

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102316719 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 11

(21) 申请号 200980150544. 3

C12N 15/84(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 12. 15

A01H 4/00(2006. 01)

C12N 15/82(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/122, 454 2008. 12. 15 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 06. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SG2009/000479 2009. 12. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02010/071608 EN 2010. 06. 24

(71) 申请人 淡马锡生命科学研究院有限公司

地址 新加坡新加坡

(72) 发明人 H·Z·毛 J·叶 N·H·蔡

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 林晓红

(51) Int. Cl.

A01H 1/00(2006. 01)

C12N 15/05(2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 13 页

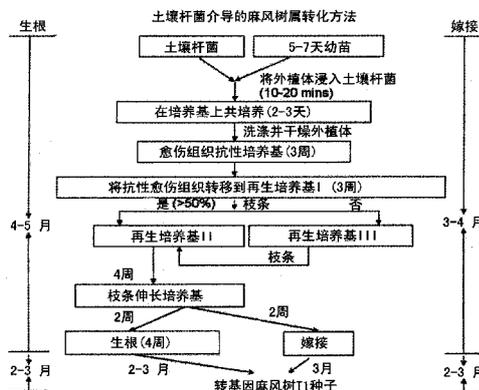
序列表 11 页 附图 4 页

(54) 发明名称

麻风树的遗传转化

(57) 摘要

本发明涉及用于麻风树属的植物,更具体的是麻风树的再生和土壤杆菌介导的转化的方法。



1. 一种用于再生麻风树植物的方法,其包括:

(a) 在固体愈伤组织形成培养基上将子叶外植体培养一段时间以产生具有愈伤组织的外植体,所述愈伤组织形成培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、6-苄氨基嘌呤(6-BA)和 1-萘乙酸(NAA);

(b) 在固体第一枝条再生培养基上将所述愈伤组织培养一段时间以产生具有枝条的愈伤组织和愈伤组织,所述第一枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、腺嘌呤、6-BA 和 3-吲哚丁酸(IBA);

(c) 在固体第二枝条再生培养基上将所述枝条培养一段时间以产生枝条,所述第二枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、6-BA、IBA 和赤霉素(GA₃);

(d) 在固体枝条伸长培养基上将来自步骤(c)的枝条培养一段时间以产生伸长的枝条,所述枝条伸长培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、6-BA 和 GA₃;以及

(e) 将所述伸长的枝条生根或嫁接,其中生根通过在固体生根培养基上将所述伸长的枝条培养一段时间以产生幼苗来进行,或者其中嫁接通过将所述伸长的枝条嫁接到麻风树根状茎来进行,所述生根培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、蔗糖和 IBA。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其还包括在固体第三枝条再生培养基上将来自步骤(b)的愈伤组织培养一段时间以产生具有枝条的愈伤组织,然后将其在步骤(c)中培养,所述第三枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、6-BA 和 IBA。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其中培养基组分的浓度是:

(a) 在所述愈伤组织形成培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;6-BA:约 1.5mg/L;和 NAA:约 0.05mg/L 至约 0.1mg/L,优选约 0.05mg/L;

(b) 在所述第一枝条再生培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;腺嘌呤:约 2mg/L 至约 4mg/L,优选约 2mg/L;6-BA:约 1.5mg/L;和 IBA:约 0.05mg/L;

(c) 在所述第二枝条再生培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;6-BA:约 1.5mg/L;IBA:约 0.05mg/L;和 GA₃:约 0.05mg/L 至约 0.5mg/L,优选约 0.5mg/L;

(d) 在所述枝条伸长培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;6-BA:约 0.3mg/L;和 GA₃:约 0.1mg/L 至约 0.5mg/L,优选约 0.1mg/L;以及

(e) 在所述生根培养基中,蔗糖:约 3%;和 IBA:约 0.07g/L。

4. 如权利要求 2 所述的方法,其中所述第三枝条再生培养基中培养基组分的浓度是柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;6-BA:约 1.5mg/L;IBA:约 0.05mg/L。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其中用于培养的时间段是:

- (a) 在所述愈伤组织形成培养基上约 2 周至约 3 周, 优选约 3 周;
 - (b) 在所述第一枝条再生培养基上约 3 周至约 4 周, 优选约 3 周;
 - (c) 在所述第二枝条再生培养基上约 3 周至约 4 周, 优选约 4 周;
 - (d) 在所述枝条伸长培养基上约 2 周至约 3 周, 优选约 2 周; 以及
 - (e) 在所述生根培养基上约 3 周至约 4 周, 优选约 4 周。
6. 如权利要求 2 所述的方法, 其中在所述第三枝条再生培养基上培养的时间段是约 4 周至约 5 周, 优选约 4 周。
7. 如权利要求 3 所述的方法, 其中用于培养的时间段是:
- (a) 在所述愈伤组织形成培养基上约 2 周至约 3 周, 优选约 3 周;
 - (b) 在所述第一枝条再生培养基上约 3 周至约 4 周, 优选约 3 周;
 - (c) 在所述第二枝条再生培养基上约 3 周至约 4 周, 优选约 4 周;
 - (d) 在所述枝条伸长培养基上约 2 周至约 3 周, 优选约 2 周; 以及
 - (e) 在所述生根培养基上约 3 周至约 4 周, 优选约 4 周。
8. 如权利要求 4 所述的方法, 其中在所述第三枝条再生培养基上培养的时间段是约 4 周至约 5 周, 优选约 4 周。
9. 一种用于土壤杆菌介导的麻风树植物转化的方法, 其包括:
- (a) 在固体培养基上将子叶外植体与土壤杆菌共培养一段时间以产生转化的子叶外植体, 所述培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、乙酰丁香酮 (AS)、6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 和 1-萘乙酸 (NAA);
 - (b) 在避光条件下, 在固体愈伤组织形成培养基上将所述转化的子叶外植体培养一段时间以产生具有转化的愈伤组织的外植体, 所述愈伤组织形成培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、6-BA、NAA、选择剂和土壤杆菌铲除剂;
 - (c) 在固体第一枝条再生培养基上将所述转化的愈伤组织培养一段时间以产生具有转化的枝条的转化的愈伤组织和转化的愈伤组织, 所述第一枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、腺嘌呤、6-BA、3-吲哚丁酸 (IBA)、选择剂和土壤杆菌铲除剂;
 - (d) 在固体第二枝条再生培养基上将所述转化的枝条培养一段时间以产生转化的枝条, 所述第二枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、6-BA、IBA、赤霉素 (GA_3)、选择剂和土壤杆菌铲除剂;
 - (e) 在固体枝条伸长培养基上将来自步骤 (c) 的转化的枝条培养一段时间以产生伸长的转化的枝条, 所述枝条伸长培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、6-BA 和 GA_3 ; 以及
 - (f) 将所述伸长的转化的枝条生根或嫁接, 其中生根通过在固体生根培养基上将所述伸长的转化的枝条培养一段时间以产生转化的幼苗来进行, 或者其中嫁接通过将所述伸长的转化的枝条嫁接到麻风树根状茎来进行, 所述生根培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、蔗糖和 IBA。
10. 如权利要求 9 所述的方法, 其还包括在固体第三枝条再生培养基上将来自步骤 (c) 的转化的愈伤组织培养一段时间以产生具有枝条的愈伤组织, 然后将其在步骤 (d) 中培养, 所述第三枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、

蔗糖、6-BA、IBA、选择剂和土壤杆菌铲除剂。

11. 如权利要求 9 所述的方法,其中培养基组分的浓度是:

(a) 在共培养培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;AS:约 20mg/L;6-BA:约 1.5mg/L;和 NAA:约 0.05mg/L 至约 0.1mg/L,优选约 0.05mg/L;

(b) 在所述愈伤组织形成培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;6-BA:约 1.5mg/L;和 NAA:约 0.05mg/L 至约 0.1mg/L,优选约 0.05mg/L;

(c) 在所述第一枝条再生培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;腺嘌呤:约 2mg/L 至约 4mg/L,优选约 2mg/L;6-BA:约 1.5mg/L;和 IBA:约 0.05mg/L;

(d) 在所述第二枝条再生培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;6-BA:约 1.5mg/L;IBA:约 0.05mg/L;和 GA₃:约 0.05mg/L 至约 0.5mg/L,优选约 0.5mg/L;

(e) 在所述枝条伸长培养基中,柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;6-BA:约 0.3mg/L;和 GA₃:约 0.1mg/L 至约 0.5mg/L,优选约 0.1mg/L;以及

(f) 在所述生根培养基中,蔗糖:约 3%;和 IBA:约 0.07g/L。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述第三枝条再生培养基中培养基组分的浓度是柠檬酸:约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L;谷氨酰胺:约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L;酪蛋白水解物:约 100mg/L;蔗糖:约 3%;6-BA:约 1.5mg/L;IBA:约 0.05mg/L。

13. 如权利要求 9 所述的方法,其中用于培养的时间段是:

(a) 约 2-3 天;

(b) 在所述愈伤组织形成培养基上约 2 周至约 3 周,优选约 3 周;

(c) 在所述第一枝条再生培养基上约 3 周至约 4 周,优选约 3 周;

(d) 在所述第二枝条再生培养基上约 3 周至约 4 周,优选约 4 周;

(e) 在所述枝条伸长培养基上约 2 周至约 3 周,优选约 2 周;以及

(f) 在所述生根培养基上约 3 周至约 4 周,优选约 4 周。

14. 如权利要求 10 所述的方法,其中在所述第三枝条再生培养基上培养的时间段是约 4 周至约 5 周,优选约 4 周。

15. 如权利要求 11 所述的方法,其中用于培养的时间段是:

(a) 约 2-3 天;

(b) 在所述愈伤组织形成培养基上约 2 周至约 3 周,优选约 3 周;

(c) 在所述第一枝条再生培养基上约 3 周至约 4 周,优选约 3 周;

(d) 在所述第二枝条再生培养基上约 3 周至约 4 周,优选约 4 周;

(e) 在所述枝条伸长培养基上约 2 周至约 3 周,优选约 2 周;以及

(f) 在所述生根培养基上约 3 周至约 4 周,优选约 4 周。

16. 如权利要求 12 所述的方法,其中在所述第三枝条再生培养基上培养的时间段是约

4 周至约 5 周, 优选约 4 周。

麻风树的遗传转化

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求享有 2008 年 12 月 15 日提交的美国临时专利申请系列号 61/122, 454 的优先权, 该临时专利申请并入本文作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明涉及植物再生和转化领域, 尤其涉及用于麻风树属 (*Jatropha*) 的再生和转化的方法。更具体地, 本发明涉及用于麻风树 (*Jatropha curcas*) 植物的再生和转化的方法和培养基组合物。

[0005] 本文中用于说明本发明背景或提供有关实施的补充细节的出版物和其他材料并入本文作为参考, 并且为了方便起见分别在文献目录中分组。

[0006] 世界面临着化石燃料供给日益减少和温室作用不断恶化的问题。亟需增加可再生能源的产生和消耗。对于许多国家寻找替代能源来说, 生物燃料已经公认为国家的优先项目以满足它们的能源安全需要, 同时有助于减少造成温室作用的 CO₂ 排放。对生物燃料的需要导致食物生产的压力增加。例如, 为了满足德国政府要求的德国 2017 年的生物燃料需求, 该国的全部农用土地都将用于生长生物能作物, 而没有留下土地用于食物生产。为了减轻对土地的这种竞争并满足我们对可再生燃料的需要, 亟需利用边缘土地来进行生物能产生。

[0007] 麻风树是属于大戟科的小木本植物。麻风树的数种独特性质使其成为用于生物柴油生产的理想植物。这些性质包括其迅速生长、容易繁殖、种子的低成本、高含油量、短孕育期、广泛的适应性、干旱耐受性和在退化土壤上茁壮成长的能力。此外, 其植株大小使种子的收集非常方便 (Jones, 1991 ;Sujatha et al. , 2008)。

[0008] 但是, 麻风树具有几个缺点, 这限制了它的广泛应用。植物的产量受到不利的雄花与雌花比的限制, 并且其含油量没有通过育种进行优化。该植物对生物应激如病毒 (Narayanna et al. , 2007)、真菌和细菌病原体, 和非生物应激特别是寒冷和干旱也是敏感的 (<http://www.jatropha.org>)。在植物的种子和叶子中存在数种毒性组分 (例如蛋白毒素、麻风树毒蛋白和致癌剂佛波酯) 给麻风树产业的农民和生物加工工人带来健康危害。

[0009] 改进植物质量性状的传统方法是通过培育优良的基因型。但是, 利用分子标记物对遗传多样性的评价公开了当地麻风树 (*J. curcas*) 种质中的低附件间 (inter-accessional) 变异性 (Sujatha et al. , 2008)。因此, 亟需诸如遗传转化方法的替代性遗传操作工具来为该作物的遗传改良提供另外的策略。土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 介导的遗传转化已经成为产生转基因植物的主要选择。但是, 很少有报道涉及属于大戟科植物的土壤杆菌介导的转化的应用。唯一报道的用于麻风树属的转化方案 (Li et al. , 2008) 在我们手中是无法重复的。

[0010] 因此, 亟需转化麻风树的方法以便为该作物种类的遗传改良提供工具。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明涉及用于麻风树属的植物, 更具体的是麻风树的再生和土壤杆菌介导的转

化的方法。

[0013] 因此,在一方面,本发明通过优化组织培养和枝条 (shoot) 再生条件提供了有效且可重复的用于麻风树的植物再生方案。这种再生方案已经与土壤杆菌介导的转化联用以产生 T_0 转基因麻风树属枝条 / 植物。本发明还提供了利用 T_0 转基因枝条作为接穗和非转基因植株作为根状茎的嫁接步骤的用途。这种嫁接步骤不需要再生的植物在组织培养中产生根,并且显著地缩短了转基因枝条开花和产生 T_1 种子的时间。

[0014] 在一实施方案中,本发明提供了一种用于再生麻风树植物的方法。根据该实施方案,从 5-7 天龄幼苗的子叶获得外植体。将外植体在愈伤组织形成培养基上培养,所述愈伤组织形成培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖以及作为植物激素的 6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 和 1-萘乙酸 (NAA)。然后将愈伤组织转移到第一枝条再生培养基,其包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、腺嘌呤、蔗糖以及作为植物激素的 6-BA 和 3-吲哚丁酸 (IBA)。将从愈伤组织再生的任何枝条转移到第二枝条再生培养基,其包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖以及作为植物激素的 6-BA、IBA 和赤霉素 (GA_3)。将不具有再生的枝条的愈伤组织转移到第三枝条再生培养基,其包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖以及作为植物激素的 6-BA 和 IBA 以用于枝条的进一步再生。将已经再生的枝条转移到枝条伸长 (elongation) 培养基,其包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖以及作为植物激素的 6-BA 和 GA_3 以用于伸长和芽增殖。将伸长的枝条转移到生根培养基,其包含 MS 无机盐、维生素 B5、蔗糖和 IBA。生根后,将幼苗转移到土壤中。可选的,可以将伸长的枝条嫁接到麻风树的根状茎。

[0015] 在第二实施方案中,本发明提供了一种用于土壤杆菌介导的麻风树植物转化的方法。根据该实施方案,土壤杆菌介导的麻风树转化利用与上述用于麻风树再生的基本方案相同的基本方案。为了进行转化,首先将外植体与土壤杆菌细胞共培养,然后转移到愈伤组织形成培养基,随后转移到如上所述的枝条再生培养基、枝条伸长培养基和生根培养基。共培养培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、葡萄糖、乙酰丁香酮以及作为植物激素的 6-BA 和 NAA。愈伤组织形成培养基与用于再生的培养基相同,除了它还包含选择剂和土壤杆菌铲除剂。类似地,枝条再生培养基还包含选择剂和土壤杆菌铲除剂。为了转化,在避光条件下的愈伤组织形成培养基上进行培养。可以将常规选择剂用于土壤杆菌介导的麻风树植物转化。选择剂的实例包括但不限于除草剂 BASTA、潮霉素等。

附图说明

[0016] 图 1 示出本发明的土壤杆菌介导的麻风树属转化方法。左边所列的时间尺度使用生根方案,而右边使用嫁接方案。

[0017] 图 2 示出用于进行本发明的转化方法的土壤杆菌转化载体。

[0018] 图 3A-3K 示出麻风树的转化、再生、开花和出苗。图 3A:麻风树 MD5 天的幼苗适于转化。图 3B:愈伤组织形成和枝条产生。左侧,用不携带任何载体的土壤杆菌接种的子叶。右侧,用携带含性状基因的载体的土壤杆菌接种的子叶。注意来自外植体的枝条再生。图 3C:褐色子叶表面上潮霉素抗性愈伤组织和枝条样器官的放大图。图 3D:麻风树的潮霉素

抗性枝条的再生。图 3E:枝条伸长。图 3F:转基因枝条的生根。图 3G:转基因麻风树的高生根效率。图 3H:土壤中生长的转基因麻风树。图 3I 和图 3J:嫁接于非转基因根状茎上的转基因麻风树枝条。白色箭头指示嫁接部位。图 3K:转基因麻风树开花和结籽。比例尺表示 10mm。

[0019] 图 4 示出 hyg⁻ 抗性 ubi:GFP 麻风树植物的 PCR 分析。泳道 - :野生型麻风树属对照 ;泳道 + :p1300-GFP 的质粒 DNA ;泳道 #1-#10 来自潮霉素抗性麻风树属的枝条叶。

[0020] 图 5A-5P 示出 T₀ 植物根部 (图 5B、图 5D)、雄花 (图 5F、图 5H) 以及受精后 3 周 T₁ 种子 (图 J、图 K、图 L、图 N、图 O、图 P) 中 GFP 的表达。图 A、图 C、图 E、图 G、图 I 和图 M 是每种植物器官的野生型对照。比例尺表示 2mm。

[0021] 图 6 示出 BASTA⁻ 抗性 35S:JcWRI1 麻风树植物的 PCR 分析。泳道 M, DNA ladder ;泳道 #1-#7 来自 BASTA 抗性麻风树属枝条叶 ;泳道 -, 野生型对照 ;泳道 +, pBA002-MYC-JcWRI1 的质粒 DNA。

[0022] 图 7 示出利用抗 HA 抗体,表达 35S:RcFAH12 和 35S:JcDGAT1 的转基因麻风树属植物的叶中 RcFAH12 和 JcDGAT1 水平的蛋白印迹分析。底部 :作为上样对照的 RUBL(RUBISCO 的大亚基) 的考马斯亮蓝染色。

[0023] 发明详述

[0024] 本发明涉及用于麻风树属的植物,更具体的是麻风树的再生和土壤杆菌介导的转化的方法。

[0025] 在一方面,本发明提供了一种用于再生麻风树属植物的方法。根据该实施方案,外植体获得自约 5 天至约 12 天龄幼苗的子叶,优选约 5-7 天龄幼苗。培养在 25°C ±2°C 和光照下进行,16h 光照 (100 μ mol/m²S)/8h 避光循环。幼苗在组织培养基中生长。利用常规技术将麻风树的种仁表面灭菌,在避光条件下浸于 28°C 无菌水中过夜。使不含胚乳的胚在不含激素的发芽培养基上发芽,其中根与培养基接触。发芽培养基包含 1/2 浓度的 MS 无机盐、维生素 B5 和蔗糖。蔗糖浓度为约 5% (w/v)。发芽培养基还可以包含缓冲液。在一实施方案中,缓冲液为约 0.5g/L 的 2-(4-吗啉代) 乙磺酸 (MES),pH 为约 5.6。发芽培养基用琼脂或植物凝胶 (phytagel) 固化。培养在 25°C ±1°C 和光照下进行,16h 光照 (100 μ mol/m²S)/8h 避光循环。

[0026] 将外植体在愈伤组织形成培养基中避光培养约 2 周至约 3 周,优选约 3 周。愈伤组织形成培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖以及作为植物激素的 6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 和 1-萘乙酸 (NAA)。柠檬酸的浓度为约 10mg/L 至约 30mg/L,优选约 10mg/L。谷氨酰胺的浓度为约 150mg/L 至约 200mg/L,优选约 150mg/L。酪蛋白水解物的浓度为约 100mg/L。蔗糖的浓度为约 3%。6-BA 的浓度为约 1.5mg/L。NAA 的浓度为约 0.05mg/L。愈伤组织形成培养基优选还包含 MgCl₂,其浓度为约 0.5g/L 至约 0.95g/L,优选 0.5g/L。愈伤组织形成培养基的 pH 为约 5.8 至约 6.0。愈伤组织形成培养基用琼脂或植物凝胶 (phytagel) 固化,优选植物凝胶,其浓度为约 2.5g/L 至约 3g/L,优选 2.5g/L。

[0027] 然后将愈伤组织转移到第一枝条再生培养基,并在光照条件下培养约 2 周至约 3 周,优选约 3 周。第一枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、腺嘌呤、蔗糖以及作为植物激素的 6-BA 和 3-吲哚丁酸 (IBA)。柠檬酸、谷氨酰

胺、酪蛋白水解物和 6-BA 的浓度与愈伤组织形成培养基中的相同。腺嘌呤的浓度为约 2mg/L 至约 4mg/L, 优选约 2mg/L。IBA 的浓度为约 0.05mg/L。第一枝条再生培养基优选还包含 $MgCl_2$, 其浓度为约 0.5g/L 至约 0.95g/L, 优选 0.5g/L。第一枝条再生培养基的 pH 为约 5.8 至约 6.0。第一枝条再生培养基用琼脂或植物凝胶固化, 优选植物凝胶, 其浓度为约 2.5g/L 至约 3g/L, 优选 2.5g/L。

[0028] 将从愈伤组织再生的任何枝条转移到第二枝条再生培养基, 并在光照条件下培养约 3 周至约 4 周, 优选约 4 周。第二枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖以及作为植物激素的 6-BA、IBA 和赤霉素 (GA_3)。柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、6-BA 和 IBA 的浓度与第一枝条再生培养基中的相同。 GA_3 的浓度为约 0.05mg/L 至约 0.5mg/L, 优选约 0.5mg/L。第二枝条再生培养基优选还包含浓度为约 0.5g/L 的 $MgCl_2$ 。第二枝条再生培养基的 pH 为约 5.8 至约 6.0。第二枝条再生培养基用琼脂或植物凝胶固化, 优选琼脂, 其浓度为约 6.5g/L 至约 7g/L, 优选 7g/L。

[0029] 将不具有再生的枝条的愈伤组织转移到第三枝条再生培养基, 并在光照条件下培养约 4 周至约 5 周, 优选约 4 周。第三枝条再生培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖以及作为植物激素的 6-BA 和 IBA 以用于枝条的进一步再生。柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、6-BA 和 IBA 的浓度与第一枝条再生培养基中的相同。第三枝条再生培养基优选还包含 $MgCl_2$, 其浓度为约 0.5g/L 至约 0.95g/L, 优选 0.5g/L。第三枝条再生培养基的 pH 为约 5.8 至约 6.0。第三枝条再生培养基用琼脂或植物凝胶固化, 优选植物凝胶, 其浓度为约 2.5g/L 至约 3g/L, 优选 2.5g/L。

[0030] 将在第二枝条再生培养基上再生的枝条转移到枝条伸长培养基, 并在光照条件下培养约 2 周至约 3 周, 优选约 2 周。枝条伸长培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖以及作为植物激素的 6-BA 和 GA_3 以用于伸长和芽增殖。柠檬酸、谷氨酰胺和酪蛋白水解物的浓度与第一枝条再生培养基中的相同。6-BA 的浓度为约 0.3mg/L。 GA_3 的浓度为约 0.1mg/L 至约 0.5mg/L, 优选约 0.1mg/L。枝条伸长培养基的 pH 为约 5.8 至约 6.0。枝条伸长培养基用琼脂或植物凝胶固化, 优选琼脂, 其浓度为约 6.5g/L 至约 7g/L, 优选 7g/L。

[0031] 将伸长的枝条转移到生根培养基, 并在光照条件下培养约 3 周至约 4 周, 优选约 4 周。生根培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、蔗糖和 IBA。蔗糖的浓度为约 3%。IBA 的浓度为约 0.07mg/L。生根培养基的 pH 为约 5.6。生根培养基用琼脂或植物凝胶固化, 优选浓度为约 2.2g/L 的植物凝胶。生根后, 将幼苗转移到土壤中。可选地, 可以利用常规技术将伸长的枝条嫁接到麻风树根状茎, 以代替转移到生根培养基。

[0032] 在第二方面, 本发明提供了一种用于土壤杆菌介导的麻风树植物转化的方法。根据该实施方案, 土壤杆菌介导的麻风树转化利用与上述用于麻风树再生的基本方案相同的基本方案。利用诸如电穿孔的常规技术将含有所关注的 DNA 的载体导入土壤杆菌。在使用前, 利用常规技术培养转化的土壤杆菌细胞。根据一种这样的技术, 将土壤杆菌细胞接种到添加了卡那霉素和羧苄西林 (carbicillin) 的 LB 培养基。卡那霉素的浓度为约 25mg/L 至约 100mg/L, 优选约 50mg/L。羧苄西林的浓度为约 50mg/L 至约 100mg/L, 优选约 100mg/L。使土壤杆菌细胞在 28°C, 250rpm 条件下生长过夜。通过离心收集土壤杆菌细胞, 再将其重悬浮于添加了蔗糖、葡萄糖、乙酰丁香酮 (AS)、6-BA 和 NAA 的液体 MS 培养基中。蔗糖的浓度

为约 30g/L。葡萄糖的浓度为约 10g/L。AS 的浓度为约 20mg/L。6-BA 的浓度为约 1.5mg/L。NAA 的浓度为约 0.05mg/L 至约 0.1mg/L, 优选约 0.1mg/L。

[0033] 为了进行转化, 首先将外植体与土壤杆菌细胞共培养, 然后转移到愈伤组织形成培养基, 随后转移到如上所述的枝条再生培养基、枝条伸长培养基和生根培养基。共培养在避光条件下进行约 2-3 天。共培养培养基包含 MS 无机盐、维生素 B5、柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物、蔗糖、AS 以及作为植物激素的 6-BA 和 NAA。柠檬酸、谷氨酰胺、酪蛋白水解物和蔗糖的浓度与愈伤组织形成培养基中的相同。AS 的浓度为约 20mg/L。6-BA 的浓度为约 1.5mg/L。NAA 的浓度为约 0.05mg/L 至约 0.1mg/L, 优选约 0.05mg/L。共培养培养基还可以包含合适的缓冲液。在一实施方案中, 缓冲液为 MES。MES 的浓度为约 0.5g/L, pH 为约 5.0 至约 5.2。

[0034] 用于土壤杆菌介导的麻风树转化的愈伤组织形成培养基与用于再生的愈伤组织形成培养基相同, 除了它还包含选择剂和土壤杆菌铲除剂。例如下文所述, 选择剂可以为针对包含在转化的土壤杆菌内的标记基因的任何选择剂。在一实施方案中, 选择剂为潮霉素, 其浓度为约 3mg/L 至约 5mg/L, 优选 3.5mg/L。在另一实施方案中, 选择剂为草铵膦, 其浓度为约 1mg/L。土壤杆菌铲除剂可以为任何常规铲除剂, 例如头孢噻肟 (cefotaxime) 等。在一实施方案中, 土壤杆菌铲除剂为头孢噻肟, 其浓度为约 100mg/L 至约 150mg/L, 优选 100mg/L。用于土壤杆菌介导的转化的愈伤组织形成培养基上的培养在避光条件下进行约 2 周至约 3 周, 优选约 3 周。

[0035] 然后如上文所述, 按照麻风树再生的描述处理愈伤组织, 转移到第一枝条再生培养基、第二枝条再生培养基、第三枝条再生培养基、枝条伸长培养基、生根培养基上在光照条件下培养或嫁接。用于土壤杆菌介导的麻风树转化的第一枝条再生培养基与用于再生的第一枝条再生培养基相同, 除了它还包含选择剂和土壤杆菌铲除剂。例如下文所述, 选择剂可以为针对包含在转化的土壤杆菌内的标记基因的任何选择剂。在一实施方案中, 选择剂为潮霉素, 其浓度为约 3mg/L 至约 5mg/L, 优选 3.5mg/L。在另一实施方案中, 选择剂为草铵膦, 其浓度为约 1mg/L。土壤杆菌铲除剂可以为任何常规铲除剂, 例如头孢噻肟。在一实施方案中, 土壤杆菌铲除剂为头孢噻肟, 其浓度为约 100mg/L 至约 150mg/L, 优选 100mg/L。

[0036] 用于土壤杆菌介导的麻风树转化的第二枝条再生培养基与用于再生的第二枝条再生培养基相同, 除了它还包含选择剂和土壤杆菌铲除剂。例如下文所述, 选择剂可以为针对包含在转化的土壤杆菌内的标记基因的任何选择剂。在一实施方案中, 选择剂为潮霉素, 其浓度为约 4mg/L 至约 5mg/L, 优选 4mg/L。在另一实施方案中, 选择剂为草铵膦, 其浓度为约 1mg/L。土壤杆菌铲除剂可以为任何常规铲除剂, 例如头孢噻肟。在一实施方案中, 土壤杆菌铲除剂为头孢噻肟, 其浓度为约 100mg/L 至约 150mg/L, 优选 100mg/L。

[0037] 用于土壤杆菌介导的麻风树转化的第三枝条再生培养基与用于再生的第三枝条再生培养基相同, 除了它还包含选择剂和土壤杆菌铲除剂。例如下文所述, 选择剂可以为针对包含在转化的土壤杆菌内的标记基因的任何选择剂。在一实施方案中, 选择剂为潮霉素, 其浓度为约 3mg/L 至约 5mg/L, 优选 3.5mg/L。在另一实施方案中, 选择剂为草铵膦, 其浓度为约 1mg/L。土壤杆菌铲除剂可以为任何常规铲除剂, 例如头孢噻肟。在一实施方案中, 土壤杆菌铲除剂为头孢噻肟, 其浓度为约 100mg/L 至约 150mg/L, 优选 100mg/L。

[0038] 用于土壤杆菌介导的麻风树转化的枝条伸长培养基和生根培养基与用于再生的

枝条伸长培养基和生根培养基相同。

[0039] 插入麻风树属植物的 DNA (所关注的 DNA) 对于转化方法不重要。通常, 导入植物的 DNA 是构建体的一部分。DNA 可以是所关注的基因, 例如蛋白的编码序列; 或者它可以是能够调节基因表达的序列, 例如反义序列、正义抑制序列或 miRNA 序列。构建体通常包含可操作地连接至所关注的 DNA 的 5' 端和 / 或所关注的 DNA 的 3' 端的调节区。含有所有这些元件的盒在本文中也称为表达盒。在表达盒构建体中, 表达盒还可以含有 5' 前导序列。调节区 (即启动子、转录调节区和翻译终止区) 和 / 或编码信号锚定的多核苷酸对宿主细胞可以是天然的 / 类似的, 或彼此是天然的 / 类似的。可选地, 调节区和 / 或编码信号锚定的多核苷酸对宿主细胞可以是异源的, 或彼此是异源的。参见, 美国专利号 7, 205, 453 和美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。表达盒还可以含有选择标记基因。参见, 美国专利号 7, 205, 453 和美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。

[0040] 通常, 表达盒包含用于选择转化的细胞的选择标记基因。选择标记基因用于选择转化的细胞或组织。通常, 植物选择标记基因通过合适的基因编码抗生素抗性, 所述合适的基因包括至少一组编码抗生素壮观霉素抗性的基因、编码链霉素抗性的链霉素磷酸转移酶 (spt) 基因、编码卡那霉素或遗传霉素抗性的新霉素磷酸转移酶 (nptII) 基因、编码潮霉素抗性的潮霉素磷酸转移酶 (hpt 或 aphiv) 基因、乙酰乳酸合酶 (als) 基因。或者, 植物选择标记基因编码除草剂抗性, 如磺酰脲型除草剂、草铵膦、草甘膦、铵、溴苯腈、咪唑啉酮和 2, 4-二氯苯氧基乙酸 (2, 4-D) 抗性, 所述选择标记基因包括编码诸如膦丝菌素或 basta 的抑制谷氨酰胺合成酶活动的除草剂抗性的基因 (例如 bar 基因)。一般见 WO 02/36782、美国专利号 7, 205, 453 及美国专利申请公开号 2006/0248616 和 2007/0143880, 以及其中引用的那些参考文献。这个选择标记基因的列表不意味着限制。可以使用任何选择标记基因。

[0041] 大量启动子可用于实施本发明。可以基于期望的结果选择启动子。也就是说, 核酸可以与组成型、组织优选型或其他启动子组合以用于在所关注的宿主细胞中表达。这类组成型启动子包括例如, Rsyn7 的核心启动子 (WO 99/48338 和美国专利号 6, 072, 050); 核心 CaMV35S 启动子 (Odell et al., 1985); 稻米肌动蛋白 (McElroy et al., 1990); 泛素 (Christensen and Quail, 1989 和 Christensen et al., 1992); pEMU (Last et al., 1991); MAS (Velten et al., 1984); ALS 启动子 (美国专利号 5, 659, 026) 等。其他组成型启动子包括例如, 在美国专利号 5, 608, 149、5, 608, 144、5, 604, 121、5, 569, 597、5, 466, 785、5, 399, 680、5, 268, 463 和 5, 608, 142 中公开的那些启动子。

[0042] 其他启动子包括诱导型启动子, 尤其是病原体诱导型启动子。这类启动子包括来自致病相关蛋白 (PR 蛋白) 的那些启动子, 其在病原体感染后被诱导; 例如, PR 蛋白、SAR 蛋白、 β -1, 3-葡聚糖酶、壳多糖酶等。其他启动子包括在病原体感染部位或其附近局部表达的那些启动子。在其他实施方案中, 启动子可以是创伤诱导型启动子。在其他实施方案中, 可以通过应用外源化学调节物以使用化学调控的启动子来调节植物中基因的表达。启动子可以是化学诱导型启动子, 其中化学药品的应用诱导基因表达; 或化学抑制型启动子, 其中化学药品的应用抑制基因表达。此外, 可以使用组织优选型启动子来靶向特定植物组织中所关注的多核苷酸的增强表达。这些启动子中的每一种描述于美国专利号 6, 506, 962、6, 575, 814、6, 972, 349 和 7, 301, 069 以及美国专利申请公开号 2007/0061917 和 2007/0143880。

[0043] 在合适情况下,可以优化所关注的 DNA 以增加在转化的植物中的表达。也就是说,可以使用植物优选的密码子来合成编码序列以提高表达。本领域提供合成植物优选基因的方法。参见,例如美国专利号 5,380,831、5,436,391 和 7,205,453 以及美国专利申请公开号 2006/0218670 和 2006/0248616。

[0044] 除非另外指出,本发明的实施使用以下常规技术:化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA、遗传学、免疫学、细胞生物学、细胞培养和转基因生物学,这都在本领域技术范围内。参见,例如 Maniatis et al.,1982, *Molecular Cloning*(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook et al.,1989, *Molecular Cloning*,2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Sambrook and Russell,2001, *Molecular Cloning*,3rd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Ausubel et al.,1992), *Current Protocols in Molecular Biology*(John Wiley & Sons, 包括目前的更新); Glover,1985, *DNA Cloning*(IRL Press, Oxford); Russell,1984, *Molecular biology of plants:a laboratory course manual*(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.); Anand, *Techniques for the Analysis of Complex Genomes*, (Academic Press, New York,1992); Guthrie and Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*(Academic Press, New York,1991); Harlow and Lane,1988, *Antibodies*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York); Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames & S. J. Higgins eds.1984); Transcription And Translation(B. D. Hames & S. J. Higgins eds.1984); Culture Of Animal Cells(R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc.,1987); Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning*(1984); the treatise, *Methods In Enzymology*(Academic Press, Inc., N.Y.); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155(Wu et al.eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*(Mayer and Walker, eds., Academic Press, London,1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV(D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.,1986); Riott, *Essential Immunology*,6th Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford,1988; Fire et al., *RNA Interference Technology:From Basic Science to Drug Development*, Cambridge University Press, Cambridge,2005; Schepers, *RNA Interference in Practice*, Wiley-VCH,2005; Engelke, *RNA Interference(RNAi):The Nuts & Bolts of siRNA Technology*, DNA Press,2003; Gott, *RNA Interference,Editing, and Modification:Methods and Protocols*(Methods in Molecular Biology), Human Press,Totowa,NJ,2004; Sohail, *Gene Silencing by RNA Interference:Technology and Application*, CRC,2004。

实施例

[0045] 本发明参考下列实施例进行描述,提供所述实施例是为了说明而不是意图以任何方式限制本发明。使用本领域公知的标准技术或下文具体描述的技术。

[0046] 实施例 1 材料和方法

[0047] 植物材料和培养法:麻风树(L.)MD种子获得自印度尼西亚。除去外种皮后,将种仁用75%(v/v)乙醇表面灭菌60秒,随后浸入10%(v/v)H₂O₂中1h,然后用无菌水淋洗两次,最后于28℃下在避光条件下浸入无菌水中过夜。使不含胚乳的胚在无激素的半浓度Murashige和Skoog盐(1/2MS)培养基(Murashige and Skoog,1962)上发芽,并在组织培养室中于25℃±2℃、16h光照(100 μmol/m²S)/8h避光循环条件下培养,其中根与培养基接触,所述培养基含有维生素B5(Gamborg et al.,1968)、5g/L蔗糖、0.5g/L2-(4-吗啉代)乙磺酸(MES)和2.2g/L植物凝胶(Sigma),pH 5.6。

[0048] 培养基:本发明使用的培养基如下所示。

[0049] 培养基I(基础培养基):使用MS主要盐、MS次要盐和维生素B5、10mg/L柠檬酸、150mg/L谷氨酰胺、100mg/L酪蛋白酶促水解物、3%(w/v)蔗糖、0.5g/L MgCl₂(只用于含有植物凝胶的培养基)与植物生长调节剂的组合。用1N KOH将培养基I调节为pH 5.8-6.0,用2.5g/L植物凝胶固化,并在121℃下高压灭菌20分钟。在添加到高压灭菌的培养基之前,将所有植物生长调节剂过滤灭菌。

[0050] 共培养培养基:基础培养基加20mg/L乙酰丁香酮(AS)、0.5g/L MES、1.5mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)和0.05mg/L 1-萘乙酸(NAA),pH 5.0-5.2。

[0051] 愈伤组织形成培养基:基础培养基加1.5mg/L 6-BA、0.05mg/L NAA、作为植物转化选择剂的3.5mg/L潮霉素(hyg, A.G scientific, SanDiego, CA)或用于清除土壤杆菌(Agrobacteria)细胞的1mg/L草铵膦(BASTA,Crescent Chemical,NY)和100mg/L头孢噻肟(Cef)。

[0052] 枝条再生培养基I:基础培养基加1.5mg/L 6-BA、0.05mg/L 3-吲哚丁酸(IBA)、2mg/L腺嘌呤(腺嘌呤半硫酸盐,SIGMA)、3.5mg/L Hyg或1mg/L草铵膦和Cef 100mg/L。

[0053] 枝条再生培养基II:基础培养基加1.5mg/L 6-BA、0.05mg/L IBA、0.5mg/L赤霉酸(GA₃)、4mg/L Hyg或1mg/L草铵膦和100mg/L Cef 100,将植物凝胶变为7g/L琼脂。

[0054] 枝条再生培养基III:基础培养基加1.5mg/L 6-BA、0.05mg/L IBA、3.5mg/L Hyg或1mg/L草铵膦和100mg/L Cef。

[0055] 枝条伸长培养基:基础培养基加0.3mg/L 6-BA、0.1mg/L GA₃,将植物凝胶变为7g/L琼脂。

[0056] 生根培养基:MS主要盐、MS次要盐和维生素B5、3%蔗糖、0.5g/LMES、0.07mg/L IBA、2.2g/L植物凝胶,pH5.6。

[0057] 培养基II:液体MS培养基,添加了10g/L葡萄糖、0.5g/L MES、20mg/L AS、1.5mg/L 6-BA、0.1mg/L NAA,pH 5.0-5.2。

[0058] RNA提取和分析:将新鲜叶或种子组织(100mg)在液氮中研磨,并用植物RNA纯化试剂(Invitrogen)提取。利用Nanodrop(Thermo,USA)测量RNA浓度。DNase处理和逆转录(RT)反应按照(Qu et al.,2007)所述进行。

[0059] 土壤杆菌菌株和载体:通过对麻风树属种子cDNA文库测序来鉴定麻风树WRINKLE1(JcWRI1)和DGAT1序列。JcWRI1全长cDNA从麻风树种子第一链cDNA产物扩增,所用的两条引物:5'-AATCGGATCCTAATGAAGAGGTCTTCTGCT-3'(SEQ ID NO:1)和5'-TCATGTTAATT AATCAAACAGAATAGTTACAAGAAA-3'(SEQ ID NO:2)(下划线的核苷酸为酶识别位点)。再将PCR产物插入用BamHI和PacI处理的pBA002-MYC载体以形成

pBA002-MYC-JcWRI1。JcDGAT1 全长 cDNA 从麻风树种子第一链 cDNA 产物扩增,所用的两条引物:5'-CAATATCTAGACCATGACGATTTTGGAGACCACT-3'(SEQ ID NO:3)和5'-TATTAGATCTGGTCTTAATTCAGCATTGCC-3'(SEQ ID NO:4)(下划线的核苷酸为酶识别位点)。再将 PCR 产物插入用 XbaI 和 BamHI 处理的 pBA002-HA 载体以形成 pBA002-JcDGAT1-HA。RcFAH12 全长 cDNA 从蓖麻子种子第一链 cDNA 产物扩增,所用的两条引物:5'-CAATATCTAGACCATGGGAGGTGGTGGTC-3'(SEQ ID NO:5)和5'-TGTAGGATCCGGATACTTGTTCGGTACCAG-3'(SEQ ID NO:6)(下划线的核苷酸为酶识别位点)。再将 PCR 产物插入用 XbaI 和 BamHI 处理的 pBA002-HA 载体以形成 pBA002-RcFAH12-HA。通过电穿孔(BIO-RAD, CA, USA)将载体导入土壤杆菌菌株 AGL1。使用转化的土壤杆菌细胞接种液体 LB 培养基,并在 28°C, 250rpm 条件下生长过夜至最终 OD₅₉₅ = 0.7-1,所述培养基添加了 50mg/L 卡那霉素(用于 pCAMBIA 1300-GFP)或 50mg/L 壮观霉素(spectimycin)(用于 pBA002-MYC-WRI 1, pBA002-JcDGAT1-HA, pBA002-RcFAH12-HA)和 100mg/L 羧苄西林。通过在 20°C 下以 4200rpm 离心 10min 来收集土壤杆菌细胞。在共培养前,将细胞沉淀用培养基 II 重悬浮,并调节至 OD₅₉₅ 为 0.25-0.35(仅土壤杆菌 AGL1)。

[0060] 麻风树叶子 DNA 的分离和基因型分析:将 50mg 新鲜麻风树叶子在液氮中破碎,并在添加 400 μL CTAB 提取缓冲液(100mM Tris, pH 8.0; 1.4M NaCl; 20mM EDTA; 2% 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB))后在 65°C 下孵育 1 小时。用预冷的氯仿提取两次后,将 DNA 用异丙醇沉淀并通过离心收集。对于潮霉素基因基因型分析,所用的引物为 hyg5:5'-CGATGTAGGAGGGCGTGG-3'(SEQ ID NO:7), hyg3:5'-ACTTCTACACAGCCATCGGTCC-3'(SEQ ID NO:8)。对于 bar 基因基因型分析,所用的引物为 bar5:5'-GTCTGCACATCGTCAACC-3'(SEQ ID NO:9), bar3:5'-GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC-3'(SEQ ID NO:10)。

[0061] 抗体和蛋白凝胶印迹分析:由 Yin Zhongcao 博士的实验室制备麻风树毒蛋白抗体。按照先前的描述(Qu et al., 2007)进行蛋白印迹分析。通过 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳来分离总植物蛋白。使用 ECL 过氧化物酶偶联的驴抗兔免疫球蛋白 G 作为二抗。使用 ECL 蛋白印迹检测试剂(GE healthcare)将免疫反应性条带显影。

[0062] 实施例 2 麻风树子叶外植体转化

[0063] 图 1 示出土壤杆菌介导的麻风树属转化方法,其在本实施例中进一步详细描述。图 2 示出用于本实施例的土壤杆菌转化载体。

[0064] 共培养:将 5-7 天龄幼苗的子叶(实施例 1;图 3A)切成小块(5×5mm),并用载有靶表达盒的土壤杆菌细胞(实施例 1)在 20ml 培养基 II 中于 25°C 下孵育 10-20min。然后将外植体转移到共培养培养基,在 22°C 下避光保持 2-3 天。共培养后,将外植体用无菌水淋洗若干次,之后用 300mg/L 头孢噻肟(cefotaxime)洗涤一次。将子叶组织吸水干燥,这通过将它们置于灭菌的纸垫上去除过量的表面水完成。

[0065] 潮霉素抗性或草铵膦抗性愈伤组织的选择:共培养后,将外植体接种于愈伤组织形成培养基板上,并转移到避光条件,在 25°C ± 1°C 下保持 3 周。未转化和转化的外植体形成愈伤组织(图 3B),而一些在培养时形成愈伤组织(图 3B,右栏;图 3C)。当在避光条件下培养时,未转化的外植体通常会变为褐色。

[0066] 枝条再生:将具有新出现的潮霉素抗性或草铵膦抗性愈伤组织的外植体转移到枝条再生培养基 I,在 25°C、16h 光照(100 μmol/m²S¹)/8h 避光循环条件下保持 3 周。本文描述的方法基于通过添加腺嘌呤从转化的愈伤组织的直接枝条诱导。而本文使用术语“再

生”来描述从这类转化的愈伤组织的完整植物的再创造 (re-creation)。尽管 6-BA (6-苄基腺嘌呤) 对枝条再生具有类似的作用,但在本文所述方法中其并不用于这一特定步骤。此外,更高或更低的浓度,过早或过迟的腺嘌呤添加会使枝条再生更困难或异常的发芽 (shooting)。在替代性实施方案中,获得枝条再生的方法包括添加 2mg/L 加普通 6-BA 或其他腺嘌呤衍生物,例如 2-异戊烯腺嘌呤。在这个时间段中,将从愈伤组织再生的任何枝条 (约 40-50%) 转移到枝条再生培养基 II (图 3D)。将不具有再生的枝条的愈伤组织转移到枝条再生培养基 III,以用于枝条的进一步培养和再生。

[0067] 枝条伸长:4 周后,将再生的枝条转移到枝条伸长培养基上以用于伸长和芽增殖 (图 3E)。

[0068] 生根:将长度为约 2.5cm 的伸长的枝条根植于生根培养基 (图 3F)。通常需要超过 1 个月来获得如图 3F 所示的根。我们的生根方案可以提供约 45% 的高生根效率 (图 3G), 并且长度大于 10mm 的一个主根可以成功转移到土壤中并获得大于 90% 的存活率 (图 3H)。

[0069] 嫁接:还可以将伸长的转基因枝条用作接穗来嫁接到非转基因根状茎。挑选健康和生长旺盛的麻风树植株作为根状茎。将接穗和根状茎切至形成层区,从而来自这两者的韧皮组织会在接合后连接。用封口膜 (parafilm) 缠绕嫁接接头 (joint),并用胶带固定。将嫁接的麻风树植株在弱光强度 (28°C、16h 光照 (50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{S}^1$)/8h 避光循环) 和 85% 湿度条件下保持 7 天。嫁接到非转基因根状茎上的转基因麻风树枝条示于图 3I 和 3J。转基因麻风树植株在温室中表现出正常的开花和结籽 (图 3K)。

[0070] 实施例 3 转基因麻风树的转化和分析

[0071] 利用本发明方法转化麻风树属以及从转化的细胞再生 BASTA 或潮霉素 (hygmycin) 植株的实施例将在下文详细描述。简单来说,该方法要求提供异源 DNA 构建体,其包含植物启动子、编码赋予诸如 BASTA 或潮霉素耐受性的选择优势的蛋白的 DNA 序列以及 3' 非翻译转录终止子区。DNA 构建体包含可操作地连接到编码赋予 BASTA 或潮霉素耐受性的蛋白的 DNA 编码区的植物启动子,和 3' 终止信号。优选地, DNA 构建体编码额外的所关注的基因。例如, DNA 构建体可以包含这样的基因,其表达导致转化的植物中增加的产量或改变的脂肪酸含量。

[0072] 在下面的实例中,从用包含 GFP 基因的 DNA 构建体转化的组织获得了表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的潮霉素耐受麻风树属植物。在如下所述的一些实例中,使用这种 GFP 基因和可以用作容易筛选的标记的其他基因,例如 GUS、萤光素酶基因,仅仅因为可以容易地在转化的植物中检测到它们的表型。可以合理的预期通过使用标准分子生物学技术产生的 DNA 构建体,可以使用本发明来获得表达几乎任何其他基因的麻风树属植物。在替代性实施方案中,用于获得转化的麻风树属植物的方法涉及两种 DNA 构建体的共转化,其中一种 DNA 构建体包含选择标记,例如 BASTA 或潮霉素耐受标记;而另外一种 DNA 构建体则包含所关注的基因。

[0073] 潮霉素抗性的推定 (putative) GFP 转基因麻风树属植物的转化和枝条再生根据实施例 2 描述的方法实现。利用实施例 1 描述的方法提取潮霉素抗性枝条的基因组 DNA。利用潮霉素基因引物对 (SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:8) 进行基因型分型。10 个事件中的 9 个是 PCR 阳性的,而非转化对照在 CK 泳道没有表现出条带 (图 4)。当用紫外光激发转基因麻风树属根时,快速筛选 GFP 表达 (图 3B)。荧光表示,该新导入的 GFP 表达盒在 T₀ 麻风

树属植物中表达。在 ubi:GFP 转基因麻风树属开花后,我们检查了花序中的 GFP 表达。雄花特别是花粉具有一些弱绿色荧光(图 5H)。我们还检查了受精后 3 周的种子中的 GFP 表达。在整个转基因 T₁ 种子中,从外部(图 5N,图 5O)或内部(图 5P)可以观察到强 GFP 表达。这表明在转基因麻风树属的后代种子中 GFP 也较好地表达。

[0074] 甘油三酯 (TAG) 是植物将太阳能转化为化学能后主要能量储存形式。但当植物使用糖酵解的变体作为中间产物时,其合成的标准生化途径被认为是相当浪费的。WRINKLED1 (WRI1) 是 AP2/EREB 家族的转录因子,其对种子保存过程的更具体方面,特别是糖变体的转录控制转化为 TAG 具有影响,因此在控制种子油含量方面表现出非常重要的作用。花椰菜花叶病毒 35S 启动子控制下的拟南芥 (*Arabidopsis*) WRI1 cDNA 表达导致种子油含量的 10-20% 增加。此外, WRINKLED1 cDNA 的异位表达导致发育幼苗中甘油三酯的积累 (Cernac and Benning, 2004)。我们认为,麻风树属 WRI1 基因在麻风树属中的异位表达会导致更高的含油量。此外,当供应糖时,转基因幼苗可以发育为胚或胚样产油器官,就像脂质反应器,可以为其供应含糖液体底物以用于营养器官中组成型 CaMV 35S 启动子-驱动的 WRI1 的强表达。

[0075] 我们克隆了麻风树属 WRI1 的全长 cDNA (JcWRI1), 其从麻风树属种子 RT-PCR 产物 PCR 扩增,这使用了用于源自麻风树属种子 cDNA 文库测序的 JcWRI1 克隆序列的 PCR 引物 (SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO :2)。全长 JcWRI1 cDNA 序列示于 SEQ ID NO :11。构建了具有受 CaMV 35S 启动子控制的 JcWRI1 cDNA 的过表达载体 (pBA002-MYC-JcWRI1), 并将其转化入土壤杆菌 AGL1 菌株。可以利用 MYC 标签抗体来检测预计的 6×MYC 标签融合 WRI1。BASTA 抗性的推定 JcWRI1 过表达转基因麻风树属植物的转化和枝条再生根据实施例 2 描述的方法实现。利用实施例 1 描述的方法提取潮霉素抗性枝条的基因组 DNA。利用 BASTA 基因引物对 (SEQ ID NO :9 和 SEQ ID NO :10) 进行基因型分析。我们测试的所有事件都是 PCR 阳性的,而非转化对照在 CK 中没有表现出条带(图 6)。

[0076] 植物和动物二酰甘油酰基转移酶 (DGAT) 负责将新生脂肪酸包装入 TAG,其随后在从内质网出芽 (bud off) 的油体中积累。已经证实植物 1 型 DGAT (DGAT1) 基因对于种子的含油量有重要贡献,这通过过表达和突变下调研究均得到证实 (Zou et al., 2001; Jako et al., 2001)。我们认为,麻风树属 DGAT1 基因在麻风树属中的异位表达会导致更高水平的含油量。

[0077] 我们根据 DGAT1 克隆序列,利用 PCR 引物 (SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4), 从麻风树属种子 RT-PCR 产物克隆了全长麻风树属 DGAT1 cDNA。全长 JcDGAT1 cDNA 序列示于 SEQ ID NO :13。构建具有受 CaMV 35S 启动子控制的 JcDGAT1 cDNA 的过表达载体 (pBA002-JcDGAT1-HA), 并将其转化入土壤杆菌 AGL1 菌株。可以利用 HA 标签抗体来检测预计的 3×HA 标签融合 DGAT1。BASTA 抗性的推定 JcDGAT1 转基因麻风树属植物的转化和枝条再生根据实施例 2 描述的方法实现。利用实施例 1 描述的方法,通过基于 HA 抗体的蛋白印迹证实了 35S-JcDGAT1 表达(图 7)。在 3 个转基因麻风树属泳道的 2 条泳道中可以观察到 HA 特异性条带。

[0078] 在植物来源的工业原料的许多情况和应用中可以使用植物油(和它们的衍生物)。与不可再生的石油相比,可再生的性质使得它们对于环境关注是个问题的全损耗应用的许多工业应用特别具有吸引力。蓖麻 (*Ricinus communis*) 油在运输、化妆品和医药以及

制造工业中有很多应用。蓖麻油含有超过 90% 的蓖麻油酸, 其是单不饱和的 18 碳脂肪酸。它是不寻常的, 因为它在第十二碳上具有羟基功能团。这个功能团造成蓖麻油酸 (和蓖麻油) 不寻常的极性 (http://en.wikipedia.org/wiki/Castor_oil)。一种特定的酶: 脂肪酸羟化酶 12 (FAH12) 负责加入羟基以代替正常的 FAD2 功能来在第十二碳上引入不饱和带 (van de Loo et al., 1995)。与缺乏羟基的其他种子油相比, 蓖麻油的价格更高。尽管对蓖麻油的需求广泛, 但是该作物的种植受到限制, 这是由于毒素 (蓖麻毒蛋白) 和变应原性蛋白的存在, 因此蓖麻油的成本是比较高的。转基因外源 FAH12 可以在拟南芥种子中产生羟基蓖麻油 (Lu et al., 2006)。我们认为, 蓖麻子 FAH12 基因在麻风树属中的异位表达会引起蓖麻油的产生。

[0079] 我们根据 FAH12 CDS 序列, 利用 PCR 引物 (SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6), 从蓖麻子种子 RT-PCR 产物克隆了全长蓖麻子 FAH12 cDNA (RcFAH12)。全长 RcFAH12 cDNA 序列示于 SEQ ID NO:15。构建了具有受 CaMV 35S 启动子控制的 RcFAH12 cDNA 的过表达载体 (pBA002-RcFAH12-HA), 并将其转化入土壤杆菌 AGL1 菌株。可以利用 HA 标签抗体来检测预计的 3×HA 标签融合 RcFAH12。BASTA 抗性的推定 RcFAH12 转基因麻风树属植物的转化和枝条再生根据实施例 2 描述的方法实现。利用实施例 1 描述的方法, 通过基于 HA 抗体的蛋白印迹证实了 35S-RcFAH12 表达。在 7 个转基因麻风树属泳道的 5 条泳道中可以观察到 HA 特异性条带 (图 7)。两个泳道 #2 和 #5, 具有非常高的 FAH12-HA 融合表达蛋白水平。

[0080] 在描述本发明的背景 (尤其是所附权利要求的背景) 下, 术语“一个 (a)”和“一个 (an)”及“这个 (the)”以及类似的所指对象的使用应理解为包括单数和复数, 除非在本文中另外指出或根据背景明显抵触。除非另作说明, 术语“包括”、“具有”、“包含”和“含有”应理解为开放式的术语 (即, 表示“包括但不限于”)。除非本文另外指出, 本文数值范围的描述仅旨在作为分别涉及属于所述范围中的每个单独值的简写方法, 每个单独值被包括进说明书就如同它是在本文中单独描述的。例如, 如果公开了范围 10-15, 那么 11、12、13 和 14 也被公开。本文描述的所有方法可以按照任何合适的顺序进行, 除非本文另外指出, 或另外根据背景明显抵触。除非另有要求, 本文提供的任何和所有实例或示例性语言 (如, “例如”) 的使用仅仅是为了更好地说明本发明, 而不是为了给本发明的范围做出限制。说明书中没有语言应理解为指示任何未要求的要素是实施本发明必需的。

[0081] 应理解本发明的方法和组合物可以并入各种形式的实施方案, 本文只公开了其中一些。本文描述了本发明的实施方案, 包括本发明人已知用于实施本发明的最佳方式。在阅读上述说明书后, 这些实施方案的变化对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。本发明人预期有经验的技术人员酌情使用这样的变化, 并且本发明人认为可以在除本文的具体描述之外实施本发明。因此, 本发明包括适用法律许可的所附权利要求中叙述的主题的所有修饰和等同物。此外, 本发明包括上述元素以其所有可能变化的任何组合, 除非本文另外指出, 或根据背景明显抵触。

[0082] 文献目录

[0083] Cernac, A. and Benning, C. (2004). WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J* 40 :575-585.

[0084] Gamborg, O. L. et al. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures

of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50 :151-158.

[0085] Jako, C. et al. (2001). Seed-specific over-expression of an *Arabidopsis* cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol* 126 :861-874.

[0086] Jones, N. M. J. (1991). *Jatropha curcas*-a multipurpose species for problematic sites. *Land Resources Series 1* :1-12.

[0087] Li, M. L. H. et al. (2008). Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 92 :173-181.

[0088] Lu, C. et al. (2006). A high-throughput screen for genes from castor that boost hydroxy fatty acid accumulation in seed oils of transgenic *Arabidopsis*. *Plant J* 45 :847-856.

[0089] Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15 :473-497.

[0090] Narayana, D. S. A et al. (2007). Distinct Begomoviruses Closely Related to Cassava Mosaic Viruses cause Indian *Jatropha* Mosaic Disease. *Int' l J Virol* 3 : 1-11.

[0091] Qu, J. et al. (2007). Artificial microRNA-mediated virus resistance in plants. *J Virol* 81 :6690-6699.

[0092] Sujatha, M. et al. (2008). Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnol Adv* 26 :424-435.

[0093] van de Loo, F. J. et al. (1995). An oleate 12-hydroxylase from *Ricinus communis* L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 6743-6747.

[0094] Zou, J. et al. (1999). The *Arabidopsis thaliana* TAG1 mutant has a mutation in a diacylglycerol acyltransferase gene. *Plant J* 19 :645-653.

[0001]

序列表

- <110> 淡马锡生命科学研究院有限公司
- <120> 麻风树的遗传转化
- <130> FP4894
- <150> US 61/122,454
- <151> 2008-12-15
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> *Jatropha curcas*
- <400> 1
aatcggatcc taatgaagag gtcttctgct 30
- <210> 2
- <211> 36
- <212> DNA
- <213> *Jatropha curcas*
- <400> 2
tcatgttaat taatcaaaca gaatagttac aagaaa 36
- <210> 3
- <211> 34
- <212> DNA
- <213> *Jatropha curcas*
- <400> 3
caatatctag accatgacga ttttgagac cact 34
- <210> 4
- <211> 30
- <212> DNA
- <213> *Jatropha curcas*
- <400> 4
tattagatct ggtcttaatt cagcattgcc 30
- <210> 5
- <211> 29
- <212> DNA
- <213> *Ricinus communis*
- <400> 5
caatatctag accatgggag gtggtggtc 29
- <210> 6
- <211> 31
- <212> DNA
- <213> *Ricinus communis*
- <400> 6
tgtaggatcc ggatacttgt tccggtacca g 31
- <210> 7
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> *Escherichia coli*
- <400> 7
cgatgtagga gggcgtgg 18

[0002]

```

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 8
acttctacac agccatcggg cc 22

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 9
gtctgcacca tcgtcaacc 19

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Streptomyces hygroscopicus

<400> 10
gaagtcagc tgccagaaac 20

<210> 11
<211> 1251
<212> DNA
<213> Jatropha curcas

<220>
<221> CDS
<222> (1).. (1251)

<220>
<221> misc feature
<222> (518).. (518)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> misc feature
<222> (792).. (792)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 11
atg aag agg tct tct gct tca tct tgc tct tct tct tct tct tct tct 48
Met Lys Arg Ser Ser Ala Ser Ser Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
1 5 10 15

tct tct cca tcc tct tct tgc tct tct gct tgt tct gct tgc tct tct 96
Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser
20 25 30

tgc tta gat tca gta tct cct cct aat cac cat caa tta cga tca gag 144
Cys Leu Asp Ser Val Ser Pro Pro Asn His His Gln Leu Arg Ser Glu
35 40 45

aaa tca aaa tcc aaa cgc att cga aaa att caa acc aag caa gat aaa 192
Lys Ser Lys Ser Lys Arg Ile Arg Lys Ile Gln Thr Lys Gln Asp Lys
50 55 60

tgt cag act aca gct act acc acc agt cca agc ggc ggc ggt agg aga 240
Cys Gln Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ser Pro Ser Gly Gly Gly Arg Arg
65 70 75 80

agc tcc att tac aga gga gtc acc cgg cat aga tgg act gga agg ttt 288
Ser Ser Ile Tyr Arg Gly Val Thr Arg His Arg Trp Thr Gly Arg Phe
85 90 95

gaa gct cat ctt tgg gat aag agt tct tgg aat aac att caa aac aag 336
Glu Ala His Leu Trp Asp Lys Ser Ser Trp Asn Asn Ile Gln Asn Lys
100 105 110

```

[0003]

aaa gga agg caa gtt tat ttg ggg gct tac gac aat gag gaa gca gct Lys Gly Arg Gln Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Asn Glu Glu Ala Ala	384
gct cat acc tat gat ctt gct gct ctc aag tac tgg gga caa gac acc Ala His Thr Tyr Asp Leu Ala Ala Leu Lys Tyr Trp Gly Gln Asp Thr	432
act ttg aat ttt ccg ata gag aca tac tca aag gag ctt gaa gag atg Thr Leu Asn Phe Pro Ile Glu Thr Tyr Ser Lys Glu Leu Glu Glu Met	480
caa aag atg agc aag gaa gag tac tta gca tct ctt cna cgg aga agc Gln Lys Met Ser Lys Glu Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Xaa Arg Arg Ser	528
agt gga ttt tca aga gga gtt tct aag tac cgg gga gta gct agg cat Ser Gly Phe Ser Arg Gly Val Ser Lys Tyr Arg Gly Val Ala Arg His	576
cat cac aat ggc cgg tgg gaa gct cga att ggc cgg gtt ttt ggc aat His His Asn Gly Arg Trp Glu Ala Arg Ile Gly Arg Val Phe Gly Asn	624
aag tat ctc tac ctc gga act tac aat aca caa gaa gag gca gca gca Lys Tyr Leu Tyr Leu Gly Thr Tyr Asn Thr Gln Glu Glu Ala Ala Ala	672
tat gat atg gca gca ata gag tac aga gga gca aat gca gta acc aat Tyr Asp Met Ala Ala Ile Glu Tyr Arg Gly Ala Asn Ala Val Thr Asn	720
ttt gat gtc agc cat tac ata gac cgt ttg aag aag aaa ggc att cct Phe Asp Val Ser His Tyr Ile Asp Arg Leu Lys Lys Lys Gly Ile Pro	768
tta gat aaa atc cta cca gaa acn ctt tct aaa ggc tca aaa gag tca Leu Asp Lys Ile Leu Pro Glu Thr Leu Ser Lys Gly Ser Lys Glu Ser	816
gaa gaa atc gag cga acc tca ccc tta ccg ttg cca tca cca cca tca Glu Glu Ile Glu Arg Thr Ser Pro Leu Pro Leu Pro Ser Pro Pro Ser	864
cca tca ata aca cca tta cac gaa gaa ata gtc tca cca cag ctg ctt Pro Ser Ile Thr Pro Leu His Glu Glu Ile Val Ser Pro Gln Leu Leu	912
gaa act gaa tgc cca caa cat cct cca tgt atg gat act tgt act atg Glu Thr Glu Cys Pro Gln His Pro Pro Cys Met Asp Thr Cys Thr Met	960
atc gtt atg gac cct ata gaa gag cac gag ctt act tgg agc ttc tgt Ile Val Met Asp Pro Ile Glu Glu His Glu Leu Thr Trp Ser Phe Cys	1008
ctc gat tcg ggg tta gtt ccg ctc cct gtg cct gac cta cca cta gca Leu Asp Ser Gly Leu Val Pro Leu Pro Val Pro Asp Leu Pro Leu Ala	1056
aat ggc tgt gag tta cca gac ttg ttg gat gac aca ggc ttt gaa gac Asn Gly Cys Glu Leu Pro Asp Leu Leu Asp Asp Thr Gly Phe Glu Asp	1104
aat att gac ttg ata ttt gat gct tgt tgc ttc gga aat gat gcc aac Asn Ile Asp Leu Ile Phe Asp Ala Cys Cys Phe Gly Asn Asp Ala Asn	1152
cct gca gat gag aat ggg aaa gag agg ttg tct tcc gct tca act tct Pro Ala Asp Glu Asn Gly Lys Glu Arg Leu Ser Ser Ala Ser Thr Ser	1200
cca tct tgt tcc aca aca tta act tct gtt tct tgt aac tat tct gtt Pro Ser Cys Ser Thr Thr Leu Thr Ser Val Ser Cys Asn Tyr Ser Val	1248
tga	1251

[0004]

<210> 12
 <211> 416
 <212> PRT
 <213> *Jatropha curcas*

 <220>
 <221> misc feature
 <222> (173).. (173)
 <223> The 'Xaa' at location 173 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.

 <400> 12
 Met Lys Arg Ser Ser Ala Ser Ser Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 Ser Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Cys Ser Ala Ser Ser Ser
 20 25 30
 Cys Leu Asp Ser Val Ser Pro Pro Asn His His Gln Leu Arg Ser Glu
 35 40 45
 Lys Ser Lys Ser Lys Arg Ile Arg Lys Ile Gln Thr Lys Gln Asp Lys
 50 55 60
 Cys Gln Thr Thr Ala Thr Thr Thr Ser Pro Ser Gly Gly Gly Arg Arg
 65 70 75 80
 Ser Ser Ile Tyr Arg Gly Val Thr Arg His Arg Trp Thr Gly Arg Phe
 85 90 95
 Glu Ala His Leu Trp Asp Lys Ser Ser Trp Asn Asn Ile Gln Asn Lys
 100 105 110
 Lys Gly Arg Gln Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Asn Glu Glu Ala Ala
 115 120 125
 Ala His Thr Tyr Asp Leu Ala Ala Leu Lys Tyr Trp Gly Gln Asp Thr
 130 135 140
 Thr Leu Asn Phe Pro Ile Glu Thr Tyr Ser Lys Glu Leu Glu Glu Met
 145 150 155 160
 Gln Lys Met Ser Lys Glu Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Xaa Arg Arg Ser
 165 170 175
 Ser Gly Phe Ser Arg Gly Val Ser Lys Tyr Arg Gly Val Ala Arg His
 180 185 190
 His His Asn Gly Arg Trp Glu Ala Arg Ile Gly Arg Val Phe Gly Asn
 195 200 205
 Lys Tyr Leu Tyr Leu Gly Thr Tyr Asn Thr Gln Glu Glu Ala Ala Ala
 210 215 220
 Tyr Asp Met Ala Ala Ile Glu Tyr Arg Gly Ala Asn Ala Val Thr Asn
 225 230 235 240
 Phe Asp Val Ser His Tyr Ile Asp Arg Leu Lys Lys Lys Gly Ile Pro
 245 250 255
 Leu Asp Lys Ile Leu Pro Glu Thr Leu Ser Lys Gly Ser Lys Glu Ser

[0005]

ctt agc tct gat gct ata ttt aaa caa agt cat gca ggt ctg ttc aac Leu Ser Ser Asp Ala Ile Phe Lys Gln Ser His Ala Gly Leu Phe Asn 115 120 125	384
ctc tgt ata gta gtg ctt gtt gct gtt aac agc agg ctt atc att gaa Leu Cys Ile Val Val Leu Val Ala Val Asn Ser Arg Leu Ile Ile Glu 130 135 140	432
aat cta atg aag tac ggt tgg tta att aaa acg ggg ttt tgg ttt agt Asn Leu Met Lys Tyr Gly Trp Leu Ile Lys Thr Gly Phe Trp Phe Ser 145 150 155 160	480
tca aga tcg ttg aga gat tgg ccc ctt ctt atg tgc tgt ctt acc ctc Ser Arg Ser Leu Arg Asp Trp Pro Leu Leu Met Cys Cys Leu Thr Leu 165 170 175	528
cct ata ttc tct ctt gcc gcc tat cta gtt gag aag ttg gca tat cga Pro Ile Phe Ser Leu Ala Ala Tyr Leu Val Glu Lys Leu Ala Tyr Arg 180 185 190	576
aaa tat ata tct gca cct att gtt att ttc ttt cat atg ctc att acc Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Ile Val Ile Phe Phe His Met Leu Ile Thr 195 200 205	624
aca aca gca gtt ttg tac cca gtt tct gtg att ctc agt tgt ggg tct Thr Thr Ala Val Leu Tyr Pro Val Ser Val Ile Leu Ser Cys Gly Ser 210 215 220	672
gct gtt ctg tct ggt gtt gca ttg atg ctc ttt gct tgt atc gtg tgg Ala Val Leu Ser Gly Val Ala Leu Met Leu Phe Ala Cys Ile Val Trp 225 230 235 240	720
ttg aaa tta gta tct tat gca cat aca aac tat gac atg aga gcc att Leu Lys Leu Val Ser Tyr Ala His Thr Asn Tyr Asp Met Arg Ala Ile 245 250 255	768
gcc aac tca gct gac aag gga gat gca cta tcc gat act tca ggt gca Ala Asn Ser Ala Asp Lys Gly Asp Ala Leu Ser Asp Thr Ser Gly Ala 260 265 270	816
gat tct tca cgt gat gtt agc ttc aag agt ttg gtc tac ttc atg gtt Asp Ser Ser Arg Asp Val Ser Phe Lys Ser Leu Val Tyr Phe Met Val 275 280 285	864
gct cct acg cta tgt tac cag cca agt tat cct cga aca gat tca gtt Ala Pro Thr Leu Cys Tyr Gln Pro Ser Tyr Pro Arg Thr Asp Ser Val 290 295 300	912
aga aag ggt tgg gtg gtt cgt caa ttt gtc aag tta ata ata ttt aca Arg Lys Gly Trp Val Val Arg Gln Phe Val Lys Leu Ile Ile Phe Thr 305 310 315 320	960
gga ttc atg gga ttt atc ata gaa caa tat atc aat cct att gtc cag Gly Phe Met Gly Phe Ile Ile Glu Gln Tyr Ile Asn Pro Ile Val Gln 325 330 335	1008
aat tca caa cat ccc tta aag ggg gat cta tta tat gcc att gaa agg Asn Ser Gln His Pro Leu Lys Gly Asp Leu Leu Tyr Ala Ile Glu Arg 340 345 350	1056
gtt ttg aag ctc tca gtt cca aac tta tat gtg tgg ctt tgc atg ttc Val Leu Lys Leu Ser Val Pro Asn Leu Tyr Val Trp Leu Cys Met Phe 355 360 365	1104
tac tgc ttt ttt cat cta tgg tta aat ata ctt gct gag ctc ctt cgg Tyr Cys Phe Phe His Leu Trp Leu Asn Ile Leu Ala Glu Leu Leu Arg 370 375 380	1152
ttt ggt gac aga gag ttc tat aaa gat tgg tgg aat gca agg acc gtt Phe Gly Asp Arg Glu Phe Tyr Lys Asp Trp Trp Asn Ala Arg Thr Val 385 390 395 400	1200
gag gag tac tgg aga atg tgg aat atg cct gtt cat aag tgg atg gtt Glu Glu Tyr Trp Arg Met Trp Asn Met Pro Val His Lys Trp Met Val 405 410 415	1248

[0007]

cgc cat atc tac ttt cca tgc ttg cgg cat aaa ata cca agg ggg gta 1296
 Arg His Ile Tyr Phe Pro Cys Leu Arg His Lys Ile Pro Arg Gly Val
 420 425 430

gcc ttg tta att gct ttc ttc gtt tca gct gta ttt cat gag ttg tgc 1344
 Ala Leu Leu Ile Ala Phe Phe Val Ser Ala Val Phe His Glu Leu Cys
 435 440 445

att gct gtt cct tgc cac atg ttc aag ctc tgg gct ttt att gga att 1392
 Ile Ala Val Pro Cys His Met Phe Lys Leu Trp Ala Phe Ile Gly Ile
 450 455 460

atg ttt cag att cca ttg gtc ggg atc act aat tac ctc cag aac aag 1440
 Met Phe Gln Ile Pro Leu Val Gly Ile Thr Asn Tyr Leu Gln Asn Lys
 465 470 475 480

ttc aga agc tcc atg gtg gga aat atg atc ttt tgg ttc att ttc tgc 1488
 Phe Arg Ser Ser Met Val Gly Asn Met Ile Phe Trp Phe Ile Phe Cys
 485 490 495

att ctt ggt caa ccc atg tgt gtg cta ttg tat tat cat gac cta atg 1536
 Ile Leu Gly Gln Pro Met Cys Val Leu Leu Tyr Tyr His Asp Leu Met
 500 505 510

aat cgg aaa ggc aat gct gaa tta aga tga 1566
 Asn Arg Lys Gly Asn Ala Glu Leu Arg
 515 520

<210> 14
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> *Jatropha curcas*
 <400> 14

Met Thr Ile Leu Glu Thr Thr Thr Ser Gly Gly Asp Gly Val Ala Glu
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Leu Asn Val Ser Leu Arg Arg Arg Arg Lys Gly Thr
 20 25 30

Ser Ser Asp Gly Ala Leu Pro Glu Leu Thr Ser Asn Ile Val Glu Leu
 35 40 45

Glu Ser Glu Ser Gly Gly Gln Val Met Met Asp Pro Gly Val Val Thr
 50 55 60

Glu Pro Glu Thr Glu Lys Ile Asn Gly Lys Asp Cys Gly Gly Asp Lys
 65 70 75 80

Asp Lys Ile Asp Asn Arg Glu Asn Arg Gly Arg Ser Asp Ile Lys Phe
 85 90 95

Thr Tyr Arg Pro Ser Val Pro Ala His Arg Ala Leu Arg Glu Ser Pro
 100 105 110

Leu Ser Ser Asp Ala Ile Phe Lys Gln Ser His Ala Gly Leu Phe Asn
 115 120 125

Leu Cys Ile Val Val Leu Val Ala Val Asn Ser Arg Leu Ile Ile Glu
 130 135 140

Asn Leu Met Lys Tyr Gly Trp Leu Ile Lys Thr Gly Phe Trp Phe Ser
 145 150 155 160

Ser Arg Ser Leu Arg Asp Trp Pro Leu Leu Met Cys Cys Leu Thr Leu

[0008]

165					170					175					
Pro	Ile	Phe	Ser	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	Val	Glu	Lys	Leu	Ala	Tyr	Arg
			180					185					190		
Lys	Tyr	Ile	Ser	Ala	Pro	Ile	Val	Ile	Phe	Phe	His	Met	Leu	Ile	Thr
		195					200					205			
Thr	Thr	Ala	Val	Leu	Tyr	Pro	Val	Ser	Val	Ile	Leu	Ser	Cys	Gly	Ser
	210					215					220				
Ala	Val	Leu	Ser	Gly	Val	Ala	Leu	Met	Leu	Phe	Ala	Cys	Ile	Val	Trp
225					230					235					240
Leu	Lys	Leu	Val	Ser	Tyr	Ala	His	Thr	Asn	Tyr	Asp	Met	Arg	Ala	Ile
				245					250					255	
Ala	Asn	Ser	Ala	Asp	Lys	Gly	Asp	Ala	Leu	Ser	Asp	Thr	Ser	Gly	Ala
			260					265					270		
Asp	Ser	Ser	Arg	Asp	Val	Ser	Phe	Lys	Ser	Leu	Val	Tyr	Phe	Met	Val
		275					280						285		
Ala	Pro	Thr	Leu	Cys	Tyr	Gln	Pro	Ser	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asp	Ser	Val
	290					295					300				
Arg	Lys	Gly	Trp	Val	Val	Arg	Gln	Phe	Val	Lys	Leu	Ile	Ile	Phe	Thr
305					310					315					320
Gly	Phe	Met	Gly	Phe	Ile	Ile	Glu	Gln	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ile	Val	Gln
				325					330					335	
Asn	Ser	Gln	His	Pro	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Leu	Tyr	Ala	Ile	Glu	Arg
			340					345					350		
Val	Leu	Lys	Leu	Ser	Val	Pro	Asn	Leu	Tyr	Val	Trp	Leu	Cys	Met	Phe
		355					360					365			
Tyr	Cys	Phe	Phe	His	Leu	Trp	Leu	Asn	Ile	Leu	Ala	Glu	Leu	Leu	Arg
	370					375					380				
Phe	Gly	Asp	Arg	Glu	Phe	Tyr	Lys	Asp	Trp	Trp	Asn	Ala	Arg	Thr	Val
385					390					395					400
Glu	Glu	Tyr	Trp	Arg	Met	Trp	Asn	Met	Pro	Val	His	Lys	Trp	Met	Val
				405					410					415	
Arg	His	Ile	Tyr	Phe	Pro	Cys	Leu	Arg	His	Lys	Ile	Pro	Arg	Gly	Val
			420					425					430		
Ala	Leu	Leu	Ile	Ala	Phe	Phe	Val	Ser	Ala	Val	Phe	His	Glu	Leu	Cys
		435					440					445			
Ile	Ala	Val	Pro	Cys	His	Met	Phe	Lys	Leu	Trp	Ala	Phe	Ile	Gly	Ile
	450					455					460				
Met	Phe	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Leu	Gln	Asn	Lys
465					470					475					480

[0009]

Phe Arg Ser Ser Met Val Gly Asn Met Ile Phe Trp Phe Ile Phe Cys
 485 490 495

Ile Leu Gly Gln Pro Met Cys Val Leu Leu Tyr Tyr His Asp Leu Met
 500 505 510

Asn Arg Lys Gly Asn Ala Glu Leu Arg
 515 520

<210> 15
 <211> 1164
 <212> DNA
 <213> Ricinus communis

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1164)

<400> 15
 atg gga ggt ggt ggt cgc atg tct act gtc ata acc agc aac aac agt 48
 Met Gly Gly Gly Gly Arg Met Ser Thr Val Ile Thr Ser Asn Asn Ser
 1 5 10 15
 gag aag aaa gga gga agc agc cac ctt aag cga gcg ccg cac acg aag 96
 Glu Lys Lys Gly Gly Ser Ser His Leu Lys Arg Ala Pro His Thr Lys
 20 25 30
 cct cct ttc aca ctt ggt gac ctc aag aga gcc atc cca ccc cat tgc 144
 Pro Pro Phe Thr Leu Gly Asp Leu Lys Arg Ala Ile Pro Pro His Cys
 35 40 45
 ttt gaa cgc tct ttt gtg cgc tca ttc tcc tat gtt gcc tat gat gtc 192
 Phe Glu Arg Ser Phe Val Arg Ser Phe Ser Tyr Val Ala Tyr Asp Val
 50 55 60
 tgc tta agt ttt ctt ttc tac tcg atc gcc acc aac ttc ttc cct tac 240
 Cys Leu Ser Phe Leu Phe Tyr Ser Ile Ala Thr Asn Phe Phe Pro Tyr
 65 70 75
 atc tct tct ccg ctc tcg tat gtc gct tgg gtc atc gcc cat gaa tgt ggc 288
 Ile Ser Ser Pro Leu Ser Tyr Val Ala Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly
 85 90 95
 caa gcc tgc att ctc act ggt ctt tgg gtc atc gcc cat gaa tgt ggc 336
 Gln Gly Cys Ile Leu Thr Gly Leu Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly
 100 105 110
 cat cat gct ttt agt gag tat cag ctg gct gat gac att gtt ggc cta 384
 His His Ala Phe Ser Glu Tyr Gln Leu Ala Asp Asp Ile Val Gly Leu
 115 120 125
 att gtc cat tct gca ctt ctg gtt cca tat ttt tca tgg aaa tat agc 432
 Ile Val His Ser Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser
 130 135 140
 cat cgc cgc cac cat tct aac ata gga tct ctc gag cga gac gaa gtg 480
 His Arg Arg His His Ser Asn Ile Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val
 145 150 155 160
 ttc gtc ccg aaa tca aag tcg aaa att tca tgg tat tct aag tac tca 528
 Phe Val Pro Lys Ser Lys Ser Lys Ile Ser Trp Tyr Ser Lys Tyr Ser
 165 170 175
 aac aac ccg cca ggt cga gtt ttg aca ctt gct gcc acg ctc ctc ctt 576
 Asn Asn Pro Pro Gly Arg Val Leu Thr Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu
 180 185 190
 ggc tgg cct tta tac tta gct ttc aat gtc tct ggt aga cct tac gat 624
 Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp
 195 200 205

[0010]

cgc ttt gct tgc cat tat gat ccc tat ggc cca ata ttt tcc gaa aga 672
 Arg Phe Ala Cys His Tyr Asp Pro Tyr Gly Pro Ile Phe Ser Glu Arg
 210 215 220
 gaa agg ctt cag att tac att gct gac ctc gga atc ttt gcc aca acg 720
 Glu Arg Leu Gln Ile Tyr Ile Ala Asp Leu Gly Ile Phe Ala Thr Thr
 225 230 235 240
 ttt gtg ctt tat cag gct aca atg gca aaa ggg ttg gct tgg gta atg 768
 Phe Val Leu Tyr Gln Ala Thr Met Ala Lys Gly Leu Ala Trp Val Met
 245 250 255
 cgt atc tat ggg gtg cca ttg ctt att gtt aac tgt ttc ctt gtt atg 816
 Arg Ile Tyr Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Cys Phe Leu Val Met
 260 265 270
 atc aca tac ttg cag cac act cac cca gct att cca cgc tat ggc tca 864
 Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr His Pro Ala Ile Pro Arg Tyr Gly Ser
 275 280 285
 tcg gaa tgg gat tgg ctc cgg gga gca atg gtg act gtc gat aga gat 912
 Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg Gly Ala Met Val Thr Val Asp Arg Asp
 290 295 300
 tat ggg gtg ttg aat aaa gta ttc cat aac att gca gac act cat gta 960
 Tyr Gly Val Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Ala Asp Thr His Val
 305 310 315 320
 gct cat cat ctc ttt gct aca gtg cca cat tac cat gca atg gag gcc 1008
 Ala His His Leu Phe Ala Thr Val Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala
 325 330 335
 act aaa gca atc aag cct ata atg ggt gag tat tac cgg tat gat ggt 1056
 Thr Lys Ala Ile Lys Pro Ile Met Gly Glu Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly
 340 345 350
 acc cca ttt tac aag gca ttg tgg agg gag gca aag gag tgc ttg ttc 1104
 Thr Pro Phe Tyr Lys Ala Leu Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Leu Phe
 355 360 365
 gtc gag cca gat gaa gga gct cct aca caa ggc gtt ttc tgg tac cgg 1152
 Val Glu Pro Asp Glu Gly Ala Pro Thr Gln Gly Val Phe Trp Tyr Arg
 370 375 380
 aac aag tat taa 1164
 Asn Lys Tyr
 385

<210> 16
 <211> 387
 <212> PRT
 <213> Ricinus communis

<400> 16
 Met Gly Gly Gly Gly Arg Met Ser Thr Val Ile Thr Ser Asn Asn Ser
 1 5 10 15
 Glu Lys Lys Gly Gly Ser Ser His Leu Lys Arg Ala Pro His Thr Lys
 20 25 30
 Pro Pro Phe Thr Leu Gly Asp Leu Lys Arg Ala Ile Pro Pro His Cys
 35 40 45
 Phe Glu Arg Ser Phe Val Arg Ser Phe Ser Tyr Val Ala Tyr Asp Val
 50 55 60
 Cys Leu Ser Phe Leu Phe Tyr Ser Ile Ala Thr Asn Phe Phe Pro Tyr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Pro Leu Ser Tyr Val Ala Trp Leu Val Tyr Trp Leu Phe

[0011]

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

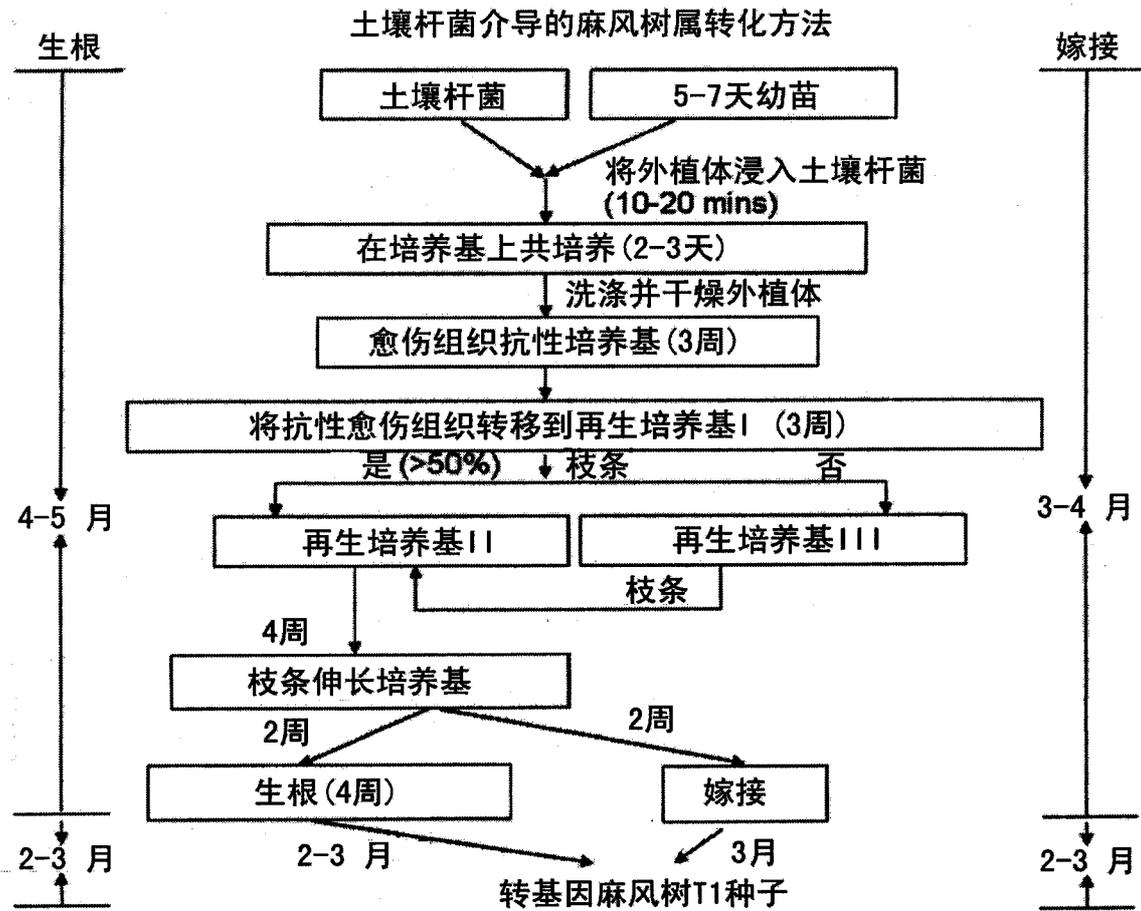


图 1

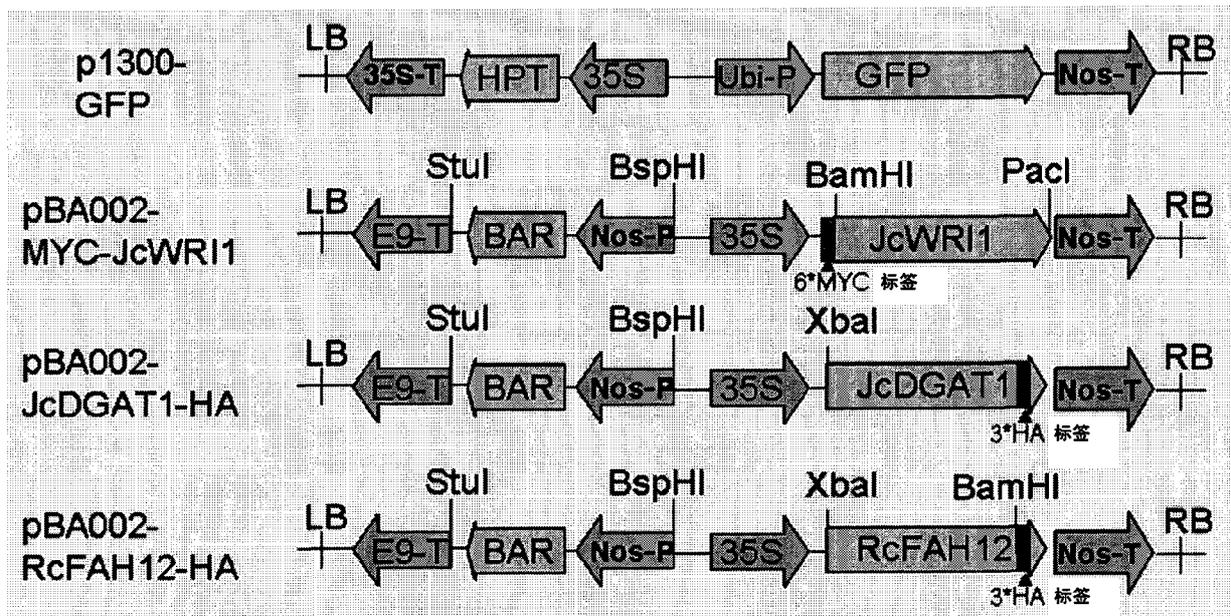


图 2

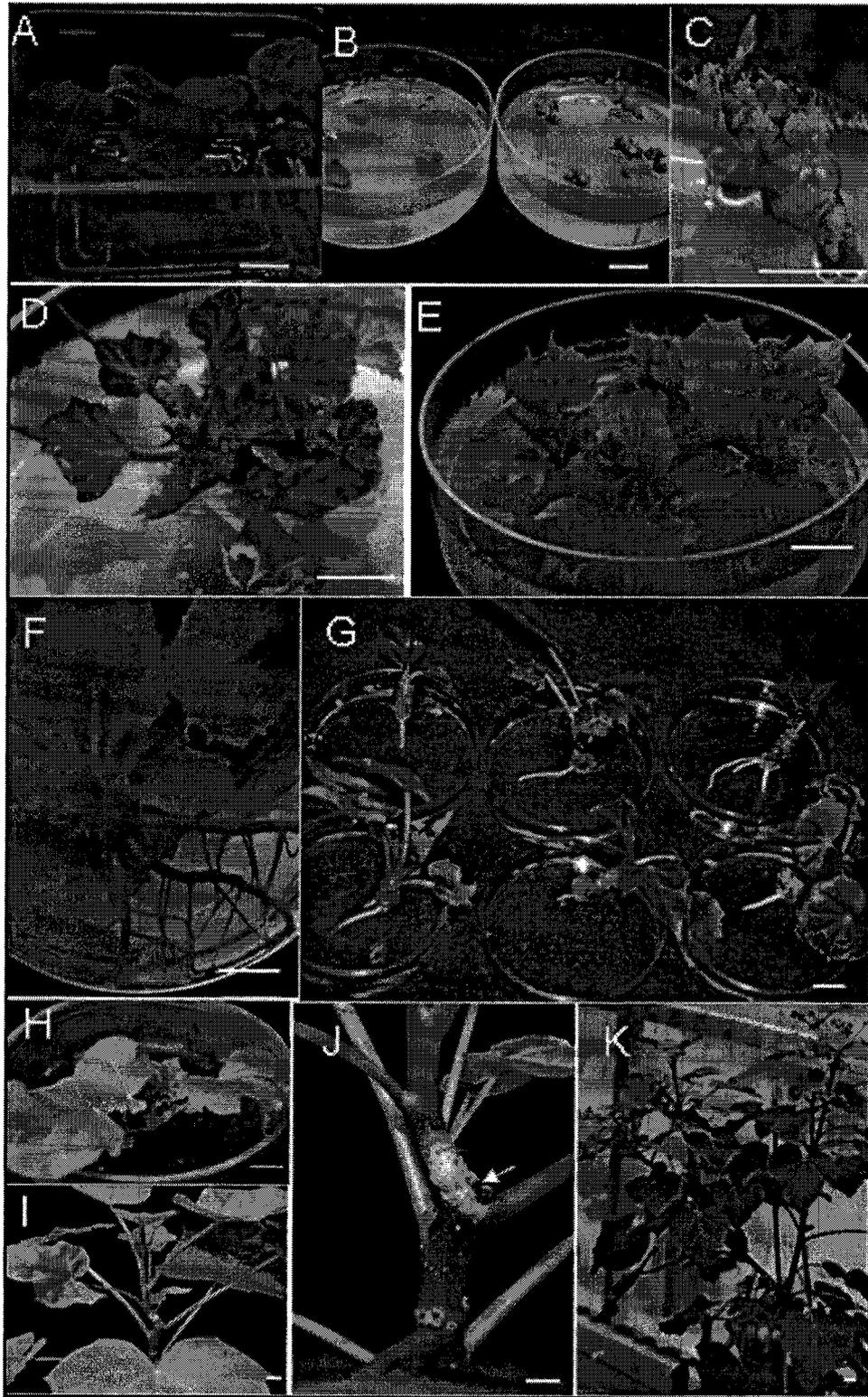


图 3

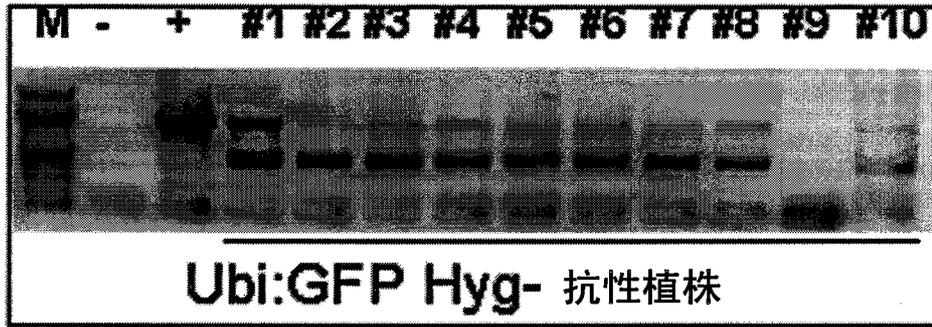


图 4

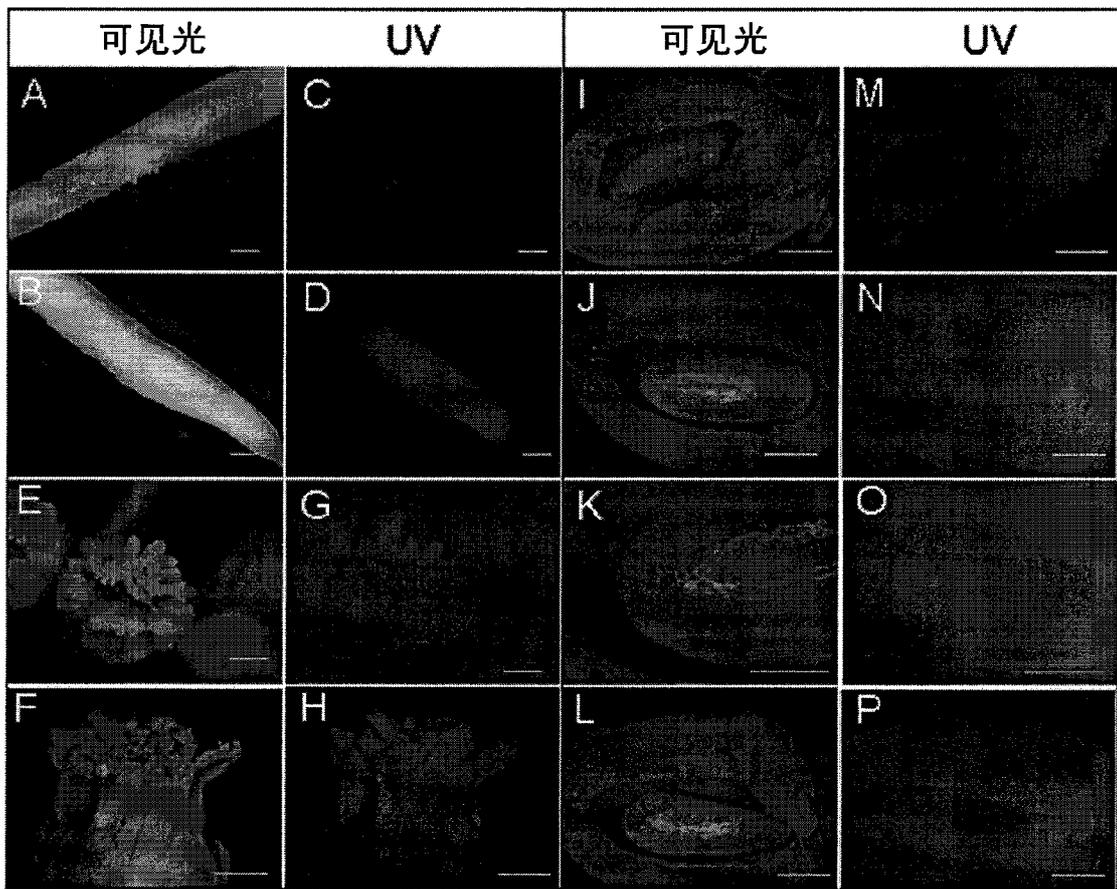


图 5

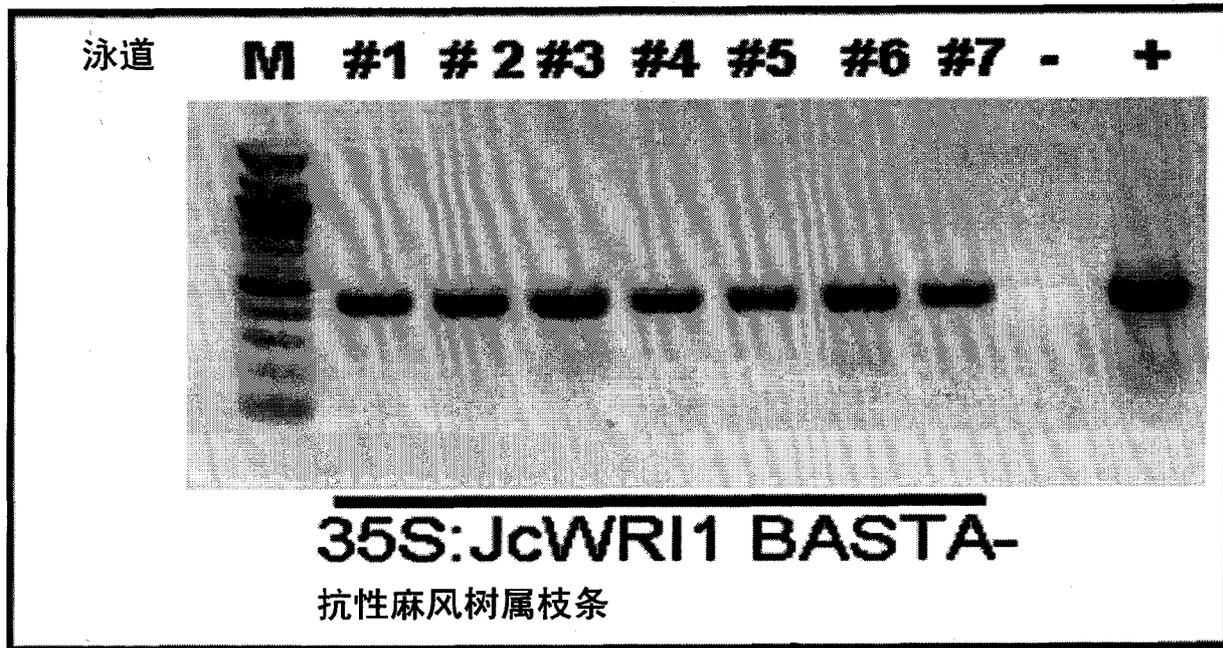


图6

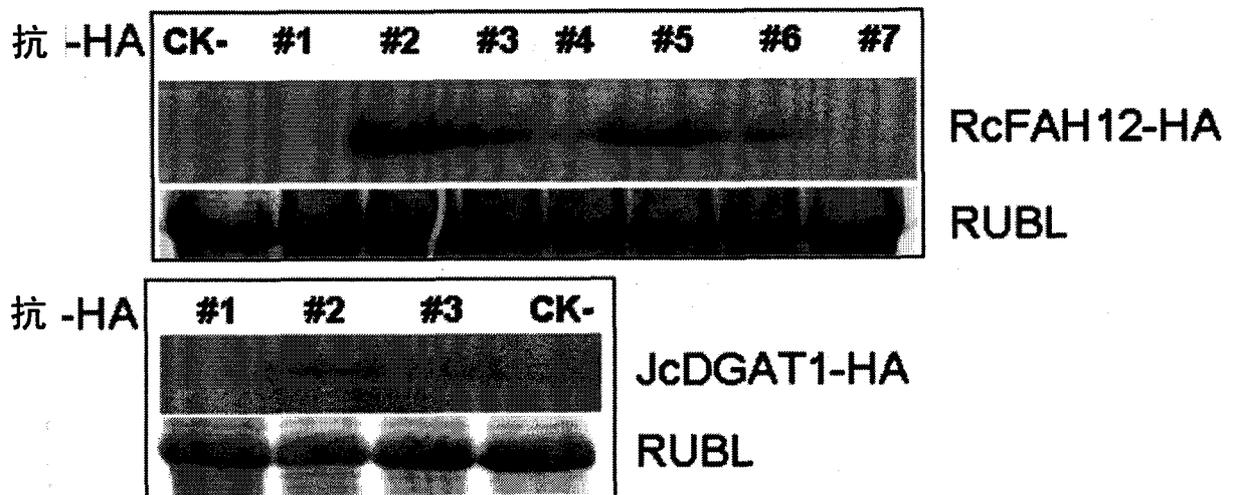


图7