



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106459986 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580019204.2

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
11105

(22)申请日 2015.03.10

代理人 张文辉

(30)优先权数据

61/951,455 2014.03.11 US

(51)Int.Cl.

C12N 15/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12N 9/02(2006.01)

2016.10.11

C12N 15/82(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/019610 2015.03.10

C12N 1/21(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/138394 EN 2015.09.17

A01H 5/00(2006.01)

A01H 5/10(2006.01)

(71)申请人 拜耳作物科学有限合伙公司

地址 美国北卡罗拉纳州

申请人 拜耳作物科学股份公司

(72)发明人 M.杜鲍尔德 R.阿姆斯特朗

F.波雷 C.彼得斯

权利要求书4页 说明书44页

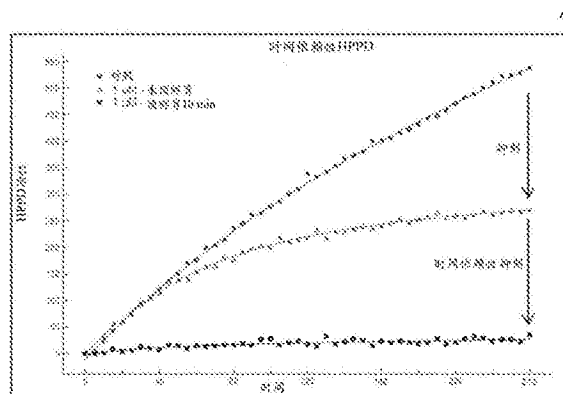
序列表63页 附图5页

(54)发明名称

HPPD变体和使用方法

(57)摘要

在本发明中,描述了显示针对若干类别的HPPD-抑制剂的完全耐受性的HPPD酶和含有这些酶的植物。已设计一组不具有与HPPD抑制剂的亲和力或仅具有显著减小的亲和力的HPPD酶,并且同时HPPD抑制剂与该酶的解离速率增加至一定程度,以使得这些HPPD抑制剂不再用作缓慢结合或缓慢且紧密结合的抑制剂,而是与此相反地变成完全可逆的抑制剂。具体地说,提供了编码HPPD抑制剂耐受性多肽的分离多核苷酸。另外,包括与这些多肽相对应的氨基酸序列。



1. 一种重组核酸分子,编码由氨基酸序列组成的4-羟苯丙酮酸二加氧酶(HPPD)蛋白,该氨基酸序列包含在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的脯氨酸和在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的位置处的苯丙氨酸或酪氨酸,并且其中所述HPPD蛋白对HPPD抑制剂除草剂耐受,其中所述编码的HPPD蛋白由进一步包含以下各项的氨基酸序列组成:

(a) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

(b) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

(c) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

(d) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置172相对应的氨基酸位置处的甘氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

(e) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;或者

(f) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸。

2. 如权利要求1所述的重组核酸分子,其中所述HPPD蛋白包含与SEQ ID NO 1、5或6中所列出的氨基酸序列具有至少53%序列一致性的氨基酸序列。

3. 如权利要求1或2所述的重组核酸分子,其中其核苷酸序列是一种已设计用于在植物中表达的合成序列。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的重组核酸分子,其中其核苷酸序列可操作地连接至能够指导该核苷酸序列在植物细胞中的表达的启动子。

5. 如权利要求1所述的重组核酸分子,其中所述核苷酸序列是选自下组,该组由SEQ ID NO:40、41、42、43、44、以及45组成。

6. 如权利要求1所述的重组核酸分子,其中所述HPPD抑制剂除草剂是选自下组,该组由以下各项组成:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类、N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类、N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类、哒嗪酮衍生物类、取代的1,2,5-噁二唑类、奥沙普秦衍生物类、三酮类、异噁唑类、以及吡唑特类。

7. 如权利要求6所述的重组核酸分子,其中所述HPPD抑制剂除草剂是选自下组,该组由以下各项组成:2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰胺、2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯甲酰胺、2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰胺、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-

1H-四唑-5-基) 苯甲酰、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基) 苯甲酰、2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基) 苯甲酰、氟磺草酮、磺草酮、甲基磺草酮、异噁唑草酮、磺酰草吡唑、以及苯吡唑草酮。

8. 一种宿主细胞, 含有如权利要求1、2或4所述的重组核酸分子。

9. 如权利要求8所述的宿主细胞, 是一种细菌宿主细胞。

10. 如权利要求8所述的宿主细胞, 是一种植物细胞。

11. 一种转基因植物, 包含如权利要求1-5中任一项所述的重组核酸分子。

12. 如权利要求11所述的植物, 其中所述植物是选自下组, 该组由以下各项组成: 玉蜀黍、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉花、稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦、以及油菜。

13. 一种转基因种子, 包含如权利要求1-5中任一项所述的重组核酸分子。

14. 一种构成HPPD蛋白的重组多肽, 其中所述HPPD蛋白对HPPD抑制剂除草剂耐受, 并且其中所述HPPD蛋白包含在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的脯氨酸和在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的位置处的苯丙氨酸或酪氨酸, 其中所述HPPD蛋白进一步包含

(a) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

(b) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

(c) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

(d) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置172相对应的氨基酸位置处的甘氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

(e) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸; 或者

(f) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸。

15. 如权利要求14所述的重组多肽, 其中所述HPPD蛋白包含与SEQ ID NO:1中所列出的氨基酸序列具有至少53%序列一致性的氨基酸序列。

16. 如权利要求14或15所述的重组多肽, 其中所述HPPD蛋白包含选自下组的氨基酸序列, 该组由SEQ ID NO:11-21组成。

17. 如权利要求14、15或16所述的重组多肽, 其中所述HPPD抑制剂除草剂是选自下组, 该组由以下各项组成: N(1,2,5-噁二唑-3-基) 苯酰胺类; N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基) 芳基甲酰胺类、N-(1,3,4-噁二唑-2-基) 苯酰胺类、N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基) 芳基甲酰胺类、哒嗪酮衍生物类、取代的1,2,5-噁二唑类、奥沙普秦衍生物类、三酮类、异噁唑

类、以及吡唑特类。

18. 如权利要求17所述的重组多肽,其中所述HPPD抑制剂除草剂是选自下组,该组由以下各项组成:2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰、2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯甲酰、2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯甲酰、2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯甲酰、氟磺草酮、磺草酮、甲基磺草酮、异噁唑草酮、磺酰草吡唑、以及苯吡唑草酮。

19. 一种用于产生具有HPPD抑制剂除草剂耐受性活性的多肽的方法,包括在其中编码该多肽的核酸分子被表达的条件下培养如权利要求8所述的宿主细胞。

20. 一种具有稳定结合到其基因组中的DNA构建体的植物,所述构建体包含与如权利要求1-5中任一项所述的核酸可操作地连接的启动子。

21. 如权利要求20所述的植物,其中所述植物是选自下组,该组由植物细胞、植物组织和植物种子组成。

22. 如权利要求20所述的植物,其中所述植物是选自下组,该组由以下各项组成:玉蜀黍、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉花、稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦、以及油菜。

23. 如权利要求20所述的植物的转基因种子。

24. 一种控制田地中的杂草的方法,包括在田地中种植如权利要求20所述的植物或其种子并且向所述田地施加有效浓度的HPPD抑制剂除草剂。

25. 如权利要求24所述的方法,其中所述HPPD抑制剂除草剂是选自下组,该组由以下各项组成:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类、N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类、N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类、哒嗪酮衍生物类、取代的1,2,5-噁二唑类、奥沙普秦衍生物类、三酮类、异噁唑类、以及吡唑特类。

26. 如权利要求24所述的方法,其中所述HPPD抑制剂除草剂是选自下组,该组由以下各项组成:2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰、2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯甲酰、2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯甲酰、2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯甲酰、氟磺草酮、磺草酮、甲基磺草酮、异噁唑草酮、磺酰草吡唑、以及苯吡唑草酮。

27. 如权利要求1-5中任一项所述的核酸用于赋予植物对一种或多种HPPD抑制剂除草剂的耐受性的用途。

28. 一种商品产品,包含如权利要求1-5中任一项所述的核酸分子或如权利要求14-16中任一项所述的蛋白质,其中所述产品是选自下组,该组由以下各项组成:完整或加工的种子或谷物、动物饲料、玉米或黄豆粗粉、玉米或黄豆面粉、玉米淀粉、大豆粗粉、黄豆面粉、麦

片、黄豆蛋白浓缩物、黄豆蛋白分离物、增稠的黄豆蛋白浓缩物、化妆品、护发产品、黄豆黄油、纳豆、印尼豆豉、水解的黄豆蛋白、喷射奶油、起酥油、卵磷脂、可食用性完整大豆、黄豆奶酪、豆腐乳、豆腐、腐竹、以及煮熟、研磨、蒸熟、烘焙或煮半熟的谷物。

## HPPD变体和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是2014年3月11日提交的美国临时申请号61/951,455的PCT申请,该申请的内容通过引用以其整体结合在此。

[0003] 对以电子方式提交的序列表的引用

[0004] 经由EFS-Web作为ASCII格式的序列表以电子方式提交序列表的正式文本,其中文件名称是“APA146008ST25”,在2015年3月9日创建并且具有138千字节的大小。此序列表与本说明书同时提交。在此ASCII格式的文档中含有的序列表是本说明书的一部分并且通过引用以其整体结合在此。

### 发明领域

[0005] 本发明涉及植物分子生物学,具体地说是赋予提高的对HPPD抑制剂除草剂的耐受性的新型HPPD多肽。

[0006] 发明背景

[0007] 4-羟苯丙酮酸二加氧酶(HPPD)是催化其中一种酪氨酸降解产物对-羟基苯丙酮酸(在此缩写为HPP)转化成生育酚和质体醌在植物中的前体尿黑酸(在此缩写为HG)的反应的酶(克劳奇N.P. (Crouch N.P.) 等人(1997),四面体(Tetrahedron),53,20,6993-7010,弗里茨(Fritze)等人,(2004),植物生理学(Plant Physiology)134:1388-1400)。生育酚用作膜相关抗氧化剂。质体醌首先用作PSII与细胞色素b6/f复合物之间的电子载体,并且其次是作为参与类胡萝卜素生物合成的八氢番茄红素去饱和酶的氧化还原辅因子。

[0008] 至今,在NCBI数据库中存在的来自不同生物体的超过1000种核酸序列被标注为编码具有HPPD结构域的推定蛋白质。但是对于这些核酸序列中的大部分,还未证实该蛋白质在体外测定或植物方法中具有HPPD酶促活性,也未证实此HPPD蛋白当在植物中表达时能够赋予对HPPD抑制剂除草剂的除草剂耐受性。在现有技术领域中已描述了若干种HPPD蛋白及其基本序列,具体地说是以下各项的HPPD蛋白:细菌,诸如假单胞菌属(瑞奇(Rüetschi)等人,欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.),205,459-466,1992,W096/38567)、克罗地亚属(Kordia)(W02011/076889)、聚球藻属(W02011/076877)、以及红球菌属(W02011/076892);原生物诸如赭纤虫属(W02011/076882);广古菌门诸如嗜酸菌属(W02011/076885);植物诸如拟南芥属(W096/38567,GENBANK®AF047834)、胡萝卜(W096/38567,GENBANK®87257)、燕麦(W02002/046387、W02011/068567)、小麦(W02002/046387)、臂形草(W02002/046387)、蒺藜草(Cenchrus echinatus)(W02002/046387)、硬直黑麦草(W02002/046387)、苇状羊茅(W02002/046387)、大狗尾草(W02002/046387)、牛筋草(Eleusine indica)(W02002/046387)、高粱(W02002/046387、W02012/021785)、玉米(W02012/021785)、球孢子菌属(Coccicoide)(GENBANK®COITRP);日本黄连(Coptis japonica)(W02006/132270)、莱茵衣藻(ES 2275365;W02011/145015);或者哺乳动物诸如小鼠或猪。

[0009] HPPD的抑制导致光合作用的解偶联、辅助性集光色素的缺乏并且最重要的是导致UV-辐射和活性氧(漂白)对叶绿素的破坏(由于缺乏类胡萝卜素通常所提供的光保护)(诺里

斯(Norris)等人(1995),植物细胞(Plant Cell)7:2139-2149)。光合活性组织的漂白导致生长抑制和植物死亡。

[0010] 抑制HPPD的一些分子和在特异性结合该酶时抑制HPP到尿黑酸的转化的一些分子已证实是非常有效的除草剂。

[0011] 目前,大部分可商购获得的HPPD抑制剂除草剂属于以下这些化学剂家族中的一种:

[0012] 1) 三酮类,例如磺草酮[即2-[2-氯-4-(甲磺酰基)苯甲酰基]-1,3-环己二酮]、甲基磺草酮[即2-[4-(甲磺酰基)-2-硝基苯甲酰基]-1,3-环己二酮];氟磺草酮(tembotrione)[即2-[2-氯-4-(甲磺酰基)-3-[(2,2,2-三氟乙氧基)甲基]苯甲酰基]-1,3-环己二酮];特呋三酮(tefuryltrione)[即2-[2-氯-4-(甲磺酰基)-3-[[四氢-2-呋喃基]甲氧基]甲基]苯甲酰基]-1,3-环己二酮];双环吡喃酮[即4-羟基-3-[[2-[(2-甲氧基乙氧基)甲基]-6-(三氟甲基)-3-吡啶基]羰基]双环[3.2.1]辛-3-烯-2-酮];苯并双环酮[即3-(2-氯-4-甲磺酰基)-2-苯基硫代双环[3.2.1]辛-2-烯-4-酮];

[0013] 2) 二酮腈类,例如2-氰基-3-环丙基-1-(2-甲基磺酰基-4-三氟甲基苯基)-丙烷-1,3-二酮和2-氰基-1-[4-(甲基磺酰基)-2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基环丙基)丙烷-1,3-二酮;

[0014] 3) 异噁唑类,例如异噁唑草酮[即(5-环丙基-4-异噁唑基)[2-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯基]甲酮];在植物中,异噁唑草酮以一种展现出HPPD抑制特性的二酮腈化合物DKN形式快速代谢;

[0015] 4) 吡唑特(pyrazolinate)类,例如苯吡唑草酮[即[3-(4,5-二氢-3-异噁唑基)-2-甲基-4-(甲磺酰基)苯基](5-羟基-1-甲基-1H-吡唑-4-基)甲酮]和磺酰草吡唑[即(5-羟基-1,3-二甲基吡唑-4-基)(2-甲磺酰基-4-三氟甲基苯基)甲酮];节草唑(pyrazofen)[即2-[4-(2,4-二氯苯甲酰基)-1,3-二甲基吡唑-5-基氧基]苯乙酮];

[0016] 5) N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类(WO2011/035874)和N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类(WO2012/126932),例如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(在下文中也称为“Cmpd.1”);

[0017] 6) N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类(WO2012/028579),例如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(在下文中也称为“Cmpd.2”);4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(在下文中也称为“Cmpd.3”);2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(在下文中也称为“Cmpd.4”);2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(在下文中也称为“Cmpd.5”);

[0018] 7) 在WO2013/050421和WO2013/083774中描述的哒嗪酮衍生物类;

[0019] 8) 在WO2013/072300和WO2013/072402中描述的取代的1,2,5-噁二唑类;以及

[0020] 9) 在WO2013/054495中描述的奥沙普秦(Oxoprazin)衍生物类。

[0021] 可以针对在显示代谢耐受性的农作物的田地中的青草和/或宽叶杂草使用这些HPPD抑制剂除草剂,这些农作物诸如其中这些除草剂被快速降解的玉蜀黍(玉米)、稻(水稻)和小麦(普通小麦)((舒尔茨(Schulz)等人,(1993),FEBS快报(FEBS letters),318,162-166;米切尔(Mitchell)等人,(2001),益虫治理科学(Pest Management Science),第

57卷,120-128;加西亚(Garcia)等人(2000),生物化学(Biochem.),39,7501-7507;帕利特(Pallett)等人(2001),益虫治理科学,第57卷,133-142)。为了扩展这些HPPD抑制剂除草剂的使用范围,已进行若干努力来赋予植物、特别是不具有代谢耐受性或具有表现不佳的代谢耐受性的植物在农艺学田间条件下可接受的耐受性水平。

[0022] 除了绕开HPPD介导的尿黑酸产生(US 6,812,010)的尝试之外,过度表达敏感性酶以便在植物中产生与除草剂足够相关的量的靶酶(W096/38567)。HPPD的过度表达使得对异噁唑草酮(IFT)的二酮腈衍生物(DKN)的萌发前耐受性更佳,但是该耐受性水平不足以耐受萌发后处理(马特林格(Matringe)等人(2005),益虫治理科学61:269-276)。

[0023] 第三种策略是使HPPD突变以便获得一种靶酶,该靶酶当保留其催化HPP转化成尿黑酸的特性时对HPPD抑制剂比突变前的天然HPPD更不敏感。

[0024] 此策略已成功应用于产生对2-氰基-3-环丙基-1-(2-甲基磺酰基-4-三氟甲基苯基)-丙烷-1,3-二酮和2-氰基-1-[4-(甲基磺酰基)-2-三氟甲基苯基]-3-(1-甲基环丙基)丙烷-1,3-二酮(EP496630)耐受的植物,这两种化合物是属于二酮腈家族的两种HPPD抑制剂除草剂(W099/24585)。Pro215Leu、Gly336Glu、Gly336Ile、以及更特别地是Gly336Trp(突变的氨基酸的位置参考荧光假单胞菌HPPD来指示)被鉴别为负责增加对使用二酮腈除草剂的处理的耐受性的突变。

[0025] 最近,已显示将荧光假单胞菌HPPD基因引入到烟草和大豆的质体基因组中比核转化更有效,这赋予了对萌发后施加的异噁唑草酮的耐受性(杜富尔曼特尔(Dufourmantel)等人(2007),植物生物技术杂志(Plant Biotechnol J.)5(1):118-33)。

[0026] 在W02004/024928中,本发明人寻求通过增加HPP前体到植物细胞中的流入来增加在这些植物细胞中的异戊二烯基醌生物合成(例如,质体醌、生育酚的生物合成)。这已通过经由过度表达预苯酸脱氢酶(PDH)将所述前体的合成与“莽草酸”途径连接来实现。还已注意到用编码PDH酶的基因和编码HPPD酶的基因转化植物使得增加所述植物对HPPD抑制剂的耐受性成为可能。

[0027] 在W02009/144079中,披露了编码在荧光假单胞菌HPPD蛋白的位置336处具有特定突变的羟苯丙酮酸二加氧酶(HPPD)的核酸序列以及其用于获得对HPPD抑制剂耐受的植物的用途。

[0028] 在W02002/046387中,已鉴别来源于植物的HPPD蛋白的若干种结构域,它们可能与赋予对不同HPPD抑制剂除草剂的耐受性有关,但无论在植物中还是在生物化学数据中均未显示证实所述结构域功能的影响。

[0029] 在W02008/150473中,举例说明了两种不同机制(编码突变体HPPD酶和CYP450玉蜀黍单加氧酶(nsf1基因)的修饰燕麦基因)的组合,以便获得提高的对HPPD抑制剂除草剂的耐受性,但是没有数据披露说明基于这两种蛋白质的组合的协同作用。

[0030] 另外,在US2011/0173718中,披露了一种通过不仅过度表达编码耐受性HPPD的基因(如例如来自燕麦)而且过度表达该基因与编码HST(尿黑酸茄呢基转移酶)蛋白的若干种植物基因的组合来生成对HPPD抑制剂耐受的植物的方法。然而,对一些选定的HPPD抑制剂除草剂的耐受性水平相当有限。

[0031] 在W02011/094199和US2011/0185444中,评估了几百种大豆野生型品系对HPPD抑制剂异噁唑草酮的耐受性。非常少的品系显示出合理水平的对这些除草剂的耐受性。鉴别



负责该耐受性的推定的QTL(数量性状座位)。在基因组的此区域内,一种编码ABC转运体的基因被鉴别为负责所观察到的提高的对HPPD抑制剂除草剂的耐受性的主要性状。然而,表达鉴别的基因的转基因植物并未显示对测试的HPPD抑制剂除草剂的耐受性的任何提高。

[0032] 在W02010/085705中,披露了燕麦HPPD的若干突变体。已显示一些变体展示出提高的对三酮类“甲基磺草酮”的体外耐受性,然而,仅非常少的突变体在烟草植物中表达。另外,与表达野生型燕麦HPPD基因的烟草植物相比,表达这些突变体的烟草植物都没有展示出提高的对甲基磺草酮或异噁唑草酮的耐受性。

[0033] US 2012/0042413描述了具有HPPD活性但也显示对至少一种HPPD抑制剂的一定不敏感性的多肽并且进一步表明在HPPD酶的不同位置处的某一组突变,并且最终披露了含有少数此类突变的HPPD的植物的生物化学数据以及耐受性水平。在EP 2453012中,已描述了若干种HPPD突变体;然而,并未证实在植物中所述突变体针对几种HPPD抑制剂除草剂的提高的耐受性。

[0034] 目前描述和部分商业化的HPPD抑制剂除草剂用作缓慢结合或缓慢且紧密结合的抑制剂(参见莫里森(Morrison)(1982)生物化学趋势(Trends Biochem.Sci.)7,102-105)。这些抑制剂缓慢结合(即它们具有缓慢的缔合速率 $k_{on}$ )但非共价地结合HPPD酶(即它们产生时间依赖性抑制),并且由于它们与该酶的过度紧密的相互作用而非常缓慢的释放(即它们具有特别缓慢的解离速率 $k_{off}$ )。

[0035] 这些抑制剂结合如此紧密使得用该酶进行化学计量滴定是可能的。

[0036] 已越来越认识到缓慢结合的或缓慢且紧密结合的抑制剂不仅是非常有效的HPPD抑制剂,而且另外具有使得它们成为用于杂草控制的有吸引力的农药的特征。缓慢的解离速率使得抑制剂有效性增强至一定程度,以使得理想地每个酶活性位点仅一个抑制剂分子是足以完全抑制酶活性并且持续长时间段维持此抑制水平,甚至在植物细胞中不存在游离抑制剂分子的情况下仍维持抑制。这转换成这些抑制剂的低应用率,以控制农作物生长区域内不希望的杂草。

[0037] 当实现HPPD抑制和除草活性是目标时,缓慢结合或缓慢且紧密结合的抑制剂的特性是有利的。然而,当设计对这些抑制剂耐受的HPPD酶时,这些特性是主要的缺点。仅减小该抑制剂与该酶的亲和力( $pI_{50}$ )的HPPD酶中的突变并未完全克服HPPD抑制,因为该抑制剂的结合和该HPPD酶的抑制仍可以发生,并且因此所实现的抑制水平将维持长时间段,甚至在植物细胞中不存在游离抑制剂的情况下仍维持抑制。

[0038] 由于所有目前描述和部分商业化的HPPD抑制剂除草剂的上述动力学特性,迄今未实现具有针对HPPD抑制剂除草剂的完全耐受性的HPPD抑制剂耐受性植物,尽管已做出许多努力来生成这些植物。

## 发明内容

[0039] 在本发明中,描述了显示针对若干类别的HPPD-抑制剂的完全耐受性的HPPD酶和含有这些酶的植物。为了获得高水平的抑制剂耐受性,生成显示缓慢结合或缓慢且紧密结合的抑制剂的解离速率( $k_{off}$ )增加的突变体。在一些实施例中,在突变体酶中同时还实现了抑制剂与该HPPD酶的亲和力( $pI_{50}$ )的减小和抑制剂与HPPD酶的解离速率( $k_{off}$ )的增加。因此,在本发明中,设计一组不具有与HPPD抑制剂的亲和力或仅具有显著减小的亲和力的

HPPD酶,并且同时HPPD抑制剂与该酶的解离速率增加至一定程度,以使得这些HPPD抑制剂不再用作缓慢结合或缓慢且紧密结合的抑制剂,而是与此相反地变成完全可逆的抑制剂。

[0040] 在本发明中,提供了用于获得具有上述特征(即不具有与HPPD抑制剂的亲和力或仅具有显著减小的亲和力、具有增加的HPPD抑制剂与酶的解离速率;HPPD抑制剂不再用作缓慢结合或缓慢且紧密结合的抑制剂但已变成完全可逆的抑制剂)的HPPD酶的组合物和方法。组合物包含HPPD和编码此类多肽的分离、重组或嵌合核酸分子、包含这些核酸分子的载体和宿主细胞。组合物还包含这些多肽的抗体。核苷酸序列可以用于在生物体(包括微生物和植物)中用以转化和表达的DNA构建体或表达盒中。核苷酸序列可以是已设计为在生物体中表达的合成序列,该生物体包括但不限于微生物或植物。

[0041] 这些组合物包含编码除草剂耐受性多肽的核酸分子,包括编码荧光假单胞菌HPPD蛋白的核酸分子,该蛋白质具有在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的脯氨酸和在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的位置处的苯丙氨酸或酪氨酸,以及任选地在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188、200、226、339、以及340相对应的位置处的一个或多个氨基酸取代,包括SEQ ID NO:11-21中任一项所列出的HPPD蛋白及其片段。还包括编码本发明的HPPD蛋白的核酸分子,包括SEQ ID NO:40、41、42、43、或44。

[0042] 组合物还包含通过将本发明的核酸序列引入到植物、植物细胞、组织以及种子中而对HPPD抑制剂除草剂耐受的转化植物、植物细胞、组织、种子。该序列的引入允许HPPD抑制剂除草剂施加于植物,以选择性杀死HPPD抑制剂敏感性杂草或其他未转化植物,而不是转化生物体。这些序列可以另外用作用于选择在一种或多种HPPD抑制剂除草剂存在下生长的植物细胞的标记物。

[0043] 另外提供用于鉴别具有HPPD抑制剂耐受活性的HPPD酶的方法。

[0044] 本发明的组合物和方法适用于产生具有增强的对HPPD抑制剂除草剂的耐受性的生物体。出于农业目的,这些生物体和包含这些生物体的组合物是令人希望的。包含编码根据本发明的HPPD的核酸序列的植物或种子可以在田地中生长并且收获以获得植物产品。本发明的组合物还适用于检测HPPD抑制剂除草剂耐受性蛋白或核酸在产物或生物体中的存在。

[0045] 附图简述

[0046] 图1示出来自微生物和植物种类的HPPD的氨基酸序列的比对,这些氨基酸序列包括荧光假单胞菌(Pf,SEQ ID NO:1)、燕麦(SEQ ID NO:23)、来自燕麦的HPPD的变体(SEQ ID NO:24)、玉米(SEQ ID NO:25)、阿维链霉菌(SEQ ID NO:29)、拟南芥(SEQ ID NO:26)、大麦(SEQ ID NO:27)、野胡萝卜(SEQ ID NO:28)、禾生球腔菌(SEQ ID NO:30)、以及粗球孢子菌(SEQ ID NO:31)、Axmi428H(SEQ ID NO:6)和(SEQ ID NO:5)。

[0047] 图2A示出在1 $\mu$ M HPPD抑制剂存在下时间依赖性HPPD突变体酶的时间依赖性抑制的实例。图2B示出在10 $\mu$ M抑制剂存在下可逆性HPPD突变体酶的可逆性抑制的实例。

[0048] 发明详述

[0049] 本发明现在将在下文中结合附图更充分地描述,在这些附图中示出了本发明的一些而不是所有的实施例。实际上,这些发明可以许多不同形式体现并且不应被解释为对在此所列出的实施例的限制;而是,提供这些实施例以使得本披露将满足适用的法律要求。在全文中类似数字指示类似元件。

[0050] 这些发明所属领域的技术人员受益于以上说明和相关附图中呈现的教义将能想到在此列出的这些发明的许多修饰和其他实施例。因此,将理解的是这些发明不限于所披露的具体实施例并且那些修饰和其他实施例旨在包括在所附权利要求书的范围内。尽管在此使用了特定术语,但是它们仅一般性和描述性的意义上使用并且不是出于限制的目的使用。

#### [0051] 概述

[0052] 已做出若干努力来赋予植物对广泛范围的HPPD抑制剂除草剂的农艺学可接受水平的耐受性,包括绕开HPPD介导的尿黑酸产生(US 6,812,010)、过度表达敏感性酶以便在植物中产生与除草剂足够相关的量的靶酶(WO96/38567)、以及使HPPD突变以便获得一种靶酶,该酶当保留其催化HPP转化成尿黑酸盐的特性时对HPPD抑制剂比突变前的天然HPPD更不敏感。

[0053] 尽管对于显示针对上述几种HPPD抑制剂除草剂的耐受性的植物的开发已获得这些成功,但是仍需要开发并且/或者提高植物对较新或若干不同HPPD抑制剂的耐受性,特别是属于以下类别的HPPD抑制剂:三酮类(例如,磺草酮、甲基磺草酮、氟磺草酮、苯并双环酮以及双环吡喃酮)、吡唑特类(例如,苯吡唑草酮和磺酰草吡唑)、N-(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺(WO2011/035874)、N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺(WO2012/028579)、哒嗪酮衍生物(WO2013/050421和WO2013/083774);取代的1,2,5-噁二唑(WO2013/072300和WO2013/072402);以及奥沙普秦衍生物(WO2013/054495)。

[0054] 因此,本发明提供了用于调节HPPD抑制剂除草剂耐受性的改进组合物和方法。HPPD抑制剂除草剂如以下类别的那些除草剂:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(WO2013/050421和WO2013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(WO2013/072300和WO2013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(WO2013/054495);三酮类,诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮,具有针对广谱的经济上重要的单子叶和双子叶年度有害植物的优异除草活性。这些活性物质还有效地作用于多年生有害植物,这些植物由根茎、木干或其他多年生器官产生芽并且难以控制。在本发明的含义内,“除草剂”被理解为其本身有除草活性的物质或者与改变其功效的添加剂组合的这种物质,该添加剂例如像增加其活性(增效剂)或限制其活性(安全剂)的试剂。除草剂可以进一步包含通常用于配制技术中的固体或液体佐剂或载体(例如,天然或再生的矿物质、溶剂、分散剂、润湿剂、增粘剂、乳化剂、促生长剂以及类似物)、以及一种或多种另外的除草剂和/或一种或多种杀虫剂(例如,杀昆虫剂、杀病毒剂、杀微生物剂、杀阿米巴剂、杀虫剂、杀真菌剂、杀细菌剂、杀线虫剂、杀软体动物剂以及类似

物)。

[0055] 这些方法涉及用编码本发明的HPPD抑制剂耐受性基因的核苷酸序列转化生物体或在不含这些基因的生物体中以其他方式引入此类HPPD抑制剂耐受性基因(例如,通过将含有引入的本发明的HPPD抑制剂基因的生物体与不含它的生物体匹配、细胞融合、或通过将它们杂交并且获得含有它们的子代)。本发明的核苷酸序列适用于制备显示增加的对HPPD抑制剂除草剂的耐受性、特别是增加的对以下类别的HPPD抑制剂除草剂的耐受性的植物:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,优选地诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、以及2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(WO2013/050421和WO2013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(WO2013/072300和WO2013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(WO2013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮。本发明的HPPD抑制剂除草剂耐受性基因还可以显示针对“苯并咪唑衍生物除草剂”的耐受性(在WO2009/090401、WO2009/090402、WO2008/071918、WO2008/009908中描述的)。在此方面,本发明的HPPD抑制剂除草剂耐受性基因中的任一种也可以在还表达如WO2011/145015、WO2013/064987、WO2013/064964或WO2010/029311中所述的嵌合尿黑酸茄呢基转移酶(HST)基因或突变的HST基因的植物中表达,以获得对HST抑制剂除草剂耐受的植物。如在此所用的,“苯并咪唑衍生物除草剂”或“HST抑制剂除草剂”包括属于IUPAC命名法5H-噁喃并[4,3-b]吡啶-8-醇、5H-噁喃并[3,4-b]吡啶-8-醇、噁噻英并(oxathiino)[5,6-b]吡啶-4-醇、以及噁噻英并[5,6-b]吡啶-4-醇的化合物。

[0056] 因此,本发明的“HPPD抑制剂除草剂耐受性”基因是指编码一种蛋白质的基因,该蛋白质赋予细胞或生物体耐受比不表达该蛋白质的此细胞或生物体更高的HPPD抑制剂除草剂浓度的能力,或者耐受一定浓度的HPPD抑制剂除草剂持续比不表达该蛋白质的此细胞或生物体更长的时间的能力,或者赋予细胞或生物体进行光合作用、生长和/或再生而观察到比不表达此蛋白质的此细胞或生物体更少的损害或生长抑制的能力。在不同实施例中,本发明的HPPD基因是选自SEQ ID NO:40、41、42、43、或44。“HPPD抑制剂耐受性蛋白”是指一种蛋白质,该蛋白质赋予细胞或生物体耐受比不表达该蛋白质的此细胞或生物体更高的HPPD抑制剂除草剂浓度的能力,或者耐受一定浓度的HPPD抑制剂除草剂持续比不表达该蛋白质的此细胞或生物体更长的时间的能力,或者赋予细胞或生物体进行光合作用、生长和/或再生而观察到比不表达此蛋白质的此细胞或生物体更少的损害或生长抑制的能力。“耐受”或“耐受性”是指幸存于一种特定的HPPD抑制剂除草剂应用,或者是指以与未处理的细胞或生物体不容易区别的方式进行必需细胞功能诸如光合作用、蛋白质合成或呼吸和再生的能力,或者是指用HPPD抑制剂除草剂处理的植物与未用此除草剂处理的此类植物(但是

其中杂草已通过除应用HPPD抑制剂除草剂之外的机制诸如W02011/100302中所述的方法去除或预防,该专利通过引用以其整体结合在此)相比不具有显著的产率差异或甚至具有提高的产率的能力。

[0057] 除对细胞赋予HPPD抑制剂耐受性之外,本发明的HPPD核酸序列编码具有HPPD活性的多肽,该活性即催化其中对羟苯丙酮酸(HPP)被转化成尿黑酸的反应。HPPD酶的催化活性可以通过本领域已熟知的不同方法来限定。W02009/144079描述了各种适合的筛选方法。

[0058] HPPD蛋白的酶活性可以通过使得测量HPP或O<sub>2</sub>底物的量的减少或测量来源于酶促反应的任何产物诸如尿黑酸或CO<sub>2</sub>的积累成为可能的任何方法来测量。具体地说,HPPD活性可以通过以下各项中所述的方法来测量:W02009/144079;加西亚等人(1997),生物化学杂志325,761-769;加西亚等人(1999),植物生理学119,1507-1516;或W02012/021785,这些文献通过引用结合在此。

[0059] 出于本发明的目的,“参考”HPPD蛋白(或HPPD基因)是与本发明的HPPD蛋白或HPPD基因相比的任何HPPD蛋白或核酸。出于描述本发明的HPPD蛋白的目的,术语“蛋白质”和“多肽”是可互换使用的。此参考HPPD可以是天然植物、细菌或动物HPPD,或者可以是本领域已知的突变HPPD,诸如国际专利公开W02009/144079中所述的并且在此分别列出为SEQ ID NO:20和2的PfP215L和PfG336F突变体,或者可以是在此分别列出为SEQ ID NO:22、37、38、43、5、6、10、以及8的PfHPPDevo33、PfHPPDevo36、PfHPPDevo37、PfHPPDevo40、或PfHPPDevo41、Axmi309H、Axmi428H、Axmi309H-Evo41、或Axmi428H-Evo41,它们也在2013年9月13日提交的国际专利申请号PCT/US2013/59598中描述,并且该专利通过引用结合在此。此参考HPPD可以用于确定本发明的HPPD蛋白或核酸是否具有感兴趣的特定性质(例如,提高的、相当的或减小的HPPD抑制剂除草剂耐受性或HPPD酶活性;在宿主细胞中提高的、相当的或减小的表达;提高的、相当的或减小的蛋白质稳定性,以及类似性质)。

[0060] 于在此的不同实施例中,由核酸编码的HPPD抑制剂除草剂耐受性蛋白(包括其分离、重组和嵌合基因、包含该核酸的载体、宿主细胞、植物、植物部分和种子、由该核酸编码的HPPD多肽及其组合物、以及使用由该核酸编码的蛋白质增加植物对HPPD抑制剂除草剂的耐受性、特别是增加的对以下类别的HPPD抑制剂除草剂的耐受性的方法:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,优选地诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、以及2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(W02013/050421和W02013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(W02013/072300和W02013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(W02013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮)具有在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的脯氨酸和在与SEQ ID NO:1

的氨基酸位置336相对应的位置处的苯丙氨酸或酪氨酸,以及任选地在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置172、188、200、226、339、以及340相对应的位置处的一个或多个氨基酸取代,包括SEQ ID NO:11-21中任一项所列出的HPPD蛋白。“对应于”是指当使用在此任何位置所述的标准比对算法比对两个(或更多个)序列时相对于SEQ ID NO:1中的位置的核苷酸或氨基酸位置。在图1中示出了SEQ ID NO:1与来自不同微生物和植物种类的HPPD氨基酸序列的代表性比对。例如,SEQ ID NO:1的氨基酸位置188、215、335、336、339、以及340分别对应于来自燕麦的HPPD(SEQ ID NO:23)的氨基酸位置241、271、412、413、416、以及417;分别对应于来自大麦的HPPD(SEQ ID NO:27)的氨基酸位置235、265、406、407、410、以及411;分别对应于来自玉米的HPPD(SEQ ID NO:25)的氨基酸位置242、272、413、414、417、以及418,对应于Axmi428H(SEQ ID NO:6)的氨基酸位置209、236、351、352、355、以及356。在欧洲专利公开号EP2453012的表2a和表2b中可见来自不同物种的许多HPPD氨基酸序列的比对,该专利通过引用结合在此。因此,根据关注的HPPD氨基酸序列的长度(与SEQ ID NO:1的序列相比具有额外或更少的残基),相应的位置可以是位于与此关注的HPPD蛋白的位置172、188、200、226、335、336、339、以及340不同的位置处。

[0061] 在一个实施例中,本发明的HPPD(包括编码它的核苷酸序列及其重组和嵌合基因、包含编码本发明的HPPD的核苷酸序列的载体、宿主细胞、植物、植物部分、以及种子)由包含在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的脯氨酸和在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的位置处的苯丙氨酸或酪氨酸的氨基酸序列组成。

[0062] 在另一个实施例中,本发明的HPPD(包括编码它的核苷酸序列及其重组和嵌合基因、包含编码本发明的HPPD的核苷酸序列的载体、宿主细胞、植物、植物部分、以及种子)由包含以下各项的氨基酸序列组成:在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的脯氨酸和在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的位置处的苯丙氨酸或酪氨酸,以及

[0063] (a) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

[0064] (b) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

[0065] (c) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

[0066] (d) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置172相对应的氨基酸位置处的甘氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

[0067] (e) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;或者

[0068] (f) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸。

[0069] 在另一个实施例中,本发明的HPPD(包括编码它的核苷酸序列及其重组和嵌合基因、包含编码本发明的HPPD的核苷酸序列的载体、宿主细胞、植物、植物部分、以及种子)由包含以下各项的氨基酸序列组成:

[0070] (a) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的氨基酸位置处的酪氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置339相对应的氨基酸位置处的甘氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸;

[0071] (b) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的氨基酸位置处的丝氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的氨基酸位置处的组氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的氨基酸位置处的酪氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的丙氨酸;以及

[0072] (c) 在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的脯氨酸、在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的氨基酸位置处的色氨酸、以及在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置340相对应的位置处的甘氨酸。

[0073] 在另一个实施例中,本发明的HPPD(包括编码它的核苷酸序列及其重组和嵌合基因、包含编码本发明的HPPD的核苷酸序列的载体、宿主细胞、植物、植物部分、以及种子)由包含以下各项的氨基酸序列组成:在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置351相对应的氨基酸位置处的脯氨酸和在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置352相对应的位置处的苯丙氨酸或酪氨酸,以及

[0074] (a) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置209相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置247相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的甘氨酸;

[0075] (b) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置221相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置247相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的甘氨酸;

[0076] (c) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置247相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的甘氨酸;

[0077] (d) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置193相对应的氨基酸位置处的甘氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的甘氨酸;

[0078] (e) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置221相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的甘氨酸;或者

[0079] (f) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置209相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置221相对应的氨基酸位置处的异亮氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置247相对应的氨基酸位置处的组氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的甘氨酸。

[0080] 在另一个实施例中,本发明的HPPD(包括编码它的核苷酸序列及其重组和嵌合基因、包含编码本发明的HPPD的核苷酸序列的载体、宿主细胞、植物、植物部分、以及种子)由包含以下各项的氨基酸序列组成:

[0081] (a) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置352相对应的氨基酸位置处的酪氨酸、在与SEQ

ID NO:6的氨基酸位置355相对应的氨基酸位置处的甘氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的甘氨酸；

[0082] (b) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置209相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置221相对应的氨基酸位置处的丝氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置247相对应的氨基酸位置处的组氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置351相对应的氨基酸位置处的丙氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置352相对应的氨基酸位置处的酪氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的丙氨酸；以及

[0083] (c) 在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置351相对应的氨基酸位置处的脯氨酸、在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置352相对应的氨基酸位置处的色氨酸、以及在与SEQ ID NO:6的氨基酸位置356相对应的位置处的甘氨酸。

[0084] 在表1中总结了包含一个或多个氨基酸取代的参考HPPD蛋白和根据本发明的HPPD蛋白的相关氨基酸位置。

[0085] 表1. 参考HPPD蛋白和根据本发明的HPPD蛋白相对于SEQ ID NO:1的氨基酸取代, 还含有对应的SEQ ID NO. 在开放框的情况下, 野生型氨基酸序列 (PfHPPD) 存在于此位置处。

[0086]

		Axmi428H中的氨基酸位置							
SEQ ID NO:		193	209	221	247	351	352	355	356



[0087]

Axmi428H	6	M	I	V	Q	E	G	K	A
Axmi428H-Evo40	7					P	S		E
Axmi428H-Evo41	8					P	W	A	Q
Axmi428H-YG	11						Y		G
Axmi428H-AHPYG	13		A		H	P	Y		G
Axmi428H-IHPYG	18			I	H	P	Y		G
Axmi428H-YGG	12						Y	G	G
Axmi428H-HPYG	16				H	P	Y		G
Axmi428H-GPYG	15	G				P	Y		G
Axmi428H-IPYG	17			I		P	Y		G
Axmi428H-AIHPYG	14		A	I	H	P	Y		G
Axmi428H-ASHAYA	19		A	S	H	A	Y		A
Axmi428H-PWG	21					P	W		G
		Axmi309H中的氨基酸位置							
		172	188	200	226	335	336	339	340
Axmi309H	5	M	I	L	Q	E	G	K	A
Axmi309H-Evo40	8					P	S		E
Axmi309H-Evo41	9					P	W	A	Q
Axmi309H-PWG	21					P	W		G
		PfHPPD中的氨基酸位置							
		172	188	200	226	335	336	339	340
PfHPPD	1	M	A	L	Q	E	G	K	A

[0088] 在另一个实施例中,根据本发明的HPPD蛋白与如SEQ ID NO:1、5或6在此所列出的氨基酸序列具有至少53%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列一致性。

[0089] 可以根据本发明修饰的示例性HPPD序列包括来自细菌的那些序列,例如假单胞菌属某种型或其他蓝藻细菌的序列,例如集胞藻属的序列。该序列也可以是植物来源的,具体地说来源于双子叶植物或单子叶植物。可以引用的有利实例是诸如以下各项的植物:烟草、拟南芥(W096/38567)、野胡萝卜(W096/38567)、玉米(玉米(corn),W02012/021785)、小麦(普通小麦,W02002/046387)、大麦(EP2453012)、燕麦(W02002/046387/W02011/068567)、臂形草(W02002/046387)、蒺藜草(W02002/046387)、硬直黑麦草(W02002/046387)、苇状羊茅(W02002/046387)、大狗尾草(W02002/046387)、牛筋草(W02002/046387)、或高粱(W02002/046387、W02012/021785)。在本发明的一个特定实施例中,可以根据本发明修饰的HPPD是来自细菌或原生生物来源,具体地是来自假单胞菌属某种,更具体地是来自荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌、鞣醌极毛杆菌(鞣醌丛毛单胞菌)、红球菌属某种(W02011/076892)、日本赭纤虫(W02011/076882)、聚球藻属某种(W02011/076877)、克鲁蒂亚·阿尔兹西达菌(*Kordia algicida*)(W02011/076889)、来自广古菌门干嗜酸菌(euryarchaeoate *Picrophilus torridus*)(W02011/076885);或来自植物来源,包括来自拟南芥、双色高粱、稻、普通小麦、大麦、硬直黑麦草或燕麦。

[0090] 出于本发明的目的,本发明的HPPD还包含另外的修饰,例如其中一些氨基酸(例如,1至10个氨基酸)出于克隆目的被替换、添加或缺失,以形成保留HPPD活性(即催化对羟苯丙酮酸转化成尿黑酸的特性)的转运肽融合物等,或者可以是可进一步改进的任何HPPD。例如,可以通过在此所述的修饰进一步改进的HPPD可以是来源于荧光假单胞菌的如SEQ ID NO:2-10、22、37或28中任一项在此所列出的变体HPPD、来源于燕麦的如SEQ ID NO:24在此所列出的变体HPPD、如在W02012/021785(该专利通过引用以其整体结合在此)中的SEQ ID NO:3-326、383-389、393、395、以及397-459中任一项所列出的变体HPPD序列;如在W02011/068567中的SEQ ID NO:2-14和20-50中任一项所列出的HPPD序列,该专利通过引用以其整体结合在此;如在W02010/085705中的SEQ ID NO:15-26中任一项所列出的HPPD序列,该专利通过引用以其整体结合在此;具有如W02009/144079或美国专利6,245,968所述的一种或多种取代的HPPD,这些专利各自通过引用以其整体结合在此;具有W02010/085705中的表1、表2、表5或表6所述的一种或多种取代的HPPD;和/或具有W02011/068567中的表1所述的一种或多种取代的HPPD。

[0091] 在一些实施例中,本发明的核苷酸序列(包括其分离、重组和嵌合基因、包含该核酸序列的载体、宿主细胞、植物、植物部分和种子、由该核酸序列编码的氨基酸序列及其组合物、以及使用该核酸序列增加植物对HPPD抑制剂除草剂的耐受性、特别是增加的对以下类别的HPPD抑制剂除草剂的耐受性的方法:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,优选地诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(W02013/050421和W02013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(W02013/072300和W02013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(W02013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮)编码SEQ ID NO:11-21中任一项所列出的氨基酸序列、以及其片段和变体,它们编码HPPD抑制剂除草剂耐受性多肽。

[0092] A.一种用于测量HPPD抑制剂耐受性的方法

[0093] 用于测量对HPPD抑制剂除草剂的耐受性的任何适合的方法可以用于评估本发明的HPPD序列。耐受性可以通过监测以下各项来测量:细胞或生物体幸存于一种特定的HPPD抑制剂除草剂应用的能力,或者以与未处理的细胞或生物体不容易区别的方式进行必需细胞功能诸如光合作用、蛋白质合成或呼吸和再生的能力,或者用HPPD抑制剂除草剂处理的植物与未用此除草剂处理的此类植物(但是其中杂草已通过除应用HPPD抑制剂除草剂之外的机制去除或预防)相比不具有显著的产率差异或甚至具有提高的产率的能力。在一些实施例中,耐受性可以在不同浓度的不同HPPD抑制剂存在下根据用包含编码对应HPPD蛋白的基因的核酸转化的细胞或生物体的可视指示物表型,或者在HPPD蛋白的体外测定中测量。

剂量反应和与这些指示物表型相关的剂量反应的相对偏移(形成棕色、生长抑制、漂白、除草剂作用等)便于例如以术语GR50(生长减少50%的浓度)或MIC(最小抑制浓度)值表示,其中在不同浓度范围的除草剂下,以基于植物损害、分生组织漂白症状等的正常方式,值的增加对应于所表达的HPPD的固有耐受性的增加。这些数据可以术语例如GR50值表示,这些GR50值由使“剂量”在x-轴上作图并且使“致死百分比”、“除草作用”、“萌发的绿色植物数目”等在y-轴上作图的剂量/反应曲线推导,其中增加的GR50值对应于增加的所表达HPPD的固有耐受性水平。除草剂可以适合地在萌发前或萌发后施加。

[0094] 在不同实施例中,可以通过对测试植物诸如烟草或农作物诸如大豆、玉米或棉花进行基因转移、再生、育种以及喷雾测试来筛选编码根据本发明的HPPD蛋白的核酸或基因或本发明的HPPD蛋白的耐受性水平。与通过此筛选获得的结果一致,相对于不含编码HPPD蛋白的任何外源基因的此类植物、或相对于含有包含编码HPPD的参考DNA、例如荧光假单胞菌编码HPPD的DNA(在与编码本发明的HPPD蛋白的核酸相同的启动子控制下)的基因的植物,此类植物对HPPD抑制剂除草剂更耐受,理想地是对田地施加所建议的正常剂量的至少2倍耐受,甚至更优选地是对田地施加所建议的正常剂量的4倍耐受(例如以下类别的HPPD抑制剂除草剂:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,优选地诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(WO2013/050421和WO2013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(WO2013/072300和WO2013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(WO2013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮)。因此,术语“能够增加植物对作用于HPPD的至少一种除草剂的耐受性”是指与仅表达其内源性HPPD的植物或表达参考HPPD酶的植物相比表达本发明的HPPD的植物对至少1x、2x、或3x、或4x、或更大倍数的正常田地剂量的HPPD抑制剂除草剂的耐受性。在此方面,术语“作用于HPPD的除草剂”不限于已知和/或用作除草剂的物质,而是限于抑制HPPD蛋白的催化活性的任何物质。

[0095] 或者,在定量水平下,可以针对本发明的HPPD蛋白获得数据如pI<sub>50</sub>(pI<sub>50</sub>-值意指抑制50%酶活性所需要的抑制剂浓度(以摩尔浓度计)的log值)并且在任何对应的HPPD抑制剂除草剂存在或不存在下与参考HPPD序列相比较。

[0096] 可以用于评估本发明的HPPD序列的一种特定的、尽管是非限制性类型的测定是比色测定。在此测定中,将具有1%琼脂糖、5mM L-酪氨酸和42mM琥珀酸盐且含有用于载体pSE420(英杰公司(Invitrogen),德国卡尔斯鲁厄(Karlsruhe,Germany))或修饰版本pSE420(pSE420(RI)NX)的选择剂的YT-肉汤-型培养基倒入深孔板中。将含有载体pSE420-HPPD<sub>x</sub>(HPPD<sub>x</sub>意指编码推定的HPPD酶/蛋白的任何基因)的指数生长期大肠杆菌培养物施加

到每个孔中。在37℃下16小时后,不含培养基的孔、已用含有空载体pSE420的大肠杆菌培养物接种的那些孔是无色的,或者已用含有载体pSE420-HPPDx(含有编码无活性HPPD的基因)的大肠杆菌培养物接种的那些孔是无色的,而用含有编码活性HPPD的载体pSE420-HPPDx的大肠杆菌培养物接种的孔是棕色的。先前已证实此测试反映了HPPD活性,无论此活性的来源是什么,并且允许鉴别HPPD活性(US 6,768,044),即在定量水平下。

[0097] B. 将突变引入到HPPD序列中的方法

[0098] 在由本发明的核酸编码的突变HPPD蛋白中,至少一个氨基酸已如上所述地被替换。

[0099] 该替换可以在编码如上所定义的参考HPPD的核酸序列中通过适合于替换的任何方式实现,在所述序列中,编码该氨基酸的密码子有待被与替换该氨基酸的氨基酸相对应的密码子替换,其中所述密码子被广泛描述于文献中并且是技术人员所熟知的。

[0100] 可以使用若干分子生物学方法实现此替换。一种用于制备根据本发明的突变核酸序列和相应蛋白质的适用方法包括对编码先前选定的一种或多种氨基酸的密码子进行定点诱变。用于获得这些定点突变的方法是技术人员所熟知的并且广泛描述于文献中(具体地说:定向诱变:实践方法(Directed Mutagenesis:A Practical Approach),1991,由M.J.麦克弗森(M.J.McPHERSON)编著,IRL出版社),或者是可以采用商业试剂盒(例如来自凯杰(Qiagen)或Stratagene公司的QUIKCHANGE™发光诱变试剂盒)的方法。在定点诱变之后,它适用于通过使用适当的筛选辅助来选择含有对HPPD抑制剂较不敏感的突变HPPD的细胞。上文已描述了实现此筛选的适当筛选方法。

[0101] 或者,编码参考HPPD的DNA序列可以经由计算机模拟来修饰以编码具有在此所述的一种或多种取代的HPPD蛋白,并且然后从新合成。编码突变HPPD蛋白的核苷酸序列可以被引入到如在此任何位置所述的宿主细胞中。

[0102] C. 分离的多核苷酸、以及其变体和片段

[0103] 在一些实施例中,本发明包括分离或重组的多核苷酸。如在此所定义的“重组”多核苷酸或多肽/蛋白质、或其生物活性部分不再存在于其原始的天然生物体中,诸如当包含在异源宿主细胞或转基因植物细胞、种子或植物中时。在一个实施例中,重组多核苷酸不含有天然侧接该多核苷酸所来源的生物体基因组DNA中核酸(即位于该核酸5'端和3'端的序列)的序列(例如蛋白质编码或调节序列)。术语“重组”包括已相对于天然多核苷酸或多肽操纵的多核苷酸或多肽,以使得该多核苷酸或多肽不同于(例如,在化学组成或结构方面)自然界中存在的多核苷酸或多肽。在另一个实施例中,“重组”多核苷酸不含有该多核苷酸所来源的生物体基因组DNA中天然存在的内部序列(即内含子)。此多核苷酸的典型实例是所谓的互补DNA(cDNA)。例如,在不同的实施例中,分离的编码HPPD抑制剂除草剂耐受性的多核苷酸可以含有小于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb或0.1kb的核苷酸序列,该核苷酸序列天然侧接该多核苷酸所来源的细胞基因组DNA中的多核苷酸分子。本发明的核酸分子包括编码本发明的HPPD的那些核酸分子。在一些实施例中,本发明的核酸分子可操作地连接至能够指导核酸分子在宿主细胞(例如,植物宿主细胞或细菌宿主细胞)中表达的启动子。

[0104] 本发明进一步考虑编码SEQ ID NO:11-21中任一项所列出的氨基酸序列的任何核酸序列的变体和片段。多核苷酸的“片段”可以编码多肽生物活性部分,或者它可以是可用

作使用在此任何位置披露的方法的杂交探针或PCR引物的片段。根据预期用途,作为多核苷酸片段的多核苷酸包含至少约15、20、50、75、100、200、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1050、1100、1150个连续核苷酸或者达到在此所披露的全长多核苷酸中存在的核苷酸数目(例如,在此披露的HPPD核酸)。“连续的”核苷酸是指彼此紧邻的核苷酸残基。

[0105] 本发明的多核苷酸片段通常将编码保留全长HPPD抑制剂除草剂耐受性蛋白的生物活性的多肽片段;即,除草剂耐受性活性。“保留除草剂耐受性活性”旨在该片段将具有在此披露为SEQ ID NO:11-21的全长HPPD抑制剂除草剂耐受性蛋白的至少约30%、至少约50%、至少约70%、至少约80%、85%、90%、95%、100%、110%、125%、150%、175%、200%、250%、至少约300%或更大的除草剂耐受性活性。用于测量除草剂耐受性活性的方法是本领域已熟知的并且在此描述了示例性方法。在一个非限制性实例中,本发明的片段将对相同剂量的HPPD抑制剂除草剂耐受,或对1x、2x、3x、4x、或更高剂量的HPPD抑制剂除草剂耐受,或者这些片段基于该片段与SEQ ID NO:11-21之间的 $pI_{50}$ 或 $K_i$ 将具有相同或更大的耐受性。

[0106] 编码本发明的多肽生物活性部分的多核苷酸片段将编码至少约150、175、200、250、300、350个连续的氨基酸,或达到本发明全长多肽中存在的氨基酸总数。在一个非限制性实例中,多核苷酸片段编码HPPD蛋白生物活性部分,该HPPD蛋白具有在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335相对应的氨基酸位置处的脯氨酸和在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置336相对应的位置处的苯丙氨酸或酪氨酸,以及任选地在与SEQ ID NO:1的氨基酸位置172、188、200、226、339、以及340相对应的位置处的一个或多个氨基酸取代,包括SEQ ID NO:11-21中任一项所列出的HPPD蛋白。

[0107] 本发明还包括如上所述的变体多核苷酸。多核苷酸的“变体”还包含编码本发明的HPPD但因为遗传密码的简并性而保守性不同的那些序列,以及具有足够一致性的那些序列。本发明的变体将保留HPPD酶活性和HPPD除草剂抑制剂耐受性。术语“足够一致”是指使用标准参数利用一种比对程序与参考序列相比具有至少约53%、至少约60%或65%序列一致性、约70%或75%序列一致性、约80%或85%序列一致性、约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的多肽或多核苷酸序列。本领域的技术人员将会认识到,这些值通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等,可以适当调整以确定由两个多核苷酸编码的多肽的相应一致性。

[0108] 细菌基因通常在开放阅读框的起始点附近拥有多个蛋氨酸起始密码子。通常,在一个或多个这些起始密码子处的翻译起始将引起功能蛋白质的产生。这些起始密码子可以包括ATG密码子。然而,细菌例如芽孢杆菌某种(*Bacillus* sp.)也识别GTG作为起始密码子,并且在GTG密码子处起始翻译的蛋白质在第一氨基酸处包含蛋氨酸。此外,通常不确定这些密码子中的哪个先天地在细菌中被天然地利用。因此,应理解使用一个替代的蛋氨酸密码子也可以引起赋予除草剂耐受性的变体的产生。这些除草剂耐受性蛋白被包括在本发明中,并且可以用于本发明的方法中。通过使用众所周知的分子生物学技术,例如聚合酶链式反应(PCR)和如下文概述的杂交技术,可以识别天然存在的等位基因变体。变体多核苷酸还包括例如通过定点诱变或其他诱变策略生成但仍编码具有希望的生物活性的多肽的合成来源的多核苷酸。

[0109] 技术人员将进一步了解的是,可以通过对本发明的多核苷酸进行进一步突变而引入变化,以此导致编码的多肽的氨基酸序列的进一步变化,而不改变这些多肽的生物活性。因此,可以通过将一个或多个另外的核苷酸取代、添加或缺失引入到编码本发明的HPPD的相应多核苷酸中使得1-5、1-10、或1-15个氨基酸取代、添加或缺失、或者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、或15个氨基酸取代、添加或缺失被引入到编码的多肽中来形成分离的变体多核苷酸。通过标准技术诸如定点诱变和PCR-介导的诱变、或基因改组技术,可以引入另外的突变。这些变体多核苷酸也包括在本发明中。

[0110] 通过沿着全部或部分编码序列随机引入突变,诸如通过饱和诱变或置换诱变,可以产生变体多核苷酸,并且可以筛选具有赋予除草剂耐受性活性的能力的所得突变体,以鉴别保留活性的突变体。

[0111] 用于生成变体的额外方法包括使表达在此披露的蛋白质(或其文库)的细胞经受对该蛋白质活性形成应激的特定条件。特定条件可以包括(但不限于)温度的变化、pH的变化和底物或抑制剂浓度的变化。蛋白质文库可以在蛋白质表达(例如,在大肠杆菌或其他宿主中)时间过程中或在形成蛋白质提取物之后、或在蛋白质纯化之后经受这些条件。

[0112] 然后将已经受应激条件的蛋白质文库的功能或酶促活性与参考蛋白进行比较,以鉴别具有改进的特性的蛋白质。此活性比较可以作为生长筛选的一部分或者可替代地作为定量蛋白质活性的酶促测定的一部分来进行。可鉴别为改进的特性可以包括HPPD抑制剂除草剂耐受性、动力学常数的变化(包括 $K_m$ 、 $K_i$ 、 $k_{cat}$ )、蛋白质稳定性、蛋白质热稳定性、或蛋白质温度和pH最佳值

[0113] D. 分离的蛋白质及其变体和片段

[0114] 除草剂耐受性多肽也包括在本发明中。除草剂耐受性多肽包括具有小于约30%、20%、10%、或5%(按干重计)的非除草剂耐受性多肽(在此也称为“污染的蛋白质”)的多肽制品。在本发明中,“除草剂耐受性蛋白”是指在此披露的HPPD多肽。还提供其片段、生物活性部分和变体,并且它们可以用于实践本发明的方法。

[0115] “片段”或“生物活性部分”包括含有编码除草剂耐受性的一部分氨基酸序列并且保留除草剂耐受活性的多肽片段。除草剂耐受性蛋白的生物活性部分可以是长度为例如10、25、50、100或更多个氨基酸的多肽。此类生物活性部分可以通过重组技术制备并用于除草剂耐受性活性的评估。

[0116] “变体”是指具有与SEQ ID NO:11-21中任一项至少约53%、60%、65%、约70%、75%、约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同的氨基酸序列的蛋白质或多肽,其中所述变体具有HPPD酶活性和HPPD抑制剂除草剂耐受性。本领域技术人员将认识到这些值可以通过考虑密码子简并性、氨基酸相似性、阅读框定位等来适当调整以确定由两个多核苷酸编码的多肽的相应一致性。

[0117] 例如,保守性氨基酸取代可以在一个或多个非必需氨基酸残基处进行。“非必需”氨基酸残基是可以从多肽参考序列改变而不改变生物活性的残基,而“必需”氨基酸残基是生物活性所需要的。“保守性氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的一种氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基的家族已在本领域中定义。这些家族包括具有以下侧链的氨基酸: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)、不带电的极性侧链(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、蛋氨酸、色氨酸)、 $\beta$ -分支侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。氨基酸取代可以在保留功能的非保守区域进行。总的来说,不会对保守性氨基酸残基,或驻留在保守基序内的氨基酸残基进行此类取代,其中这些残基对于多肽活性是必需。然而,在本技术领域的技术人员能理解功能性变异在保守性氨基酸残基中可以轻微的保守或非保守的改变。

[0118] 还包括本发明的HPPD、或其变体或片段的抗体。用于产生抗体的方法是本领域已熟知的(参见,例如,哈洛(Harlow)和拉内(Lane)(1988)抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual),冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),纽约冷泉港(Cold Spring Harbor,NY);美国专利号4,196,265)。

[0119] 因此,本发明的一个方面涉及特异性地结合一个或多个本发明的蛋白质或肽分子及其同系物、融合物或片段的抗体、单链抗原结合分子、或其它的蛋白质。在一个特别优选的实施例中,该抗体特异性结合具有在SEQ ID NO:11-21中列出的氨基酸序列的蛋白质或其片段。在另一个实施例中,该抗体特异性结合融合蛋白或其片段,该融合蛋白包含选自SEQ ID NO:11-21中列出的氨基酸序列的氨基酸序列。在一些实施例中,该抗体特异性结合以下各项:与SEQ ID NO:1的氨基酸位置178相对应的蛋白质区域、或与SEQ ID NO:1的氨基酸位置188相对应的蛋白质区域、或与SEQ ID NO:1的氨基酸位置200相对应的蛋白质区域、或与SEQ ID NO:1的氨基酸位置226相对应的蛋白质区域、或与SEQ ID NO:1的氨基酸位置335-340相对应的蛋白质区域。在其他实施例中,该抗体特异性结合以下各项:与SEQ ID NO:6的氨基酸位置193相对应的蛋白质区域、或与SEQ ID NO:6的氨基酸位置209相对应的蛋白质区域、或与SEQ ID NO:6的氨基酸位置221相对应的蛋白质区域、或与SEQ ID NO:6的氨基酸位置247相对应的蛋白质区域、或与SEQ ID NO:6的氨基酸位置351-356相对应的蛋白质区域。

[0120] 本发明的抗体可以用于定量或定性地检测本发明的蛋白质或肽分子,或用于检测蛋白质的翻译后修饰。如在此使用的,如果结合是不被非相关分子的存在竞争性地抑制,则认为抗体或肽“特异性地结合”本发明的蛋白质或肽分子。

#### [0121] E. 基因叠加

[0122] 在农作物的商业生产中,希望的是在可靠的杀虫管理下从农作物田地中除去不需要的植物(即“杂草”)。理想的处理是可以施加于整个田地中但仅除去不需要的植物而留下不受影响的农作物的一种处理。一种这样的处理系统将涉及使用对除草剂耐受的农作物,以使得当在除草剂耐受性农作物田地上喷洒除草剂时,农作物继续茁壮生长而非除草剂耐受性杂草被杀死或受到严重损害。理想地,此处理系统将利用不同的除草剂特性,以使得杂草控制可以提供最大可能的柔性和经济的组合。例如,个别除草剂在田地中具有不同的使用寿命,并且一些除草剂在它们施加于田地中之后持续且有效地持续相对长的时间,而其他除草剂快速分解成其他和/或无活性化合物。一种理想的处理系统将允许使用不同的除草剂,以使得培育者能对特定情况更改除草剂的选择。

[0123] 虽然许多除草剂耐受性农作物目前是商业上可获得的,但是许多商用除草剂和除草剂/农作物组合出现的一个问题是,个别除草剂典型地具有针对常见杂草种类的不完整活性谱。对于已使用一些时间的大部分单一除草剂而言,除草剂耐受性杂草种类和生物型的

群体变得更加普遍(参见,例如,特瑞纳(Tranel)和赖特(Wright)(2002)杂草科学(Weed Science) 50:700-712;欧文(Owen)和赛拉亚(Zelaya)(2005)益虫治理科学61:301-311)。已描述了对超过一种除草剂耐受的转基因植物(参见,例如,W02005/012515)。然而,在农作物生产、杂草控制选项、残余杂草控制、以及农作物产率提高的各方面持续需要改进。

[0124] 本发明的HPPD蛋白或核苷酸序列有利地在植物中与编码赋予此类植物有用的农艺学特性的蛋白质或RNA的其他基因组合。在编码对转化植物赋予有用的农艺学特性的蛋白质或RNA的基因中,可以提及的是编码赋予对一种或多种除草剂(该除草剂根据其化学结构而不同于HPPD抑制剂除草剂)的耐受性的蛋白质、以及赋予对某些昆虫的耐受性的其他蛋白质、赋予对某些疾病的耐受性的那些蛋白质的DNA序列,编码提供线虫或昆虫控制的RNA的DNA等。

[0125] 此类基因特别描述于公开的PCT专利申请W091/02071和W095/06128以及美国专利7,923,602和美国专利公开号20100166723中,这些专利各自通过引用以其整体结合在此。

[0126] 在编码赋予转化植物细胞和植物对某些除草剂的耐受性的蛋白质的DNA序列中,可以提及的是W02009/152359中描述的赋予对草丁磷除草剂的耐受性的bar或PAT基因或天蓝色链霉菌基因、编码赋予对以EPSPS为靶标的除草剂(诸如草甘膦及其盐)的耐受性的适合EPSPS的基因(US 4,535,060、US 4,769,061、US 5,094,945、US 4,940,835、US 5,188,642、US 4,971,908、US 5,145,783、US 5,310,667、US 5,312,910、US 5,627,061、US 5,633,435)、编码草甘膦-n-乙酰转移酶的基因(例如,US 8,222,489、US 8,088,972、US 8,044,261、US 8,021,857、US 8,008,547、US 7,999,152、US 7,998,703、US 7,863,503、US 7,714,188、US 7,709,702、US 7,666,644、US 7,666,643、US 7,531,339、US 7,527,955、以及US 7,405,074)、或编码草甘膦氧化还原酶的基因(例如,US 5,463,175)。

[0127] 在编码赋予对以EPSPS为靶标的除草剂的耐受性的适合EPSPS的DNA序列中,将更具体地提及的是编码植物EPSPS、具体地是玉蜀黍EPSPS、具体地是包含两个突变(具体地是在氨基酸位置102处的突变和在氨基酸位置106处的突变)并且描述于专利申请US 6566587(在下文中称为双突变体玉蜀黍EPSPS或2mEPSPS)的玉蜀黍EPSPS(W02004/074443)的基因、或者编码从土壤杆菌属中分离的EPSPS并且通过美国专利5,633,435的序列ID No.2和序列ID No.3描述的基因(也称为CP4)。

[0128] 在编码赋予对以EPSPS为靶标的除草剂的耐受性的适合EPSPS的DNA序列中,将更具体地提及的是编码来自球形节杆菌的EPSPS GRG23而且编码突变体GRG23ACE1、GRG23ACE2或GRG23ACE3,具体地是如W02008/100353中所述的GRG23突变体或变体,诸如W02008/100353中的SEQ ID No.29的GRG23(ace3)R173K的基因。

[0129] 在编码EPSPS并且更具体地说编码以上基因的DNA序列的情况下,编码这些酶的序列有利地在编码转运肽、具体地说是在美国专利5,510,471或5,633,448中的“优化转运肽”的序列前面。

[0130] 可以与本发明的核酸序列组合的示例性除草剂耐受性性状进一步包括至少一种ALS(乙酰乳酸合酶)抑制剂(W02007/024782);突变的拟南芥ALS/AHAS基因(美国专利6,855,533);编码通过代谢赋予对2,4-D(2,4-二氯苯氧基乙酸)的耐受性的2,4-D-单加氧酶的基因(美国专利6,153,401);以及编码通过代谢赋予对麦草畏(3,6-二氯-2-甲氧基苯甲酸)的耐受性的麦草畏单加氧酶的基因(US 2008/0119361和US 2008/0120739)。



[0131] 在不同实施例中,本发明的HPPD与一种或多种除草剂耐受性基因叠加,这些耐受性基因包括一种或多种另外的HPPD抑制剂除草剂耐受性基因、和/或对草甘膦和/或草丁磷耐受的一种或多种基因。在一个实施例中,本发明的HPPD与2mEPSPS和bar组合。

[0132] 在编码涉及耐昆虫特性的蛋白质的DNA序列中,将更具体地提及的是文献中广泛描述的并且本领域技术人员已熟知的Bt蛋白质。还将提及的是从细菌诸如光杆状菌属中提取的蛋白质(WO97/17432&WO98/08932)。

[0133] 在编码赋予新耐昆虫特性的感兴趣蛋白质的此类DNA序列中,将更具体地提及的是文献中广泛描述的并且本领域技术人员已熟知的Bt Cry或VIP蛋白质。这些蛋白质包括Cry1F蛋白或源自Cry1F蛋白的杂合体(例如,US 6,326,169;US 6,281,016;US 6,218,188中所述的杂合Cry1A-Cry1F蛋白或其毒性片段)、Cry1A-型蛋白或其毒性片段、优选地Cry1Ac蛋白或源自Cry1Ac蛋白的杂合体(例如,US 5,880,275中所述的杂合Cry1Ab-Cry1Ac蛋白)或如EP451878中所述的Cry1Ab或Bt2蛋白或其杀昆虫片段、如WO2002/057664中所述的Cry2Ae、Cry2Af或Cry2Ag蛋白或其毒性片段、WO 2007/140256中所述的Cry1A.105蛋白(SEQ ID No.7)或其毒性片段、NCBI登记ABG20428的VIP3Aa19蛋白、NCBI登记ABG20429的VIP3Aa20蛋白(在WO 2007/142840中的SEQ ID No.2)、在COT202或COT203棉花事件中产生的VIP3A(分别为WO2005/054479和WO2005/054480)、如WO2001/47952中所述的Cry蛋白、如埃斯特鲁奇(Estruch)等人(1996)美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A) 28; 93(11):5389-94和US 6,291,156中所述的VIP3Aa蛋白或其毒性片段;来自致病杆菌属(如WO98/50427中所述的)、沙雷氏菌属(具体地是来自嗜虫沙雷氏菌(*S.entomophila*))或光杆状菌属菌株的杀昆虫蛋白,诸如来自光杆状菌属的如WO98/08932中所述的Tc-蛋白(例如,沃特菲尔德(Waterfield)等人,2001,应用与环境微生物学(Appl Environ Microbiol.) 67(11):5017-24;法伦许-康斯坦特(Ffrench-Constant)和鲍恩(Bowen),2000,细胞与分子生命科学(Cell Mol Life Sci.);57(5):828-33)。在此还包括一些(1-10,优选地1-5个)氨基酸不同于任一以上序列的这些蛋白质中任一种的任何变体或突变体,这些序列具体地是其毒性片段的序列、或融合至转运肽诸如质体转运肽、或另一种蛋白质或肽的序列。

[0134] 在不同实施例中,本发明的HPPD序列可以在植物中与赋予所希望的性状的一种或多种基因组合,这些性状诸如除草剂耐受性、昆虫耐受性、耐旱性、线虫控制、水分利用效率、氮利用效率、提高的营养价值、抗病性、提高的光合作用、提高的纤维品质、胁迫耐受性、提高的再生、以及类似性状。

[0135] 在相同种类的植物中可以与本发明的基因组合的特别适用的转基因事件(例如通过将含有另一个转基因事件的植物与本发明的嵌合基因杂交或通过用本发明的嵌合基因再转化该植物)包括事件531/PV-GHBK04(棉花,昆虫控制,在WO2002/040677中所述的)、事件1143-14A(棉花,昆虫控制,无保藏,在WO2006/128569中所述的);事件1143-51B(棉花,昆虫控制,无保藏,在WO2006/128570中所述的);事件1445(棉花,除草剂耐受性,无保藏,在US-A 2002-120964或WO2002/034946中所述的);事件17053(稻,除草剂耐受性,保藏为PTA-9843,在WO2010/117737中所述的);事件17314(稻,除草剂耐受性,保藏为PTA-9844,在WO2010/117735中所述的);事件281-24-236(棉花,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为PTA-6233,在WO2005/103266或US-A 2005-216969中所述的);事件3006-210-23(棉花,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为PTA-6233,在US-A 2007-143876或WO2005/103266中所述的);事

件3272(玉米,品质性状,保藏为PTA-9972,在W02006/098952或US-A 2006-230473中所述的);事件33391(小麦,除草剂耐受性,保藏为PTA-2347,在W02002/027004中所述的)、事件40416(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-11508,在W0 11/075593中所述的);事件43A47(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-11509,在W02011/075595中所述的);事件5307(玉米,昆虫控制,保藏为ATCC PTA-9561,在W02010/077816中所述的);事件ASR-368(常绿草,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-4816,在US-A 2006-162007或W02004/053062中所述的);事件B16(玉米,除草剂耐受性,无保藏,在US-A 2003-126634中所述的);事件BPS-CV127-9(大豆,除草剂耐受性,保藏为NCIMB No.41603,在W02010/080829中所述的);事件BLR1(油菜,雄性不育的恢复,保藏为NCIMB 41193,在W02005/074671中所述的)、事件CE43-67B(棉花,昆虫控制,保藏为DSM ACC2724,在US-A 2009-217423或W02006/128573中所述的);事件CE44-69D(棉花,昆虫控制,无保藏,在US-A 2010-0024077中所述的);事件CE44-69D(棉花,昆虫控制,无保藏,在W02006/128571中所述的);事件CE46-02A(棉花,昆虫控制,无保藏,在W02006/128572中所述的);事件COT102(棉花,昆虫控制,无保藏,在US-A 2006-130175或W02004/039986中所述的);事件COT202(棉花,昆虫控制,无保藏,在US-A 2007-067868或W02005/054479中所述的);事件COT203(棉花,昆虫控制,无保藏,在W02005/054480中所述的);事件DAS21606-3/1606(大豆,除草剂耐受性,保藏为PTA-11028,在W02012/033794中所述的)、事件DAS40278(玉米,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-10244,在W02011/022469中所述的);事件DAS-44406-6/pDAB8264.44.06.1(大豆,除草剂耐受性,保藏为PTA-11336,在W02012/075426中所述的)、事件DAS-14536-7/pDAB8291.45.36.2(大豆,除草剂耐受性,保藏为PTA-11335,在W02012/075429中所述的)、事件DAS-59122-7(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA 11384,在US-A 2006-070139中所述的);事件DAS-59132(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,无保藏,在W02009/100188中所述的);事件DAS68416(大豆,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-10442,在W02011/066384或W02011/066360中所述的);事件DP-098140-6(玉米,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-8296,在US-A 2009-137395或W0 08/112019中所述的);事件DP-305423-1(大豆,品质性状,无保藏,在US-A 2008-312082或W02008/054747中所述的);事件DP-32138-1(玉米,杂交系统,保藏为ATCC PTA-9158,在US-A 2009-0210970或W02009/103049中所述的);事件DP-356043-5(大豆,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-8287,在US-A 2010-0184079或W02008/002872中所述的);事件EE-1(茄子,昆虫控制,无保藏,在W0 07/091277中所述的);事件FI117(玉米,除草剂耐受性,保藏为ATCC 209031,在US-A 2006-059581或W0 98/044140中所述的);事件FG72(大豆,除草剂耐受性,保藏为PTA-11041,在W02011/063413中所述的)、事件GA21(玉米,除草剂耐受性,保藏为ATCC 209033,在US-A 2005-086719或W0 98/044140中所述的);事件GG25(玉米,除草剂耐受性,保藏为ATCC 209032,在US-A 2005-188434或W0 98/044140中所述的);事件GHB119(棉花,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-8398,在W02008/151780中所述的);事件GHB614(棉花,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-6878,在US-A 2010-050282或W02007/017186中所述的);事件GJ11(玉米,除草剂耐受性,保藏为ATCC 209030,在US-A 2005-188434或W098/044140中所述的);事件GM RZ13(甜菜,抗病毒性,保藏为NCIMB-41601,在W02010/076212中所述的);事件H7-1(甜菜,除草剂耐受性,保藏为NCIMB 41158或NCIMB 41159,在US-A 2004-172669或W0 2004/074492中

所述的);事件JOPLIN1(小麦,耐病性,无保藏,在US-A 2008-064032中所述的);事件LL27(大豆,除草剂耐受性,保藏为NCIMB41658,在W02006/108674或US-A 2008-320616中所述的);事件LL55(大豆,除草剂耐受性,保藏为NCIMB 41660,在W0 2006/108675或US-A 2008-196127中所述的);事件LL棉花25(棉花,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-3343,在W02003/013224或US-A 2003-097687中所述的);事件LL稻06(稻,除草剂耐受性,保藏为ATCC 203353,在US 6,468,747或W02000/026345中所述的);事件LL稻62(稻,除草剂耐受性,保藏为ATCC 203352,在W02000/026345中所述的)、事件LL稻601(稻,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-2600,在US-A 2008-2289060或W02000/026356中所述的);事件LY038(玉米,品质性状,保藏为ATCC PTA-5623,在US-A 2007-028322或W02005/061720中所述的);事件MIR162(玉米,昆虫控制,保藏为PTA-8166,在US-A 2009-300784或W02007/142840中所述的);事件MIR604(玉米,昆虫控制,无保藏,在US-A 2008-167456或W02005/103301中所述的);事件MON15985(棉花,昆虫控制,保藏为ATCC PTA-2516,在US-A2004-250317或W02002/100163中所述的);事件MON810(玉米,昆虫控制,无保藏,在US-A 2002-102582中所述的);事件MON863(玉米,昆虫控制,保藏为ATCC PTA-2605,在W02004/011601或US-A 2006-095986中所述的);事件MON87427(玉米,授粉控制,保藏为ATCC PTA-7899,在W02011/062904中所述的);事件MON87460(玉米,胁迫耐受性,保藏为ATCC PTA-8910,在W02009/111263或US-A 2011-0138504中所述的);事件MON87701(大豆,昆虫控制,保藏为ATCC PTA-8194,在US-A 2009-130071或W02009/064652中所述的);事件MON87705(大豆,品质性状-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-9241,在US-A 2010-0080887或W02010/037016中所述的);事件MON87708(大豆,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-9670,在W02011/034704中所述的);事件MON87712(大豆,产率,保藏为PTA-10296,在W02012/051199中所述的)、事件MON87754(大豆,品质性状,保藏为ATCC PTA-9385,在W02010/024976中所述的);事件MON87769(大豆,品质性状,保藏为ATCC PTA-8911,在US-A2011-0067141或W02009/102873中所述的);事件MON88017(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-5582,在US-A 2008-028482或W02005/059103中所述的);事件MON88913(棉花,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-4854,在W02004/072235或US-A 2006-059590中所述的);事件MON88302(油菜,除草剂耐受性,保藏为PTA-10955,在W02011/153186中所述的)、事件MON88701(棉花,除草剂耐受性,保藏为PTA-11754,在W02012/134808中所述的)、事件MON89034(玉米,昆虫控制,保藏为ATCC PTA-7455,在W0 07/140256或US-A 2008-260932中所述的);事件MON89788(大豆,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-6708,在US-A 2006-282915或W02006/130436中所述的);事件MS11(油菜,授粉控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-850或PTA-2485,在W02001/031042中所述的);事件MS8(油菜,授粉控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-730,在W02001/041558或US-A 2003-188347中所述的);事件NK603(玉米,除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-2478,在US-A 2007-292854中所述的);事件PE-7(稻,昆虫控制,无保藏,在W02008/114282中所述的);事件RF3(油菜,授粉控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-730,在W02001/041558或US-A 2003-188347中所述的);事件RT73(油菜,除草剂耐受性,无保藏,在W02002/036831或US-A 2008-070260中所述的);事件SYHT0H2/SYN-000H2-5(大豆,除草剂耐受性,保藏为PTA-11226,在W02012/082548中所述的)、事件T227-1(甜菜,除草剂耐受性,无保藏,在W02002/44407或US-A 2009-265817中所述的);事件T25(玉米,除草剂耐受性,无保藏,在

US-A 2001-029014或W02001/051654中所述的);事件T304-40(棉花,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-8171,在US-A 2010-077501或W02008/122406中所述的);事件T342-142(棉花,昆虫控制,无保藏,在W02006/128568中所述的);事件TC1507(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,无保藏,在US-A 2005-039226或W02004/099447中所述的);事件VIP1034(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为ATCC PTA-3925.,在W02003/052073中所述的)、事件32316(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为PTA-11507,在W02011/084632中所述的)、事件4114(玉米,昆虫控制-除草剂耐受性,保藏为PTA-11506,在W02011/084621中所述的)、事件EE-GM3/FG72(大豆,除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-11041),任选地与以下各项叠加:事件EE-GM1/LL27或事件EE-GM2/LL55(W02011/063413A2)、事件DAS-68416-4(大豆,除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-10442,W02011/066360A1)、事件DAS-68416-4(大豆,除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-10442,W02011/066384A1)、事件DP-040416-8(玉米,昆虫控制,ATCC登记号PTA-11508,W02011/075593A1)、事件DP-043A47-3(玉米,昆虫控制,ATCC登记号PTA-11509,W02011/075595A1)、事件DP-004114-3(玉米,昆虫控制,ATCC登记号PTA-11506,W02011/084621A1)、事件DP-032316-8(玉米,昆虫控制,ATCC登记号PTA-11507,W02011/084632A1)、事件MON-88302-9(油菜,除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-10955,W02011/153186A1)、事件DAS-21606-3(大豆,除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-11028,W02012/033794A2)、事件MON-87712-4(大豆,品质性状,ATCC登记号PTA-10296,W02012/051199A2)、事件DAS-44406-6(大豆,叠加的除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-11336,W02012/075426A1)、事件DAS-14536-7(大豆,叠加的除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-11335,W02012/075429A1)、事件SYN-000H2-5(大豆,除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-11226,W02012/082548A2)、事件DP-061061-7(油菜,除草剂耐受性,无保藏号可用,W02012071039A1)、事件DP-073496-4(油菜,除草剂耐受性,无保藏号可用,US2012131692)、事件8264.44.06.1(大豆,叠加的除草剂耐受性,登记号PTA-11336,W02012075426A2)、事件8291.45.36.2(大豆,叠加的除草剂耐受性,登记号PTA-11335,W02012075429A2)、事件SYHT0H2(大豆,ATCC登记号PTA-11226,W02012/082548A2)、事件MON88701(棉花,ATCC登记号PTA-11754,W02012/134808A1)、事件KK179-2(alfalfa,ATCC登记号PTA-11833,W02013/003558A1)、事件pDAB8264.42.32.1(大豆,叠加的除草剂耐受性,ATCC登记号PTA-11993,W02013/010094A1)、事件MZDT09Y(玉米,ATCC登记号PTA-13025,W02013/012775A1)。

#### [0136] F. 多核苷酸构建体

[0137] 编码本发明的HPPD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。编码在此鉴别的多肽的多核苷酸可以被提供在表达盒中,以在感兴趣的植物中表达。“植物表达盒”包含能够引起多核苷酸在植物细胞中表达的DNA构建体,包括重组DNA构建体。盒可以在5'-3'的转录方向,包含可操作地连接至感兴趣的一个或多个多核苷酸的转录起始区(即启动子,具体地是异源性启动子)、和/或在植物中起作用的翻译和转录终止区(即终端区)。该盒可以另外含有有待引入到生物体中的至少一个附加多核苷酸,例如选择性标记基因。或者,一个或多个附加多核苷酸可以设置于多个表达盒上。这样的表达盒设有多个限制位点,以用于在调控区的转录调控作用下插入该一个或多个多核苷酸。

[0138] 在另一个实施例中,本发明涉及一种包含编码序列的嵌合基因,该编码序列包含可操作地连接至植物可表达启动子的本发明的核酸和任选地转录终止区和聚腺苷酸化区。

“异源”通常是指如下多核苷酸或多肽,其对于细胞不是内源的或对于它所存在的天然基因组中的位置不是内源的,且已经通过感染、转染、显微注射、电穿孔、显微映像等添加到细胞中。“可操作地连接”是指两个多核苷酸之间的功能性连接。例如,当启动子可操作地连接至DNA序列时,启动子序列开始并介导DNA序列的转录。应认识到可操作地连接的多核苷酸可以是连续的或可以是不连续的,并且在用于提及两个多肽编码区的连接时,在相同阅读框中表达这些多肽。

[0139] 该启动子可以是在选定的植物细胞、植物部分或植物中显示转录活性的任何多核苷酸序列。启动子可以是对于本发明的植物宿主和/或DNA序列天然的或类似的、或外来的或异源的。当启动子是对于植物宿主“天然”或“类似”的时,它是指启动子在引入该启动子的天然植物中发现。当启动子是对于本发明的DNA序列“外来的”或“异源的”,它是指启动子对于本发明的可操作连接的DNA序列不是天然的或天然存在的启动子。该启动子可以是诱导型或组成型的。它可以是天然存在的,可以由不同天然存在的启动子的部分组成,或者可以是部分合成或总体合成的。用于设计启动子的指导是通过启动子结构的研究来提供的,诸如哈利(Harley)和雷诺兹(Reynolds)(1987)核酸研究(Nucleic Acids Res.)15:2343-2361。而且,可以优化启动子相对于转录起始的位置。参见,例如罗伯茨(Roberts)等人(1979)美国国家科学院院刊,76:760-764。用于植物中的许多适合的启动子是本领域已熟知的。

[0140] 例如,用于植物中的适合组成型启动子包括:来自植物病毒的启动子,诸如花生褪绿条纹病毒(PCISV)启动子(美国专利号5,850,019);来自花椰菜花叶病毒的35S启动子(CaMV)(奥德尔(Ode11)等人(1985)自然(Nature)313:810-812);小球藻病毒甲基转移酶基因的启动子(美国专利号5,563,328)以及拉制玄参花叶病毒的全长转录体启动子(FMV)(美国专利号5,378,619);来自诸如稻肌动蛋白的基因的启动子(麦克尔罗伊(McElroy)等人(1990)植物细胞(Plant Cell)2:163-171以及美国专利5,641,876)泛素(克里斯滕森(Christensen)等人(1989)植物分子生物学(Plant Mol.Biol.)12:619-632以及克里斯滕森等人(1992)植物分子生物学生物学18:675-689);pEMU(拉斯特(Last)等人(1991)理论与应用遗传学(Theor.Appl.Genet.)81:581-588);MAS(费尔滕(Velten)等人(1984)EMBO杂志3:2723-2730和美国专利5,510,474);玉蜀黍H3组蛋白(丽培缇(Lepetit)等人(1992)分子遗传学和基因组(Mol.Gen.Genet.)231:276-285和阿塔纳索瓦(Atanassova)等人(1992)植物杂志2(3):291-300);欧洲油菜ALS3(PCT申请W097/41228);植物核酮糖-二羧化酶/加氧酶(RuBisCO)小亚基基因;圆环病毒(AU 689 311)或木薯脉花叶病毒(CsVMV,US 7,053,205);以及补体土壤杆菌属基因的启动子(参见美国专利号4,771,002;5,102,796;5,182,200;以及5,428,147)。

[0141] 用于在植物中的适合诱导型启动子包括:来自响应于铜的ACE1系统的启动子(梅特(Mett)等人(1993)PNAS 90:4567-4571);响应于苯磺酰胺除草剂安全剂的玉蜀黍In2基因的启动子(赫尔歇(Hershey)等人(1991)分子基因与遗传学227:229-237和加茨(Gatz)等人(1994)分子基因与遗传学243:32-38);以及来自Tn10的Tet阻遏子的启动子(加茨等人(1991)分子基因与遗传学227:229-237)。用于植物中的另一种诱导型启动子是响应于植物通常并不响应的诱导剂的一种启动子。此类型的一种示例性诱导型启动子是来自类固醇激素基因的启动子,该基因的转录活性是通过糖皮质激素(斯凯纳(Schena)等人(1991)

美国国家科学院院刊88:10421)或最新应用嵌合转录激活剂来诱导的,以用于通过雌二醇诱导的基于雌激素受体的诱导型植物表达系统中(左(Zuo)等人(2000)植物杂志,24:265-273)。用于植物中的其他诱导型启动子描述于EP 332104、PCT WO 93/21334和PCT WO 97/06269中,这些专利通过引用以其整体结合在此。还可以使用由其他启动子和部分或总体合成的启动子的部分组成的启动子。参见,例如,描述用于植物中的此类启动子的倪(Ni)等人(1995)植物杂志7:661-676和PCT WO 95/14098。

[0142] 在本发明的一个实施例中,对植物的特定区域或组织特异的启动子序列可以用于表达本发明的HPPD蛋白,诸如对种子特异的启动子(达察,R. (Datla,R.)等人,1997,生物技术年度综述(Biotechnology Annual Review)3,269-296),特别是napin启动子(EP 255 378A1)、菜豆素启动子、麦谷蛋白启动子、向日葵蛋白启动子(W092/17580)、白蛋白启动子(W098/45460)、油质蛋白启动子(W098/45461)、SAT1启动子或SAT3启动子(PCT/US98/06978)。

[0143] 还可以使用有利地选自以下各项的诱导型启动子:苯丙氨酸解氨酶(PAL)、HMG-CoA还原酶(HMG)、几丁质酶、葡聚糖酶、蛋白酶抑制剂(PI)、PR1家族基因、胭脂碱合酶(nos)和vspB启动子(US 5 670 349,表3)、HMG2启动子(US 5 670 349)、苹果 $\beta$ -半乳糖苷酶(ABG1)启动子以及苹果氨基环丙烷羧酸合酶(ACC合酶)启动子(W098/45445)。多个启动子可以用于本发明的构建体中,包括依次使用。

[0144] 启动子可以包括或者被修饰来包括一个或多个增强子元件。在一些实施例中,启动子可以包括多个增强子元件。含有增强子元件的启动子提供了与不包含它们的启动子相比更高水平的转录。用于植物中的适合增强子元件包括PC1SV增强子元件(美国专利号5,850,019)、CaMV 35S增强子元件(美国专利号5,106,739和5,164,316)和FMV增强子元件(迈蒂(Maiti)等人(1997)转基因研究(Transgenic Res.)6:143-156);在申请W087/07644中所述的烟草花叶病毒(TMV)的转录激活剂,或者由卡林顿(Carrington)和弗雷德(Freed)1990,病毒学杂志(J.Virol.)64:1590-1597所述的烟草蚀纹病毒(TEV)的转录激活剂,例如,或者内含子诸如玉蜀黍的adh1内含子或稻肌动蛋白的内含子1。还参见PCT W096/23898、W02012/021794、W02012/021797、W02011/084370、以及W02011/028914。

[0145] 这些构建体通常可以含有5'和3'端非翻译区。这些构建体可以含有“信号序列”或“前导序列”,以促进感兴趣的肽向某些细胞内结构共翻译或翻译后转运,或促使其分泌,这些细胞内结构诸如叶绿体(或其他质体)、内质网或高尔基体。例如,构建体可以被工程化为含有促进肽向内质网的转移的信号肽。“信号序列”是指已知或怀疑导致穿过细胞膜的共翻译或翻译后肽转运的序列。在真核细胞中,其典型地涉及向高尔基体中的分泌,有些会导致糖基化。“前导序列”是指在翻译时产生足以触发肽链向亚细胞器共翻译转运的氨基酸序列的任何序列。因而,这包括通过进入内质网、液泡通道、包括叶绿体、线粒体等的质体而靶向转运和/或糖基化的前导序列。还可以优选地加工植物表达盒,使之含有内含子,从而其表达需要内含子的mRNA加工。

[0146] “3'非翻译区”是指位于编码序列下游的多核苷酸。多腺苷酸化信号序列,以及编码能够影响将多腺苷酸片段添加到mRNA前体3'端的调控信号的其他序列都是3'非翻译区。“5'非翻译区”是指位于编码序列上游的多核苷酸。

[0147] 其他上游或下游的非翻译元件包括增强子。增强子是作用来增加启动子区的表达

的多核苷酸。增强子是本领域中公知的,且包括但不限于SV40增强子区和35S增强子元件。

[0148] 终止区域可以是与转录起始区原生的,可以是与本发明的序列原生的,或可以来源于另一来源。合适的终止区可以从根癌农杆菌的Ti-质粒得到,例如章鱼碱合酶和胭脂碱合酶终止区。也参见盖琳诺(Guerineau)等人(1991)分子基因与遗传学262:141-144;普劳德富特(Proudfoot)(1991)细胞64:671-674;珊法孔(Sanfacon)等人(1991)基因开发(Genes Dev.)5:141-149;莫根(MMogen)等人(1990)植物细胞2:1261-1272;芒罗(Munroe)等人(1990)基因(Gene)91:151-158;巴利亚斯(Ballas)等人(1989)核酸研究17:7891-7903;以及乔希(Joshi)等人(1987)核酸研究15:9627-9639;以及欧洲专利申请EP 0 633 317A1。

[0149] 在本发明的一个方面中,针对给定的多肽诸如本发明的多肽设计合成的DNA序列。合成DNA序列的开放阅读框在细胞中的表达能够产生本发明的多肽。合成的DNA序列可以适用于简单地去除不需要的限制性内切核酸酶位点、辅助DNA克隆策略、改变或去除任何潜在的密码子偏爱、改变或提高GC含量、去除或改变交替的阅读框、并且/或者改变或去除可能存在于天然DNA序列中的内含子/外显子间接识别位点、聚腺苷酸化位点、核糖体结合序列、不需要的启动子元件等。还可能的是合成的DNA序列可以用于将其他改进引入到DNA序列中,诸如引入内含子序列、创建表达为与细胞器靶向序列的蛋白质融合物的DNA序列,该蛋白质诸如叶绿体转运肽、质外体/空泡靶向肽、或在内质网中引起所得肽截留的肽序列。可以使用宿主细胞优选的密码子来合成多种合成的基因以改进表达,或者可以根据宿主优选的密码子使用频率用密码子合成这些基因。参见,例如,坎贝尔(Campbell)和格里(Gowri)(1990)植物生理学92:1-11;美国专利号6,320,100;6,075,185;5,380,831;以及5,436,391,美国公开申请号20040005600和20010003849,以及默里(Murray)等人(1989)核酸研究17:477-498,这些文献通过引用在此结合。

[0150] 在一个实施例中,将感兴趣的多核苷酸靶向到叶绿体中以进行表达。以此方式,当感兴趣的核酸未直接插入到叶绿体中时,表达盒将另外含有编码转运肽的多核苷酸以将感兴趣的核苷酸引导至叶绿体。这些转运肽是本领域已知的。参见,例如,凡·海耶(Von Heijne)等人(1991)植物分子生物学导报(Plant Mol.Biol.Rep.)9:104-126;克拉克(Clark)等人(1989)分子生物学杂志264:17544-17550;黛拉-乔帕(Della-Cioppa)等人(1987)植物生理学84:965-968;罗默(Romer)等人(1993)生物化学与生物物理学研究通讯(Biochem.Biophys.Res.Commun.)196:1414-1421;以及沙阿(Shah)等人(1986)科学233:478-481。

[0151] 可以优化有待靶向到叶绿体中的感兴趣的多核苷酸,以在叶绿体中表达,说明在植物核与此细胞器之间的密码子使用差异。以此方式,可以使用叶绿体偏好的密码子合成感兴趣的多核苷酸。参见例如,美国专利号5,380,831,该专利通过引用结合在此。

[0152] 此植物表达盒典型地可以被插入到植物转化载体中。转化载体是指允许转化细胞的DNA分子。这样的分子可以由一个或多个表达盒组成,且可以被组织成超过一个的载体DNA分子。例如,二元载体是使用2个非连续DNA载体编码转化植物细胞的所有必需的顺式和反式作用功能的植物转化载体(海伦斯(Hellens)和姆林内克斯(Mullineaux)(2000)植物科学发展趋势(Trends in Plant Science),5:446-451)。“载体”是指设计成在不同的宿主细胞之间进行转移的多核苷酸构建体。“表达载体”是指具有在外来细胞中结合、整合和表

达异源DNA序列或片段的能力的载体。

[0153] 植物转化载体包括用于实现植物转化的一种或多种DNA载体。例如,本领域的常见实践是使用包含超过一个连续DNA片段的植物转化载体。这些载体在本领域通常称为“二元载体”。二元载体以及带有辅助质粒的载体最常用于农杆菌介导转化,其中实现高效转化所需的DNA片段的大小和复杂度都是非常大的,且将功能分离到分离的DNA分子上是有利的。二元载体典型地含有包含T-DNA转移(例如左边界和右边界)所需的顺式作用序列的质粒载体、被工程化为能够在植物细胞中表达的可选择标记和“感兴趣的多核苷酸”(被工程化为能够在植物细胞中表达以期形成一代转基因植物的多核苷酸)。此质粒载体上还存在细菌复制所需要的序列。顺式作用序列以适宜方式排列,使其能向植物细胞内有效转移并在细胞中表达。例如,可选择标记序列和感兴趣的序列位于左右边界之间。通常,第二质粒载体含有反式作用因子,这些反式作用因子介导从农杆菌到植物细胞的T-DNA转移。此质粒通常含有毒性作用(病毒基因),使植物细胞被土壤杆菌属感染,并且通过在边界序列切割来转移DNA以及进行病毒介导的DNA转移,这一点是在本领域所理解的(海伦斯和姆林内克斯(2000)植物科学趋势,5:446-451)。几种类型的土壤杆菌属菌株(例如,LBA4404、GV3101、EHA101、EHA105等等)可以用于植物转化。对于通过其他方法诸如显微投影、显微注射、电穿孔、聚乙二醇等等来将多核苷酸引入到植物中,第二质粒载体并非必要。

#### [0154] G. 植物转化

[0155] 本发明的方法涉及将核苷酸构建体引入到植物中。“引入”是指以使得构建体能够到达植物细胞内部的方式将核苷酸构建体提供给植物。本发明的方法不要求使用某个具体方法将核苷酸构建体引入植物,只要求核苷酸构建体能够到达植物的至少一个细胞的内部。本领域已知的用于将核苷酸构建体引入到植物中的方法包括但不限于稳定转化法、瞬间转化法以及病毒介导法。参见,例如,以下各项中所描述的用于转化植物细胞并再生植物的方法:US 4,459,355、US 4,536,475、US 5,464,763、US 5,177,010、US 5,187,073、EP 267,159 A1、EP 604 662 A1、EP 672 752 A1、US 4,945,050、US 5,036,006、US 5,100,792、US 5,371,014、US 5,478,744、US 5,179,022、US 5,565,346、US 5,484,956、US 5,508,468、US 5,538,877、US 5,554,798、US 5,489,520、US 5,510,318、US 5,204,253、US 5,405,765、EP 442 174 A1、EP 486 233 A1、EP 486 234 A1、EP 539 563 A1、EP 674 725 A1、W091/02071、W095/06128、以及W02011/095460,这些专利通过引用结合在此,特别是关于其中所述的转化方法。

[0156] 一般来说,植物转化方法涉及将异源DNA转移进入靶植物细胞(例如不成熟的或成熟的胚、悬浮培养物、无差别的愈伤组织、原生质,等等),接着是应用最大阈值水平的适当选择(取决于可选择标记基因)以从一组未转化成形的细胞团块恢复转化植物细胞。典型地,将外植体转移到新供应的相同培养基中,并常规培养。随后,在放置于补充有最大阈值水平的选择试剂的再生培养基上之后,使转化细胞分化成嫩芽。然后将嫩芽转移到选择性生根培养基中,用于回收生根的嫩芽或小植株。转基因植株然后成长为成熟的植物并产生可育种子(例如江井(Hiei)等人,(1994)植物杂志6:271-282;石田(Ishida)等人(1996)自然生物技术14:745-750)。典型地,将外植体转移到新供应的相同培养基中,并常规培养。用于产生转基因植物的技术与方法的一般说明可参见艾尔斯(Ayres)和帕克(Park)(1994)植物科学评论性综述(Critical Reviews in Plant Science)13:219-239以及博米尼尼



(Bommineni) 和裘哈 (Jauhar) (1997) 玉米 (Maydica) 42:107-120。由于转化物质含有许多细胞;在任何一片目的愈伤组织或组织或细胞群中同时存在转化细胞和未转化细胞。杀死未转化细胞并允许转化细胞增殖的能力产生转化植物培养物。通常,去除未转化细胞的能力限制转化植物细胞的快速恢复和转基因植物的成功生成。可以用分子和生物化学方法来确认在转基因植物的基因组中是否存在整合的异源的感兴趣的基因。

[0157] 可以通过若干种方法之一来生成转基因植物,这些方法包括但不限于,通过土壤杆菌属将异源DNA引入到植物细胞(土壤杆菌属介导的转化)、用粘附至颗粒的外源外来DNA轰击植物细胞、以及各种其他非颗粒直接介导的方法(例如江井等人(1994)植物杂志6:271-282;石田等人(1996)自然生物技术14:745-750;艾尔斯和帕克(1994)植物科学评论性综述13:219-239以及博米尼尼和裘哈(1997)玉米(Maydica)42:107-120),以转移DNA。

[0158] 用于转化叶绿体的方法是本领域已知的。参见,例如,Svab等人(1990)《美国国家科学院院刊》(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)87:8526-8530;Svab与Maliga(1993)《美国国家科学院院刊》(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)90:913-917;Svab与Maliga(1993)《欧洲分子生物学组织杂志》(EMBO J.)12:601-606。该方法依赖于基因枪递送含有选择标记的DNA,且通过同源重组将DNA靶向定位到质体基因组中。另外,通过对核编码的、质体定位RNA聚合酶的组织偏爱型表达,实现沉默质体载体转基因的反式激活,可以完成质体转化。这样的系统已经被报道于麦克布赖德(McBride)等人(1994)美国国家科学院院刊91:7301-7305。

[0159] 可以根据常规方法将已经转化的植物细胞培养成植物。参见,例如,麦考密克(McCormick)等人(1986)植物细胞报告(Plant Cell Reports)5:81-84。之后这些植物可以生长,并且用相同的转化品系或不同的品系对它授粉,并且所得的杂种具有鉴定的所需表型特征组成型表达。可以培养两代或多代,以确保理想表型特征的表达得到稳定维持和遗传,然后收获种子,以确保已经实现了理想表型特征的表达。以此方式,本发明提供了具有稳定地结合到在其基因组中的本发明核苷酸构建体(例如本发明的表达盒)的转化种子(也称作“转基因种子”)。在不同实施例中,可以用至少一种杀霉菌剂和/或至少一种杀昆虫剂、至少一种除草剂、和/或至少一种安全剂、或其任何组合涂覆种子。

[0160] H植物转化的评估

[0161] 将异源的外来DNA引入到植物细胞后,通过不同的方法诸如分析与整合的基因有关的核酸、蛋白质以及代谢物,确认了异源基因在植物基因组中的转化或整合。

[0162] PCR分析是在移植到土壤中之前的早期阶段,筛选转化的细胞、组织或芽是否存在所结合的基因的快速方法(萨姆布鲁克(Sambrook)和拉塞尔(Russell),2001,分子克隆:实验手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约冷泉港(Cold Spring Harbor,NY))。使用对目的基因或农杆菌载体背景等具有特异性的寡核苷酸引物进行PCR。

[0163] 可以通过基因组DNA的DNA印迹分析确认植物转化(萨姆布鲁克和拉塞尔,2001,同上)。一般而言,从转化体中提取总DNA,用合适的限制酶消化,在琼脂糖凝胶上分级分离,并转移到硝酸纤维素或尼龙膜上。然后根据标准技术(萨姆布鲁克和拉塞尔,2001,同上),可以用例如放射标记的<sup>32</sup>P靶DNA片段探测膜或“印迹”,以确认所引入的基因在植物基因组中的整合。

[0164] 在RNA印迹分析中,根据本领域常规使用的标准程序(萨姆布鲁克和拉塞尔(2001)

同上),将RNA从转化体的特定组织中分离,在甲醛琼脂糖凝胶中分级分离,并且印迹到尼龙滤膜上。然后使用本领域已知的方法(萨姆布鲁克和拉塞尔(2001)同上)通过使滤膜与源自GDC的放射性探针杂交来测试由本发明的核苷酸序列编码的RNA的表达。可以使用如本领域已知的逆转录酶PCR检测并且/或者量化RNA(例如,格林(Green)和萨姆布鲁克(2012)分子克隆:实验室手册,第4版,冷泉港实验室出版社,纽约伍德伯里(Woodbury))。

[0165] 蛋白质印迹、ELISA、横流测试、以及生物化学检验等可以对转基因植物进行,以使用结合存在于除草剂耐受性蛋白上的一个或多个表位的抗体通过标准程序(萨姆布鲁克和拉塞尔(2001)同上)来确认由除草剂耐受性基因编码的蛋白质的存在。

[0166] 在本发明的一个方面中,在此所述的HPPD基因适用作评估细菌或植物细胞转化的标记。

[0167] I. 作为转化标记的用途

[0168] 本发明还涉及编码根据本发明的HPPD的核酸在一种用于转化植物的方法中作为标记基因或作为使赋予对HPPD抑制剂除草剂的植物耐受性成为可能的编码序列的用途、以及一种或多种HPPD抑制剂对包含编码根据本发明的HPPD的核酸序列的植物的用途。参见例如,美国专利6,791,014,该专利通过引用以其整体结合在此。

[0169] 在此实施例中,HPPD抑制剂可以被引入到感受态的植物细胞的培养基中,以便在转化步骤之前漂白所述细胞。然后用作为选择性标记的HPPD抑制剂耐受性基因转化漂白的感受态细胞,并且已将所述选择性标记整合到其基因组中的转化细胞变成绿色,使得能够选择这些细胞。此方法使得减少选择转化细胞所需要的时间成为可能。

[0170] 因此,本发明的一个实施例由一种用于通过将外源基因引入到具有作为选择性标记的HPPD抑制剂耐受性基因的所述植物细胞中来转化植物细胞的方法组成,其中该方法包括在适合的培养基中制备并培养能够接收异源基因的感受态植物细胞并且将适合量的HPPD抑制剂引入到感受态植物细胞的适合培养基中。然后用异源基因和选择性标记转化感受态细胞,并且在适合的培养基中生长包含该异源基因的转化细胞并且从该细胞中选择转化体。然后可以使这些转化细胞再生成不育的转化植物。

[0171] J. 植物和植物部分

[0172] “植物”指整个植物、植物器官(例如,叶、茎、根等)、种子、植物细胞、无性繁殖体、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到任何植物种类中,包括但不限于单子叶植物和双子叶植物。感兴趣的植物的实例包括但不限于玉米(玉蜀黍)、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、马铃薯、棉花、稻、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦和油籽油菜、芸苔属、苜蓿、黑麦、粟类、红花、花生、甘薯、木薯、咖啡、椰子、菠萝、柑桔树、可可、茶叶、香蕉、油桃、无花果、番石榴、芒果、橄榄、木瓜、腰果、澳洲坚果、杏、燕麦、蔬菜、观赏植物以及针叶树。

[0173] 蔬菜包括但不限于番茄、莴苣、青豆、利马豆、豌豆以及甜瓜属的成员(诸如黄瓜、哈密瓜以及西瓜)。观赏植物包括但不限于杜鹃花、绣球花、芙蓉、玫瑰、郁金香、黄水仙、矮牵牛、康乃馨、一品红以及菊花。农作物也是感兴趣的,包括例如,玉蜀黍、高粱、小麦、向日葵、番茄、十字花科植物、胡椒、土豆、棉花、稻谷、大豆、甜菜、甘蔗、烟草、大麦、油菜等等。

[0174] 本发明适用于单子叶植物家族的任何成员,包括但不限于玉蜀黍、稻谷、大麦、燕

麦、小麦、高粱、黑麦、甘蔗、菠萝、白薯、洋葱、香蕉、椰子以及枣。

[0175] K. 用于增加植物产率的方法

[0176] 提供了增加植物产率的方法。这些方法包括提供包含含有编码本发明的HPPD的核苷酸序列的多核苷酸的植物或者将该多核苷酸引入到植物或植物细胞中、在田地中生长植物或其种子、并且由所述植物或种子产生收获。如在此所定义的,植物的“产率”是指植物产生的生物质的质量和/或数量。“生物质”是指任何测得的植物产品。生物质产量的增加是测量的植物产品的产率的任何提高。增加植物产率具有若干商业应用。例如,增加植物叶片的生物质可以增加绿叶蔬菜的产率供人类或动物消费。此外,增加的叶生物质可以用于增加植物源性制药或工业产品的产量。产率的增加可以包括任何统计上显著的增加,包括但不限于,至少1%增加、至少3%增加、至少5%增加、至少10%增加、至少20%增加、至少30%、至少50%、至少70%、至少100%、或更大的增加。

[0177] 在具体方法中,用有效浓度的HPPD抑制剂除草剂处理包含本发明的HPPD序列的植物,该抑制剂除草剂诸如选自下组的一种或多种HPPD抑制剂除草剂,该组由以下类别的HPPD抑制剂除草剂组成:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,优选地诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、以及2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(WO2013/050421和WO2013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(WO2013/072300和WO2013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(WO2013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮,其中除草剂施加使得植物产率增加。

[0178] 还提供了用于在植物或植物部分中赋予除草剂耐受性的方法。在此类方法中,将编码本发明的HPPD的核苷酸序列引入到植物中,其中该多核苷酸的表达引起HPPD抑制剂除草剂耐受性。可以用有效浓度的除草剂处理经由此方法产生的植物(该除草剂诸如选自下组的一种或多种HPPD抑制剂除草剂,该组由以下类别的HPPD抑制剂除草剂组成:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,优选地诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(WO2013/050421

和W02013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(W02013/072300和W02013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(W02013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮)并且展示出增加的对该除草剂的耐受性。在本申请中除草剂的“有效浓度”是足以使对该除草剂未天然耐受或未变得耐受的植物或植物部分的生长减慢或停止的量。

#### [0179] L. 控制田地中的杂草的方法

[0180] 本发明因此还涉及一种控制不需要的植物或用于调节在包含编码根据本发明的HPPD的核苷酸序列的植物作物中的植物生长的方法,其中一种或多种HPPD抑制剂除草剂,例如一种或多种选自以下类别的HPPD抑制剂除草剂:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,优选地诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、以及2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(W02013/050421和W02013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(W02013/072300和W02013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(W02013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮,被施加于植物(例如有害植物,诸如单子叶的或双子叶的杂草或不希望的农作物)、施加于种子(例如,谷物、种子或无性繁殖体,诸如具有芽的块茎或胚芽部分)或施加于植物所生长的区域(例如栽培区域)。在此背景下,有效浓度的一种或多种HPPD抑制剂除草剂,例如选自下组的一种或多种HPPD抑制剂除草剂,该组由以下类别的HPPD抑制剂除草剂组成:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,优选地诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、以及2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(W02013/050421和W02013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(W02013/072300和W02013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(W02013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮,特别是选自氟磺草酮、磺草酮、苯吡唑草酮、双环吡喃酮、特呋三酮、异噁唑草酮、以及甲基磺草酮,可以例如在种植前(如果适合的话也通过掺入到土壤中)、在萌发前或萌发后施加,并且可以与

农作物对其天然耐受或经由表达一种或多种除草剂耐受性转基因对其耐受的其它除草剂的应用组合。参见,例如,美国申请公开号2004/0058427和PCT申请公开号W098/20144。“有效浓度”是指控制杂草或其他未转化植物的生长或传播而不显著影响HPPD抑制剂耐受性植物或植物种子的浓度。本领域技术人员应理解的是,除草剂的施加可以许多不同形式进行并且可以在种子种植和生长过程之前和/或整个过程中的许多不同时间进行。“萌发前”施加是指在植物从土壤中可见地萌发之前施加于感兴趣的区域(例如,田地或栽培区域)中的除草剂。“萌发后”施加是指在植物从土壤中可见地萌发之后施加于区域中的除草剂。在一些情况下,术语“萌发前”和“萌发后”与感兴趣的区域内的杂草结合使用,并且在一些情况下,这些术语与感兴趣的区域内的农作物结合使用。当与杂草结合使用时,这些术语可以应用于存在于或被认为存在于感兴趣的区域内的特定类型的杂草或杂草种类。除草剂“种植前掺入”涉及在种植前将化合物掺入到土壤中。

[0181] 因此,本发明涉及一种控制田地中的杂草的方法,该方法包括在田地中种植包含本发明的HPPD的植物或其种子并且向所述植物或所述植物周围的区域施加有效浓度的一种或多种HPPD抑制剂除草剂。

[0182] 在本发明的一个实施例中,可以在种植植物或播种种子之前用HPPD抑制剂除草剂诸如异噁唑草酮(IFT)处理有待种植含有本发明的HPPD核苷酸序列的植物(诸如大豆、棉花、玉米或小麦植物,例如),以清理由HPPD抑制剂杀死的杂草的田地,从而允许免耕实践,接着随后在该同一预处理田地中种植或播种这些植物(用HPPD抑制剂除草剂进行燃尽应用)。IFT的残余活性也将保护萌发和生长的植物使其免于在早期生长阶段与杂草竞争。当此类植物对草丁磷或草甘膦或HPPD抑制剂或HPPD抑制剂与另一种除草剂诸如草甘膦的混合物耐受时,一旦这些植物具有一定大小并且杂草有再次出现的倾向,可以在植物顶端施加所述除草剂作为萌发后除草剂。

[0183] 在本发明的另一个实施例中,可以在植物萌发之前但在种子播种之后用HPPD抑制剂除草剂诸如IFT处理其中播种含有本发明的HPPD核苷酸序列的种子的田地(该田地可以在播种之前使用其他方式进行除草,这些方式典型地是常规耕种实践,诸如犁地、凿式犁地或苗床制备),其中残余活性将使得田地不具有由除草剂杀死的杂草,以使得萌发和生长的植物不用与杂草竞争(萌发前施加HPPD抑制剂除草剂)。当此类植物对草丁磷或草甘膦或HPPD抑制剂或HPPD抑制剂与另一种除草剂诸如草甘膦的混合物耐受时,一旦这些植物具有一定大小并且杂草有再次出现的倾向,可以在植物顶端施加所述除草剂作为萌发后除草剂。

[0184] 在本发明的另一个实施例中,当此类植物对此类除草剂耐受时,可以在已从播种的种子萌发的植物顶端用HPPD抑制剂除草剂处理含有本发明的HPPD核苷酸序列的植物,以清理由HPPD抑制剂杀死的杂草的田地,该应用可以与在植物顶端用草甘膦或草丁磷作为萌发后除草剂进行的处理(萌发后施加HPPD抑制剂除草剂(使用或不使用草甘膦))一起(例如,在喷雾罐混合物中)、在该处理之后或之前。

[0185] 可以用HPPD抑制剂除草剂控制的单子叶和双子叶杂草的个别代表的实例包括:

[0186] 以下属的单子叶有害植物:山羊草属(Aegilops)、冰草属(Agropyron)、剪股颖属(Agrostis)、看麦娘属(Alopecurus)、阿披拉草属(Apera)、燕麦属(Avena)、臂形草属(Brachiararia)、雀麦属(Bromus)、蒺藜草属(Cenchrus)、鸭跖草属(Commelina)、狗牙根属

(Cynodon)、莎草属(Cyperus)、龙爪茅属(Dactyloctenium)、马唐属(Digitaria)、稗属(Echinochloa)、荸荠属(Eleocharis)、稊属(Eleusine)、画眉草属(Eragrostis)、野黍属(Eriochloa)、羊茅属(Festuca)、飘拂草属(Fimbristylis)、异蕊花属(Heteranthera)、白茅属(Imperata)、鸭嘴草属(Ischaemum)、千金子属(Leptochloa)、黑麦草属(Lolium)、雨久花属(Monochoria)、黍属(Panicum)、雀稗属(Paspalum)、藨草属(Phalaris)、梯牧草属(Phleum)、早熟禾属(Poa)、筒轴茅属(Rottboellia)、慈姑属(Sagittaria)、蔗草属(Scirpus)、狗尾草属(Setaria)、高粱属(Sorghum)。

[0187] 以下属的双子叶杂草：苘麻属(Abutilon)、苋属(Amaranthus)、豚草属(Ambrosia)、单花葵属(Anoda)、春黄菊属(Anthemis)、鳧裳草属(Aphanes)、蒿属(Artemisia)、滨藜属(Atriplex)、雏菊属(Beilis)、鬼针属(Bidens)、芥属(Capsella)、飞廉属(Carduus)、决明属(Cassia)、矢车菊属(Centaurea)、藜属(Chenopodium)、蓟属(Cirsium)、旋花属(Convolvulus)、曼陀罗属(Datura)、山蚂蝗属(Desmodium)、刺酸模属(Emex)、糖芥属(Erysimum)、大戟属(Euphorbia)、鼬瓣花属(Galeopsis)、牛膝菊属(Galinsoga)、拉拉藤属(Galium)、木槿属(Hibiscus)、番薯属(Ipomoea)、地肤属(Kochia)、野芝麻属(Lamium)、独行菜属(Lepidium)、母草属(Lindernia)、母菊属(Matricaria)、薄荷属(Mentha)、山靛属(Mercurialis)、粟米草属(Mullugo)、勿忘草属(Myosotis)、罂粟属(Papaver)、牵牛属(Pharbitis)、车前属(Plantago)、寥属(Polygonum)、马齿苋属(Portulaca)、毛茛属(Ranunculus)、萝卜属(Raphanus)、蔊菜属(Rorippa)、节节菜属(Rotala)、酸模属(Rumex)、猪毛草属(Salsola)、千里光属(Senecio)、田菁属(Sesbania)、黄花稔属(Sida)、欧白芥属(Sinapis)、茄属(Solanum)、苦苣菜属(Sonchus)、尖瓣花属(Sphenoclea)、繁缕属(Stellaria)、蒲公英属(Taraxacum)、遏蓝菜属(Thlaspi)、三叶草属(Trifolium)、荨麻属(Urtica)、婆婆纳属(Veronica)、堇菜属(Viola)、苍耳属(Xanthium)。

[0188] 适用于本发明中的HPPD抑制剂除草剂,包括但不限于以下类别的HPPD抑制剂除草剂:N(1,2,5-噁二唑-3-基)苯酰胺类;N-(四唑-4-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺和2-氯-3-(甲氧基甲基)-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺;N-(1,3,4-噁二唑-2-基)苯酰胺类,诸如2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.1);N-(四唑-5-基)-或N-(三唑-3-基)芳基甲酰胺类,优选地诸如2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.2)、4-(二氟甲基)-2-甲氧基-3-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯酰胺(Cmpd.3)、2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.4)、2-(甲氧基甲基)-3-(甲基亚磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯酰胺(Cmpd.5);哒嗪酮衍生物类(WO2013/050421和WO2013/083774);取代的1,2,5-噁二唑类(WO2013/072300和WO2013/072402);以及奥沙普秦衍生物类(WO2013/054495);三酮类,优选地诸如氟磺草酮、磺草酮和甲基磺草酮;异噁唑类别,优选地诸如异噁唑草酮;或者吡唑特类别,优选地诸如磺酰草吡唑和苯吡唑草酮,可以根据现行生物学和/或生理化学参数来以不同方式配制。可能的配制品的实例是:可湿性粉剂(WP)、水溶性粉剂(SP)、水溶性浓缩物、可乳化的浓缩物(EC)、乳剂(EW)(诸如水包油和油包水乳剂)、可喷射溶液、悬浮液浓缩物(SC)、油基或水基分散剂、油混溶溶液、胶囊悬浮液(CS)、粉末(DP)、拌种产物、通过在土壤上播种进行应用的颗粒、微粒像是的颗粒(GR)、

喷雾颗粒、涂层颗粒和吸收颗粒、水分散颗粒(WG)、水溶性颗粒(SG)、ULV配制品、微胶囊以及蜡。

[0189] 这些单独类型的配制品是理论上已知的并且例如描述于:维纳克尔-库兹勒尔(Winnacker-Küchler),“化学技术(Chemische Technologie)”[化学技术(Chemical technology)],第7卷,慕尼黑C.汉泽尔出版社(C.Hanser Verlag Munich),第4版1986;韦德·范·法尔肯堡(Wade van Valkenburg),“除草剂制剂(Pesticide Formulations)”,马塞尔·德克尔出版社(Marcel Dekker),纽约,1973;K.马顿斯(K.Martens),“喷雾干燥(Spray Drying)”手册,第3版1979,G.古德温出版公司(G.Goodwin Ltd.),伦敦(London)。

[0190] 所需要的配制助剂诸如惰性物质、表面活性剂、溶剂、以及其他添加剂也是已知的并且例如描述于:沃特金斯(Watkins),“杀虫粉尘稀释剂和载体手册(Insecticide Dust Diluents and Carriers)”,第2版,达兰德出版社(Darland Books),考德威尔N.J.(Caldwell N.J.),H.v.奥尔夫(H.v.Olphen),“粘土胶体化学简介(Introduction to Clay Colloid Chemistry)”;第2版,约翰·威利父子公司(J.Wiley&Sons),纽约;C.马斯登(C.Marsden),“溶剂指南(Solvents Guide)”;第2版,威利国际公司(Interscience),纽约1963;麦卡琴氏(McCutcheon's),“洗涤剂 and 乳化剂手册(Detergents and Emulsifiers Annual)”,麦肯锡咨询公司(MC Publ.Corp.),里奇伍德N.J.(Ridgewood N.J.);西斯利(Sisley)和伍德(Wood),“表面活性剂百科全书(Encyclopedia of Surface Active Agents)”,化学出版有限公司(Chem.Publ.Co.Inc.),纽约1964;舍恩菲尔德(Schönfeldt),“界面活性环氧乙烷加合物(Grenzflächenaktive Äthylenoxidaddukte)”[界面活性环氧乙烷加合物(Interface-active ethylene oxide adducts)],Wiss.Verlagsgesell., Stuttgart 1976;维纳克尔-库兹勒尔,“化学技术(Chemische Technologie)”[化学技术],第7卷,慕尼黑C.汉泽尔出版社,第4版,1986。

[0191] 基于这些配制品,还可以制备与其他杀虫活性物质例如像杀昆虫剂、杀螨剂、除草剂、杀霉菌剂的组合,以及与安全剂、肥料和/或生长调节剂的组合,例如以预拌或罐混合的形式。

[0192] M.将本发明的基因引入到另一种植物中的方法

[0193] 在此还提供了将本发明的HPPD核苷酸序列引入到另一种植物中的方法。本发明的HPPD核苷酸序列或其片段可以通过以下方式引入到第二种植物中:轮回选择、回交、系谱育种、家系选择、混合选择、诱变育种和/或遗传标记增强的选择。

[0194] 因此,在一个实施例中,本发明的方法包括将包含本发明的HPPD核苷酸序列的第一种植物与第二种植物杂交以产生F1子代植物并且选择对HPPD抑制剂除草剂耐受或包含本发明的HPPD核苷酸序列的F1子代植物。这些方法可以进一步包括将选定的子代植物与包含本发明的HPPD核苷酸序列的第一种植物杂交以产生回交的子代植物并且选择对HPPD抑制剂除草剂耐受或包含本发明的HPPD核苷酸序列的回交的子代植物。在此其他位置提供了用于评估HPPD抑制剂除草剂耐受性的方法。这些可以进一步包括依次重复这些步骤一次或更多次,以产生对HPPD抑制剂除草剂耐受或包含本发明的HPPD核苷酸序列的所选定的第二次或更高次回交的子代植物。

[0195] 在本发明的方法中可以使用涉及选择所希望的表型的植物的任何培育方法。在一些实施例中,F1植物可以自花授粉,以产生分离的F2代。然后可以选择在每一代(F3、F4、F5)

中代表所希望的表型(例如,HPPD抑制剂除草剂耐受性)的个别植物,直到这些性状是纯合的或固定在育种群体中为止。

[0196] 第二种植物可以是具有所希望的性状的植物,这些性状诸如除草剂耐受性、昆虫耐受性、耐旱性、线虫控制、水分利用效率、氮利用效率、提高的营养价值、抗病性、提高的光合作用、提高的纤维品质、胁迫耐受性、提高的再生、以及类似性状。第二种植物可以是如在此其他位置所述的原种事件。

[0197] 在不同实施例中,可以从所得杂交物收获植物部分(全株植物、植物器官(例如,叶、茎、根等)、种子、植物细胞、繁殖体、胚芽等)并且可以增殖或收集以用于下游用途(诸如,食物、饲料、生物燃料、油、面粉、粗粉等)。

[0198] N. 获得植物产品的方法

[0199] 本发明还涉及一种用于获得商品产品的方法,该方法包括从包含本发明的HPPD序列的作物中收获并且/或者研磨谷物,以获得该商品产品。农艺学上和商业上重要的产品和/或物质组合物包括但不限于动物饲料、商品、以及旨在用作人消耗的食物或用于旨在用于人消耗的组合物和商品中的植物产品和副产品,具体地是失活的种子/谷物产品,包括由此类谷物/种子产生的(半加工)加工产品,其中所述产品是或包括完整或加工的种子或谷物、动物饲料、玉米或黄豆粗粉、玉米或黄豆面粉、玉米、玉米淀粉、大豆粗粉、黄豆面粉、麦片、黄豆蛋白浓缩物、黄豆蛋白分离物、增稠的黄豆蛋白浓缩物、化妆品、护发产品、黄豆黄油、纳豆、印尼豆豉(tempeh)、水解的黄豆蛋白、喷射奶油、起酥油、卵磷脂、可食用性完整大豆(生的、烘烤过的、或作为日本青豆)、黄豆奶酪、豆腐乳、豆腐、腐竹、以及煮熟、研磨、蒸熟、烘焙或煮半熟的谷物等,如果这些产品和物质组合物含有可检测量的在此所述的核苷酸和/或核酸序列作为含有此类核苷酸序列的任何植物的诊断,则它们旨在处于本发明的范围内。

[0200] 以下实例是举例说明而不是任何形式的限制。

[0201] 实验

[0202] 实例1.Axmi428H的诱变

[0203] 基于其对氟磺草酮(TBT)的高耐受性和与先前显示具有TBT耐受性的荧光假单胞菌酶(W09638567A3)的同源性,选择Axmi428H(在2013年9月13日提交的国际专利申请号PCT/US2013/59598中所述的并且在此列出为SEQ ID NO:6)作为诱变的模板(Pf G336W;参见W01999024585和W02009144079)。将PfG336W取代工程化为天然假单胞菌属HPPD,以提高对TBT的耐受性;提出该耐受性由在该酶的活性位点中排挤出庞大TBT抑制剂的较大酪氨酸侧链介导。

[0204] 基于结构模型,选择HPPD Axmi428H活性位点附近的氨基酸进行诱变。然后对单独的氨基酸进行完全随机分组,并且在TBT存在下在大肠杆菌中用比色测定筛选随机化蛋白质的活性(基于Axmi428H突变体的黑脓素产生),并且通过量化由HPPD酶形成的产物的酶促测定进行进一步筛选。通过此方法鉴别具有提高的对TBT的耐受性的酶。研究假单胞菌属HPPD的三维结构,以鉴别在活性位点中可能涉及底物结合的残基。

[0205] 生成编码随机化氨基酸的Axmi428H基因

[0206] 将编码HPPD酶Axmi428H(SEQ ID NO:6)的核苷酸序列克隆到大肠杆菌表达载体(基于pRSF1-b)中,以在用IPTG诱导之后指导Axmi428H在大肠杆菌细胞系(诸如BL21\*DE3)



中过度表达。使用设计用于诱变的引物,将QUIKCHANGE®发光定点诱变试剂盒(Stratagene目录号210519)用于指导Axmi428H在质粒pSE420中的定点诱变。

[0207] 使用黑脓素测定对随机化Axmi428H酶进行初步筛选

[0208] 使用固相的基于生长的测定评价含有随机化氨基酸位置的Axmi428H蛋白的HPPD活性。简言之,在丰富的生长培养基上HPPD酶(在大肠杆菌中)的过度表达使得产生化合物黑脓素。黑脓素的颜色是深棕色,因此查看在多孔板中的LB琼脂上生长的HPPD酶允许目视比较HPPD酶的酶活性。此实验方法还允许将不同浓度的HPPD抑制剂(诸如氟磺草酮)添加到个别样品孔中,从而允许目视评定随机化HPPD酶对HPPD抑制剂的耐受性。

[0209] 使用体外动力学测定对随机化Axmi428H酶进行二级筛选

[0210] 将在初步筛选(黑脓素测定)过程中选择的Axmi428H突变体推进到在体外动力学测定中利用HPPD的二级筛选中。体外动力学测定将尿黑酸的产生与酶尿黑酸1,2-双加氧酶(HGO)相联。HGO将尿黑酸转化成顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸(maleoacetoacetate),该顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸容易通过321nm的UV吸收来量化。实时进行该测定,并且可以在96-孔分光光度计中连续量化产物。

[0211] 分两个阶段进行动力学测定。在第一阶段,在3个条件下评估酶:1)在高底物浓度(500 $\mu$ M HPPD)的条件下量化HPPD活性并且在此条件下获得的速率是该酶的催化活性( $V_{max}$ )的测量值;2)在高底物下量化HPPD活性,其中添加单一浓度的氟磺草酮抑制剂(500 $\mu$ M HPP+5 $\mu$ M TBT)。将使用氟磺草酮的酶促速率相对于未使用氟磺草酮的速率(仅500 $\mu$ M HPP)的比较用于测量对抑制剂氟磺草酮的耐受性,该耐受性是抑制剂结合常数( $K_i$ )的指示;3)在有限的底物条件(125 $\mu$ M HPP)下量化HPPD活性。在有限底物浓度下的酶促速率相对于在高底物浓度(500 $\mu$ M HPP)下的速率的比较提供了该酶与该底物的亲和力测量值( $K_m$ )。

[0212] 在实验时,如下进行第一阶段酶促测定。将初步筛选(黑脓素测定)中鉴别的首选Axmi428H突变体的克隆物转化到DH5a中,并且将一菌环量的菌落用于接种125ml烧瓶中的25ml LB+卡那霉素。在37 $^{\circ}$ C下孵育这些培养物。当OD达到0.6-0.7时,将温度降低至30 $^{\circ}$ C并且将这些培养物孵育过夜。在黑脓素测定的下一个下午对培养物进行取样,并且将其余培养物在SA600转子中在6500rpm下沉淀,去除上清液,并且将沉淀在-20 $^{\circ}$ C下冷冻过夜或直到进行测定。

[0213] 就在测定之前,将这些沉淀重悬于1ml缓冲液(20mM HEPES pH 7.0、50mM NaCl)中。将2 $\mu$ l LYSONASE™(Novagen)添加到每个重悬的沉淀中,并且随后混合。然后将2ml缓冲液和4 $\mu$ l LYSONASE™添加到HGO沉淀中。将悬浮液在室温下孵育45分钟并且然后在-20 $^{\circ}$ C冷冻至少1小时。接着,将溶液在室温下解冻,有时简单地浸入在37 $^{\circ}$ C水浴中并轻微搅拌。将培养物在Sorvall SA 600转子中在14000rpm下旋转15min。将上清液小心地从沉淀上吸出(小心不要扰动沉淀),并且将其转移到1列96孔板中,并且将0.5ml缓冲液添加到各样品中并上下吹打以混合。收集HGO上清液并且以以下次序进行反应。将HGO添加到500 $\mu$ M HPP溶液和500 $\mu$ M溶液+5 $\mu$ M TBT中。立即将100 $\mu$ l 500 $\mu$ M HPP溶液吸入到偶数行(5次重复)并且将100 $\mu$ l 500 $\mu$ M HPP+5 $\mu$ M TBT溶液吸入到奇数行(5次重复)。将这些反应物分到两个96-孔板之间,以允许分析足够数量的样品(在一个96孔板中总计4个测定,并且在另一个板中总计6个测定)。接着,首先将100 $\mu$ l酶溶液或缓冲液吸入到含有500 $\mu$ M HPP+5 $\mu$ M TBT的一行孔中,随后通过用移液管头搅拌来轻微混合,并且接着将其吸入到含500 $\mu$ M HPP的一行孔中,随后通过

用移液管头搅拌来轻微混合。通过在321nm下在5sec间隔的吸光度来测量产物形成。对减小的值(等同于50sec内的吸光度变化,并且被计算为OD/min)进行分析。收集五组数据。然后在将HGO添加到125 $\mu$ M HPP中之后,使用与以上相同的步骤重复此过程。

[0214] 将在第1阶段动力学测定中进行良好的个别Axmi428H突变体推进到使用第2阶段形式进行的更深入表征。与第1阶段一样,第2阶段测定利用将尿黑酸的产生与酶尿黑酸1,2-双加氧酶(HGO)相联的体外动力学测定。HGO将尿黑酸转化成顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸,该顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸由于它在321nm下强烈吸收而容易监控。在第2阶段,跨越更广泛范围的底物浓度以及同样的抑制剂浓度量化产物的实时产生,以允许更准确地确定有待计算的米-门氏(Michaelis-Menten)结合常数( $K_m$ )和抑制剂结合常数( $K_i$ )。可以通过在不同量的抑制剂氟磺草酮存在下对此 $K_m$ 的变化作图来确定 $K_i$ 。或者,该 $K_i$ 当针对 $K_m$ 和底物浓度进行调整时可以由该酶的 $IC_{50}$ 值计算。将用于计算 $K_i$ 的此后一种技术用于大部分Axmi428H突变体。

[0215] 在实验时,如下进行第二阶段酶促测定。如上所述地生长个别Axmi428H突变体克隆物,并且以相同方式制备大肠杆菌提取物。最终测定浓度如下:pH 7.0 20mM HEPES、50mM NaCl、0-500 $\mu$ M HPP、0-50 $\mu$ M TBT、以及饱和量的新鲜制备的HGO酶(最终浓度是约50 $\mu$ g/ml)。动力学数据的分析产生动力学常数。用标准米-门氏动力学等式计算这些酶的 $K_m$ 和 $K_i$ 。在500 $\mu$ M的HPP浓度下计算 $IC_{50}$ ,并且使用以下公式使用测量的 $K_m$ 推导出 $K_i$ :

$$[0216] \quad K_i = IC_{50} / (1 + (K_m / [S]))$$

[0217] 对于一些Axmi428H突变体,通过SDS-PAGE检查所表达的蛋白质,以确定是否存在表达水平差异。简言之,将60 $\mu$ l每种培养物在9000下旋转2分钟,并且移出上清液并将沉淀重悬于100 $\mu$ l 2x NuPage样品缓冲液中(用水1:1稀释的NuPage LDS 4x样品缓冲液(NP0007)。将这些样品在90 $^{\circ}$ C下加热10分钟。用10 $\mu$ l Fermentas PAGERULER<sup>TM</sup>蛋白梯(来自VWR的Fermentas#SM0661)和20 $\mu$ l每种样品装载4%-12%Bis-Tris NuPage凝胶10或12个孔(NP0322)中的NuPage 1x Mops缓冲液(NP0002-02)中。通过考马斯蛋白染色法对凝胶进行染色。

[0218] 结果

[0219] 初步筛选和二级筛选方法(以上所述的)鉴别了具有改进的特性的若干种Axmi428H蛋白。表2总结了若干种首选Axmi428H酶的动力学测定数据(二级筛选)。表2中的和此实例中所述的氨基酸位置对应于SEQ ID NO:6的氨基酸位置。所示的各突变体是“叠加”,其中所指示的取代被添加到含有两个位置的取代(G352Y、A356G)的亲代Axmi428H酶(SEQ ID NO:11)中。在500 $\mu$ M HPP下每种蛋白质的酶促测定被显示为毫OD单位/分钟,而在500 $\mu$ M HPP+5 $\mu$ M TBT和125 $\mu$ M HPP下的相对活性被显示为在500 $\mu$ M HPP下的活性百分比。

[0220] 表2. 动力学测定数据

[0221]

	SEQ ID NO:	500 $\mu$ M HPP, 数据集1	500 $\mu$ M HPP, 数据集2	500 $\mu$ M HPP + 5 $\mu$ M TBT (为 500 $\mu$ M HPP 的%, 数据集1)	500 $\mu$ M HPP + 5 $\mu$ M TBT (为 500 $\mu$ M HPP 的%, 数据集2)	125 $\mu$ M HPP (为 500 $\mu$ M HPP 的%, 数据集1)	125 $\mu$ M HPP (为 500 $\mu$ M HPP 的%, 数据集2)
Axmi428H-evo40	7	75, 29		33, 49		32, 40	
Axmi428H-evo41	8	103, 73		32, 36		27, 25	
PfHPPDEvo40	3	16, 19		42, 65		61, 65	
PfHPPDEvo41	4	64, 73		28, 52		34, 54	
Axmi428H-YG	11	47 (平均值)		59 (平均值)		34, 41	44 (平均值)
M193G		20, 22	51,46	60, 69	75,83	70, 36	83, 70
I209A		34, 24	47,54	62, 68	87,74	48, 49	61, 69
V221I		36, 26	33,47	63, 61	88,85	52, 30	74, 73
M226V		22, 17	64,91	70, 84	72,90	50, 43	49, 71

[0222]

E239C		12, 19	45,43	97, 74	72,84	58, 32	39, 61
Q247H		27, 15	20, 66, 42	100, 93	90, 94, 77	37, 47	35,115, 86
Q247S		32, 17	30,50	84, 53	93,80	41	63, 56
I248L		19, 31	44,63	75, 49	86,71	62, 50	60, 72
E250G		?, 9	41,44	?, 78	88,80	?, 67	94, 59
E351P		82, 41	31	56, 66	89	39, 32	75
E351D		38,33	84	67,59	70	42,39	56
L357M		11,24	54,45	73,80	57,76	123,42	70,84

[0223] 另外的首选突变体叠加

[0224] 接着,将以上鉴别的最佳氨基酸叠加在具有特别强的活性的2种突变体上(M226V和Q247H,各自与作为单独的突变体库的“YG”(G352Y,A356G)组合)。在这些叠加中还包含取代E351P,因为该取代似乎提高Axmi428H的Vmax。如先前所述地构建叠加的突变体,并且通过如上所述的初步筛选(体内测定中的黑脓素(pyomyelin))和二级筛选(体外快速动力学测定)来筛选。在表3中示出了这些组的叠加突变体中的两种的初步筛选和二级筛选数据。

[0225] 表3.Axmi428H-YG叠加的动力学数据

[0226]

	500 $\mu$ M HPP	500 $\mu$ M HPP , 5 $\mu$ M TBT/500 $\mu$ M HPP x 100	125 $\mu$ M HPP/500 $\mu$ M HPP x 100
Axmi428HEvo40	54	37	36
Axmi428HEvo41	84	34	24
PfHPPDEvo40	30	44	57
PfHPPDEvo41	77	39	50
Axmi428H YG Q247 A3 His (HYG)	18	88	50
Axmi428H YG Q247 A3 His (HYG)	21	74	39
Axmi428H YG Q247H , E351P (HPYG)	25	80	47
Axmi428H YG E8 (YG)	46	49	40
Axmi428H YG E351P (PYG)	33	53	33

[0227] 存在两种在黑脓素和快速动力学测定二者中比亲代 (Axmi428H-YG, SEQ ID NO: 11) 更好地进行的Axmi428H突变体:

[0228] • 428H M193G、E351P G352Y、A356G (Axmi428H-GPYG, SEQ ID NO:15)

[0229] • 428H V221I、E351P G352Y、A356G (Axmi428H-IPYG, SEQ ID NO:17)

[0230] 存在3种在黑脓素和快速动力学测定二者中比亲代 (Axmi428H-HPYG, SEQ ID NO: 16) 更好地进行的附加突变体:

[0231] • 428H I209A、Q247H、E351P G352Y、A356G (Axmi428H-AHPYG, SEQ ID NO:13)

[0232] • 428H V221I、Q247H、E351P G352Y、A356G (Axmi428H-IHPYG, SEQ ID NO:18)

[0233] • 428H I209A、V221I、Q247H、E351P G352Y、A356G (Axmi428H-AIHPYG, SEQ ID NO: 14)

[0234] 实例2.Axmi309H的诱变

[0235] 将一些428H突变引入到HPPD酶Axmi309H (SEQ ID NO:5) 的相应位置中,包括E351P和A356G突变。在棕色测定中观察到在活性位点含有E335P、G336W和A340G (Axmi309H-PWG, SEQ ID NO:21) 的Axmi309H蛋白似乎对氟磺草酮最耐受。

[0236] 实例3.使用HGD方法对Axmi428H变体进行分析

[0237] 选择使用棕色测定鉴别的候选突变体。产生并纯化蛋白质。用HGD方法评估酶的活性和酶对HPPD抑制剂的耐受性。如W02011/076882中所述地产生并纯化HPPD蛋白。通过HGD测定,在室温下通过将适当量的HPPD添加到总体积为1ml的200mM Tris-HCl pH 7.6、10mM 抗坏血酸盐、20 $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>、650单位的过氧化氢酶、8 $\mu$ g HGA双加氧酶 (HGA:尿黑酸) 以及600 $\mu$ M HPP中。由因形成顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸而引起的在318nm处的吸光度增加来确定在抑制剂存在或不存在下的初始反应速率 ( $\epsilon_{318} = 11,900 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )。由HPPD活性与使用ID商业解决方案公司 (Business Solutions Ltd.) XLfit套装软件的4参数逻辑模型或S形剂量反应模型测量的抑制剂浓度的剂量反应曲线确定pI50-值 (抑制50%酶活性的抑制剂浓度 (以摩尔浓度计) 负log值。由于所测试的HPPD抑制剂的UV吸收,所以不能测试>100 $\mu$ M的抑制剂

浓度。结果“<4”意味着在100 $\mu$ M抑制剂浓度下的抑制低于25%并且因此pI50-值在所测试的抑制剂的浓度范围内不能精确计算。“n.d.”意指未测定。

[0238] 因此将允许随着时间连续进行HPPD-催化的HGA形成的HGD测定用于确定所测试的HPPD抑制剂的抑制类型。当在抑制剂存在下发现HPPD活性以缓慢结合或缓慢且紧密结合的抑制剂所特有的时间依赖性方式减小(定义参见莫里森(1982))生物化学趋势7,102-105)时,该抑制剂被称为时间依赖性的(缩写为“td”)。当在抑制剂存在下HPPD活性受到抑制但发生该抑制并不以时间依赖性方式减小时,该抑制剂被称为可逆性的(缩写为“rev”)。

[0239] 缩写“no-in”意指由于以下事实使得抑制的类型不能确定,该事实是在100 $\mu$ M抑制剂浓度下未观察到相应HPPD变体的抑制。

[0240] 所测试的抑制剂是氟磺草酮、二酮腈(异噁唑草酮的活性化合物)和甲基磺草酮、以及选自N0-整合剂类别的3种抑制剂。结果显示在表4-7中。符号“>>”意指不在测量范围内但高度超过下文所列出的数值。

[0241] 表4. 使用HGD测定的Axmi428H突变体对二酮腈(DKN)的耐受性

克隆物	SEQ ID NO	Axmi428H中的氨基酸位置								pI50	
		193	209	221	247	351	352	355	356		
										二酮腈	$K_m$
Axmi428H	6	M	I	V	Q	E	G	K	A	7.0	47
Axmi428H-AHPYG	13	-	A	-	H	P	Y	-	G	3.7	326
Axmi428H-HPYG	16	-	-	-	H	P	Y	-	G	3.8	541
Axmi428H-AIHPYG	14	-	A	I	H	P	Y	-	G	4.0	188
Axmi428H-PWAQ	20	-	-	-	-	P	W	A	Q	4.3	>>1000
Axmi428H-IHPYG	18	-	-	I	H	P	Y	-	G	4.3	379
Axmi428H-IPYG	17	-	-	I	-	P	Y	-	G	4.5	680
Axmi428H-Evo40	21	-	-	-	-	P	S	-	E	5.2	1490
Axmi428H-YGG	12	-	-	-	-	-	Y	G	G	5.4	321
Axmi428H-GPYG	15	G	-	-	-	P	Y	-	G		-

[0242] [0243] 对于HPPD Axmi428H-GPYG,在此测定中没有活性是可检测到的。

[0244] 表5. 使用HGD测定的Axmi428H突变体对氟磺草酮(TBT)和和甲基磺草酮(MST)的耐受性

[0245]

	SEQ ID NO:	Axmi428H中的氨基酸位置								pI50	pI50
		193	209	221	247	351	352	355	356	氟磺草酮	甲基磺草酮
Axmi428H	6	M	I	V	Q	E	G	K	A		
Axmi428H-HPYG	16	-	-	-	H	P	Y	-	G	5.5	4.9
Axmi428H-AHPYG	13	-	A	-	H	P	Y	-	G	5.2	4.6
Axmi428H-IHPYG	18	-	-	I	H	P	Y	-	G	5.8	5.2
Axmi428H-AIHPYG	14	-	A	I	H	P	Y	-	G	5.5	4.9
Axmi428H-IPYG	17	-	-	I	-	P	Y	-	G	5.6	5.3
Axmi428H-	12	-	-	-	-	-	Y	G	G	5.9	5.2

[0246]

YGG											
-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

[0247] 表6. 使用HGD测定的Axmi428H突变体对NO螯合剂Cmpd.1 (2-甲基-N-(5-甲基-1,3,4-噁二唑-2-基)-3-(甲磺酰基)-4-(三氟甲基)苯甲酰)、Cmpd.2 (2-氯-3-乙氧基-4-(甲磺酰基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)苯甲酰)以及Cmpd.4 (2-氯-3-(甲基硫烷基)-N-(1-甲基-1H-四唑-5-基)-4-(三氟甲基)苯甲酰)的耐受性

[0248]

	SEQ ID NO:	Axmi428H中的氨基酸位置								pI50	pI50	pI50
		193	209	221	247	351	352	355	356	Cmpd.2	Cmpd.1	Cmpd.4
Axmi428H	6	M	I	V	Q	E	G	K	A	n.d	n.d.	n.d
Axmi428H-HPYG	16	-	-	-	H	P	Y	-	G	5	4.3	n.d.
Axmi428H-AHPYG	13	-	A	-	H	P	Y	-	G	5.3	4.3	n.d
Axmi428H-IHPYG	18	-	-	I	H	P	Y	-	G	5.5	4.4	5.9
Axmi428H-AIHPYG	14	-	A	I	H	P	Y	-	G	5.3	4.3	n.d
Axmi428H-IPYG	17	-	-	I	-	P	Y	-	G	5.7	4.6	5.9
Axmi428H-YGG	12	-	-	-	-	-	Y	G	G	5.8	5.6	6.4

[0249] 表7. 突变对于每种单一测试的抑制剂 (DKN、TBT和MST) 对酶的抑制类型的作用

[0250]

										p150	p150	p150
	SEQ ID NO	193	209	221	247	351	352	355	356	DKN	TBT	MST
Axmi428H	6	M	I	V	Q	E	G	K	A	td	td	td
Axmi428H-HPYG	16	-	-	-	H	P	Y	-	G	rev	rev	rev
Axmi428H-AHPYG	13	-	A	-	H	P	Y	-	G	rev	rev	rev
Axmi428H-IHPYG	18	-	-	I	H	P	Y	-	G	rev	rev	rev
Axmi428H-AIHPYG	14	-	A	I	H	P	Y	-	G	rev	rev	rev
Axmi428H-IPYG	17	-	-	I	-	P	Y	-	G	rev	rev	rev
Axmi428H-YGG	12	-	-	-	-	-	Y	G	G	rev	rev	rev

[0251] n.d.:未确定

[0252] rev:每种测试的抑制剂对HPPD酶的可逆性抑制

[0253] td:每种测试的抑制剂对HPPD酶的时间依赖性抑制

[0254] 表8. 突变对于每种单一测试的抑制剂(NO螯合剂)对酶的抑制类型的作用

[0255]

										p150	p150	p150
		193	209	221	247	351	352	355	356	Cmpd.2	Cmpd.1	Cmpd.4
Axmi428H	6	M	I	V	Q	E	G	K	A	n.d	n.d.	n.d
Axmi428H-HPYG	16	-	-	-	H	P	Y	-	G	rev	rev	n.d.
Axmi428H-AHPYG	13	-	A	-	H	P	Y	-	G	rev	rev	n.d.
Axmi428H-IHPYG	18	-	-	I	H	P	Y	-	G	rev	rev	rev
Axmi428H-AIHPYG	14	-	A	I	H	P	Y	-	G	rev	rev	n.d.
Axmi428H-IPYG	17	-	-	I	-	P	Y	-	G	rev	rev	rev
Axmi428H-YGG	12	-	-	-	-	-	Y	G	G	rev	rev	rev

[0256] 实例4.大豆转化

[0257] 用本领域已熟知的方法实现大豆转化,该方法诸如实质上利用帕斯(Paz)等人(2006),植物细胞报告25:206所述的方法使用根瘤土壤杆菌介导的转化大豆半种子外植体的一种所述方法。用氟磺草酮作为选择性标记鉴别转化体。观察绿芽的外观,并且将其记录为对除草剂异噁唑草酮或氟磺草酮的耐受性的指示。耐受性转基因芽将显示出比得上未用异噁唑草酮或氟磺草酮处理的野生型大豆芽的正常绿色,而用相同量的异噁唑草酮或氟磺草酮处理的野生型大豆芽将完全漂白。这表明HPPD蛋白的存在使得具有对HPPD抑制剂除草

剂如异噁唑草酮或氟磺草酮的耐受性。

[0258] 将耐受性绿芽转移到生根培养基中或接枝。在适应周期之后将生根的苗转移到温室中。然后用补充有硫酸铵甲酯菜籽油的HPPD抑制剂除草剂喷洒含有该转基因的植物，例如用氟磺草酮以100g AI/ha的速率或用甲基磺草酮以300g AI/ha的速率喷洒。在施加十天后，评估由施加除草剂引起的症状并且将其与在相同条件下在野生型植物上观察到的症状相比。

[0259] 实例5.大豆植物对甲基磺草酮的耐受性

[0260] 测试表达本发明的HPPD抑制剂耐受性酶、具有赋予对草甘膦的耐受性的基因和赋予对草丁膦的耐受性的基因的大豆植物对甲基磺草酮的耐受性。在每次喷洒前校准DeVries Tracker喷雾器。用于甲基磺草酮(MST)测试的化学配制品是Callisto®4 SC配制品。用3X田地率(等同于每亩9液量盎司的含有40%活性成分(AI)甲基磺草酮的相同除草剂配制品)进行喷洒测试,这等于每公顷316克AI。在喷洒一周后评估耐受性。将“0”耐受性评定等级分配给其芽尖、新萌发的三叶和一些腋芽完全漂白的植物。将“1”评定等级分配给具有轻微耐受性的植物,即具有一些绿色的最新的植物芽组织,并且未完全漂白。将“2”评定等级分配给显示中等耐受性的植物,即顶部三叶超过50%叶面积未显示萎黄病或漂白损伤。将“3”评定等级分配给显示几乎完全耐受性的植物,即小于10%叶面积显示萎黄病或非常轻微的漂白。结果显示在表9中。

[0261] 表9.

[0262]

克隆物	核苷酸 SEQ ID NO:	核酸SEQ ID NO:	0	1	2	3	植物的总数 #
Axmi428H	45	6	5	18	23	12	58
Axmi428H-Evo41	39	8	2	7	4	8	21
Axmi428H- AHPYG	41	13	1	2	3	6	12
Axmi428H- IHPYG	42	18	6	15	3	3	27
Axmi428H-YGG	43	12	7	15	25	22	69
Axmi428H-HPYG	44	16	4	11	37	3	55
Axmi309H-PWG	40	22	5	18	23	12	58

[0263] 实例6:棉花T0植物建立和选择。

[0264] 用本领域已熟知的方法实现棉花转化,特别是在PCT专利公开WO 00/71733中所述的方法中的优选方法。将再生的植物转移到温室中。在适应周期后,用补充有硫酸铵和甲酯菜籽油的HPPD抑制剂除草剂喷洒足够生长的植物,这些除草剂例如等同于100或200gAI/ha的氟磺草酮。在喷洒应用七天后,评估由用除草剂处理引起的症状并且将其与在相同条件下经受相同处理的野生型棉花植物上观察到的症状相比。

[0265] 实例7.通过土壤杆菌介导的转化转化玉蜀黍植物细胞

[0266] 最好在传粉后8-12天收集穗。从穗中分离胚,并且将大小0.8-1.5mm的那些胚优选用于转化。将胚以小盾片侧朝上的方向接种在适合的孵育培养基上,并且在25°C下在黑暗中孵育过夜。



[0267] 然而, 胚本身不需要孵育过夜。将胚与含有具有本发明的核苷酸序列的适当载体的土壤杆菌菌株接触, 以进行Ti质粒介导的转移约5-10min, 并且然后将其接种到共培养培养基上约3天(在黑暗中以25℃下)。在共培养之后, 将外植体转移到回收期培养基约五天(在黑暗中以25℃下)。根据所利用的具体选择的性质和特征, 将外植体在选择性培养基中孵育八周。在选择期间之后, 将所得愈伤组织转移到胚成熟培养基中, 直到观察到成熟体细胞胚胎形成为止。然后将所得成熟体细胞胚胎置于低照度下, 并且如本领域已知地开始再生过程。允许所得根在生根培养基中生根, 并且将所得植物转移到育苗盆中并增殖为转基因植物。

[0268] 说明书中提到的所有出版物和专利申请都表明了本发明相关领域技术人员的技术水平。所有出版物和专利申请以相同程度通过引用结合在此, 如同这些出版物或专利申请中的每一个都是特定地和单独地通过引用结合在此的。

[0269] 尽管出于清楚地理解的目的, 本发明通过说明和实例加以详细描述, 显而易见的是, 可以在随附的权利要求书的范围内作出一定的改变和修改。

## 序列表

<110> 拜耳作物科学有限合伙公司 (Bayer Cropscience LP)  
拜耳作物科学股份公司 (Bayer Cropscience AG)

<120> HPPD 变体和使用方法

<130> APA146008W0

<150> 61/951, 455

<151> 2014-03-11

<160> 45

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 358

<212> PRT

<213> 荧光假单胞菌 (Pseudomonas fluorescens)

<400> 1

Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe  
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu  
20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His  
35 40 45

[0001]

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn  
50 55 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly  
65 70 75 80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu  
85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu  
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile  
115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr  
130 135 140

Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile  
145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala  
165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp  
180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro

195	200	205
Asp Gly Met Ile Arg Ile	Pro Leu Asn Glu Glu	Ser Ser Lys Gly Ala
210	215	220
Gly Gln Ile Glu Glu Phe	Leu Met Gln Phe Asn	Gly Glu Gly Ile Gln
225	230	235
His Val Ala Phe Leu Thr	Asp Asp Leu Val Lys	Thr Trp Asp Ala Leu
	245	250
Lys Lys Ile Gly Met Arg	Phe Met Thr Ala Pro	Pro Asp Thr Tyr Tyr
	260	265
Glu Met Leu Glu Gly Arg	Leu Pro Asp His Gly	Glu Pro Val Asp Gln
	275	280
Leu Gln Ala Arg Gly Ile	Leu Leu Asp Gly Ser	Ser Val Glu Gly Asp
	290	295
Lys Arg Leu Leu Leu Gln	Ile Phe Ser Glu Thr	Leu Met Gly Pro Val
	305	310
Phe Phe Glu Phe Ile Gln	Arg Lys Gly Asp Asp	Gly Phe Gly Glu Gly
	325	330
[0002] Asn Phe Lys Ala Leu Phe	Glu Ser Ile Glu Arg Asp	Gln Val Arg Arg
	340	345
Gly Val Leu Thr Ala Asp		
	355	
<210> 2		
<211> 358		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 变体 HPPD		
<400> 2		
Met Ala Asp Leu Tyr Glu	Asn Pro Met Gly Leu	Met Gly Phe Glu Phe
1	5	10
Ile Glu Phe Ala Ser Pro	Thr Pro Gly Thr Leu	Glu Pro Ile Phe Glu
	20	25
Ile Met Gly Phe Thr Lys	Val Ala Thr His Arg	Ser Lys Asn Val His
	35	40
Leu Tyr Arg Gln Gly Glu	Ile Asn Leu Ile Leu	Asn Asn Glu Pro Asn
	50	55
Ser Ile Ala Ser Tyr Phe	Ala Ala Glu His Gly	Pro Ser Val Cys Gly
	65	70
		75
		80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu  
85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu  
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile  
115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr  
130 135 140

Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile  
145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala  
165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp  
180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro  
195 200 205

Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala  
210 215 220

[0003]

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln  
225 230 235 240

His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu  
245 250 255

Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr  
260 265 270

Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln  
275 280 285

Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp  
290 295 300

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val  
305 310 315 320

Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Glu Trp  
325 330 335

Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg  
340 345 350

Gly Val Leu Thr Ala Asp  
355

<210> 3  
 <211> 358  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 变体 HPPD

<400> 3

Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe  
 1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu  
 20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His  
 35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn  
 50 55 60

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly  
 65 70 75 80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu  
 85 90 95

[0004]

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu  
 100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile  
 115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr  
 130 135 140

Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile  
 145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala  
 165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp  
 180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro  
 195 200 205

Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala  
 210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln  
 225 230 235 240

His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu

		245				250					255				
Lys	Lys	Ile	Gly	Met	Arg	Phe	Met	Thr	Ala	Pro	Pro	Asp	Thr	Tyr	Tyr
		260						265					270		
Glu	Met	Leu	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	Asp	His	Gly	Glu	Pro	Val	Asp	Gln
		275					280					285			
Leu	Gln	Ala	Arg	Gly	Ile	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Val	Glu	Gly	Asp
		290				295						300			
Lys	Arg	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Thr	Leu	Met	Gly	Pro	Val
		305			310					315					320
Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asp	Asp	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser
				325					330						335
Asn	Phe	Lys	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Arg	Asp	Gln	Val	Arg	Arg
			340					345					350		
Gly	Val	Leu	Thr	Ala	Asp										

- <210> 4
- <211> 358
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 变体 HPPD
- <400> 4

[0005]

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr  
 130 135 140  
 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile  
 145 150 155 160  
 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala  
 165 170 175  
 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp  
 180 185 190  
 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro  
 195 200 205  
 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala  
 210 215 220  
 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln  
 225 230 235 240  
 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu  
 245 250 255  
 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr  
 260 265 270  
 [0006]  
 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln  
 275 280 285  
 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp  
 290 295 300  
 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val  
 305 310 315 320  
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Trp  
 325 330 335  
 Asn Phe Ala Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg  
 340 345 350  
 Gly Val Leu Thr Ala Asp  
 355  
 <210> 5  
 <211> 358  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体 HPPD  
 <400> 5  
 Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe

1	5	10	15
Ile Glu Phe	Ala Ser Pro Thr Pro	Gly Thr Leu Glu Pro	Ile Phe Glu
	20	25	30
Ile Met Gly	Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser	Lys Asn Val His	
	35	40	45
Leu Tyr Arg	Gln Gly Ala Ile Asn Leu Ile Leu	Asn Asn Glu Pro His	
	50	55	60
Ser Val Ala	Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys	Gly	
	65	70	75
Met Ala Phe	Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg	Ala Leu	
	85	90	95
Glu Leu Gly	Ala Gln Pro Ile His Ile Glu Thr Gly Pro	Met Glu Leu	
	100	105	110
Asn Leu Pro	Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro	Leu Tyr Leu Ile	
	115	120	125
Asp Arg Phe	Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Phe		
	130	135	140
[0007] Leu Glu Gly	Val Asp Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Ile Ile		
	145	150	155
Asp His Leu Thr	His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Ala Tyr Trp Ala		
	165	170	175
Asn Phe Tyr	Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ile Arg Tyr Phe Asp		
	180	185	190
Ile Lys Gly	Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Thr Ala Pro		
	195	200	205
Asp Gly Met	Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala		
	210	215	220
Gly Gln Ile	Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln		
	225	230	235
His Val Ala	Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Gln Leu		
	245	250	255
Lys Lys Ile	Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr		
	260	265	270
Glu Met Leu	Glu Gly Arg Leu Pro Asn His Gly Glu Pro Val Asp Gln		
	275	280	285
Leu Gln Ser	Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ala Ser Asp Lys Glu Asp		



290 295 300  
 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val  
 305 310 315 320  
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Glu Gly  
 325 330 335  
 Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg  
 340 345 350  
 Gly Val Leu Ala Thr Glu  
 355  
 <210> 6  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体 HPPD  
 <400> 6  
 Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp  
 1 5 10 15  
 Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala  
 20 25 30  
 Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln  
 35 40 45  
 Ala Ile Ala Lys His Arg Arg Lys Asn Val Thr Leu Tyr Arg Gln Gly  
 50 55 60  
 Glu Ile Asn Phe Ile Ile Asn Ala Glu Pro Asp Ser Phe Ala Gln Arg  
 65 70 75 80  
 Phe Ala Arg Leu His Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Ala Ile Arg Val  
 85 90 95  
 Asn Asp Ala Lys Tyr Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Ser Leu Gly Ala Trp  
 100 105 110  
 Gly Tyr Ala Gln Gln Ala Ala Pro Gly Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ile  
 115 120 125  
 Lys Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Tyr Phe Ile Asp Lys Trp Arg Gly  
 130 135 140  
 Lys Asn Gly Ala Lys Asp Gly Asp Leu Gly Asn Ile Ser Phe Phe Asp  
 145 150 155 160  
 Val Asp Phe Glu Pro Leu Pro Gly Ala Asp Leu His Pro Glu Gly Leu  
 165 170 175

[0008]

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

[0009]

<210> 7  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体 HPPD  
 <400> 7  
 Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp  
 1 5 10 15  
 Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala  
 20 25 30  
 Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln

	35	40	45																
	Ala	Ile	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly			
	50						55					60							
	Glu	Ile	Asn	Phe	Ile	Ile	Asn	Ala	Glu	Pro	Asp	Ser	Phe	Ala	Gln	Arg			
	65				70						75					80			
	Phe	Ala	Arg	Leu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Ala	Ile	Ala	Ile	Arg	Val			
				85						90					95				
	Asn	Asp	Ala	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Arg	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Trp			
				100					105					110					
	Gly	Tyr	Ala	Gln	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Ala	Ile			
			115					120					125						
	Lys	Gly	Ile	Gly	Asp	Ser	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Arg	Gly			
	130						135					140							
	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Phe	Phe	Asp			
	145					150					155					160			
	Val	Asp	Phe	Glu	Pro	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Leu			
				165						170						175			
[0010]	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	Asn	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg			
				180					185					190					
	Met	Ala	Glu	Leu	Ala	Glu	Phe	Tyr	Glu	Arg	Ile	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu			
			195					200					205						
	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Lys			
	210						215					220							
	Ala	Met	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu	Glu			
	225					230					235					240			
	Gly	Asn	Asp	Lys	Ala	Gly	Gln	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asp	Met	Tyr	Arg			
				245						250					255				
	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu	Tyr	Asp			
				260					265					270					
	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Gln	Met	Asn	Gly	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser			
			275					280						285					
	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Arg	Ile	Pro	Asp	Leu	Gln	Glu			
		290					295					300							
	Pro	Ile	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Gly	Gln	Pro			
	305					310					315					320			
	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Asn	Gln	Leu	Gly	Pro	Ile			

	325		330		335														
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Ser			
			340						345					350					
	Asn	Phe	Lys	Glu	Leu	Phe	Glu	Thr	Met	Glu	Leu	Asp	Gln	Met	Arg	Arg			
			355					360					365						
	Gly	Val	Leu	Lys	Thr														
			370																
	<210>	8																	
	<211>	373																	
	<212>	PRT																	
	<213>	人工序列																	
	<220>																		
	<223>	变体 HPPD																	
	<400>	8																	
	Met	Asn	Ala	Pro	Leu	Thr	Gln	Ser	Asn	Ala	Ser	Gln	Phe	Gln	Thr	Trp			
	1				5					10					15				
	Asp	Asn	Pro	Met	Gly	Thr	Asp	Gly	Phe	Glu	Phe	Val	Glu	Tyr	Ala	Ala			
				20					25					30					
	Pro	Asp	Pro	Val	Ala	Met	Gly	Gln	Leu	Phe	Glu	Arg	Met	Gly	Phe	Gln			
				35					40				45						
[0011]	Ala	Ile	Ala	Lys	His	Arg	Arg	Lys	Asn	Val	Thr	Leu	Tyr	Arg	Gln	Gly			
		50					55					60							
	Glu	Ile	Asn	Phe	Ile	Ile	Asn	Ala	Glu	Pro	Asp	Ser	Phe	Ala	Gln	Arg			
		65				70					75					80			
	Phe	Ala	Arg	Leu	His	Gly	Pro	Ser	Val	Cys	Ala	Ile	Ala	Ile	Arg	Val			
					85					90					95				
	Asn	Asp	Ala	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Glu	Arg	Ala	Thr	Ser	Leu	Gly	Ala	Trp			
				100					105					110					
	Gly	Tyr	Ala	Gln	Gln	Ala	Ala	Pro	Gly	Glu	Leu	Ser	Ile	Pro	Ala	Ile			
			115						120					125					
	Lys	Gly	Ile	Gly	Asp	Ser	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Arg	Gly			
		130						135					140						
	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Phe	Phe	Asp			
		145				150					155					160			
	Val	Asp	Phe	Glu	Pro	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Leu			
					165					170						175			
	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	Asn	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg			
				180					185						190				

Met Ala Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Glu Arg Ile Phe Asn Phe Arg Glu  
 195 200 205

Ile Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Gln Ala Thr Gly Val Lys Ser Lys  
 210 215 220

Ala Met Thr Ser Pro Cys Gly Lys Ile Arg Ile Pro Ile Asn Glu Glu  
 225 230 235 240

Gly Asn Asp Lys Ala Gly Gln Ile Gln Glu Tyr Leu Asp Met Tyr Arg  
 245 250 255

Gly Glu Gly Ile Gln His Ile Ala Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr Asp  
 260 265 270

Thr Val Asp Gly Leu Gln Met Asn Gly Ile Lys Leu Leu Asn Thr Ser  
 275 280 285

Glu Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Pro Lys Arg Ile Pro Asp Leu Gln Glu  
 290 295 300

Pro Ile Pro Glu Leu Leu Ala Arg Asn Ile Leu Val Asp Gly Gln Pro  
 305 310 315 320

Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Asn Gln Leu Gly Pro Ile  
 325 330 335

[0012] Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Pro Trp  
 340 345 350

Asn Phe Ala Gln Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg  
 355 360 365

Gly Val Leu Lys Thr  
 370

<210> 9  
 <211> 357  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 变体 HPPD

<400> 9

Met Asn Ala Val Ala Lys Ile Glu Gln His Asn Pro Ile Gly Thr Asp  
 1 5 10 15

Gly Phe Glu Phe Val Glu Phe Thr Ala Pro Asp Ala Lys Gly Ile Glu  
 20 25 30

Gln Leu Arg Gln Leu Phe Asn Met Met Gly Phe Thr Glu Thr Ala Lys  
 35 40 45

His Arg Ser Lys Glu Val Phe Leu Phe Gln Gln Asn Asp Ile Asn Ile

	50						55									60
	Val	Leu	Asn	Gly	Ser	Pro	Thr	Gly	His	Val	His	Glu	Phe	Ala	Leu	Lys
	65						70				75					80
	His	Gly	Pro	Ser	Ala	Cys	Ala	Met	Ala	Phe	Arg	Val	Lys	Asn	Ala	Ser
					85					90					95	
	Gln	Ala	Ala	Ala	Tyr	Ala	Glu	Ser	Gln	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Gly	Ser
				100					105					110		
	His	Ala	Asn	Phe	Gly	Glu	Leu	Asn	Ile	Pro	Ser	Leu	Glu	Gly	Ile	Gly
			115					120					125			
	Gly	Ser	Leu	Leu	Tyr	Leu	Val	Asp	Arg	Tyr	Gly	Asp	Arg	Ser	Ile	Tyr
	130						135					140				
	Asp	Val	Asp	Phe	Glu	Phe	Ile	Glu	Gly	Arg	Ser	Ala	Asn	Asp	Asn	Ser
	145					150					155					160
	Val	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	His	Asn	Val	Lys	Arg	Gly
					165					170						175
	Gln	Met	Asp	Val	Trp	Ser	Gly	Phe	Tyr	Glu	Arg	Ile	Ala	Asn	Phe	Arg
				180					185						190	
[0013]	Glu	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ile	Glu	Gly	Lys	Leu	Thr	Gly	Leu	Phe	Ser
			195					200					205			
	Arg	Ala	Met	Thr	Ala	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu
		210					215						220			
	Ser	Ala	Asp	Asp	Thr	Ser	Gln	Ile	Glu	Glu	Phe	Ile	Arg	Glu	Tyr	His
	225					230					235					240
	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Asp	Ile	Tyr	Ala
					245					250						255
	Thr	Val	Arg	Lys	Leu	Arg	Asp	Asn	Gly	Val	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Pro
				260					265					270		
	Asp	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Lys	Val	Asp	Thr	Arg	Val	Ala	Gly	His	Gly	Glu
			275					280					285			
	Pro	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Asn	Leu	Leu	Ile	Asp	Gly	Ala	Pro
		290					295						300			
	Gly	Asp	Asp	Gly	Ile	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Thr	Asp	Thr	Val	Ile	Gly
	305					310					315					320
	Pro	Ile	Phe	Phe	Glu	Ile	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asn	Gln	Gly	Phe	Gly
					325					330						335
	Pro	Ser	Asn	Phe	Lys	Glu	Leu	Phe	Glu	Ser	Ile	Glu	Glu	Asp	Gln	Ile

340 345 350  
 Arg Arg Gly Val Ile  
 355  
 <210> 10  
 <211> 357  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体 HPPD  
 <400> 10  
 Met Asn Ala Val Ala Lys Ile Glu Gln His Asn Pro Ile Gly Thr Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Glu Phe Val Glu Phe Thr Ala Pro Asp Ala Lys Gly Ile Glu  
 20 25 30  
 Gln Leu Arg Gln Leu Phe Asn Met Met Gly Phe Thr Glu Thr Ala Lys  
 35 40 45  
 His Arg Ser Lys Glu Val Phe Leu Phe Gln Gln Asn Asp Ile Asn Ile  
 50 55 60  
 Val Leu Asn Gly Ser Pro Thr Gly His Val His Glu Phe Ala Leu Lys  
 65 70 75 80  
 His Gly Pro Ser Ala Cys Ala Met Ala Phe Arg Val Lys Asn Ala Ser  
 85 90 95  
 Gln Ala Ala Ala Tyr Ala Glu Ser Gln Gly Ala Lys Leu Val Gly Ser  
 100 105 110  
 His Ala Asn Phe Gly Glu Leu Asn Ile Pro Ser Leu Glu Gly Ile Gly  
 115 120 125  
 Gly Ser Leu Leu Tyr Leu Val Asp Arg Tyr Gly Asp Arg Ser Ile Tyr  
 130 135 140  
 Asp Val Asp Phe Glu Phe Ile Glu Gly Arg Ser Ala Asn Asp Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Val Gly Leu Thr Tyr Ile Asp His Leu Thr His Asn Val Lys Arg Gly  
 165 170 175  
 Gln Met Asp Val Trp Ser Gly Phe Tyr Glu Arg Ile Ala Asn Phe Arg  
 180 185 190  
 Glu Ile Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Lys Leu Thr Gly Leu Phe Ser  
 195 200 205  
 Arg Ala Met Thr Ala Pro Cys Gly Lys Ile Arg Ile Pro Ile Asn Glu  
 210 215 220

[0014]

Ser Ala Asp Asp Thr Ser Gln Ile Glu Glu Phe Ile Arg Glu Tyr His  
 225 230 235 240  
 Gly Glu Gly Ile Gln His Ile Ala Leu Thr Thr Asp Asp Ile Tyr Ala  
 245 250 255  
 Thr Val Arg Lys Leu Arg Asp Asn Gly Val Lys Phe Met Ser Thr Pro  
 260 265 270  
 Asp Thr Tyr Tyr Glu Lys Val Asp Thr Arg Val Ala Gly His Gly Glu  
 275 280 285  
 Pro Leu Glu Gln Leu Arg Glu Leu Asn Leu Leu Ile Asp Gly Ala Pro  
 290 295 300  
 Gly Asp Asp Gly Ile Leu Leu Gln Ile Phe Thr Asp Thr Val Ile Gly  
 305 310 315 320  
 Pro Ile Phe Phe Glu Ile Ile Gln Arg Lys Gly Asn Gln Gly Phe Gly  
 325 330 335  
 Pro Trp Asn Phe Ala Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Glu Asp Gln Ile  
 340 345 350  
 Arg Arg Gly Val Ile  
 355

[0015]

<210> 11  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体 HPPD  
 <400> 11

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



	100		105		110
	Gly Tyr Ala 115	Gln Gln Ala Ala	Pro Gly Glu Leu Ser 120	Ile Pro Ala Ile 125	
	Lys Gly Ile 130	Gly Asp Ser 135	Leu Ile Tyr Phe Ile 140	Lys Trp Arg Gly	
	Lys Asn Gly Ala Lys 145	Asp Gly Asp 150	Leu Gly Asn Ile 155	Ser Phe Phe Asp 160	
	Val Asp Phe Glu 165	Pro Leu Pro Gly Ala 170	Asp Leu His Pro 175	Glu Gly Leu	
	Gly Leu Thr 180	Tyr Ile Asp His Leu 185	Thr Asn Asn Val Tyr 190	Arg Gly Arg	
	Met Ala Glu 195	Leu Ala Glu Phe Tyr 200	Glu Arg Ile Phe Asn 205	Phe Arg Glu	
	Ile Arg Tyr 210	Phe Asp Ile Glu Gly 215	Gln Ala Thr Gly 220	Val Lys Ser Lys	
	Ala Met Thr 225	Ser Pro Cys Gly Lys 230	Ile Arg Ile Pro 235	Ile Asn Glu Glu 240	
[0016]	Gly Asn Asp Lys 245	Ala Gly Gln Ile Gln 250	Glu Tyr Leu Asp Met 255	Tyr Arg	
	Gly Glu Gly 260	Ile Gln His Ile Ala 265	Leu Gly Ser Thr Asn 270	Leu Tyr Asp	
	Thr Val Asp 275	Gly Leu Gln Met Asn 280	Gly Ile Lys Leu Leu 285	Asn Thr Ser	
	Glu Thr Tyr 290	Tyr Glu Leu Leu Pro 295	Lys Arg Ile Pro 300	Asp Leu Gln Glu	
	Pro Ile Pro 305	Glu Leu Leu Ala Arg 310	Asn Ile Leu Val Asp 315	Gly Gln Pro 320	
	Gly Glu Leu 325	Leu Leu Gln Ile Phe Ser 330	Glu Asn Gln Leu Gly 335	Pro Ile	
	Phe Phe Glu 340	Phe Ile Gln Arg Lys 345	Gly Asn Ser Gly Phe 350	Gly Glu Tyr	
	Asn Phe Lys 355	Gly Leu Phe Glu Thr 360	Met Glu Leu Asp 365	Gln Met Arg Arg	
	Gly Val Leu 370	Lys Thr			

&lt;210&gt; 12

<211> 373  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 变体 HPPD

<400> 12

Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp  
 1 5 10 15

Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala  
 20 25 30

Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln  
 35 40 45

Ala Ile Ala Lys His Arg Arg Lys Asn Val Thr Leu Tyr Arg Gln Gly  
 50 55 60

Glu Ile Asn Phe Ile Ile Asn Ala Glu Pro Asp Ser Phe Ala Gln Arg  
 65 70 75 80

Phe Ala Arg Leu His Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Ala Ile Arg Val  
 85 90 95

Asn Asp Ala Lys Tyr Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Ser Leu Gly Ala Trp  
 100 105 110

[0017]

Gly Tyr Ala Gln Gln Ala Ala Pro Gly Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ile  
 115 120 125

Lys Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Tyr Phe Ile Asp Lys Trp Arg Gly  
 130 135 140

Lys Asn Gly Ala Lys Asp Gly Asp Leu Gly Asn Ile Ser Phe Phe Asp  
 145 150 155 160

Val Asp Phe Glu Pro Leu Pro Gly Ala Asp Leu His Pro Glu Gly Leu  
 165 170 175

Gly Leu Thr Tyr Ile Asp His Leu Thr Asn Asn Val Tyr Arg Gly Arg  
 180 185 190

Met Ala Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Glu Arg Ile Phe Asn Phe Arg Glu  
 195 200 205

Ile Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Gln Ala Thr Gly Val Lys Ser Lys  
 210 215 220

Ala Met Thr Ser Pro Cys Gly Lys Ile Arg Ile Pro Ile Asn Glu Glu  
 225 230 235 240

Gly Asn Asp Lys Ala Gly Gln Ile Gln Glu Tyr Leu Asp Met Tyr Arg  
 245 250 255

Gly Glu Gly Ile Gln His Ile Ala Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr Asp  
 260 265 270  
 Thr Val Asp Gly Leu Gln Met Asn Gly Ile Lys Leu Leu Asn Thr Ser  
 275 280 285  
 Glu Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Pro Lys Arg Ile Pro Asp Leu Gln Glu  
 290 295 300  
 Pro Ile Pro Glu Leu Leu Ala Arg Asn Ile Leu Val Asp Gly Gln Pro  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Asn Gln Leu Gly Pro Ile  
 325 330 335  
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Glu Tyr  
 340 345 350  
 Asn Phe Gly Gly Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg  
 355 360 365  
 Gly Val Leu Lys Thr  
 370  
 <210> 13  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体 HPPD  
 <400> 13  
 Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp  
 1 5 10 15  
 Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala  
 20 25 30  
 Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln  
 35 40 45  
 Ala Ile Ala Lys His Arg Arg Lys Asn Val Thr Leu Tyr Arg Gln Gly  
 50 55 60  
 Glu Ile Asn Phe Ile Ile Asn Ala Glu Pro Asp Ser Phe Ala Gln Arg  
 65 70 75 80  
 Phe Ala Arg Leu His Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Ala Ile Arg Val  
 85 90 95  
 Asn Asp Ala Lys Tyr Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Ser Leu Gly Ala Trp  
 100 105 110  
 Gly Tyr Ala Gln Gln Ala Ala Pro Gly Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ile

[0018]

	115		120		125															
	Lys	Gly	Ile	Gly	Asp	Ser	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ile	Asp	Lys	Trp	Arg	Gly				
	130						135					140								
	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Phe	Phe	Asp				
	145					150					155					160				
	Val	Asp	Phe	Glu	Pro	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Leu				
					165					170					175					
	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	Asn	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg				
				180					185					190						
	Met	Ala	Glu	Leu	Ala	Glu	Phe	Tyr	Glu	Arg	Ile	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu				
			195					200					205							
	Ala	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Lys				
		210					215					220								
	Ala	Met	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu	Glu				
	225					230					235					240				
	Gly	Asn	Asp	Lys	Ala	Gly	His	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asp	Met	Tyr	Arg				
					245					250					255					
[0019]	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu	Tyr	Asp				
				260					265						270					
	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Gln	Met	Asn	Gly	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser				
			275					280						285						
	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Arg	Ile	Pro	Asp	Leu	Gln	Glu				
		290					295					300								
	Pro	Ile	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Gly	Gln	Pro				
	305					310					315					320				
	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Asn	Gln	Leu	Gly	Pro	Ile				
					325					330					335					
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Tyr				
				340					345					350						
	Asn	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Glu	Thr	Met	Glu	Leu	Asp	Gln	Met	Arg	Arg				
			355					360						365						
	Gly	Val	Leu	Lys	Thr															
		370																		
	<210>	14																		
	<211>	373																		
	<212>	PRT																		
	<213>	人工序列																		

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 变体 HPPD

&lt;400&gt; 14

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

[0020]

Lys Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Tyr Phe Ile Asp Lys Trp Arg Gly  
130 135 140Lys Asn Gly Ala Lys Asp Gly Asp Leu Gly Asn Ile Ser Phe Phe Asp  
145 150 155 160Val Asp Phe Glu Pro Leu Pro Gly Ala Asp Leu His Pro Glu Gly Leu  
165 170 175Gly Leu Thr Tyr Ile Asp His Leu Thr Asn Asn Val Tyr Arg Gly Arg  
180 185 190Met Ala Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Glu Arg Ile Phe Asn Phe Arg Glu  
195 200 205Ala Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Gln Ala Thr Gly Ile Lys Ser Lys  
210 215 220Ala Met Thr Ser Pro Cys Gly Lys Ile Arg Ile Pro Ile Asn Glu Glu  
225 230 235 240Gly Asn Asp Lys Ala Gly His Ile Gln Glu Tyr Leu Asp Met Tyr Arg  
245 250 255Gly Glu Gly Ile Gln His Ile Ala Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr Asp  
260 265 270

Thr Val Asp Gly Leu Gln Met Asn Gly Ile Lys Leu Leu Asn Thr Ser  
 275 280 285  
 Glu Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Pro Lys Arg Ile Pro Asp Leu Gln Glu  
 290 295 300  
 Pro Ile Pro Glu Leu Leu Ala Arg Asn Ile Leu Val Asp Gly Gln Pro  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Asn Gln Leu Gly Pro Ile  
 325 330 335  
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Pro Tyr  
 340 345 350  
 Asn Phe Lys Gly Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg  
 355 360 365  
 Gly Val Leu Lys Thr  
 370  
 <210> 15  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体 HPPD  
 [0021]  
 <400> 15  
 Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp  
 1 5 10 15  
 Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala  
 20 25 30  
 Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln  
 35 40 45  
 Ala Ile Ala Lys His Arg Arg Lys Asn Val Thr Leu Tyr Arg Gln Gly  
 50 55 60  
 Glu Ile Asn Phe Ile Ile Asn Ala Glu Pro Asp Ser Phe Ala Gln Arg  
 65 70 75 80  
 Phe Ala Arg Leu His Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Ala Ile Arg Val  
 85 90 95  
 Asn Asp Ala Lys Tyr Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Ser Leu Gly Ala Trp  
 100 105 110  
 Gly Tyr Ala Gln Gln Ala Ala Pro Gly Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ile  
 115 120 125  
 Lys Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Tyr Phe Ile Asp Lys Trp Arg Gly

	130		135				140									
	Lys	Asn	Gly	Ala	Lys	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Phe	Phe	Asp
	145					150					155					160
	Val	Asp	Phe	Glu	Pro	Leu	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	His	Pro	Glu	Gly	Leu
					165						170					175
	Gly	Leu	Thr	Tyr	Ile	Asp	His	Leu	Thr	Asn	Asn	Val	Tyr	Arg	Gly	Arg
				180					185					190		
	Gly	Ala	Glu	Leu	Ala	Glu	Phe	Tyr	Glu	Arg	Ile	Phe	Asn	Phe	Arg	Glu
			195					200					205			
	Ile	Arg	Tyr	Phe	Asp	Ile	Glu	Gly	Gln	Ala	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Lys
	210						215						220			
	Ala	Met	Thr	Ser	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Arg	Ile	Pro	Ile	Asn	Glu	Glu
	225					230					235					240
	Gly	Asn	Asp	Lys	Ala	Gly	Gln	Ile	Gln	Glu	Tyr	Leu	Asp	Met	Tyr	Arg
					245						250					255
	Gly	Glu	Gly	Ile	Gln	His	Ile	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Leu	Tyr	Asp
				260						265						270
[0022]	Thr	Val	Asp	Gly	Leu	Gln	Met	Asn	Gly	Ile	Lys	Leu	Leu	Asn	Thr	Ser
			275					280								285
	Glu	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Arg	Ile	Pro	Asp	Leu	Gln	Glu
		290					295					300				
	Pro	Ile	Pro	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asp	Gly	Gln	Pro
	305					310					315					320
	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Glu	Asn	Gln	Leu	Gly	Pro	Ile
					325						330					335
	Phe	Phe	Glu	Phe	Ile	Gln	Arg	Lys	Gly	Asn	Ser	Gly	Phe	Gly	Pro	Tyr
				340					345						350	
	Asn	Phe	Lys	Gly	Leu	Phe	Glu	Thr	Met	Glu	Leu	Asp	Gln	Met	Arg	Arg
			355					360						365		
	Gly	Val	Leu	Lys	Thr											
		370														
	<210>	16														
	<211>	373														
	<212>	PRT														
	<213>	人工序列														
	<220>															
	<223>	变体 HPPD														
	<400>	16														

Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp  
 1 5 10 15

Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala  
 20 25 30

Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln  
 35 40 45

Ala Ile Ala Lys His Arg Arg Lys Asn Val Thr Leu Tyr Arg Gln Gly  
 50 55 60

Glu Ile Asn Phe Ile Ile Asn Ala Glu Pro Asp Ser Phe Ala Gln Arg  
 65 70 75 80

Phe Ala Arg Leu His Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Ala Ile Arg Val  
 85 90 95

Asn Asp Ala Lys Tyr Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Ser Leu Gly Ala Trp  
 100 105 110

Gly Tyr Ala Gln Gln Ala Ala Pro Gly Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ile  
 115 120 125

Lys Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Tyr Phe Ile Asp Lys Trp Arg Gly  
 130 135 140

[0023]

Lys Asn Gly Ala Lys Asp Gly Asp Leu Gly Asn Ile Ser Phe Phe Asp  
 145 150 155 160

Val Asp Phe Glu Pro Leu Pro Gly Ala Asp Leu His Pro Glu Gly Leu  
 165 170 175

Gly Leu Thr Tyr Ile Asp His Leu Thr Asn Asn Val Tyr Arg Gly Arg  
 180 185 190

Met Ala Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Glu Arg Ile Phe Asn Phe Arg Glu  
 195 200 205

Ile Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Gln Ala Thr Gly Val Lys Ser Lys  
 210 215 220

Ala Met Thr Ser Pro Cys Gly Lys Ile Arg Ile Pro Ile Asn Glu Glu  
 225 230 235 240

Gly Asn Asp Lys Ala Gly His Ile Gln Glu Tyr Leu Asp Met Tyr Arg  
 245 250 255

Gly Glu Gly Ile Gln His Ile Ala Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr Asp  
 260 265 270

Thr Val Asp Gly Leu Gln Met Asn Gly Ile Lys Leu Leu Asn Thr Ser  
 275 280 285



Glu Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Pro Lys Arg Ile Pro Asp Leu Gln Glu  
 290 295 300

Pro Ile Pro Glu Leu Leu Ala Arg Asn Ile Leu Val Asp Gly Gln Pro  
 305 310 315

Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Asn Gln Leu Gly Pro Ile  
 325 330 335

Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Pro Tyr  
 340 345 350

Asn Phe Lys Gly Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg  
 355 360 365

Gly Val Leu Lys Thr  
 370

<210> 17  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 变体 HPPD

<400> 17

[0024]

Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp  
 1 5 10 15

Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala  
 20 25 30

Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln  
 35 40 45

Ala Ile Ala Lys His Arg Arg Lys Asn Val Thr Leu Tyr Arg Gln Gly  
 50 55 60

Glu Ile Asn Phe Ile Ile Asn Ala Glu Pro Asp Ser Phe Ala Gln Arg  
 65 70 75 80

Phe Ala Arg Leu His Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Ala Ile Arg Val  
 85 90 95

Asn Asp Ala Lys Tyr Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Ser Leu Gly Ala Trp  
 100 105 110

Gly Tyr Ala Gln Gln Ala Ala Pro Gly Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ile  
 115 120 125

Lys Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Tyr Phe Ile Asp Lys Trp Arg Gly  
 130 135 140

Lys Asn Gly Ala Lys Asp Gly Asp Leu Gly Asn Ile Ser Phe Phe Asp

145	150	155	160
Val Asp Phe Glu Pro Leu Pro Gly Ala Asp Leu His Pro Glu Gly Leu	165	170	175
Gly Leu Thr Tyr Ile Asp His Leu Thr Asn Asn Val Tyr Arg Gly Arg	180	185	190
Met Ala Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Glu Arg Ile Phe Asn Phe Arg Glu	195	200	205
Ile Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Gln Ala Thr Gly Ile Lys Ser Lys	210	215	220
Ala Met Thr Ser Pro Cys Gly Lys Ile Arg Ile Pro Ile Asn Glu Glu	225	230	240
Gly Asn Asp Lys Ala Gly Gln Ile Gln Glu Tyr Leu Asp Met Tyr Arg	245	250	255
Gly Glu Gly Ile Gln His Ile Ala Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr Asp	260	265	270
Thr Val Asp Gly Leu Gln Met Asn Gly Ile Lys Leu Leu Asn Thr Ser	275	280	285
[0025] Glu Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Pro Lys Arg Ile Pro Asp Leu Gln Glu	290	295	300
Pro Ile Pro Glu Leu Leu Ala Arg Asn Ile Leu Val Asp Gly Gln Pro	305	310	315
Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Asn Gln Leu Gly Pro Ile	325	330	335
Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Pro Tyr	340	345	350
Asn Phe Lys Gly Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg	355	360	365
Gly Val Leu Lys Thr	370		
<210> 18			
<211> 373			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 变体 HPPD			
<400> 18			
Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp	1	5	10
			15

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

[0026]

Pro Ile Pro Glu Leu Leu Ala Arg Asn Ile Leu Val Asp Gly Gln Pro  
305 310 315 320

Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Asn Gln Leu Gly Pro Ile  
325 330 335

Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Pro Tyr  
340 345 350

Asn Phe Lys Gly Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg  
355 360 365

Gly Val Leu Lys Thr  
370

<210> 19

<211> 373

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 变体 HPPD

<400> 19

Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp  
1 5 10 15

[0027]

Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala  
20 25 30

Pro Asp Pro Val Ala Met Gly Gln Leu Phe Glu Arg Met Gly Phe Gln  
35 40 45

Ala Ile Ala Lys His Arg Arg Lys Asn Val Thr Leu Tyr Arg Gln Gly  
50 55 60

Glu Ile Asn Phe Ile Ile Asn Ala Glu Pro Asp Ser Phe Ala Gln Arg  
65 70 75 80

Phe Ala Arg Leu His Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Ala Ile Arg Val  
85 90 95

Asn Asp Ala Lys Tyr Ala Tyr Glu Arg Ala Thr Ser Leu Gly Ala Trp  
100 105 110

Gly Tyr Ala Gln Gln Ala Ala Pro Gly Glu Leu Ser Ile Pro Ala Ile  
115 120 125

Lys Gly Ile Gly Asp Ser Leu Ile Tyr Phe Ile Asp Lys Trp Arg Gly  
130 135 140

Lys Asn Gly Ala Lys Asp Gly Asp Leu Gly Asn Ile Ser Phe Phe Asp  
145 150 155 160

Val Asp Phe Glu Pro Leu Pro Gly Ala Asp Leu His Pro Glu Gly Leu

	165		170		175
	Gly Leu Thr Tyr Ile Asp His Leu Thr Asn Asn Val Tyr Arg Gly Arg	180	185	190	
	Met Ala Glu Leu Ala Glu Phe Tyr Glu Arg Ile Phe Asn Phe Arg Glu	195	200	205	
	Ala Arg Tyr Phe Asp Ile Glu Gly Gln Ala Thr Gly Ser Lys Ser Lys	210	215	220	
	Ala Met Thr Ser Pro Cys Gly Lys Ile Arg Ile Pro Ile Asn Glu Glu	225	230	235	240
	Gly Asn Asp Lys Ala Gly His Ile Gln Glu Tyr Leu Asp Met Tyr Arg	245	250	255	
	Gly Glu Gly Ile Gln His Ile Ala Leu Gly Ser Thr Asn Leu Tyr Asp	260	265	270	
	Thr Val Asp Gly Leu Gln Met Asn Gly Ile Lys Leu Leu Asn Thr Ser	275	280	285	
	Glu Thr Tyr Tyr Glu Leu Leu Pro Lys Arg Ile Pro Asp Leu Gln Glu	290	295	300	
[0028]	Pro Ile Pro Glu Leu Leu Ala Arg Asn Ile Leu Val Asp Gly Gln Pro	305	310	315	320
	Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Asn Gln Leu Gly Pro Ile	325	330	335	
	Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Ala Tyr	340	345	350	
	Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg	355	360	365	
	Gly Val Leu Lys Thr	370			
	<210> 20				
	<211> 373				
	<212> PRT				
	<213> 人工序列				
	<220>				
	<223> 变体.HPPD				
	<400> 20				
	Met Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Asn Ala Ser Gln Phe Gln Thr Trp	1	5	10	15
	Asp Asn Pro Met Gly Thr Asp Gly Phe Glu Phe Val Glu Tyr Ala Ala	20	25	30	

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

[0029]

Gly Glu Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Asn Gln Leu Gly Pro Ile  
325 330 335

Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asn Ser Gly Phe Gly Pro Trp  
340 345 350

Asn Phe Ala Gln Leu Phe Glu Thr Met Glu Leu Asp Gln Met Arg Arg  
355 360 365

Gly Val Leu Lys Thr  
370

<210> 21  
<211> 358  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 变体 HPPD

<400> 21

Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe  
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu  
20 25 30

[0030]

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His  
35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Ala Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro His  
50 55 60

Ser Val Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly  
65 70 75 80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu  
85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Glu Thr Gly Pro Met Glu Leu  
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile  
115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Phe  
130 135 140

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

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Ala Tyr Trp Ala  
165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ile Arg Tyr Phe Asp

	180	185	190
	Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Thr Ala Pro 195 200 205		
	Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala 210 215 220		
	Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln 225 230 235 240		
	His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Gln Leu 245 250 255		
	Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr 260 265 270		
	Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asn His Gly Glu Pro Val Asp Gln 275 280 285		
	Leu Gln Ser Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ala Ser Asp Lys Glu Asp 290 295 300		
	Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val 305 310 315 320		
[0031]	Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Pro Trp 325 330 335		
	Asn Phe Lys Gly Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg 340 345 350		
	Gly Val Leu Ala Thr Glu 355		
	<210> 22 <211> 358 <212> PRT <213> 人工序列		
	<220> <223> 变体 HPPD		
	<400> 22		
	Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe 1 5 10 15		
	Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu 20 25 30		
	Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His 35 40 45		
	Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn 50 55 60		



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

[0032]

Gly Val Leu Thr Ala Asp  
355

<210> 23

<211> 440

<212> PRT

<213> 燕麦 (Avena sativa)

<400> 23

Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
1 5 10 15

Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
20 25 30

Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
50 55 60

Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
65 70 75 80

His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
85 90 95

[0033]

Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Thr  
100 105 110

Ala Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala  
115 120 125

Ala His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala  
130 135 140

Ala Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe  
145 150 155 160

Ala Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu  
165 170 175

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp  
180 185 190

Leu Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val  
195 200 205

Asp Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu  
210 215 220

Met Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu  
225 230 235 240

Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu  
 245 250 255  
 Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu  
 260 265  
 Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr  
 275 280 285  
 Leu Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser  
 290 295 300  
 Asn Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly  
 325 330 335  
 Val Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu  
 340 345  
 Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu  
 355 360 365  
 Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Phe Phe Leu  
 370 375 380  
 [0034] Glu Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln  
 385 390 395 400  
 Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser  
 405 410 415  
 Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys  
 420 425 430  
 Gln Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435 440  
 <210> 24  
 <211> 439  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 变体 HPPD  
 <400> 24  
 Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val  
 1 5 10 15  
 Thr Pro Glu His Ala Ala Arg Ser Phe Pro Arg Val Val Arg Val Asn  
 20 25 30  
 Pro Arg Ser Asp Arg Phe Pro Val Leu Ser Phe His His Val Glu Leu  
 35 40 45

Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ser Phe Ala Leu  
 50 55 60  
 Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser Thr Gly Asn Ser Ala  
 65 70 75 80  
 His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Leu Ala Phe Leu Phe Thr  
 85 90 95  
 Ala Pro Tyr Ala Pro Pro Pro Gln Glu Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala  
 100 105 110  
 Ser Ile Pro Ser Phe Ser Ala Asp Ala Ala Arg Thr Phe Ala Ala Ala  
 115 120 125  
 His Gly Leu Ala Val Arg Ser Val Gly Val Arg Val Ala Asp Ala Ala  
 130 135 140  
 Glu Ala Phe Arg Val Ser Val Ala Gly Gly Ala Arg Pro Ala Phe Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Asp Leu Gly His Gly Phe Gly Leu Ala Glu Val Glu Leu Tyr  
 165 170 175  
 Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Tyr Pro Asp Glu Thr Asp Leu  
 180 185 190  
 Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg Val Ser Ser Pro Gly Ala Val Asp  
 195 200 205  
 Tyr Gly Leu Thr Arg Phe Asp His Val Val Gly Asn Val Pro Glu Met  
 210 215 220  
 Ala Pro Val Ile Asp Tyr Met Lys Gly Phe Leu Gly Phe His Glu Phe  
 225 230 235 240  
 Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Thr Glu Ser Gly Leu Asn  
 245 250 255  
 Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Ala Val Leu Leu Pro Leu Asn  
 260 265 270  
 Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu  
 275 280 285  
 Glu Tyr His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Ile Ala Leu Ala Ser Asn  
 290 295 300  
 Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Ala Arg Thr Pro Met Gly  
 305 310 315 320  
 Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Gln Ala Lys Tyr Tyr Glu Gly Val  
 325 330 335

[0035]

Arg Arg Ile Ala Gly Asp Val Leu Ser Glu Glu Gln Ile Lys Glu Cys  
 340 345 350

Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu  
 355 360

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

Met Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Val Gly Gln Glu  
 385 390 395 400

Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu  
 405 410 415

Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Val Lys Gln  
 420 425 430

Ser Val Val Ala Gln Lys Ser  
 435

<210> 25  
 <211> 444  
 <212> PRT  
 <213> 玉米 (Zea mays)

<400> 25

[0036]

Met Gly Pro Thr Pro Thr Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Val Ala Ala  
 1 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Glu Gln Ala Ala Phe Arg Leu Val Gly His Arg Asn  
 20 25 30

Phe Val Arg Phe Asn Pro Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ala Phe  
 35 40 45

His His Val Glu Leu Trp Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg  
 50 55 60

Phe Ser Phe Gly Leu Gly Ala Pro Leu Ala Ala Arg Ser Asp Leu Ser  
 65 70 75 80

Thr Gly Asn Ser Ala His Ala Ser Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ser Leu  
 85 90 95

Ser Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ala His Gly Ala Asp Ala Ala Thr  
 100 105 110

Ala Ala Leu Pro Ser Phe Ser Ala Ala Ala Ala Arg Arg Phe Ala Ala  
 115 120 125

Asp His Gly Leu Ala Val Arg Ala Val Ala Leu Arg Val Ala Asp Ala  
 130 135 140

Glu Asp Ala Phe Arg Ala Ser Val Ala Ala Gly Ala Arg Pro Ala Phe  
 145 150 155 160  
 Gly Pro Val Asp Leu Gly Arg Gly Phe Arg Leu Ala Glu Val Glu Leu  
 165 170 175  
 Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr Pro Asp Gly Ala Ala  
 180 185 190  
 Gly Glu Pro Phe Leu Pro Gly Phe Glu Gly Val Ala Ser Pro Gly Ala  
 195 200 205  
 Ala Asp Tyr Gly Leu Ser Arg Phe Asp His Ile Val Gly Asn Val Pro  
 210 215 220  
 Glu Leu Ala Pro Ala Ala Ala Tyr Phe Ala Gly Phe Thr Gly Phe His  
 225 230 235 240  
 Glu Phe Ala Glu Phe Thr Thr Glu Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly  
 245 250 255  
 Leu Asn Ser Met Val Leu Ala Asn Asn Ser Glu Asn Val Leu Leu Pro  
 260 265 270  
 Leu Asn Glu Pro Val His Gly Thr Lys Arg Arg Ser Gln Ile Gln Thr  
 275 280 285  
 Phe Leu Asp His His Gly Gly Pro Gly Val Gln His Met Ala Leu Ala  
 290 295 300  
 Ser Asp Asp Val Leu Arg Thr Leu Arg Glu Met Gln Ala Arg Ser Ala  
 305 310 315 320  
 Met Gly Gly Phe Glu Phe Met Ala Pro Pro Thr Ser Asp Tyr Tyr Asp  
 325 330 335  
 Gly Val Arg Arg Arg Ala Gly Asp Val Leu Thr Glu Ala Gln Ile Lys  
 340 345 350  
 Glu Cys Gln Glu Leu Gly Val Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val  
 355 360 365  
 Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe  
 370 375 380  
 Leu Glu Ile Ile Gln Arg Ile Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Lys Gly  
 385 390 395 400  
 Gln Glu Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe  
 405 410 415  
 Ser Gln Leu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala  
 420 425 430

[0037]

Lys Gln Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Gly Ser  
 435 440

<210> 26  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> 拟南芥 (Arabidopsis thaliana)  
 <400> 26

Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp  
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe  
 20 25 30

Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His  
 35 40 45

His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe  
 50 55 60

Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr  
 65 70 75 80

Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg  
 85 90 95

[0038]

Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile  
 100 105 110

Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys  
 115 120 125

Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile  
 130 135 140

Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly  
 145 150 155 160

Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile  
 165 170 175

Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr  
 180 185 190

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

Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu  
 210 215 220

Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr  
 225 230 235 240

Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp  
245 250 255

Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser  
260 265 270

Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr  
275 280 285

Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala  
290 295 300

Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu  
305 310 315 320

Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro  
325 330 335

Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp  
340 345 350

Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu  
355 360 365

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

[0039]

Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly  
385 390 395 400

Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys  
405 410 415

Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu  
420 425 430

Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly  
435 440 445

<210> 27

<211> 434

<212> PRT

<213> 大麦 (Hordeum vulgare)

<400> 27

Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Ala Ala Ala Ala  
1 5 10 15

Val Thr Pro Glu His Ala Arg Pro His Arg Met Val Arg Phe Asn Pro  
20 25 30

Arg Ser Asp Arg Phe His Thr Leu Ser Phe His His Val Glu Phe Trp  
35 40 45

Cys Ala Asp Ala Ala Ser Ala Ala Gly Arg Phe Ala Phe Ala Leu Gly



	50				55					60						
	Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	His
	65					70					75					80
	Ala	Ser	Gln	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr	Ala
					85					90					95	
	Pro	Tyr	Ala	Asn	Gly	Cys	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Phe
				100					105					110		
	Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Asp	His	Gly	Ile	Ala	Val
			115					120					125			
	Arg	Ser	Val	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Glu	Ala	Phe	Arg	Ala
	130						135					140				
	Ser	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala	Pro	Val	Asp	Leu	Gly
	145					150					155					160
	Arg	Gly	Phe	Ala	Phe	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu
					165					170						175
	Arg	Phe	Val	Ser	His	Pro	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly
				180					185					190		
[0040]	Phe	Glu	Gly	Val	Thr	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg
			195					200					205			
	Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala
		210					215						220			
	Tyr	Ile	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Glu	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala
	225					230					235					240
	Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ala
					245					250					255	
	Asn	Asn	Ser	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Val	His	Gly
				260					265					270		
	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Phe	Leu	Glu	His	His	Gly	Gly
			275					280						285		
	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Thr
		290					295					300				
	Leu	Arg	Lys	Met	Arg	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Gly	Gly	Phe	Asp	Phe	Leu
	305					310					315					320
	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Val	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly
					325					330					335	
	Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Glu	Leu	Gly	Val

```

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

```

```

<210> 28
<211> 442
<212> PRT
<213> 野胡萝卜 (Daucus carota)
<400> 28

```

[0041]

```

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

```

Ala Pro Val Glu Leu Asp Asp Gln Ala Trp Leu Ala Glu Val Glu Leu  
165 170 175

Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Phe Val Ser Phe Gly Arg Glu Glu Gly  
180 185 190

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

Asp Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu Asp His Ala Val Gly Asn Val  
210 215 220

Thr Glu Leu Gly Pro Val Val Glu Tyr Ile Lys Gly Phe Thr Gly Phe  
225 230 235 240

His Glu Phe Ala Glu Phe Thr Ala Glu Asp Val Gly Thr Leu Glu Ser  
245 250 255

Gly Leu Asn Ser Val Val Leu Ala Asn Asn Glu Glu Met Val Leu Leu  
260 265 270

Pro Leu Asn Glu Pro Val Tyr Gly Thr Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln  
275 280 285

Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala Gly Val Gln His Leu Ala Leu  
290 295 300

[0042]

Val Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser  
305 310 315 320

Cys Leu Gly Gly Phe Glu Phe Met Pro Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr  
325 330 335

Lys Asn Leu Lys Asn Arg Val Gly Asp Val Leu Ser Asp Glu Gln Ile  
340 345 350

Lys Glu Cys Glu Asp Leu Gly Ile Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly  
355 360 365

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

Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly Cys Met Leu Lys Asp Asp Ala  
385 390 395 400

Gly Gln Met Tyr Gln Lys Gly Gly Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn  
405 410 415

Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu  
420 425 430

Ala Lys Gln Ile Thr Gly Ser Ala Ala Ala  
435 440

<210> 29  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> 阿维链霉菌 (Streptomyces avermitilis)  
 <400> 29  
 Met Thr Gln Thr Thr His His Thr Pro Asp Thr Ala Arg Gln Ala Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Phe Pro Val Lys Gly Met Asp Ala Val Val Phe Ala Val Gly Asn  
 20 25 30  
 Ala Lys Gln Ala Ala His Tyr Ser Thr Ala Phe Gly Met Gln Leu Val  
 35 40 45  
 Ala Tyr Ser Gly Pro Glu Asn Gly Ser Arg Glu Thr Ala Ser Tyr Val  
 50 55 60  
 Leu Thr Asn Gly Ser Ala Arg Phe Val Leu Thr Ser Val Ile Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Ala Thr Pro Trp Gly His Phe Leu Ala Asp His Val Ala Glu His Gly  
 85 90 95  
 Asp Gly Val Val Asp Leu Ala Ile Glu Val Pro Asp Ala Arg Ala Ala  
 100 105 110  
 [0043]  
 His Ala Tyr Ala Ile Glu His Gly Ala Arg Ser Val Ala Glu Pro Tyr  
 115 120 125  
 Glu Leu Lys Asp Glu His Gly Thr Val Val Leu Ala Ala Ile Ala Thr  
 130 135 140  
 Tyr Gly Lys Thr Arg His Thr Leu Val Asp Arg Thr Gly Tyr Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Pro Tyr Leu Pro Gly Tyr Val Ala Ala Ala Pro Ile Val Glu Pro Pro  
 165 170 175  
 Ala His Arg Thr Phe Gln Ala Ile Asp His Cys Val Gly Asn Val Glu  
 180 185 190  
 Leu Gly Arg Met Asn Glu Trp Val Gly Phe Tyr Asn Lys Val Met Gly  
 195 200 205  
 Phe Thr Asn Met Lys Glu Phe Val Gly Asp Asp Ile Ala Thr Glu Tyr  
 210 215 220  
 Ser Ala Leu Met Ser Lys Val Val Ala Asp Gly Thr Leu Lys Val Lys  
 225 230 235 240  
 Phe Pro Ile Asn Glu Pro Ala Leu Ala Lys Lys Lys Ser Gln Ile Asp  
 245 250 255

Glu Tyr Leu Glu Phe Tyr Gly Gly Ala Gly Val Gln His Ile Ala Leu  
 260 265 270  
 Asn Thr Gly Asp Ile Val Glu Thr Val Arg Thr Met Arg Ala Ala Gly  
 275 280 285  
 Val Gln Phe Leu Asp Thr Pro Asp Ser Tyr Tyr Asp Thr Leu Gly Glu  
 290 295 300  
 Trp Val Gly Asp Thr Arg Val Pro Val Asp Thr Leu Arg Glu Leu Lys  
 305 310 315  
 Ile Leu Ala Asp Arg Asp Glu Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Ile Phe Thr  
 325 330 335  
 Lys Pro Val Gln Asp Arg Pro Thr Val Phe Phe Glu Ile Ile Glu Arg  
 340 345 350  
 His Gly Ser Met Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu  
 355 360 365  
 Ala Ile Glu Arg Glu Gln Glu Lys Arg Gly Asn Leu  
 370 375 380

[0044]

<210> 30  
 <211> 419  
 <212> PRT  
 <213> 禾生球腔菌 (*Mycosphaerella graminicola*)  
 <400> 30  
 Met Ala Pro Gly Ala Leu Leu Val Thr Ser Gln Asn Gly Arg Thr Ser  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Tyr Asp Ser Asp Gly Tyr Val Pro Ala Pro Ala Ala Leu Val  
 20 25 30  
 Val Gly Gly Glu Val Asn Tyr Arg Gly Tyr His His Ala Glu Trp Trp  
 35 40 45  
 Val Gly Asn Ala Lys Gln Val Ala Gln Phe Tyr Ile Thr Arg Met Gly  
 50 55 60  
 Phe Glu Pro Val Ala His Lys Gly Leu Glu Thr Gly Ser Arg Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Ala Ser His Val Val Gln Asn Asn Gly Val Arg Phe Val Phe Thr Ser  
 85 90 95  
 Pro Val Arg Ser Ser Ala Arg Gln Thr Leu Lys Ala Ala Pro Leu Ala  
 100 105 110  
 Asp Gln Ala Arg Leu Asp Glu Met Tyr Asp His Leu Asp Lys His Gly  
 115 120 125

Asp Gly Val Lys Asp Val Ala Phe Glu Val Asp Asp Val Leu Ala Val  
 130 135 140  
 Tyr Glu Asn Ala Val Ala Asn Gly Ala Glu Ser Val Ser Ser Pro His  
 145 150 155 160  
 Thr Asp Ser Cys Asp Glu Gly Asp Val Ile Ser Ala Ala Ile Lys Thr  
 165 170 175  
 Tyr Gly Asp Thr Thr His Thr Phe Ile Gln Arg Thr Thr Tyr Thr Gly  
 180 185 190  
 Pro Phe Leu Pro Gly Tyr Arg Ser Cys Thr Thr Val Asp Ser Ala Asn  
 195 200 205  
 Lys Phe Leu Pro Pro Val Asn Leu Glu Ala Ile Asp His Cys Val Gly  
 210 215 220  
 Asn Gln Asp Trp Asp Glu Met Ser Asp Ala Cys Asp Phe Tyr Glu Arg  
 225 230 235 240  
 Cys Leu Gly Phe His Arg Phe Trp Ser Val Asp Asp Lys Asp Ile Cys  
 245 250 255  
 Thr Glu Phe Ser Ala Leu Lys Ser Ile Val Met Ser Ser Pro Asn Gln  
 260 265 270  
 Val Val Lys Met Pro Ile Asn Glu Pro Ala His Gly Lys Lys Lys Ser  
 275 280 285  
 Gln Ile Glu Glu Tyr Val Asp Phe Tyr Asn Gly Pro Gly Val Gln His  
 290 295 300  
 Ile Ala Leu Arg Thr Pro Asn Ile Ile Glu Ala Val Ser Asn Leu Arg  
 305 310 315 320  
 Ser Arg Gly Val Glu Phe Ile Ser Val Pro Asp Thr Tyr Tyr Glu Asn  
 325 330 335  
 Met Arg Leu Arg Leu Lys Ala Ala Gly Met Lys Leu Glu Glu Ser Phe  
 340 345 350  
 Asp Ile Ile Gln Lys Leu Asn Ile Leu Ile Asp Phe Asp Glu Gly Gly  
 355 360 365  
 Tyr Leu Leu Gln Leu Phe Thr Lys Pro Leu Met Asp Arg Pro Thr Val  
 370 375 380  
 Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Asn Asn Phe Asp Gly Phe Gly Ala Gly  
 385 390 395 400  
 Asn Phe Lys Ser Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Asp Leu Arg  
 405 410 415

[0045]

Gly Asn Leu

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 399

&lt;212&gt; PRT

<213> 粗球孢子菌 (*Coccicoides immitis*)

&lt;400&gt; 31

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

[0046]

Lys Glu Ile His Ala His Leu Glu Arg His Gly Asp Gly Val Lys Asp  
100 105 110Val Ala Phe Glu Val Asp Cys Val Glu Ser Val Phe Ser Ala Ala Val  
115 120 125Arg Asn Gly Ala Glu Val Val Ser Asp Val Arg Thr Val Glu Asp Glu  
130 135 140Asp Gly Gln Ile Lys Met Ala Thr Ile Arg Thr Tyr Gly Glu Thr Thr  
145 150 155 160His Thr Leu Ile Glu Arg Ser Gly Tyr Arg Gly Gly Phe Met Pro Gly  
165 170 175Tyr Arg Met Glu Ser Asn Ala Asp Ala Thr Ser Lys Phe Leu Pro Lys  
180 185 190Val Val Leu Glu Arg Ile Asp His Cys Val Gly Asn Gln Asp Trp Asp  
195 200 205Glu Met Glu Arg Val Cys Asp Tyr Tyr Glu Lys Ile Leu Gly Phe His  
210 215 220Arg Phe Trp Ser Val Asp Asp Lys Asp Ile Cys Thr Glu Phe Ser Ala  
225 230 235 240

Leu Lys Ser Ile Val Met Ala Ser Pro Asn Asp Ile Val Lys Met Pro

	245	250	255
Ile Asn Glu	Pro Ala Lys Gly Lys	Lys Gln Ser Gln	Ile Glu Glu Tyr
	260	265	270
Val Asp Phe Tyr Asn Gly Ala Gly Val Gln His Ile Ala Leu Arg Thr			
	275	280	285
Asn Asn Ile Ile Asp Ala Ile Thr Asn Leu Lys Ala Arg Gly Thr Glu			
	290	295	300
Phe Ile Lys Val Pro Glu Thr Tyr Tyr Glu Asp Met Lys Ile Arg Leu			
	305	310	315
Lys Arg Gln Gly Leu Val Leu Asp Glu Asp Phe Glu Thr Leu Lys Ser			
	325	330	335
Leu Asp Ile Leu Ile Asp Phe Asp Glu Asn Gly Tyr Leu Leu Gln Leu			
	340	345	350
Phe Thr Lys His Leu Met Asp Arg Pro Thr Val Phe Ile Glu Ile Ile			
	355	360	365
Gln Arg Asn Asn Phe Ser Gly Phe Gly Ala Gly Asn Phe Arg Ala Leu			
	370	375	380
[0047] Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Leu Arg Gly Thr Leu Ile			
	385	390	395
<210> 32			
<211> 350			
<212> PRT			
<213> 聚球藻亚科某些种 (Synechococcoideae spp.)			
<400> 32			
Met Asn Pro Ser Ile Arg Ile Val Gln Gly Ile His His Leu His Phe			
1	5	10	15
Tyr Leu Trp Asp Leu Pro Arg Trp Arg Glu His Phe Cys Arg Val Trp			
	20	25	30
Gly Phe Arg Val Ala Ser Asp Ala Gly Asn Thr Leu Glu Leu Glu Gln			
	35	40	45
Gly Ser Leu Arg Leu Arg Leu Ser Gln Pro Ala Arg Ala Gly Asp Glu			
	50	55	60
Val Asp Arg His Leu Gln Arg His Gly Pro Gly Val Val Asp Val Ala			
	65	70	75
Leu Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Pro Ala Leu Ala Glu Leu Leu Arg			
	85	90	95
Gly Arg Gly Ala Gln Leu Ala Trp Ile Pro Ala Ala Ala Ala Leu Cys			
	100	105	110



Leu His Thr Pro Tyr Gly Ile Arg His Ser Leu Ile Pro Gly Pro Leu  
 115 120 125

Asp Ala Ala Pro Ala Glu Ala Gly Leu Phe Ser His Trp Asp His Val  
 130 135 140

Val Leu Asn Val Glu Gln Gly Ser Leu Gln Ala Ala Ala Asp Trp Tyr  
 145 150 155 160

Gly Arg Val Leu Gly Trp Arg Arg Leu Tyr Arg Tyr Ser Ile Gly Thr  
 165 170 175

Ala Thr Ser Gly Leu Glu Ser Val Val Val Gly Asp Pro Glu Ala Gly  
 180 185 190

Ile Gln Trp Ala Ile Asn Glu Pro Thr Cys Ala Ala Ser Gln Ile Gln  
 195 200 205

Glu Phe Leu His Ala His Gly Gly Pro Gly Ile Gln His Ala Ala Leu  
 210 215 220

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

Val Asp Phe Leu Gln Val Ala Pro Gln Tyr Tyr Thr Ser Leu Glu Arg  
 245 250 255

Glu Leu Gly Leu Ala Leu Arg Ser Ala Leu Gly Gln Ala Ile Ser Trp  
 260 265 270

Gln Asp Leu Val Glu Gln Gln Ile Leu Leu Asp Ala Thr Leu Pro Ala  
 275 280 285

Ser Asp Gly Gln Asp Arg Pro Leu Leu Leu Gln Thr Phe Thr Gln Pro  
 290 295 300

Leu Phe Gly Arg Pro Thr Phe Phe Phe Glu Val Ile Gln Arg Leu Gly  
 305 310 315 320

Gly Ala Thr Gly Phe Gly Glu Ala Asn Phe Gln Ala Leu Phe Glu Ala  
 325 330 335

Leu Glu Arg Gln Gln Arg Gln Arg His Gln Ala Leu Thr Pro  
 340 345 350

<210> 33  
 <211> 368  
 <212> PRT  
 <213> 嗜热嗜酸菌 (Microphilus torridus)

<400> 33

Met Tyr Gly Lys Asn Leu Ile Ser Glu Leu Arg Glu Lys Glu Ile Phe  
 1 5 10 15

[0048]

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

[0049]

Glu Lys His Asn Ile Leu Val Asp Arg Asp Glu Asn Gly Tyr Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Gln Ile Phe Thr Lys Pro Val Thr Asp Arg Pro Thr Phe Phe Phe Glu  
 325 330 335  
 Val Ile Gln Arg Lys Gly Ala Arg Ser Phe Gly Asn Gly Asn Phe Lys  
 340 345 350  
 Ala Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Lys Arg Gly Asn Leu  
 355 360 365  
 <210> 34  
 <211> 387  
 <212> PRT  
 <213> 克鲁蒂亚 阿尔兹西达菌 (*Kordia algicida*)  
 <400> 34  
 Met Ala Ala Glu Ile Lys Asn Leu Lys Asp Leu Gln Asn Thr Glu Tyr  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Lys Lys Leu Phe Asp Glu Ala Glu Asp Phe Leu Pro Leu Leu  
 20 25 30  
 Gly Thr Asp Tyr Val Glu Leu Tyr Val Gly Asn Ala Lys Gln Ser Ala  
 35 40 45  
 [0050]  
 His Phe Tyr Lys Thr Ala Phe Gly Phe Gln Ser Glu Ala Tyr Ala Gly  
 50 55 60  
 Leu Glu Thr Gly Leu Thr Asp Arg Val Ser Tyr Val Leu Lys Gln Asp  
 65 70 75 80  
 Lys Ile Arg Leu Val Leu Thr Thr Pro Leu Gly Lys Gly Gly Glu Ile  
 85 90 95  
 Asn Glu His Ile Asp Leu His Gly Asp Gly Val Lys Val Val Ala Leu  
 100 105 110  
 Trp Val Glu Asp Ala Thr Lys Ala Phe Glu Glu Thr Thr Lys Arg Gly  
 115 120 125  
 Ala Lys Pro Tyr Met Glu Pro Thr Lys Glu Glu Asp Glu Asn Gly Tyr  
 130 135 140  
 Val Ile Arg Ser Gly Ile Tyr Thr Tyr Gly Glu Thr Val His Val Phe  
 145 150 155 160  
 Val Glu Arg Lys Asn Tyr Asn Gly Val Phe Leu Pro Gly Tyr Gln Arg  
 165 170 175  
 Trp Glu Ser His Tyr Asn Pro Glu Pro Val Gly Leu Lys Phe Ile Asp  
 180 185 190

His Met Val Gly Asn Val Gly Trp Gly Glu Met Lys Glu Trp Cys Glu  
 195 200 205  
 Phe Tyr Ala Lys Val Met Gly Phe Ala Gln Ile Ile Ser Phe Thr Asp  
 210 215 220  
 Asp Asp Ile Ser Thr Asp Phe Thr Ala Leu Met Ser Lys Val Met Ser  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Asn Gly Arg Ile Lys Phe Pro Ile Asn Glu Pro Ala Glu Gly  
 245 250 255  
 Lys Lys Lys Ser Gln Ile Glu Glu Tyr Leu Asp Phe Tyr Asn Gly Ser  
 260 265 270  
 Gly Val Gln His Ile Ala Val Ala Thr Asp Asn Ile Ile Asp Thr Val  
 275 280 285  
 Ser Gln Met Arg Glu Arg Gly Val Glu Phe Leu Tyr Val Pro Asp Thr  
 290 295 300  
 Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Glu Arg Val Gly Asp Ile Asp Glu Asp Val  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Leu Lys Lys His Gly Ile Leu Ile Asp Arg Asp Glu Glu Gly  
 325 330 335  
 [0051] Tyr Leu Leu Gln Leu Phe Thr Lys Thr Ile Val Asp Arg Pro Thr Met  
 340 345 350  
 Phe Phe Glu Val Ile Gln Arg Lys Gly Ala Gln Ser Phe Gly Val Gly  
 355 360 365  
 Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ala Ile Glu Arg Glu Gln Ala Ala Arg  
 370 375 380  
 Gly Thr Leu  
 385  
 <210> 35  
 <211> 382  
 <212> PRT  
 <213> 日本赭纤虫 (Blepharisma japonicum)  
 <400> 35  
 Met Thr Tyr Tyr Asp Lys Gln Glu Thr Arg Pro Asp Leu Gly Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Tyr Gly Phe His His Val Arg Phe Tyr Val Ser Asn Ser Glu Gln Ala  
 20 25 30  
 Ala Ser Phe Tyr Thr Ser Arg Phe Gly Phe Ser Pro Val Ala Tyr Glu  
 35 40 45  
 Gly Leu Glu Thr Gly Asn Gln Lys Phe Cys Thr Asn Val Val Arg Ser

50	55	60																		
Asn 65	His	Val	Val	Ile	Ala 70	Phe	Thr	Ser	Ala	Leu 75	Thr	Pro	Glu	Asp	Asn 80					
Glu	Val	Asn	Arg	His 85	Val	Gly	Lys	His	Ser 90	Asp	Gly	Val	Gln	Asp 95	Ile					
Ala	Phe	Ser	Val 100	Ser	Asp	Ala	Arg	Gly 105	Met	Tyr	Glu	Lys	Ala 110	Ile	Ala					
Lys	Gly	Cys 115	Lys	Ser	Phe	Arg	Glu 120	Pro	Gln	Val	Leu	Gln 125	Asp	Gln	Phe					
Gly 130	Ser	Val	Ile	Ile	Ala	Ser 135	Leu	Gln	Thr	Tyr	Gly 140	Asp	Thr	Val	His					
Thr 145	Leu	Val	Gln	Asn 150	Val	Asp	Tyr	Thr	Gly	Pro 155	Phe	Leu	Pro	Gly	Phe 160					
Arg	Ala	Ile	Thr	Lys 165	Asp	Asp	Pro	Leu	Asn 170	Ser	Ala	Phe	Pro	Gln 175	Val					
Asn	Tyr	Asp	Ile 180	Ile	Asp	His	Val 185	Val	Gly	Asn	Gln	Pro	Gly 190	Gly	Asp					
[0052]	Met	Thr	Pro 195	Thr	Val	Glu	Trp 200	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Leu	Glu 205	Phe	His	Arg				
Tyr	Trp 210	Ser	Ala	Asp	Glu	Ser 215	Val	Ile	His	Thr	Asp 220	Tyr	Ser	Ala	Leu					
Arg 225	Ser	Val	Val	Val	Ala 230	Asp	Trp	Asp	Glu	Val 235	Ile	Lys	Met	Pro	Ile 240					
Asn	Glu	Pro	Ala	Asp 245	Gly	Leu	Arg	Lys	Ser 250	Gln	Ile	Gln	Glu	Tyr 255	Val					
Glu	Tyr	Tyr	Gly 260	Gly	Ala	Gly	Val	Gln	His 265	Ile	Ala	Leu	Lys	Val 270	Asn					
Asp	Ile	Ile	Ser 275	Val	Ile	Ser	Thr 280	Leu	Arg	Ala	Arg	Gly 285	Val	Glu	Phe					
Leu	Glu 290	Val	Pro	Pro	Lys	Tyr 295	Tyr	Asp	Ser	Leu	Arg 300	Lys	Arg	Leu	Ala					
His 305	Ser	Ala	Val	Gln 310	Ile	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys 315	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu 320					
His	Ile	Leu	Val 325	Asp	Phe	Asp	Asp	Arg	Gly 330	Tyr	Leu	Leu	Gln	Ile 335	Phe					
Thr	Lys	Pro	Val	Glu	Asp	Arg	Pro	Thr	Leu	Phe	Tyr	Glu	Ile	Ile	Gln					

340 345 350  
 Arg His Asn Asn Asn Gly Phe Gly Ile Gly Asn Phe Lys Ala Leu Phe  
 355 360 365  
 Glu Ser Leu Glu Gln Glu Gln Glu Arg Arg Gly Asn Leu Ile  
 370 375 380  
 <210> 36  
 <211> 401  
 <212> PRT  
 <213> 红球菌属某种 (Rhodococcus sp.)  
 <400> 36  
 Met Thr Ile Glu Gln Thr Leu Thr Asp Lys Glu Arg Leu Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Asp Leu Gly Gln Leu Glu Gln Leu Val Gly Leu Val Glu Tyr Asp Gly  
 20 25 30  
 Thr Arg Asp Pro Phe Pro Val Ser Gly Trp Asp Ala Val Val Trp Val  
 35 40 45  
 Val Gly Asn Ala Thr Gln Thr Ala His Tyr Phe Gln Ser Ala Phe Gly  
 50 55 60  
 Met Thr Leu Val Ala Tyr Ser Gly Pro Thr Thr Gly Asn Arg Asp His  
 65 70 75 80  
 His Ser Phe Val Leu Glu Ser Gly Ala Val Arg Phe Val Ile Lys Gly  
 85 90 95  
 Ala Val Asn Pro Asp Ser Pro Leu Ile Asp His His Arg Thr His Gly  
 100 105 110  
 Asp Gly Val Val Asp Ile Ala Leu Ala Val Pro Asp Val Asp Lys Cys  
 115 120 125  
 Ile Ala His Ala Arg Ala Gln Gly Ala Thr Val Leu Asp Glu Pro His  
 130 135 140  
 Asp Val Thr Asp Asp His Gly Thr Val Arg Leu Ala Ala Ile Ala Thr  
 145 150 155 160  
 Tyr Gly Asp Thr Arg His Thr Leu Val Asp Arg Ser His Tyr Thr Gly  
 165 170 175  
 Pro Tyr Leu Pro Gly Tyr Thr Ala Arg Thr Ser Gly His Thr Lys Arg  
 180 185 190  
 Asp Gly Ala Pro Lys Arg Leu Phe Gln Ala Leu Asp His Val Val Gly  
 195 200 205  
 Asn Val Glu Leu Gly Lys Met Asp His Trp Val Asp Phe Tyr Asn Arg  
 210 215 220

[0053]

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

Phe

<210> 37  
 <211> 358  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 变体 HPPD

<400> 37

Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe  
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu  
20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His  
35 40 45

[0054]

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn  
 50 55 60  
 Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly  
 65 70 75 80  
 Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu  
 85 90 95  
 Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu  
 100 105 110  
 Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile  
 115 120 125  
 Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr  
 130 135 140  
 Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile  
 145 150 155 160  
 Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala  
 165 170 175  
 Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Ala Arg Tyr Phe Asp  
 180 185 190  
 [0055]  
 Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro  
 195 200 205  
 Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala  
 210 215 220  
 Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln  
 225 230 235 240  
 His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu  
 245 250 255  
 Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr  
 260 265 270  
 Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln  
 275 280 285  
 Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp  
 290 295 300  
 Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val  
 305 310 315 320  
 Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Ser Ser  
 325 330 335



Asn Phe Thr Gln Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg  
340 345 350

Gly Val Leu Thr Ala Asp  
355

<210> 38  
<211> 358  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 变体 HPPD

<400> 38

Met Ala Asp Leu Tyr Glu Asn Pro Met Gly Leu Met Gly Phe Glu Phe  
1 5 10 15

Ile Glu Phe Ala Ser Pro Thr Pro Gly Thr Leu Glu Pro Ile Phe Glu  
20 25 30

Ile Met Gly Phe Thr Lys Val Ala Thr His Arg Ser Lys Asn Val His  
35 40 45

Leu Tyr Arg Gln Gly Glu Ile Asn Leu Ile Leu Asn Asn Glu Pro Asn  
50 55 60

[0056]

Ser Ile Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Glu His Gly Pro Ser Val Cys Gly  
65 70 75 80

Met Ala Phe Arg Val Lys Asp Ser Gln Lys Ala Tyr Asn Arg Ala Leu  
85 90 95

Glu Leu Gly Ala Gln Pro Ile His Ile Asp Thr Gly Pro Met Glu Leu  
100 105 110

Asn Leu Pro Ala Ile Lys Gly Ile Gly Gly Ala Pro Leu Tyr Leu Ile  
115 120 125

Asp Arg Phe Gly Glu Gly Ser Ser Ile Tyr Asp Ile Asp Phe Val Tyr  
130 135 140

Leu Glu Gly Val Glu Arg Asn Pro Val Gly Ala Gly Leu Lys Val Ile  
145 150 155 160

Asp His Leu Thr His Asn Val Tyr Arg Gly Arg Met Val Tyr Trp Ala  
165 170 175

Asn Phe Tyr Glu Lys Leu Phe Asn Phe Arg Glu Trp Arg Tyr Phe Asp  
180 185 190

Ile Lys Gly Glu Tyr Thr Gly Leu Thr Ser Lys Ala Met Ser Ala Pro  
195 200 205

Asp Gly Met Ile Arg Ile Pro Leu Asn Glu Glu Ser Ser Lys Gly Ala  
210 215 220

Gly Gln Ile Glu Glu Phe Leu Met Gln Phe Asn Gly Glu Gly Ile Gln  
 225 230 235 240

His Val Ala Phe Leu Thr Asp Asp Leu Val Lys Thr Trp Asp Ala Leu  
 245 250 255

Lys Lys Ile Gly Met Arg Phe Met Thr Ala Pro Pro Asp Thr Tyr Tyr  
 260 265 270

Glu Met Leu Glu Gly Arg Leu Pro Asp His Gly Glu Pro Val Asp Gln  
 275 280 285

Leu Gln Ala Arg Gly Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ser Val Glu Gly Asp  
 290 295 300

Lys Arg Leu Leu Leu Gln Ile Phe Ser Glu Thr Leu Met Gly Pro Val  
 305 310 315 320

Phe Phe Glu Phe Ile Gln Arg Lys Gly Asp Asp Gly Phe Gly Glu Trp  
 325 330 335

Asn Phe Lys Ala Leu Phe Glu Ser Ile Glu Arg Asp Gln Val Arg Arg  
 340 345 350

Gly Val Leu Thr Ala Asp  
 355

[0057]

<210> 39  
 <211> 1141  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 变体 HPPD

<400> 39  
 gtttaaacat gaatgctect ctcacccaaa gcaatgcttc tcagttccaa acttgggaca 60  
 acccaatggg aacigatggc tttagatttg tggaatatgc tgctccagat ccagtggcaa 120  
 tggggcagct tttgagagg atgggettcc aagccattgc caagcacaga aggaagaatg 180  
 tgacattata caggcaagga gagatcaact tcateatcaa tgctgagcca gattcctttg 240  
 ctcaaaggit tgcaaggctt caiggeccct ctgittgtgc cattgccatc agggtgaatg 300  
 atgccaaata tgcttatgag agagcaacaa gccctggagc ttggggatat gctcagcaag 360  
 ctgctcctgg agagctttca attcctgcca tcaagggatc tggagacagc tigtatctact 420  
 tcattgacaa gttgagaggg aagaatggag caaaggatgg agatttggga aacatcagct 480  
 tctttgatgt ggattttgag cctcttctctg gtgctgatct tcatccagaa ggcttggggg 540  
 tgacatacat tgaicactc accaacaatg ttacagagg aaggatggca gaactagcag 600  
 agttttatga gaggatcttc aacttcagag agatcagata ttttgacatt gaaggccaag 660  
 caactggagt gaagagcaag gcaatgactt ctccttgtgg gaagatcagg attccaatca 720  
 atgaagaagg aaagacaag gctggccaga tccaagaata tttggacatg tacagaggag 780

aaggaatcca acacattgct ctggcctcaa caaacctcta tgacaetgtg gatggcttgc	840
aatgaatgg caicaagctg ctgaacactt cagaaacata itaigagctg ctgccaaaga	900
ggattccaga tetccaagag ccaattccag agcttetage aaggaacatc ctgggtgatg	960
gccaacctgg agagctgtct ctgcaaactt tctcagagaa ccagcttggg ccaatcttct	1020
ttgattcat ccaaaggaaa gaaaacagtg gctttgggcc ttggaacttt gctcagctgt	1080
ttgaaacaat ggagtggat cagatgagaa gaggagtgct gaagacatga taaggcgcgc	1140
c	1141
<210> 40	
<211> 1485	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 变体 HPPD	
<400> 40	
cacgtgttaa ttaaaaaaaaa aatggcttcg atctccctct cagttagcgc egttagccgg	60
accgccccctg ctccaggcca catggiggct ccgttcaccg gccittaagtc caacgcgcgc	120
ttccccacca ccaagaaggc taacgacttc tccacccttc ccagcaacgg tggaaagatt	180
caatataatgc aggtgtggcc ggcttacggc aacaagaagt tccagacgct gtcgtacctg	240
ccgcgcctgt ctatggcgcc caccgtgatg atggccctct cggccaccgc cgtcgcctccg	300
ttccaggggc tcaagtccac cgcacgctc ccgctcgccc gccgctcctc cagaagcctc	360
ggcaacgtca gcaacggcgg aaggatccgg tcatggctg atttataatga aaatccaatg	420
ggattgatgg gatttgaatt tatigaattt gcttctcaa ctcttgaac ttggaacca	480
atitttgaat tcaatggatt cacaaaagt gcaactcaca gaagcaaaaa igttcatctt	540
tacagacaag gagcaatcaa ttgatattg aacaatgaac ctcatctgt igcttcatat	600
tttctctctg aacatggacc ttctgtttgt ggaatggctt tcagagtga agattctcaa	660
aaagcataca acagagcttt ggaacttggc gctcaaccaa ttcacatga aactggacca	720
atggaattga atcttctctg aatcaaagga atgggtgtg ctctctctta ttgatggac	780
agatttggag aaggaagttc aatttatgat attgattttg tttcttggg aggagttgac	840
agaaaacctg ttggagctgg attgaagatc atgaicatt tgacacacaa tglttacaga	900
ggaagaatgg catattgggc aaatttttat gaaaaattat tcaatttcag agaaatcaga	960
tatttigata tcaaaggaga atacacitga ttgacaagca aagcaatgac tgcctctgat	1020
ggaatgatca ggattccttt gaatgaagaa agttcaaaag gagctggaca aattgaagaa	1080
ttttgatgc aattcaatgg agaagggatt caacatgttg ctctcttgac agatgatttg	1140
gtgaaaactt gggatcaatt gaagaagatt ggaatgagat tcatgactgc tctccagat	1200
acatattaig aaatgttga aggaagattg ccaaatcatg gagaacctgt tgateaactt	1260
caatcaagag gaattttgtt ggatggagct tcagacaaag aagacaaaag attgcttctt	1320
caaatttttt cagaaacatt gatgggacca gtttctttg aatttatca aagaaaagga	1380
gatgatggat ttggaccatg gaatttcaa ggattgtttg aaagcatga aagatcaaa	1440

[0058]

	gtgagaagag gagttcttgc aacagaaiga taagttaacg acgic	1485
	<210> 41	
	<211> 1530	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 变体 HPPD	
	<400> 41	
	cacgtgttaa ttaaaaaaaaaaatggtctcg atctccfct cagttgagac cgttagccgg	60
	accgccccctg cfcaggccaa catggtggct ccgttcaccg gccttaagtc caacgcgcc	120
	ttccccacca ccaagaaggc taacgacttc tccaccctc ccagcaacgg tggaagagtt	180
	caatataatgc aggtgtggcc ggcttacggc aacaagaagt tcgagacgt gtcgtacctg	240
	ccgcgcctgt ctatggccc caecgtgat atggcctctg cggccaccgc cgtcgcctcg	300
	ttccaggggc tcaagtcac cgcagcctc ccgctgccc gcgctctc cagaagcctc	360
	ggcaacgtca gcaacggcgg aaggatccg tcatgaacg cccacttac tcaatctaac	420
	gcactcagc tcaaaacat ggataacca atgggtaccg acggtttga gttigttag	480
	taccccgcac ctgacctgt tcaatgggt caactatcg agaggaagg atticaagcc	540
	atcgtataac ataggagaaa gaatgtgact ctatataggc aaggagagat aaacttcac	600
	atcaacgcc aacctgattc ttigtcccag agattcgcca ggttgcaagg tcttctgtg	660
[0059]	tgigtatfg ccattagagi gaacgatcc aagtatcat atgagagagc lacttcttg	720
	ggagcatggg gttacgcaca acaggcagca cctggagaat tgtaatacc tgctatcaag	780
	ggtatcggag attcattgat ttatittatc gacaagtga gaggaaagaa cggtgccaag	840
	gatggtgacc ttgtaacat ttattcttc gatgtagatt tcgagccatt gccaggagca	900
	gatcttcac ctgaaggact tggacttacc tataatgacc atcttcaaaa caacgtglac	960
	agaggaagga tgcttgatt ggctgaattc tatgagagga tcttaattt cagagaagcc	1020
	agatatttcg acattgaagg acaggccacc ggggtgaagt caaaggctat gacatctca	1080
	tgcgtaaga tcagaattcc tataaatgag gaaggtaacg ataaggcagg acacatccag	1140
	gagtatcttg atatgtatag gggtaggggt atacaacata ttgccttggg atctactaac	1200
	cttatgaca cagtggatgg acttcagatg aacggtatca agcttcttaa cacatcagag	1260
	acctattacg aatgcttcc aaagagaatt ccagatctc aggaacctat acctgattg	1320
	ttggcaagga atatacttgt ggaatggacag cctggagaat tgttgettca aatatttca	1380
	gaaaaccagt tgggaccaat ctttttcgaa ttcacccaaa gaaaggglaa ccttggttt	1440
	ggtccataca atttcaaagg atgtttgag acctatggaac ttgatcaaat gagaagggt	1500
	gtgttgaaga ccaataggi taacgactc	1530
	<210> 42	
	<211> 1530	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 变体 HPPD	
	<400> 42	
	cacgtgttaa ttaaaaaaaaa aalggcttcg atctctctct cagttggac cgttagccgg	60
	accgccccctg ctcaggccaa catgggtgct ccgttcaccg gccttaagtc caacgccgcc	120
	ttccccacca ccaagaagge taacgacttc tccacccttc ccagcaacgg tggaagagtt	180
	caataatagc aggtgtggcc ggcctacggc aacaagaagt tcgagacgt gtcgtaccig	240
	ccgccgcigt ctalgggcc caccgigaig aiggccctgt cggccaccgc cgtcgtccg	300
	ttccaggggc tcaagtccac cggcaccctc cccgtcggcc gccctctctc cagaagcctc	360
	ggcaacgtca gcaacggcgg aaggatccgg tgcattgaac ctccacttac tcaatetaac	420
	gcattctcagt tccaacaatg ggataacca atgggtaccg accgttttga gtttgttag	480
	tacgccgcac ctgacctgtg tgcaatgggt caactatctg agaggatggg attcaagcc	540
	atcgtctaac ataggagaaa gaatgtgact ctatataggc aaggagagat aaacttcate	600
	ataacgcccg aacctgattc ttttggccag agattcgeca ggttgcacgg tctttctgtg	660
	tgigtatttg ccafttaggt gaacgatcc aagtatgcat atgagagac tactttttg	720
	ggagcatggg gtlaccgaca acaggcagca ccgggagaat tgtcaatacc tgcatacaag	780
	ggatcggag attcattgat ttattttatc gacaagtgga gaggaaagaa cggtgccaag	840
	gatggtagcc ttggtaacat ttcatcttc gatgtagatt tcgagccatt gccaggagca	900
	gattcttate ctgaaggact tggacttacc tatattgacc atcttataaa caacggttac	960
[0060]	agaggaagga tggctgagtt ggctgaattc tatgagagga tctttaattt cagagaaatc	1020
	agatatttcg acattgaagg acaggccacc gggaicaagt caaaggctat gacatctcca	1080
	tgcggtaaga tcgaattcc tataaatgag gaaggtaacg ataaggcagg acacatccag	1140
	gagtatcttg atatgtatag gggtaggggt atacaacata ttgcccttggg atctactaac	1200
	cttlatgaca cagtggtatg acttcagatg aacggtatca agcttcttaa cacatcagag	1260
	acctattacg aattgcttcc aaagagaatt ccagatcttc aggaacctat acctgagttg	1320
	ttggcaagga atatactgtg ggatggacag cctggagaat tgttgcctca aatatttca	1380
	gaaaaccagt tggaccaat ctttttcgaa tcatccaaa gaaagggtaa ctctggtttt	1440
	ggiccataca atttcaaagg attgtttgag accatggaac ttgatcaaat gagaaggggt	1500
	gtgttgaaga cctaataagt taacgacgtc	1530
	<210> 43	
	<211> 1530	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 变体 HPPD	
	<400> 43	
	cacgtgttaa ttaaaaaaaaa aatggcttcg atctctctct cagttggac cgttagccgg	60
	accgccccctg ctcaggccaa catgggtgct ccgttcaccg gccttaagtc caacgccgcc	120
	ttccccacca ccaagaagge taacgacttc tccacccttc ccagcaacgg tggaagagtt	180
	caataatagc aggtgtggcc ggcctacggc aacaagaagt tcgagacgt gtcgtaccig	240

	ccgccgcgtg ctatggcgcc caccgtgatg atggccctcgt cggccaccgc cgtcgcctccg	300
	ttccaggggc tcaagtcac cggcagcctc cccgtcggcc gccgctcctc cagaagcctc	360
	ggcaacgtca gcaacggcgg aaggatccgg tgcattgaac ctccacttac tcaatetaac	420
	gcattctcagt tccaaacatg ggataacceca atgggtaccg acggttitga gtttgttag	480
	tacgccgcac ctgacctgtg tgcaatgggt caactattcg agaggatggg atttcaagcc	540
	atcgctaac ataggagaaa gaatgtgact ctatataggc aaggagatg aaacttcac	600
	atcaacgcgc aacctgattc ttttgcccag agattcgcca ggttgcacgg tccctctgtg	660
	tgtctattg ccattagagt gaacgatgcc aagtatgcat atgagagagc tacttctttg	720
	ggagcaiggg gttacgcaca acaggcagca cctggagaat tgtcaatacc tgcatacaag	780
	ggatccggag attcattgat ttattttacc gacaagtgga gaggaaagaa cggtgccaag	840
	galtgtgacc ttgglaacat ttcaattctc gatgtagatt tggagccatt gccaggagca	900
	gatcttcac ctgaaggact tggacttacc tataattgacc atcttaccaa caacgtgtac	960
	agaggaagga tggctgagtt ggcctgaattc tatgagagga tcttttaatt cagagaaatc	1020
	agatattctg acattgaagg acaggccacc ggggtgaagt caaaggetat gacatctcca	1080
	tgcggtaaga tcagaattcc tataaatgag gaaggtaacg ataaggcagg acagatccag	1140
	gagtatcttg atatgtatag gggtaggggt atacaacata ttgccttggg atctactaac	1200
	ctttatgaca cagtggaagg acttcagatg aacggtaaca agcttcttaa cacatcagag	1260
	acctattacg aattgcttcc aaagagaatt ccagatcttc aggaacctat acctgagttg	1320
[0061]	ttggcaagga atatacttgt ggatggacag cctggagaat tgttgcctca aatatttca	1380
	gaaaaccagt tgggaccaat ctttttcgaa tcatccaaa gaaagggtaa ctctggtttt	1440
	ggtgagtaca atttcaaagg aggatttgag accatggaac ttgatcaaat gagaaggggt	1500
	gtgttgaaga cctaataagt taacgacgtc	1530

<210> 44  
 <211> 1530  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 变体 HPPD

<400>	44	
	cacgtgttaa ttaaaaaaaaa aatggcttcg atctctctct cagttgcgac cgttagccgg	60
	accgcccctg ctccagccaa catgggtggt cegttaccg gcccttaagtc caacgcggcc	120
	ttccccacca ccaagaaggc taacgacttc tccacccttc ccagcaacgg tggagaggtt	180
	caalataigc aggtgigccc ggcttacggc aacaagaagt tggagacgct gtcgtaccig	240
	ccgccgcgtg ctatggcgcc caccgtgatg atggccctcgt cggccaccgc cgtcgcctccg	300
	ttccaggggc tcaagtcac cggcagcctc cccgtcggcc gccgctcctc cagaagcctc	360
	ggcaacgtca gcaacggcgg aaggatccgg tgcattgaac ctccacttac tcaatetaac	420
	gcattctcagt tccaaacatg ggataacceca atgggtaccg acggttitga gtttgttag	480
	tacgccgcac ctgacctgtg tgcaatgggt caactattcg agaggatggg atttcaagcc	540

```

atcgctaac ataggagaaa gaatgtgact ctatataggc aaggagagat aaacttcac 600
atcaacgccg aacctgattc tttgcccag agattcgcca ggttgcacgg tctttctgtg 660
tgtgctatfg ccattagagt gaacgatgcc aagtatgcat atgagagagc tacittcttg 720
ggagcatggg gtiacgcaca acaggcagca cctggagaat tgcataacc tctatcaag 780
ggtatcggag attcattgat ttattttatc gacaagtga gaggaagaa cggigccaag 840
gatggtgacc ttgtaacat ttcattctc gatgtagatt tggagcatt gccaggagca 900
gatcttcatc ctgaaggact tggacttacc tatattgacc atcttcaaaa caacgtgtac 960
agaggaagga tggctgagtt ggctgaattc tatgagagga tctttaattt cagagaaatc 1020
agatatttcg acattgaagg acaggccacc ggggtgaagt caaagctat gacatctca 1080
tgcgtaaga tcagaattcc tataaatgag gaaggtaacg ataaggcagg acacatccag 1140
gaglatctlg atalgtatag gggigaggtt atacaacata ttgcttggg atctactaac 1200
ctttaigaca cagtggatgg acttcagatg aacggtatca agcttcttaa cacatcagag 1260
acctattacg aattgctcc aaagagaatt ccagatctc aggaacctat accigagttg 1320
ttggcaagga atatacttgt ggttgacag cctggagaat tgttgcitea aatatttca 1380
gaaaaccagt tgggaccaat ctttttcgaa ttcatccaaa gaaagggtaa ctctggttt 1440
ggccataca atttcaaagg atigtgtgag accttgaac ttgatcaaat gagaagggtt 1500
gigtgaaga cctaataggt taacgacgtc 1530

```

[0062]

```

<210> 45
<211> 1530
<212> DNA
<213> 人工序列

```

```

<220>
<223> 变体 HPPD

```

```

<400> 45
cacgtgttaa ttaaaaaaaaa aatggtctcg atctctctct cagttgcgac cgttagccgg 60
accgcccttg cttagcccaa catggtggct ccgttcaccg gccttaagtc caacgccgcc 120
ttcccacca ccaagaaggc taacgacttc tccacccttc ccagcaacgg tggagagtt 180
caatataatg aggtgtggcc ggctacggc aacaagaagt tggagacgtt gtcgtacctg 240
ccgccctgt ctatggcgcc caccgtgatg atggcctcgt cggccaccgc cgtctctccg 300
ttccaggggc tcaagtcac cggcagcctc cccgtcggcc gcgctctctc cagaagcctc 360
ggcaacgtca gcaacggcgg aaggatccgg tgcataaacg ctccacttac tcaatctaac 420
gcactctcagt tcaaacatg ggataaccca atgggtaccg acggttttga gttgtgtgag 480
tagccgcac ctgacctgt tgcattgggt caactatctg agaggatggg atttcaagcc 540
atcgctaac ataggagaaa gaatgtgact ctatataggc aaggagagat aaacttcac 600
atcaacgccg aacctgattc tttgcccag agattcgcca ggttgcacgg tctttctgtg 660
tgtgctatfg ccattagagt gaacgatgcc aagtatgcat atgagagagc tacittcttg 720
ggagcatggg gtiacgcaca acaggcagca cctggagaat tgcataacc tctatcaag 780
ggtatcggag attcattgat ttattttatc gacaagtga gaggaagaa cggigccaag 840

```

	gatggigacc tiggtaacat ttcattcttc gatglagatt tcgagccatt gccaggagca	900
	gatcttcate ctgaaggact tggacttacc tataatgacc atcttcaaaa caacgtgtac	960
	agaggaagga tggctgagti ggctgaattc taigagagga tcittaatti cagagaaatc	1020
	agatatttcg acatigaagg acagccacc ggggigaagt caaaggctat gacatctcca	1080
	tgcgtaaga tcagaattcc tataaatgag gaagtaacg ataaggcagg acagatccag	1140
[0063]	gaglatcttg aatgtatag gggigagggt atacaacata ttccctggg atctactaac	1200
	ctttatgaca cagtggatgg acttcagatg aacggatca agcttcttaa cacatcagag	1260
	acctattacg aattgcttcc aaagagaatt ccagatcttc agaacctat acctgagttg	1320
	ttggcaagga atatactigt ggatggacag cctggagaat tgttgcttca aataitttca	1380
	gaaaaccagt tggaccaat ctttttcgaa ttcattcaaaa gaaagggtaa ctctggtttt	1440
	ggtgagggca atttcaaagc ctigtgtgag accatggaac ttgatcaaat gagaagggtt	1500
	gigtgaaga cctaataggt taacgacgtc	1530



FESEFD	-----MADLYENFNG-----INTF	14
燕麦	--MPPTPT-ATGASAAAVTPEHAAS-----PFRVVRVNFSDRFPPVLSF	43
燕麦 缺失	--MPPTPT-ATGASAAAVTPEHAAS-----PFRVVRVNFSDRFPPVLSF	43
玉米	--MGPTPTAAAACAAVAAASAAEQAAFFLYGHRAPVFRPNRSDRFHTLAP	46
阿维链霉菌	--MTQPTHTPTDARQSDPP-----VKRN	33
拟南芥	--MGHQKAAVRENQNRDDEAAASDFGFKLVG-FKRFVRENPKSDRFVVKRF	47
大麦	--NPPTPTTAAATGASAAAVTPEHAP-----HFRVFRNFSDRFHTLSF	42
野胡萝卜	--MGKK-QSRABILGSGSSTSPATFVLVG-PNNFVRAKRFSDRFVAVRF	46
禾生球腔菌	--MAGPALLVTSQNGRTSPLYDSGQVYAP-----AALVVGCHVNYGKY	42
粗球孢子菌	--MAPADSPTLQPAQPDIN-----QYGY	24
Axmi 3033	-----MADLYENFNG-----LMGP	14
Axmi 4233	MNAELTQNNAEQFQTDKDMG-----EDGP	25
FESEFD	EFIFASPTPTLEPIPEIKGPTKVAHRSKN-----VHLYRQGEINL	57
燕麦	HNVELWCADAASAAAGRFSPALQAPLAAREDLSTONSAHASILLRSGALAP	93
燕麦 缺失	HNVELWCADAASAAAGRFSPALQAPLAAREDLSTONSAHASILLRSGALAP	93
玉米	HNVELWCADAASAAAGRFSPALQAPLAAREDLSTONSAHASILLRSGALAP	99
阿维链霉菌	DAVVFAVNRKQAA-RYETAFQMQLVAYGSESESRBTASYVLTNRSARF	72
拟南芥	SHIEFWGDATINVARFSEWLGMRPFAKSELSTINMNHASVLLTSGLDF	57
大麦	HNVEFWCADAAASAAAGRFSPALQAPLAAREDLSTONSAHASILLRSGALAP	92
野胡萝卜	HNIEFWGGAATNERRFSEWLGMRPFAKSELSTONSAHASVLYRANLAP	96
禾生球腔菌	HNAEKHWONAKQVAQPYITRHOPEPVAHGLETSSEFFASRVVQFNGVRF	92
粗球孢子菌	DAVHWYVONAKQAAATYVTRMGPERVAYGLETSGKAVASNVVENITP	74
Axmi 3033	EFIFASPTPTLEPIPEIKGPTKVAHRSKN-----VHLYRQGEINL	57
Axmi 4233	EFVEYAAPDFVAMQQLFERHGFQATAMHRSKN-----VTLYRQGEINL	68
FESEFD	ILNNEFNS-----IASYFAAENGSPVYCCNAFFVYK	96
燕麦	LFTAFYAPFPQRA-ATAAATASIFSPSADAAPTFAAARGLAVRSEVVRVA	142
燕麦 缺失	LFTAFYAPFPQRA-ATAAATASIFSPSADAAPTFAAARGLAVRSEVVRVA	141
玉米	LFTAFYAN-----GDANTAALFSPSAAAARFPAADHOLAVRAVALRVA	142
阿维链霉菌	VLTSVIKPATFNG--RFLA-----DVAENHSGVGLALEVD	107
拟南芥	LFTAFYSPSLSAKRIKFTTTAGIPEFDNGSCLSPFEGHGLKAVALEVE	147
大麦	LFTAFYAN-----GDAATAELFSPSADAAPTFAAARGLAVRSEVVRVA	136
野胡萝卜	VFTAFYRSTTT-----SGGSAIFSPSAGGFHSPAKRGLAVRSLALEVA	142
禾生球腔菌	VFTSFVRSBAKQT---LKAAPLADQARLDEMYDRLOKGGGVKQVAFVD	139
粗球孢子菌	LLTSPLFSVQAS--RFPE---DEALLKEINAHLEHGGVVDVAFVD	118
Axmi 3033	ILNNEFNS-----VAEYFAAENGSPVYCCNAFFVYK	86
Axmi 4233	LINNEFNS-----FAQGFPAKLEHGGVYCAIALRVA	97
DESEFD	DSQKAYRRALELGAQFTHIDTGM-----ELNLDPAIKYIGASPLYLIDRFQ	132
燕麦	DAEAAPFVSVAGGASDAFAPADLQ---RQFLAEVELYGDVLRVVSYPD	189
燕麦 缺失	DAEAAPFVSVAGGASDAFAPADLQ---RQFLAEVELYGDVLRVVSYPD	189
玉米	DAEAAPFVSVAGGASDAFAPADLQ---RQFLAEVELYGDVLRVVSYPD	189
阿维链霉菌	DARAANAYAIERERVAVSPYELKDEHCTVVLAAIATYKPTHTLVLRG	197
拟南芥	DARAFPSISVANGAIPSSPFIVLN---EAVTLAEVLYGDVLRVVSYPD	194
大麦	DAEAAPFVSVAGGASDAFAPADLQ---RQFAPAEVLYGDVLRVVSYPD	183
野胡萝卜	DVARAFERSVAGGASDAFAPADLQ---DQAWLAEVELYGDVLRVVSYPD	189
禾生球腔菌	DVLAAYVENAVANGAESVPSPHDSECTEGDVIKAAIKTYGPTHTFFIQRFT	189
粗球孢子菌	CVESVFSAVPNGASVVSVDVKTVEDEDQIKWATIRTYGPTHTLVLRG	189
Axmi 3033	DSQKAYRRALELGAQFTHIDTGM-----ELNLDPAIKYIGASPLYLIDRFQ	132
Axmi 4233	DAEVAYERRALELGAQFTHIDTGM-----ELNLDPAIKYIGASPLYLIDRFQ	143

图1A

PESEFD	-- EGS-----SYDIDFVYLEG---VERNFVQAGLEVIDLHTRWVYR	169
燕麦	ETD-----LPLFLGFPERVE-----SPQAVDYGLTRFDHWVGN--V	212
燕麦 缺失	ETD-----LPLFLGFPERVE-----SPQAVDYGLTRFDHWVGN--V	211
玉米	GAAG-----SFFLPQFEQVA-----SPGAADYQLESDFDHIWGN--V	223
阿维链霉菌	YDG-----FYLPGYVAA&DIVEPPAHR-- --TPQRLDHCVENVEL	193
拟南芥	BDTEK-----SEFLPFFERVEDA--SSFP-LDYGIRALDHWVGN--V	231
大麦	QTD-----VFPLGPFESWT-----NPDVDYGLTRFDHWVGN--V	216
野胡萝卜	ER-----GLFLGFPEAVEST--ASFPLDYGIRALDHWVGN--V	224
禾生球腔菌	YTG-----PFLEGYRSCCTVDEANKFLPPVWLEALDHWVGNQDW	218
粗球孢子菌	YEG-----GFMPQYRRESMADATSXFLPKVVLERRDHCVENQDW	207
Axmi 3098	-- EGS-----SYDIDFVYLEG---VDPMPVQAGLFIIDLHTRWVYR	169
Axmi 4288	GNKGAEDGDLNLSFFDVFPEPLG---ADLHPEQLGLEYIDLHTRWVYR	190
: : : : * : *		
PESEFD	GRMVYRANFYBKLFNFRREARYF---DIKGEYTGLETAKNSADKMKIRIPL	216
燕麦	PEMAPVIDYMEQFLGFNHPAEPTAKDVGTTESGLNSVVLANNSEAVLLPL	272
燕麦 缺失	PEMAPVIDYMEQFLGFNHPAEPTAKDVGTTESGLNSVVLANNSEAVLLPL	271
玉米	PFLAFAAAAYFAGFTGFNHPAEFTTSDVGTAEGLNSVVLANNSEAVLLPL	273
阿维链霉菌	GRNNEWVGFYNNVWVPTNNHRESVGDUIATEYSALMSKQVVAQYLKVKRPI	343
拟南芥	PELGRALTYVAGFTGFNHPAEFTTSDVGTAEGLNSVVLANNSEAVLLPL	281
大麦	PELAPAAAYFAGFTGFNHPAEFTTSDVGTAEGLNSVVLANNSEAVLLPL	266
野胡萝卜	TELOPFVRYIAGFTGFNHPAEPTAKDVEETLESGLNSVVLANNSEAVLLPL	274
禾生球腔菌	DEMSLADCFYERCLGFNHPFWSVDDFDICTEFSALKSIVMSDFNQVYKRF	278
粗球孢子菌	DEMERVCDYYEKILGFNHPFWSVDDFDICTEFSALKSIVMSDFNQVYKRF	257
Axmi 3098	GRMAYRANFYKLFNFRREIRVF---DIKGEYTGLETAKNSADKMKIRIPL	316
Axmi 4288	GNMABLABPYERISFNFRREIRVF---DIKQATGVESKARTSPQMKIRIPI	337
: : : : * : * : : : : : *		
PESEFD	NE--ESSKCAQQTREFLQFNGETIQHVAFLIDDLVRTWDALKYI---G	260
燕麦	NEPVVGTKRRSQIQTYLEVHGQPGVQHIALASNDVLRTLREMPARTPMGG	322
燕麦 缺失	NEPVVGTKRRSQIQTYLEVHGQPGVQHIALASNDVLRTLREMPARTPMGG	321
玉米	NEPVVGTYRRKRSQIQTYLLEHGQPGVQHIALASNDVLRTLREMPARTPMGG	323
阿维链霉菌	NEEALAKY-KSQIDRYLEFYGAGVQHIALATGDIIVETVTRMKAE---G	288
拟南芥	NEPVVGTKRRSQIQTYLLEHGQPGVQHIALASNDVLRTLREMPARTPMGG	311
大麦	NEPVVGTKRRSQIQTYLLEHGQPGVQHIALAVASSDYLRTLRMPARTPMGG	316
野胡萝卜	NEPVVGTKRRSQIQTYLLEHGQPGVQHIALASNDVLRTLREMPARTPMGG	324
禾生球腔菌	NEPANGKN-KSQIERVYLFYNGAGVQHIALRTPNILEAVSNLSEK---G	323
粗球孢子菌	NEPAREKN-QSQLESYVDFYNGAGVQHIALRTPNILEAVSNLSEK---G	302
Axmi 3098	NE--ESSKCAQQTREFLQFNGETIQHVAFLIDDLVRTWDALKYI---G	260
Axmi 4288	NE--EGNDKAGQIQEYLDWYRGETIQHIALGRTNLYDTVDOLQEN---G	281
** : : : : * : * : * : * : : : *		
DESEFD	MRFPTAFPDYYEMLEKRLFDHRSFVDQLQARGILLGSSVRECKRLLIQ	310
燕麦	FQFMAPQAKYYRQVRIAGDVL--EQQIFRQELGVLDVDRDQGVLLQ	370
燕麦 缺失	FQFMAPQAKYYRQVRIAGDVL--EQQIFRQELGVLDVDRDQGVLLQ	369
玉米	FQFMAPPTSDYYRQVRIAGDVL--EQQIFRQELGVLDVDRDQGVLLQ	371
阿维链霉菌	VQFLDTP-DQYVETLGEWVGT---RVFVETLRELCITLADRDQGVLLQ	353
拟南芥	FQFMAPSDPTYYRQVRIAGDVL--DEQIKKRELEGLVDRDQGVLLQ	373
大麦	FQFLFPPLPKYYRQVRIAGDVL--EQQIFRQELGVLDVDRDQGVLLQ	364
野胡萝卜	FQFMAPSDPTYYRQVRIAGDVL--DEQIFRQELGVLDVDRDQGVLLQ	372
禾生球腔菌	VEFISVF-DTYTENWRLRLAAGWKLERFDIIGELNLLIFDFRQGVLLQ	372
粗球孢子菌	TEFISVF-ETYYEDMKXIPLKRQGLVLDVDFETLMSLELLIFDFRQGVLLQ	351
Axmi 3098	MRFPTAFPDYYEMLEKRLFDHRSFVDQLQESQITLDRGASDSECKRLLIQ	310
Axmi 4288	IFLLNIS-ETYYELLPRIFDQLQSPPELLASNTLVDQGPQR---LILQ	326
: : : : * : * : : : : : *		

图1B



图1C

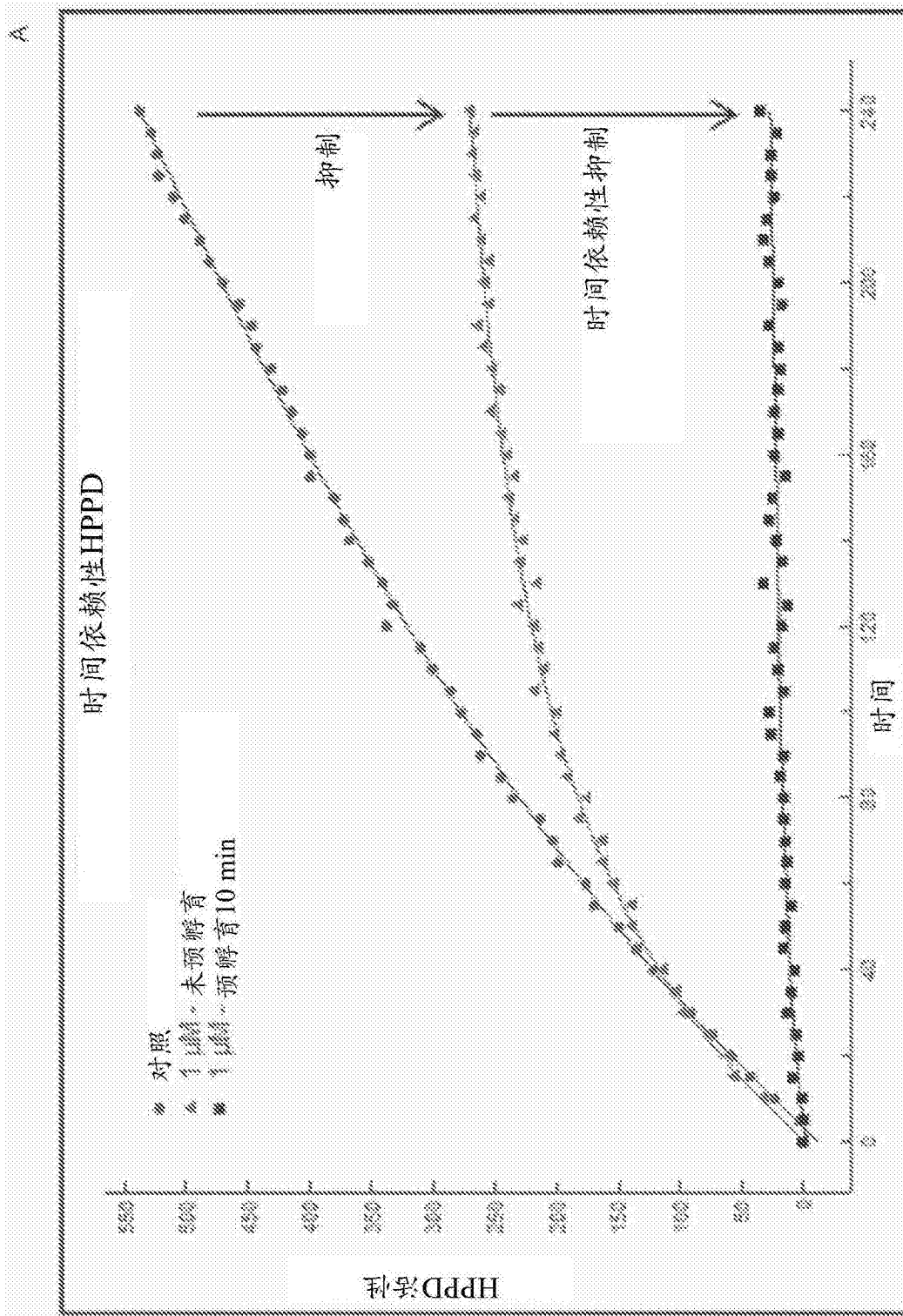


图2a

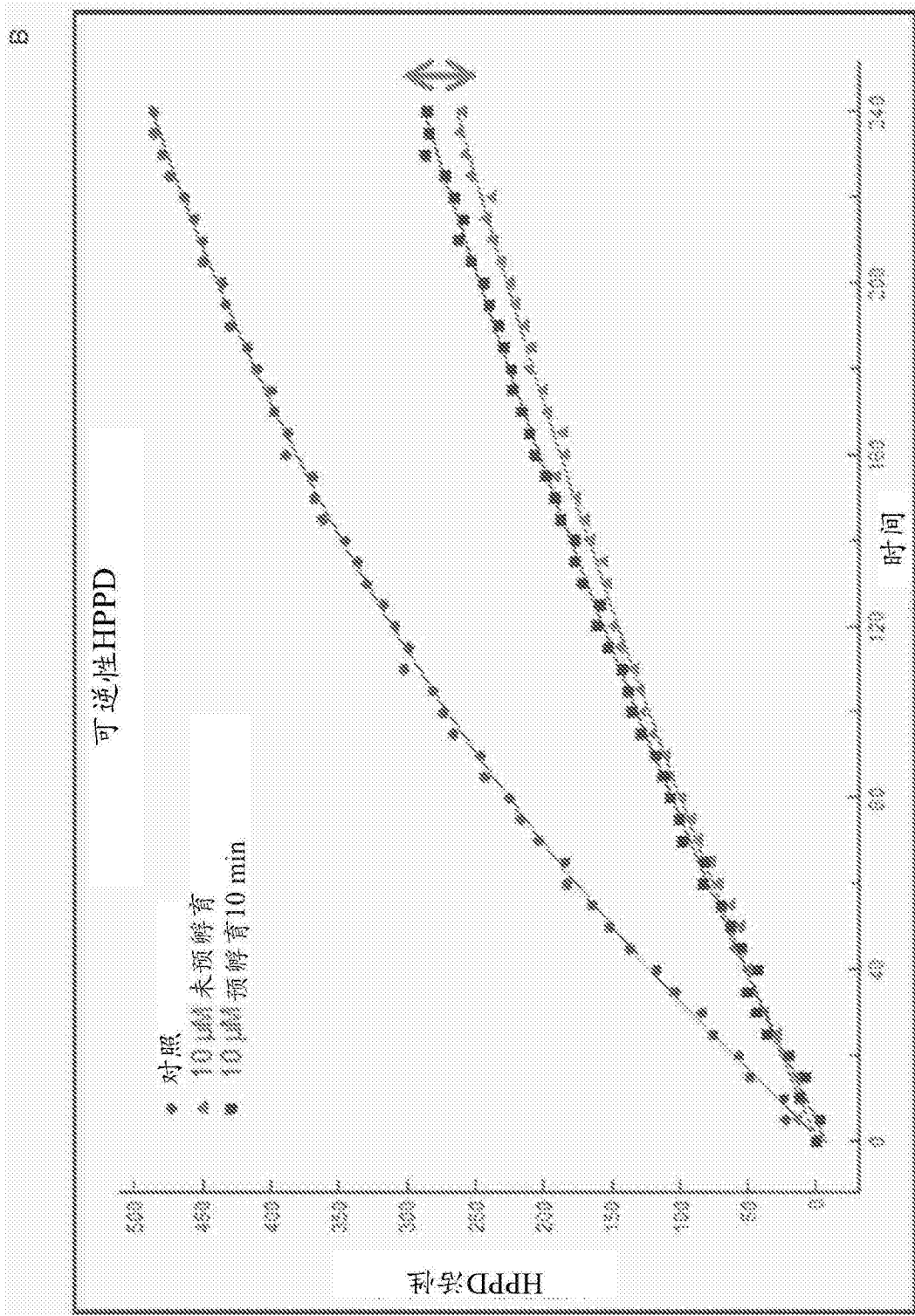


图2b