



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110317824 B

(45) 授权公告日 2021.03.05

(21) 申请号 201810270131.X

A01H 6/46 (2018.01)

(22) 申请日 2018.03.29

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110317824 A

(56) 对比文件

(43) 申请公布日 2019.10.11

CN 101892238 A, 2010.11.24

WO 2010082367 A1, 2010.07.22

(73) 专利权人 中国科学院植物研究所  
地址 100093 北京市海淀区香山南辛村20号

吕维玲等. 玉米血管紧张素转化酶抑制肽及其降压作用的研究.《药学服务与研究》.2009, 第9卷(第2期), 第126-128页.

(72) 发明人 曲乐庆 钱丹丹

Li, Y等. A Novel ACE Inhibitory

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

Peptide Ala-His-Leu-Leu Lowering Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats.《JOURNAL OF MEDICINAL FOOD》.2015, 第19卷(第2期), 第181-185页.

代理人 关畅

审查员 徐益君

(51) Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

A01H 5/00 (2018.01)

权利要求书2页 说明书11页

序列表4页 附图6页

(54) 发明名称

降血压水稻材料的制备方法及所用基因与蛋白质

(57) 摘要

本发明公开了降血压水稻材料的制备方法及所用基因与蛋白质。本发明公开的降血压水稻材料的制备方法,包括:提高目的植物中降血压相关蛋白的表达量,得到具有降低动物血压功能的植物;降血压相关蛋白由n种血管紧张素转化酶抑制肽直接连接或由连接肽连接得到;n为自然数, $n \geq 1$ ;降血压相关蛋白含有m个血管紧张素转化酶抑制肽;m为自然数, $m \geq 2$ ;降血压相关蛋白的每两个血管紧张素转化酶抑制肽间均含有蛋白酶的识别序列。实验证明,本发明的降血压水稻材料可以有效降低高血压动物的血压。

1. 具有降低动物血压功能植物的制备方法,包括:提高目的植物中降血压相关蛋白的表达量,得到具有降低动物血压功能的植物;

所述降血压相关蛋白由下述A1)- A10)的十种多肽直接相连或由所述多肽连接得到:

A1) 序列1的第3-8位所示的多肽;

A2) 序列1的第11-16位所示的多肽;

A3) 序列1的第19-30位所示的多肽;

A4) 序列1的第31-33位所示的多肽;

A5) 序列1的第34-40位所示的多肽;

A6) 序列1的第43-47位所示的多肽;

A7) 序列1的第50-61位所示的多肽;

A8) 序列1的第64-66位所示的多肽;

A9) 序列1的第68-73位所示的多肽;

A10) 序列1的第76-85位所示的多肽。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述降血压相关蛋白为如下B1)或B2):

B1) 氨基酸序列是序列1的蛋白质;

B2) 在B1)的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述提高目的植物中降血压相关蛋白的表达量通过向所述目的植物中导入含有权利要求1或2中所述降血压相关蛋白的编码基因的表达盒实现。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述编码基因为编码序列是序列表中序列2的第106-360位的cDNA分子或DNA分子。

5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述表达盒中所述编码基因的表达由组织特异性启动子启动,所述组织特异性启动子能启动所述编码基因在所述动物可食用部分表达。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:所述目的植物为单子叶植物或双子叶植物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述单子叶植物为禾本科植物。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述禾本科植物为水稻、玉米、小麦、高粱、燕麦、大麦或黑麦。

9. 权利要求1中所述降血压相关蛋白。

10. 编码权利要求9所述降血压相关蛋白的核酸分子。

11. 含有权利要求10所述核酸分子的表达盒。

12. 含有权利要求10所述核酸分子的重组载体、或含有权利要求11所述表达盒的重组载体。

13. 含有权利要求10所述核酸分子的重组微生物、或含有权利要求11所述表达盒的重组微生物、或含有权利要求12所述重组载体的重组微生物。

14. 含有权利要求10所述核酸分子的转基因植物细胞系、或含有权利要求11所述表达盒的转基因植物细胞系。

15. 含有权利要求10所述核酸分子的转基因植物组织、或含有权利要求11所述表达盒

的转基因植物组织。

16. 含有权利要求10所述核酸分子的转基因植物器官、或含有权利要求11所述表达盒的转基因植物器官。

17. 权利要求9所述降血压相关蛋白、权利要求10所述核酸分子、权利要求11所述表达盒、权利要求12所述重组载体、权利要求13所述重组微生物、权利要求14所述转基因植物细胞系、权利要求15所述转基因植物组织或权利要求16所述转基因植物器官在制备降低动物血压产品中的应用。

18. 权利要求1-8中任一所述方法在制备降低动物血压产品中的应用。

## 降血压水稻材料的制备方法及其所用基因与蛋白质

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物基因工程领域中,降血压水稻材料的制备方法及其所用基因与蛋白质。

### 背景技术

[0002] 高血压是一种常见的心血管疾病,它对大脑、肾脏和心血管都可造成损害,是引起脑卒中、冠心病以及心力衰竭等疾病的重要因素。血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme,ACE)在血压调节过程中起着关键作用,它可以使没有活性的血管紧张素I转化为有活性的血管紧张素II。血管紧张素II是体内最强的缩血管物质,还能刺激醛固酮分泌,直接引起血压上升。同时血管紧张素转化酶还可以使具有血管扩张作用的缓激肽降解,间接造成血压上升。因此血管紧张素转化酶是预防和治疗高血压的首要靶标。

[0003] 目前对高血压主要是通过药物治疗进行的,降血压药物主要是血管紧张素转化酶抑制剂。自1981年,第一个合成口服有效的肽类ACE抑制剂巯甲丙脯(Captopril)问世以来,目前已有许多化学合成类的ACE抑制剂应用于临床。然而这类降血压药物作用时间短,治疗周期长,停药后会产生血压反弹,成本高,同时副作用大,可以引起肾功能损害和低血压等。因此,亟待寻找安全、长效、无毒副作用的新型降血压药。

[0004] 近些年的研究表明,食物蛋白质酶解产物中的一些短肽具有降血压功能,如水稻、玉米、大麦、大豆、芝麻等作物种子以及酪蛋白、猪血红蛋白、乳清蛋白、酸奶、鱼肉蛋白、干酪、猪肉、鸡肉蛋白等含有许多由2-12个氨基酸组成的具有降血压功能的血管紧张素转化酶抑制肽(ACEIP)。这些降血压活性肽食用安全性高,无毒副作用,而且它们共同的突出优点是对高血压患者可以起到降血压作用,对血压正常的人无降血压作用;除了有降血压的功能外,往往还同时具有抗氧化、促消化、降血糖、抗血小板凝集、增强人体免疫力等作用;具有较高的热稳定性、水溶性等优点,因而又可作为功能因子添加到饮料、食品中去,市场前景极好。

[0005] 目前,研究发现很多食品来源的ACE抑制肽,如DKIHPPF、YQQPVL、FFVAPFPEVFGK、IPP、YLAHKALPMHIR、VPP、SKVYPPFGPI、LKPNM、KVLVPVE等,这些ACE抑制肽均来自于牛奶蛋白,且有很好的ACE抑制活性。

[0006] 虽然食物蛋白质中广泛含有具有抑制血压升高作用的ACEIP,但这些ACEIP形成具有降血压功效的活性肽需经过复杂的蛋白酶水解过程,因此,往往即使某种蛋白含有ACEIP组分,也无法通过适当的蛋白酶水解形成具有生理功能的活性肽而发挥降血压功能。与此同时,天然蛋白中ACEIP含量很低,利用天然蛋白经蛋白酶水解回收生产ACEIP成本很高,无法实现产业化。

### 发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是如何制备具有降低动物血压功能的植物材料。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明首先提供了具有降低动物血压功能植物的制备方

法,所述方法包括:提高目的植物中降血压相关蛋白的表达量,得到具有降低动物血压功能的植物;

[0009] 所述降血压相关蛋白由n种血管紧张素转化酶抑制肽直接连接或由连接肽连接得到;n为自然数, $n \geq 1$ ;

[0010] 所述降血压相关蛋白含有m个所述血管紧张素转化酶抑制肽;m为自然数, $m \geq 2$ ;

[0011] 所述降血压相关蛋白的每两个所述血管紧张素转化酶抑制肽间均含有蛋白酶的识别序列。

[0012] 所述血管紧张素转化酶抑制肽(ACEIP)为食物蛋白质酶解产物中的一些具有降血压功能的短肽,如来源于水稻、玉米、大麦、大豆、芝麻等作物种子以及酪蛋白、猪血红蛋白、乳清蛋白、酸奶、鱼肉蛋白、干酪、猪肉、鸡肉蛋白等的由2-12个氨基酸组成的具有降血压功能的多肽。

[0013] 所述蛋白酶的识别序列可由两个所述血管紧张素转化酶抑制肽直接相连后在连接处形成,也可由通过所述连接肽连接两个所述血管紧张素转化酶抑制肽后在连接处形成。

[0014] 所述降血压相关蛋白能被所述蛋白酶酶切得到q个多肽; $q \leq m$ ;所述多肽为下述a1)或a2):

[0015] a1) 所述血管紧张素转化酶抑制肽;

[0016] a2) 在所述血管紧张素转化酶抑制肽的N端和/或C端添加1-2个氨基酸残基得到的多肽。

[0017] 所述蛋白酶可为所述动物蛋白酶。

[0018] 上述方法中,所述蛋白酶可为胰蛋白酶或胃蛋白酶。

[0019] 所述连接肽可为Gln-Arg。

[0020] n可满足: $1 \leq n \leq 20$ 。进一步,n可满足: $1 \leq n \leq 10$ 。

[0021] m可满足: $2 \leq m \leq 20$ 。

[0022] 上述方法中,所述血管紧张素转化酶抑制肽可为下述A1)-A10)中的至少一种,但不仅限于A1)-A10)中所述多肽:

[0023] A1) 序列1的第3-8位所示的多肽;

[0024] A2) 序列1的第11-16位所示的多肽;

[0025] A3) 序列1的第19-30位所示的多肽;

[0026] A4) 序列1的第31-33位所示的多肽;

[0027] A5) 序列1的第34-40位所示的多肽;

[0028] A6) 序列1的第43-47位所示的多肽;

[0029] A7) 序列1的第50-61位所示的多肽;

[0030] A8) 序列1的第64-66位所示的多肽;

[0031] A9) 序列1的第68-73位所示的多肽;

[0032] A10) 序列1的第76-85位所示的多肽。

[0033] 所述降血压相关蛋白可由上述A1)-A10)的十种多肽直接相连或由所述多肽连接得到。

[0034] 上述方法中,所述降血压相关蛋白可为如下B1)、B2)或B3):

[0035] B1) 氨基酸序列是序列1的蛋白质；

[0036] B2) 将序列表中序列1所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的蛋白质；

[0037] B3) 在B1) 或B2) 的N端或/和C端连接标签得到的融合蛋白质。

[0038] 为了使B1) 中的蛋白质便于纯化,可在由序列表中序列1所示的氨基酸序列组成的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上如表1所示的标签。

[0039] 表1、标签的序列

标签	残基	序列
Poly-Arg	5-6 (通常为5个)	RRRRR
Poly-His	2-10 (通常为6个)	HHHHHH
FLAG	8	DYKDDDDK
Strep-tag II	8	WSHPQFEK
c-myc	10	EQKLISEEDL

[0041] 上述A2) 中的蛋白质,所述一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加为不超过10个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加。

[0042] 上述A2) 中的蛋白质可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0043] 上述A2) 中的蛋白质的编码基因可通过将序列2的第126-380位所示的DNA序列中缺失一个或几个氨基酸残基的密码子,和/或进行一个或几个碱基对的错义突变,和/或在其5'端和/或3'端连上表1所示的标签的编码序列得到。其中,序列2的第126-380位所示的DNA分子编码序列1所示的蛋白质。

[0044] B3) 中所述标签还可为信号肽。所述信号肽可将所述降血压相关蛋白运送到细胞的特定部位。所述信号肽可为GluA2信号肽。所述信号肽具体可为序列表中序列3的第1-35位所示的多肽。

[0045] 上述方法中,所述提高目的植物中降血压相关蛋白的表达量可通过向所述目的植物中导入含有所述降血压相关蛋白的编码基因的表达盒实现。

[0046] 上述方法中,所述编码基因可为如下c1) 或c2) 或c3) :

[0047] c1) 编码序列是序列表中序列2的第106-360位的cDNA分子或DNA分子；

[0048] c2) 与c1) 限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且编码所述降血压相关蛋白的cDNA分子或DNA分子；

[0049] c3) 在严格条件下与c1) 限定的核苷酸序列杂交,且编码所述降血压相关蛋白的cDNA分子或DNA分子。

[0050] 本领域普通技术人员可以很容易地采用已知的方法,例如定向进化和点突变的方法,对本发明的编码所述降血压相关蛋白的核苷酸序列进行突变。那些经过人工修饰的,具有与本发明分离得到的所述降血压相关蛋白的核苷酸序列75%或者更高同一性的核苷酸,只要编码所述降血压相关蛋白且具有所述降血压相关蛋白功能,均是衍生于本发明的核苷酸序列并且等同于本发明的序列。

[0051] 这里使用的术语“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”包括与本发明的编码序列1所示的氨基酸序列组成的蛋白质的核苷酸序列具有75%或更高,或85%或更高,或90%或更高,或95%或更高同一性的核苷酸序列。同一性可以用肉眼或计算机软件

进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。

[0052] 所述严格条件是在 $2 \times \text{SSC}$ ,  $0.1\%$  SDS的溶液中,在 $68^\circ\text{C}$ 下杂交并洗膜2次,每次5min,又于 $0.5 \times \text{SSC}$ ,  $0.1\%$  SDS的溶液中,在 $68^\circ\text{C}$ 下杂交并洗膜2次,每次15min;或, $0.1 \times \text{SSPE}$  (或 $0.1 \times \text{SSC}$ )、 $0.1\%$  SDS的溶液中, $65^\circ\text{C}$ 条件下杂交并洗膜。

[0053] 上述75%或75%以上同一性,可为80%、85%、90%或95%以上的同一性。

[0054] B2) 所述表达盒,是指能够在宿主细胞中表达所述降血压相关蛋白的DNA,该DNA不但可包括启动所述降血压相关蛋白编码基因转录的启动子,还可包括终止所述降血压相关蛋白编码基因转录的终止子。进一步,所述表达盒还可包括增强子序列。

[0055] 上述方法中,所述表达盒中所述编码基因的表达可由组织特异性启动子启动,所述组织特异性启动子能启动所述编码基因在所述动物可食用部分表达。

[0056] 所述动物可食用部分为所述目的植物的种子。

[0057] 所述组织特异性启动子为GluC启动子。所述GluC启动子能启动目的基因在胚乳中表达。

[0058] 所述GluC启动子可来源于所述目的植物。所述GluC启动子具体可为如下d1) 或d2) 或d3) :

[0059] d1) 序列表中序列4的DNA分子;

[0060] d2) 与d1) 限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且具有相同功能的DNA分子;

[0061] d3) 在严格条件下与d1) 限定的核苷酸序列杂交,且具有相同功能的DNA分子。

[0062] 所述表达盒还含有终止子。所述终止子可来源于所述目的植物。所述终止子具体可为GluB5终止子。所述GluB5终止子具体可为如下e1) 或e2) 或e3) :

[0063] e1) 序列表中序列5的DNA分子;

[0064] e2) 与e1) 限定的核苷酸序列具有75%或75%以上同一性,且具有相同功能的DNA分子;

[0065] e3) 在严格条件下与e1) 限定的核苷酸序列杂交,且具有相同功能的DNA分子。

[0066] 在实际用于中还可以将至少两个所述降血压相关蛋白进行串联,以提高所述降血压相关蛋白的表达量。在本发明的一个实施例中,所述表达盒中含有两个串联的所述编码基因。所述表达盒中,在两个串联的所述编码基因的上游还含有所述信号肽的编码基因。

[0067] 上述方法中,所述目的植物可为f1) 或f2) 或f3) :

[0068] f1) 单子叶植物或双子叶植物;

[0069] f2) 禾本科植物;

[0070] f3) 水稻、玉米、小麦、高粱、燕麦、大麦或黑麦。

[0071] 所述双子叶植物可为胚乳型双子叶植物。

[0072] 为解决上述技术问题,本发明还提供了下述任一产品:

[0073] G1) 所述降血压相关蛋白;

[0074] G2) 与所述降血压相关蛋白相关的生物材料,所述生物材料为下述G21) 至G27) 中的任一种:

[0075] G21) 编码所述降血压相关蛋白的核酸分子;

- [0076] G22) 含有G21) 所述核酸分子的表达盒；
- [0077] G23) 含有G21) 所述核酸分子的重组载体、或含有G22) 所述表达盒的重组载体；
- [0078] G24) 含有G21) 所述核酸分子的重组微生物、或含有G22) 所述表达盒的重组微生物、或含有G23) 所述重组载体的重组微生物；
- [0079] G25) 含有G21) 所述核酸分子的转基因植物细胞系、或含有G22) 所述表达盒的转基因植物细胞系；
- [0080] G26) 含有G21) 所述核酸分子的转基因植物组织、或含有G22) 所述表达盒的转基因植物组织；
- [0081] G27) 含有G21) 所述核酸分子的转基因植物器官、或含有G22) 所述表达盒的转基因植物器官。
- [0082] 其中, 所述核酸分子可以是DNA, 如cDNA、基因组DNA或重组DNA; 所述核酸分子也可以是RNA, 如mRNA或hnRNA等。
- [0083] G21) 所述核酸分子可为上述方法中所述编码基因。
- [0084] G22) 所述表达盒可为上述方法中所述表达盒。
- [0085] 可用现有的载体构建含有编码所述降血压相关蛋白核酸分子表达盒的重组载体。
- [0086] 所述载体可为质粒、黏粒、噬菌体或病毒载体。所述质粒具体可为pGPTV-pGluC-tGluB5表达载体。
- [0087] G23) 所述重组载体具体可为pGPTV-SPAA; 所述pGPTV-SPAA为将pGPTV-pGluC-tGluB5表达载体的SalI与SacI的识别序列间的DNA片段替换为序列2所示的DNA片段得到的重组载体, 该重组载体能表达序列表中序列3所示的两个串联的SPAA与所述信号肽的融合蛋白质。所述pGPTV-SPAA中, 目的基因的表达由所述GluC启动子和所述GluB5终止子控制。
- [0088] 所述微生物可为酵母、细菌、藻或真菌。其中, 所述细菌可为农杆菌, 如农杆菌EHA105。所述重组微生物可为将所述重组载体导入所述微生物中得到的重组微生物。
- [0089] 所述转基因细胞系、所述转基因组织和所述转基因器官均不包括繁殖材料。所述转基因细胞系、所述转基因组织和所述转基因器官分别可为利用上述方法得到转基因细胞系、组织和器官。
- [0090] 为解决上述技术问题, 本发明还提供了下述任一应用:
- [0091] H1、所述产品在制备降低动物血压产品中的应用;
- [0092] H2、所述产品在降低动物血压中的应用;
- [0093] H3、所述方法在制备降低动物血压产品中的应用。
- [0094] 本发明中, 所述动物可为高血压动物。所述动物具体可为哺乳动物, 如大鼠或人。所述血压可为收缩压。
- [0095] 实验证明, 利用本发明的具有降低动物血压功能植物的制备方法制备的转基因植物的种子可以有效降低高血压动物的血压, 最大降低值约为49.6mmHg, 明显高于现已报道的其他方法。因此, 该方法以及该方法中所用到的降血压相关蛋白及其基因均可用于降低高血压动物血压。利用转基因技术在植物中特异表达外源重组蛋白、多肽药物, 使人们可以在日常的饮食中预防和治疗疾病, 这对于改善人们的生活质量有非常重要的作用。与传统的发酵技术相比, 利用转基因植物来生产药物蛋白、药物多肽有更多的优点, 如安全性更好、产量更高、经济更为可观等。

## 附图说明

[0096] 图1为pGPTV-SPAA载体LB和RB间的结构。其中,GluB5 T表示GluB5终止子,GluC pro表示GluC启动子,35S pro表示35S启动子,Ag7 T表示gene 7终止子。

[0097] 图2为T<sub>0</sub>代转pGPTV-SPAA水稻的PCR检测结果。

[0098] 图3为T<sub>2</sub>代转pGPTV-SPAA水稻植株的Southern杂交检测结果。

[0099] 图4为T<sub>2</sub>代转pGPTV-SPAA水稻种子的Northern杂交检测结果。

[0100] 图5为T<sub>2</sub>代转pGPTV-SPAA水稻种子的Western杂交检测结果。

[0101] 图6为定量检测SPAA在转pGPTV-SPAA水稻中的积累。A为Western杂交结果;B为原核表达SPAA的蛋白的定量结果;C为转基因植株中SPAA的定量结果。

[0102] 图7为WKY-C和SHR-C组大鼠在灌胃生理盐水后的血压变化。“\*\*”和“\*\*\*”分别表示与WKY-C组相比,P<0.01和P<0.001。血压值为收缩压的数值。

[0103] 图8为W-200T组和W-200V组大鼠在灌胃后的收缩压变化。血压值为收缩压的数值。

[0104] 图9为S-50V组和S-50T组大鼠在灌胃后的收缩压变化。“\*\*\*”表示与S-C组相比,P<0.001。血压值为收缩压的数值。

[0105] 图10为S-100V组和S-100T组大鼠在灌胃后的收缩压变化。“\*”和“\*\*”分别表示与S-C组相比,P<0.05和P<0.01;“#”表示与S-100V相比,P<0.05。血压值为收缩压的数值。

[0106] 图11为S-200V组和S-200T组大鼠在灌胃后的收缩压变化。“\*”、“\*\*”和“\*\*\*”分别表示与S-C组相比,P<0.05、P<0.01和P<0.001;“#”和“###”分别表示与S-200V相比,P<0.05和P<0.001。血压值为收缩压的数值。

[0107] 图12为W-200V组和W-200T组大鼠的收缩压变化。“+1”和“+2”分别表示停止喂食大米粉后第一周、第二周。

[0108] 图13为S-50V组和S-50T组大鼠的收缩压变化。“+1”和“+2”分别表示停止喂食大米粉后第一周、第二周;“\*”表示差异达到P<0.05水平。

## 具体实施方式

[0109] 下面结合具体实施方式对本发明进行进一步的详细描述,给出的实施例仅为了阐明本发明,而不是为了限制本发明的范围。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂、仪器等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。下述实施例中,如无特殊说明,序列中各核苷酸序列的第1位均为相应DNA的5'末端核苷酸,末位均为相应DNA的3'末端核苷酸。

[0110] 下述实施例中的水稻(*Oryza sativa* cv Kitaake)((Wen Jing Li • Ling Ling Dai • Zhi Jian Chai • Zhi Jie Yin • Le Qing Qu.Evaluation of seed storage protein gene 3'-untranslated regions in enhancing gene expression in transgenic rice seed.*Transgenic Res* (2012) 21:545-553.)公众可从申请人处获得该生物材料,该生物材料只为重复本发明的相关实验所用,不可作为其它用途使用。

[0111] 实施例1、降血压相关蛋白及其编码基因的制备

[0112] 本实施例提供了一种由十种血管紧张素转化酶抑制肽(ACEIP)连接得到的具有降血压功能的蛋白质,将该蛋白质命名为降血压相关蛋白(SPAA),所用ACEIP的序列分别为序

列表中序列1的第3-8位、第11-16位、第19-30位、第31-33位、第34-40位、第43-47位、第50-61位、第64-66位、第68-73位和第76-85位,不能被胃蛋白酶酶切的两个ACEIP间由谷氨酰胺和精氨酸连接,以使不能被胃蛋白酶酶切的两个多肽能被胰酶酶切,SPAA的氨基酸序列为序列列表中序列1。

[0113] 根据水稻密码子偏好性人工设计编码SPAA的核苷酸序列,将该DNA片段记为SPAA基因,其序列为序列列表中序列2的第106-360位,在生工生物工程(上海)有限公司合成SPAA基因。

[0114] 实施例2、降血压转基因水稻新材料的制备及其降血压功能的检测

[0115] 一、双元植物表达载体的构建

[0116] 人工合成序列列表中序列2所示的DNA分子,序列2的第1-105位为GluA2信号肽序列,第106-360位和第361-615位均为SPAA基因序列,将序列2所示的DNA片段记为GluA2-2SPAA基因。

[0117] 将pGPTV-pGluC-tGluB5表达载体(Wen Jing Li • Ling Ling Dai • Zhi Jian Chai • Zhi Jie Yin • Le Qing Qu. Evaluation of seed storage protein gene 3'-untranslated regions in enhancing gene expression in transgenic rice seed. *Transgenic Res* (2012) 21:545-553.)的SmaI与SacI的识别序列间的DNA片段替换为序列2所示的DNA片段,得到重组载体,将该重组载体命名为pGPTV-SPAA, pGPTV-SPAA能表达序列列表中序列3所示的蛋白质,该重组载体中GluA2-2SPAA基因的表达由GluC启动子(序列为序列列表中序列4)和GluB5终止子(序列为序列列表中序列5)控制,该重组载体还含有一个由35S启动子和Ag7终止子(Detlef Becker, Elke Kemper, Jeff Schell and Robert Masterson. *New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Molecular Biology* 20:1195-1197, 1992.)控制的潮霉素抗性基因的表达盒。pGPTV-SPAA载体LB和RB间的结构如图1所示。

[0118] 其中,序列3的第1-35位为GluA2信号肽,第36-120位和第121-205位为SPAA。

[0119] 二、转pGPTV-SPAA植物表达载体水稻的构建

[0120] 用冻融法将步骤一的pGPTV-SPAA导入农杆菌EHA105中,然后通过农杆菌介导法转化水稻ktia-ake胚性愈伤组织。利用潮霉素筛选方法,获得24株T<sub>0</sub>代转基因植株。将pGPTV-pGluC-tGluB5表达载体导入农杆菌EHA105中,然后通过农杆菌介导法转化水稻ktia-ake胚性愈伤组织,得到空载体对照水稻。

[0121] 三、转基因水稻植株的分子检测

[0122] 1、T<sub>0</sub>代转pGPTV-SPAA水稻的PCR检测

[0123] 利用PCR方法进行T<sub>0</sub>代植株分子检测。用于检测的潮霉素基因引物序列如下:

[0124] Hpt-F: 5' AGTTCGACAGCGTCTCCGACCTG 3'

[0125] Hpt-R: 5' CCTGCGCCCAAGCTGCATCATCG 3'

[0126] PCR扩增得到819bp的目的条带即为检测阳性。实验设置未转基因的水稻Kitaake作为阴性对照,同时以pGPTV-SPAA质粒作为阳性对照。

[0127] 结果表明:得到的24株T<sub>0</sub>代转基因植株均为阳性植株(图2)。图中M为DNA分子量标准,+为阳性对照,NT为阴性对照,Q1~Q24分别为24株T<sub>0</sub>代转基因植株。

[0128] 2、T<sub>2</sub>代转pGPTV-SPAA水稻植株的Southern杂交检测

[0129] 24株T<sub>0</sub>代转基因植株自交繁殖得到T<sub>2</sub>代转基因植株。用CTAB法提取T<sub>2</sub>代转基因植株叶片的基因组DNA,然后向约25μg基因组DNA加入SacI充分酶切24h,将得到的酶切产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳分离后,转移到带正电核的尼龙膜(Amersham pharmacia公司)上。尼龙膜与探针的杂交和信号检测均参照罗氏II型高效地高辛DNA标记和检测试剂盒的说明书来操作(货号:11585614910)。将用Hpt1与Hpt2对潮霉素基因进行PCR扩增得到潮霉素基因片段作为杂交探针,引物序列如下:

[0130] Hpt1:5' -GCAAGGAATCGGT-CAATACA-3'

[0131] Hpt2:5' -TTCTACACAGCCATCGGTC-3'

[0132] Southern杂交结果显示,8个转基因株系中都能检测出潮霉素基因的杂交条带,并且在不同的株系中,杂交条带的数目和出现的位置不完全相同,这表明SPAA基因已经成功整合到水稻基因组中,并且各个转基因株系间是相互独立的转化个体(图3)。图中,kita为水稻ktia-ake,作为非转基因植株对照,Q1~Q8为T<sub>0</sub>代转基因植株中编号为Q1~Q8的T<sub>2</sub>代植株。

[0133] 3、T<sub>2</sub>代转pGPTV-SPAA水稻种子的Northern杂交检测

[0134] 用TRIpure试剂(百泰克公司)提取开花后10天的转基因水稻种子总RNA,将约25μg总RNA经0.8%琼脂糖凝胶电泳分离后,用20×SSC将RNA转移到带正电核的尼龙膜(Amersham pharmacia公司)上。转移后的膜与探针的杂交和信号检测均参照罗氏II型高效地高辛DNA标记和检测试剂盒的说明书来操作(货号:11585614910)。用SPAA基因全长核苷酸序列作为杂交探针。

[0135] Northern杂交结果显示,在转pGPTV-SPAA水稻种子中,与非转基因对照植株(水稻ktia-ake)相比,SPAA基因在转录水平有不同程度的表达(图4)。图中,kita为非转基因植株对照,Q2、Q3、Q6、Q8为分别为T<sub>0</sub>代转基因植株中编号为Q2、Q3、Q6、Q8的T<sub>2</sub>代植株。这表明在转基因植株中,GluC启动子和GluB5基因终止子可以在转录水平上有效、特异地驱动和调控SPAA基因在种子胚乳的表达。

[0136] 4、T<sub>2</sub>代转pGPTV-SPAA水稻种子的Western杂交检测

[0137] 从T<sub>2</sub>代转pGPTV-SPAA水稻的成熟种子中提取总蛋白,种子充分研磨后,加入抽提缓冲液(配方:0.125M Tris-HCl,4M urea,4%SDS和2%β-mercaptoethanol,pH 6.8),振荡过夜,12000g离心5min,收集上清,经过13.6%SDS-PAGE胶电泳后,用半干法将蛋白转移到PVDF膜上(Millipore公司)。膜依次进行封闭、漂洗、一抗、漂洗、二抗、漂洗、ECL超敏发光液反应(Amersham Biosciences公司)、压片、显影、定影、扫描,以非转基因植株水稻Kitaake为对照。

[0138] 所用一抗的制备方法如下:利用DNAMAN软件分析SPAA氨基酸序列的抗原性和疏水性,选取序列表中的序列3作为抗原序列。将这段序列相应的核苷酸序列(序列表中序列2),利用酶切位点EcoRI和XhoI,构建在原核表达载体pET-32a上,表达出的GluA2-2SPAA融合His标签的融合蛋白,利用镍柱对表达出的融合蛋白进行纯化,免疫鸡,得到免疫血清作为一抗用于Western杂交。

[0139] Western杂交结果显示,与非转基因植株对照相比,转基因株系中SPAA蛋白有不同程度的表达(图5)。图中,kita为非转基因植株对照,Q1~Q8为T<sub>0</sub>代转基因植株中编号为Q1~Q8的T<sub>2</sub>代植株。

[0140] 四、T<sub>4</sub>代转pGPTV-SPAA水稻种子喂食SHR降血压检测

[0141] 1、定量检测SPAA在转pGPTV-SPAA水稻中的积累

[0142] 选取四个T<sub>4</sub>代转pGPTV-SPAA水稻种子株系Q2、Q3、Q6和Q8的种子,分别提取水稻种子全蛋白,按照步骤三的方法进行Western杂交分析。四个株系的蛋白上样量均为80μg,蛋白定量使用GE Healthcare蛋白定量试剂盒(货号:80-6483-56),具体操作见说明书。同时取0ng,25ng,50ng,75ng,100ng原核表达的SPAA蛋白作为标准,利用在线软件NIH ImageJ (National Institutes of Health, ver.1.41, <http://www.nih.gov/>)测定其光密度值,绘制标准曲线。最终计算出Q2, Q3, Q6, Q8四个株系中SPAA的含量(图6)。

[0143] 其中,原核表达的SPAA蛋白的制备方法如下:将序列表中序列2所示的DNA分子利用酶切位点EcoRI和XhoI,构建在原核表达载体pET-32a上然后导入大肠杆菌中进行蛋白的表达,表达出的GluA2-2SPAA融合His标签的融合蛋白,利用镍柱对表达出的融合蛋白进行纯化。

[0144] 结果显示,在四个纯合的转基因株系Q2, Q3, Q6, Q8中SPAA蛋白稳定表达,每80μg种子全蛋白中SPAA蛋白的含量分别为27ng, 23ng, 30ng, 38ng。因为1g水稻种子大约可以提取160mg的全蛋白,据此可以推算出在表达量最高的株系Q8中,1g水稻种子中最多可积累76μg的SPAA蛋白。

[0145] 2、水稻种子蛋白粉制备:

[0146] 将T<sub>4</sub>代转pGPTV-SPAA水稻种子株系Q8、水稻kitaake、空载体对照水稻的种子按照下述方法提取蛋白质,分别得到转基因水稻种子蛋白粉、普通水稻种子蛋白粉和空载对照水稻种子蛋白粉:

[0147] 充分研磨水稻种子,加入抽提缓冲液(配方:0.125M Tris-HCl, 4M urea, 4% SDS and 2%β-mercaptoethanol, pH 6.8),振荡过夜,12000g离心10min,收集上清,加入预冷的6倍体积的丙酮,颠倒混匀,-20℃放置1h,4000g离心10min,收集沉淀,氮吹仪吹干,充分去除丙酮,利用研磨仪将蛋白研磨成粉状,即得到水稻种子蛋白粉,备用。

[0148] 3、转pGPTV-SPAA水稻种子蛋白对大鼠血压的影响

[0149] 选取雄性的18周龄的自发性高血压大鼠(SHR,北京维通利华实验动物技术有限公司)作为实验动物模型,雄性的18周龄的SPF级WKY大鼠(自北京维通利华实验动物技术有限公司)作为实验对照。将WKY大鼠随机分组,每组6~7只;SHR大鼠随机分组,每组6~7只。采用口服给药方式,短期喂食水稻种子蛋白粉,水稻种子蛋白粉利用生理盐水溶解,每只大鼠的灌胃蛋白粉量和溶液体积均相等,记录喂食前和喂食后2h, 4h, 6h, 8h后的血压变化。计算每只大鼠不同时间点的平均收缩压后,再计算每组大鼠不同时间点平均收缩压。数据以Mean±SEM表示,使用Two-way ANOVA进行数据分析,以P值小于0.05表示有显著性差异。使用小动物无创血压分析系统(BP-2000, Visitech Systems, 美国)检测各组大鼠动脉收缩压。测量时,将大鼠置于固定器中,设置热板温度为39℃,静置10min后,测量血压15次,计算每只大鼠所有有效收缩压的平均值作为该大鼠该次测量结果。

[0150] 检测WKY和SHR大鼠对照组(W-C组和S-C组)大鼠在灌胃生理盐水后0h、2h、4h、6h和8h的收缩压,结果如图7显示,WKY-C组大鼠各时间点平均收缩压约为150mmHg,SHR大鼠平均收缩压为200mmHg,均具有显著性差异(P<0.0001),说明SHR大鼠已发展为高血压阶段,可作为高血压模型进行后续实验。

[0151] 灌胃转基因水稻种子蛋白粉(灌胃量满足SPAA的灌胃量为200 $\mu$ g/kg体重)的WKY大鼠(W-200T组)与灌胃等量普通水稻种子蛋白粉/kg体重的WKY大鼠(W-200V组)相比,其收缩压在灌胃0h、2h、4h、6h和8h后,均无明显差异(图8),说明转基因水稻种子蛋白粉对WKY大鼠收缩压没有影响。

[0152] 灌胃转基因水稻种子蛋白粉(灌胃量满足SPAA的灌胃量为50 $\mu$ g/kg体重)的SHR大鼠(S-50T组),其收缩压在灌胃2h后出现降低,在灌胃8h后达到最低值,其收缩压明显低于灌胃生理盐水组(S-C组)的SHR大鼠( $P < 0.001$ ),最大降低值约为49.6mmHg(图9)。灌胃等量普通水稻种子蛋白粉/kg体重的SHR大鼠(S-50V组),在灌胃0h、2h、4h、6h和8h后对SHR大鼠的动脉收缩压均无影响。

[0153] 灌胃转基因水稻种子蛋白粉(灌胃量满足SPAA的灌胃量为100 $\mu$ g/kg体重)的SHR大鼠(S-100T组),其收缩压在灌胃后2h即出现明显降低(与S-C组相比,显著性分析 $P < 0.05$ ),但在灌胃后4h即出现暂时回升;而在灌胃后6h,其收缩压持续降低(与S-C组相比,显著性分析 $P < 0.01$ ;与S-100V组相比,显著性分析 $P < 0.05$ ),并一直持续至灌胃后8h(与S-C组相比,显著性分析 $P < 0.01$ )(图10)。灌胃等量普通水稻种子蛋白粉/kg体重的SHR大鼠(S-100V组),在灌胃0h、2h、4h、6h和8h后对SHR大鼠的动脉收缩压均无影响。

[0154] 灌胃转基因水稻种子蛋白粉(灌胃量满足SPAA的灌胃量为200 $\mu$ g/kg体重)的SHR大鼠(S-200T组),其收缩压在灌胃后4h出现明显降低( $P < 0.05$ ),并一直持续至灌胃后8h,达到最低值(与S-C组相比,显著性分析 $P < 0.001$ ;与S-200V组相比,显著性分析 $P < 0.001$ )(图11)。灌胃等量普通水稻种子蛋白粉/kg体重的SHR大鼠(S-200V组),在灌胃0h、2h、4h、6h和8h后对SHR大鼠的动脉收缩压均无影响。

[0155] 分别将等量的空载对照水稻种子蛋白粉灌胃WKY大鼠和SHR大鼠,发现,与灌胃普通水稻种子蛋白粉的WKY大鼠和SHR大鼠相比,收缩压均无显著变化。另灌胃等体积生理盐水的WKY大鼠和SHR大鼠与灌胃普通蛋白粉的WKY大鼠和SHR大鼠相比,收缩压也均无显著变化。

[0156] 上述结果表明,转基因水稻种子蛋白粉对普通大鼠的收缩压无影响,但可以降低高血压大鼠的收缩压,也即转SPAA水稻具有降血压功能。

[0157] 4、转pGPTV-SPAA水稻种子干粉对大鼠血压的影响

[0158] 选取雄性的19周龄的自发性高血压大鼠(SHR)作为实验动物模型,雄性的19周龄SPF级WKY大鼠作为实验对照。将WKY大鼠随机分组,每组6~7只;SHR大鼠随机分组,每组6~7只。大鼠每周称量体重一次。长效实验前一周,每只大鼠每天以3ml生理盐水(NS)灌胃一次。长效实验期间,大鼠根据其前一周体重,溶解所需量步骤2的转基因大米粉于3ml生理盐水中,每天灌胃一次,持续5周。灌胃5周后,大鼠再正常饲养二周。使用小动物无创血压分析系统(BP-2000,Visitech Systems,美国)检测各组大鼠动脉收缩压。测量时,将大鼠置于固定器中,设置热板温度为39 $^{\circ}$ C,静置10min后,测量血压15次,计算每只大鼠所有有效收缩压的平均值作为该大鼠该次测量结果。每周四和周五检测所有大鼠平均收缩压一次,以短效实验0h血压值作为血压0点,计算每组大鼠收缩压与血压0点的差值( $\Delta P$ ),并以此差值为纵轴、时间为横轴作图。数据以Mean $\pm$ SEM表示,使用Two-way ANOVA进行数据分析,以P值小于0.05表示有显著性差异。

[0159] 每周测量WKY大鼠平均动脉收缩压一次,以短效实验0h血压值为基准,计算血压差

值( $\Delta P$ )。如图12所示,连续灌胃转基因大米粉(灌胃量满足SPAA的灌胃量为 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)的WKY大鼠(W-200T组)对WKY大鼠动脉收缩压并无影响,与灌胃等量普通大米粉WKY大鼠组(W-200V组)相比,无显著差异;灌胃等量对照大米粉与普通大米粉的WKY大鼠收缩压无显著差异。灌胃转基因大米粉(灌胃量满足SPAA的灌胃量为 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)的SHR大鼠(S-50T组),其收缩压在灌胃后2周出现明显降低( $P<0.05$ ),在灌胃后5周时,其收缩压达到最低,与灌胃等量普通大米粉SHR大鼠组(S-50V组)相比,具有显著差异(图13);灌胃等量对照大米粉与普通大米粉以及等量生理盐水的SHR大鼠收缩压无显著差异。表明,转基因大米粉可以降低高血压大鼠的收缩压,也即转pGPTV-SPAA水稻具有降血压功能。

[0160] 其中,将水稻kitaake种子去壳后得到的大米磨成粉即为普通大米粉;将T<sub>4</sub>代转pGPTV-SPAA水稻种子株系Q8的种子去壳后得到的大米磨成粉即为转基因大米粉;将空载体对照水稻种子去壳后得到的大米磨成粉即为对照大米粉。

- [0001] <110> 中国科学院植物研究所
- [0002] <120> 降血压水稻材料的制备方法及其所用基因与蛋白质
- [0003] <160> 5
- [0004] <170> PatentIn version 3.5
- [0005] <210> 1
- [0006] <211> 85
- [0007] <212> PRT
- [0008] <213> 人工序列
- [0009] <220>
- [0010] <223>
- [0011] <400> 1
- [0012] Gln Arg Asp Lys Ile His Pro Phe Gln Arg Tyr Gln Gln Pro Val Leu
- [0013] 1 5 10 15
- [0014] Gln Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly Lys Ile Pro
- [0015] 20 25 30
- [0016] Pro Lys Val Leu Pro Val Pro Glu Gln Arg Leu Lys Pro Asn Met Gln
- [0017] 35 40 45
- [0018] Arg Tyr Leu Ala His Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg Gln Arg Val
- [0019] 50 55 60
- [0020] Pro Pro Gln Arg Pro Leu Lys Pro Trp Gln Arg Ser Lys Val Tyr Pro
- [0021] 65 70 75 80
- [0022] Phe Pro Gly Pro Ile
- [0023] 85
- [0024] <210> 2
- [0025] <211> 615
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> 人工序列
- [0028] <220>
- [0029] <223>
- [0030] <400> 2
- [0031] atggcatcca taaatcgccc catagttttc ttcacagttt gcttgttcct cttgtgcat 60
- [0032] ggctccctag ccgtatatat catccaaggg agaggtataa cagggaacg tgataagatt 120
- [0033] catccttcc agcgttacca gcaaccagtt ctacagagat tcttcgttgc cccatttcca 180
- [0034] gaagtctttg gaaagattcc acctaaggtt ctcccagtac ccgagcagag gcttaagcca 240
- [0035] aatatgcaac gttatcttgc acataaggcc ttgccaatgc acatccggca aagggttccc 300
- [0036] cctcaacgtc cacttaagcc ttggcagcgt agtaaggctt acccatttcc gggttccaatc 360
- [0037] caacgtgata agattcatcc cttccagcgt taccagcaac cagttctaca gagattcttc 420
- [0038] gttgccccat ttccagaagt ctttgaaag attccaccta aggttctccc agtaccgag 480
- [0039] cagaggctta agccaaatat gcaacgttat cttgcacata aggccttgc aatgcacatc 540
- [0040] cggcaaaggg ttccccctca acgtccactt aagccttggc agcgtagtaa ggtctacca 600
- [0041] tttccgggtc caatc 615

[0042] <210> 3  
 [0043] <211> 205  
 [0044] <212> PRT  
 [0045] <213> 人工序列  
 [0046] <220>  
 [0047] <223>  
 [0048] <400> 3  
 [0049] Met Ala Ser Ile Asn Arg Pro Ile Val Phe Phe Thr Val Cys Leu Phe  
 [0050] 1 5 10 15  
 [0051] Leu Leu Cys Asp Gly Ser Leu Ala Val Tyr Ile Ile Gln Gly Arg Gly  
 [0052] 20 25 30  
 [0053] Ile Thr Gly Gln Arg Asp Lys Ile His Pro Phe Gln Arg Tyr Gln Gln  
 [0054] 35 40 45  
 [0055] Pro Val Leu Gln Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe Pro Glu Val Phe Gly  
 [0056] 50 55 60  
 [0057] Lys Ile Pro Pro Lys Val Leu Pro Val Pro Glu Gln Arg Leu Lys Pro  
 [0058] 65 70 75 80  
 [0059] Asn Met Gln Arg Tyr Leu Ala His Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg  
 [0060] 85 90 95  
 [0061] Gln Arg Val Pro Pro Gln Arg Pro Leu Lys Pro Trp Gln Arg Ser Lys  
 [0062] 100 105 110  
 [0063] Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile Gln Arg Asp Lys Ile His Pro Phe  
 [0064] 115 120 125  
 [0065] Gln Arg Tyr Gln Gln Pro Val Leu Gln Arg Phe Phe Val Ala Pro Phe  
 [0066] 130 135 140  
 [0067] Pro Glu Val Phe Gly Lys Ile Pro Pro Lys Val Leu Pro Val Pro Glu  
 [0068] 145 150 155 160  
 [0069] Gln Arg Leu Lys Pro Asn Met Gln Arg Tyr Leu Ala His Lys Ala Leu  
 [0070] 165 170 175  
 [0071] Pro Met His Ile Arg Gln Arg Val Pro Pro Gln Arg Pro Leu Lys Pro  
 [0072] 180 185 190  
 [0073] Trp Gln Arg Ser Lys Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile  
 [0074] 195 200 205  
 [0075] <210> 4  
 [0076] <211> 2331  
 [0077] <212> DNA  
 [0078] <213> 水稻(*Oryza sativa* L.)  
 [0079] <400> 4  
 [0080] gttcaagatt ttttttgggt atttaattta cttgcttaag tcagatatat tcccatcgtt 60  
 [0081] gcaggtttgt cacttagtat tattattaag cgctctagca ctaggactct ggataaataa 120  
 [0082] gaaagtttat tcacgaggct agagtagtaa tcaataacat aagcgtggtg tctaggtcag 180  
 [0083] cggttatctt catatgtagt gtgctccatg gaaagtgagg taggaggaag gtggtgacag 240

[0084] tcccgtccgt cctttgtatc cctccatggt cgggtatata atagagctac aggctagact 300  
 [0085] tagcttggca gactagggga gagccgggtc tcgaagcaat ccatgaggct ttacatttaa 360  
 [0086] cataagttag taaattaacc cataggaatc atctctagac tgaacctacc agtagttgtg 420  
 [0087] cttggatata attatattcc tacatataca tacacgttcc ctgctgattag atacccttgg 480  
 [0088] aatactctaa ggtgaagtgc tacagcggta tccgtgcgct tgcggattta tctgtgaccg 540  
 [0089] tatcaaatac caacaggtag atacaaggaa tcatctctcc tatccattgg tttatcatct 600  
 [0090] tttaaaatta tctcttgcgc tectattgcc tctgcaactg cggatagggt tttctcaaca 660  
 [0091] atgaaggttg tgaagaatgc tttgtgcaac aagatggatg acaagtatct cagccatagc 720  
 [0092] ctcatattgct ttgtagaaaa ggatatgtcg gacacaatca ctaagtatca cctggaag 780  
 [0093] gatgcaactgt atgccctatc tatatttacc atttagtaat atttatatgg cttgtgctaa 840  
 [0094] ctttatgttg tctttacagg caataacatt atttggaagg catatctata tattactatt 900  
 [0095] taagataatg taatatctca aagttttat aagctgcaat gaggtgagtt tcaacttagct 960  
 [0096] ttctaacttg ttatgagtta tagatgcatg ccaccagtca ttttttatct tgcactagcc 1020  
 [0097] cctgcctggt agaatatggt tctttgtctg ggagtccatg tcaactagcc aatttccaaa 1080  
 [0098] tatatgaaca aaactatgtg gcctttgtaa cccaatgag ataaagacta ctctccatag 1140  
 [0099] aaatttagca aacatggcac tcaaagaaaa tgtgttgat agtttcatca tgcatacaaa 1200  
 [0100] agcaacactt ttgaactacc attccaaatc ctttttgtaa attatctttg cttaacacta 1260  
 [0101] cccctttgag caaatgtggc tttgtgcgga aaaaactcaa acttggtagg gtagacatcc 1320  
 [0102] atttatataa ttggatccat gtacataagt tgttgagtac ttcaagtact tacccttgtg 1380  
 [0103] atatacatct caaataatatt gaagaagaga agttctttt ttgagagagg ttgaagaaga 1440  
 [0104] gaagttgtc catagctgaa gaggagttt atagtgtcta gcttaccttg ctgctgattg 1500  
 [0105] catgtctaaa atgtcgttta atttgggcta taatgaaata ttcaccaata tttctgctgg 1560  
 [0106] tctattaaag ttaatatggt actcgtact catttatctt gggctataat ttaatatca 1620  
 [0107] cctatgtttt tgttagtcta ttttatttcc ctagtgtgca ctacttaac cccaaattag 1680  
 [0108] ttttgaacac ttaacctaaa tgtgtctatt atggctagac actctctcac ggcactctaa 1740  
 [0109] caaaaagtga atttgtgtgt tatgtttttg tcatgatctc acaagcaatg tacatgtacg 1800  
 [0110] tttctagagt gcaatcttat gctagcctga ttgtgaattt agtgtagttt gttttctctt 1860  
 [0111] tttgtagcta cactaccaat aacctattgt cctctagtca taccacgtaa tcacaaggca 1920  
 [0112] aatccctaac tctcaccttt aaaagcatgt ctttatcttc ttgggtggca ctaatacaaa 1980  
 [0113] atcttttca gcattcctat gtgcgatagc aagaaaacat ggcataactc ttgcttcaact 2040  
 [0114] ctaacaaaaa aaacactttt ccaactttaa aacaatgta tctatgtgtt taatgatcaa 2100  
 [0115] tcaagcatat aatgacttac aagtttttac ctatgccctt tttgcatcat cttgtttgca 2160  
 [0116] acagacaaac tagatattcc tttaggctat aaacacatca gcatgataaa gagattaggt 2220  
 [0117] aagtttgta tccctttttg catatattct cgtctactcc gtgtatataa gccctctcc 2280  
 [0118] tccaactcgt ccatccatca ccaagagcag tgggaaacta agtgaataac t 2331  
 [0119] <210> 5  
 [0120] <211> 497  
 [0121] <212> DNA  
 [0122] <213> 水稻(Oryza sativa L.)  
 [0123] <400> 5  
 [0124] acccaaggca ttatatacta aaaaataaag ccacatgcat aaagctttgt ggagttttgt 60  
 [0125] atttgtcgt atgtgtaagt taaataaaaa aagaattgcc ttcatttaac cgattttgtc 120

---

[0126]	acttactccc tttatataccc atcttatnttt tttcttttagt aaattaaatt actcttgccct	180
[0127]	ctctaaggcg cctttgnttt tagcaaaaat caacatttaa aaattgacta ctaatttaac	240
[0128]	taaaatata atgtgttacg tgttatatac tctcatacat gtacctata ttcgtgnttt	300
[0129]	aaagtaattt tatatgatac taattaagtg gttattgaca acatattaac aaaaggtaa	360
[0130]	tgataaaaag atagtgtcgg agactatgac aaaaagtaa aattgcctta tattgtattt	420
[0131]	tagaacggaa aagacgtaat ttgcatactt gcgttccatc actgcctcac ggcaaacagt	480
[0132]	gtcgtggcac caagttt	497



图1

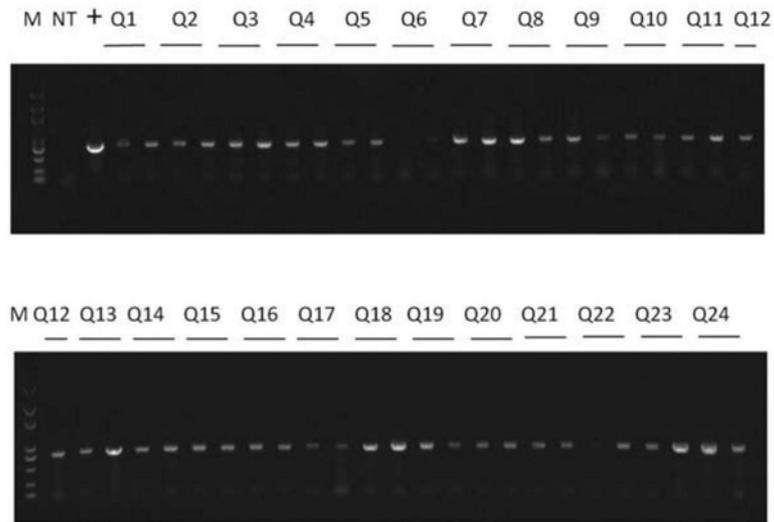


图2

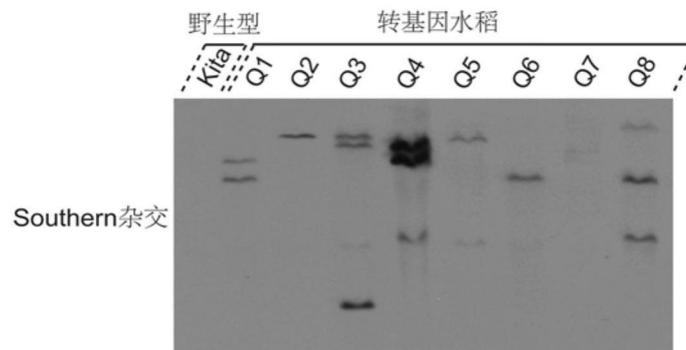


图3

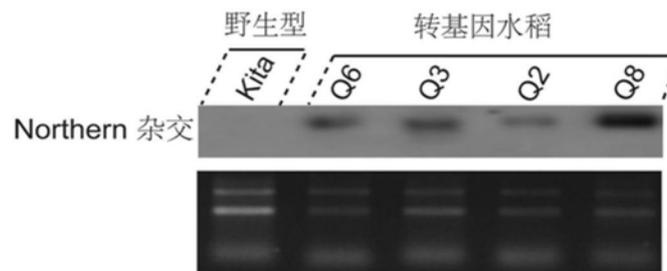


图4

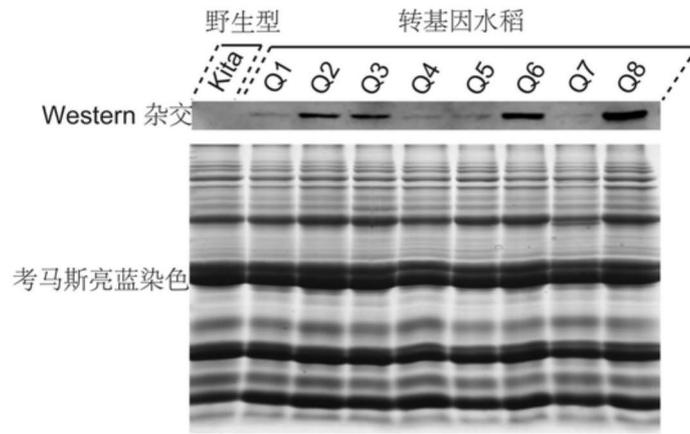


图5

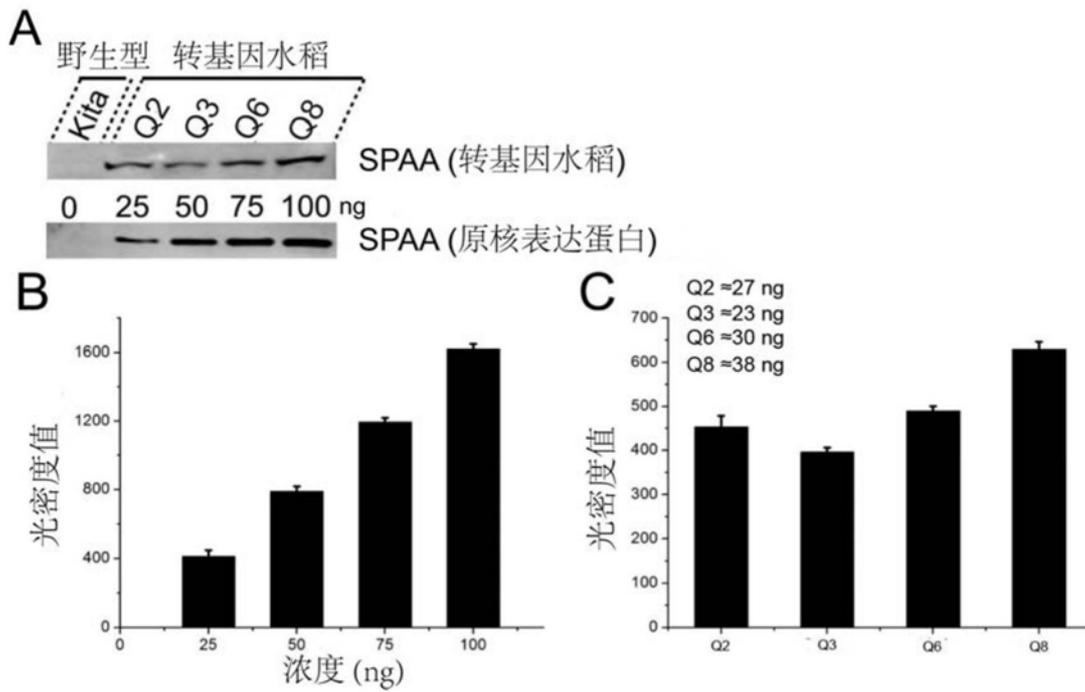


图6

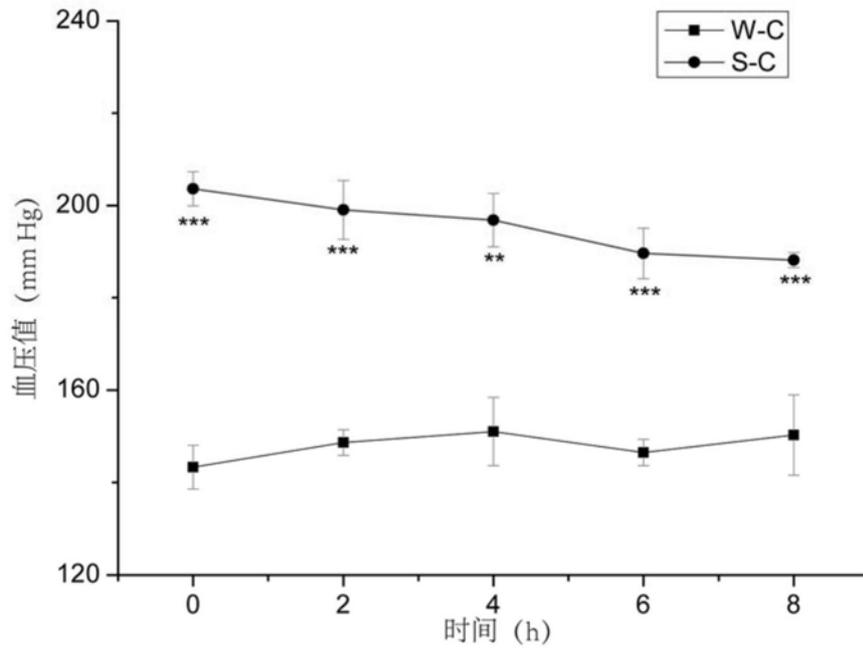


图7

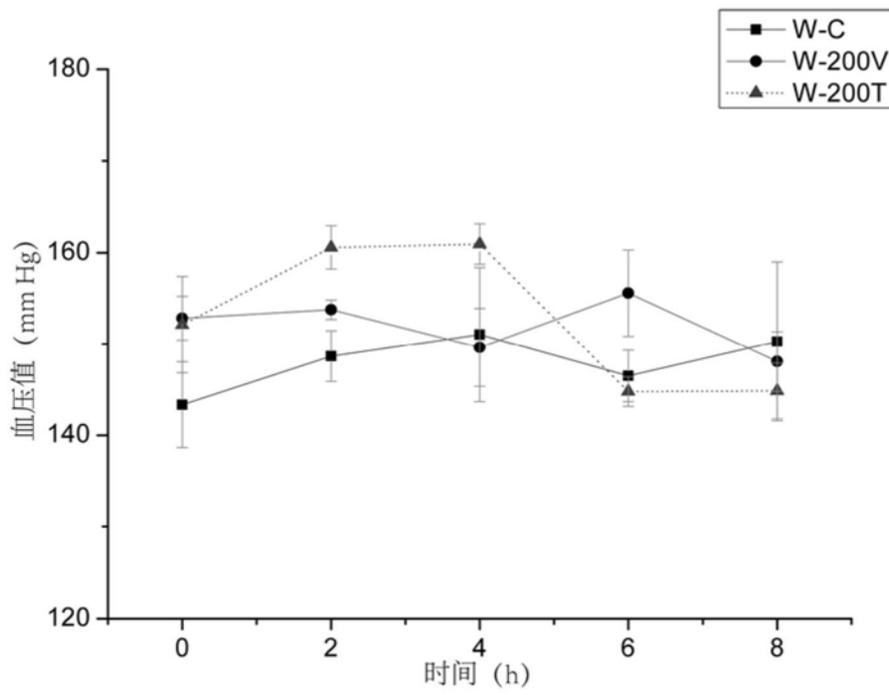


图8

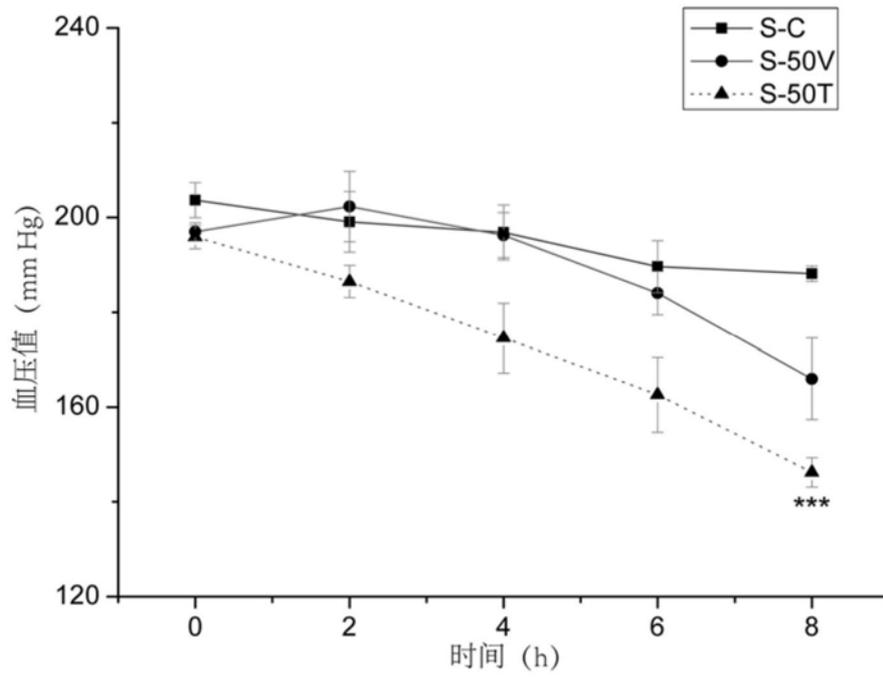


图9

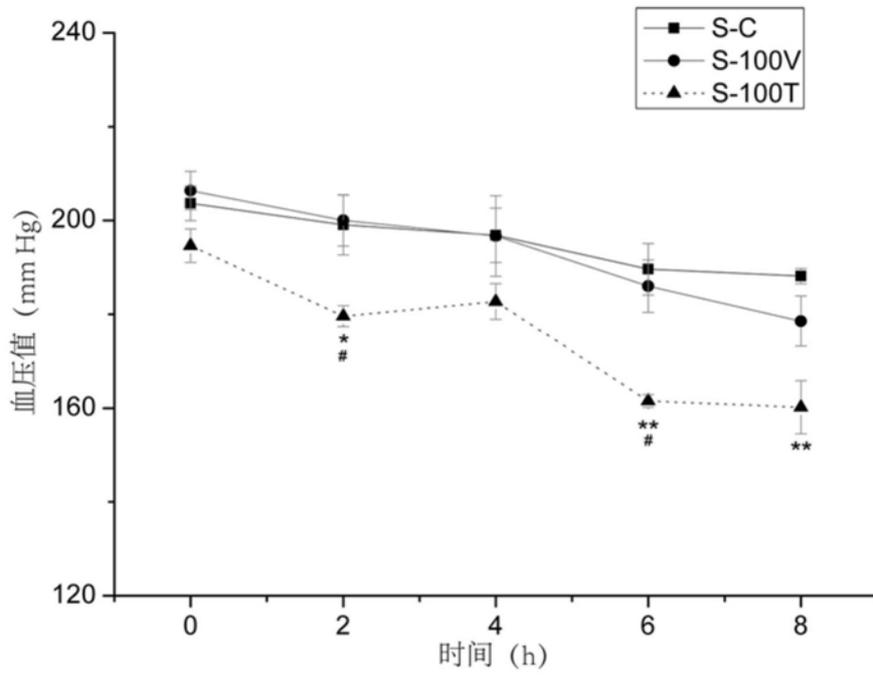


图10

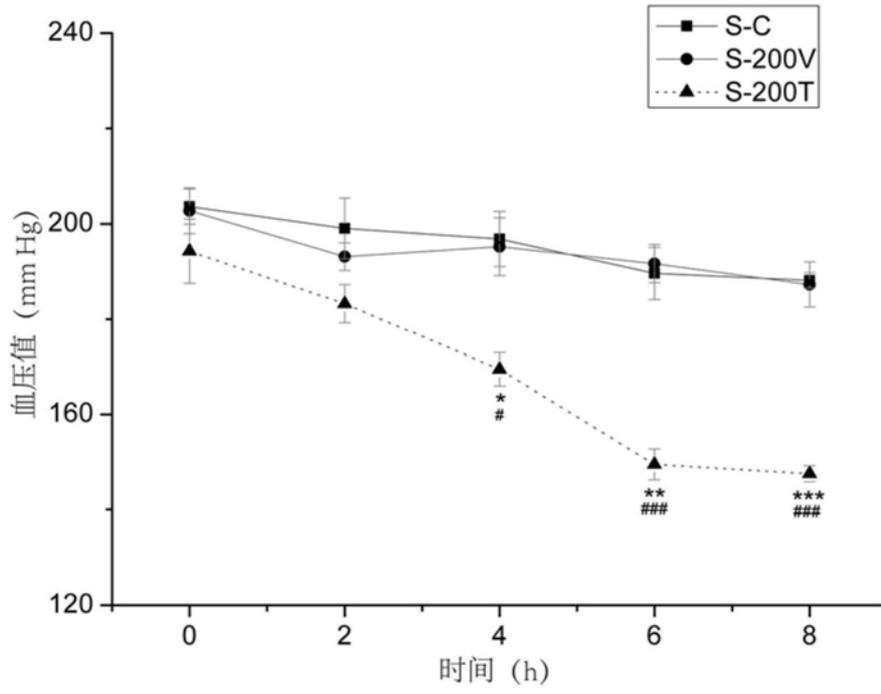


图11

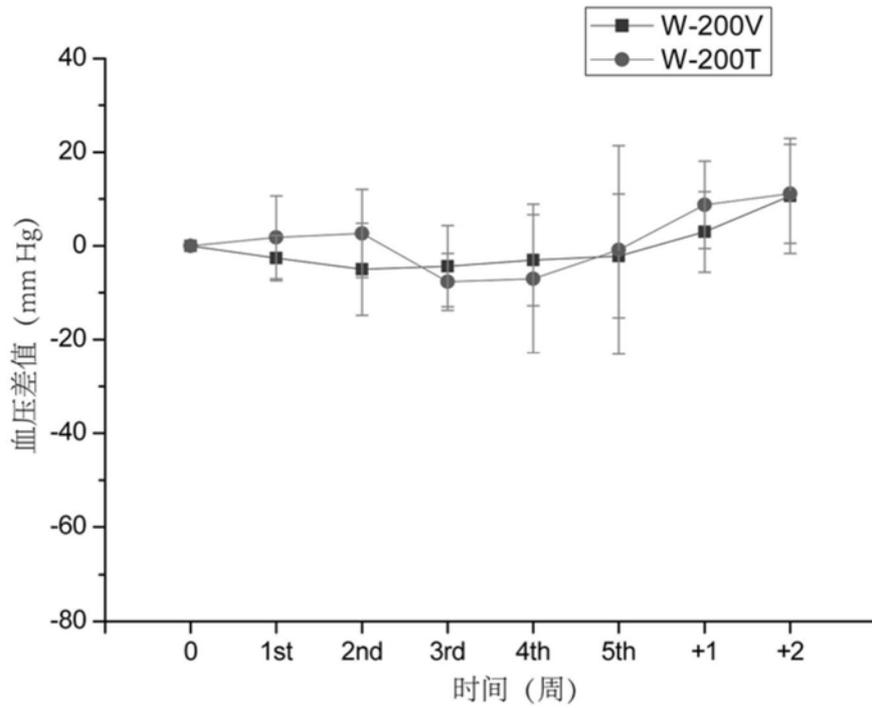


图12

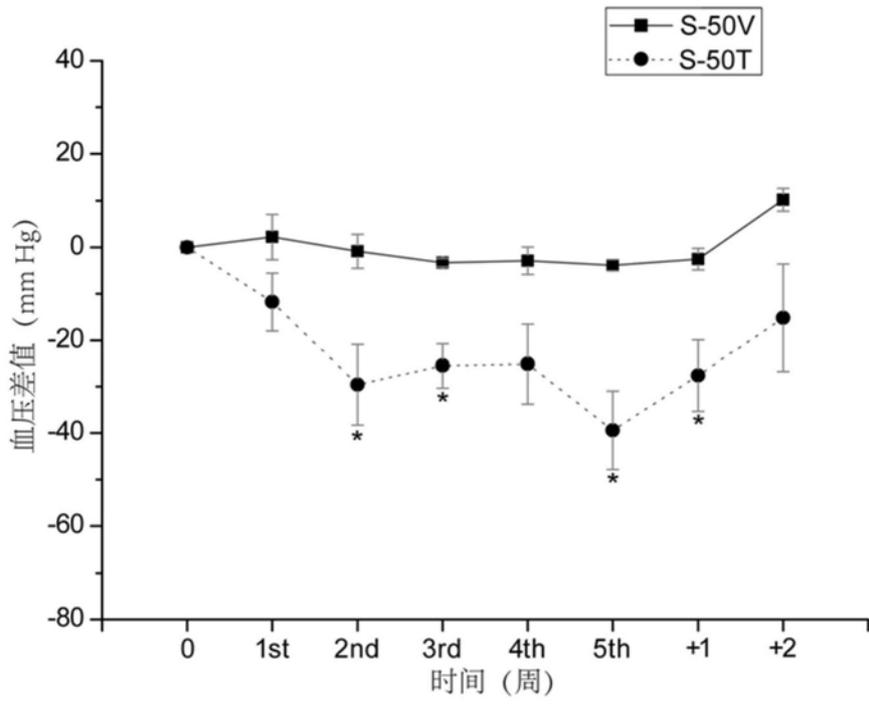


图13