(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101600800 B
(45)授权公告日 2013.08.28

(21)申请号 200780049630.6
(22)申请日 2007.11.20
(30)优先权数据
60/861,455 2006.11.29 US
60/872,200 2006.12.01 US
60/972,502 2007.09.14 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2009.07.09
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2007/085164 2007.11.20
(87)PCT申请的公布数据
WO2008/100353 EN 2008.08.21
(73)专利权人 埃塞尼克斯公司
地址 美国北卡罗来纳州
(72)发明人 L·C·斯考藤 C·彼得斯 B·范德伯格 T·汉森 V·贝林逊
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 赵蓉民 陈建芳
(51)Int.Cl.
*C12N 15/82*(2006.01)
*C12N 9/10*(2006.01)
*A01H 5/00*(2006.01)
*A01H 1/00*(2006.01)

(56)对比文件
WO 2006110586 A3,2006.10.19, 全文.
CN 1952152 A,2007.04.25, 全文.
刘光全等."草甘膦抗性新基因的克隆、序列分析及其蛋白高级结构预测".《中国生物化学与分子生物学报》.2006, 第22卷(第3期), 第197-203页.
STALKER D M et al."A SINGLE AMINO-ACID SUBSTITUTION IN THE ENZYME 5 ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE EC-2.5.1.19 CONFERS RESISTANCE TO THE HERBICIDE GLYPHOSATE".《JOURNAL OF BIOLOGICAL》.1985, 第260卷(第8期), 第4724-4728页.
PADGETTE S R et al."SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF A CONSERVED REGION OF THE 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE ACTIVE SITE".《JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》.1991, 第266卷(第33期), 第22364-22369页.

审查员 董桂灵

权利要求书2页 说明书19页
序列表70页 附图3页

(54)发明名称

# 改良的GRG23 EPSP合酶:组合物和使用方法

(57)摘要

提供了赋予细菌、植物、植物细胞、组织和种子除草剂抗性或耐性的组合物和方法。组合物包括编码除草剂抗性或耐性多肽的多核苷酸、包含那些多核苷酸的载体以及包含所述载体的宿主细胞。本发明的核苷酸序列可以在DNA构建物或表达盒中使用,用于在生物体——包括微生物和植物——中转化和表达。组合物也包括转化的细菌、植物、植物细胞、组织和种子。具体而言,提供了编码草甘膦抗性或耐性多肽的分离的多核苷酸。此外,也包括与多核苷酸对应的氨基酸序列。尤其是,本发明提供了分离的多核苷酸,所述分离的多核苷酸包含编码SEQ ID NO:9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33或35中示出的氨基酸序列的核苷酸序列,或SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32或34中列出的核苷酸序列。

CN 101600800 B

1. 分离的或重组的核酸分子，其选自：

a) 核酸分子，其由 SEQ ID NO:28 或 32 的核苷酸序列组成；和

b) 核酸分子，其编码由 SEQ ID NO:29 或 33 的氨基酸序列组成的多肽。

2. 权利要求 1 所述的分离的或重组的核酸分子，其中所述核苷酸序列是设计用于在植物中表达的合成序列。

3. 权利要求 1 所述的分离的或重组的核酸分子，其中所述核苷酸序列可操作地连接到能够指导编码序列在植物细胞中表达的启动子。

4. 载体，其包含权利要求 1、2 或 3 所述的核酸分子。

5. 权利要求 4 所述的载体，进一步包含编码异源多肽的核酸分子。

6. 宿主细胞，其含有权利要求 2 或 3 所述的核酸分子。

7. 权利要求 6 所述的宿主细胞，其是细菌宿主细胞。

8. 分离的或重组的多肽，其选自：

a) 多肽，其由 SEQ ID NO:29 或 33 的氨基酸序列组成；和

b) 多肽，其由 SEQ ID NO:28 或 32 的核苷酸序列编码。

9. 产生具有抗草甘膦活性的多肽的方法，包括在表达编码所述多肽的核酸分子的条件下培养权利要求 6 所述的宿主细胞，所述多肽选自：

a) 多肽，其由 SEQ ID NO:29 或 33 的氨基酸序列组成；和

b) 多肽，其由 SEQ ID NO:28 或 32 的核苷酸序列编码。

10. 赋予植物草甘膦抗性的方法，所述方法包括用 DNA 构建物转化所述植物和再生转化的植物，所述构建物包含驱动在植物细胞中表达的启动子，所述启动子与选自 SEQ ID NO:28 或 32 的核苷酸序列可操作地连接。

11. 权利要求 10 所述的方法，其中所述植物是大豆植物。

12. 权利要求 10 所述的方法，其中所述植物是玉米植物。

13. 权利要求 10 所述的方法，其中所述植物选自玉米、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉、水稻、大豆、甘蔗、烟草和大麦。

14. 权利要求 13 所述的方法，其中所述十字花科植物是甜菜和油菜。

15. 赋予植物草甘膦抗性的方法，包括：

a) 提供包含 SEQ ID NO:28 或 32 中所示的核苷酸序列的植物；

b) 使所述植物与有效浓度的草甘膦接触；和

c) 在与所述草甘膦接触之后，使所述植物在温度高于周围环境温度的条件下生长每天至少 2 个连续小时，持续至少 4 天，其中所述接触之后的天数在所述植物的生长季节内并且其中步骤 b) 中的所述温度是 37℃。

16. 权利要求 1 所述的分离的或重组的核酸分子，其由 SEQ ID NO:28 的核苷酸序列组成。

17. 权利要求 1 所述的分离的或重组的核酸分子，其由 SEQ ID NO:32 的核苷酸序列组成。

18. 权利要求 1 所述的分离的或重组的核酸分子，其中所述核酸分子编码由 SEQ ID NO:29 的氨基酸序列组成的多肽。

19. 权利要求 1 所述的分离的或重组的核酸分子，其中所述核酸分子编码由 SEQ ID

NO :33 的氨基酸序列组成的多肽。

# 改良的 GRG23EPSP 合酶 :组合物和使用方法

## 技术领域

[0001] 本发明涉及植物分子生物学,特别是涉及新型 EPSP 合酶多肽,所述合酶多肽赋予增加的对除草剂草甘膦的抗性和耐性。

## 背景技术

[0002] N-膦酰甲基甘氨酸,一般称为草甘膦,是重要的农学化学制品。草甘膦抑制将磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 和 3- 磷酸莽草酸 (S3P) 转化为 5- 烯醇丙酮酰 -3- 磷酸莽草酸的酶。这种酶 (5- 烯醇丙酮酰莽草酸 -3- 磷酸合酶,本文称为“EPSP 合酶”或“EPSPS”) 的抑制通过关闭莽草酸途径,从而抑制芳香族氨基酸的生物合成来杀死植物细胞。

[0003] 由于草甘膦类除草剂抑制芳香族氨基酸的生物合成,所以它们不仅杀死植物细胞,而且也对细菌细胞具有毒性。草甘膦抑制多种细菌 EPSP 合酶,因而对这些细菌具有毒性。然而,某些细菌 EPSP 合酶对草甘膦具有高的耐性。

[0004] 可以通过转化植物细胞以表达抗草甘膦的细菌 EPSP 合酶来产生抗草甘膦毒性的植物细胞。值得注意,来自根癌农杆菌 (Agrobacterium tumefaciens) 菌株 CP4 的细菌基因已经被用于在植物中表达之后赋予植物细胞除草剂抗性。来自鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium) 菌株 CT7 的突变 EPSP 合酶赋予细菌细胞草甘膦抗性,并且赋予植物细胞草甘膦抗性 ( 美国专利第 4,535,060、4,769,061 和 5,094,945 号 )。

[0005] 美国专利第 6,040,497 号报道了突变玉米 EPSP 合酶,其在 102 位具有苏氨酸到异亮氨酸的置换并且在 106 位具有脯氨酸到丝氨酸的置换 ( “TIPS”突变 )。这样的改变赋予了玉米酶草甘膦抗性。来自鼠伤寒沙门氏菌菌株 CT7 的突变 EPSP 合酶赋予细菌细胞的草甘膦抗性,并且据报道赋予植物细胞草甘膦抗性 ( 美国专利第 4,535,060、4,769,061 和 5,094,945 号 )。He 等,((2001)Biochim et Biophysica Acta1568 :1-6) 已经通过在大肠杆菌 (E.coli) 和鼠伤寒沙门氏菌 EPSP 合酶基因之间进行诱变和重组而开发了具有增加的草甘膦耐性的 EPSP 合酶,并且提出在位置 42(T42M) 和位置 230(Q230K) 的突变可能是造成观测到的抗性的原因。后续工作 (He 等,(2003)Biosci.Biotech.Biochem.67 :1405-1409) 显示,T42M 突变 ( 苏氨酸到甲硫氨酸 ) 足以提高大肠杆菌酶和鼠伤寒沙门氏菌酶两者的耐性。由于除草剂抗性植物提供的许多优势,除草剂抗性基因改善的抗草甘膦活性是期望的。

[0006] 诱变的可选方法是“变换诱变 (permutational mutagenesis)”方法,所述方法在 2006 年 6 月 13 日提交的美国专利申请第 60/813,095 号中被描述。

## 发明内容

[0007] 提供了赋予抗性或耐性的组合物和方法。组合物包括抗草甘膦除草剂的 EPSP 合酶,以及编码这种酶的核酸分子,包含那些核酸分子的载体和包含这些载体的宿主细胞。组合物包括编码除草剂抗性多肽的核酸分子,其包括编码包含 SEQ ID NO :9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 35 的多肽的那些核酸分子,以及 SEQ ID NO :6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 34 的多核苷酸序列。编码序列可以在 DNA 构建物或表达

盒中使用，用于在生物体——包括微生物和植物——中转化和表达。组合物还包括转化的细菌、植物、植物细胞、组织和种子，它们通过将本发明的组合物引入到生物体的基因组中而具有草甘膦抗性。在所述生物体是植物时，序列的引入允许含草甘膦的除草剂应用到植物以选择性地杀死对草甘膦敏感的杂草或其它未转化的植物，但是不杀死转化的生物体。该序列可以另外用作标记，用于选择在草甘膦条件下生长的植物细胞。

[0008] 另外提供了鉴定具有抗草甘膦活性的 EPSP 合酶的方法。所述方法包括在本发明的结构域存在的基础上鉴定对草甘膦具有抗性的另外的 EPSP 合酶序列。

## 附图说明

[0009] 图 1 显示 GRG23(ace1)(“M5”，SEQ ID NO :10) 在 37℃ 0 至 25 小时相比于野生型 GRG23(“WTGRG23”，SEQ ID NO :2) 的酶促活性。

[0010] 图 2 示出了 GRG23 和几种变体对草甘膦的抗性，表示为抑制常数，或 $K_I$。

[0011] 图 3 示出了 GRG23 和 GRG23 变体在 37℃的半衰期。

## 具体实施方式

[0012] 现在本发明将在下文中参考附图更充分地进行描述，其中，本发明的一些但不是全部实施方式被示出。实际上，这些发明可以以许多不同的形式加以体现并且不应该被解释为限于本文提出的实施方式；相反，这些实施方式被提供以使本公开满足可适用的法律要求。在全文中同样的数字是指同样的要素。

[0013] 本发明相关领域的技术人员在了解了前述描述和相关附图中给出的教导的益处之后将会想到本文提出的发明的许多修改和其它实施方式。因此，应当理解，本发明不限于公开的具体实施方式并且修改和其它实施方式拟被包括在所附权利要求的范围之内。虽然本文使用了具体术语，但它们只以一般性和描述性的意义被使用，并不用于限制的目的。

[0014] 本发明涉及用于调节生物体、尤其是植物和植物细胞中的除草剂抗性的组合物和方法。所述方法包括用编码本发明的抗草甘膦基因的核苷酸序列转化生物体。本发明的核苷酸序列可用于制备对除草剂草甘膦显示出增加的抗性的植物。因而，本发明的“草甘膦抗性”或“草甘膦耐性”基因意指 SEQ ID NO :6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 34 中列出的核苷酸序列及其片段和变体，所述片段和变体编码草甘膦抗性或耐性多肽。同样，本发明的“草甘膦抗性”或“草甘膦耐性”多肽是具有 SEQ ID NO :9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 35 列出的氨基酸序列的多肽及其片段和变体，所述片段和变体赋予宿主细胞草甘膦抗性或耐性。A. 分离的多核苷酸及其变体和片段

[0015] 在一些实施方式中，本发明包括分离的、重组的或纯化的多核苷酸。“分离的”“或“纯化的”多核苷酸或多肽、或其生物学活性部分在通过重组技术产生时基本上不含其它的细胞材料或培养基，或在化学合成时基本上不含化学前体或其它化学制品。“生物学活性的”意指具有天然多肽的所需生物学活性，也就是说，保持抗除草剂活性。“分离的”多核苷酸可以不含这样的序列（例如，蛋白质编码序列），所述序列天然地位于生物体的基因组 DNA 中的核酸侧翼（即，位于所述核酸的 5′ 和 3′ 端的序列），所述多核苷酸来源于所述生物体。对于本发明的目的，“分离的”当用于指多核苷酸时不包括分离的染色体。例如，在各种实施方式中，分离的草甘膦抗性编码多核苷酸可以包含小于大约 5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、

0.5kb 或 0.1kb 的核苷酸序列，其天然地位于细胞的基因组 DNA 中的多核苷酸的侧翼，所述多核苷酸来源于所述细胞。

[0016] 本发明的多核苷酸包括编码包含 SEQ ID NO:9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33 或 35 的草甘膦抗性多肽的那些多核苷酸，以及 SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32 或 34 的多核苷酸序列。

[0017] “草甘膦”意指 N- 膦酰甲基甘氨酸的任何除草剂形式（包括其任何盐）和导致草甘膦阴离子在植物中 (in planta) 产生的其它形式。“除草剂抗性蛋白”或由“除草剂抗性编码核酸分子”的表达产生的蛋白质包括这样的蛋白质，其赋予细胞比不表达所述蛋白质的细胞耐受更高浓度的除草剂的能力，或赋予比不表达所述蛋白质的细胞耐受某一浓度的除草剂更长时间的能力。“草甘膦抗性蛋白”包括这样的蛋白质，其赋予细胞比不表达所述蛋白质的细胞耐受更高浓度的草甘膦的能力，或者比不表达所述蛋白质的细胞耐受某一浓度的草甘膦更长一段时间的能力。“耐受”或“耐性”意指存活或以不容易与未处理细胞区别的方式进行基本的细胞功能，例如蛋白质合成和呼吸。

[0018] 本发明进一步考虑本文描述的多核苷酸的变体和片段。多核苷酸的“片段”可以编码多肽的生物学活性部分，或其可以是采用本文其它地方公开的方法可用作杂交探针或 PCR 引物的片段。取决于意图的用途，多核苷酸——其是多核苷酸的片段——包括至少大约 15、20、50、75、100、200、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150、1200、1250、1300、1350、1400、1450、1500、1550、1600、1650、1700、1750、1800、1850、1900、1950 个连续核苷酸，或可达存在于本文公开的全长多核苷酸的核苷酸数（例如包含 SEQ ID NO:1 的 EPSP 合酶多核苷酸）。“连续”核苷酸意指彼此紧邻的核苷酸残基。

[0019] 本发明的多核苷酸片段一般将编码保持全长草甘膦抗性蛋白的生物学活性——即抗除草剂活性——的多肽片段。“保持抗除草剂活性”意指所述片段将具有本文公开的如 SEQ ID NO:2、3 或 5 的全长草甘膦抗性蛋白的至少大约 30%，至少大约 50%、至少大约 70%、至少大约 80%、85%、90%、95%、100%、110%、125%、150%、175%、200%、250%、至少大约 300% 或以上的抗除草剂活性。测量抗除草剂活性的方法在本领域内是熟知的。参见，例如，美国专利第 4,535,060 和 5,188,642 号，其每一个通过引用以其全部并入本文。

[0020] 编码本发明多肽的生物学活性部分的多核苷酸片段将编码至少大约 15、25、30、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400 个连续氨基酸，或可达存在于本发明的全长多肽中的氨基酸的总数。

[0021] 本发明也包括变体多核苷酸。多核苷酸的“变体”包括编码本文公开的多肽但由于遗传密码的简并性而保守地不同的那些序列，以及足够相同的那些序列。

[0022] 术语“足够相同的”意指采用标准参数，应用比对程序之一，与参考序列相比具有至少大约 60% 或 65% 的序列同一性、大约 70% 或 75% 的序列同一性、大约 80% 或 85% 的序列同一性、大约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性的多肽或多核苷酸序列。本领域普通技术人员将会认识到这些值可以适当调整以通过考虑密码简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等来确定由两个多核苷酸编码的多肽的对应同一性。

[0023] 细菌基因很经常具有多个靠近开放阅读框起点的甲硫氨酸起始密码子。通常，在

一个或多个这些起始密码子的翻译起始将导致功能蛋白质的产生。这些起始密码子可以包括ATG密码子。然而，细菌如芽孢杆菌(Bacillus sp.)也识别密码子GTG作为起始密码子，并且在GTG密码子处起始翻译的蛋白质包含在第一个氨基酸处的甲硫氨酸。而且，经常不能先验确定这些密码子中的哪个在细菌中天然使用。因而，应理解的是，可选的甲硫氨酸密码子之一的使用可导致赋予除草剂抗性的变体产生。这些除草剂抗性蛋白被包括在本发明中并且可以在本发明的方法中使用。

[0024] 可以应用熟知的分子生物学技术，如下面概述的聚合酶链式反应(PCR)和杂交技术，鉴定天然发生的等位基因变体。变体多核苷酸也包括合成来源的多核苷酸，其通过例如采用定点诱变或其它诱变策略产生，但是仍然编码具有期望的生物学活性的多肽。

[0025] 技术人员将进一步理解，可以通过进一步突变本发明的多核苷酸从而导致所编码的多肽的氨基酸序列的进一步改变但不改变所述多肽的生物学活性来引入改变。因而，分离的变体多核苷酸可以通过引入一个或多个额外的核苷酸置换、添加或缺失到编码本文公开的EPSP合酶结构域的相应多核苷酸中而产生，以使一个或多个氨基酸置换、添加或缺失被引入到所编码的多肽中。进一步的突变可以通过标准技术如定点诱变和PCR介导的诱变或基因改组(gene shuffling)技术引入。这种变体多核苷酸也被本发明包括。

[0026] 变体多核苷酸可以通过沿着全部或部分编码序列随机引入突变，如通过饱和突变来制备，并且可以筛选得到的突变体赋予抗除草剂活性的能力，以鉴定保持活性的突变体。

[0027] 基因改组或有性PCR(sexual PCR)法（例如，Smith(1994)Nature 370:324-325；美国专利第5,837,458、5,830,721、5,811,238和5,733,731号，其每一篇通过引用被并入本文）可以被用于进一步修饰或增强具有本发明的EPSP合酶结构域的多核苷酸和多肽（例如，赋予草甘膦抗性的多肽）。基因改组包括几种突变DNA的随机断裂，然后通过PCR将它们重装配成全长分子。各种基因改组法的例子包括但不限于，DNase处理后的装配、交错延伸法(staggered extension process，STEP)和体外随机引发重组(random priming in vitro recombination)。在DNase介导的方法中，用DNaseI将从阳性突变体库分离的DNA区段切割成随机片段并且在未添加引物的情况下进行多轮PCR。当PCR循环进行时，随机片段的长度接近未切割的区段的长度，导致在不同的克隆中的突变混合在一起并且在一些得到的序列中累积。多个循环的选择和改组已经导致几种酶的功能增强(Stemmer(1994)Nature370:389-391;Stemmer(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:10747-10751;Crameri等，(1996)Nat.Biotechnol.14:315-319;Zhang等，(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:4504-4509;和Crameri等，(1997)Nat.Biotechnol.15:436-438)。可以例如对编码具有本发明的序列结构域的多肽的多核苷酸进行这类方法，以产生赋予草甘膦抗性的多肽。

[0028] 应用方法如PCR、杂交等，相应除草剂抗性序列可以通过寻找本发明的EPSP合酶结构域来鉴定。见，例如，Sambrook和Russell(2001)，Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring HarborLaboratory Press，Cold Spring Harbor，NY)和Innis等，(1990)PCRProtocols:A Guide to Methods and Applications(Academic Press,NY)。B.分离的蛋白质及其变体和片段

[0029] 除草剂抗性多肽也被包括在本发明之内。基本上不含细胞材料(cellular material)的除草剂抗性多肽包括具有小于大约30%、20%、10%或5%（按干重计）的非除草剂抗性多肽（本文也称为“污染蛋白质”）的多肽制剂。在本发明中，“除草剂抗性蛋

白”意指具有本发明的序列结构域的EPSP合酶多肽。片段、生物活性部分、及其变体也被提供，并且可以被用于实践本发明的方法。

[0030] “片段”或“生物活性部分”包括多肽片段，其含有编码除草剂抗性蛋白的氨基酸序列的一部分并保持抗除草剂活性。除草剂抗性蛋白的生物学活性部分可以是多肽，所述多肽的长度为例如10、25、50、100个或更多的氨基酸。这种生物学活性部分可以通过重组技术制备并且可以评价抗除草剂活性。

[0031] “变体”意指具有这样的氨基酸序列的蛋白质或多肽，所述氨基酸序列与具有本发明的EPSP合酶结构域的EPSP合酶多肽具有至少大约60％、65％、大约70％、75％、大约80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％的同一性。本领域普通技术人员将会意识到这些值可以被适当调整以通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等来确定由两个多核苷酸编码的多肽的对应同一性。

[0032] 例如，可以在一个或多个非必需氨基酸残基处进行保守氨基酸置换。“非必需的”氨基酸残基是可以在多肽的野生型序列中加以改变而不改变生物学活性的残基，而“必需的”氨基酸残基对于生物学活性是必需的。“保守氨基酸置换”是这样的置换，其中氨基酸残基用具有相似侧链的氨基酸残基置换。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已经被定义。这些家族包括具有碱性侧链（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如，天冬氨酸、谷氨酸）、无荷电极性侧链（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、非极性侧链（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸）、β-支化侧链（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和芳族侧链（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）的氨基酸。氨基酸置换可以在保持功能的非保守区进行。一般而言，将不会对保守的氨基酸残基或对位于保守基序中的氨基酸残基——其中这类残基对于多肽活性是必需的——进行这样的置换。然而，本领域普通技术人员将会理解，功能变体可以在保守残基中具有不重要的保守或非保守改变。

[0033] 本发明的多肽或其变体或片段的抗体也被包括。产生抗体的方法在本领域是熟知的（参见，例如，Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY;美国专利第4,196,265号）。C. 多核苷酸构建物

[0034] 编码本发明的EPSP合酶多肽的多核苷酸可以被修饰以获得或增强在植物细胞中的表达。编码本文鉴定的多肽的多核苷酸可以被提供于表达盒中，所述表达盒用于在目标植物中表达。“植物表达盒”包括DNA构建物——包括重组DNA构建物，其能够导致多核苷酸在植物细胞中的表达。所述盒可以包括以5′ -3′的转录方向、可操作地连接到一个或多个感兴趣多核苷酸的转录起始区（即，启动子，特别是异源启动子）、和/或植物中发挥功能的翻译和转录终止区（即，终止区）。所述盒可以额外包含至少一个将被引入到生物体的额外多核苷酸，如选择性标记基因。可选地，额外的多核苷酸（一个或多个）可以被提供在多个表达盒上。这种表达盒被提供有多个限制性位点，用于插入所述多核苷酸（一个或多个），使之受调节区的转录调节。

[0035] “异源的”一般是指这样的多核苷酸或多肽，其对于细胞而言不是内源的或对于它存在的天然基因组中的位置而言不是内源的，并且其通过感染、转染、显微注射、电穿孔、显微投影等被加入到细胞中。“可操作地连接”意指两个多核苷酸之间的功能连接。例如，当

启动子可操作地连接到DNA序列时，该启动子序列起始并且调节所述DNA序列的转录。已经认识到，可操作地连接的多核苷酸可以相邻或可以不相邻，并且在用于指两个多肽编码区的接合时，所述多肽在同一阅读框中表达。

[0036] 启动子可以是在选择的植物细胞、植物部分或植物中显示出转录活性的任何多核苷酸序列。启动子对于植物宿主和/或对于本发明的DNA序列可以是天然的或类似的，或者外源的或异源的。在启动子对于植物宿主是“内源的”或“类似的”时，意指该启动子在其被引入的天然植物中被找到。当启动子对于本发明的DNA序列是“外源的”或“异源的”时，意指该启动子对于本发明的可操作连接的DNA序列而言不是天然的或天然发生的启动子。启动子可以是诱导型或组成型。它可以是天然发生的，可以由各种天然发生的启动子部分组成，或可以是部分或全部合成的。启动子设计指导由启动子结构的研究提供，如Harley和Reynolds(1987)Nucleic Acids Res.15:2343-2361中的指导。同样，启动子相对于转录起始的位置可以被优化。见，例如，Roberts等，(1979)Proc.Natl.Acad.Sci.USA，76:760-764。许多用于植物的合适启动子在本领域中是熟知的。

[0037] 例如，适合用于植物的组成型启动子包括：来自植物病毒的启动子，如花生褪绿条死病花椰菜花叶病毒组(peanut chlorotic streakcaulimovirus(PClSV))启动子(美国专利第5,850,019号)；来自花椰菜花叶病毒(CaMV)的35S启动子(Odell等，(1985)Nature313:810-812)；小球藻病毒甲基转移酶基因启动子(美国专利第5,563,328号)和来自玄参花叶病毒(FMV)的全长转录启动子(美国专利第5,378,619号)；来自基因如水稻肌动蛋白(McElroy等，(1990)Plant Cell 2:163-171)、泛素(Christensen等，(1989)Plant Mol.Biol.12:619-632和Christensen等，(1992)Plant Mol.Biol.18:675-689)、pEMU(Last等，(1991)Theor.Appl.Genet.81:581-588)、MAS(Velten等，(1984)EMBO J.3:2723-2730)、玉米H3组蛋白(Lepetit等，(1992)Mol.Gen.Genet.231:276-285和Atanassova等，(1992)Plant J.2(3):291-300)、油菜(Brassica napus)ALS3(PCT申请WO 97/41228)的启动子；以及各种农杆菌属(Agrobacterium)基因的启动子(见，美国专利第4,771,002、5,102,796、5,182,200和5,428,147号)。

[0038] 适合用于植物的诱导型启动子包括：来自对铜作出反应的ACE1系统的启动子(Mett等，(1993) PNAS 90:4567-4571)；对苯磺酰胺除草剂安全剂作出反应的玉米In2基因的启动子(Hershey等，(1991)Mol.Gen.Genetics 227:229-237和Gatz等，(1994)Mol.Gen.Genetics 243:32-38)；和来自Tn10的Tet阻抑子的启动子(Gatz等，(1991)Mol.Gen.Genet.227:229-237)。另外的用于植物的诱导型启动子是对诱导剂作出反应的启动子，植物通常对所述诱导剂不作出反应。这种类型的示例性诱导型启动子是来自类固醇激素基因的诱导型启动子，其转录活性被糖皮质类固醇激素诱导(Schena等，(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10421)或通过嵌合转录激活剂XVE的最近应用来诱导，用于通过雌二醇活化的基于雌激素受体的诱导型植物表达系统(Zuo等，(2000)Plant J.，24:265-273)。其它的用于植物的诱导型启动子在EP 332104、PCT WO 93/21334和PCT WO 97/06269中被描述，其通过引用以其全部并入本文。也可以使用由其它启动子部分组成的启动子以及部分或全部合成的启动子。见，例如，Ni等，(1995)Plant J.7:661-676和PCT WO 95/14098，它们描述了用于植物的这类启动子。

[0039] 启动子可以包括，或被修饰以包括，一个或多个增强子元件。在一些实施方式中，

启动子可以包括多个增强子元件。与不包含增强子元件的启动子相比，包含增强子元件的启动子提供了更高水平的转录。用于植物的合适增强子元件包括PClSV增强子元件（美国专利第5,850,019号）、CaMV 35S增强子元件（美国专利第5,106,739和5,164,316号）和FMV增强子元件(Maiti等,(1997)Transgenic Res.6:143-156)。也参见PCT WO 96/23898。

[0040] 通常，这种构建物可包含5′和3′非翻译区。这种构建物可以包含“信号序列”或“前导序列”，以促进感兴趣肽的共翻译或翻译后转运到某些细胞内结构如叶绿体（或其它质体）、内质网或高尔基体，或被分泌。例如，构建物可以被设计为包含信号肽来促进肽至内质网的转移。“信号序列”意指已知或疑似导致共翻译或翻译后肽运输穿过细胞膜的序列。在真核细胞中，这典型地包括分泌到高尔基体，带有一些因而发生的糖基化。“前导序列”意指当翻译时，导致足以引起肽链共翻译运输到亚细胞器的氨基酸序列的任何序列。因而，这包括通过进入内质网，到达液泡、包括叶绿体、线粒体等在内的质体而靶向运输和/或糖基化的前导序列。也可以优选的是，设计包含内含子的植物表达盒，以使内含子的mRNA加工对于表达是必需的。

[0041] “3′非翻译区”意指位于编码序列下游的多核苷酸。多腺苷酸化信号序列和编码调控信号的其它序列是3′非翻译区，所述调控信号能够影响聚腺苷酸束(polyadenylic acid tract)添加到mRNA前体的3′端。“5′非翻译区”意指位于编码序列上游的多核苷酸。

[0042] 其它的上游或下游非翻译元件包括增强子。增强子是用于增加启动子区表达的多核苷酸。增强子在本领域是熟知的，且包括但不限于SV40增强子区和35S增强子元件。

[0043] 终止区可以是对转录起始区天然的，可以是对本发明的序列天然的，或可以源自另一来源。合适的终止区可从根癌农杆菌(A.tumefaciens)的Ti-质粒得到，如章鱼碱合酶和胭脂氨酸合成酶终止区。也参见Guerineau等人，(1991)Mol.Gen.Genet.262:141-144；Proudfoot(1991)Cell 64:671-674;Sanfacon等人，(1991)Genes Dev.5:141-149;Mogen等人，(1990)Plant Cell 2:1261-1272;Munroe等人，(1990)Gene91:151-158;Ballas等人，(1989)Nucleic Acids Res.17:7891-7903；和Joshi等人，(1987)Nucleic Acid Res.15:9627-9639。

[0044] 在本发明的一个方面，合成的DNA序列被设计用于给定的多肽，如本发明的多肽。细胞中合成DNA序列的开放阅读框的表达导致本发明的多肽的产生。合成DNA序列可以用于简单地除去不必要的限制性内切核酸酶位点，以促进DNA克隆策略，改变或除去任何潜在的密码子偏倚，改变或提高GC含量，除去或改变另起读框，和/或改变或除去内含子/外显子剪接识别位点、多腺苷酸化位点、SD序列、不必要的启动子元件和可能存在于天然DNA序列中的类似物。也可能的是，合成DNA序列可以被用于将其它改良引入DNA序列，如引入内含子序列、产生作为融合到细胞器引导肽的蛋白质表达的DNA序列，所述细胞器引导肽例如叶绿体转运肽、质外体/液泡导向肽、或导致所得到的肽保持在内质网中的肽序列。合成基因也可以使用宿主细胞优选的密码子合成，用于改进表达，或可以使用具有宿主优选的密码子使用频率的密码子进行合成。见，例如，Campbell和Gowri(1990)Plant Physiol.92:1-11;美国专利第6,320,100、6,075,185、5,380,831和5,436,391号，美国公布申请第20040005600和20010003849号、以及Murray等,(1989)Nucleic Acids Res.17:477-498,其通过引用并入本文。

[0045] 在一种实施方式中，感兴趣的多核苷酸被靶向叶绿体来进行表达。在这种方式中，在感兴趣的多核苷酸不直接插入到叶绿体中时，表达盒将额外包含编码指引感兴趣的核苷酸到叶绿体中的转运肽的多核苷酸。这种转运肽在本领域是已知的。见，例如，Von Heijne 等 人，(1991)Plant Mol.Biol.Rep.9:104-126;Clark 等，(1989)J.Biol.Chem.264:17544-17550;Della-Cioppa 等，(1987)Plant Physiol.84:965-968;Romer 等，(1993)Biochem.Biophys.Res.Commun.196:1414-1421;以及 Shah 等，(1986)Science 233:478-481。

[0046] 靶向叶绿体的感兴趣多核苷酸可以被优化，用于在叶绿体中表达，以说明在植物细胞核和该细胞器之间密码子使用的不同。在这种方式中，可以使用叶绿体优选的密码子合成感兴趣多核苷酸。见，例如，美国专利第 5,380,831 号，其通过引用并入本文。

[0047] 这种植物表达盒可以被插入到植物转化载体中。“转化载体”意指允许转化细胞的 DNA 分子。这样的分子可以由一个或多个表达盒组成，并且可以组织成一个以上的载体 DNA 分子。例如，二元载体是植物转化载体，其利用两个非邻接 DNA 载体来编码所有必需的顺式 - 和反式作用功能，用于转化植物细胞 (Hellens 和 Mullineaux(2000)Trends in Plant Science 5:446-451)。“载体”是指设计用于在不同宿主细胞之间转移的多核苷酸构建物。“表达载体”是指具有在外源细胞中掺入、整合和表达异源 DNA 序列或片段的能力的载体。

[0048] 植物转化载体包括一个或多个实现植物转化的 DNA 载体。例如，本领域内的常见做法是应用包含一个以上邻接 DNA 区段的植物转化载体。这些载体在本领域内通常称为二元载体。二元载体以及具有辅助质粒的载体最常用于农杆菌属介导的转化，其中实现有效转化所需要的 DNA 区段的大小和复杂性是相当大的，并且将单独的功能分开在单独的 DNA 分子上是有利的。二元载体通常包含质粒载体，所述质粒载体包含 T-DNA 转移必需的顺式作用序列（如左边界和右边界）、被工程化为能够在植物细胞中表达的选择性标记、和“感兴趣的多核苷酸”（被工程化为能够在植物细胞中表达的多核苷酸，转基因植物的产生对于所述植物细胞是期望的）。也在该质粒载体上存在的是细菌复制必需的序列。顺式作用序列以允许有效转移到植物细胞并且在其中表达的方式排列。例如，选择性标记序列和感兴趣的序列位于左边界和右边界之间。第二质粒载体经常包含介导 T-DNA 从农杆菌属转移到植物细胞的反式作用因子。该质粒经常包含侵入性功能 (Vir 基因)，其允许植物细胞被农杆菌属感染，以及通过在边界序列切割的 DNA 转移，和病毒介导的 DNA 转移，如本领域所理解的 (Hellens 和 Mullineaux(2000)Trends in Plant Science,5:446-451)。几种类型的农杆菌属菌株（例如，LBA4404、GV3101、EHA101、EHA105 等）可用于植物转化。第二质粒载体对于通过其它方法如显微投影、显微注射、电穿孔、聚乙二醇等将多核苷酸引入到植物中不是必需的。D. 植物转化

[0049] 本发明的方法包括将核苷酸构建物引入到植物中。“引入”意指将核苷酸构建物以该构建物进入到植物细胞内部的方式呈递给植物。本发明的方法不需要使用将核苷酸构建物引入植物的具体方法，只需要核苷酸构建物进入到植物的至少一个细胞的内部。将核苷酸构建物引入植物中的方法在本领域是已知的，包括但不限于，稳定转化法、瞬时转化法和病毒介导法。

[0050] 一般而言，植物转化法包括将异源 DNA 转移到靶植物细胞（例如，未成熟或成熟胚、悬浮培养物、未分化的愈伤组织、原生质体等），随后应用最大阈值水平的适当选择（取

决于选择性标记基因并且在此情况下为“草甘膦”）以从未转化的细胞团中回收转化的植物细胞。外植体被典型地转移到新鲜供给的相同培养基中并且常规培养。之后，转化细胞在放置在补充有最大阈值水平的选择剂（例如，“草甘膦”）的再生培养基上之后分化成茎干。然后，茎干被转移到选择性生根培养基，用于回收生根的茎干或小植株。转基因小植株然后生长成为成熟的植物并且产生能育种子（例如，Hiei 等，(1994)The PlantJournal6 :271-282 ;Ishida 等，(1996)Nature Biotechnology 14 :745-750)。外植体典型地被转移到新鲜供给的相同培养基中并且常规培养。产生转基因植物的技术和方法的一般描述在 Ayres 和 Park(1994)CriticalReviews in Plant Science 13 :219-239 以及 Bommineni 和 Jauhar(1997)Maydica 42 :107-120 中找到。由于转化的材料包含许多细胞 ;转化的和未转化的细胞都出现在任何一块经受处理的靶愈伤组织或组织或细胞群中。杀死非转化细胞并允许转化细胞增殖的能力产生转化的植物培养物。通常，除去非转化细胞的能力限制了转化植物细胞的快速回收和转基因植物的成功产生。分子方法和生化方法可以用于确定整合的感兴趣异源基因在转基因植物的基因组中的存在。

[0051] 转基因植物的产生可以通过几种方法之一进行，包括但不限于，通过农杆菌属将异源 DNA 引入到植物细胞中（农杆菌属介导的转化），用附到粒子的异源外来 DNA 轰击植物细胞，和用于转移 DNA 的各种其它非粒子直接介导法（例如，Hiei 等，(1994) The Plant Journal6 :271-282 ;Ishida 等，(1996)Nature Biotechnology 14 :745-750 ; Ayres 和 Park(1994)Critical Reviews in Plant Science 13 :219-239 ;Bommineni 和 Jauhar(1997)Maydica 42 :107-120)。

[0052] 转化叶绿体的方法在本领域内是已知的。见，例如，Svab 等，(1990)Proc.Natl. Acad.Sci.USA 87 :8526-8530 ;Svab 和 Maliga(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 : 913-917 ;Svab 和 Maliga(1993)EMBO J.12 :601-606。该方法依赖于粒子枪输送含选择性标记的 DNA 以及通过同源重组将 DNA 靶向质体基因组。此外，质体转化可以通过核编码和质体介导的 RNA 聚合酶的组织优选表达来反式激活沉默的质体携带的转基因来完成。这种系统已经在 McBride 等，(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91 :7301-7305 中进行了报道。

[0053] 按照常规方法，已经被转化的细胞可以生长成植物。参见，例如，McCormick 等，(1986)Plant Cell Reports 5 :81-84。然后这些植物可以生长并且或者用同一转化株系或不同株系进行授粉，并且得到的杂种具有经过鉴定的期望表型特征的组成型表达。可以生长两代或两代以上以保证期望表型特征的表达被稳定地保持并且遗传，然后收获种子以确保期望表型特征的表达已经获得。以这种方式，本发明提供了转化种子（也称为“转基因种子”），其具有稳定掺入它们的基因组中的本发明的核苷酸构建物，例如，本发明的表达盒。

E. 植物转化的评价

[0054] 在将异源外来 DNA 引入到植物细胞中以后，异源基因在植物基因组中的转化或整合通过各种方法如与整合基因有关的核酸、蛋白质和代谢物的分析来证实。

[0055] PCR 分析是移种到土壤之前筛选早期转化细胞、组织或茎中掺入基因存在的快速方法 (Sambrook 和 Russell(2001)MolecularCloning :A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，NY))。应用对感兴趣基因或农杆菌属载体背景等特异的寡核苷酸引物进行 PCR。

[0056] 植物转化可以通过基因组 DNA 的 DNA 印迹分析来证实 (Sambrook 和

Russell(2001)，见前）。一般而言，从转化体提取总 DNA，用适当的限制性酶消化，在琼脂糖凝胶中进行分离并且转移到硝酸纤维素或尼龙膜上。然后根据标准技术 (Sambrook 和 Russell，2001，见前），可以用例如放射性标记的 $^{32}P$ 靶 DNA 片段探测所述膜或“印迹”，以证实被引入的基因在植物基因组中的整合。

[0057] 在 RNA 印迹分析中，根据本领域常规使用的标准程序，从转化体的特异组织分离 RNA，所述 RNA 在甲醛琼脂糖凝胶上进行分离，并且印迹到尼龙滤膜上 (Sambrook 和 Russell(2001)，见前）。然后通过本领域内已知的方法 (Sambrook 和 Russell(2001)，见前），使所述滤膜与源自 GDC 的放射性探针杂交，来检测由本发明的 grg 序列编码的 RNA 的表达。

[0058] 根据标准程序 (Sambrook 和 Russell(2001)，见前），使用与存在于除草剂抗性蛋白上的一个或多个表位结合的抗体，可以对转基因植物进行蛋白质印迹和生化分析等，以确定由除草剂抗性基因编码的蛋白质的存在。

[0059] 在本发明的一个方面，本文描述的 grg 基因可用作标记以评价细菌或植物细胞的转化。F. 植物和植物部分

[0060] “植物”意指全植物、植物器官（例如，叶、茎、根等）、种子、植物细胞、繁殖体、胚及其后代。植物细胞可以是分化的或未分化的（例如，愈伤组织、悬浮培养细胞、原生质体、叶细胞、根细胞、韧皮部细胞、花粉）。本发明可以用于将多核苷酸引入任何植物种类中，包括但不限于，单子叶植物和双子叶植物。感兴趣的植物的例子包括但不限于，玉米（玉蜀黍）、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉、水稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦和油菜 (oilseed rape)、芸苔属某种、紫花苜蓿、裸麦、稷、红花、花生、甘薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑桔树、可可、茶、香蕉、鳄梨、无花果、番石榴、芒果、橄榄、番木瓜、腰果树、澳大利亚坚果、杏树、燕麦、蔬菜、观赏植物和针叶树。

[0061] 蔬菜包括但不限于，番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆和甜瓜属 (genus Curcumis) 的成员如黄瓜、甜瓜和香瓜。观赏植物包括但不限于，杜鹃花、绣球花属、芙蓉属、玫瑰、郁金香、水仙花、矮牵牛属、石竹属、猩猩木和菊花。农作物植物也是感兴趣的，包括例如，玉米、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉、水稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦、油菜等。

[0062] 本发明适合单子叶植物科的任何成员，包括但不限于，玉米、水稻、大麦、燕麦、小麦、高粱、裸麦、甘蔗、菠萝、薯蓣、洋葱、香蕉、椰子和海枣。G. 增加植物产量的方法

[0063] 提供了增加植物产量的方法。所述方法包括将包含本文公开的 grg 序列的多核苷酸引入到植物或植物细胞中。如本文所定义的，植物的“产量”是指由植物产生的生物量的质量和 / 或数量。“生物量”意指任何测量的植物产物。生物量产率的增加是任何所测量的植物产物的产量的提高。增加植物产量具有几种商业应用。例如，增加植物叶的生物量可以增加多叶蔬菜的产量，用于人类和动物消费。此外，增加叶生物量可以用于增加植物来源的药品或工业产品的生产。产量的增加可以包括统计学上显著的增加，包括但不限于，至少 1％的增加、至少 3％的增加、至少 5％的增加、至少 10％的增加、至少 20％的增加、至少 30％的增加、至少 50％的增加、至少 70％的增加、至少 100％的增加或更大的增加。

[0064] 在具体的方法中，用有效浓度的除草剂处理植物，其中所述除草剂应用导致植物产量增加。“有效浓度”意指允许植物产量增加的浓度。感兴趣除草剂的这种有效浓度通

常在本领域内是已知的。按照通常的除草剂施用技术，除草剂可以在芽前或芽后被施用到含有农作物的田地中，所述农作物已经通过异源表达本发明的 grg 基因而获得了除草剂抗性。

[0065] 也提供了赋予植物或植物部分除草剂抗性的方法。在这种方法中，本文公开的 grg 多核苷酸被引入到植物中，其中所述多核苷酸的表达导致草甘膦耐性或抗性。通过这种方法产生的植物可以用有效浓度的除草剂处理并且显示出增加的对除草剂的耐性。本申请中除草剂的“有效浓度”是足以使植物或植物部分的生长减缓或停止的量，所述植物或植物部分对除草剂不具有天然抗性或没有获得对除草剂的抗性。H. 在田地中控制杂草的方法

[0066] 也提供了在含有植物的田地中选择性控制杂草的方法。在一种实施方式中，作为本文公开的 grg 多核苷酸插入到植物种子或植物的结果，植物种子或植物具有草甘膦抗性。在具体的方法中，植物用有效浓度的除草剂处理，其中所述除草剂施用导致选择性控制杂草或其它未转化的植物。“有效浓度”意指控制杂草或其它未转化植物的生长或蔓延而不显著影响草甘膦抗性植物或植物种子的浓度。感兴趣除草剂的这种有效浓度通常在本领域内是已知的。按照通常的除草剂施用技术，除草剂可以在芽前或芽后被施用到含有获得除草剂抗性的植物或植物种子的田地中。I. 温度谱

[0067] 已经进行了几个植物中草甘膦代谢的研究，所述研究显示草甘膦不被植物代谢或代谢得非常缓慢。草甘膦迅速穿透角质层，并且在相当长的一段时间内被转移遍及整个植物（在 Kearney 和 Kaufman，Eds(1988)Herbicides ;Chemistry，Degradation & Mode of Action MarcelDekker，Inc.，New York，3 :1-70 以及 Grossbard 和 Atkinson，Eds.(1985)，The Herbicide Glyphosate Butterworths，London，p.25-34 中进行综述）。因而，可能的是，在农学上重要的植物中，草甘膦耐性在草甘膦暴露之后的一段持续时间中是必要的。在温度经常在生长季节期间超过 30℃的情况下，使用可在升高的温度保持活性的草甘膦耐性 EPSP 合酶将会是有利的。

[0068] 在本发明的一个实施方式中，EPSP 合酶在比周围环境温度高或低的温度下显示出热稳定性。“热稳定性”意指在比周围环境温度高或低的温度下，所述酶比在该温度下为非热稳定的 EPSP 合酶在更长的一段时间内具有活性。例如，热稳定 EPSP 合酶在比周围环境温度高或低的温度下具有酶促活性大于大约 1 小时、大于大约 2 小时、大约 3 小时、大约 4 小时、大约 5 小时、大约 6 小时、大约 7 小时、大约 8 小时、大约 9 小时、大约 10 小时、大约 11 小时、大约 12 小时、大约 13 小时、大约 14 小时、大约 15 小时、大约 20 小时、大约 25 小时或更长。为了本发明的目的，“周围”环境温度为大约 30℃。在一些实施方式中，高于周围温度是在或高于大约 32℃、大约 34℃、大约 37℃、大约 40℃、大约 45℃、大约 50℃、大约 55℃、大约 60℃、大约 65℃或更高的温度。低于周围温度是在或低于大约 28℃、低于大约 27℃、大约 26℃、大约 25℃、大约 23℃、大约 20℃、大约 18℃、大约 15℃、大约 10℃，在或低于大约 5℃，或在 0℃左右。分析 EPSP 合酶活性的方法在本文其它地方被进一步详细讨论。为了本发明的目的，当热稳定 EPSP 合酶以在该酶的最适温度观测到的最大活性水平的大约 90％至 100％、大约 80％至大约 90％、大约 70％至大约 80％、大约 60％至大约 70％或大约 50％至大约 60％起作用时，其被认为是有活性的。

[0069] 因而，本文提供的是在高于周围环境温度的温度下增加草甘膦耐性的方法和组合物。在一种实施方式中，所述方法包括将编码在 SEQ ID NO :8、10、14、28、30、32 或 34 中所

示的草甘膦抗性 EPSP 合酶的核苷酸序列引入植物，并且使所述植物在高于周围环境温度的温度下生长。在具体实施方式中，所述生长温度在所述植物的生长季节期间高于周围温度平均至少大约 2 小时每天，至少大约 3 小时每天、至少大约 4 小时每天、至少大约 5 小时每天、大约 6 小时每天、大约 7 小时每天、大约 8 小时每天、大约 9 小时每天、大约 10 小时每天、大约 11 小时每天、大约 12 小时每天、大约 14 小时每天、大约 16 小时每天、大约 18 小时每天、大约 20 小时每天、至少大约 22 小时每天，或可达大约 24 小时一天。

[0070] 在另一实施方式中，所述方法包括将编码在 SEQ ID NO:8、10、14、28、30、32 或 34 中所示的草甘膦耐性 EPSP 合酶的核苷酸序列引入植物，使所述植物与除草有效浓度的草甘膦接触，和使所述植物在高于周围环境温度的温度下生长每天至少 1 小时、至少大约 2 小时、至少大约 3 小时、至少大约 4 小时或以上，在草甘膦施用给植物之后持续至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 或更多天，其中温度高于周围环境温度的天数发生在所述植物的生长季节期间。

[0071] 下列实施例作为说明而不是作为限制加以提供。实验实施例 1. svngrg23 设计和表达

[0072] GRG23(SEQ ID NO:2) 是 EPSP 合酶，其具有极好的动力学数值 Km、Ki 和 Vmax（美国专利申请第 60/741,166 号，2005 年 12 月 1 日提交）。新的编码 GRG23 蛋白的基因序列（美国专利申请第 60/741,166 号，2005 年 12 月 1 日提交）被设计并合成。所得到的序列在本文被提供为 SEQ ID NO:6，并且在本文中称为“syngrg23”。通过本领域已知的方法，将开放阅读框克隆到表达载体 pRSF1b(Invitrogen) 中。

[0073] 编码 GRG23 的 syngrg23 基因被克隆到 pUC19 载体中以产生 pAX748。应用 Mutazyme II 系统 (Stratagene)，使用在该载体中在 syngrg23 侧翼的 PCR 引物从 pAX748 扩增 syngrg23，以将随机突变引入 syngrg23 编码区。在易错 PCR(error-prone PCR) 反应中，模板以 1 ： 50 稀释，并且扩增进行 30 个循环。用限制性酶 BamHI 和 SgsI 消化得到的 PCR 产物，凝胶纯化，并且连接到载体 pRSF1b 中，以产生诱变的 syngrg23 文库。

[0074] 所述诱变的 syngrg23 文库被转化进大肠杆菌 (E.coli) 菌株 BL21*DE3star(Invitrogen) 中。转化后，单个菌落被铺板在含有 150mM 草甘膦的 1×M63 培养基上，以选择保持酶促活性和具有生长耐性的克隆。实施例 2. 在平板上筛选草甘膦抗性

[0075] 文库连接物被转化到 BL21*DE3 感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen) 中。根据制造商说明书进行转化，其中具有下列改变。在 37℃，在 SOC 培养基中温育 1 小时之后，通过离心沉淀细胞 (5 分钟，1000×g，4℃ )。用 1ml M63+ 洗涤细胞，再次离心，并且倾析上清液。再一次用 1ml M63+ 洗涤细胞，并且将细胞重悬于 200ul M63+ 中。

[0076] 为了选择在大肠杆菌中赋予草甘膦抗性的突变 GRG23 酶，细胞被铺板在含有 150mM 草甘膦、0.05mM IPTG（异丙基 -β -D- 硫代吡喃半乳糖苷）(isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) 和 50μg/ml 卡那霉素的 M63+ 琼脂培养板上。M63+ 培养基含有 100mM $KH_2PO_4$、15mM $(NH_4)_2SO_4$、50μM $CaCl_2$、1μM $FeSO_4$、50μM $MgCl_2$、55mM 葡萄糖、25mg/ 升 L- 脯氨酸、10mg/ 升盐酸硫胺素、足量的 NaOH 以调节 pH 至 7.0、和 15g/ 升琼脂。将所述平板在 37℃温育 36 小时。

[0077] 挑取单个菌落并且排列到 384 孔板中。以这种方式，产生了两个 384 孔板。从在没有草甘膦的平板上生长的菌落中挑取第三板的 384 个克隆。实施例 3. 草甘膦抗性 GRG23

变体的分离和分析

[0078] 通过在草甘膦平板上生长来鉴定用诱变的 syngrg23 和 / 或 grg23 变体转化的 BL21*DE3 细胞。制备诱变的 syngrg23 和 / 或 grg23 变体的提取物并且分析其改进的酶促活性。用针将草甘膦平板上鉴定的菌落挑到含有 LB 培养基的 96 孔板中并且生长至 0.D 大约 0.6。然后加入 IPTG(0.5mM) 并且将所述板在 20℃温育过夜，以诱导蛋白质表达。使用 POP 培养试剂 (Novagen) 和 Lysonase(Novagen)，从细胞团中制备蛋白质提取物，并且在 37℃加热提取物 30 分钟后，测量粗制溶解产物中的酶促活性。活性大于含有适当对照蛋白质 ( 例如，GRG23) 的一组提取物的平均值以上两个标准差的提取物被选择，用于进一步分析。

[0079] 在作为粗制提取物温育之后显示出活性增加的克隆被生长在 250mL LB 培养物中，并用 IPTG 诱导蛋白质表达。诱导之后，使用钴树脂 (cobalt resin)(Novagen)，通过亲和层析从每一培养物中纯化突变 GRG23 蛋白。然后，在 37℃加热 0、2、4、和大约 16 小时之后，检测纯化的蛋白质的酶促活性。实施例 4. 改良的 GRG23 变体

[0080] 从诱变 syngrg23 的 DNA 文库中，鉴定出几个在 37℃具有改良的活性的克隆。与这些提取物对应的克隆的 DNA 序列被测定。表 1 示出了在 6 个保持草甘膦抗性的 GRG23 的变体中鉴定的氨基酸变化 :grg23(L3P1.B20)(SEQ ID NO :20)，编码氨基酸序列 GRG23(L3P1.B20)(SEQ ID NO :21) ;grg23(L3P1.B3)(SEQ ID NO :22)，编码氨基酸序列 grg23(L3P1B3)(SEQ ID NO :23) ;GRG23(L3P1.F18)(SEQ ID NO :24)，编码氨基酸序列 GRG23(L3P1.F18)(SEQ ID NO :25) ;和 grg23(L3P1.023)(SEQ ID NO :26)，编码氨基酸序列 GRG23(L3P 1.023)(SEQ ID NO :27)。表 1. 在抗草甘膦的 GRG23 变体中鉴定出的突变

| 克隆 | 在 GRG23 中的氨基酸 (AA) |
|---|---|
| L3P1B20 | V206 → I |
| L3P1B3 | D75 → H、E217 → K |
| L3P1F18 | T274 → I |
| L3P1023 | R5 → H |

[0081] 克隆在 250mL LB 培养物中生长，并且如上所述分离所诱导的蛋白质表达。然后，在 37℃加热 0、2、4、和大约 16 小时之后，检测纯化的蛋白质的酶促活性。发现克隆之一，称为“M5”，在 37℃延长温育之后保持了增加比例的酶促活性 ( 表 2)。该克隆的 DNA 序列被测定，并且在本文中该基因被称为 grg23(ace1)(SEQ ID NO :8)。从 grg23(ace1) 表达的蛋白质被称为 GRG23(ACE1)(SEQ ID NO :9)。表 2. 在升高的温度下 GRG23(ACE1) 对 GRG23 的半衰期

| 蛋白质 | 在 37℃的半衰期 ( 小时 ) |
|---|---|
| GRG23 | 7 |
| GRG23(ACE1) | 15.5 |

[0082] 相对于野生型 GRG23 蛋白，GRG23(ACE1) 包含两个氨基酸置换 :A49 → T 和

S276→T。含有该基因的pRSF 1b被称为pAX3801。图1示出了在升高的温度下GRG23(ACE1)对GRG23的相对稳定性。实施例5.GRG-23变体的EPSPS活性测定

[0083] 分析了含有GRG-23变体蛋白的提取物的EPSP合酶活性，如2005年12月1日提交的美国专利申请第60/741,166号中所述，其通过引用以其全部并入本文。根据制造商说明书，在含有0.5mM莽草酸-3-磷酸、200uM磷酸烯醇丙酮酸(PEP)、1U/ml黄嘌呤氧化酶、2U/ml核苷磷酸化酶、2.25mM肌苷、1U/ml辣根过氧化物酶、2mM草甘膦、50mM HEPES/KOH pH 7.0、100mM KCl和AMPLEX®Red(Invitrogen)的50μl终体积中进行分析。在室温下，提取物与除了莽草酸-3-磷酸之外的所有分析成分温育5分钟，并且通过加入莽草酸-3-磷酸开始进行分析。应用Spectramax Gemini XPS荧光分光计(Molecular Dynamics，激发：555nm；发射：590nm)，测量EPSP合酶活性。

[0084] 如以前所述(2005年12月1日提交的美国专利申请号60/741,166)，对纯化的蛋白质的动力学参数进行全测定，调节由本领域内已知的Bradford分析确定的蛋白质量。对于任一种草甘膦浓度，EPSP合酶活性被测量为范围广泛的PEP浓度的函数。采用KALEIDAGRAPH®软件(Synergy Software)，数据被拟合到Michaelis-Menten方程，并被用于确定EPSP合酶在该草甘膦浓度下的$K_m$(表观$K_m$)。在不少于4个草甘膦浓度的情况下确定表观$K_m$值，并且应用本领域已知的方程(m1*x/(m2+x)；m1＝1；m2＝1)，根据表观$K_m$对草甘膦浓度的曲线图，计算EPSPS对于草甘膦的$K_i$。表3.GRG23(ACE1)对GRG23的动力学

| | Km (μM) | Ki(μM) | Vmax (nmol/min/μg) |
|---|---|---|---|
| GRG23 | 12.2 | 13,800 | 14.77 |
| GRG23(ACE1) | 9.7 | 14,620 | 13.73 |

实施例6.grg23(ace2)的鉴定

[0085] 相对于GRG23，GRG23(ACE1)包含两个氨基酸改变。为了确定在这些位置的另外的置换是否能够进一步提高活性，产生DNA文库，其导致产生表达蛋白质的克隆，所述蛋白质在与GRG23(SEQ IDNO:2)对应的位置49和276上进行实质性突变。通过在草甘膦平板上生长，选择赋予草甘膦抗性的克隆，并且生长并分析动力学特性，如所述。

[0086] 令人惊讶的是，一个克隆——本文称为grg23(ace2)(SEQ IDNO:10)，其编码GRG23(ACE2)蛋白(SEQ ID NO:11)——被鉴定为具有改进的热稳定性。grg23(ace2)的DNA序列显示GRG23(ACE2)包含单氨基酸改变(GRG23的残基276改变为精氨酸)。实施例7.GRG23和GRG51的比较，以及不同残基的诱变

[0087] 产生两个文库以通过GRG23和GRG51的氨基酸序列的比较评价可能的氨基酸序列的变换。第一个文库将变异从GRG51氨基酸序列引入grg23(ace2)编码区。第二个文库将变异从GRG23(ACE2)氨基酸序列引入grg51编码区。

[0088] 评价所得到的文库的克隆：(1)赋予细胞草甘膦抗性的能力，和(2)在37℃延长温育后的活性。全部10个克隆被测序并且更详细地分析。一个具体克隆——本文称为grg51.4(SEQ ID NO:12)，其编码蛋白质GRG51.4(SEQ ID NO:13)——相对于GRG23(ACE2)

和 GRG51 包含几个氨基酸改变。相对于 GRG23(ACE2) 存在于 GRG51.4 中的氨基酸改变随后被引入 grg23(ace2) 基因中，以产生 grg23(ace3)(SEQ ID NO:14)，其编码 GRG23(ACE3) 蛋白 (SEQ ID NO:15)。GRG23(ACE3) 显示出相对于 GRG23 和 GRG23(ACE2) 的较高的活性和热稳定性。

[0089] GRG23(ace1) 被诱变，并且检测克隆以鉴定表达具有改进的热稳定性和 / 或活性的变体的克隆。一个克隆——grg23(L5P2.J2)(SEQ ID NO:16)，其编码 GRG23(L5P2.J2)(SEQ ID NO:17)——由于其改进的动力学特性而被鉴定。GRG23(L5P2.J2) 相对于 GRG23(ACE1) 包含三个氨基酸改变，如下面表 4 中所示。表 4.GRG23(L5P2.J2) 中的氨基酸改变

| 相对于 GRG23(ACE1)，在 GRG23(L5P2.J2) 中的氨基酸 (AA) |
|---|
| V101 → F |
| A213 → S |
| D284 → N |

[0090] 寡核苷酸诱变被用于修饰 grg23(ace3) 编码区，以包含在 GRG23(L5P2.J2) 中鉴定的每一个氨基酸改变。具有包含这些修饰的基因的克隆被鉴定出，并且发现其编码相对 GRG23(ACE3) 具有改变的动力学特征的蛋白质。该基因被称为 grg23(ace4)(SEQ ID NO:18)。由 grg23(ace4) 编码并被称为 GRG23(ACE4)(SEQ ID NO:19) 的蛋白质相对于 GRG23(ACE3) 包含单氨基酸改变 ( 缬氨酸 101 改变为苯丙氨酸 )。基于这种结果，进行单独的寡核苷酸诱变以检测在位置 101 处的每一个可能的氨基酸置换的动力学。与 GRG23(ACE4) 相比，没有一个氨基酸改变导致动力学特性的进一步改善。见表 5。表 5. 改进变体的动力学

| | Km (μM) | Ki (μM) | Vmax (nmol/min/μg) |
|---|---|---|---|
| GRG23 | 14 | 10,800 | 13 |
| GRG51 | 15 | 21,048 | 13 |
| GRG23(ACE1) | 10 | 14,620 | 14 |
| GRG23(ACE2) | 11 | 18,104 | 15 |
| GRG51.4 | 19 | 26,610 | 17 |
| GRG23(ACE3) | 15 | 20,000 | 17 |
| GRG23(L5P2.J2) | 15 | 2,500 | 23 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| GRG23(ACE4) | 14 | 5,010 | 24 |

实施例 8.GRG23 变体的改进热稳定性

[0091] 通过将蛋白质样品在 37℃温育一系列时间来测定 GRG23 和几种变体的热稳定性，然后如本文所述测定残留的 EPSPS 活性，并且将所述活性与在 4℃温育的对照样品的活性进行比较。表 6 示出了 GRG23 变体 GRG23(ACE1)、GRG23(ACE2) 和 GRG23(ACE3) 具有改进的热稳定性。表 6.GRG23 和 GRG23 变体的热稳定性

| 蛋白质 | 在 37℃的 $t_{1/2}$ |
|---|---|
| GRG23 | 10.1 |
| GRG23(ACE 1) | 15.3 |
| GRG23(ACE2) | 34.2 |
| GRG23(ACE3) | 65.4 |

实施例 9.grg23(ace3) 的变体

[0092] 寡核苷酸诱变被用于产生 grg23(ace3) 的变体，所述变体导致具有氨基酸残基修饰的蛋白质表达，所述氨基酸残基与 SEQ ID NO:15 的位置 169 至 174 相对应。使用 QuickChange® 试剂盒 (Stratagene)，根据制造商说明书，进行诱变反应。质粒克隆被转化到大肠杆菌细胞系 BL21*DE3 中，并且通过 IPTG 诱导蛋白质表达，如本领域中已知的。通过亲和结合到镍柱 (TALON 金属亲和树脂，Clontech) 来纯化蛋白质。天然 GRG23(ace3) 蛋白也被表达和纯化，用作对照。在每一种酶纯化之后，通过本领域内已知的 Bradford 分析来测量蛋白质浓度。实施例 10.GRG23(ace3) 变体的动力学分析

[0093] 如本文所述，通过酶分析表征 GRG23(ace3) 变体 GRG23(ace3)R173K(SEQ ID NO:29，由 SEQ ID NO:28 编码)、GRG23(ace3)G169V/L170V(SEQ ID NO:31，由 SEQ ID NO:30 编码)、GRG23(ace3)R173Q(SEQ ID NO:33，由 SEQ ID NO:32 编码) 和 GRG23(ace3)I174V(SEQ ID NO:35，由 SEQ ID NO:34 编码)，并且将其与天然 GRG23(ace3) 酶相比较。对于每一种酶，在几种草甘膦浓度的每一浓度下测定 Km( 表观 )，并且 Km( 表观 ) 对草甘膦浓度的曲线图被用于计算每一种酶的 Ki。通过在 37℃温育酶 16 小时，评价每一种酶的热稳定性，然后量化相比于在 4℃温育的对照酶的残留酶活性 ( 以 Vmax 表示 )。

[0094] 动力学分析显示，GRG23(ace3)R173K、GRG23(ace3)R173Q、GRG23(ace3)I174V 和 GRG23(ace3)G169V/L170V 实际上与天然 GRG23(ace3) 不能区别并且显示出几乎相同的催化速率、极高的草甘膦抗性和非常好的 PEP 亲和性。对于 G169V/L170V，对 PEP 的观测 Km 为 19μM( 与对于 GRG23(ace3) 的 15μM 相比 )，可表示相对于 GRG23(ace3)，对 PEP 的结合亲和力稍微较低。四种变体的每一种在 37℃ 16 小时之后具有大于 95％的热稳定性。对于 GRG23(ace3) 变体 GRG23(ace3)R173K、GRG23(ace3)R173Q 和 GRG23(ace3)I174V 所测定的动力学值被示于表 6 中。表 7.GRG23(ace3) 变体的动力学

| | Km(μM) | Ki(mM) | Vmax(nmol/min/μg) |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| GRG23(ace3) | 16 | 14 | 16 |
| GRG23(ace3)R173K | 16.6 | 14.7 | 17.7 |
| GRG23(ace3)R173Q | 14.3 | 14.2 | 15.8 |
| GRG23(ace3)I174V | 15.5 | 15.0 | 15.5 |

实施例 11. 将 syngrg23 和 grg23 变体克隆到植物表达盒中

[0095] 对于本文描述的 syngrg23 和每一种 grg23 变体（包括，例如，grg23(ace1)、grg23(ace2)、grg23(ace3)、grg23(ace4)、grg23(ace3)R173K、grg23(ace3)R173Q、grg23(ace3)I174V、grg23(ace3)G169V/L170V 和 grg23(L5P2.J2)，通过 PCR 从全长 DNA 模板扩增开放阅读框 (ORF)。在 PCR 过程中，Hind III 限制性位点被加入到 ORF 的每一个末端。此外，核苷酸序列 ACC 被直接添加到基因的起始密码子的 5′ 端，以增加翻译效率 (Kozak(1987)Nucleic Acids Research15 :8125-8148 ;Joshi(1987)Nucleic Acids Research 15 :6643-6653)。应用本领域熟知的技术克隆 PCR 产物并且进行测序，以保证在 PCR 期间没有突变被引入。

[0096] 用 Hind III 消化包含 PCR 产物的质粒，并且分离包含完整 ORF 的片段。该片段被克隆到质粒如 pAX200——一种包含水稻肌动蛋白启动子 (McElroy 等，(1991)Molec.Gen. Genet.231 :150-160) 和 PinII 终止子 (An 等，(1989)The Plant Cell 1 :115-122) 的植物表达载体——的 Hind III 位点。然后，来自该中间质粒的启动子 - 基因 - 终止子片段被亚克隆到质粒 pSB11(Japan Tobacco，Inc.) 中，以形成最终的基于 pSB11 的质粒。在一些情况下，可优选的是产生可选的构建物，其中叶绿体前导序列被编码为融合到 syngrg23、grg23(ace1)、grg23(ace2)、grg23(ace3)、grg23(ace4)、grg23(L5P2.J2)、grg23(ace3)R173K、grg23(ace3)R173Q、grg23(ace3)I174V 或 grg23(ace3)G169V/L170V 构建物的 N- 端。通常，这些基于 pSB 11 的质粒被组构，以使包含启动子 - 基因 - 终止子构建物或启动子 - 叶绿体前导区 - 基因 - 终止子构建物的 DNA 片段可以通过限制性酶如 Kpn I 和 Pme I 的双消化来切除，并且用于通过气溶胶束注射而转化入植物。得到的基于 pSB 11 的克隆的结构通过限制性消化和凝胶电泳以及通过跨过各种克隆链接点的测序来证实。

[0097] 应用本领域熟知的三亲交配法 (triparental matingprocedures)，质粒被移动到也具有质粒 pSB1(Japan Tobacco，Inc.) 的根癌农杆菌菌株 LBA4404 中，并且在含有壮观霉素 (spectinomycin) 的培养基上铺板。基于 pSB 11 的质粒克隆携带壮观霉素抗性但是是窄宿主范围质粒并且不能在农杆菌属中复制。当基于 pSB 11 的质粒通过同源重组整合到宽宿主范围质粒 pSB1 中时，壮观霉素抗性菌落出现。通过 DNA 杂交，证实 pSB1 和基于 pSB11 的质粒的共整合产物。具有共整合的农杆菌属菌株被用于通过本领域已知的方法例如 PureIntro 法 (Japan Tobacco) 转化玉米。实施例 12. 通过农杆菌属介导转化进行植物细胞的转化

[0098] 最好在授粉后 8-12 天收集玉米穗。从穗分离胚，且那些大小 0.8-1.5mm 的胚被优选用于转化。胚以盾片侧朝上被平铺在合适的温育培养基上，所述合适的温育培养基如 DN62A5S 培养基 (3.98g/L N6 盐，1ml/L(1000× 储存液 )N6 维生素 ;800mg/L L- 天冬酰胺 ;

100mg/L 肌醇 ;1.4g/L L- 脯氨酸 ;100mg/L 酪蛋白氨基酸 ;50g/L 蔗糖 ;1ml/L(1mg/ml 储存液 )2,4-D)。然而,除了 DN62A5S 以外的培养基和盐是适合的并且在本领域是已知的。胚在 25℃在黑暗中温育过夜。然而,本身并非必须将胚温育过夜。

[0099] 得到的外植体被转移到方形网格 ( 每平板 30-40 个 ),转移到渗透介质上大约 30-45 分钟,然后转移到光照板 (beaming plate)( 见,例如,PCT 公布 WO/0138514 和美国专利第 5,240,842 号 )。

[0100] 应用基本上如在 PCT 公布 WO/0138514 中所述的条件,采用气溶胶束加速器 (aerosol beam accelerator),促进 DNA 构建物到植物组织中,所述 DNA 构建物被设计来在植物细胞中表达本发明的 GRG 蛋白。光照之后,胚在渗透介质上温育大约 30 分钟,并且在黑暗中在 25℃被置于温育培养基上过夜。为了避免过度损害光照的外植体,在转移到恢复培养基之前,这些外植体被温育至少 24 小时。然后,在 25℃在黑暗中,胚被铺展在恢复期培养基上大约 5 天,随后被转移到选择培养基。外植体在选择培养基中温育可达 8 周,这取决于所使用的具体选择的种类和特性。在选择期之后,得到的愈伤组织被转移到胚成熟培养基,直到观察到成熟的体细胞胚形成。然后,得到的成熟体细胞胚被放置在弱光下,并且通过本领域已知的方法起始再生过程。所得到的茎干被允许在生根培养基上生根,并且所得到的植物被转移到苗盆并且作为转基因植物繁殖。材料 DN62A5S 培养基

| 成分 | 每升 | 来源 |
|---|---|---|
| Chu's N6 基础盐混合物 ( 产品编号 C416) | 3.98g/L | Phytotechnology Labs |
| Chu's N6 维生素溶液 ( 产品编号 C149) | 1ml/L(1000× 储存液 ) | Phytotechnology Labs |
| L- 天冬酰胺 | 800mg/L | Phytotechnology Labs |
| 肌醇 | 100mg/L | Sigma |
| L- 脯氨酸 | 1.4g/L | Phytotechnology Labs |
| 酪蛋白氨基酸 | 100mg/L | Fisher Scientific |
| 蔗糖 | 50g/L | Phytotechnology Labs |
| 2,4-D( 产品编号 D-7299) | 1ml/L(1mg/ml 储存液 ) | Sigma |

[0101] 用 1N KOH/1N KCl 调节溶液的 pH 至 pH5.8,加入 Gelrite(Sigma) 至 3g/L,并且高压灭菌。在冷却至 50℃之后,加入 5mg/ml 的硝酸银储存液 (Phytotechnology Labs) 至 2ml/L。该配方得到大约 20 块平板。实施例 13. 通过农杆菌属介导的转化将 EPSP 合酶转化到玉米植物细胞中

[0102] 最好在授粉后 8-12 天收集穗。从穗分离胚,并且那些大小 0.8-1.5mm 的胚被优选用于转化。胚以盾片侧朝上被平铺在合适的温育培养基上,并且在 25℃在黑暗中温育过夜。

[0103] 然而，本身并非必须将胚温育过夜。胚与含有适当载体的农杆菌属菌株接触大约5-10分钟，用于Ti质粒介导的转移，所述适当载体具有本发明的EPSP合酶，然后平铺到共培养培养基上大约3天(25℃，在黑暗中)。共培养之后，外植体被转移至恢复期培养基大约5天(25℃，在黑暗中)。外植体在选择培养基中温育可达8周，这取决于所使用的具体选择的种类和特性。在选择期之后，得到的愈伤组织被转移到胚成熟培养基，直到观察到成熟的体细胞胚形成。然后，得到的成熟体细胞胚被放置在弱光下，并且通过本领域已知的方法起始再生过程。所得到的茎干被允许在生根培养基上生根，并且所得到的植物被转移到苗盆并且作为转基因植物繁殖。

[0104] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请表示本发明所属领域普通技术人员的水平。所有出版物和专利申请通过引用被并入本文，其程度如同具体并个别地指出各个单独的出版物或专利申请通过引用被并入。

[0105] 尽管为了清楚理解的目的，以说明和实施例的方式在一些细节上描述了前述发明，但是显然某些变化和改变可以在所附的权利要求的范围内实践。

# 序列表

<110>L.C. 斯考藤
C.L. 彼得斯
B. 范德伯格
T.K. 汉森

<120> 改良的 GRG23EPSP 合酶 :组合物和使用方法

<130>45600/336802

<150>60/972,502
<151>2007-09-14

<150>60/872,200
<151>2006-12-01

<150>60/861,455
<151>2006-11-29

<160>35

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1
<211>1892
<212>DNA
<213> 球形节杆菌 (Arthrobacter globiformis)

<220>
<221>CDS
<222>(178)...(1417)

<221>misc_feature
<222>1801
<223>n = A,T,C or G

<400>1
gggaccacat gctgctcctg atttcagggc tgctgccggt atggaccagg gtttagagag 60

ggacggcacg catccgggcc cttatcggac caacgccaac agcggtcggt ggccttggag 120
cggggccagc acggccgatc acgtagactc tttggagctt cgctcgaaag gatcacc atg 180
Met
1

gaa act gat cga cta gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac cgg 228
Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn Arg
5 10 15

gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg aga 276
Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val Arg
20 25 30

cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca att cag gcc 324
Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln Ala
35 40 45

ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa ggc 372
Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu Gly
50 55 60 65

ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gat gca 420
Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp Ala
70 75 80

ggt acc gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gtc gcc gca gga cag ggg 468
Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln Gly

aag ttc acc gtc gac gga agc gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt cgg 516
Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu Arg
100 105 110

ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc gag 564
Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser Glu
115 120 125

cag ctg ccc cta aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag tac 612
Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu Tyr
130 135 140 145

gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc atg 660
Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile 6et
150 155 160

gcc gcc ccg tac gcg cga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat ccc 708
Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn Pro
165 170 175

gtg agc cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac ttc 756
Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp Phe
180 185 190

ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct ccc ggg 804
Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro Gly
195 200 205

cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa att gaa ccg gac gcg tca act gcg 852
Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr Ala
210 215 220 225

tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc cga agc ttc gaa ttc 900
Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu Phe
230 235 240

cag ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc aat 948
Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe Asn
245 250 255

gta ctt ggg cgg ctc ggt gca gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg gtc 996
Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser Val
260 265 270

acc ata tcc gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat atg 1044
Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp Met
275 280 285

ggc gag ata tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct cta 1092
Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro Leu
290 295 300 305

gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggc cat gca cgg ttg aag 1140
Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu Lys
310 315 320

gaa tcc gac cgc atc tcg gcg atg gaa acc aac ctg cga acg ctc ggt 1188
Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu Gly
325 330 335

gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg cga atc tac ccc tct acc 1236
Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser Thr
340 345 350

ccg cac ggc ggc aga gtc aat tgc cac cgg gac cac agg atc gcc atg 1284
Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala Met
355 360 365

gcg ttt tca atc ctg gga ctg cga gtg gac ggg att acc ctc gac gac 1332
Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp Asp
370 375 380 385

cct caa tgt gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt gga 1380
Pro Gln lys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu Gly
390 395 400

cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc t agtgacttcc 1427
Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410
tctccggcgg acgctaggca tcggaaaacg aatcctgaca tgaccgacct cctcgcgtca 1487
cggcgtgtct gccggtaccc aagcattctg ccttagccgc ttccgcggcc ccttatgctt 1547
tctggttgtc cagattttca tccgggatgt tgcctgacct tgagcagggc aatcagctgt 1607
tcagcactgt caatggtgtg ggccctgaag gcggcttcga tggctgccac gtcggcggct 1667
ctcatcgctg tcacgacacg cagatgcgct tcataggcac gttcaggatc cgccctcgtc 1727
gcctgatcct gagccaaggc aatagttaga tgtgcctccg ttggcggcca gagccgaagc 1787
aataaggagt tttncgaggc cacccagatt ccccgggtgg aaggcgatat gggcttcatg 1847
ctgaactatg gggtccggat ggaagtgact tttcaactct gccca 1892

<210>2
<211>413
<212>PRT
<213> 球形节杆菌

<400>2
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn

165 170 175
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270
Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>3
<211>436
<212>PRT
<213> 球形节杆菌

<400>3
Met Ala Leu Glu Arg Gly Gln His Gly Arg Ser Arg Arg Leu Phe Gly

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

Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr
325 330 335
Asn Ile Gly His Ala Arg Leu Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met
340 345 350
Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp
355 360 365
Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys
370 375 380
His Arg Asp His Arg Ile Ala Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg
385 390 395 400
Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe
405 410 415
Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu
420 425 430
Thr Leu Pro Gly
435

<210>4
<211>1242
<212>DNA
<213> 未知

<220>
<223> 分离自土壤样品

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>4
atg gaa act gat cga cta gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc gcg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Ala Ser Val Leu Val
20 25 30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca att cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcg gac ggt gat gat tgg gtc gtt gaa 192

Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
50 55 60

ggc ctg ggc cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gat 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

gcc ggt acc gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gtc gcc gca gga cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

ggg aag ttc acc gtc gac gga agc gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc cta acg att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggt ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg cga caa ggc ctg cgt gtt cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg agc cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcg acc gtc agc gtt cct ccc 624
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcg cgg cgg tat gag att gaa ccg gac gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc cgg cgc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

ttc cag ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta crt ggg cgg ctc ggc gca gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg 816

```
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Ash Ser
            260                 265                 270
gtc acc ata tcc gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat   864
Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
        275                 280                 285
atg ggc gag ata tcg gac acc ttc atg aca ctg gcg gcg att gcc cct   912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
    290                 295                 300
cta gcc gat gga ccc atc acg ata aca aac att ggc cat gca cgg ttg   960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305                 310                 315                 320
aag gaa tcc gac cgc atc tcg gcg atg gaa agc aac ctt cga atg ctc   1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Met Leu
                325                 330                 335
ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg cga atc tac ccc tct   1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
            340                 345                 350
acc ccg cac ggc ggc aga gtc aat tgc cac cgg gac cac agg atc gcc   1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
        355                 360                 365
atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg cga gtg gac ggg att acc ctc gac   1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
    370                 375                 380
gac cct caa tgt gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt   1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
gga cgc ctt ttc ccg gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag           1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly  *
                405                 410
```

<210>5
<211>413
<212>PRT
<213> 未知

<220>
<223> 分离自土壤样品

<400> 5

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

305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Met Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>6
<211>1242
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 grg23

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>6
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240

Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat 864

```
Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
        275                 280                 285
atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct   912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
    290                 295                 300
ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg   960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305                 310                 315                 320
aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc   1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
                325                 330                 335
ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct   1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
            340                 345                 350
acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct   1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
        355                 360                 365
atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac   1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
    370                 375                 380
gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt   1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag           1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly  *
                405                 410
```

<210>7
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的 GRG23

<400>7

```
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1               5                  10                  15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
```

20 25 30

Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln

35 40 45

Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu

50 55 60

Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp

65 70 75 80

Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln

85 90 95

Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu

100 105 110

Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser

115 120 125

Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu

130 135 140

Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile

145 150 155 160

Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn

165 170 175

Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp

180 185 190

Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro

195 200 205

Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr

210 215 220

Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu

225 230 235 240

Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe

245 250 255

Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser

260 265 270

Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp

275 280 285

Met Gly Ilu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro

290 295 300

Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu

305 310 315 320

Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu

325 330 335

Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>8
<211>1242
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(ace1)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>8
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
acc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
Thr Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288

Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata act gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Thr Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912

Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350

acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365

atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380

gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400

gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410

<210>9
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(ACE1)

<400>9
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15

Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30

Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45

Thr Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu

50 55 60

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

Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>10
<211>1242
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(ace2)

<221>1DS
<222>(1)...(1242)

<400>10
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu

100 105 110

cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata cgg gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu

305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350

acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365

atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380

gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400

gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410

<210>11
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(ACE2)

<400>11
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

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

385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>12
<211>1242
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg51.4

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>12
atg gaa act gat cga cta gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca att cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcg gac ggt gat gat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
50 55 60
ggc ctg ggc cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gat 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
gcc ggt acc gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gtc gcc gca gga cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
ggg aag ttc acc gtc gac gga agc gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110
cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser

115 120 125

gag cag ctg ccc cta acg att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggt ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg cga caa ggc ctg cgt gtt cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg agc cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcg acc gtc agc gtt cct ccc 624
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcg cgg cgg tat gag att gaa ccg gac gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc cgg cgc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

ttc cag ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggc gca gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata cgc gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag ata tcg gac acc ttc atg aca ctg gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

cta gcc gat gga ccc atc acg ata aca aac att ggc cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tcg gcg atg gaa agc aac ctt cga acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu

325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg cga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350

acc ccg cac ggc ggc aga gtc aat tgc cac cgg gac cac agg atc gcc 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365

atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg cga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380

gac cct caa tgt gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400

gga cgc ctt ttc ccg gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410

<210>13
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG51.4

<400>13
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
50 55 60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu

100 105 110

Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser

115 120 125

Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu

130 135 140

Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile

145 150 155 160

Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn

165 170 175

Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp

180 185 190

Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro

195 200 205

Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr

210 215 220

Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu

225 230 235 240

Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe

245 250 255

Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser

260 265 270

Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp

275 280 285

Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro

290 295 300

Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu

305 310 315 320

Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu

325 330 335

Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser

340 345 350

Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala

355 360 365

Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp

370 375 380

Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu

385 390 395 400

Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly

405 410

<210>14
<211>1242
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(ace3)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>14

```
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac   48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1               5                  10                  15

cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg   96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
            20                  25                  30

aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag   144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
        35                  40                  45

gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac gat tgg gtc gtt gaa   192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
    50                  55                  60

ggc ctg ggt cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac   240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65                  70                  75                  80

gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag   288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
                85                  90                  95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt   336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
            100                 105                 110

cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc   384
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
        115                 120                 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag   432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
```

130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg cgc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata cgt gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa agc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser

340 345 350

acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365

atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380

gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400

gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410

<210>15
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(ACE3)

<400>15
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
50 55 60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
260 265 270
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>16
<211>1242

<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(L5P2.J2)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>16

```
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac   48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser lys Ser Ile Thr Asn
 1               5                  10                  15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg   96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
            20                  25                  30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag   144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
        35                  40                  45
acc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa   192
Thr Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
    50                  55                  60
ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac   240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65                  70                  75                  80
gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag   288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
                85                  90                  95
ggg aag ttc acc ttc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt   336
Gly Lys Phe Thr Phe Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
            100                 105                 110
cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc   384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
        115                 120                 125
gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agt ggg ctg gca ggc ggg gag   432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
    130                 135                 140
tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc   480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
```

145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca tcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ser Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata act gga ccg gaa agg ctg aac ggc aac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Thr Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asn Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350

acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala

```
        355                 360                 365
atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac   1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
    370                 375                 380
gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt   1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag           1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly  *
                405                 410
```

<210>17
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(L5P2.J2)

<400>17

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

145 150 155 160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205
Gly Arg Tyr Thr Ser Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270
Val Thr Ile Thr Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asn Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>18
<211>1242
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(ace4)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>18

```
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac   48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1               5                  10                  15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg   96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
            20                  25                  30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag   144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
        35                  40                  45
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac gat tgg gtc gtt gaa   192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
    50                  55                  60
ggc ctg ggt cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac   240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65                  70                  75                  80
gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag   288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
                85                  90                  95
ggg aag ttc acc ttc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt   336
Gly Lys Phe Thr Phe Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
            100                 105                 110
cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc   384
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
        115                 120                 125
gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag   432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
    130                 135                 140
tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc   480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145                 150                 155                 160
atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat   528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
```

165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg asp
180 185 190

ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg cgc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata cgg gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa agc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350

acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365

atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp

```
    370                 375                 380
gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt   1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag           1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly  *
                405                 410
```

<210>19
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(ACE4)

<400>19

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

Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
260 265 270
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>20
<211>1244
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(L3P1.B20)

<221>CDS

<222>(1)...(1242)

<400>20

```
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac   48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1               5                  10                  15

cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg   96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
            20                  25                  30

aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag   144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
        35                  40                  45

gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa   192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
    50                  55                  60

ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac   240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65                  70                  75                  80

gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag   288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
                85                  90                  95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ttg cgg cgg cgc ccg ctt   336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
            100                 105                 110

cgg ccc ctg gtt gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc   384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
        115                 120                 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag   432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
    130                 135                 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc   480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145                 150                 155                 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat   528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
                165                 170                 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac   576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
```

180 185 190

ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc atc cct cca 624
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Ile Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tacttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350

acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365

atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380

gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu

385 390 395 400

gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410

gg 1244

<210>21
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(L3P1.B20)

<400>21
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

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

<210>22
<211>1244
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(L3P1.B3)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>22

```
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac   48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1               5                  10                  15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg   96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
            20                  25                  30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag   144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
        35                  40                  45
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa   192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
    50                  55                  60
ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc cac atc tgg tgc gag gac   240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala His Ile Trp Cys Glu Asp
65                  70                  75                  80
gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag   288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
                85                  90                  95
ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt   336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
            100                 105                 110
cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc   384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
        115                 120                 125
gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag   432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
    130                 135                 140
tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc   480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145                 150                 155                 160
atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat   528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
                165                 170                 175
ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac   576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
            180                 185                 190
ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca   624
```

Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat aaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Lys Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270

gtc acc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350

acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cga gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365

atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380

gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400

gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242

Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410

gg 1244

<210>23
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(L3P1.B3)

<400>23
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala His Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Lys Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225 230 235 240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270
Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>24
<211>1244
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(L3P1.F18)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>24

```
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac   48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
 1               5                  10                  15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg   96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
            20                  25                  30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag   144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
        35                  40                  45
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa   192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
    50                  55                  60
ggc ctg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac   240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65                  70                  75                  80
gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag   288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
                85                  90                  95
ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt   336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
            100                 105                 110
cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc   384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
        115                 120                 125
gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag   432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
    130                 135                 140
tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc   480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145                 150                 155                 160
atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat   528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
                165                 170                 175
ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac   576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
            180                 185                 190
ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca   624
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
        195                 200                 205
```

```
ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act   672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
    210                 215                 220
gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa   720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225                 230                 235                 240
ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc   768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
                245                 250                 255
aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg   816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
            260                 265                 270
gtc atc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat   864
Val Ile Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
        275                 280                 285
atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct   912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
    290                 295                 300
ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg   960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305                 310                 315                 320
aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc   1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
                325                 330                 335
ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct   1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
            340                 345                 350
acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct   1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
        355                 360                 365
atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac   1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
    370                 375                 380
gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt   1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag           1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly  *
                405                 410
```

gg 1244

<210>25

<211>413

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>GRG23(L3P1.F18)

<400>25

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

225 230 235 240
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270
Val Ile Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>26
<211>1244
<212>DNA
<213> 人工序列
<220>
<223>grg23(L3P1.023)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>26
atg gaa act gat cac ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp His Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gcg ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96

Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30

aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45

gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac aat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asn Trp Val Val Glu
50 55 60

ggc ttg ggt cag gca ccc cac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro His Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

cgg ccc ctg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Leu Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc ctt gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Leu Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg agc ttc gaa 720

```
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Ser Phe Glu
225                 230                 235                 240
ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttt ttc   768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
                245                 250                 255
aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca ccc aac tcg   816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
            260                 265                 270
gtc acc ata tct gga ccg gaa agg ctg aac ggc gac att gaa gtg gat   864
Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
        275                 280                 285
atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct   912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
    290                 295                 300
ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg   960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305                 310                 315                 320
aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa acc aac ctg cgc acg ctc   1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
                325                 330                 335
ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct   1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
            340                 345                 350
acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct   1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
        355                 360                 365
atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac   1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
    370                 375                 380
gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt   1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctt ccc ggc tag           1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly  *
                405                 410
gg                                                               1244
```

<210>27

<211>413

<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(L3P1.023)

<400>27

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

Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Pro Asn Ser
260 265 270
Val Thr Ile Ser Gly Pro Glu Arg Leu Asn Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
29 0295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Thr Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>28
<211>1244
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(ace3) 变体序列 (grg23(ace3)R173K)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>28
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30

aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45

gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac gat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
50 55 60

ggc ctg ggt cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg aag ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Lys Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg cgc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

```
ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc   768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
                245                 250                 255
aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg   816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
            260                 265                 270
gtc acc ata cgg gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat   864
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
        275                 280                 285
atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct   912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
    290                 295                 300
ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg   960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305                 310                 315                 320
aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa agc aac ctg cgc acg ctc   1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
                325                 330                 335
ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct   1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
            340                 345                 350
acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct   1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
        355                 360                 365
atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac   1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
    370                 375                 380
gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt   1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag           1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly  *
                405                 410
gg                                                               1244
```

<210>29
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>

<223>GRG23(ace3) 变体序列 (GRG23(ace3)R173K)

<400>29

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

Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>30
<211>1244
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(ace3) 变体序列 (grg23(ace3)
G169V/L170V)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>30
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144

Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45

gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac gat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
50 55 60

ggc ctg ggt cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa gtc gtg cgt gtg aag ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Val Val Arg Val Lys Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tacttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg cgc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768

```
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
                245                 250                 255
aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg   816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
            260                 265                 270
gtc acc ata cgg gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat   864
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
        275                 280                 285
atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct   912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
    290                 295                 300
ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg   960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305                 310                 315                 320
aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa agc aac ctg cgc acg ctc  1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
                325                 330                 335
ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct  1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
            340                 345                 350
acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct  1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
        355                 360                 365
atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac  1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
    370                 375                 380
gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt  1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385                 390                 395                 400
gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag          1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly  *
                405                 410
gg                                                              1244
```

<210>31
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>

<223>GRG23(ace3) 变体序列 (GRG23(ace3) G169V/L170V)

<400>31

Met Glu Thr Asp Arg Leu ValIle Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15

Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30

Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45

Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
50 55 60

Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Val Val Arg Val Lys Ile Pro Asn
165 170 175

Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

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

Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
260 265 270

Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp

275 280 285
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>32
<211>1244
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(ace3) 变体序列 (grg23(ace3)R173Q)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>32
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45

gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac gat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu
50 55 60

ggc ctg ggt cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg caa ata cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Gln Ile Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tacttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg cgc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser
260 265 270
gtc acc ata cgg gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285
atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300
ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa agc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410
gg 1244

<210>33
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(ace3) 变体序列 (GRG23(ace3)R173Q)

<400>33

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

290 295 300
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

<210>34
<211>1244
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223>grg23(ace3) 变体序列 (grg23(ace3)I174V)

<221>CDS
<222>(1)...(1242)

<400>34
atg gaa act gat cgc ctt gtg atc cca gga tcg aaa agc atc acc aac 48
Met Glu Thr Asp Arg Leu Val Ile Pro Gly Ser Lys Ser Ile Thr Asn
1 5 10 15
cgg gct ttg ctt ttg gct gcc gca gcg aag ggc acg tcg gtc ctg gtg 96
Arg Ala Leu Leu Leu Ala Ala Ala Ala Lys Gly Thr Ser Val Leu Val
20 25 30
aga cca ttg gtc agc gcc gat acc tca gca ttc aaa act gca atc cag 144
Arg Pro Leu Val Ser Ala Asp Thr Ser Ala Phe Lys Thr Ala Ile Gln
35 40 45
gcc ctc ggt gcc aac gtc tca gcc gac ggt gac gat tgg gtc gtt gaa 192
Ala Leu Gly Ala Asn Val Ser Ala Asp Gly Asp Asp Trp Val Val Glu

50 55 60

ggc ctg ggt cag gca ccc aac ctc gac gcc gac atc tgg tgc gag gac 240
Gly Leu Gly Gln Ala Pro Asn Leu Asp Ala Asp Ile Trp Cys Glu Asp
65 70 75 80

gca ggt act gtg gcc cgg ttc ctc cct cca ttc gta gcc gca ggt cag 288
Ala Gly Thr Val Ala Arg Phe Leu Pro Pro Phe Val Ala Ala Gly Gln
85 90 95

ggg aag ttc acc gtc gac gga tca gag cag ctg cgg cgg cgc ccg ctt 336
Gly Lys Phe Thr Val Asp Gly Ser Glu Gln Leu Arg Arg Arg Pro Leu
100 105 110

cgg ccc gtg gtc gac ggc atc cgc cac ctg ggc gcc cgc gtc tcc tcc 384
Arg Pro Val Val Asp Gly Ile Arg His Leu Gly Ala Arg Val Ser Ser
115 120 125

gag cag ctg ccc ctt aca att gaa gcg agc ggg ctg gca ggc ggg gag 432
Glu Gln Leu Pro Leu Thr Ile Glu Ala Ser Gly Leu Ala Gly Gly Glu
130 135 140

tac gaa att gaa gcc cat cag agc agc cag ttc gcc tcc ggc ctg atc 480
Tyr Glu Ile Glu Ala His Gln Ser Ser Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ile
145 150 155 160

atg gcc gcc ccg tac gcg aga caa ggc ctg cgt gtg cgg gtc cca aat 528
Met Ala Ala Pro Tyr Ala Arg Gln Gly Leu Arg Val Arg Val Pro Asn
165 170 175

ccc gtg tca cag ccc tac ctc acg atg aca ctg cgg atg atg agg gac 576
Pro Val Ser Gln Pro Tyr Leu Thr Met Thr Leu Arg Met Met Arg Asp
180 185 190

ttc ggc att gag acc agc acc gac gga gcc acc gtc agc gtc cct cca 624
Phe Gly Ile Glu Thr Ser Thr Asp Gly Ala Thr Val Ser Val Pro Pro
195 200 205

ggg cgc tac aca gcc cgg cgg tat gaa ata gaa ccg gat gcg tca act 672
Gly Arg Tyr Thr Ala Arg Arg Tyr Glu Ile Glu Pro Asp Ala Ser Thr
210 215 220

gcg tcg tac ttc gcc gcc gct tcc gcc gtc tct ggc agg cgc ttc gaa 720
Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Gly Arg Arg Phe Glu
225 230 235 240

ttt caa ggc ctt ggc aca gac agc atc caa ggc gac acg tca ttc ttc 768
Phe Gln Gly Leu Gly Thr Asp Ser Ile Gln Gly Asp Thr Ser Phe Phe
245 250 255

aat gta ctt ggg cgg ctc ggt gcg gag gtc cac tgg gca tcc aac tcg 816
Asn Val Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu Val His Trp Ala Ser Asn Ser

260 265 270

gtc acc ata cgg gga ccg gaa agg ctg acc ggc gac att gaa gtg gat 864
Val Thr Ile Arg Gly Pro Glu Arg Leu Thr Gly Asp Ile Glu Val Asp
275 280 285

atg ggc gag att tcg gac acc ttc atg aca ctc gcg gcg att gcc cct 912
Met Gly Glu Ile Ser Asp Thr Phe Met Thr Leu Ala Ala Ile Ala Pro
290 295 300

ttg gcc gat gga ccc atc acg ata acc aac att ggt cat gca cgg ttg 960
Leu Ala Asp Gly Pro Ile Thr Ile Thr Asn Ile Gly His Ala Arg Leu
305 310 315 320

aag gaa tcc gac cgc atc tca gcg atg gaa agc aac ctg cgc acg ctc 1008
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335

ggt gta caa acc gac gtc gga cac gac tgg atg aga atc tac ccc tct 1056
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350

acc ccg cac ggc ggt aga gtg aat tgc cac cgg gac cac agg atc gct 1104
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365

atg gcg ttt tca atc ctg gga ctg aga gtg gac ggg att acc ctc gac 1152
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380

gac cct caa tgc gtc ggg aag acc ttt cct ggc ttc ttc gac tac ctt 1200
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400

gga cgc ctt ttc ccc gaa aag gcg ctt acg ctc ccc ggc tag 1242
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly *
405 410

gg 1244

<210>35
<211>413
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>GRG23(ace3) 变体序列 (GRG23(ace3)I174V)

<400>35

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

305 310 315 320
Lys Glu Ser Asp Arg Ile Ser Ala Met Glu Ser Asn Leu Arg Thr Leu
325 330 335
Gly Val Gln Thr Asp Val Gly His Asp Trp Met Arg Ile Tyr Pro Ser
340 345 350
Thr Pro His Gly Gly Arg Val Asn Cys His Arg Asp His Arg Ile Ala
355 360 365
Met Ala Phe Ser Ile Leu Gly Leu Arg Val Asp Gly Ile Thr Leu Asp
370 375 380
Asp Pro Gln Cys Val Gly Lys Thr Phe Pro Gly Phe Phe Asp Tyr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Leu Phe Pro Glu Lys Ala Leu Thr Leu Pro Gly
405 410

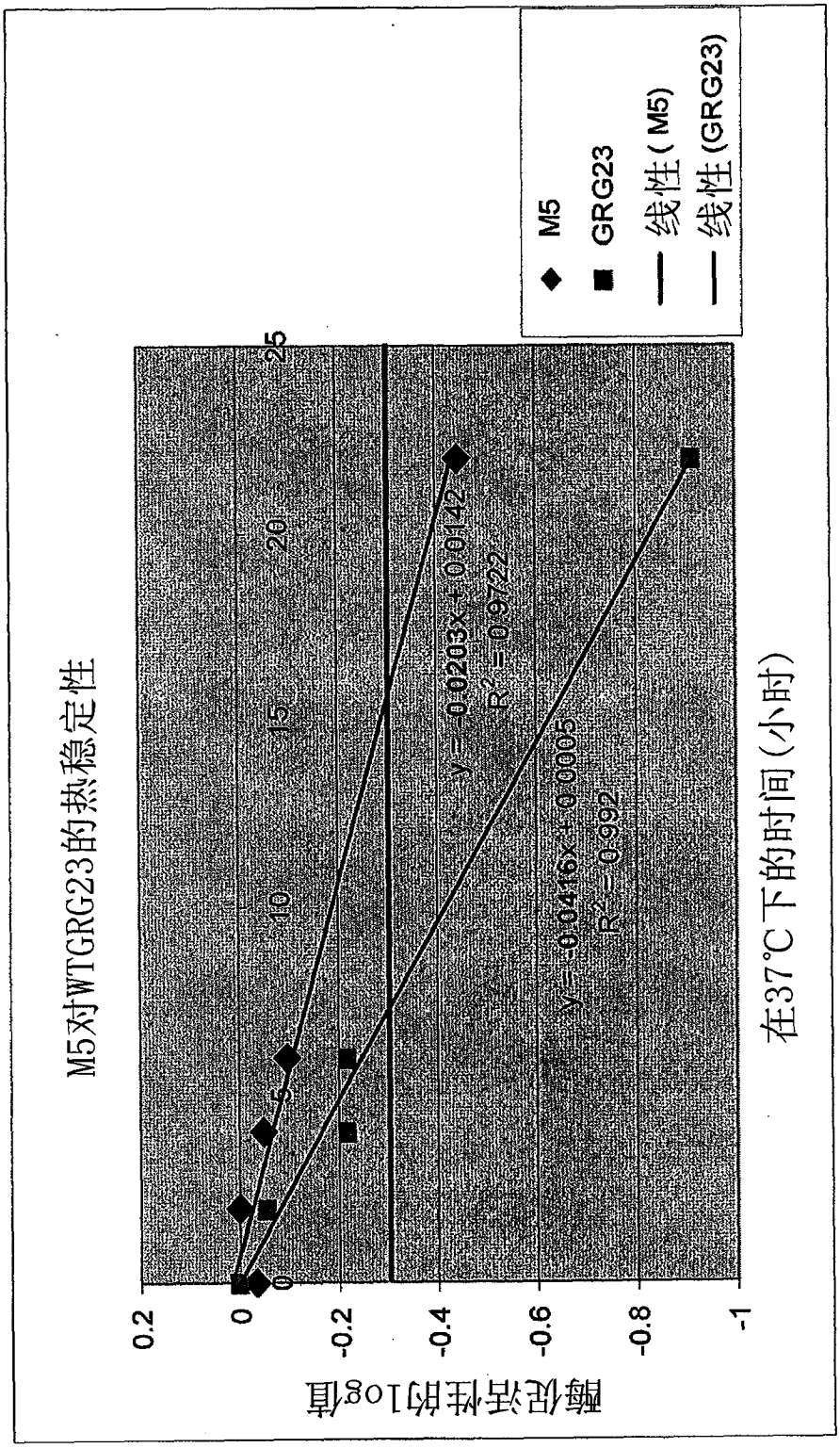

M5对WTGRG23的热稳定性
M5
GRG23
线性(M5)
线性(GRG23)
y = -0.0203x + 0.0142
R² = 0.9722
y = -0.0416x + 0.0005
R² = 0.992
0
5
10
15
20
25
0.2
0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
-1
酶促活性的log值
在37℃下的时间(小时)

图 1

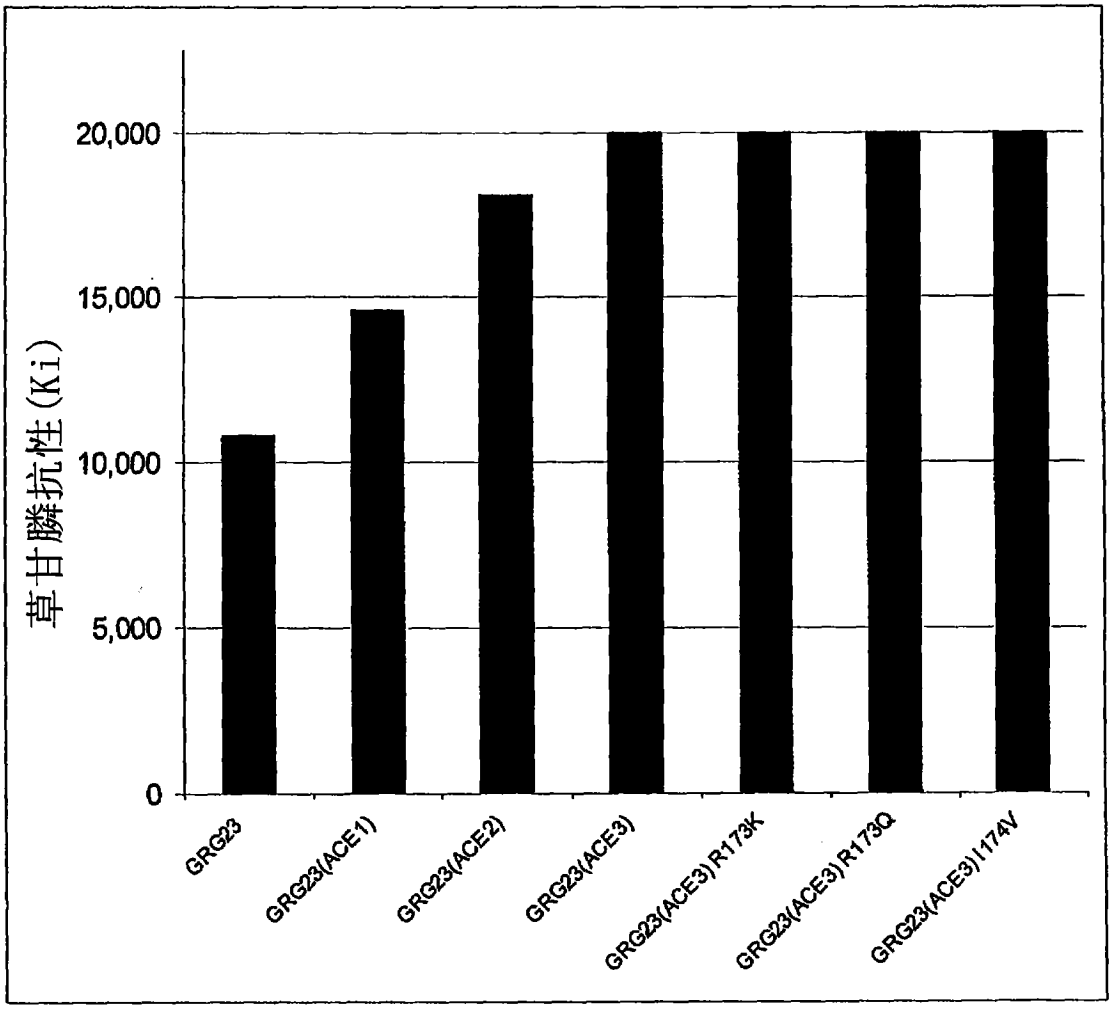

草甘膦抗性(Ki)
20,000
15,000
10,000
5,000
0
GRG23
GRG23(ACE1)
GRG23(ACE2)
GRG23(ACE3)
GRG23(ACE3)R173K
GRG23(ACE3)R173Q
GRG23(ACE3)I174V

图 2

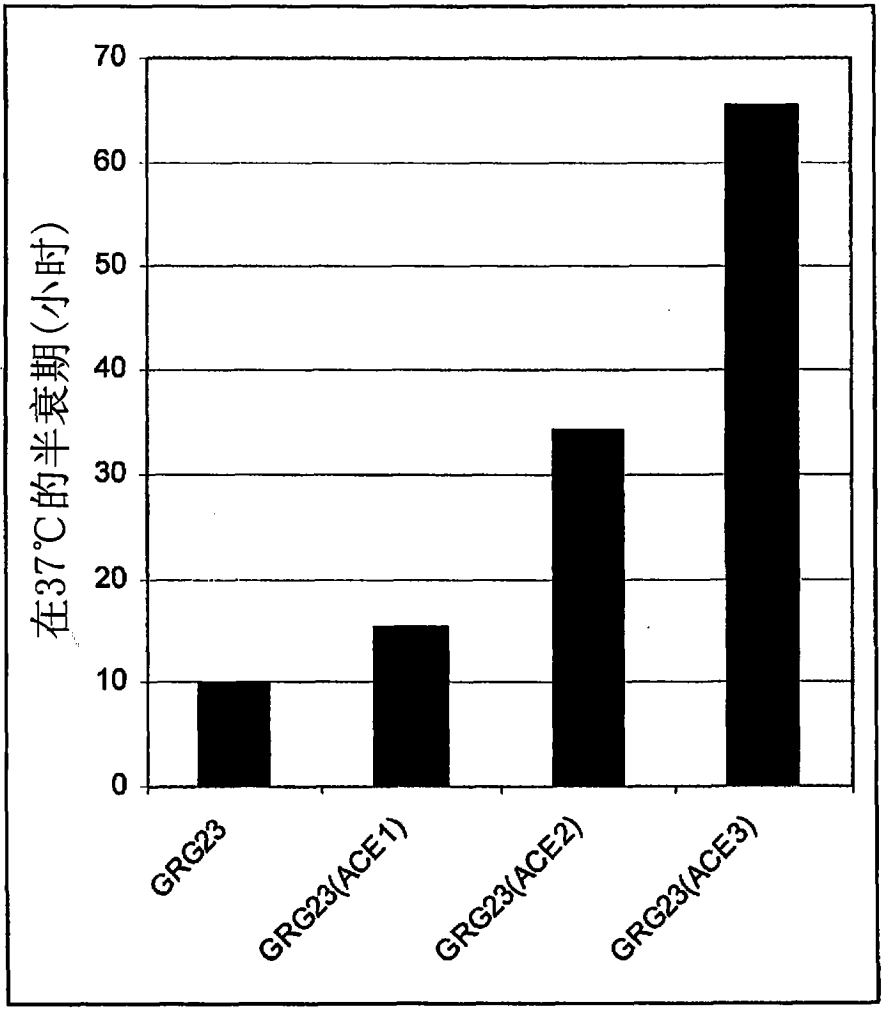

在37℃的半衰期(小时)
70
60
50
40
30
20
10
0
GRG23
GRG23(ACE1)
GRG23(ACE2)
GRG23(ACE3)

图 3