

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580048513.9

[51] Int. Cl.

A01H 5/10 (2006.01)

A01H 5/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101384167A

[22] 申请日 2005.12.19

[21] 申请号 200580048513.9

[30] 优先权

[32] 2004.12.21 [33] US [31] 60/638,099

[86] 国际申请 PCT/US2005/046013 2005.12.19

[87] 国际公布 WO2006/069017 英 2006.6.29

[85] 进入国家阶段日期 2007.8.21

[71] 申请人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 A·伦德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘健 刘玥

权利要求书4页 说明书37页 序列表42页

[54] 发明名称

具有改良农业性状的转基因植物

[57] 摘要

本公开描述了一种从用重组DNA转化以表达具有同源结构域蛋白的植物细胞中筛选出一定数量转基因植物的方法,以鉴定已转入用于表达改良性状的特定基因的转基因农业植物。这些性状包括增加氮的利用率、提高产量、增加水的利用率、增强对冷负荷的耐受力 and/或改良种子成分。同时也公开了转基因种子,这些种子能生长成为在基因组中带有重组DNA并表现出所筛选的增强性状的转基因植物。还公开了基于转基因事件的产生种子和植物的方法。

1. 一种具有稳定整合的重组 DNA 的植物细胞，该重组 DNA 包括一个在植物细胞中有功能的启动子，该启动子可操纵地连接于编码蛋白的 DNA 上，被编码的蛋白在序列上具有的氨基酸结构域在与 Pfam 同源异型框蛋白结构域家族和 Pfam HALZ 蛋白结构域家族的氨基酸序列比对上超过了 Pfam 富集中止区；其中对于同源异型框蛋白结构域家族，Pfam 的富集中止区在 -4，对于 HALZ 蛋白结构域家族，Pfam 的富集中止区在 17；其中所述植物细胞是从带有所述重组 DNA 的植物细胞种群中筛选出来的，筛选的条件是所筛选的植物是从该种群中的植物细胞再生而来并表达能让该植物相对于没有该重组 DNA 的对照植物表现出改良性状的蛋白；并且其中所述改良性状选自提高的水利用率、增强的抗冻性、提高的产量、提高的氮利用率、改良的种子蛋白和改良的种子油脂。

2. 权利要求 1 的植物细胞，其中所述蛋白质具有一个与在共有氨基酸序列组中的共有氨基酸序列至少有 90% 的一致性的序列，该共有氨基酸序列组由通过 SEQ ID NO: 5 至 SEQ ID NO: 8 的比对所构建的共有氨基酸序列组成。

3. 权利要求 1 的植物细胞，其中所述蛋白质选自具有 SEQ ID NO: 5 至 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的蛋白。

4. 权利要求 1 的植物细胞，该细胞还包含一段 DNA，该 DNA 所表达的蛋白能够产生忍耐以对所述植物细胞的野生型致死水平施加的除草剂处理的耐受性。

5. 权利要求 4 的植物细胞，其中所述除草剂是草甘膦、麦草畏或草铵膦化合物。

6. 一种转基因植物，该植物包含多个权利要求 1 的植物细胞。

7. 权利要求 6 的转基因植物，该植物对于所述重组 DNA 是纯合子。

8. 一种转基因种子，该种子包含多个权利要求 1 的植物细胞。

9. 权利要求 8 的转基因种子，该种子来自于玉米、大豆、棉花、芸苔、苜蓿、小麦或水稻植物。

10. 权利要求 9 的非天然的转基因玉米种子，其中所述种子能产生可抵抗由 MaI de Rio Cuarto 病毒或玉米锈病(Puccinia sorghi)真菌两

者或两者之一引起的疾病的玉米植物。

11. 一种转基因花粉粒，该花粉粒包括由权利要求 1 的植物细胞所衍生出来的单倍体。

12. 一种用于产生由于稳定整合的重组 DNA 表达而具有改良性状的转基因植物作物的非天然的转基因种子的方法，该重组 DNA 包括一个启动子，该启动子 (a) 在植物细胞中有功能并且 (b) 可操纵地连接到编码蛋白的 DNA 上，其中被编码的蛋白在序列上具有的氨基酸结构域在与 Pfam 同源异型框蛋白结构域家族和 Pfam HALZ 蛋白结构域家族的氨基酸序列比对上超过了 Pfam 富集中止区；其中对于同源异型框蛋白结构域家族，Pfam 的富集中止区在 -4，对于 HALZ 蛋白结构域家族，Pfam 的富集中止区在 17；其中所述改良性状选自提高的水利用率、增强的抗冻性、提高的产量、提高的氮利用率、改良的种子蛋白和改良的种子油脂，所述用于制备所述种子的方法包括：

- (a) 针对所述改良性状和所述重组 DNA 筛选一个种群的植物，其中所述种群中，单个植物所表现出所述性状的水平低于、基本相当于或高于在没有表达该重组 DNA 的对照植物上所表现出来的所述性状的水平，
- (b) 从所述种群中选择一个或多个表现该性状的水平高于对照植物所表现该性状的水平水平的植物，
- (c) 验证所述重组 DNA 已经稳定地整合进了该选择的植物中，
- (d) 分析所选择的植物的组织以确定功能蛋白的产生，该功能蛋白由在序列上为 SEQ ID NO: 1-4 之一的核苷酸所编码；和
- (e) 收集所选择植物的种子。

13. 权利要求 12 的方法，其中所述种群中的植物还包含一段 DNA，该 DNA 所表达的蛋白能够产生忍耐以对野生型植物细胞致死水平施加的除草剂处理的耐受性，并且其中所述选择是通过用所述除草剂处理该种群而进行的。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述除草剂包括草甘膦、麦草畏或草铵膦化合物。

15. 权利要求 12 的方法，其中所述选择是通过鉴定具有所述改良

性状的植物而进行的。

16. 权利要求 12 的方法，其中所述种子是玉米、大豆、棉花、苜蓿、小麦或水稻种子。

17. 一种产生杂交玉米种子的方法，所述方法包括：

- (a) 从抗除草剂的玉米植物上获取杂交玉米种子，该玉米植物同时含有稳定整合的重组 DNA，此重组 DNA 包括了一个启动子，该启动子 (a) 在植物细胞中有功能并且 (b) 可操纵地连接到编码蛋白的 DNA 上，其中被编码的蛋白在序列上具有的氨基酸结构域在与 Pfam 同源异型框蛋白结构域家族和 Pfam HALZ 蛋白结构域家族的氨基酸序列比对上超过了 Pfam 富集中止区；其中对于同源异型框蛋白结构域家族，Pfam 的富集中止区在 -4，对于 HALZ 蛋白结构域家族，Pfam 的富集中止区在 17；
- (b) 从所述杂交玉米种子生产玉米植物，其中一部分从该杂交玉米种子产生的植物对所述重组 DNA 是纯合子，一部分从该杂交玉米种子产生的植物对所述重组 DNA 是半合子，还有一部分从该杂交玉米种子产生的植物不具有所述重组 DNA；
- (c) 使用除草剂处理以选择对所述重组 DNA 为纯合子和半合子的玉米植物；
- (d) 收集除草剂处理后存活的玉米植物的种子，并种植该种子产生下一子代的玉米植物；
- (e) 重复步骤 (c) 和 (d) 至少一次，以产生近交玉米系；
- (f) 将所述近交系玉米与另一系玉米杂交以产生杂交种子。

18. 选择包括权利要求 1 的细胞的植物的方法，其中使用免疫反应性抗体来检测种子或植物组织中所述蛋白的存在。

19. 用于反假冒的碎种子，其含有权利要求 1 的植物细胞作为原始标记。

20. 一种无需灌溉的种植玉米、棉花或大豆作物的方法，所述方法包括种植具有权利要求 1 的植物细胞的种子，该种子是针对提高的水利用率而被选择出来的。

21. 权利要求 20 的方法，包括在种植所述作物期间最多提供 300

毫米的地面水。

22. 一种无需施加氮肥的种植玉米、棉花或大豆作物的方法，所述方法包括种植具有权利要求 1 的植物细胞的种子，该种子是针对提高的氮利用率而被选择出来的。

具有改良农业性状的转基因植物

相关申请的相互参考

本申请要求 2004 年 12 月 21 日美国临时专利申请 60/638,099, 35USC§119 (e) 的优先权, 此处纳入本文作为参考。

包括序列表

在 CD-ROM 上有序列表和序列表的计算机可读格式 (CRF), 都带有创建于 2005 年 12 月 18 日、大小为 63KB (在 MS-WINDOWS 中测出) 并名为 “G1543C.ST25.txt” 的文本文件, 此处纳入本文作为参考。

包括电子序列表

在复制的 CD-ROM 上附加了一个电子列表, 包括了一个名为 “hmmer-2.3.2” 的文件夹和两个 _HMM 文件, 纳入本文作为参考。hmmer-2.3.2 文件夹包含了使用 HMMer 软件进行 Pfam 分析的源代码和其他相关文件。_HMM 文件包含了 Pfam 隐藏 Markov 模式。电子列表创建于 2005 年 12 月 18 日。

发明领域

此处公开的发明属于植物遗传学和发育生物学。更为具体地说, 发明能提供带有重组 DNA 的植物细胞以在转基因植物中产生改良性状, 这里植物包括了由这些植物而来的细胞、种子和花粉, 以及得到这些细胞、植物、种子和花粉的方法。特别是发明中的重组 DNA 表达的是具有同源异型结构域的转录因子。

发明背景

具有改良性状, 如高产、耐受环境压力、抗虫、抗除草剂、改良种子成分等等, 的转基因植物是农业工作者和消费者都渴望获得的。虽然在植物育种上付出的相当努力促使在获得期望性状的工作上取得重要的成就, 但是如果导入特异基因进植物基因组就能有更多的机会产生改良和/或稀有性状的植物。仅仅在植物基因组中导入重组 DNA 不一定总能获得改良农业性状的转基因植物。从众多转基因事件中筛选各个单独事件的方法是鉴定产生改良农业性状的转基因事件所必需的。

发明概述

本发明使用重组 DNA 来表达可使转基因植物表现改良农业性状的蛋白。本发明在构建体中提供重组 DNA，该重组 DNA 包括一个在植物细胞中有功能的启动子，该启动子可操纵地连接于编码蛋白的 DNA 上，被编码的蛋白在序列上具有的氨基酸结构域在与 Pfam 同源异型框蛋白结构域家族和 Pfam HALZ 蛋白结构域家族的氨基酸序列比对上超过了 Pfam 富集中止区。对于同源异型框蛋白结构域家族，Pfam 的富集中止区在-4，对于 HALZ 蛋白结构域家族，Pfam 的富集中止区在 17。本发明的另一方面特指含有本发明所述 DNA 的转基因植物细胞、具有多数这类细胞的转基因植物、能产生后代的转基因种子和从这些植物上得到的转基因花粉。这些植物细胞从由重组 DNA 转化的植物细胞培养出来的一定种群的转基因植物中筛选得到，并表达从这种改良性状种群的转基因植物与不含所述重组 DNA 的对照组的比较中筛选出来的蛋白。这里的改良性状是从改良性状组包括改良水份的利用效率、改良对寒冷的耐受性、提高产量、提高的氮利用率、改良种子蛋白质和改良种子油脂。

在本发明的另一个方面，植物细胞、植物、种子和花粉还含有能表达蛋白质的 DNA，该蛋白质提供暴露于对所述植物细胞野生型致死水平的除草剂的耐受性。这种耐受性不仅仅是作为一种优良的性状同时对本发明中的选择步骤也相当有用。在本发明的各个方面中，这样的除草剂是草甘膦、麦草畏或草铵膦化合物。

而本发明的另一些方面则提供了重组 DNA 的纯合子转基因植物和本发明从玉米、大豆、棉花、芸苔、苜蓿、小麦或水稻类植物中得到的转基因种子。在阿根廷，在对本发明各方面实践的其它重要实施方案中，重组 DNA 转导入来源于玉米株系的植物细胞中，使得这种细胞可以抵抗 MaI de Rio Cuarto 病毒和/或玉米锈病 (Puccinia sorghi) 真菌，或者能维持这种抗性。

本发明也提供生产非天然的转基因种子的方法，因为稳定整合的重组 DNA 能表达由 SEQ ID NO: 5-8 组中筛选出来的一种蛋白质，使该种子能生长出一批具有改良性状的转基因植物。更为具体地说，该方法包括了：(a) 筛选一个种群的具有一种改良性状和重组 DNA 的植物，这个种群中的单个植物个体能表现出该性状的程度不低于，基

本相当于或大于，未表达重组 DNA 的对照组所表现这种性状的程度，(b) 从这个种群中选出一个或多个能表达该性状程度高于对照组的植物个体，(c) 确认重组 DNA 稳定地整合于所述被选植物中，(d) 分析一株被选植物的组织来确定某种蛋白的产量，这种蛋白具有由核酸序列 SEQ ID NO: 1-4 编码的蛋白的功能，以及 (e) 收集被选植物的种子。对本发明的一个方面，种群中的植物还含有表达抗除草剂蛋白的 DNA，这种蛋白可以使植物耐受对野生型植物细胞致死剂量的除草剂，当用除草剂，如草甘膦、麦草畏或草铵膦类化合物处理种群时，可以有效地进行选择。另一个方面，还要鉴定植物的改良性状来对植物进行选择。这此方法对获得玉米、大豆、棉花、苜蓿、小麦或水稻种子都特别有用。再有，植物还含有表达第二种可以使植物细胞产生一种或多种改良农业性状的蛋白的 DNA。

本发明的另一个方面提供了一种生产杂合玉米种子的方法，包括从抗除草剂玉米植物中获得杂合玉米种子，该玉米植物含有稳定整合的重组 DNA，这种重组 DNA 包含有一个启动子：(a) 该启动子在植物中能发挥功能，(b) 可操纵地连接到编码从 SEQ ID NO: 5-8 组中筛选出的蛋白的 DNA 上；在这里，子代转基因植物是由所述细胞的一个拷贝再生出来的，相对于没有所述 DNA 结构的对照植物能表现出改良性状；这里所述细胞是从使用所述 DNA 结构转化的细胞种群中筛选出来，筛选条件是相对于所述对照植物该细胞种群中产生的子代植物具有改良性状，这里所述改良性状是从因为表达了所述蛋白而产生良好水利用率、良好耐冻性、高产、良好氮利用率、良好种子蛋白和脂类含量的性状的种群中筛选出来。这些方法还包括从所述杂合种子来生产玉米植物，在这里一部分由所述杂合玉米种子来源的植物是对所述重组 DNA 是纯合子，而一部分所述杂合玉米种子来源的植物则对所述重组 DNA 是半合子，以及还有一部分所述杂合玉米种子来源的植物是不含所述重组 DNA；使用除草剂来选择对所述重组 DNA 是纯合子和半合子的玉米植物；从除草剂处理后存活的玉米植物上收集种子，并将其栽培得到次子代玉米植物；重复筛选和收集步骤至少一次以得到近交系玉米；将近交系玉米与第二种玉米系进行杂交而得到杂合种子。

本发明的另一个方面提供了一种选择本发明中的植物包括植物细

胞的方法，即应用免疫反应性抗体来检测在种子和植物组织中是否有重组 DNA 表达的蛋白生成。另外，本发明还提供用于反假的碎种子，含有本发明的植物细胞作为原始标记。

本发明还有一些方面涉及具有优良水利用率或者氮利用率的转基因植物。比如，本发明提供了无需灌溉种植玉米、棉花或大豆作物的方法，包括种植含有本发明为改良水利用率选择出来的植物细胞的种子。可选择的方法包括减少灌溉水，例如在生物玉米作物时提供多至 300 毫米地面水。本发明也提供了不加氮肥种植玉米、棉花或大豆作物的方法，包括种植含有本发明为提高的氮利用率选择出来的植物细胞的种子。

发明详述

此处所用的“植物细胞”指一种由稳定整合的、非天然的、重组 DNA 转化的细胞，例如，由农杆菌介导或用重组 DNA 包裹的微粒轰击或其它方法造成的转化。本发明中的一个植物细胞能成为一个原始转化植物细胞，该细胞以微生物型式存在或作为能再生成为分化组织的子代植物细胞，如长成具有稳定整合、非天然的重组 DNA 的转基因植物，或由子代转基因植物产生的种子或花粉。

此处所用的“转基因植物”指基因组被稳定整合的重组 DNA 所改变的植物。一个转基因植物包括由原始转化植物细胞再生成的植物和从转化植物的后续繁殖或杂交获得的子代转基因植物。

此处所用的“重组 DNA”指在细胞外用遗传学设计构建的 DNA，包括含有自然存在的 DNA 或 cDNA 或合成 DNA。

此处所用的“共有序列”指一段在同源蛋白氨基酸序列线性保守区上的人工氨基酸序列，比如，像同源蛋白氨基酸序列的 CLUSTALW 线性区所确定的序列。

此处所用的“同源体”指在具有相同生物功能的蛋白组群中的一个蛋白，比如属于同一个 Pfam 蛋白家族并在本发明的转基因植物中造成相同的改良性状的蛋白。同源体是由同源基因表达产生。同源基因包括自然存在的等位基因和人造的变体。遗传密码的简并性使得替换基因的蛋白编码序列中的至少一个碱基时可能不会造成由该基因所产生的多肽的氨基酸序列改变。因此，一个本发明中有用的多聚核苷酸可能具有由 SEQ ID NO: 1 到 SEQ ID NO: 4 替换简并遗传密码产

生的任何碱基序列。同源体指在与某个鉴定为在植物细胞中表达时与表现改良性状有关的蛋白进行全长优化比对时，具有至少 60%的一致性，较优选的为 70%或者更高，更优选的为至少 80%甚至至少 90%的一致性的蛋白。同源体包括具有与其中公开的蛋白质和同源体的共有氨基酸序列有至少 90%以上一致性的氨基酸序列的蛋白。

同源体通过比对氨基酸序列进行鉴定，比如手工或利用基于计算机的工具通过著名的基于同源性的搜索算法进行比对，如著名和常用的 BLAST、FASTA 和 Smith- Waterman。一个本地的序列比对程序，如 BLAST，能用于搜索序列数据库来找到相似的序列，并用简略期望值（E 值）来测量碱基序列的相似性。对于特定生物来说，作为具有最佳 E 值的蛋白命中可能不必要是一个 ortholog 或只是 ortholog，在本发明中应用反查（reciprocal query）来过滤对 ortholog 鉴定有显著 E 值命中序列。反查法要求对与被查询的蛋白序列相似的基本生物氨基酸序列数据库搜索显著的命中。当反查的最佳命中就是被查询蛋白本身或是由物种形成后的复制基因编码的蛋白时，一个命中就是一个可能的 ortholog。本发明的另一个方面包含了有功能的同源蛋白，作为对保守氨基酸的替换，这些同源蛋白与公开的蛋白相比可能有一个或多个氨基酸的不同，比如以下类型之间的替换：酸性（带负电）氨基酸如天门冬氨酸和谷氨酸；碱性（带正电）氨基酸如精氨酸、组氨酸和赖氨酸；中性极性氨基酸如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺；中性非极性（疏水性）氨基酸如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸；具有脂肪族侧链的氨基酸如甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸；具有脂肪族羟基侧链的氨基酸如丝氨酸和苏氨酸；带有酰胺侧链的氨基酸如天门冬酰胺和谷氨酰胺；具有芳香族侧链的氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；带有碱性侧连的氨基酸如赖氨酸、精氨酸和组氨酸；带有硫原子的侧链的氨基酸如半胱氨酸和甲硫氨酸；天然保守氨基酸如缬氨酸-亮氨酸，缬氨酸-异亮氨酸，苯丙氨酸-酪氨酸，赖氨酸-精氨酸，丙氨酸-缬氨酸，天门冬氨酸-谷氨酸以及天门冬酰胺-谷氨酰胺。对于本发明中对转基因植物起作用的 DNA 所编码的同源体，其不同于公开蛋白的另一个方面是由于这些蛋白在天然序列中删去或插入了一个或多个氨基酸。

这里使用的"一致性百分比"指两个优化对比的 DNA 或蛋白质片段在整个组件对比的窗口中的非差异性的程度,如核酸或氨基酸序列。对于一对测试序列和参考序列的对比片段,一个一致性片断是指一致性组件的数量,该组件为两对比片段的序列所共有,按在比对窗上的参考片段中序列组件的总数所划分,该对比窗比全部测试序列或全部参考序列要小一些。一致性百分比("一致性%")是一致性片断乘以 100。

其中使用的 "Pfam"指多序列对比和覆盖许多普通蛋白家族的隐藏 Markov 模式的大规模采集,比如 Pfam 18.0 版本(2005.8)含有 7973 种蛋白家族的对比和模型,并基于 Swissprot 47.0 和 SP-TrEMBL 30.0 的蛋白序列数据库构建。见 S.R.Eddy, "Profile Hidden Markov Models", *Bioinformatics* 14: 755-763, 1998。现在 Pfam 协会在负责对 Pfam 的维持和升级。序列比对体现了保守结构的进化,而这种保守结构则暗示了蛋白质的功能。从 Pfam 的比对建立起来的状况隐藏 Markov 模型(profile HMMs)对于自动识别新蛋白在已存在蛋白家族中的归属非常有用,甚至能用于从比对上显示出同源性非常低的情况。一旦鉴定出一个 DNA 编码的蛋白在转基因植物中表达,就能让植物表现出改良的性状时,其它编码同一个家族蛋白的 DNA 就可以通过对隐藏 Markov 模型查询由候选 DNA 所编码蛋白的氨基酸序列被鉴定,该模型使用 HMMER 软件来描述 Pfam 结构域,在附加计算机列表中提供了 HMMER 软件的当前版本。在对特殊 Pfam 比对遇到富集中止时,候选蛋白属于这个蛋白家族并具有同族的 DNA,该 DNA 在构建重组 DNA 并用于本发明的植物细胞时很有作用。本发明植物细胞中,使用 HMMER 软件在重组 DNA 常规 Pfam 下鉴定表达蛋白的 DNA,用到的隐藏 Markov 模型数据库也包括在附件的计算机列表中。HMMER 软件与 Pfam 数据库的版本是 18.0,用该软件和数据库确定了 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列有两个 Pfam 结构域,即同源异型框结构域和 HALZ 结构域。经鉴定,同源异型框结构域包括了 130 到 193 之间的氨基酸残基,得分为 70.1,超出富集中止-4。HALZ 结构域被鉴定为包括了 194 到 238 之间的氨基酸残基,得分为 71.9,超过富集中止 17。

对于鉴定同源异型框和 HALZ 结构域的 HMMER 软件和数据库在

任何 Pfam 网站上都可以得到，也能由申请者提供，如在附加的计算机列表中就有。

此处所用的“启动子”指启动转录的调节 DNA。“植物启动子”是指在植物细胞中能够启动转录的启动子，而不管它的来源是不是植物细胞，比如众所周知的农杆菌启动子就是在植物细胞中有功能的。因此，植物启动子就包括了那些从植物、植物病毒、细菌如农杆菌和根瘤菌所得到的启动子 DNA。在发育控制下的启动子例子包括了在某些组织如叶、根或种子中优先启动转录的启动子。这类启动子被称为“组织优先”。只有在某种组织中才能启动转录的启动子被称为“组织特异”。“细胞型”特异启动子主要驱动在一种或多种器官中的某种细胞类型的基因表达，如根和叶中的维管细胞。“可诱导”或“可抑制”启动子是指受环境控制的启动子。比如可能影响由可诱导启动子启动转录的环境条件包括缺氧条件、某些化学药物或光照条件。组织特异性、组织优先性、细胞型特异性和可诱导启动子构成了“非组成性”启动子类型。“组成性”启动子是指在大多数环境下都有活性的启动子。

在这里使用的“可操纵地连接”指将两个或更多的 DNA 片断连接到一个 DNA 结构中，以便使其中的一个，如编码蛋白的 DNA，受控于另一个，如启动子。

此处所用的“表达的”指产生的，如一个蛋白在某个植物细胞中表达，就是指它的 DNA 转录生成 mRNA 并翻译成蛋白质。

此处所用的“对照植物”指不含有表达能表现改良性状蛋白的 DNA 的植物。对照植物用于鉴定和筛选具有改良性状的转基因植物。一个合适的对照植物可以是用于产生转基因植物的亲本系中的未转基因植物，即缺乏重组 DNA 的植物。合适的对照植物在一些条件下也可能是半合子转基因植物系的子代，该子代不含有重组 DNA，比如说阴性分离子。

其中所用的“改良性状”指转基因植物的特性，包括但不限于植物形态、生理、生长发育、产出、营养改善、抗病虫害或环境或化学药物耐受性等改良的农业性状。在本发明中的更具体方面，改良性状选自于具有改良性状的种群，包括提高的水利用率、增强的抗冻性、提高产量、提高的氮利用率、改良种子中的蛋白和油脂含量。在本发

明的一个重要方面，改良性状是高产量，包括在无压力条件下的高产和在环境压力条件下的高产。压力条件可以包括，如干旱、日照不足、真菌病、病毒病、细菌病、昆虫害、线虫害、低温、高温、渗透压、低氮营养供给、低磷营养供给和高植物密度。“产量”能被很多植物特征所影响，包括无界限、植物高度、结荚数、在植物上的结荚位置、结间数量、结荚的损坏率、粒度、根瘤生成率和固氮率、营养同化效率、耐受生物和非生物的压力、碳同化、植物结构、抗倒伏、种子出芽率、幼苗活力和幼苗性状。产量也能受出芽率（包括在压力条件下的出芽率）、生长速率（包括在压力条件下的生长速率）、麦穗数量、每个麦穗上的种子数量、种子大小、种子成份（淀粉、油脂、蛋白）和种子饱满特征等影响。

本发明中的转基因植物所提高的产量可以用多种方法进行测量，包括测定重量、每株植物的种子数量、种子重量、每单位面积的种子数量（即每英亩地的种子数量或重量）、每英亩产量的蒲式耳数（bu/a），每英亩产量的公吨数、每英亩产量的吨数、每公顷产量的公斤数。例如，玉米产量可以用每单位生产面积的去壳玉米产量来测定，比如每英亩的蒲式耳数或每公顷的公吨数，通常的报道要基于水分校正，如15.5%的水分。产量提高可能是因为对重要生物化学化合物的利用增加，如氮、磷和碳水化合物，或者是因为改善了对环境压力的反应，如冷、热、干燥、盐份或病虫害。本发明中应用的重组 DNA 也能用于改善植物的生长发育并最终提高产量，如调整植物生产调节因子的表达、或修改细胞周期或光合作途径。还有意思的是，转基因植物世代中表现出种子某成分的高产可能会也可能不会与整个植物产量有关。这样的特点包括在种子油脂、种子中的分子如维生素 E、蛋白质和淀粉，或者油脂，特别是由于种子成份比例的改变而显示出来的油脂成份的改良。

本发明的一种核酸分子的亚型包括公开的重组 DNA 片段，该片段是由至少 15 个，优选至少 16 或 17 个，更优选为至少 18 或 19 个，甚至再优选为至少 20 个或以上的连续核苷酸组成的寡核苷酸。这样的寡核苷酸是更大的具有从 SEQ ID NO: 1 到 SEQ ID NO: 4 组中选择序列的分子的片段，发现能作为如探针和引物来探测本发明的多聚核苷酸。

DNA 结构的装配使用了本领域具备普通技能的人员都熟知的方法进行, 具代表性结构包括可操纵地连接于 DNA 上的启动子, 而该 DNA 的表达能表现改良的农业性状。其它的结构组份可包括附加的调节元件, 如增强表达的 5'前导序列和内含子, 3'非翻译区 (如多聚腺苷酸信号和位点), 转运或信号肽的 DNA。

很多在植物细胞中有活性的启动子在文献中都有描述。它们包括在植物基因组中存在的启动子, 以及其它来源的启动子, 包括在根癌农杆菌的根癌诱导质粒上胆脂碱合成酶 (NOS) 启动子和真蛭碱合成酶 (OCS) 启动子, 花椰菜病毒组启动子, 如花椰菜花叶病毒。例如, 美国专利 No. 5,858,742 和 No.5,322,938 公开了来自于花椰菜花叶病毒 (CaMV35S) 组成型启动子的模型, 美国专利 No. 5,641,876 公开了水稻肌动蛋白启动子, 美国专利申请 2002/0192813A1 公开了对于设计高效植物表达载体非常有用的 5', 3'和内含子元件, 美国专利申请系列号 08/706,946 公开了水稻谷蛋白启动子, 美国专利申请 09/757,089 公开了玉米醛缩酶 (FDA) 启动子, 以及美国专利申请系列号 60/310,370 公开了玉米 nicotianamine 合成酶的启动子, 以上所有文献其中引入作为参考文献。这些以及其它很多在植物细胞中发挥功能的启动子为本领域技术人员熟知并可用于本发明的多聚核苷酸中使转基因植物细胞中的期望基因得以表达。

在本发明的另外一些方面, 期望得到在植物绿色组织中的优选表达。用于这些用途的启动子包括从如拟南芥核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 (Rubisco) 小亚基 (Fischhoff 等. (1992) *Plant Mol Biol.* 20: 81-93)、醛缩酶和丙酮酸磷酸二激酶 (PPDK) (Taniguchi 等 (2000) *Plant Cell Physiol.* 41(1): 42-48) 基因中得到的启动子。

而且, 启动子可以被改变为含有多重“增强子序列”以帮助提高基因表达。这些增强子在本技术领域为人熟知。通过在这样的结构中加入增强子, 所选择蛋白的表达量可能会增强。这些增强子通常发现位于在对真核细胞起作用的启动子的 5'端到转录起点区域, 但常能被插入编码序列的上游 (5') 或下游 (3')。在一些例子中, 这些 5'增强元件是内含子。作为增强子特别有用的是水稻肌动蛋白 1 (见美国专利 5,641,876) 和水稻肌动蛋白 2 基因的 5'内含子、玉米乙醇脱氢酶基因内含子、玉米热休克蛋白 70 基因内含子 (美国专利 5,593,874) 和

玉米萎缩 1 基因。

本发明的另一些方面中，为了有效改善种子组成成分，希望在植物种子组织中实现充分表达。可效仿的用于变更种子组成的启动子包括来源于种子基因的启动子如 napin 基因（美国专利 5,420,034）、玉米 L3 油质蛋白基因（美国专利 6,433,252）、玉蜀黍蛋白 Z27 基因（Russell 等. (1997) *Transgenic Res.* 6(2): 157- 166）、球蛋白 1 基因（Belanger 等(1991) *Genetics* 129: 863-872）、谷蛋白 1 基因（Russell (1997) *supra*）和 peroxiredoxin antioxidant (Perl) 基因（Stacy 等. (1996) *Plant Mol Biol.* 31(6): 1205- 1216）。

按本发明制备的重组 DNA 结构也通常包括了一个典型含有多聚腺苷酸的信号和位点的 3' 元件。著名的 3' 元件包括：来自于根癌农杆菌基因的如 nos 3'、trnI 3'、tmr 3'、tms 3'、ocs 3'、tr73' 之类的 3' 元件，例如美国专利 6,090,627 所公开的，其中引入作为参考文献；来自于植物基因的 3' 元件如来自小麦（*Triticum aestivum*）热休克蛋白 17（Hsp173）基因、小麦泛素基因、小麦果糖-1,6-二磷酸酯酶基因、水稻谷蛋白基因、水稻乳酸脱氢酶基因和水稻 β 微管蛋白基因，所有这些基因都在美国出版的专利申请 2002/0192813 A1 中公开，纳入此处作为参考文献；以及豌豆（*Pisum sativum*）核酮糖二磷酸羧化酶基因（rbs 3'）和来自于宿主植物内基因的 3' 元件。

基因结构和载体也可以包含导肽以使基因产物定位至植物细胞器，特别是叶绿体、无色体或其它质体细胞器。为阐述叶绿体导肽的作用，请见美国专利 No.5,188,642 和 No. 5,728,925，其中纳入作为参考文献。为阐述本发明中有用的拟南芥 EPSPS 基因导肽区，请见 Klee, HJ. 等 (MGG (1987) 210: 437-442)。

转基因植物，包括或源自于本发明中由重组 DNA 转化的植物细胞，可由于叠加性状而被进一步改良，例如，一种具有改良性状的玉米植物，由于表达了其中公开的 DNA，可兼有抗除草剂和/或抗虫害的性状。例如，本发明的基因可以与其它农业上感兴趣的性状叠加，如能抗除草剂或抗昆虫害的性状，如使用来源于苏云金芽孢杆菌（*Bacillus thuringensis*）的基因来产生对鳞翅类、coliopteran、同翅类、半翅类和其它昆虫的抗性。转基因植物表现出耐受并在本发明的方法中得以应用的除草剂包括但不限于草甘膦、麦草畏、草铵膦、磺酰

脲类、溴草腈和达草灭。编码抗除草剂相关蛋白的多聚核苷酸分子在本领域众所周知，包括但不限于编码 5-烯醇式丙酮基莽草酸-3-磷酸合成酶 (EPSPS) 的多聚核苷酸分子，于美国专利 5,094,945; 5,627,061; 5,633,435 和 6,040,497 公开，应用于表现草甘膦抗性。编码草甘膦氧化还原酶 (GOX) 和草甘膦-N-乙酰转移酶 (GAT) 的多聚核苷酸分子分别在美国专利 5,463,175 和美国专利申请公开物 2003/0083480 A1 中公开，它们也能应用于表现草甘膦抗性；在美国专利申请公开物 2003/0135879 A1 中公开的麦草畏加单氧酶能表现出麦草畏抗性；美国专利 4,810,648 公开的编码溴草腈水解酶 (Bxn) 的多聚核苷酸分子能用于表现溴草腈抗性；编码八氢番茄红素去饱和酶 (crtl) 的多聚核苷酸分子用于达草灭抗性在 Misawa 等, (1993) *Plant J.* 4: 833-840 和 Misawa 等, (1994) *Plant J.* 6: 481-489 的文章中有所阐述；编码乙酰羟酸合成酶 (AHAS, akaALS) 的多聚核苷酸分子用于表现磺酰脲类除草剂抗性在 Sathasiivan 等. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 2188- 2193 的文章中有所阐述。多聚核苷酸分子如 bar 基因, 在 DeBlock, 等. (1987) *EMSO J.* 6: 2513-2519 文章中公开，可应用于 glufosinate 和 bialaphos 抗性；美国专利申请公开物 2003/010609 A1 公开的多聚核苷酸分子用于表现 N-氨基甲基膦酸抗性；美国专利 6,107,549 公开的多聚核苷酸分子能表现出吡啶除草剂抗性；对于表现对多种除草剂，如草甘膦、阿特拉津、ALS 抑制剂、isoxoflutole 和 glufosinate，抗性使用的分子和方法在美国专利 6,376,754 和美国专利申请公开物 2002/0112260 中公开，所有所述美国专利和美国专利申请公开物均纳入此处作为参考文献。对于表现对昆虫/线虫/病毒抗性所用的分子和方法在美国专利 5,250,515; 5,880,275; 6,506,599; 5,986,175 和美国专利申请公开物 2003/0150017 A1 中公开，均其中纳入作为参考文献。

在特殊的具体实施方案中，发明者期望使用能与此处公开蛋白结合的抗体，或者是单克隆或者是多克隆。用于制备和特异化抗体的方法在其领域中是熟知的（比如见 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 纳入此处作为参考文献）。产生单克隆抗体 (mAbs) 的方法刚开始时与制备多克隆抗体是一样的。简要地说，多克隆抗体是按照本发明方法用免疫原性化合物免疫动物并从被免疫动物上收集抗血清而制备的。很多种类动物可以用来制备抗血

清。典型的用于生产抗血清的动物有兔子、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或山羊。因为兔子有相对大的血容量，所以兔子是生产多克隆抗体的优先选择。

本领域公知给定化合物可能有不同的免疫原性。因此加强刺激宿主免疫系统常常是必要的，可以通过将多肽或多肽抗原偶联在一个载体上达到效果。可作为范例和优选的载体是钉形贝血蓝蛋白（KLH）和牛血清白蛋白（BSA）。其它白蛋白如卵清蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也能被作为载体。偶联多肽和载体蛋白方法在本领域众所周知，包括使用戊二醛、间马来酰亚氨基苯甲酰基-N-羧基琥珀酰亚胺酯、碳二亚胺和 bis-biazotized 联苯胺。

本领域也公知，对一个特殊的免疫原组分，其免疫原性可以利用免疫反应的非特异性刺激而被加强，如大家所知的佐剂。可作为范例和优选佐剂包括弗氏完全佐剂（一种免疫反应的非特异刺激物，含有灭活的结核分支杆菌），弗氏不完全佐剂和氢氧化铝佐剂。

用于生产多克隆抗体的免疫原组分的量可以因免疫原的性质和被免疫动物的不同而变化。免疫原的给药途径也可以不同（皮下注射、肌肉注射、真皮内注射、静脉注射和腹膜注射）。多克隆抗体产量可以在免疫之后不同的时间点采取被免疫动物的血样进行监控。也可以给予二次加强注射。重复加强和滴度测定过程直到得到合适的抗体滴度。当获得期望的免疫程度时，将被免疫动物放血，分离血清并贮存，和/或将该动物用于产生 mAbs。

mAbs 可以使用熟知的技术很容易地制备，如美国专利 No. 4,196,265 所列举的方法，纳入此处作为参考。典型的这种技术包括使用所选的免疫原组分免疫合适的动物，例如一种纯化的或部分纯化的抗真菌蛋白、多肽或肽。免疫组分用一定方式给药以有效地刺激产生抗体的细胞。啮齿类如小鼠和大鼠是优选动物，而也可能用兔子和绵羊或青蛙细胞。使用大鼠可能有某些优势（Goding, 1986, pp. 60-61），但小鼠是优选的，BALB/c 小鼠是最优选择，因为它最为常用并通常可产生高比例的稳定融合。

免疫之后，具有产生抗体潜能的体细胞，特别是 B 淋巴细胞（B 细胞），被筛选出来用于 mAb 生产。这些细胞可以从活体的脾脏、扁桃腺或淋巴结中获得，或从外周血中取样。脾细胞和外周血细胞是优

选，前者是因为它是抗体生成细胞的富有源，并且这些细胞正处于分化浆母细胞阶段；后者是因为外周血易于获取。通常，一组动物在免疫后，具有最高抗体滴度的脾将被切除下来，用注射器均浆后可得到脾淋巴细胞。典型地说，从一个被免疫老鼠的脾脏中可获得大约 5×10^7 到 2×10^8 个淋巴细胞。

将来源于被免疫动物的产生抗体的 B 淋巴细胞与永生的骨髓瘤细胞融合，这种细胞通常来自与被免疫动物同一种类的动物。适合于杂交瘤融合操作的骨髓瘤细胞系，应优选无抗体产生、具有高融合效率和酶缺陷型细胞系，这样在只支持期望的融合细胞（杂交瘤）生长的选择性培养基中，未融合细胞则不能生长。

为本领域的技术人员所熟知，许多骨髓瘤细胞中的任何一种都可用（Goding, 1986, pp. 65-66; Campbell, 1984, pp. 75-83）。例如，当使用小鼠作为被免疫动物时，可用 P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NSI/1.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 和 S194/5XX0 细胞系；对于大鼠，则可用 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 和 4B210 细胞系；而 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 和 UC729-6 细胞系则全部用于与人类细胞融合。

一种优选的鼠类骨髓瘤细胞是 NS-1 骨髓瘤细胞系（也被命名为 P3-NS-1-Ag4-1），该细胞可以很容易地从国立普通医学科学研究所人类遗传变异细胞贮存库获得，索求细胞系贮存号为 GM3573。另一种可用的小鼠骨髓瘤细胞系是 8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠骨髓瘤细胞非 SP2/0 生成细胞系。

用于产生抗体生成脾或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂合体的方法通常包括，以 2:1 的比例混合体细胞与骨髓瘤细胞，在有一种或多种促细胞膜融合因子（化学的或电的）的存在下，这个混合比例可以分别从大概 20:1 到 1:1 不等。（Kohler 和 Milstein, 1975; 1976）文中阐述了使用 Send 病毒融合的方法，也有使用聚乙二醇(PEG)，如 37%(v/v) PEG 的方法（Gefter 等，1977）。使用电介导融合的方法也能适用（Goding, 1986, pp. 71-74）。

融合操作产生的可传代杂合体的几率常常较低，大约 1×10^{-6} 到 1×10^{-8} 。但是这并不成什么问题，因为在选择性培养基中培养时，可传代的融合杂合体可以由亲代未融合的细胞分化（特别是未融合的骨

髓瘤细胞通常可以继续不定地分裂)而来。一般来说,选择性培养基是含有一种能阻断核苷酸新合成的试剂的组织培养基。可作为范例和优选的试剂是氨基嘌呤、甲氨基嘌呤和氨基丝氨酸。氨基嘌呤和甲氨基嘌呤可同时阻断嘌呤和四氢化吡咯的新合成,而氨基丝氨酸只阻断嘌呤合成。当使用氨基嘌呤和甲氨基嘌呤时,培养基需补加次黄嘌呤和脱氧胸苷作为核苷酸来源(HAT培养基)。当使用氨基丝氨酸时,培养基中应补加次黄嘌呤。

培养基优选 HAT。只有能进行核苷酸补救途径的细胞才能在 HAT 培养基中存活下来。骨髓瘤细胞缺乏补救途径的关键酶,如次黄嘌呤转磷酸核糖基酶(HPRT),不能存活下来。B 细胞能进行这种途径,但是它们在培养时生命有限,通常在大约两周之内死亡。所以,能生存于选择性培养基中的细胞只有由骨髓瘤细胞和 B 细胞形成的杂合体。

这种培养能提供一个杂交瘤细胞种群,从中特异的杂交瘤细胞可被筛选出来。典型地说,杂交瘤细胞的筛选是这样进行的,先在微量滴定板中培养单克隆稀释后的细胞,然后测定各单克隆上清液以检测期望的活性(在大约两周或三周之后)。测定应该灵敏、简单和快速,如放射免疫测定法、酶免疫测定法、细胞毒性测定法、噬菌斑测定法、圆点免疫结合测定法等诸如此类。

所选择的杂交瘤细胞再进行连续稀释并克隆成为单一抗体生成细胞,这样这些克隆就能无繁殖用于产生单克隆抗体。该细胞系可以通过两种基本方法用来生产 mAb。一个例子就是将杂交瘤注射进一个动物体内(常常是注射入腹膜腔内),该动物与提供最初融合所用体细胞和骨髓瘤细胞的动物类型之间组织相容。被注射的动物体内生长出能分泌由融合细胞杂合体产生的特异单克隆抗体的肿瘤。动物的体液,如血清或腹积液,可被抽出以提供高浓度的 mAbs。单个细胞系也可以在体外进行培养,这时, mAbs 就自然地分泌进入培养基中,从培养基里可以很容易地得到高浓度的抗体。如果希望的话,两种方法生产的 mAbs 都可被进一步纯化,可用过滤、离心和各种层析方法,如 HPLC 或亲和层析进行。

植物细胞转化方法

为本领域所熟知的,有许多方法可以用于重组 DNA 转化植物细

胞，这些方法也可用于本发明中。两个通常使用的转化植物的方法是农杆菌介导的转化和微粒轰击。微粒轰击方法在美国专利 5,015,580 (大豆); 5,550,318 (玉米); 5,538,880 (玉米); 5,914,451 (大豆); 6,160,208 (玉米); 6,399,861 (玉米) 和 6,153,812 (水稻) 中有图解说明，农杆菌介导的转化方法在美国专利 5,159,135 (棉花); 5,824,877 (大豆); 5,591,616 (玉米); 和 6,384,301 (大豆) 中得以阐述，所有以上专利均纳入此处作为参考。对于基于根癌农杆菌的植物转化系统，在转化构建中出现的附加元素包括 T-DNA 的左缘和右缘序列，它们能使重组多聚核苷酸很方便地整合进入植物基因组。

通常，随机导入重组 DNA，即非特异地定位于目标植物种系的基因组里，都是有用的。在一些特殊的例子中，定位重组 DNA 的插入以得到位点特异性的整合可能是有用，例如，用于取代一个基因组中已经存在的基因，利用植物基因组中已经存在的启动子或者插入重组的多聚核苷酸到一个预先确定的位点，该位点是已知活跃的基因表达位点。已知有几个位点特异性重组系统在植物中有效，包括美国专利 4,959,317 中公开的 cre-lox，美国专利 5,527,695 中公开的 FLP-FRT，两者均纳入此处作为参考文献。

本发明的转化方法优选地应用于培养基和受控环境中的组织培养。“培养基”指在体外，即在完整的活器官之外，培养细胞所用的许多营养物质的混合物。受体细胞目标包括但不限于分生组织细胞、愈伤组织细胞、未成熟胚细胞和配子细胞如小孢子、花粉、精子和卵细胞。任何可以再生成为可育植物的细胞均可以考虑用来作为受体细胞。本发明中用于产生转基因植物的实际转化方法和材料，例如各种不同的培养基、受体目标细胞、未成熟胚细胞转化和可育转基因植物的后继再生，均在美国专利 6,194,636 和 6,232,526 中公开，其中纳入作为参考。

转基因植物的种子可以从可育转基因植物收获，并用来种植本发明所述转化植物的子代，包括用于选择具有改良性状植物的杂合植物株系。除了使用重组 DNA 进行直接转化，转基因植物也可以通过带有重组 DNA 的植物与不带重组 DNA 的植物的杂交而获得。例如，重组 DNA 能被导入第一种植物株系转化产生转基因植物，这种转基因植物可与第二种植物株系杂交而使重组 DNA 渗入第二种植物株系中。

将具有提供一种改良性状，如提高产量，的重组 DNA 的转基因植物可以与具有提供另一种性状，如抗除草剂或抗虫害，的重组 DNA 的转基因植物杂交，可以产生具有提供两种性状的重组 DNA 的子代。典型地说，在对组合性状的这种培育中，提供附加性状的转基因植物是父系，而带有基础性状的转基因植物则是母系。这种杂交产生的子代将出现性状分离，以至于有些植物可携带同时表现双亲性状的 DNA 而有些则带有只表现一个亲本性状的 DNA；这样的植物可以用与亲本重组 DNA 偶联的标记进行鉴定，如通过对重组 DNA 分析进行的标记鉴定，或者在一些例子中，一个可选标记连接在重组 DNA 上，通过使用选择试剂，如除草剂来鉴定除草剂耐受型标记，或选择改良性状加以鉴定。带有能表现亲本双方性状 DNA 的子代植物可以与母本系进行多次回交，比如通常 6 至 8 代，以产生具有与初始转基因亲本之一基本上相同的基因型的子代植物，要不是有另一个转基因亲本的重组 DNA。

实际上，在任何一次转基因实验中，转化 DNA 一般只能导入很小比例的目标植物细胞中。标记基因用于提供一个有效的系统来鉴定那些通过接收和整合转基因 DNA 进入自己基因组的稳定转化细胞。优选的标记基因提供能对选择试剂产生耐受性的选择性标记，如抗生素或除草剂。任何一种除草剂，只要本发明中的植物可以耐受，都可以用作鉴定选择性标记的试剂。将可能被转化的细胞用选择试剂处理。对于存活的细胞种群，一般来说，提供耐受性的基因是整合的，并能以足够高的水平进行表达以维持细胞存活。细胞可以被进一步地测定以确定外源 DNA 的稳定整合。常用的选择标记基因包括那些对抗生素产生抗性的基因，如卡那霉素和巴龙霉素 (nptII)、潮霉素 B (aph IV) 和庆大霉素 (aac3 和 aacCA)，或抗除草剂的基因如 glufosinate (bar 或者 pat) 和草甘膦 (aroA 或者 EPSPS)。对这些选择性的实例在美国专利 5,550,318; 5,633,435; 5,780,708 和 6,118,047 中有图注说明，所有纳入此处作为参考。能够使肉眼观察就能鉴定转化体的可选择标记也可以使用，比如表达有色或荧光蛋白，如荧光素酶或绿色荧光蛋白 (GFP)，的基因，或者表达 β -葡糖苷酸酶或 uidA 基因 (GUS)，因为它具有多种已知的显色底物。

那些经选择试剂处理后存活的植物细胞或者在筛选测定中被评分

为阳性的细胞，可以在再生培养基中培养并长成植物。在转移至温室或成熟生长箱之前，将正在生长的从转化植物细胞再生的小植物转移到植物生长混合培养基中，使其硬化，例如在一个环境可控的培养箱中，大约 85% 的相对湿度、600ppm CO₂ 以及 25-250 微爱因斯坦 m⁻²s⁻¹ 的光照强度。在转化子的鉴定后，植物的再生需要大约 6 周至 10 个月的时间，这取决于原始组织。植物可以使用本领域技术人员熟知的常规植物育种方法时行受粉和种子生产，例如转基因玉米常用自花受粉。再生的转化植物或其子代种子或植物需被鉴定重组 DNA 的表达并选择改良农业性状。

转基因植物和种子

培育源自于本发明植物细胞的转基因植物，使其生长成为相对于对照植物具有改良农业性状的转基因植物，并产生本发明所述转基因种子和单倍体花粉。这些具有改良农业性状的植物是通过筛选转化植物或子代种子的改良性状而鉴定的。为了提高效率，应设计一种选择方法以评估多个含有重组 DNA 的转基因植物（事件），比如从 2-20 的多个植物或更多的转基因事件。此处提供的由转基因种子生长起来的转基因植物表现出更好的农业性状，使得产量增加或由其它性状提升了植物的价值，包括如更好的种子质量。特别的好处是植物具有提高的水利用率、增强的抗冻性、提高的产量、提高的氮利用率、改良的种子蛋白和改良的种子油脂。

表 1 提供了编码蛋白的 DNA（基因）列表，可用这些基因作为重组 DNA 来产生具有改良农业性状的转基因植物。表 1 的各要素通过以下进行：

“PEP SEQ” 是从 SEQ ID NO: 5-8 中鉴定的一个氨基酸序列。

“NUC SEQ” 是从 SEQ ID NO: 1-4 中鉴定的一段 DNA 序列。

“基础载体”是一个基础质粒，用于重组 DNA 的转化。

“蛋白质名称”是指由重组 DNA 编码的蛋白质的通用名。

“质粒 ID”指包含重组 DNA 的植物转化质粒的简称，该质粒的作用是在植物细胞中表达重组 DNA。

表 1

PEP SEQ ID NO	NUC SEQ ID NO	基础载体	蛋白质名称	质粒 ID
5	1	pMON65154	拟南芥 G1543	pMON68392
5	1		拟南芥 G1543	pMON74775
5	1	pMON74537	拟南芥 G1543	pMON83062
6	2	pMON81244	玉米 G1543-样 1	pMON82686
6	2	pMON74537	玉米 G1543-样 1	pMON83049
7	3	pMON81244	大豆 G1543-样 1	pMON82688
7	3	pMON81244	大豆 G1543-样 1	pMON84131
7	3	pMON74537	大豆 G1543-样 1	pMON83311
8	4	pMON74537	稻 Hox3 - AAD37696	pMON73829

具有改良农业性状的转基因植物的筛选方法

许多转基因事件可以产生存活的可育的转基因植物，这些转基因植物可以产出种子和子代植物，但不表现改良的农业性状。筛选是鉴定本发明的转基因植物所必需。通过不同的测定改良性状的检验方法对植物性状评估，可将具有改良农业性状的转基因植物从其中所述转化植物种群中鉴定出来。这些检验可能会采用多种形式，包括但不限于分析测定植物的化学成份、生物量、生理特征、形态学的变化。化学成份的变化如玉米营养成份的变化能通过分析种子成份和蛋白、自由氨基酸、油脂、自由脂肪酸、淀粉或维生素 E 含量而被检测。生物量特征能因温室或大田的种植而改变，可包括植物的高、茎粗、根和枝条的干重，以及对于玉米植物的穗长和直径。生理性质的改变可以由评估对压力条件的反应来鉴定，例如在施加压力条件下，如缺水、缺氮、低温生长条件、病虫害、缺少光照或提高植物密度，进行检验。形态学改变可以通过观察具有改良性状的转基因植物与正常植物比较产生的可见变化趋势来进行测量，如比较分枝，较高、较厚、较窄的叶片，条纹叶片，结的性状，萎黄，白化，花青素的产生或变化的雄

花穗、穗或根。其它的筛选特征包括产生花粉的天数、抽丝的天数、叶的扩展率、叶绿素的含量、叶片温度、林分、幼苗活力、结间长度、植物高度、叶数、叶面积、分蘖、支柱根、滞绿、茎倒伏、根倒伏、植物健康度、不育/多产、生长打断 (green snap) 和抗虫性。另外，可以评估收获谷粒的表型特征，包括穗上每排的米粒数、穗上米粒的排数、米粒败育、米粒重量、米粒大小、米粒密度和谷粒的生理品质。

本发明中对于具改良农业性状的转基因植物的优选种子是玉米和大豆植物，其它的种子则是棉花、油菜、小麦、葵花、高粱、苜蓿、大麦、小米、水稻、烟草、水果和蔬菜作物，以及草坪用草。

提高的氮利用率的筛选

本发明中的一个优选转基因植物的改良农业性状就是相对于对照植物具有提高的氮利用率。高氮土壤的应用可以提高种子的蛋白和淀粉的积累，产生更大的种子重量和每穗更多的谷粒数量。最近的在改良高产杂交玉米基因型上的进展包括了对氮的高效利用。在农作物中产生提高的氮利用率的基因非常有用，例如，能提高产量。提高的氮利用率可以用测定植物生长的改度来进行评估，比如测定植物生长在氮限制和/或氮充足条件下的叶面积产量、枝的生物量、叶绿素含量。在氮限制条件下进行第一次筛选并在氮限制和氮充足条件下确认复制的转基因事件是非常有用的。表 2 展示了用于氮利用率筛选的氮限制条件（低氮生长条件）和氮充足条件（高氮生长环境）中所用的营养液中各营养成分的量。例如在温室筛选盆中，分别在进行高氮和低氮选择种植后的 8 天和 10 天开始，将转基因植物和对照植物用 100ml 的营养液处理，隔日一次，每周三次。

表 2

营养物贮备液	2mM NH ₄ NO ₃ (低氮生长条件)	20mM NH ₄ NO ₃ (高氮生长条件)
	mL/L	mL/L
1 M NH ₄ NO ₃	2	20
1 M KH ₂ PO ₄	0.5	0.5
1 M MgSO ₄ ·7H ₂ O	2	2
1 M CaCl ₂	2.5	2.5
1 M K ₂ SO ₄	1	1

注意：用 HCl 或 KOH 将 pH 调至 5.6

对于低氮筛选在植物生长 28 天和对高氮筛选的 23 天后，进行如下方面测定：总枝干的鲜重、叶片的叶绿素、叶片面积、叶片鲜重和叶片干重。

对高产的筛选

本发明的许多转基因植物相对于对照植物表现出提高的产量。高产可以是因为改良的种子的库容量，即胚乳细胞或者米粒的数量和大小；和/或改良的库强度，即淀粉生物合成的速率。库容量在米粒发育很早的时候就能建立，如胚乳细胞数量、细胞大小都在受粉后的前几天就确定下来的。

在过去几十年中，许多提高玉米产量的方法都是提高种植密度的结果。在这期间，玉米产量以 2.1 蒲式耳/英亩/年的速度提升，但种植密度则以 250 株/英亩/年的速度增加。现代杂交玉米的一个特征就是这些品种能在高密度下种植。很多研究已经显示出比现在更高的种植密度的结果是更高的生物量的产出，但在这些更高的密度下现在的种质则没能有好的表现。一个提高产量的途径就是在高密度种植时提高收获指数 (HI)，即相对于总生物量米粒分配到的生物量占的比例。

对转基因玉米产量的有效筛选利用转基因事件杂交子代在最优的生产管理以及最好害虫控制下于多个地点进行种植。对于高产有用的指标是相对于种植对照植物的种子在产量上有 5%到 10%的提升。有

效的筛选需在多个不同的地理位置，如多至 16 或更多的地点，和多于一个或多个种植季节，如至少两个种植季节进行，以从统计学上区别产量提升和自然环境的影响。要种植多种转基因植物、阳性和阴性对照植物和传粉植物，将它们种植于标准样地中，例如，两排样地，20 英尺长，5 英尺宽，每排间隔 30 英寸，行列之间有 3 英尺的小径。转基因事件由重组 DNA 的结构进行分组，各组随机播种于地中。在使用雄性不育转基因事件时，每两个样地间需种植一个样地的高品质玉米种系传粉者以进行自由传粉。有效的种植密度为大约 30000 个植物/英亩。

用于产量提高筛选的替代指标包括源容量（生物量）、源产出（蔗糖和光合作用）、库组成（米粒大小、穗大小、种子中的淀粉）、发育（光反应、高度、密度耐受性）、成熟、早期开花性状和对高密度种植的生理反应，例如每英亩 45000 个植物的种植密度，如表 3 和表 4 所展示。

表 3

时间	评价	描述	注释
V2-3	最初林分	发生在植物发芽后摘芽前的任何时段	
花粉产生	至 50%花粉产生的 GDU	至 50%植株脱落 50%雄花穗的 GDU	
抽丝	至 50%抽丝的 GDU	至 50%植株抽丝的 GDU	
成熟	植株高度	土壤表面到旗叶之间的高度 (英寸)	10 株植物/样地-产量 团体辅助
成熟	穗高度	土壤表面到早期穗结之间的高度	10 株植物/样地-产量 团体辅助
成熟	穗上叶	视觉分值: 垂直、大小、起伏	
成熟	雄花穗大小	视觉分值: +/- vs. WT	
在先收获	最终林分	收获前计算的最终林分, 除开分蘖	
在先收获	茎倒伏	早期穗下起伏的茎数目, 除开倾斜分蘖	
在先收获	根倒伏	与垂直倾斜度>45°的茎数目	
在先收获	滞绿	生理成熟后并且基因型差异明显: 比例 1 (90-100%绿色组织) -9 (0-19%绿色组织)	
收获	谷物产量	谷物产量/样地 (壳重)	

当对产量提高进行筛选时, 一个有效的统计学检测途径包括三个组成部分, 即分别对分布各个区域实验地建立空间自相关模型, 针对对各区域的空间依赖性进行重组 DNA 事件的性状校正, 和进行交叉地域分析。建立空间自相关模型的第一步是估计半变异函数的协方差参数。假定用一个球体协方差模型来建立空间自相关模型。因为实验

的大小和性质，空间自相关可能会改变。所以需与球体协方差同时假定各向异性。以下的一套方程式描述了各向异性球状协方差模型。

$$C(h; \theta) = vI(h=0) + \sigma^2 \left(1 - \frac{3}{2}h + \frac{1}{2}h^3 \right) I(h < 1)$$

其中 $I(\bullet)$ 是指标函数 $h = \sqrt{x^2 + y^2}$

和

$$\begin{aligned} \dot{x} &= [\cos(\rho\pi/180)(x_1 - x_2) - \sin(\rho\pi/180)(y_1 - y_2)]/\omega_x \\ \dot{y} &= [\sin(\rho\pi/180)(x_1 - x_2) + \cos(\rho\pi/180)(y_1 - y_2)]/\omega_y \end{aligned}$$

其中 $S1 = (x1, y1)$ 是一个区域的空间坐标， $S2$ 是第二个区域的空间坐标。有 5 个协方差参数。

$$\theta = (v, \sigma^2, \rho, \omega_n, \omega_j)$$

其中 v 是硬块效应， σ^2 是偏坎 (partial sill)， ρ 是从北顺时针旋转度数， ω_n 是短轴的定标参数， ω_j 是相等协方差的各向异性椭圆的长轴定标参数。使用来自大量复制授粉器曲线经由最大限制性似然途径的数据来估计定义空间趋势的五个协方差参数。在多区域田地试验中，对每个区域要分别进行空间趋势建模。

在获得模型不同参数后，要对准备分析的数据建立变异数协方差结构。该变异数协方差结构包括用于校正空间依赖性产量数据的空间信息。在这种情况下，一个最能表现该研究处理和实验设计的嵌套模型将与变异数协方差结构一起用于对产量数据的校正。在这个过程中，苗圃或种子批次影响也能建模并被评估以校正对任何由于种子批间不同所引起的产量差异。

在对来自于不同区域的数据进行空间校正之后，所有的被校正数据将在假设区域重复条件下被合并分析。在该分析中，区域内或区域间的变量被结合起来以估算转基因植物和对照植物产量的标准差。相对平均比较用于显示有统计学意义的产量提高。

对水利用率的筛选

本发明使得转基因植物具有高产量的一个方面是因为提高的水利

用率和/或抗旱性。在这个例子中所述是一种对于转基因玉米植物相对于野生型玉米植物（用作测试的为近交系或杂合系）水利用率的高通量温室筛选方法。这个筛选过程在植物 11 天的初始压力自由生长后在共 15 天期间加上了三个干旱/再供水循环。每 5 天一个循环，每个循环前 4 天不供水，第 5 天进行水淬。由该筛选方法主要分析的基因型是那些在保证营养的干旱处理期间植物生长率发生改变的植物，这个生长率由植物高度和生物量所决定。枝条的水合状态干旱处理后被测定。在三个时间点测定植物的高度。第一个时间点是在植物 11 天大时开始干旱处理之前取得，这时为枝杆的初始旱度（SIH）。植物高度也会在干旱/再供水法的中途，种植后的 18 天被测量，以获得枝杆的中期干旱高度（SMH）。在最后一个干旱循环完成时，即种植后的 26 天，收获植物的枝杆部分，并测量最终高度，即枝杆的萎蔫高度（SWH），同时也测定枝杆的萎蔫生物量（SWM）。将枝杆置于 40 摄氏度水中，避光。三天后，称量枝杆重量即为枝杆吸胀重量（STM）。用烘箱干燥 4 天后，称量枝杆重量即为枝杆干燥生物量（SDM）。枝杆均高（SAH）是三次高度测定后的植物平均高度。上述阐述的过程可以根据条件在每步上调整 +/- 一天。

为了校正植物之间的轻度差别，从 SIH 和 SWH 中衍生出一个大小校正生长值。这就是相对生长率（RGR）。每个枝条的相对生长率可依照公式 $[RGR\% = (SWH-SIH)/((SWH+SIH)/2)*100]$ 进行计算。相对水含量（RWC）是对收获时水在植物中所占比例（%）。每个枝条相对水含量（RWC）可依照公式 $[RWC\% = (SWM-SDM)/(STM-SDM)*100]$ 进行计算。完全供水的玉米植物其中年龄的 RWC 约为 98%。

对在寒冷压力下生长的筛选

本发明一个方面提供了在寒冷压力下具有改良生长状况的转基因植物，例如在早期幼苗生长测定中，测定了 3 批种子。第一批是一组是从转基因植物收获的转基因种子；第二批是转基因种子的阴性分离子；第三批是从两种抗冻和两种不抗冻的野生型对照植物获得的种子。所有的种子均用以上提及的杀霉剂处理。将种子种于萌发纸上（12 英寸 x 18 英寸 Anchor Paper #SD7606），用 0.5% KNO_3 和 0.1% Thyram 溶液湿润。在每片纸上将 15 粒种子沿直线平均放置，以使根向同一

边缘生长。将湿纸均匀卷紧，以保持种子的位置。把纸卷小心地放入有两个大纸夹的地方，一个夹在顶部，一个夹中底部。将纸卷按完全随机组设计装入合适的容器，在温度为 23℃ 的培养室中孵育三天。培养室的湿度设置为 65%，无光照循环。对进行寒冷压力处理组，将纸卷在 12℃ 培养室中孵育 14 天，培养室的湿度设置为 65%，无光照循环。对进行热处理组，将纸卷在 23℃ 多孵育两天。将处理后的萌发纸打开，弃去未发芽的种子。测量每粒种子的胚根与胚芽鞘长度。从每组六个单独米粒收集胚芽鞘样本以确定重组 DNA 的表达。用经过前处理和冷处理后的根和苗在长度上的统计学差异来评估寒冷处理在玉米植物上的影响。分别单独对热和冷处理组进行分析。

对植物种子中改良的油脂、淀粉或蛋白含量的筛选

植物种子中的油脂含量由低分辨率 $\text{sup } ^1\text{H}$ 核磁共振 (NMR) 来确定 (Tiwari 等, JAOCS, 51: 104-109 (1974); 或 Rubel, JAOCS, 71: 1057- 1062 (1994))。也可用近红外光谱 (NIR) 来确定油脂、淀粉和蛋白的含量。

以下实施例用于说明本发明。

实施例 1

该实施例说明用于转运重组 DNA 进入植物细胞的质粒的构建，而该植物细胞可以再生成为本发明所述转基因植物。用于 PCR 扩增重组 DNA 蛋白编码核苷酸的引物被设计在或靠近编码序列的起始和终止密码子处，以清去大部分的 5' 和 3' 的非翻译区。在插入基础载体之前，如表 1 中引用，每一个编码表 1 中所鉴定蛋白的重组 DNA 都将用 PCR 进行扩增。

使用 GATEWAY(TM) Destination 植物表达载体系统 (由 Invitrogen 生命科技 Carlsbad, CA 提供) 构建一种基础植物转化载体 pMON65154 用于重组 DNA 转化进入玉米组织。参考表 5 下部所述元件和 SEQ ID NO: 9, pMON65154 包括了一个可选的标记表达盒和一个模板重组 DNA 表达盒。标记表达盒包括了一个 CaMV 35S 启动子，连接在新霉素磷酸转移酶 II (riptide II) 编码基因上，后面再接着一个根癌农杆菌胆脂碱合成酶 (nos) 基因。模板重组 DNA 表达盒与标记表达盒尾尾相对。模板重组 DNA 表达盒包含了 5' 调控 DNA，包括水稻肌动蛋白 1

的启动子、外显子和内含子，接着是一个 GATEWAY™ 重组 DNA 插入位点，然后是土豆蛋白酶抑制物 II (pinII) 基因的 3' 区域。在重组 DNA 被插入进插入位点后，该质粒就能用于植物转化，比如使用微粒轰击法。

表 5

功能	元件	参考文献
植物目的基因表达盒	水稻肌动蛋白 1 启动子	U.S. 专利 5,641,876
	水稻肌动蛋白 1 外显子 1, 内含子 1 增强子	U.S. 专利 5,641,876
植物目的基因插入位点	<i>AttR1</i>	GATEWAY™ Cloning Technology Instruction Manual
	CmR 基因	GATEWAY™ Cloning Technology Instruction Manual
	<i>ccdA</i> , <i>ccdB</i> 基因	GATEWAY™ Cloning Technology Instruction Manual
	<i>attR2</i>	GATEWAY™ Cloning Technology Instruction Manual
植物目的基因表达盒	土豆 pinII 3' 区域	An <i>et al.</i> (1989) Plant Cell 1:115-122
植物选择标记表达盒	CaMV 35S 启动子	U.S. 专利 5,858,742
	nptII 选择标记	U.S. 专利 5,858,742
	<i>Nos</i> 3' 区域	U.S. 专利 5,858,742
大肠杆菌中的维持	<i>ColE1</i> 复制起点	
	<i>F1</i> 复制起点	
	Bla 氨苄青霉素抗性	

相似的载体质粒 pMON72472 (SEQ ID NO: 10) 也被构建起来用于农杆菌介导的植物转化方法，该质粒与 pMON65154 相似，除了 (a) 在模板重组 DNA 表达盒中的 5' 调节 DNA 是一个水稻肌动蛋白启动子和一个水稻肌动蛋白内含子，(b) 加入了来自于农杆菌 T-DNA 左右

边缘序列，其中右边缘序列加在水稻肌动蛋白 1 启动子的 5'端，而左边缘序列则位于 35S 启动子的 3'端；(c) 加入 DNA 以使质粒在大肠杆菌和根癌农杆菌中均容易复制。该 DNA 加在质粒 T-DNA 边缘序列之外，包括了一个在农杆菌中有效的 oriN 宽宿主范围 DNA 复制起点和在大肠杆菌中有效的 pBR322 复制起点，以及一个同时能用于大肠杆菌和农杆菌选择的大观霉素/链霉素抗性基因。pMON74775 由一个与 pMON72472 基本相同的基础质粒所构建。

其它与上述相似的基础质粒也被构建出来，包括含有丙酮酸磷酸二激酶 (PPDK) 启动子 (SEQ ID NO: 11) 和作为增强子的玉米 DnaK 内含子 (SEQ ID NO: 12) 的 pMON81244。

用于大豆转化的植物表达载体

用于大豆转化的质粒也已被制备出来。可作范例的通用表达载体质粒 pMON74532 (SEQ ID NO: 13) 的各组件都在表 7 下展示。

构建类似于上述的用于大豆转化的质粒载体以用于农杆菌 (*Agrobacterium*) 介导的大豆转化，pMON74537，其含有 *Arabidopsis thaliana* 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶 (Rubisco) 小亚单位启动子 (SEQ ID NO: 14)。

在插入位点插入载体之前，通过 PCR 来扩增编码重组 DNA 片段的蛋白。在或接近起始密码子和终止密码子设计用于 PCR 扩增的引物，以消除大部分 5' 和 3' 未翻译区域。

表 7

功能	元件	参考文献
农杆菌转化	B-ARGtu.右边缘	Depicker, A. 等人 (1982) Mol Appl Genet 1:561-573
抗生素抗性	CR-Ec.aadA-SPC/STR	
ColE1 质粒的引物抑制物	CR-Ec.rop	
复制起点	OR-Ec.oriV-RK2	
农杆菌转化	B-ARGtu.左边缘	Barker, R.F. 等人 (1983) Plant Mol Biol 2:335-350
植物选择标记表达盒	拟南芥 act 7 基 (AtAct7) 带内含子和 5'UTR 的启动子	McDowell 等人 (1996) Plant Physiol. 111:699-711.
	Arabidopsis act 7 基因的 5' UTR	
	AtAct7 5'UTR 的内含子	
	拟南芥 EPSPS 的转运肽区域	Klee, H.J. 等人 (1987) MGG 210:437-442
	使用双子叶植物密码子偏爱的合成 CP4 编码区	
	农杆菌 Ti 质粒胭脂氨酸合成基因的 3' UTR	U.S. 专利 5,858,742
植物目的基因表达盒	含有-90 到-350 区域重复的 CaMV 35S RNA 的启动子	U.S. 专利 5,322,938
	目的基因插入位点	
	棉花 E6 3' 末端	GenBank 登陆号 U30508

实施例 2

该实施例说明植物转化在产生本发明的转基因玉米植物上很有作用。将一种易转化的玉米植物种植于温室之中，当胚长到 1.5 到 2.0mm 长时，收获其穗。通过喷撒或将穗浸泡入 80%乙醇来对穗表面消毒，

然后风干。在表面消毒的穗上的各个米粒中分离出未成熟胚。在接种玉米细胞之前，将农杆菌细胞在室温培养过夜。将切下来的未成熟的玉米胚立即与农杆菌在一起，并与农杆菌在室温共同孵育 5-20 分钟。把未成熟胚与农杆菌在 23℃ 避光共同培养 1-3 天。共培养后的胚被转移至选择培养基中并培养大约两周让胚愈伤组织得以发育。胚愈伤组织再被转移到含有 100 mg/L 巴龙霉素的培养基中，间隔大概两周进行亚培养。在初始筛选后 6-8 周可得到转化株。

制备质粒载体克隆在表 1 中鉴定的 DNA，以用于玉米的转化并且产生转基因玉米植物和种子。

对于玉米愈伤组织农杆菌介导的转化，未成熟胚需在切割后培养 8-21 天让愈伤组织得以发育。将愈伤组织在室温下与农杆菌悬液共同孵育 30 分钟，然后吸干液体。在非选择条件下将愈伤组织和农杆菌共培养 3-6 后，再用巴龙霉素选择培养大概 6 周，每两周转入新鲜培养液，巴龙霉素抗性愈伤组织被鉴定为含有表达盒中的重组 DNA。

对于用微粒轰击的转化，未成熟玉米胚在轰击之前被分离出来并培养 3-4 天。进行微粒轰击前，制备一种金颗粒悬液，并在上面沉淀期望的重组 DNA 表达盒。如美国专利 5,550,318 和 6,399,861 所阐述，用放电粒子加速基因递送仪将 DNA 导入玉米细胞。在微粒轰击之后，将组织于 27℃ 下避光培养。

为了产生转基因玉米植物，由转化产生的转基因愈伤组织被置于培养基上以开始枝杆发育并形成小植物，将小植物转移到盆栽土壤中在 26℃ 培养室中进行初始培养，接着进行“mist bench”，然后将之移植到 5 英寸盆中让植物生长成熟。让植物进行自花授粉，收集产生的种子，用于种子、幼苗、子代 R2 植物或杂合体的筛选，例如上述的产量筛选试验。

实施例 3

该实施例进一步说明对具有改良农业性状，即相对于对照植物来说提高的氮利用率、高产、提高的水利用率、改良的耐冻性和/或改良的种子成份，的转基因玉米种子的生产和鉴定。通过转化，制备了含有重组 DNA 的转基因玉米种子和植物，该重组 DNA 来自于克隆在如表 1 中所鉴定的基础载体之一中的各个基因。许多转基因事件虽然可

产生存活的可育转基因植物并能产生种子和子代植物，但却不能显现出改良的农业性状。具有本发明所述改良农业性状的转基因植物和种子通过筛选其氮利用率、产量、水利用率和抗冻性而被鉴定出来。具有改良种子成分的供种转基因植物通过分析种子的成分包括蛋白、油脂和淀粉含量而被鉴定出来。

A. 提高的氮利用率

本发明提供的具有提高的氮利用率的转基因植物是通过按照上述的标准程序的筛选过程而筛选出来的，以下表 8 显示了这些转基因植物的性能。

表 8

事件 ID	叶片叶绿素范围				叶片叶绿素				新鲜枝杆量			
	百分比 改变	平均数	对照 平均数	P 值	百分比 改变	平均数	对照 平均数	P 值	百分比 改变	平均数	对照 平均数	P 值
ZM_M24857	-1	5366.5	5430	0.75	2	27.8	27.3	0.48	-3	51.6	53.4	0.31
ZM_M24857	-24	4150.6	5430	0.00	-8	25.1	27.3	0.01	-33	36	53.4	0.00
ZM_M24861	12	3811.5	3397.7	0.00	7	25.2	23.5	0.02	8	31.2	28.8	0.02
ZM_M24861	0	5430.4	5430	1.00	6	28.9	27.3	0.04	1	54.2	53.4	0.66
ZM_M24870	-2	5347.4	5430	0.68	-1	27	27.3	0.72	-9	48.9	53.4	0.01
ZM_M24870	-3	5268.1	5430	0.41	5	28.6	27.3	0.10	-5	50.8	53.4	0.14
ZM_M24873	-7	5023.8	5430	0.04	-9	24.8	27.3	0.00	-18	43.7	53.4	0.00
ZM_M24873	-5	5159.9	5430	0.17	4	28.4	27.3	0.15	-11	47.7	53.4	0.00
ZM_M24874	-3	5289.5	5430	0.48	2	27.8	27.3	0.50	-3	51.9	53.4	0.40
ZM_M24874	-2	5319.7	5430	0.58	1	27.5	27.3	0.77	-2	52.4	53.4	0.58
ZM_M26391	-9	4914.4	5430	0.01	0	27.2	27.3	0.91	-2	52.5	53.4	0.60
ZM_M26391	-3	5273.7	5430	0.43	3	28	27.3	0.35	-2	52.2	53.4	0.48

产量

本发明提供的具有改良产量的转基因植物是通过按照上述的标准程序的筛选过程而筛选出来的，以下表 9 和表 10 显示了这些转基因植物的性能，在表示玉米产量的变化上是用蒲式耳/英亩为单位的。

表 9

事件	大面积产量		高密度产量
	第1年	第2年	
24861	3.9	-2.22	-5.3
24862	0.51	-1.86	2.8
24870	2.33	5.41	7.81
24874	5.21	2.61	8.21
26391	1.13	-3.59	5.1

表 10

事件	Δ	百分比改变	P 值
ZM_M81660	-6.20	-3.47	0.05
ZM_M81671	-21.99	-12.32	0.00
ZM_M81675	-23.94	-13.41	0.00
ZM_M81677	-3.71	-2.08	0.23
ZM_M81682	-5.58	-3.12	0.11
ZM_M81684	-14.72	-8.25	0.00
ZM_M81687	4.83	2.71	0.13
ZM_M81688	-14.64	-8.20	0.00

水利用率

本发明提供的具有改良水利用率的转基因植物是通过按照上述的标准程序的筛选过程而筛选出来的，以下表 11 显示了这些转基因植物的性能。

表 11

事件	% SAH	P 值 SAH	% RGR	P 值 RGR	% SDM	P 值 SDM	% RWC	P 值 RWC
ZM_M24857	1.02	0.02	1.63	0.05	3.29	0.02	1.52	0.16
ZM_M24857	- 4.22	0.00	10.66	0.00	-4.33	0.00	4.59	0.00
ZM_M24861	- 1.53	0.00	2.09	0.01	2.88	0.03	2.65	0.02
ZM_M24861	- 2.75	0.00	5.85	0.00	0.33	0.81	4.86	0.00
ZM_M24862	- 0.56	0.20	-5.05	0.00	3.33	0.01	-3.04	0.01
ZM_M24870	- 3.17	0.00	8.47	0.00	-4.36	0.00	-1.29	0.23
ZM_M24870	0.29	0.50	1.24	0.12	-0.36	0.79	-2.05	0.06
ZM_M24873	- 3.54	0.00	6.88	0.00	-4.88	0.00	1.30	0.25
ZM_M24873	- 4.61	0.00	10.51	0.00	-3.08	0.02	-1.92	0.08
ZM_M24874	0.00	1.00	-3.57	0.00	2.96	0.03	-2.45	0.03
ZM_M24874	- 1.96	0.00	2.17	0.01	-0.60	0.66	1.16	0.31
ZM_M26391	- 2.18	0.00	4.02	0.00	-1.01	0.45	-0.11	0.92
ZM_M26391	0.76	0.08	-4.44	0.00	2.77	0.04	2.67	0.01

抗冻性

本发明提供的具有改良抗冻性的转基因植物是通过按照上述的标准程序的筛选过程而筛选出来的，以下表 12 显示了这些转基因植物早期幼苗的生长性能。

表 12

事件 ID	根长度				枝杆长度				苗长度			
	百分比 改变	平均数	对照 平均数	P 值	百分比 改变	平均数	对照 平均数	P 值	百分比 改变	平均数	对照 平均数	P 值
ZM_M24857	23	14.81	12.07	0.01	15	10.07	8.77	0.02	19	24.89	20.84	0.01
ZM_M24857	18	14.1	11.97	0.01	6	10.35	9.72	0.13	13	24.45	21.69	0.02
ZM_M24857	9	13.69	12.56	0.03	12	9.13	8.17	0.01	10	22.81	20.74	0.01
ZM_M24857	14	13.68	11.97	0.04	10	10.66	9.72	0.02	12	24.33	21.69	0.03
ZM_M24857	-11	10.12	11.39	0.10	-3	8.24	8.48	0.64	-8	18.36	19.87	0.21
ZM_M24861	5	13.43	12.79	0.32	-10	7.71	8.58	0.07	-1	21.13	21.37	0.82
ZM_M24861	4	12.4	11.97	0.61	-3	9.43	9.72	0.48	1	21.83	21.69	0.91
ZM_M24861	-10	10.15	11.32	0.11	-12	8.96	10.22	0.01	-11	19.11	21.54	0.04
ZM_M24862	-9	10.32	11.32	0.17	-7	9.47	10.22	0.14	-8	19.79	21.54	0.13
ZM_M24870	14	13.65	11.97	0.05	7	10.43	9.72	0.09	11	24.09	21.69	0.04
ZM_M24870	-2	12.28	12.56	0.59	1	8.29	8.17	0.75	-1	20.58	20.74	0.83
ZM_M24870	11	13.31	11.97	0.11	4	10.11	9.72	0.34	8	23.42	21.69	0.14
ZM_M24870	0	10.46	10.45	0.98	2	8.08	7.96	0.82	1	18.55	18.41	0.89
ZM_M24873	10	13.2	11.97	0.14	5	10.2	9.72	0.25	8	23.39	21.69	0.15
ZM_M24873	-8	11.83	12.79	0.13	-10	7.75	8.58	0.08	-8	19.58	21.37	0.08

ZM_M24873	17	14.06	11.97	0.01	16	11.3	9.72	0.00	17	25.36	21.69	0.00
ZM_M24873	-7	11.74	12.56	0.11	0	8.16	8.17	0.98	-4	19.91	20.74	0.28
ZM_M24874	-13	11.15	12.79	0.01	-19	6.92	8.58	0.00	-15	18.07	21.37	0.00
ZM_M24874	13	13.52	11.97	0.07	8	10.54	9.72	0.05	11	24.06	21.69	0.05
ZM_M24874	-10	11.33	12.56	0.02	-4	7.87	8.17	0.43	-7	19.21	20.74	0.05
ZM_M24874	2	12.25	11.97	0.74	7	10.39	9.72	0.11	4	22.64	21.69	0.42
ZM_M26391	23	14.72	11.97	0.00	17	11.37	9.72	0.00	20	26.08	21.69	0.00
ZM_M26391	-6	11.82	12.56	0.15	7	8.72	8.17	0.16	-1	20.54	20.74	0.80
ZM_M26391	-23	8.09	10.45	0.00	-14	6.88	7.96	0.04	-19	14.97	18.41	0.00
ZM_M26391	9	13.01	11.97	0.21	10	10.72	9.72	0.02	9	23.72	21.69	0.09

表 13 油脂

事件	重组体	Y2 杂交数据				Y1 杂交数据			
		平均数	对照平均数	百分比改变	P 值	平均数	对照平均数	百分比改变	P 值
ZM_M24870	PMON68392	4.48	4.29	4.28	0.18	0.04	0.14	0.15	0.15
ZM_S68719	PMON74775	4.43	4.12	7.38	0.30	0.00	#N/A	#N/A	#N/A
ZM_S69656	PMON74775	4.36	4.12	5.59	0.23	0.03	0.33	0.02	0.02

改良的种子组成

本发明提供的具有改良种子组成的转基因植物是通过按照上述的标准程序的筛选过程而筛选出来的，以下表 13-5 显示了这些转基因植物的性能。

表 14 油脂

事件	构建体	平均值	平均对照	Δ	P 值
ZM_M92534	PMON84131	4.94	4.51	0.42	0.00
ZM_M91731	PMON84131	4.90	4.51	0.38	0.01
ZM_M92532	PMON84131	4.87	4.51	0.35	0.02

表 15 蛋白质

事件	构建体	蛋白质 Δ	蛋白质 p 值
ZM_M24870	PMON68392	0.44	0.02
ZM_S68719	PMON74775	0.35	0.12
ZM_S69656	PMON74775	0.21	0.35

实施例 4

该实施例阐明了具有通过组合的改良性状的转基因植物。如实施例 3 中所述，通过引入来自于表 1 所鉴定的各个基因的重组 DNA，产生具有各种改良农业性状的转基因植物。为了将这些转基因植物农业性状进一步改良，将表 1 中的基因与一个或多个能够改良农业性状的其它基因进行组合，以产生相对于单独使用其中一个基因，在一个或多个农业性状上具有更高改良的转基因植物。达到这种组合形式，可以通过转化的方法也可以使用育种的方法。以下的例子可说明这种原理。一种转基因玉米植物由质粒 pMON74923 稳定转化，该质粒含有由玉米醛缩酶（FDA）启动子（美国专利申请 No.09/757,089）控制的玉米植物色素 B（phyB）基因（SEQ ID NO: 15），将该玉米植物与由 pMON68392 稳定转化的转基因玉米植物杂交。相对于只含 phyB 基因的玉米植物提高的产量（2.4%），杂交品种提高的产量（bu./a）

达到 7.2%。

实施例 5. 大豆植物的转化

该实施例说明了用于生产本发明所述转基因大豆上的植物转化，以及用于产生具有改良农业性状的转基因大豆的转基因种子的生产和鉴定，即相对于对照植物具有的提高了的氮利用率、提高了的产量、改良水利用率、在寒冷压力下改良的生长力和/或改良的种子油脂、蛋白和/或淀粉含量。对于农杆菌介导的转化，让大豆种子萌发过夜，切下分生组织外植块。将分生组织和外植块放进一个创伤管里。将大豆外植块和包含质粒 DNA 的农杆菌株诱导细胞混合在一起，该质粒 DNA 带有目的表达盒的基因和一个植物选择性标记盒，整个过程从种子萌发起始到声裂创伤时间不超过 14 个小时。在创伤处理之后，将外植块共同培养 2-5 天，然后将它们转移到选择培养基中培养 6-8 周让转基因枝杆得以选择和生长。性状阳性枝杆在大约在轰击后 6-8 周时收集，并放于选择性生根培养基中 2-3 周。长出根的枝杆被转移到温室，在土壤中盆栽。在选择培养时保持健康但不生根的枝杆被转移至非选择性生根培养基中继续培养两周。在所有选择结束后生根的枝杆移植于温室土壤盆栽之前，测定这些枝杆的根是否有植物选择性标记表达。

实施例 6

该实施例进一步阐述了用于产生具有改良农业性状的转基因大豆的转基因种子的生产和鉴定，这些改良的性状即是相对于对照植物所具有的提高了的氮利用率、提高了的产量、改良水利用率、在寒冷压力下改良的生长力和/或改良的种子成份。通过转化制备了包含重组 DNA 转基因大豆种子和植物，该重组 DNA 来自于克隆在如表 1 中所鉴定的基础载体之一中的各个基因。许多转基因事件虽然可产生存活的可育转基因植物并能产生种子和子代植物，但却不能显现出改良的农业性状。具有本发明所述改良的农业性状转基因植物和种子通过筛选其氮利用率、产量、水利用率和抗冻性而鉴定出来。具有改良种子成分的供种转基因植物通过分析种子的成分包括蛋白、油脂和淀粉含量而被鉴定出来。

<110> Monsanto Technology LLC
 Lund, Adrian
 Deikman, Jill
 Anstrom, Donald
 Chomet, Paul
 Heard, Jacqueline

<120> 具有改良农业性状的转基因植物

<130> 38-21(53720)C

<150> 60/638,099

<151> 2004-12-21

<150> 60/660,320

<151> 2005-03-10

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 828

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 1

atgataaaac tactathttac gtacatatgc acatacacat ataaactata tgctctatat 60

catatggatt acgcatgcgt gtgtatgtat aaatataaag gcatcgtcac gettcaagtt 120

tgtctctttt atattaaact gagagttttc ctctcaaact ttaccttttc ttcttegatc 180

ctagctctta agaaccctaa taattcattg atcaaaataa tggcgathtt gccgaaaac 240

tcttcaaact tggatcttac tatctccggt ccaggcttct cttcatcccc tctctccgat 300

gaaggaagtg gcggaggaag agaccagcta aggctagaca tgaatcggtt accgtcgtct 360

gaagacggag acgatgaaga attcagtcac gatgatgget ctgctcctcc gcgaaagaaa 420

ctccgtctaa ccagagaaca gtcacgtctt cttgaagata gtttcagaca gaatcatacc 480
 cttaatccca aacaaaagga agtacttgcc aagcatttga tgctacggcc aagacaaatt 540
 gaagtttggt ttcaaaaccg tagagcaagg agcaaattga agcaaaccga gatggaatgc 600
 gagtatctca aaaggtgggt tggttcatta acggaagaaa accacaggct ccatagagaa 660
 gtagaagagc ttagagccat aaaggttgcc ccaacaacgg tgaactctgc ctcgagcett 720
 actatgtgtc ctgctgcga gcgagttacc cctgccgcga gcccttcgag ggcggtgggtg 780
 ccggttccgg ctaagaaaac gtttccgccg caagagcgtg atcgttga 828

<210> 2

<211> 678

<212> DNA

<213> 玉米

<400> 2

atgggggtcca cttctccttc aggcctggag ctccacatgg ctgtcccggg cctcagctcc 60
 tcctctggct cagaggggtt tggatgcaac aacaacaacg ggagcgggaa cggaacaac 120
 atgagggacc tggacatgaa ccagccggcg agcggcggcg aggaggagga gttcccaatg 180
 gggagcgtgg aggaggagga ggacgagcgc ggcggcggcg gcgggcccga ccgcgccaaag 240
 aagctccggc tgtccaagga gcagtcgcc ctcttgagg agagcttccg cctcaaccac 300
 accctcacac ogaagcaaaa ggaggccttg gctgtcaagc tcaagctgcg gccaggcag 360
 gtggaggtet ggttccagaa ccgcagggtt aggacgaagc ttaagcagac ggagctggag 420
 tgcgagtacc tgaagcgtg cttcggctcg ctgaccgagg agaaccggcg gctgcagcgg 480
 gaggtggagg agctgcgcgc gatgcgggtg gccccccca ccgtgctctc cccgcacacc 540
 cggcagccgc tcccggctc cgcgctcacc atgtccccg getgcgagcg catcacccgc 600
 gcaacggccg cgcgcacccc acgcccgcg cccgcgcga gcccttcca cccgcgcgc 660

ccgtccgcgg cgtttttag 678

<210> 3

<211> 642

<212> DNA

<213> 大豆

<400> 3

atggcgggtt taccaagtag ctctcaagc ttggaattga ccatatctgt acctggtttt 60

gcttcttcac caaccttct tcctcatca totgtgaaag aattggacat aatcaagta 120

cctcttgaag aagattggat ggcataaac atggaagatg aagaagaaag cagcaatgga 180

gaacctctc gaaagaaact ccgtctcaca aaggaacaat ctcttctct tgaagaaagc 240

tttagacaaa accacacggt gaacccaaag cagaaagagt ctttggcaat gcaactgaag 300

ctgcgaccaa ggcaagtgga ggtgtggttt cagaaccgta gggccaggag caagctgaag 360

cagacagaga tggagtgcga gtacctcaag aggtggttcg gtteccctcac agagcagaac 420

cggaggtcc agaggggaagt ggaggagctg cgagccatta aggtgggccc acccaccgtg 480

atctcccctc actcctgcga accgtcccg gcctccacac tttccatgtg tccccgtgc 540

gagcgtgtca cctccaccgc cgacaaaccg cctccgcgg cggccacttt gtccgctaaa 600

gtgccgcaa ctcaatccc ccaacctcc gggcctgtt ag 642

<210> 4

<211> 690

<212> DNA

<213> 水稻

<400> 4

atgatggggg ccattctcc gtcaggcctg gagctacca tggctgtccc cggcctcagc 60

tctctggtt cagaaggggc cggttgcaac aacaacaacg ccggtggcgg ctgcaacatg 120

agggacctgg acatcaacca gccggcgagc ggoggcgagg aggaggagt cccgatgggc 180

agcgtggagg aggacgagga ggagaggggc gtcggtgggc cccaccgccc caagaagctc 240
 cgcctctcca aggagcagtc ccgcctctc gaggagagct tccgcctcaa ccataccctc 300
 acgccgaagc aaaaggaggc cttggcgatc aaactgaagc tgcggccgag gcaggtggag 360
 gtctggtttc agaaccgtag ggcaaggacg aagctgaagc agacggagat ggagtgcgag 420
 tacctgaagc gctgcttcgg gtcgctgacg gaggagaacc gccggetgca gcgggaggtg 480
 gaggagctgc gggegatgcg ggtggccccc cccacggtgc tctcgcgca caccaggcag 540
 ccgctccggc cgteccgct caccatgtgc ccccgtgcg agcgcatac cgcccccacc 600
 ggcccgcctg ccgtgcgccc gccgcgctc tcagccgccc ccgcccgcc ctcgcccttc 660
 caccctcgcc gccctctgc ggccttctag 690

<210> 5

<211> 275

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 5

Met Ile Lys Leu Leu Phe Thr Tyr Ile Cys Thr Tyr Thr Tyr Lys Leu
 1 5 10 15

Tyr Ala Leu Tyr His Met Asp Tyr Ala Cys Val Cys Met Tyr Lys Tyr
 20 25 30

Lys Gly Ile Val Thr Leu Gln Val Cys Leu Phe Tyr Ile Lys Leu Arg
 35 40 45

Val Phe Leu Ser Asn Phe Thr Phe Ser Ser Ser Ile Leu Ala Leu Lys
 50 55 60

Asn Pro Asn Asn Ser Leu Ile Lys Ile Met Ala Ile Leu Pro Glu Asn

65	70	75	80
Ser Ser Asn Leu Asp Leu Thr Ile Ser Val Pro Gly Phe Ser Ser Ser	85	90	95
Pro Leu Ser Asp Glu Gly Ser Gly Gly Gly Arg Asp Gln Leu Arg Leu	100	105	110
Asp Met Asn Arg Leu Pro Ser Ser Glu Asp Gly Asp Asp Glu Glu Phe	115	120	125
Ser His Asp Asp Gly Ser Ala Pro Pro Arg Lys Lys Leu Arg Leu Thr	130	135	140
Arg Glu Gln Ser Arg Leu Leu Glu Asp Ser Phe Arg Gln Asn His Thr	145	150	155
Leu Asn Pro Lys Gln Lys Glu Val Leu Ala Lys His Leu Met Leu Arg	165	170	175
Pro Arg Gln Ile Glu Val Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Arg Ser Lys	180	185	190
Leu Lys Gln Thr Glu Met Glu Cys Glu Tyr Leu Lys Arg Trp Phe Gly	195	200	205
Ser Leu Thr Glu Glu Asn His Arg Leu His Arg Glu Val Glu Glu Leu	210	215	220
Arg Ala Ile Lys Val Gly Pro Thr Thr Val Asn Ser Ala Ser Ser Leu	225	230	235
Thr Met Cys Pro Arg Cys Glu Arg Val Thr Pro Ala Ala Ser Pro Ser	245	250	255

Arg Ala Val Val Pro Val Pro Ala Lys Lys Thr Phe Pro Pro Gln Glu
 260 265 270

Arg Asp Arg
 275

<210> 6

<211> 225

<212> PRT

<213> 玉米

<400> 6

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

Gly Leu Ser Ser Ser Ser Gly Ser Glu Gly Phe Gly Cys Asn Asn Asn
 20 25 30

Asn Gly Ser Gly Asn Gly Asn Asn Met Arg Asp Leu Asp Met Asn Gln
 35 40 45

Pro Ala Ser Gly Gly Glu Glu Glu Glu Phe Pro Met Gly Ser Val Glu
 50 55 60

Glu Glu Glu Asp Glu Arg Gly Gly Ala Gly Gly Pro His Arg Ala Lys
 65 70 75 80

Lys Leu Arg Leu Ser Lys Glu Gln Ser Arg Leu Leu Glu Glu Ser Phe
 85 90 95

Arg Leu Asn His Thr Leu Thr Pro Lys Gln Lys Glu Ala Leu Ala Val
 100 105 110

Lys Leu Lys Leu Arg Pro Arg Gln Val Glu Val Trp Phe Gln Asn Arg
 115 120 125

Arg Ala Arg Thr Lys Leu Lys Gln Thr Glu Leu Glu Cys Glu Tyr Leu
 130 135 140

Lys Arg Cys Phe Gly Ser Leu Thr Glu Glu Asn Arg Arg Leu Gln Arg
 145 150 155 160

Glu Val Glu Glu Leu Arg Ala Met Arg Val Ala Pro Pro Thr Val Leu
 165 170 175

Ser Pro His Thr Arg Gln Pro Leu Pro Ala Ser Ala Leu Thr Met Cys
 180 185 190

Pro Arg Cys Glu Arg Ile Thr Ala Ala Thr Ala Ala Arg Thr Pro Arg
 195 200 205

Pro Pro Pro Ala Ala Ser Pro Phe His Pro Arg Arg Pro Ser Ala Ala
 210 215 220

Phe
 225

<210> 7

<211> 213

<212> PRT

<213> 大豆

<400> 7

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

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

Lys Glu Leu Asp Ile Asn Gln Val Pro Leu Glu Glu Asp Trp Met Ala
 35 40 45

Ser Asn Met Glu Asp Glu Glu Glu Ser Ser Asn Gly Glu Pro Pro Arg
 50 55 60

Lys Lys Leu Arg Leu Thr Lys Glu Gln Ser Leu Leu Leu Glu Glu Ser
 65 70 75 80

Phe Arg Gln Asn His Thr Leu Asn Pro Lys Gln Lys Glu Ser Leu Ala
 85 90 95

Met Gln Leu Lys Leu Arg Pro Arg Gln Val Glu Val Trp Phe Gln Asn
 100 105 110

Arg Arg Ala Arg Ser Lys Leu Lys Gln Thr Glu Met Glu Cys Glu Tyr
 115 120 125

Leu Lys Arg Trp Phe Gly Ser Leu Thr Glu Gln Asn Arg Arg Leu Gln
 130 135 140

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

Ile Ser Pro His Ser Cys Glu Pro Leu Pro Ala Ser Thr Leu Ser Met
 165 170 175

Cys Pro Arg Cys Glu Arg Val Thr Ser Thr Ala Asp Lys Pro Pro Ser
 180 185 190

Ala Ala Ala Thr Leu Ser Ala Lys Val Pro Pro Thr Gln Ser Arg Gln

Arg Thr Lys Leu Lys Gln Thr Glu Met Glu Cys Glu Tyr Leu Lys Arg
 130 135 140

Cys Phe Gly Ser Leu Thr Glu Glu Asn Arg Arg Leu Gln Arg Glu Val
 145 150 155 160

Glu Glu Leu Arg Ala Met Arg Val Ala Pro Pro Thr Val Leu Ser Pro
 165 170 175

His Thr Arg Gln Pro Leu Pro Ala Ser Ala Leu Thr Met Cys Pro Arg
 180 185 190

Cys Glu Arg Ile Thr Ala Ala Thr Gly Pro Pro Ala Val Arg Pro Pro
 195 200 205

Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ser Pro Phe His Pro Arg Arg
 210 215 220

Pro Ser Ala Ala Phe
 225

<210> 9

<211> 9215

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体

<400> 9

actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg 60

ctgccataac catgagtgat aacaactgagg ccaacttact tctgacaacg atcgaggac 120

cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt	180
gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag	240
caatggcaac aacgttgcgc aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccgcg	300
aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc	360
ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta	420
tcattgcagc actggggcca gatggttaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg	480
ggagtcaggc aactatggat gaacgaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga	540
ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac	600
ttcattttta atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa	660
tccttaacg tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat	720
cttcttgaga tcctttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc	780
taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg	840
gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc	900
acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcctct gctaatcctg ttaccagtgg	960
ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggc ctcaagacga tagttaccgg	1020
ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa	1080
cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttccc	1140
aaggagaaaa ggccgacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga	1200
gggagcttcc agggggaaac gcctgtatc tttatagtcc tgtcgggttt cgcacctct	1260
gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt cagggggcg gagcctatgg aaaaacgcca	1320
gcaacgcggc ctttttacgg ttctggcct tttgctggcc ttttctcac atgttcttc	1380
ctgcgttate cctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg	1440
ctcgcgcag ccgaacgacc gagcgcagc agtcagtga cgaggaagcg gaagagcgc	1500

caatacgc	aaaccgctctc	cccgcgcg	ttggcattca	ttaatgcagc	tggcacgaca	1560
ggtttcccga	ctggaaagcg	ggcagtgagc	gcaacgcaat	taatgtgagt	tagctcactc	1620
attaggcacc	ccagccttta	cactttatgc	ttccggctcg	tatgtttgtg	ggaattgtga	1680
goggataaca	atttcacaca	ggaaacagct	atgacatga	ttacgccaaag	ctcgaaatta	1740
accctcacta	aagggaaaca	aagetggagc	tgagtactgg	cgcgcctcgc	gccgcctcga	1800
ggtcattcat	atgcttgaga	agagagtcgg	gatagtccaa	aataaaaca	aggtaagatt	1860
acctggtaaa	aagtgaaaac	atcagttaaa	aggtggtata	aagtaaaata	tcggtaataa	1920
aaggtggccc	aaagtgaat	ttactctttt	ctactattat	aaaaattgag	gatgtttttg	1980
tcggctacttt	gatacgtcat	ttttgtatga	attggttttt	aagttttatc	gcttttgtaa	2040
atgcatactc	gtatttgagt	cgggttttaa	gttcgtttgc	ttttgtaaat	acagagggat	2100
ttgtataaga	aatatcttta	aaaaaaccca	tatgctaatt	tgacataatt	tttgagaaaa	2160
atatatattc	aggcgaattc	tcacaatgaa	caataataag	attaaaatag	ctttcccccg	2220
ttgcagcgc	atgggtat	ttctagtaaa	aataaaagat	aaacttagac	tcaaaacatt	2280
tacaaaaaca	accctaaag	ttcctaaagc	caaagtgc	atccacgac	cattagcaag	2340
gcccagccca	accctaaagc	accctaaagc	cccagtc	gccaactgga	caatagtctc	2400
cacccccgc	actatcaccg	tgagttgtcc	gcaccaccgc	acgtctcgca	gccaaaaaaa	2460
aaaaagaaa	gaaaaaaaag	aaaaagaaa	acagcaggtg	ggccggggtc	gtggggggccg	2520
gaaaagcgag	gaggatcgcg	agcagcgacg	aggccccgcc	ctccctccgc	ttccaaagaa	2580
acgccccca	tcgccaactat	atacataccc	ccccctctcc	tccatcccc	ccaaccctac	2640
caccaccacc	accaccacct	cctccccct	cgtgcggga	cgacgagctc	ctccccctc	2700
ccccctcgcc	gccgcccgtta	accaccccgc	ccctctctc	tttttttctc	cgtttttttt	2760
ttcgtctcgg	tctcgatctt	tgcccttggt	agtttgggtg	ggcgagagcg	gcttcgtcgc	2820

ccagatcggg gcgcgggagg ggcgggatct cgcggctggc gtctccgggc gtgagtcggc	2880
ccgatcctc gcggggaatg gggetctcgg atgtagatct gatccgcctg tgttggggga	2940
gatgatgggg ggtttaaaat ttccgccatg ctaaacaaga tcaggaagag gggaaaagg	3000
cactatggtt tatattttta tatatctctg ctgcttcgtc aggcttagat gtgctagatc	3060
tttcttctt cttttgtgg gtagaatttg aatccctcag cattgttcat cggtagtttt	3120
tcttttcatg atttgtgaca aatgcagcct cgtgcggagc tttttttag gtagaccgag	3180
ggatatcaca agtttgaca aaaaagctga acgagaaacg taaaatgata taaatatcaa	3240
tatattaaat tagattttgc ataaaaaaca gactacataa tactgtaaaa cacaacatat	3300
ccagtcacta tgccggccgc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg	3360
tataatgtgt ggattttgag ttaggatccg tcgagatttt caggagctaa ggaagctaaa	3420
atggagaaaa aatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa	3480
cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat	3540
attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcctttatt	3600
cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggt	3660
gagctgggta tatgggatag tgttaccctt tgttacaccg ttttccatga gcaaaactgaa	3720
acgttttcat cgctctggag tgaataccac gaagatttcc ggcagtttct acacatatat	3780
tcgcaagatg tgccgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tcctaaagg gtttattgag	3840
aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg	3900
gccaatatgg acaacttctt cgccccggtt ttaccatgg gcaaatatta tacccaaggc	3960
gacaagggtc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtctgtga tggcttccat	4020
gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcatg agtggcaggg cggggcgtaa	4080
acgcgtggat ccggcttact aaaagccaga taacagtatg cgtatttgcg cgctgatttt	4140
tcgggtataa gaatatatac tgatatgtat acccgaagta tgtcaaaaag aggtgtgcta	4200

tgaagcagcg tattacagtg acagttgaca gogacagcta tcagttgctc aaggcatata 4260
tgatgtcaat atctccggtc tgtaagcac aaccatgcag aatgaagccc gtcgtctgcg 4320
tgccgaacgc tggaagcgg aaaatcagga agggatggct gaggtcgccc ggtttattga 4380
aatgaacggc tcttttgctg acgagaacag gggctggtga aatgcagttt aaggtttaca 4440
cctataaaag agagagccgt tategtctgt ttgtggatgt acagagtgat attattgaca 4500
cgcccgggcg acggatggtg atccccctgg ccagtgcacg tctgctgtca gataaagtct 4560
cccgtgaact ttaccgggtg gtgcatatcg gggatgaaag ctggcgcag atgaccaccg 4620
atatggccag tgtgccggtc tccgttatcg gggaagaagt ggctgatctc agccaccgcg 4680
aaaatgacat caaaaacgcc attaacctga tgttctgggg aatataaatg tcaggetccc 4740
ttatacacag ccagttctga ggtcgacat agtgactgga tatgttgtgt tttacagtat 4800
tatgtagtct gtttttatg caaaatctaa tttaatatat tgatatttat atcattttac 4860
gtttctcggt cagctttctt gtacaaagtg gtgatgggga tccccaccc tgcaatgtga 4920
ccctagactt gtccatcttc ggatggccaa cttaatattt gtataaataa aaggatgcac 4980
acatagtgac atgctaatca ctataatgtg ggcataaag ttgtgtgta tgtgtaatta 5040
ctaattatct gaataagaga aagagatcat ccatatttct tatectaaat gaatgtcacg 5100
tgtctttata attctttgat gaaccagatg cattttatta accaattcca tatacatata 5160
aatattaate atatataatt aatatcaatt gggtagcaa aacaaatcta gtctaggtgt 5220
gttttgctaa ttattggggg atagtcaaa aagaaatcta cgttctcaat aattcagata 5280
gaaaacttaa taaagtgaga taattacat agattgcttt tatectttga tatatgtgaa 5340
accatgcag atataaggaa aatagataga gaataatth tttacatcgt tgaatatgta 5400
aacaatttaa ttcaagaagc taggaatata aatattgagg agtttatgat tattattatt 5460
atthtgatgt tcaatgaagt ttttttaatt ttcatatgaa gtatacaaaa attcttcata 5520

gatttttgtt tctatgccgt agttatcttt aatatatttg tggttgaaga aatttattgc	5580
tagaaacgaa tggattgtca attttttttt aaagcaaata tatatgaaat tatactgtat	5640
attatttttag teatgattaa aatgtgacct taattgaate atcttttctca ttcatttttt	5700
caaaagcata tcaggatgat tgatatttat ctatttttaa aattaattta agggttcaaa	5760
ttaaatttaa cttaaagtg tcctaacctg agttaaaggt ttactttaaa aaaactat	5820
gaaaaatcta atcttctatg aatcgacctg caggatttaa atccatcgtt ctggggccta	5880
acgggccaag ctttccgac ctaacctgtca ctccatcaaa aggacagtag aaaaggaagg	5940
tggcacctac aatgccate attgcgataa aggaaagget atcattcaag atgcctctgc	6000
cgacagtggc cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt	6060
tccaaccacg tcttcaaagc aagtggattg atgtgatact tccactgacg taagggatga	6120
cgcaaatcc cactatcctt cgcaagacce ttctctata taaggaagtt catttcattt	6180
ggagaggaca cgctgaaatc accagtctct ctctacaaga tcggggatct ctagctagac	6240
gatcgtttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg	6300
agaggetatt cgctatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt	6360
tccggctgtc agcgcagggg cgcccgttc tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgcc	6420
tgaatgaaat gcaggacgag gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt	6480
gocgagctgt gctcgacgtt gtcactgaag ogggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag	6540
tgccggggca ggatctctg tcctctcacc ttgctctgc cgagaaagta tccatcatgg	6600
ctgatgcaat gggcggtctg catacgcttg atccgctac ctgcccattc gaccaccaag	6660
cgaaacatcg catcgagcga gcactactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg	6720
atctggacga agagcatcag gggctcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc	6780
gcatgccga cggcgaggat ctctctgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca	6840
tgggtgaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg cggctgggt gtggegacc	6900

gctatcagga catagcggtg gctacccgtg atattgctga agagcttggc ggcgaatggg	6960
ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg ccgctcccga ttgcgagcgc atcgcccttct	7020
atcgcccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttcgaagaat tcccgatcgt	7080
tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg ttgceggctt tgcgatgatt	7140
atcatataat ttctgttgaa ttacgttaag catgtaataa ttaacatgta atgcatgacg	7200
ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat tatacattta atacgcgata	7260
gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc gcgcggtgtc atctatgta	7320
ctagatcggg gatatcgcgt gtctttataa ttctttgatg aaccagatgc attttattaa	7380
ccaattccat atacatataa atattaatca tatataatta atatcaattg ggtagcaaaa	7440
acaaatctag tctaggtgtg ttttgctaata tattggggga tagtgcaaaa agaaatctac	7500
gttctcaata attcagatag aaaacttaata aaagtgatg aatttacata gattgctttt	7560
atcctttgat atatgtgaaa ccatgcatga tataaggaaa atagatagag aaataatttt	7620
ttacatcgtt gaatatgtaa acaatttaata tcaagaagct aggaatataa atattgagga	7680
gtttatgatt attattatta ttttgatggt caatgaagtt ttttttaatt tcatatgaag	7740
tatacaaaaa ttcttcacatg atttttgttt ctatgcccga gttatcttta atatattgt	7800
ggttgaagaa atttattgct agaaacgaat ggattgtcaa tttttttta aagcaaatat	7860
atatgaaatt atactgtata ttattttagt catgattaaa atgtggcctt aattgaaatca	7920
tctttctcat tcattttttc aaaagcatat caggatgatt gatatttate tattttaaaa	7980
attaatttaa gggttcaaat taaatttaac ttaaaagtgt cctaaccgta gttaaagggt	8040
tactttaaaa aaatactatg aaaaatctaa tcttctatga atcgaccgct gatcgatcgc	8100
ggccgctggc gcgccagtac tagctagtac ccaattcgcc ctatagtgag tcgtattaca	8160
attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta	8220

atcgccettgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccg 8280
 atcgccettc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gaaattgtaa gcgttaatat 8340
 tttgttaaaa ttgcggttaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga 8400
 aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgtttgtcc 8460
 agtttggaac aagagtccac tattaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac 8520
 cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacce taatcaagtt ttttggggtc 8580
 gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg 8640
 gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag 8700
 ggcgctggca agtgtagogg tcacgctgcg cgtaaccacc acaccgccc cgcttaatgc 8760
 gccgctacag ggcgctcag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg 8820
 tttatttttc taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat 8880
 gcttcaataa tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat 8940
 tccctttttt ggggcatttt gccttctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt 9000
 aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag 9060
 cggtaagatc cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa 9120
 agttctgeta tgtggcggg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg 9180
 ccgatacac tattctcaga atgaactggt tgagt 9215

<210> 10

<211> 9747

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体

<400> 10

```

ccgacctac ctgtcacttc atcaaaagga cagtagaaaa ggaaggtggc acctacaaat    60

gccatcattg cgataaagga aaggetatca ttcaagatgc ctctgccgac agtgggccca    120

aagatggacc cccacccaag aggagcatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtett    180

caaagcaagt ggattgatgt gataacttcca ctgacgtaag ggatgacgca caatcccact    240

atccttcgca agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggacacgct    300

gaaatcacca gtctctctct acaagatcgg ggatctctag ctagacgate gtttcgcatg    360

attgaacaag atggattgca cgcaggttct cggcccgctt ggggtggagag gctattcggc    420

tatgactggg cacaacagac aatcggetgc tctgatgcog ccgtgttccg gctgtcagcg    480

caggggcgcc cggttctttt tgcaagacc gacctgtcog gtgccctgaa tgaactgcag    540

gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc acgacgggcg ttccttgccg agctgtgctc    600

gacgtttgca ctgaagcggg aagggactgg ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat    660

ctcctgtcat ctcaccttgc tectgccgag aaagtatcca tcatggctga tgcaatgcgg    720

cggctgcata cgtttgatcc ggtacactgc ccattcgacc accaagcgaa acatcgcac    780

gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag    840

catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc gccaggetca aggcgcgcat gcccgcggc    900

gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc tgettgcga atatcatggt ggaaaatggc    960

cgcttttctg gattcatoga ctgtggccgg ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata   1020

gcgttggcta cccgtgatat tgctgaagag cttggcggcg aatgggctga ccgcttcctc   1080

gtgctttacg gtatcgcgcg tcccattcg cagcgcacg ccttctatcg ccttcttgac   1140

gagttcttet gagegggact ctggggttcg aagaattccc gatcgttcaa acatttggca   1200

ataaagtttc ttaagattga atcctgttgc cggctttgag atgattatca tataatttct   1260

gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg   1320

```

ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata	1380
gcgcgcaaac taggataaat tategcgcgc ggtgtcatct atgttaactag atcggggata	1440
tgcggtgtct ttataattct ttgatgaacc agatgcattt tattaaccaa ttccatatac	1500
atataaatat taatcatata taattaatat caattgggtt agcaaaacaa atctagtcta	1560
ggtgtgtttt gctaattatt ggggatagtg gcaaaaagaa atctacgttc tcaataattc	1620
agatagaaaa cttataaag tgagataatt tacatagatt gcttttatcc tttgatatat	1680
gtgaaacct gcatgatata aggaaaatag atagagaaat aatTTTTTtac atcgttgaat	1740
atgtaaacaa ttttaattcaa gaagctagga atataaatat tgaggagttt atgattatta	1800
ttattatfff gatgttcaat gaagttffff ttaatttcat atgaagtata caaaaattct	1860
tcatagattt ttgtttctat gccgtagtta tctttaatat atttgtggtt gaagaaattt	1920
attgctagaa acgaatggat tgcaatttt tttttaaage aaatatatat gaaattatac	1980
tgtatattat tttagtcatg attaaaatgt ggccttaatt gaatcatctt tctcattcat	2040
tttttcaaaa gcataatcagg atgattgata tttatctatt ttaaaaatta atttaagggt	2100
tcaaattaa ttttaacttaa aagtgtccta accgtagtta aaggtttact ttaaaaaaat	2160
actatgaaaa atctaattct ctatgaatcg accgctgac gatcgcggcc gctggcgcgc	2220
cctcgagagg cctcatctaa gccccattt ggacgtgaat gtagacacgt cgaaataaag	2280
atttccgaat tagaataatt tgtttattgc ttttcctat aaatacgaag gatcgttaatt	2340
tgtcgtttta tcaaaatgta ctttcatttt ataataacgc tgcggacatc tacatttttg	2400
aattgaaaa aaattggtaa ttactcttcc tttttctcca tattgaccat catactcatt	2460
gctgatccat gtagatttcc cggacatgaa gccatttaca attgaatata tcttgcgcgc	2520
gctgccgctt tgcaccgggt ggagcttgca tgttggtttc tacgcagaac tgagccggtt	2580
aggcagataa tttccattga gaactgagcc atgtgcacct tcccccaac acggtgagcg	2640
acggggcaac ggagtgatcc acatgggact tttcctagct tggtgccat ttttgggggtg	2700

aggccgttgc cggccgaggg gcgcagcccc tgggggatg ggaggcccgc gttagcgggc 2760
 cgggaggggtt cgagaagggg gggcaccccc ctctggcgtg cgcggtcacg cgcacagggc 2820
 gcagccctgg ttaaaaaaa ggtttataaa tattggttta aaagcaggtt aaaagacagg 2880
 ttagcgggtg cggaaaaacg ggcggaaacc cttgcaaatg ctggattttc tgccctgtga 2940
 cagcccctca aatgtcaata ggtgcgcccc tcatctgtca gcaactctgc cctcaagtgt 3000
 caaggatcgc gcccctcacc tgtcagtagt cgcgcccctc aagtgtcaat accgcagggc 3060
 acttatcccc aggettgtcc acatcatctg tgggaaactc gcgtaaaatc aggcgttttc 3120
 gccgatttgc gaggttgccc agtccacgt cgcggccga aatcgagcct gcccctcacc 3180
 tgtcaacgcc gcgcgggtg agtcggcccc tcaagtgtca acgtccgccc ctcatctgtc 3240
 agtgagggcc aagttttccg cgaggatcc acaacgcgg cgccggccg cgggtgtctgc 3300
 cacacggctt cgacggcgtt tctggcgcgt ttgcagggcc atagacggcc gccagcccag 3360
 cggcgagggc aaccagcccg gtgagcgtcg gaaagggctg atcgaccgat gcccttgaga 3420
 gccttcaacc cagtcagctc ctccgggtg gcgcggggca tgactacggt atcagctcac 3480
 tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 3540
 gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 3600
 aggetccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac 3660
 ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct 3720
 gttccgacce tgccgcttac cggataacctg tccgccttcc tcccttcggg aagcgtggcg 3780
 ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttgc ctccaagctg 3840
 ggcgtgtgtc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctggc ccttatecgg taactatcgt 3900
 cttgagtcca acccggttaag acacgactta tgcacctgg cagcagccac tggtaacagg 3960
 attagcagag cgaggtatgt aggcgggtct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac 4020

ggctacacta gaagaacagt atttggatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga	4080
aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt	4140
gtttgcaagc agcagattac ggcgagaaaa aaagatctc aagaagatcc tttgatcttt	4200
tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt ggtcatgagg	4260
gaagcgggta tcgccgaagt atcgactcaa ctatcagagg tagttggcgt catcgagcgc	4320
catctcgaac cgacgttgct ggccgtacat ttgtacggct ccgcagtgga tggcggcctg	4380
aagccacaca gtgatattga tttgetggtt acggtgaccg taaggcttga tgaacaacg	4440
cggcgagctt tgatcaacga ctttttgaa acttcggctt cccttgaga gagcgagatt	4500
ctccgcgctg tagaagtcac cattgttggt cacgacgaca tcattccgtg gcgttatcca	4560
gctaagcgcg aactgcaatt tggagaatgg cagcgcaatg acattcttgc aggtatcttc	4620
gagccagcca cgatcgacat tgatctggct atcttgctga caaaagcaag agaacatagc	4680
gttgcccttg taggtccagc ggccgaggaa ctctttgatc cggttcctga acaggatcta	4740
tttgaggcgc taaatgaaac cttaacgcta tggaaactgc cgcccactg ggctggcgat	4800
gagcgaaatg tagtgcttac gttgtcccgc atttggtaaa gcgcagtaac cggcaaaatc	4860
gcgccgaagg atgtcgtcgc cgactgggca atggagcgc tgcggccca gtatcagccc	4920
gtcatacttg aagctaggca ggcttatctt ggacaagaag atcgcttggc ctgcgcgca	4980
gatcagttgg aagaatttgt tcaactcgtg aaaggcgaga tcaccaaggt agtcggcaaa	5040
taatgtctaa caattcgttc aagccgacgc cgttcgcgg cgcggcttaa ctcaagcgtt	5100
agatgctgca ggcatcgttg tgtaacgctc gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg	5160
ttccaacga tcaaggcgag ttacatgata ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc	5220
cttcggctct ccgategagg attttcggc gctgcgctac gtccgcgacc gcgttgaggg	5280
atcaagccac agcagccac tcgaccttct agccgacca gacgagccaa gggatctttt	5340
tggaatgctg ctccgctcgc aggtttccg acgtttgggt ggttgaacag aagtcattat	5400

cgcacggaat gccaaagcact ccogagggga accctgtggt tggcatgcac atacaaatgg 5460
 acgaacggat aaaccttttc acgccctttt aaatatccga ttattctaataaaacgtcttt 5520
 ttctcttagg ttacccegcc aatatatcct gtcaaact gatagttaa acatgactct 5580
 ctttaagtag ccaaagcccc ggaattcgge gcgcctgagg ccgcctogag gtcattcata 5640
 tgcttgagaa gagagtcggg atagtccaaa ataaaacaaa ggtaagatta cctggtcaaa 5700
 agtgaaca tcagttaaaa ggtggtataa agtaaaat cggtataaaa aggtggccca 5760
 aagtgaatt tactcttttc tactattata aaaattgagg atgtttttgt cgtactttg 5820
 atacgtcatt ttgtatgaa ttggtttta agtttattcg cttttggaaa tgcatatctg 5880
 tatttgagtc gggtttaag ttggttctt tttgtaaata cagagggatt tgtataagaa 5940
 atatcttaa aaaaacccat atgctaattt gacataattt ttgagaaaaa tatatattca 6000
 ggcaattct cacaatgaac aataataaga ttaaaatagc tttccccgt tgcagcgcac 6060
 ggtattttt tctagtaaaa ataaaagata aacttagact caaacattt acaaaaacaa 6120
 ccctaaagt tctaaagcc caaagtgcta tccacgatcc atagcaagcc cagcccaacc 6180
 caaccaacc caaccaccc cagtcagcc aactggacaa tagtctccac accccccac 6240
 taccacgtg agttgtccgc acgcaccgca cgtctcag ccaaaaaaaaaa aaaaagaaag 6300
 aaaaaaaga aaaagaaaa acagcaggtg ggtccgggtc gtgggggccc gaaacgcgag 6360
 gaggatcgc agccagcgc gaggccggcc ctccctcgc ttcaaagaa acgccccca 6420
 tcgcaactat atacataccc cccctctcc tccatccc ccaacctac caccaccacc 6480
 accaccact ccactctcc cccctcctc gcggacgac gagctctcc cccctcccc 6540
 tccgcgcgc ccgcgcggt aaccacccc cccctctct cttttttct cgttttttt 6600
 tttccgtctc ggtctcgatc tttggccttg gtagtttggg tgggcgagag gggcttctg 6660
 gcgcgccag atcggtgcc gggaggggccc ggatctcgc gctggggctc tcgccggcgt 6720

ggatccggcc cggatctcgc ggggaatggg gctctcggat gtagatctgc gatccgccgt	6780
tgttggggga gatgatgggg ggtttaaaat ttccgccatg ctaaacaaga tcaggaagag	6840
gggaaaaggg cactatgggt tatattttta tatatttctg ctgcttcgtc aggetttagat	6900
gtgetagatc tttctttctt ctttttgtgg gtagaatttg aatccctcag cattgttcat	6960
cggtagtttt tcttttcatg atttgtgaca aatgcagcct cgtgcggagc tttttttag	7020
gtagaccgcg ggatatcaca agtttgtaaa aaaaagctga acgagaaaac taaaatgata	7080
taaatatcaa tatattaaat tagattttgc ataaaaaaca gactacataa tactgtaaaa	7140
cacaacatat ccagtcacta tgccggccgc attagccacc ccaggettta cactttatgc	7200
ttccggctcg tataatgtgt ggattttgag ttaggatccg tcgagatttt caggagctaa	7260
ggaagctaaa atggagaaaa aatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca	7320
tcgtaaagaa cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt	7380
tcagctggat attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc	7440
ggcctttatt cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat	7500
gaaagacggg gagctgggta tatgggatag gtccaccct tgttacaccg ttttccatga	7560
gcaaactgaa acgttttcat cgctctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct	7620
acacatatat tcgcaagatg tgccgtgtta cggtgaaaac ctggcctatt tcctaaagg	7680
gtttattgag aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga	7740
tttaaactg gccaatatgg acaacttctt ccccccggtt ttcaccatgg gcaaatatta	7800
tacgcaaggc gacaagggtc tgatcccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtttgtga	7860
tgcttccat gtcggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg	7920
cggggcgtaa acgcgtggat ccggcttact aaaagccaga taacagtatg cgtatttgcg	7980
cgctgatitt tgcggtataa gaatatatac tgatattgat acccgaagta tgtcaaaaag	8040
aggtatgcta tgaagcagcg tattacagtg acagttgaca ggcacageta tcagttgctc	8100

aaggcatata tgatgtcaat atctccggtc tggtaagcac aaccatgcag aatgaagccc 8160
gtcgtctgcg tgcogaacgc tggaaagcgg aaaatcagga agggatggct gaggtcgccc 8220
ggtttattga aatgaacggc tcttttctg acgagaacag gggctggtga aatgcagttt 8280
aaggtttaca cctataaaag agagagccgt tctcgtctgt ttgtggatgt acagagtgat 8340
attattgaca cgcccgggcg acggatggtg atccccctgg ccagtgcacg tctgctgtca 8400
gataaagtct ccogtgaact ttaccgggtg gtgcatatcg gggatgaaag ctggcgcag 8460
atgaccaccg atatggccag tgtgccggtc tccgttatcg gggaagaagt ggctgatctc 8520
agccaccgcg aaaatgacat caaaaacgcc attaacctga tgttctgggg aatataaatg 8580
tcaggctccc ttatacacag ccagtctgca ggtcgacat agtgactgga tatgtttgtg 8640
tttacagtat tatgtagtet gtttttatg caaaatctaa ttaatatat tgatatttat 8700
atcattttac gtttctcgtt cagctttctt gtacaaagtg gtgatgggga tccccaccc 8760
tgcaatgtga ccctagactt gtccatcttc tggattggcc aacttaatta atgtatgaaa 8820
taaaaggatg cacacatagt gacatgctaa tcaactataat gtgggcatca aagttgtgtg 8880
ttatgtgtaa ttactaatta tctgaataag agaaagagat catccatatt tcttatccta 8940
aatgaatgtc acgtgtcttt ataattcttt gatgaaccag atgcatttta ttaaccaatt 9000
ccatatacat ataaatatta atcatatata attaatatca attgggttag caaaacaaat 9060
ctagtctagg tgtgttttgc taattattgg gggatagtc aaaaagaaat ctacgttctc 9120
aataattcag atagaaaact taataaagtg agataattta catagattgc ttttatcctt 9180
tgatatatgt gaaacctgc atgatataag gaaaatagat agagaaataa ttttttcat 9240
cgttgaatat gtaacaatt taattcaaga agctaggaat ataaatattg aggagtttat 9300
gattattatt attattttga tgttcaatga agttttttt aatttcatat gaagtataca 9360
aaaattcttc atagattttt gtttctatgc cgtagttatc ttaatatat ttgtggttga 9420

agaaatttat tgctagaaac gaatggattg tcaatttttt tttaaagcaa atatatatga 9480
 aattatactg tatattattt tagtcatgat taaaatgtgg cettaattga atcatcttcc 9540
 tcattcattt tttcaaaagc atatcaggat gattgatatt tatctatttt aaaaattaat 9600
 ttaagggttc aaattaaatt taacttaaaa gtgtcctaac cgtagttaa ggtttacttt 9660
 aaaaaatac tatgaaaaat ctaatcttct atgaatcgac ctgcaggatt taaatccatc 9720
 gttctggggc ctaacgggcc aagcttt 9747

<210> 11

<211> 1023

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 启动子

<400> 11

Ala Gly Cys Thr Thr Ala Thr Cys Gly Gly Cys Cys Gly Ala Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Gly Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala
 20 25 30

Gly Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly
 35 40 45

Gly Cys Cys Thr Gly Ala Cys Gly Thr Ala Gly Ala Thr Ala Gly Ala
 50 55 60

Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Cys Thr Cys Thr Thr Ala Gly Cys Thr
 65 70 75 80

Thr Thr Cys Ala Thr Thr Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr Thr
85 90 95

Thr Gly Thr Ala Gly Thr Cys Ala Thr Cys Thr Gly Ala Thr Thr Thr
100 105 110

Ala Cys Cys Thr Cys Thr Cys Thr Cys Gly Thr Thr Thr Ala Thr Ala
115 120 125

Cys Ala Ala Cys Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala
130 135 140

Cys Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Ala Ala Cys Thr Thr Thr Thr Cys
145 150 155 160

Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Thr
165 170 175

Thr Ala Cys Cys Cys Thr Ala Gly Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Ala
180 185 190

Ala Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Gly Gly Thr Gly Ala Thr Thr Thr
195 200 205

Thr Gly Cys Thr Ala Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Gly Cys Cys Ala
210 215 220

Thr Gly Thr Thr Ala Gly Ala Thr Ala Gly Ala Gly Gly Thr Ala Ala
225 230 235 240

Ala Ala Thr Gly Ala Ala Cys Thr Ala Gly Thr Thr Ala Ala Ala Ala
245 250 255

Gly Cys Thr Cys Ala Gly Ala Gly Thr Gly Ala Thr Ala Ala Ala Thr

260	265	270
Cys Ala Gly Gly Cys Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr		
275	280	285
Cys Ala Thr Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala		
290	295	300
Ala Ala Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Thr Thr		
305	310	315 320
Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala Ala Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala		
325	330	335
Ala Ala Ala Thr Thr Thr Ala Gly Thr Thr Thr Ala Gly Thr Ala Thr		
340	345	350
Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Cys Ala Gly Thr Thr Gly Ala		
355	360	365
Ala Thr Ala Thr Ala Gly Thr Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Thr Cys		
370	375	380
Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Gly		
385	390	395 400
Ala Thr Cys Thr Thr Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Thr Thr Thr Cys		
405	410	415
Cys Thr Thr Ala Ala Ala Ala Cys Cys Gly Thr Gly Cys Thr Cys Thr		
420	425	430
Ala Thr Cys Thr Thr Thr Gly Ala Thr Gly Thr Cys Thr Ala Gly Thr		
435	440	445

Thr Thr Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ala Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ala
450 455 460

Ala Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Thr Gly Cys Thr Thr Ala
465 470 475 480

Ala Cys Thr Ala Cys Gly Ala Cys Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala Ala
485 490 495

Gly Thr Ala Cys Gly Thr Ala Gly Ala Ala Ala Thr Ala Cys Thr Ala
500 505 510

Gly Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Gly Thr Gly Cys Cys Gly Cys Gly
515 520 525

Thr Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Thr Ala Gly Cys Cys Ala Cys Thr
530 535 540

Cys Gly Thr Ala Cys Gly Cys Thr Ala Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala
545 550 555 560

Ala Gly Cys Gly Cys Thr Ala Gly Ala Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly
565 570 575

Ala Gly Gly Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly
580 585 590

Gly Cys Gly Thr Cys Gly Cys Gly Gly Cys Ala Cys Thr Ala Thr Ala
595 600 605

Gly Cys Cys Ala Cys Thr Cys Gly Cys Cys Gly Cys Ala Ala Gly Ala
610 615 620

cttgetgat gccttctccc tagtggtgac cagtgttact cacatagtct ttgetcattt 780

cattgtaatg cagataccaa gcgg 804

<210> 13

<211> 9754

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体

<400> 13

gatggggatc agattgtcgt ttcccgcctt cagtttaaac taccagtgtt tgacaggata 60

tattggcggg taaacctaac agaaaagagc gtttattaga ataactggat attttaaagg 120

gcgtgaaaag gtttatccgt tcgtccattt gtatgtgcat gccaaaccaca gggttcccct 180

cgggagtgct tggcattccg tgcgataatg acttctgttc aaccacccaa acgtcggaaa 240

gcctgacgac ggagcagcat tccaaaaaga tcccttggct cgtctgggtc ggctagaagg 300

tcgagtgggc tgctgtgget tgatccctca acgcggctgc ggacgtagcg cagcgcgaa 360

aaatcctega tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat ggggatcat 420

gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt 480

gacaccacga tgcctgcagc atctaactgt tgagttaagc cgcgccgca agcggcgtcg 540

gcttgaacga attgttagac attatttgcc gactaccttg gtgatctgc ctttcacgta 600

gtgaacaaat tcttccaact gatctgcgag cgaggccaag cgatcttctt gtccaagata 660

agcctgccta gcttcaagta tgacgggctg ataactgggcc ggcaggecct ccattgceca 720

gtcggcagcg acatcctteg gcgagatctt gccggttact gcgctgtacc aaatgcccga 780

caacgtaagc actacatttc gctcatcgcc agcccagtcg ggcggcagag tccatagcgt 840

taaggtttca tttagcgcct caaatagatc ctgttcagga accggatcaa agagttcctc	900
cgccgctgga cctaccaagg caacgctatg ttctcttget tttgtcagca agatagccag	960
atcaatgtcg atcgtggctg gctcgaagat acctgcaaga atgtcattgc gctgccatc	1020
tccaaattgc agttcgcgct tagctggata acgccacgga atgatgtcgt cgtgcacaac	1080
aatggtgact tctacagcgc ggagaatctc gctctctcca ggggaagccg aagtttcaa	1140
aaggctgttg atcaaagctc gccgcgttgt ttcatcaagc cttacggtca ccgtaaccag	1200
caaatcaata tcaactgtgtg gcttcaggcc gccatccact ggggagccgt acaaatgtac	1260
ggccagcaac gtccggttcca gatggcgctc gatgacgcca actacctctg atagttgagt	1320
cgatacttcg gcgatcaccg ctccctcat gatgtttaac tcctgaatta agccgcgccg	1380
cgaagcggtg tcggcttgaa tgaattgta ggcgtcatcc tgtctcccg acctgcagca	1440
atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaaactac ttactctagc ttcccggcaa	1500
caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccgccctt	1560
ccgctggct ggttttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc	1620
attgcagcac tggggccaga tggtaaagccc tccgtatcg tagttatcta cacgacgggg	1680
agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgtg agataggtgc ctcactgatt	1740
aagcattggt aactgtcaga ccaagttac tcatatatac ttagattga tttaaaactt	1800
catTTTTaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctTTTTg ataatctcat gacaaaaac	1860
cettaacgtg agttttcgtt ccaactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct	1920
tcttgagatc cttttttct gcgcgtaate tgetgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta	1980
ccagcgggtg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc ttttccgaa ggtaactggc	2040
ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac	2100
ttcaagaact ctgtagcacc gctacatac ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct	2160
gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat	2220

aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaac 2280

acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccga 2340

gggagaaagg cggacaggta tccggtaage ggcagggctg gaacaggaga ggcacagagg 2400

gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga 2460

cttgagcgtc gatTTTTgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatgaa aaacgccagc 2520

aacgeggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct 2580

gcgttatecc ctgattctgt ggataaccgt attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct 2640

cgccgcagcc gaacgaccga ggcagcagcgc tcagtgagcg aggaagcgga agagcgctg 2700

atgggttatt ttctccttac gcctctgtgc ggtatttcaac accgatatg gtgcactctc 2760

agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg 2820

actgggtcat ggctgcgccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgccc tgacgggctt 2880

gtctgctccc ggcattccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcattgtgc 2940

agaggttttc accgtcatca ccgaaacgc cgaggcagct gcggtaaagc tcatcagcgt 3000

ggtcgtgaag cgattcacag atgtctgcct gttcatccgc gtccagctcg ttgagtttct 3060

ccagaagcgt taatgtctgg cttctgataa agcgggcat gtaaggcg gtttttct 3120

gtttggtcac tgatgcctcc gtgtaagggg gattctgtt catgggggta atgataccga 3180

tgaaacgaga gaggatgctc acgatacggg ttactgatga tgaacatgcc cggttactgg 3240

aacgttgtga gggtaaaca ctggcggtat ggatgcggcg ggaccagaga aaaatcactc 3300

agggtcaatg ccagccttc gtttaatacag atgtaggtgt tccacagggt agccagcagc 3360

atcctgcgat gcagatccgg aacataatgg tgcagggcgc tgaactccgc gtttccagac 3420

tttacgaaac acggaacccg aagaccatc atgttgttgc tcaggtcga gacgttttgc 3480

agcagcagtc gcttcacgtt cgctcgcgta tcggtgattc attctgctaa ccagtaaggc 3540

aaccccgcca gctagccgg gtcctcaacg acaggagcac gatcatgcgc acccgtggcc	3600
aggacceaac gctgcccag atgcgcccgg tgcggetgct ggagatggcg gacgcatgg	3660
atatgttctg ccaagggttg gtttgcgcat tcacagttct ccgcaagaat tgattggctc	3720
caattcttgg agtggatgaat ccgtagcga ggtgccgccc gcttccattc aggtcagagt	3780
ggcccggctc catgcaccgc gacgcaacgc ggggaggcag acaaggtata gggcggcgcc	3840
tacaatccat gccaacccgt tccatgtgct cgcgaggcg gcataaatcg ccgtgacgat	3900
cagcgtcca atgatcgaag ttaggctggg aagagccgag agcgcctt gaagctgtcc	3960
ctgatggtcg tcactacct gcctggacag catggcctgc aacgcgggca tcccgatgcc	4020
gccggaagcg agaagaatca taatgggaa ggccatocag cctcgcctcg cgaacccag	4080
caagacgtag cccagcgcgt cggccgcat gccggcgata atggcctgct tctcgcgaa	4140
acgtttggtg gcgggaccag tgacgaaggc ttgagcgagg gcgtgcaaga ttccgaatac	4200
cgcaagcgac agccgatca tcgtcgcgt ccagcgaaag cggtcctcgc cgaaaatgac	4260
ccagagcgt gccggcacct gtctacgag ttgcatgata aagaagacag tcataagtgc	4320
ggcgacgata gtcattcccc gcgccaccg gaaggagctg actgggttga aggtctctca	4380
ggccatcggg ccatcgacc tttccgacgc tcaccgggt ggttgccctc gccgctgggc	4440
tggcggccgt ctatggcct gcaaacgcgc cagaaacgcc gtcgaagccg tgtgcgagac	4500
accgcggccg gccgcccggg ttgtggatac ctcgaggaaa acttgccct cactgacaga	4560
tgaggggagg acgttgacac ttgaggggccc gactcaccgc gcgcggcgtt gacagatgag	4620
gggcaggctc gatttcggcc ggcgactgg agctggccag cctcgcaaat cggcgaaaac	4680
gcctgatttt acgcgagttt cccacagatg atgtggacaa gcctggggat aagtgcctg	4740
cggtattgac acttgagggg cgcgactact gacagatgag gggcgcgac cttgacactt	4800
gaggggcaga gtgctgacag atgaggggccc cacctattga catttgagg gctgtccaca	4860
ggcagaaaat ccagcatttg caagggttcc cgcctgtttt tcggccaccg ctaacctgtc	4920

ttttaacctg cttttaaacc aatatttata aaccttgttt ttaaccaggg ctgcgccctg 4980
 tgcgcgtgac cgcgcacgcc gaaggggggt gccccccctt ctgaaccct cccggcccgc 5040
 taacgogggc ctcccatccc cccaggggct gcgcccctcg gccgcgaacg gcctcacccc 5100
 aaaaatggca gccaaagctag gaaaagtccc atgtggatca ctccgttgcc ccgtcctca 5160
 ccgtgttggg gggaaggtgc acatggetca gttctcaatg gaaattatct gcctaaccgg 5220
 ctcagttctg cgtagaaacc aacatgcaag ctccaccggg tgcaaagcgg cagcggcggc 5280
 aggatatatt caattgtaaa tggcttcatg tccgggaaat ctacatggat cagcaatgag 5340
 tatgatggtc aatatggaga aaaagaaaga gtaattacca atttttttc aattcaaaaa 5400
 tgtagatgtc cgcagcgta ttataaaatg aaagtacatt ttgataaac gacaaattac 5460
 gatccgtcgt atttatagcc gaaagcaata aacaaattat tetaattcgg aaatctttat 5520
 ttcgacgtgt ctacattcac gtccaaatgg gggttagat gagaaacttc acgatcgatg 5580
 cgccaccac togagaagct tactagtcaa caattggcca atctttgttc taaattgcta 5640
 ataaacgacc atttccgta attctccttg gttgcaacag tctaccgctc aatgtttac 5700
 taatttataa gtgtgaagtt tgaattatga aagacgaaat cgtattaaaa attcacaaga 5760
 ataaacaact ccatagattt tcaaaaaaac agtcaogaga aaaaaaccac agtccgtttg 5820
 tctgctcttc tagtttttat tattttteta ttaatagttt ttgtttattt cgagaataaa 5880
 atttgaacga tgtccgaacc acaaaagccg agccgataaa tccaaagccg agcctaactt 5940
 tagccgtaac catcagtcac ggctcccggg ctaattcatt tgaaccgaat cataatcaac 6000
 ggtttagatc aaactcaaaa caatctaacg gcaacataga cgcgtcgggt agctaaaaag 6060
 agtgtgaaag ccaggtcacc atagcattgt ctctcccaga ttttttattt gggaaataat 6120
 agaagaaata gaaaaaata aaagagtgag aaaaatcgta gagctatata ttgcacatg 6180
 tactcgttcc gctttcetta gtgttagctg ctgccgctgt tgtttctcct ccatttctct 6240

atctttctct ctcgctgctt ctgcaatctt ctgtatcacc ttctttctct tcaaggtgag 6300
tctctagacc cgttcgcttg attttgetgc tcgtagtcg ttattgttga ttctctatgc 6360
cgatttcgct agatctgttt agcatgcgct gtggttttat gagaaaatct ttgttttggg 6420
ggttgcttgt tatgtgattc gatccgtgct tgttggatcg atctgagcta attcttaagg 6480
tttatgtgtt agatctatgg agtttgagga ttctctcgc ttctgtcgat ctctcgtgt 6540
tatttttgtt tttttcagtg aagtgaagtt gtttagttcg aatgacttc gtgtatgctc 6600
gattgatctg gttttaatct tcgatctgtt aggtgttgat gtttacaagt gaattctagt 6660
gtttctcgt tgagatctgt gaagtttgaa cctagttttc tcaataatca acatatgaag 6720
cgatgtttga gtttcaataa acgctgctaa tcttcgaaac taagttgtga tctgattcgt 6780
gtttacttca tgagcttacc caattcattt cggtttcatt ttactttttt tttagtgaac 6840
catggcgcaa gtttagcagaa tctgcaatgg tgtgcagaac ceatctctta tctccaatct 6900
ctcgaaatcc agtcaacgca aatctccctt atcggtttct ctgaagacgc agcagcatcc 6960
acgagcttat ccgatttcgt cgtcgtgggg attgaagaag agtgggatga cgtaattgg 7020
ctctgagctt cgtcctctta aggtcatgct ttctgtttcc acggcgtgca tgcttcatgg 7080
agcttcatct aggccagcta ctgccaggaa gtctagcggg ctcaaggca ccgtgcgcat 7140
ccctggcgat aaaagtattt cacacaggag ctctcatgtc ggaggacttg ctagtggaga 7200
gacgagaate actggtttgc ttgagggcga agatgttacc aacaccggtg aggcgatgca 7260
agcaatgggt gccagaatcc gaaaagaggc cgatacgtgg atcatcgacg gtgttggtaa 7320
cggaggattg ctgcctcccg aagcgcact tgactttggg aacgcagcta cggggtgccg 7380
tcttactatg ggactggtag gcgtgtatga cttgactct accttcatcg gtgacgcgag 7440
cctcactaag agaccaatgg gacgagtgct gaatcccctg agggagatgg gtgtccaggt 7500
gaaatctgag gatggtgacc gtcttcgggt tactctgcga ggccccaga cccccacgc 7560
aatcacgtac agggttccga tggcgtcacc acaggtcaag tcagcggtag tcttgccggg 7620

cctcaacaca cctggaatca caaccgtgat tgaacccatc atgactagag accacacgga 7680
gaagatgttg cagggtttcg gcgctaattc aacggtcgaa accgacgccg acggcgtgag 7740
gacaatccgc ttggagggea gaggtaaact gactggccaa gtcacgatg tgccctggaga 7800
tccctcgtcc acagcgtttc cctcctgtagc tgcgttgctc gtccttgat ctgatgtgac 7860
gatcctgaat gtcctcatga atccaactag aaccggcctc atcctcacat tgcaggagat 7920
gggtgctgac atcgaggtta tcaatcctag gttggcaggt ggagaggatg tggccgatct 7980
gcgcgtgcgt tctagtacac tcaaaggcgt gaccgtccct gaggatcgcg ctccatccat 8040
gatcgacgag taccceatc tcgccgttgc tgctgcgttt gccgagggcg caactgtaat 8100
gaacggcctt gaggagtga gggttaagga gactgacagg ctgtccgcgg tggcgaatgg 8160
cctgaagcta aacggcgtgg actgcgacga aggtgaaacg tccctttag tccgtggtcg 8220
cccagacggg aaggggttgg ggaatgcttc gggagctgct gtggcgacgc accttgatca 8280
tagaatgcc atgtcattc tggatgagg acttgtctcc gagaatccgg tgaccgttga 8340
cgatgctacc atgatgccca cctcctttcc tgagttcatg gacctcatgg caggcttggg 8400
ggccaagatc gagctgtctg atactaagcc cgttgaatt cccgatcgtt caaacatttg 8460
gcaataaagt ttcttaagat tgaatcctgt tgcggctctt gcgatgatta tcatataatt 8520
tctgttgaat tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcacacgt tatttatgag 8580
atgggttttt atgattagag tcccgaatt atacattta tacgcgatag aaaacaaaat 8640
atagcgcgca aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcgggg 8700
atcccacgtg cggaccgcct gcaggccgcg ttatcaagct aactgcaggt ccgatgtgag 8760
acttttcaac aaagggtaat atccggaaac ctctcggat tccattgccc agctatctgt 8820
cactttattg tgaagatagt ggaaaaggaa ggtggctcct acaaatgccca tcattgcgat 8880
aaaggaaagg ccatcgttga agatgcctct gccgacagtg gtcccaaaga tggaccccca 8940

cccacgagga gcatcgtgga aaaagaagac gttccaacca cgtottcaaa gcaagtggat 9000
tgatgtgatg gtccgattga gacttttcaa caaagggtaa tatccggaaa cctcctcgga 9060
ttccattgcc cagctatctg tcactttatt gtgaagatag tggaaaagga aggtggctcc 9120
tacaaatgcc atcattgcga taaaggaaag gccatcgttg aagatgcctc tgccgacagt 9180
ggtcccaaag atggaccccc acccagcagg agcatcgttg aaaaagaaga cgttccaacc 9240
acgtcttcaa agcaagtgga ttgatgtgat atctccactg acgtaaggga tgacgcacaa 9300
tcccactatc cttegcaaga cccttcctct atataaggaa gttcatttca tttggagagg 9360
accaggtggg accggcgcgc caggectggg agtctgatta attaagcgat cgcgggcctt 9420
gatcacctgt cgtacagtat ttctacattt gatgtgtgat ttgtgaagaa catcaaacia 9480
aacaagcact ggctttaata tgatgataag tattatggta attaattaat tggcaaaaac 9540
aacaatgaag ctaaaatfff atttattgag cettgcgggtt aatttcttgt gatgatcttt 9600
ttttttatff tctaattata tatagtttcc tttgctttga aatgctaaag gtttgagaga 9660
gttatgctct ttttttcttc ctctttcttt ttttaacttta tcatacaaat tttgaataaa 9720
aatgtgagta cattgagctc atttaaataa gctt 9754

<210> 14

<211> 1696

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 元件

<400> 14

caaatffatt atgtgttttt tttccgtggg cgagattgtg tattattctt tagttattac 60

aagactffta gctaaaatff gaaagaatff actfftaagaa aatcttaaca tctgagataa 120

tttcagcaat agattatatt tttcattact cttagcagtat ttttgagat caatcgaac 180

atatatggtt gtagaaaa atgcactata tatatatata ttatTTTTc aattaaagt	240
gcatgatata taatatatat atatatatat atgtgtgtgt gtatatggtc aaagaaattc	300
ttatacaaat atacacgaac acatatattt gacaaaatca aagtattaca ctaaacaatg	360
agttggtgca tggccaaaac aaatatgtag attaaaaatt ccagcctcca aaaaaaatc	420
caagtgttgt aaagcattat atatatatag tagatcccaa atttttgtac aattccacac	480
tgatogaatt tttaaagttg aatatctgac gtaggatttt tttaatgtct tacctgacca	540
ttactaata acattcatac gttttcattt gaaatatcct ctataattat attgaatttg	600
gcacataata agaaacctaa ttggtgattt attttactag taaatttctg gtgatgggct	660
ttctactaga aagctctcgg aaaatcttgg accaaatcca tattccatga cttegattgt	720
taacctatt agttttcaca aacatactat caatatcatt gcaacggaaa aggtacaagt	780
aaaacattca atccgatagg gaagtgatgt aggaggttgg gaagacaggc ccagaaagag	840
atztatctga ctgttttgt gtatagtttt caatgttcat aaaggaagat ggagacttga	900
gaagtTTTT ttggacttg tttagcttg ttggcgttt tttttttga tcaataactt	960
tgttgggctt atgatttga atatttctg ggaactctta gtttatttag acgtgctaac	1020
ttgttgggc ttatgacttg ttgtaacata ttgtaacaga tgacttgatg tgcgactaat	1080
ctttacacat taaacatagt tctgtttttt gaaagttctt attttcattt ttatttgaat	1140
gttatatatt tttctatatt tataattcta gtaaaaggca aattttgctt ttaaatgaaa	1200
aaaatatata ttccacagtt tcacctaate ttatgcattt agcagtaca attcaaaaat	1260
ttccatttt tattcatgaa tcataccatt atatattaac taaatccaag gtaaaaaaaaa	1320
ggatgaaag ctctatagta agtaaaatat aattcccca taaggaaagg gccagttcca	1380
ccaggcaagt aaaatgagca agcaccactc caccatcaca caatttcaact catagataac	1440
gataagattc atggaattat ctccacgtg gcattattcc agcggttcaa gccgataagg	1500

gtctcaacac ctctccttag gcctttgtgg ccgttaccaa gtaaaattaa cctcacacat	1560
atccacacte aaaatccaac ggtgtagatc ctagtccact tgaatctcat gtatcctaga	1620
ccctccgate actccaaagc ttgttctcat tgttgttate attatatata gatgacccaaa	1680
gcactagacc aaacct	1696
<210> 15	
<211> 1696	
<212> DNA	
<213> 玉米	
<400> 15	
caaatttatt atgtgttttt tttccgtggt cgagattgtg tattattctt tagttattac	60
aagactttta gctaaaattt gaaagaattt actttaagaa aatcttaaca tctgagataa	120
tttcagcaat agattatatt tttcattact ctagcagtat ttttgcagat caatcgcaac	180
atatatggtt gttagaaaaa atgcactata tatatatata ttatTTTTTc aattaaagt	240
gcatgatata taatatatat atatatatat atgtgtgtgt gtatatggtc aaagaaattc	300
ttatacaaat atacacgaac acatatattt gacaaaatca aagtattaca ctaaacaatg	360
agttggtgca tggccaaaac aaatatgtag attaaaaatt ccagcctcca aaaaaaatc	420
caagtgttgt aaagcattat atatatatag tagatcccaa atTTTTgtac aattccacac	480
tgategaatt tttaaagttg aatatctgac gtaggatttt tttaatgtct tacctgacca	540
tttactaata acattcatac gttttcattt gaaatatect ctataattat attgaatttg	600
gcacataata agaaacctaa ttggtgattt attttactag taaatttctg gtgatgggct	660
ttctactaga aagctctcgg aaaatcttgg accaaatcca tattccatga cttegattgt	720
taacctatt agttttcaca aacatactat caatatcatt gcaacggaaa aggtacaagt	780
aaaacattca atccgatagg gaagtgatgt aggaggttgg gaagacagge ccagaaagag	840
atztatctga cttgttttgt gtatagtttt caatgttcat aaaggaagat ggagacttga	900

gaagtttttt ttggactttg tttagctttg ttgggcgttt tttttttga tcaataactt	960
tgttgggcctt atgatttgta atattttcgt ggactcttta gtttatttag acgtgctaac	1020
ttgttgggc ttatgacttg ttgtaacata ttgtaacaga tgacttgatg tgcgactaat	1080
ctttacacat taaacatagt tctgtttttt gaaagttctt attttcattt ttatttgaat	1140
gttatatatt tttctatatt tataattcta gtaaaaggca aattttgctt ttaaataaaa	1200
aaaatatata ttccacagtt tcacctaatc ttatgcattt agcagtaca attcaaaaat	1260
ttccatttt tattcatgaa tcataccatt atatattaac taaatccaag gtaaaaaaaaa	1320
ggtatgaaag ctctatagta agtaaaatat aaattcccca taaggaaagg gccaggtcca	1380
ccaggcaagt aaaatgagca agcaccactc caccatcaca caatttctact catagataac	1440
gataagatte atggaattat cttccacgtg gcattattcc agcggttcaa gccgataagg	1500
gtctcaacac ctctccttag gcctttgtgg ccgttaccaa gtaaaattaa cctcacacat	1560
atccacactc aaaatccaac ggtgtagatc ctagtccact tgaatctcat gtatcctaga	1620
ccctccgatc actccaage ttgttctcat tgttgttatc attatatata gatgaccaa	1680
gcactagacc aaacct	1696