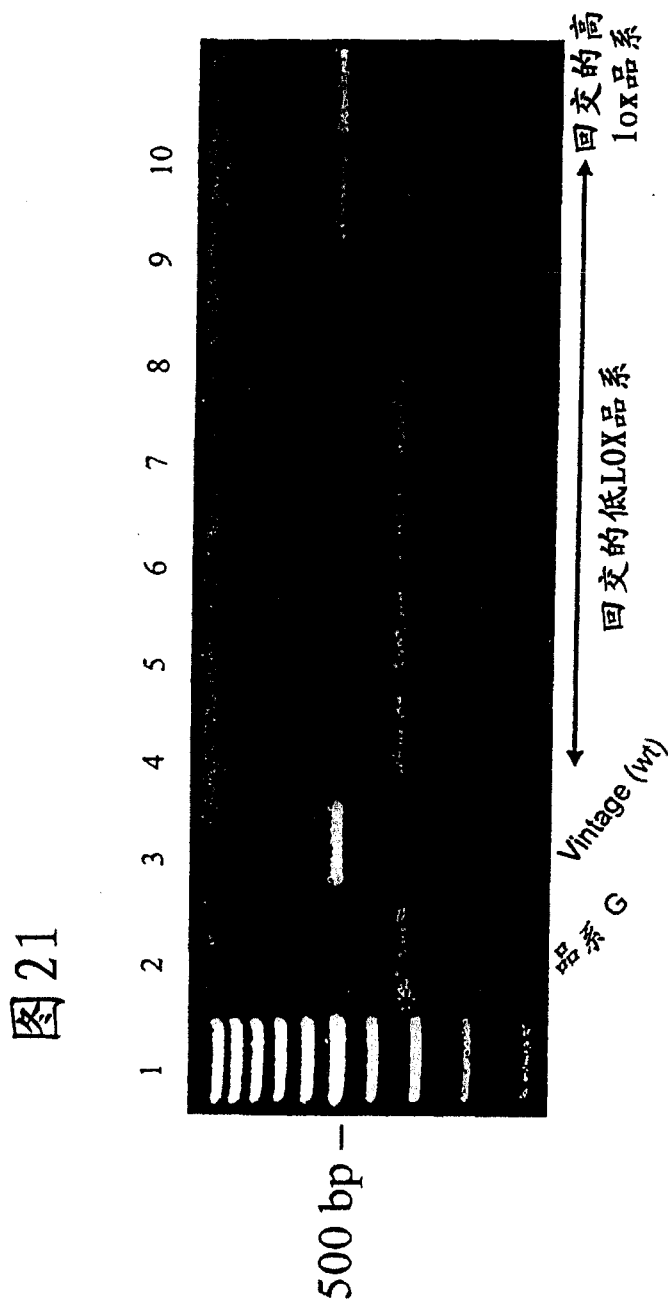


图 22B

	<u>E14</u>	+	<u>E15</u>	+	<u>E16</u>	+	+	<u>H9</u>	540
Gm1	TILFLREDGTLKPV		IELSLPHSAGDLSAAV		SQVVLPAKEG.VESTI			WLLAKAYMIVNDS	
Gm2	TILFLRENGTLKPV		IELSLPHPAGDLSGAV		SQVILPAKEG.VESTI			WLLAKAYMVVNDG	
Gm3	TILFLKNDGTLRPL		IELSLPHPOGDQSGAF		SQVFLPADEG.VESSI			WLLAKAYMVVNDG	
Hv2	TLFLRGDGTLPV		IELSSPLIQGELTTAK		SAVYTPQHAG.VEGWI			WLLAKAYASVNDY	
Hv1	TLFFLRGDGRLT		PLAIELSEPIIQGGLT		TAKSKVYTPVPSGS			VEGWVWELAKAYM	
	541	•	•	•	H9			+H10	+
Gm1	CYHQLMSHWLNTH		AAMEPFVIATHRHLS		VLHPIYKLLTPHYR			NMNINALARQSLIN	
Gm2	CYHQLMSHWLNTH		AVIEPFIIATNRHLS		ALHPIYKLLTPHYR			DTMNINGLARQSLIN	
Gm3	CYHQLVSHWLNTH		AVVEPFIIATNRHLS		VVHPIYKLLHPHYR			DTMNINGLARQSLIN	
Hv2	GWHQLISHWLNTH		AVMEPFVIATNRQLS		VTHPVYKLLHPHYR			DTMNINGARGLLIN	
Hv1	GWHQLVSHWLNTH		AVMEPFVISTNRHLS		VTHPVHKLLSPHYR			DTMTINALARQTLIN	
	601	H12		H13				+H14	+
Gm1	IIETTF		LPSKYSVEMSSAVY		KNWVFTDQALPADL			IKRGVAIKDPSTPHG	
Gm2	IIEKSE		LPSKHSVEMSSAVY		KNWVFTDQALPADL			IKRGVAIKDPSAPHG	
Gm3	VIEQTF		LWGRYSVEMSSAVY		KDWVFTDQALPADL			IKRGMIEDPSCPHG	
Hv2	VIEQTF		LWGRYSVEMSSAVY		KDWVFTDQALPADL			IKRGMIEDPSCPHG	
Hv1	IFEMIV		FPKHAMPSSMVK		HWNFTEQALPADL			IKRGMAVEDASSPHK	
	661	H15		H16				H17	+
Gm1	ADGLEI		WAAIKTWVQYEV		PLYARDDVKNDS			SELQHWWEAVEKG	
Gm2	VDGLEI		WAAIKTWVQYV		SLYARDDVKNDS			SELQWWEAVEKG	
Gm3	VDGLEI		WDAIKTWVHEY		VFLYKSDTLRED			PELQACWKEVEVGH	
Hv2	TDGLAV		WDAIEQWVSDYL		TIYYPNDGV			LQGDVELQAWWEV	
Hv1	ADGLAI		WHAIEQYVSEYL		AIYYPNDGV			LQGDTEVQAWWKE	
	721	H18		•	•			+	+
Gm1	LEDLVE		CLIIITWASALHA		VNFGQYFYGG			ILINRPTASRRL	
Gm2	IEELVE		ICTIIITWASALHA		VNFGQYFYGG			ILINRPTSSRRL	
Gm3	REELVE		ACAIITWASALHA		VNFGQYFYGG			ILINRPTLSRR	
Hv2	VAELIK		ACATIIWTGSAL		HAVNFGQYFY			SGYHFNKESASRR	
Hv1	VPELAK		ACTTIIWIGSAL		HAVNFGQYFY			AGFLINRPTVSRR	
	781	H20		H21				+	+
Gm1	KAYLRT		TITSKLP		TLISLSVIEI			ILSTHASDEVY	
Gm2	KAYLRT		TITSKFQ		TLVDLSVIEI			ILSRHASDEVY	
Gm3	KAYLKT		ITPKFQ		TLIDLSVIEI			ILSRHASDEVY	
Hv2	KAFIRT		TITSQFHAL		VGISLMEI			ILSKHSSDEVY	
Hv1	RAFIHT		TITSQIQ		TIIGVSLLE			VLVSKHSSDELY	
	841	++	+	+	+			+	++
Gm1	IEEKLV		RRNDPSLQGN		RLGVPQLPYTLL			YPSSEE.....GLT	
Gm2	IEEKLV		RRNDQSL.SN		RLGVPQLPYTLL			HPNSE.....GLT	
Gm3	IENKLV		SERNDEKLR		.NRCGPVQMPY			TLLLPSSKE.....GLT	
Hv2	IEKQV		VAMNSDPQLK		.NRTGPAKFPY			MLLYPNTSDHTG	
Hv1	IESKVV		GMNHDP		PELK.NRNGPAK			FPYMLLYPNTSD	

Gm1 SEQ ID NO:15 上述编号系统序列对比不相应于比对中的
 Gm2 SEQ ID NO:16 任一脂氧化酶序列的实际氨基酸数目
 Gm3 SEQ ID NO:17
 Hv2 SEQ ID NO:18
 Hv1 SEQ ID NO:9