



(10) 授权公告号 CN 110923251 B

(45) 授权公告日 2022.07.08

(21) 申请号 201911317951.0

(22) 申请日 2019.12.19

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110923251 A

(43) 申请公布日 2020.03.27

(73) 专利权人 中国烟草总公司郑州烟草研究院  
地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

(72) 发明人 张慧 翟妞 周会娜 徐国云  
刘萍萍 郑庆霞 陈千思 金立锋  
武明珠

(74) 专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通合伙) 41104  
专利代理师 张晓萍

(51) Int.Cl.

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/84 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/82 (2018.01)

(56) 对比文件

CN 108174952 A, 2018.06.19

CN 107653256 A, 2018.02.02

WO 02061101 A2, 2002.08.08

Genbank.PREDICTED: Nicotiana tabacum polyphenol oxidase E, chloroplastic-like (LOC107789348), transcript variant X3, mRNA:XM\_016611143.1.《Genbank》.2016,

段杜薇等.多酚氧化酶基因NtPPOE差异表达的效应分析.《分子植物育种》.2021,第19卷(第3期),

尹建雄等.烟草中多酚化合物及多酚氧化酶研究进展.《广西农业科学》.2005,第36卷(第3期),

Briardo Llorente et al..Safety assessment of nonbrowning potatoes: opening the discussion about the relevance of substantial equivalence on next generation biotech crops.《Plant Biotechnology Journal》.2011,第9卷

审查员 杨景丽

权利要求书1页 说明书5页  
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

烟草多酚氧化酶NtPPO4及其应用

(57) 摘要

本发明属于烟草基因工程领域,具体涉及一个烟草多酚氧化酶NtPPO4基因及其应用专利申请。该基因碱基序列如SEQ ID NO.1所示。烟草多酚氧化酶NtPPO4由588个氨基酸残基组成,具有3个典型的保守结构域。该蛋白与植物叶片绿原酸含量相关,降低该基因的表达后,叶片中绿原酸含量显著升高。本发明通过对烟草多酚氧化酶NtPPO4的初步研究,发现其与烟草绿原酸含量高度相关,在将该基因沉默后,烟草叶片中绿原酸含量明显升高,基于这一特性,可为烟草新品种的培育提供应用基础和参考借鉴。

1. 烟草多酚氧化酶NtPPO4的编码基因*NtPPO4*在烟草叶片绿原酸含量调控中的应用,其特征在于,利用基因沉默技术,通过下调烟草*NtPPO4*基因的表达量,来提高烟叶中绿原酸含量;

所述烟草多酚氧化酶NtPPO4的编码基因*NtPPO4*,其碱基序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 烟草多酚氧化酶NtPPO4在烟草叶片绿原酸含量调控中的应用,其特征在于,烟草多酚氧化酶NtPPO4与烟草叶片绿原酸含量相关,降低烟草多酚氧化酶NtPPO4表达量后,烟草叶片中绿原酸含量明显升高;

所述烟草多酚氧化酶NtPPO4,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 利用烟草多酚氧化酶NtPPO4的编码基因*NtPPO4*的烟草品种培育方法,其特征在于,利用病毒诱导的基因沉默技术,构建含有*NtPPO4*基因的病毒诱导沉默载体,转化烟草,干扰*NtPPO4*基因的表达使其沉默,筛选获得绿原酸含量升高的烟草品种;

所述烟草多酚氧化酶NtPPO4的编码基因*NtPPO4*,其碱基序列如SEQ ID NO.1所示。

## 烟草多酚氧化酶NtPP04及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于烟草基因工程领域,具体涉及一个烟草多酚氧化酶NtPP04及其应用专利申请。

### 背景技术

[0002] 绿原酸(Chlorogenic acid,CGA),又名咖啡单宁,是植物在有氧呼吸过程中经苯丙氨酸途径生成的一种苯丙素类化合物。绿原酸具有重要的药用价值,统计表明,卫生部《药品标准》收录的具有清热解毒和抗菌消炎的170种中成药中均含有绿原酸且为主要成分。另一方面,绿原酸作为一种新型的抗氧化剂,在食品和果品保鲜、防晒护肤等方面也有重要应用。因此,对绿原酸合成代谢途径的深入研究具有十分重要的技术价值和实用意义。

[0003] 我国的烟草种植面积和产量均居世界首位,而烟叶也是绿原酸含量较高的植物之一(约为3%-5%或更高)。统计表明,每年在烟草的采收和生产过程中会产生约25%的废次烟沫等下脚料不能使用,也因此,如果能够从烟草废料中充分提取绿原酸,不仅可以变废为宝,而且具有巨大的经济利益。而鉴于烟草组织培养技术的日趋成熟,加上烟草易于遗传转化,因此如能通过转基因技术或其他育种技术培育获得高绿原酸含量的烟草品种,可为利用烟草作为生物反应器来提取绿原酸奠定良好的技术基础。

[0004] 已有研究表明,绿原酸是多酚氧化酶(Polyphenol Oxidase,PP0)的一种底物,而PP0是一类广泛分布于植物体中的一种铜结合酶,参与生物氧化,在植物抵御外界病原菌伤害、对植物嫁接生根伤口愈合以及农产品的质量等方面都有重要作用。在烟草中,烟草PP0介导酶促棕色化反应,通过分子氧催化酚类物质氧化成醌,醌再与其他醌、氨基酸、蛋白质及化合物聚合成色素物质。因此,烟草中PP0酶活过高时,不仅影响烟叶外观质量,还会降低烟叶内致香物质的含量,使烟叶品质下降,工业可用性降低。

[0005] 总之,随着烟草基因工程深入,结合多酚类物质组分对于烟叶品质的重要影响,对于与烟草中多酚类物质相关编码基因的深入研究和开发,可为烟草品质调控、烟草新品种培育奠定良好的技术基础。

### 发明内容

[0006] 基于烟草中绿原酸含量调控相关基因的研究,本发明目的在于提请一个烟草多酚氧化酶NtPP04基因及其在烟草绿原酸含量调控方面的应用,从而为烟草品质调控、烟草新品种培育奠定一定技术基础。

[0007] 本申请所采取的技术方案详述如下。

[0008] 烟草多酚氧化酶NtPP04的编码基因NtPP04,由1767个碱基构成,其中特异性核酸片段为33-319位碱基,具体碱基序列如SEQ ID NO.1所示。

[0009] 所述编码基因NtPP04在叶片绿原酸含量调控中的应用,利用基因沉默技术、或者基因超表达方法,通过调节烟草NtPP04基因表达量,来调控烟叶中绿原酸含量情况。

[0010] 所述编码基因NtPP04的PCR扩增制备方法,具体包括如下步骤:

[0011] (1)提取(具体例如以烟草K326叶片为样品)基因组,并反转录为cDNA备用;

[0012] (2)设计PCR扩增用引物,并进行PCR扩增,具体引物序列设计如下:

[0013] *NtPP04*-F:5' - CAGCAAAACTCTCTTTTC- 3' ,

[0014] *NtPP04*-R:5' - CTGGACCATCCGTTATCG- 3' 。

[0015] 烟草多酚氧化酶*NtPP04*,其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,由588个氨基酸残基组成,其中第170-373位氨基酸为保守的Tyrosinase结构域,第380-430位氨基酸为保守的PP01\_DWL结构域,第451-584位氨基酸为保守的PP01\_KFDV结构域。

[0016] 所述烟草多酚氧化酶*NtPP04*在叶片绿原酸含量调控中的应用,该蛋白与植物叶片中绿原酸含量相关,降低该蛋白表达后,叶片中绿原酸含量明显升高。

[0017] 利用所述编码基因*NtPP04*的烟草新品种培育方法,通过转基因技术、瞬时表达技术或基因组编辑技术,构建含有*NtPP04*基因的病毒诱导沉默载体、RNAi干涉载体、超表达载体或基因组编辑载体,转化烟草,筛选获得绿原酸含量变化的烟草新品种;

[0018] 具体例如:利用病毒诱导的基因沉默(VIGS)的技术,干扰*NtPP04*基因的表达使其沉默,*NtPP04*基因沉默植株中绿原酸含量显著升高,进而获得绿原酸含量升高的植物新品种。

[0019] 换言之,一种培育高绿原酸含量烟草新品种培育方法,利用病毒诱导的基因沉默(VIGS)的技术,干扰*NtPP04*基因的表达使其沉默,*NtPP04*基因沉默的新烟草品种植株中绿原酸含量显著上升。

[0020] 本申请中,发明人通过对与绿原酸降解相关的特定烟草多酚氧化酶*NtPP04*研究基础上,发现其与烟草中绿原酸含量高度相关。进一步基因功能验证过程中,在将该基因沉默后,烟草中绿原酸含量发生了明显升高。基于这一结果,可为烟草品质调控、高绿原酸含量的烟草新品种培育奠定一定技术基础和提供一定借鉴参考。

## 附图说明

[0021] 图1 为与对照植株相比,*NtPP04*基因沉默植株中该基因的相对表达量;

[0022] 图2 为病毒诱导基因沉默的烟叶及对照烟叶中的绿原酸含量比较。

## 具体实施方式

[0023] 下面结合实施例对本申请做进一步解释说明,在介绍具体实施例前,就下述实施例中具体实验背景资料情况简要介绍如下。

[0024] 生物材料:

[0025] 本氏烟草,一种常用烟草材料,下述实施例中烟草种植于郑州烟草院种植基地,育苗钵中育苗,待发芽后两周进行分苗,种于塑料钵(10cm×10cm)中,22℃、16h光/8h暗条件下进行日常肥水管理等;

[0026] 下述实施例中所采用的VIGS载体是一种来自烟草脆裂病毒的病毒载体(tobacco rattle virus,TRV),所具体利用的TRV2(一种常用载体),其带有卡那筛选标记和35S启动子,同时TRV2带有EcoR I和BamH I等多克隆位点,可以用来携带和转化外源基因;

[0027] 实验试剂:

[0028] LB液体培养基,1L含量中含有:10 g细菌蛋白胨(bacteriological peptone);10

g氯化钠(NaCl);5 g酵母抽提物(yeast extract),高温高压灭菌;

[0029] YEB液体培养基,1L含量中含有:5g 牛肉浸膏(beef extract);5 g细菌蛋白胨(bacteriological peptone);5 g 蔗糖(sucrose);1 g酵母抽提物(yeast extract);2 mL 1M硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>),高温高压灭菌;

[0030] 1M 2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)储备液:ddH<sub>2</sub>O溶解,过滤灭菌,-20℃储存备用;

[0031] 200 mM乙酰丁香酮(Acetosyringone,As)储备液:二甲基亚砜(DMSO)溶解,-20℃储存备用;

[0032] MMA(100 mL):1 mL(1 M)MgCl<sub>2</sub>;1 mL(1 M,pH5.6)MES;75 μL(200 mM)As。

[0033] 实施例1

[0034] 本实施例就烟草*NtPP04*基因克隆及沉默载体的构建过程简要介绍如下。

[0035] (1)烟草*NtPP04*基因克隆

[0036] 根据前期对于烟草基因组及相关*NtPP04*基因研究,选择特异编码序列为目标片段,设计PCR扩增用引物序列如下:

[0037] *NtPP04*-F:5' - CAGCAAACTCTCTTTTC- 3' ,

[0038] *NtPP04*-R:5' - CTGGACCATCCGTTATCG- 3' ;

[0039] 以烟草K326叶片的cDNA为模板,进行PCR扩增获得*NtPP04*基因;

[0040] PCR扩增程序为:95℃预变性3 min;95℃变性15s,55℃退火15s,72℃延伸30s,34个循环后,72℃彻底延伸 5min;

[0041] 对PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,并回收电泳产物备用。

[0042] (2)构建重组TRV2- *NtPP04*载体

[0043] 将步骤(1)中的PCR扩增产物进行EcoRI、BamHI双酶切,同时对空载体TRV2进行EcoRI、BamHI双酶切,分别回收酶切产物,利用T4 DNA连接酶进行连接;

[0044] 将连接产物转化大肠杆菌感受态DH5α,转化操作结束后将转化产物涂布在含50mg/L Kan的LB固体培养基上,37℃过夜培养;

[0045] 挑选阳性单菌落扩增后进一步进行PCR鉴定,并结合测序验证,确保获得构建正确的重组载体TRV2- *NtPP04*。

[0046] 需要说明的是,

[0047] 烟草*NtPP04*基因,包括1767个碱基,碱基序列如SEQ ID NO.1所示,具体碱基序列为:

[0048] ATGGCTTCTTCTTCTACTCTACCTTTATGCACCAGCAAACTCTCTTTTCTTCCTTACCAACTCATC  
TTTCTTTGCAAAACCCTCCCAGCATTTCTCCATGGAAAACGTAACCAATGTTTCAAGGTTTCATGCACGGGCGAG  
CATGACGGAAACCAACTTGACGCCATTAAGAAGGAGCTGTTGACAGAAGGAATGTCCTTTTGGGTTTAGGAGGGC  
TGTATGGCGCAGCTAATCTTGCGCCATTAGCCTCTGCTGCTCCCGTACCACCCCGATCAAAAATCATGTGGCAC  
GGCCACGATAACGGATGGTCCAGCTGTACCATATAGTTGTTGCCCCCTAAACCAGATGATATGGACAGCGTTCCA  
TATTACAAGATCCCTCGCATGTCCAAGCTTCGTAAGCGGCCCGCTGCCAAAACGTGACTGAGGAGTATATAGCCA  
AGTACCAGTTAGCCACTAGTAAAATGAAGGAATTAGACAAAGACCAATTTGATCCTCTTGGCTTCAAGCAACAAGC  
TAATATCCATTGTGCTTATTGCAACAATGCTTACACAATGGGTGACCAAAAAGTTACAAGTTCACGAATCTTGGCTT  
TTCTTCCCATTTTCATAGATGGTACTTGTACTTCTACGAGAGAATCTTGGGCTCCCTCATCGATGATCCAACCTTTG  
CTTTGCCATATTGAACTGGGACCATCCAAGCGGCATGCGTTTGCCCTCCTATGTTCGATGTCGAAGGTTCTTCCT

GTACGATGCAAGACGTAATCCACAAGTCCGTAATGGAACCATAATCGATCTTGGTTTTTTTCGGTGATGAAGTCAAA  
 ACTAATGAAATACAGATGATAACTAACAACCTTAATTCTAATGTATCGTCAAATGATAACTAATGCTCCATGCCCGC  
 TGTTGTTCTTTCGGAGAGCCTTACAGATTCGGATCTAAACCAATCCGGGGCAGGGAACCATTGAAAACATCCCTCA  
 TACTCCAGTCCACATTTGGACTGGTACTGTGCGGGATACGGATTTGGGTAATGGTGTGAAATCATACGGTGAGGAT  
 ATGGACCCAGTTTTTTTACAGCCACCACGCCAATGTGGACCGCATGTGGAATGAATGGAAAGCACTAGGAGGGAAAA  
 GAAGGGATCTCACAGACAATGATTGGTTAAATTCCGAGTTCTCTTTCTACGATGAAAACCGCGACCCATGGCGTGT  
 GAAAGTCCGAGACTGTTTGGACAGTAAGAAGATGGGGTATGATTACGAACCAACATCCACACCATGGCGTAACTTT  
 AAGCCAGGGAAAAAGAGCACAGAGGGCAAGGTGAATCTAAGTTCAATTAAGCCAGCCAGCAAGGTATTCCCCTCT  
 CAAATCTGGACAGAGCCATTTGCTTTAGTATAGAGAGGCCAGCTACATCAAGGAGTCAGCAGGAGAAAGATGAATT  
 CGAGGAGATCCTAACATTCAAGGGTGTAAAGTATGATGATAGCAAGTATATAAGGTTTGATGTGTTCCCTCAATGCA  
 GACAAGACTGTGAATGCAGATGACATTAACAAGAGAGAGTATGCAGGGAGCTATACCAGCTTGCCACATGTTTCATG  
 GACCTAATAATGCCACTCATGAGTTTAAACCAAAAAGAATTCAAGCTAGCCATCACTGAACTTCTTGAGGACTGTGG  
 TTTGGAAGATGAAGACATTATTGCGGTAAGTGTGGTTCCAAAGAAGGGGGCGAAGTGGTCAGCATCGACAATGTG  
 GAGATTGAACTTAAGGATTGTTTTTAA。

[0049] 烟草多酚氧化酶NtPP04,包括588个氨基酸,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,具体氨基酸序列为:

[0050] MASSSTLPLCTSKTLFSSFTNSSFFAKPSQHFLHGKRNQCFKVSCTGEHDGNQLDAIKEGAVDRRNVL  
 LGLGGLYGAANLAPLASAAPVPPDQKSCGTATITDGPVYPYSCPPKPDMDSPYYKIIPRMSKLRKRPAAQNVT  
 EEYIAKYQLATSKMKELDKDQFDPLGFKQQANIHCAYCANNAYTMGDQKLQVHESWLFFPFHRWLYFYERILGSLI  
 DDPTFALPYWNWDHPSGMRLPPMFDEGSSLYDARRNPQVRNGTIIDLGGFFGDEVKTNEIQMI TNNLILMYRQMIT  
 NAPCPLLFFGEPYRFGSKPNPGQGTIENIPHTPVHIWTGTVRDIDLNGVKSYPGEDMDPVFYSHHANVDRMWNEWK  
 ALGGKRRDLTDNDWLNSEFSFYDENRDPWRVKVRDCLDSKKMGYDYEPSTPWRNFKPGKKSTEGKVNLSIKPAS  
 KVFPLSNLDRAICFSIERPATSRSQEKDEFEEILTFKGVKYDDSKYIRFDVFLNADKTVNADDINKREYAGSYTS  
 LPHVHGPNNATHEFKPEFKLAITELLEDCGLEDEDIIAVTVVPPKKGGEVVSIDNVEIELKDCF。

[0051] 实施例2

[0052] 在实施例1基础上,利用农杆菌介导的VIGS技术,发明人进一步将所构建的重组TRV2- *NtPP04*载体转化了烟草植株,并就相关植物表型变化情况做了验证分析,具体实验过程简介如下。

[0053] (1)转化农杆菌

[0054] 需要说明的是,参考实施例1操作及现有技术,发明人同时制备了TRV2、TRV2-PDS重组载体作为对照,具体转化过程为:

[0055] 将TRV2(载体对照)、TRV2-PDS(VIGS效率对照)及TRV2- *NtPP04*的阳性克隆质粒,分别通过电击转化方式转化进入农杆菌GV3101感受态细胞中,利用含50mg/L Kan 和50mg/L Rif的YEB平板进行培养筛选,在28℃倒置培养2d后,利用菌落PCR筛选带有目的基因的农杆菌。

[0056] (2)制备转染用菌液

[0057] 将步骤(1)中筛选所得阳性农杆菌克隆在5 mL的YEB液体培养基(含50 mg/L Kan 和50 mg/L Rif)中,28℃、250 rpm条件下培养过夜;

[0058] 取50uL 过夜培养物接种至50 mL的YEB液体培养基(含50 mg/L Kan)中,培养至

$OD_{600} = 1.0 \sim 1.5$ 左右,然后4000g 离心5 min,收集菌体,再用MMA (1 mL (1 M)MgCl<sub>2</sub>;1 mL (1 M, pH5.6)MES;75  $\mu$ L (200 mM)As)重悬,调节 $OD_{600} = 1.0$ 左右;

[0059] 最后室温放置3 h左右后,作为转染用菌液。

[0060] (3)瞬时转化

[0061] 以3~4 w(周)苗龄的本氏烟草叶片为实验材料,利用1 mL规格注射器,将步骤(2)中所制备转染用菌液注射至烟草叶片中,注射后的烟草继续在人工培养箱内培养,观察表型变化。

[0062] 注射3周后的烟草表型并无变化,进一步通过qRT-PCR对*NtPPO4*基因表达情况进行了检测,结果如图1所示,可以看出,TRV2- *NtPPO4*的侵染植株中,*NtPPO4*的表达量显著降低。

[0063] 进一步地,发明人对实验组 (TRV2- *NtPPO4*侵染植株) 和对照组 (TRV2侵染植株) 中的绿原酸含量进行了检测,检测方法参照《基于气质和液质联用技术的烟草鲜烟叶代谢组学分析流程》(郑庆霞等,烟草科技,2019)。检测结果如图2所示,可以看出,*PPO4*基因沉默后,实验组绿原酸含量升高了3.5倍左右。基于此,可为烟草品质调控、或者新品种培育奠定良好技术基础。

|        |   |      |
|--------|---|------|
| [0001] | 序列表   |      |
| [0002] | <110> 中国烟草总公司郑州烟草研究院  |      |
| [0003] | <120> 烟草多酚氧化酶NtPP04及其应用   |      |
| [0004] | <130> none  |      |
| [0005] | <160> 2   |      |
| [0006] | <170> SIPOSequenceListing 1.0                                     |      |
| [0007] | <210> 1   |      |
| [0008] | <211> 1767  |      |
| [0009] | <212> DNA   |      |
| [0010] | <213> <i>Nicotiana tabacum</i>                                    |      |
| [0011] | <400> 1   |      |
| [0012] | atggettctt cttctactct acctttatgc accagcaaaa ctctcttttc ttccttcacc | 60   |
| [0013] | aactcatctt tctttgcaaa accctcccag catttctctc atggaaaacg taaccaatgt | 120  |
| [0014] | ttcaaggttt catgcacggg cgagcatgac gaaaccaac ttgacgcat taaagaagga   | 180  |
| [0015] | gctgttgaca gaaggaatgt ctttttggt ttaggaggc tgtatggcg agctaactt     | 240  |
| [0016] | gcgccattag cctctgctgc tcccgtacca cccccgatc aaaaatcatg tggcacggc   | 300  |
| [0017] | acgataacgg atggtccagc tgtaccatat agttgttgc ccctaaacc agatgatatg   | 360  |
| [0018] | gacagcttc catattaca gatccctgc atgtccaagc ttcgtaagc gcccgctgc      | 420  |
| [0019] | caaacgtga ctgaggagta tatagccaag taccagttag ccactagtaa aatgaaggaa  | 480  |
| [0020] | ttagacaaag accaatttga tcctcttggc ttcaagcaac aagctaatat ccattgtgct | 540  |
| [0021] | tattgaaca atgcttacac aatgggtgac caaagtac aagtccacga atcttggctt    | 600  |
| [0022] | ttcttccat ttcatagat gtacttgta ttctacgaga gaatcttggg ctccctcctc    | 660  |
| [0023] | gatgatcaa cttttgctt gccatattgg aactgggacc atccaagcgg catgcgtttg   | 720  |
| [0024] | cctctatgt tcgatgtga aggttcttc ctgtacgat caagacgtaa tccacaagtc     | 780  |
| [0025] | cgtaatgaa ccataatcga tcttggttt ttcggtgat aagtcaaac taatgaaata     | 840  |
| [0026] | cagatgataa ctaacaactt aattctaag tategtcaa tgataactaa tgctccatgc   | 900  |
| [0027] | ccgctgtgt tcttcggaga gccttacaga ttcgatcta aaccaatcc ggggcagga     | 960  |
| [0028] | accattgaaa acatccctca tactccagtc cacatttga ctggtactgt gcgggatac   | 1020 |
| [0029] | gatttgggta atggtgtgaa atcatacgt gaggatatg acccagttt ttacagccac    | 1080 |
| [0030] | cacccaatg tggaccgat gtggaatgaa tggaaagcac taggaggaa aagaaggat     | 1140 |
| [0031] | ctcacagaca atgattggt aaattccgag ttctcttct acgatgaaa ccgacacca     | 1200 |
| [0032] | tggcgtgtga aagtccgaga ctgtttggac agtaagaaga tggggtatga ttacgaacca | 1260 |
| [0033] | acatccacac catggcgtaa ctttaagcca gggaaaaga gcacagagg caaggtgaat   | 1320 |
| [0034] | ctaagtcaa ttaagccagc cagcaagta tcccactct caaatctgga cagagccatt    | 1380 |
| [0035] | tgcttagta tagagaggc agctacatca aggagtcagc aggagaaaga tgaattcgag   | 1440 |
| [0036] | gagatcctaa cattcaagg tgtaaagtat gatgatagca agtatataag gtttgatgtg  | 1500 |
| [0037] | ttctcaatg cagacaagac tgtgaatgca gatgacatta acaagagaga gtatgcagg   | 1560 |
| [0038] | agtatacca gcttgcaca gtttcatgga ctaataatg ccactcatga gtttaacca     | 1620 |
| [0039] | aaagaattca agctagccat cactgaact cttgaggact gtggtttgga agatgaagac  | 1680 |
| [0040] | attattgagg taactgtgt tccaagaag gggggcgaag tggtcagcat cgacaatgtg   | 1740 |
| [0041] | gagattgaac ttaaggattg ttttaa                                      | 1767 |



[0042] <210> 2  
 [0043] <211> 588  
 [0044] <212> PRT  
 [0045] <213> *Nicotiana tabacum*  
 [0046] <400> 2  
 [0047] Met Ala Ser Ser Ser Thr Leu Pro Leu Cys Thr Ser Lys Thr Leu Phe  
 [0048] 1 5 10 15  
 [0049] Ser Ser Phe Thr Asn Ser Ser Phe Phe Ala Lys Pro Ser Gln His Phe  
 [0050] 20 25 30  
 [0051] Leu His Gly Lys Arg Asn Gln Cys Phe Lys Val Ser Cys Thr Gly Glu  
 [0052] 35 40 45  
 [0053] His Asp Gly Asn Gln Leu Asp Ala Ile Lys Glu Gly Ala Val Asp Arg  
 [0054] 50 55 60  
 [0055] Arg Asn Val Leu Leu Gly Leu Gly Gly Leu Tyr Gly Ala Ala Asn Leu  
 [0056] 65 70 75 80  
 [0057] Ala Pro Leu Ala Ser Ala Ala Pro Val Pro Pro Pro Asp Gln Lys Ser  
 [0058] 85 90 95  
 [0059] Cys Gly Thr Ala Thr Ile Thr Asp Gly Pro Ala Val Pro Tyr Ser Cys  
 [0060] 100 105 110  
 [0061] Cys Pro Pro Lys Pro Asp Asp Met Asp Ser Val Pro Tyr Tyr Lys Ile  
 [0062] 115 120 125  
 [0063] Pro Arg Met Ser Lys Leu Arg Lys Arg Pro Ala Ala Gln Asn Val Thr  
 [0064] 130 135 140  
 [0065] Glu Glu Tyr Ile Ala Lys Tyr Gln Leu Ala Thr Ser Lys Met Lys Glu  
 [0066] 145 150 155 160  
 [0067] Leu Asp Lys Asp Gln Phe Asp Pro Leu Gly Phe Lys Gln Gln Ala Asn  
 [0068] 165 170 175  
 [0069] Ile His Cys Ala Tyr Cys Asn Asn Ala Tyr Thr Met Gly Asp Gln Lys  
 [0070] 180 185 190  
 [0071] Leu Gln Val His Glu Ser Trp Leu Phe Phe Pro Phe His Arg Trp Tyr  
 [0072] 195 200 205  
 [0073] Leu Tyr Phe Tyr Glu Arg Ile Leu Gly Ser Leu Ile Asp Asp Pro Thr  
 [0074] 210 215 220  
 [0075] Phe Ala Leu Pro Tyr Trp Asn Trp Asp His Pro Ser Gly Met Arg Leu  
 [0076] 225 230 235 240  
 [0077] Pro Pro Met Phe Asp Val Glu Gly Ser Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Arg  
 [0078] 245 250 255  
 [0079] Asn Pro Gln Val Arg Asn Gly Thr Ile Ile Asp Leu Gly Phe Phe Gly  
 [0080] 260 265 270  
 [0081] Asp Glu Val Lys Thr Asn Glu Ile Gln Met Ile Thr Asn Asn Leu Ile  
 [0082] 275 280 285  
 [0083] Leu Met Tyr Arg Gln Met Ile Thr Asn Ala Pro Cys Pro Leu Leu Phe

|        |   |     |         |
|--------|---|-----|---------|
| [0084] | 290   | 295 | 300     |
| [0085] | Phe Gly Glu Pro Tyr Arg Phe Gly Ser Lys Pro Asn Pro Gly Gln Gly |     |         |
| [0086] | 305   | 310 | 315 320 |
| [0087] | Thr Ile Glu Asn Ile Pro His Thr Pro Val His Ile Trp Thr Gly Thr |     |         |
| [0088] |   | 325 | 330 335 |
| [0089] | Val Arg Asp Thr Asp Leu Gly Asn Gly Val Lys Ser Tyr Gly Glu Asp |     |         |
| [0090] |   | 340 | 345 350 |
| [0091] | Met Asp Pro Val Phe Tyr Ser His His Ala Asn Val Asp Arg Met Trp |     |         |
| [0092] |   | 355 | 360 365 |
| [0093] | Asn Glu Trp Lys Ala Leu Gly Gly Lys Arg Arg Asp Leu Thr Asp Asn |     |         |
| [0094] | 370   | 375 | 380     |
| [0095] | Asp Trp Leu Asn Ser Glu Phe Ser Phe Tyr Asp Glu Asn Arg Asp Pro |     |         |
| [0096] | 385   | 390 | 395 400 |
| [0097] | Trp Arg Val Lys Val Arg Asp Cys Leu Asp Ser Lys Lys Met Gly Tyr |     |         |
| [0098] |   | 405 | 410 415 |
| [0099] | Asp Tyr Glu Pro Thr Ser Thr Pro Trp Arg Asn Phe Lys Pro Gly Lys |     |         |
| [0100] |   | 420 | 425 430 |
| [0101] | Lys Ser Thr Glu Gly Lys Val Asn Leu Ser Ser Ile Lys Pro Ala Ser |     |         |
| [0102] |   | 435 | 440 445 |
| [0103] | Lys Val Phe Pro Leu Ser Asn Leu Asp Arg Ala Ile Cys Phe Ser Ile |     |         |
| [0104] |   | 450 | 455 460 |
| [0105] | Glu Arg Pro Ala Thr Ser Arg Ser Gln Gln Glu Lys Asp Glu Phe Glu |     |         |
| [0106] | 465   | 470 | 475 480 |
| [0107] | Glu Ile Leu Thr Phe Lys Gly Val Lys Tyr Asp Asp Ser Lys Tyr Ile |     |         |
| [0108] |   | 485 | 490 495 |
| [0109] | Arg Phe Asp Val Phe Leu Asn Ala Asp Lys Thr Val Asn Ala Asp Asp |     |         |
| [0110] |   | 500 | 505 510 |
| [0111] | Ile Asn Lys Arg Glu Tyr Ala Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Pro His Val |     |         |
| [0112] |   | 515 | 520 525 |
| [0113] | His Gly Pro Asn Asn Ala Thr His Glu Phe Lys Pro Lys Glu Phe Lys |     |         |
| [0114] |   | 530 | 535 540 |
| [0115] | Leu Ala Ile Thr Glu Leu Leu Glu Asp Cys Gly Leu Glu Asp Glu Asp |     |         |
| [0116] | 545   | 550 | 555 560 |
| [0117] | Ile Ile Ala Val Thr Val Val Pro Lys Lys Gly Gly Glu Val Val Ser |     |         |
| [0118] |   | 565 | 570 575 |
| [0119] | Ile Asp Asn Val Glu Ile Glu Leu Lys Asp Cys Phe                 |     |         |
| [0120] |   | 580 | 585     |

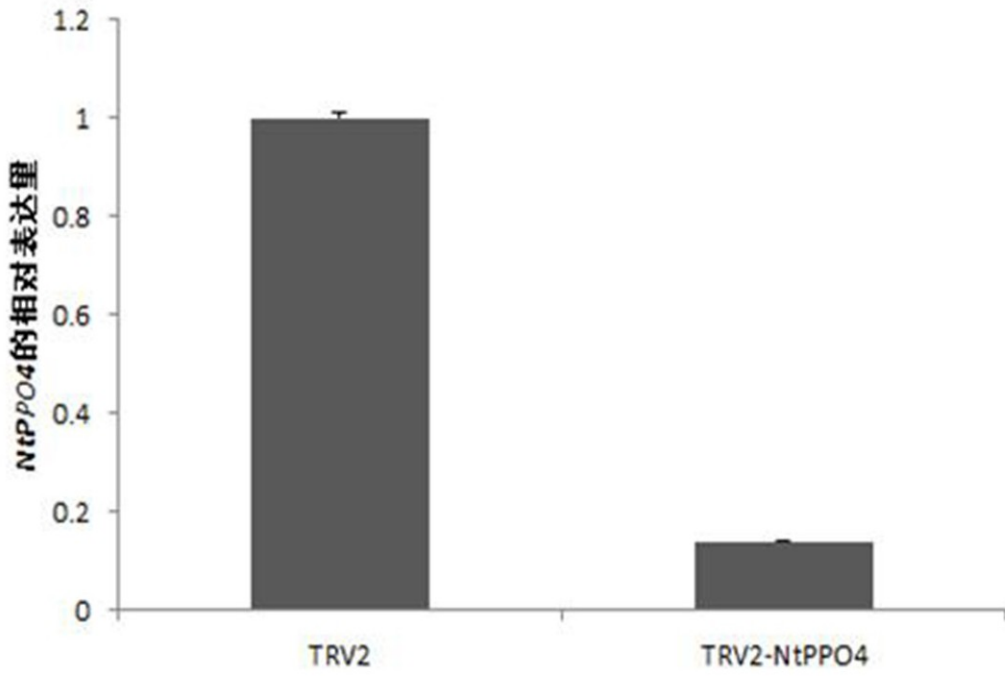


图1

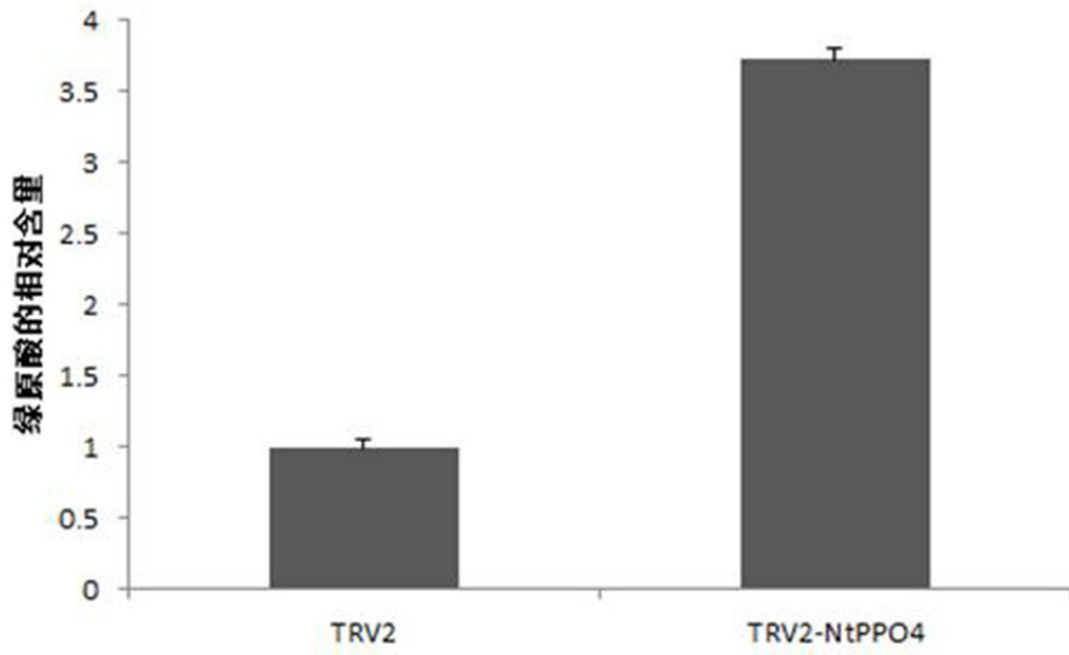


图2