



(21) 申请号 201880055140.5

(22) 申请日 2018.08.24

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110997704 A

(43) 申请公布日 2020.04.10

(30) 优先权数据
17290107.6 2017.08.25 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/072878 2018.08.24

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/038422 EN 2019.02.28

(73) 专利权人 天主教鲁汶大学
地址 比利时新鲁汶
专利权人 波尔多大学 国家科学研究中心

(72) 发明人 H.巴托科 P.莫罗

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 涂滔 邹宗亮

(51) Int.Cl.

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(56) 对比文件

AU 6813598 A, 1998.11.11

Leo Veenman, et al..Tetrapyrroles as Endogenous TSPO Ligands in Eukaryotes and Prokaryotes: Comparisons with Synthetic Ligands.《INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES》.2016,第17卷(第6期),第16-17页.

Vimal Selvaraj.Current status and future perspectives: TSPO in steroid neuroendocrinology.《Journal of Endocrinology》.2016,第231卷(第1期),R1-R30.

Lin X, et al..Arabidopsis thaliana, TSPO(outer membrane tryptophan-rich sensory protein)-like protein, Accession NO:NP_566110.1.《GeneBank Database》.2017, 1-2.

审查员 刘婷

权利要求书4页 说明书36页

序列表27页 附图4页

(54) 发明名称

具有经修饰的脂质代谢的植物及用于制备它们的方法

(57) 摘要

本发明总体上涉及植物分子生物学领域,并且涉及具有经修饰的脂质代谢的植物以及用于制备此类经修饰的植物的方法。具体而言,本发明通过以下方式提供具有增加的三酰甘油(TAG)水平的经修饰的植物及其部分(包括种子):在所述经修饰的植物或其部分中在种子填充期间在种子组织中种子特异性表达编码易位蛋白(TSPO)的核酸。本发明进一步涉及用于调节植物中脂质代谢的方法和用于产生具有经修饰的脂质代谢的植物的方法。本发明还提供了可用于本

发明的方法中的构建体、载体和宿主细胞,并且进一步涉及从经修饰的植物获得的产品。

1. 包含以下可操作连接的核酸序列的用于增加植物种子中的脂质产生的构建体:

- a) 编码TSP0多肽的核酸,
- b) 一个或多个能够驱动a)的核酸表达的控制序列;以及任选地
- c) 一个或多个转录终止子序列,

其中所述控制序列的至少一个是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,并且其中所述启动子序列不是天然存在的TSP0启动子,

并且其中所述TSP0多肽来源于拟南芥(*Arabidopsis thaliana*),并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:2或其与SEQ ID NO:2具有至少99%序列一致性的同源物表示;

所述TSP0多肽来源于亚麻荠(*Camelina sativa*),并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:32或其与SEQ ID NO:32具有至少99%序列一致性的同源物表示;或

所述TSP0多肽来源于亚麻(*Linum usitatissimum*),并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:34或其与SEQ ID NO:34具有至少99%序列一致性的同源物表示。

2. 根据权利要求1的构建体,其中所述核酸编码TSP0多肽,所述TSP0多肽包含

a) 富含色氨酸的感觉蛋白/外围型苯二氮~~草~~受体结构域,其与如SEQ ID NO:49所示的结构域具有至少30%的序列一致性,和/或

b) N末端结构域,其与如SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%的序列一致性,和/或

c) 保守结构域,其与如SEQ ID NO:51所示的序列具有至少70%的序列一致性。

3. 根据权利要求1或2的构建体,其中所述种子特异性启动子是在所述种子填充期间的脂质生物合成的时段期间有活性的启动子。

4. 根据权利要求1至3中任一项的构建体,其中所述种子特异性启动子是编码种子贮藏蛋白的基因的启动子。

5. 根据权利要求1或2的构建体,其中所述启动子序列对应于已经经修饰以在种子填充期间在种子组织中赋予种子特异性表达的TSP0启动子。

6. 根据权利要求5的构建体,其中所述启动子序列对应于已经经修饰以在所述种子填充期间的脂质生物合成的时段期间在种子组织中赋予种子特异性表达的TSP0启动子。

7. 根据权利要求1至6中任一项的构建体在用于制备与对照植物相比具有增加的脂质产生的植物的方法中的用途。

8. 根据权利要求1至6中任一项的构建体在用于制备与对照植物相比具有提高的三酰甘油的量的植物的方法中的用途。

9. 用于与对照植物相比增加植物种子中脂质产生的方法,其包括提供包含构建体的植物的步骤,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽的核酸,和任选地c) 转录终止子序列,其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,并且其中所述启动子序列不是天然存在的TSP0启动子,

并且其中所述TSP0多肽来源于拟南芥,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:2或其与SEQ ID NO:2具有至少99%序列一致性的同源物表示;

所述TSP0多肽来源于亚麻荠,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:32或其与SEQ ID NO:32具有至少99%序列一致性的同源物表示;或

所述TSP0多肽来源于亚麻,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:34或其与SEQ ID NO:34具有至少99%序列一致性的同源物表示。

10. 用于产生与对照植物相比具有植物种子中增加的脂质产生的方法,所述方法包括以下步骤:

(i) 在所述植物种子中引入和表达构建体,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽的核酸,和任选地c) 转录终止子序列,其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,并且其中所述启动子序列不是天然存在的TSP0启动子,

并且其中所述TSP0多肽来源于拟南芥,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:2或其与SEQ ID NO:2具有至少99%序列一致性的同源物表示;

所述TSP0多肽来源于亚麻芥,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:32或其与SEQ ID NO:32具有至少99%序列一致性的同源物表示;或

所述TSP0多肽来源于亚麻,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:34或其与SEQ ID NO:34具有至少99%序列一致性的同源物表示,和

(ii) 在促进植物生长和发育的条件下培养所述植物细胞或所述植物。

11. 根据权利要求9或10的方法,其中所述核酸编码TSP0多肽,所述TSP0多肽包含

a) 富含色氨酸的感觉蛋白/外围型苯二氮_草受体结构域,其与如SEQ ID NO:49所示的结构域具有至少30%的序列一致性,和/或

b) N末端结构域,其与如SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%的序列一致性,和/或

c) 保守结构域,其与如SEQ ID NO:51所示的序列具有至少70%的序列一致性。

12. 根据权利要求9至11中任一项的方法,其中所述种子特异性启动子是在所述种子填充期间的脂质生物合成的时段期间有活性的启动子。

13. 根据权利要求9至12中任一项的方法,其中所述种子特异性启动子是编码种子贮藏蛋白的基因的启动子。

14. 根据权利要求9至11中任一项的方法,其中所述启动子序列对应于已经经修饰以在种子填充期间在种子组织中赋予种子特异性表达的TSP0启动子。

15. 根据权利要求14的方法,其中所述启动子序列对应于已经经修饰以在所述种子填充期间的脂质生物合成的时段期间在种子组织中赋予种子特异性表达的TSP0启动子。

16. 根据权利要求9至14中任一项的方法,其中增加的脂质产生包括与对照植物相比,在所述植物中提高的三酰甘油的量。

17. 根据权利要求16的方法,其中增加的脂质产生包括提高的衍生自甘油和脂肪酸的三酰甘油的量,其中所述脂肪酸选自包含以下项的组:包含13至18个碳原子的长链脂肪酸(LCFA)和包含超过18个碳原子的极长链脂肪酸(VLCFA)。

18. 用于在植物中产生产品的方法,所述方法包括以下步骤:根据权利要求9至17中任一项的方法种植植物,以及从所述植物或其部分或者通过所述植物或其部分产生所述产品,所述部分包括种子。

19. 根据权利要求18的方法,其中所述产品是油或脂肪。

20. 包含构建体的种子用于制备与对照植物或其部分相比增加的脂质产生的植物或其

部分的用途,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:

- a) 启动子序列,
- b) 编码TSP0多肽的核酸,和任选地
- c) 转录终止子序列,

其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,并且其中所述启动子序列不是天然存在的TSP0启动子,

并且其中所述TSP0多肽来源于拟南芥,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:2或其与SEQ ID NO:2具有至少99%序列一致性的同源物表示;

所述TSP0多肽来源于亚麻荠,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:32或其与SEQ ID NO:32具有至少99%序列一致性的同源物表示;或

所述TSP0多肽来源于亚麻,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:34或其与SEQ ID NO:34具有至少99%序列一致性的同源物表示;并且

其中,与对照种子相比,所述构建体赋予所述种子增加的脂质产生。

21. 包含构建体的种子用于产生产品的用途,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:

- a) 启动子序列,
- b) 编码TSP0多肽的核酸,和任选地
- c) 转录终止子序列,

其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,并且其中所述启动子序列不是天然存在的TSP0启动子,

其中所述TSP0多肽来源于拟南芥,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:2或其与SEQ ID NO:2具有至少99%序列一致性的同源物表示;

所述TSP0多肽来源于亚麻荠,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:32或其与SEQ ID NO:32具有至少99%序列一致性的同源物表示;或

所述TSP0多肽来源于亚麻,并且所述TSP0多肽由SEQ ID NO:34或其与SEQ ID NO:34具有至少99%序列一致性的同源物表示;并且

其中,与对照种子相比,所述构建体赋予所述种子增加的脂质产生。

22. 根据权利要求21的用途,其中所述产品是油或脂肪。

23. 根据权利要求21或22的用途,其中从所述种子或者通过所述种子产生所述产品。

24. 根据权利要求21或22的用途,其中所述种子用于制备与对照植物或其部分相比具有增加的脂质产生的植物或其部分,并且从所述植物或其部分或者通过所述植物或其部分产生所述产品。

25. 根据权利要求20至24中任一项的用途,其中所述核酸编码TSP0多肽,所述TSP0多肽包含

a) 富含色氨酸的感觉蛋白/外围型苯二氮~~草~~受体结构域,其与如SEQ ID NO:49所示的结构域具有至少30%的序列一致性,和/或

b) N末端结构域,其与如SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%的序列一致性,和/或

c) 保守结构域,其与如SEQ ID NO:51所示的序列具有至少70%的序列一致性。

26. 根据权利要求20至25中任一项的用途,其中所述种子特异性启动子是在所述种子填充期间的脂质生物合成的时段期间有活性的启动子。

27. 根据权利要求20至26中任一项的用途,其中所述种子特异性启动子是编码种子贮藏蛋白的基因的启动子。

28. 根据权利要求20至25中任一项的用途,其中所述启动子序列对应于已经经修饰以在种子填充期间在种子组织中赋予种子特异性表达的TSP0启动子。

29. 根据权利要求28的用途,其中所述启动子序列对应于已经经修饰以在所述种子填充期间的脂质生物合成的时段期间在种子组织中赋予种子特异性表达的TSP0启动子。

30. 根据权利要求20至29中任一项的用途,其中与对照植物、植物部分或植物细胞相比,所述增加的脂质产生包括在所述植物、植物部分或植物细胞中提高的三酰甘油的量。

31. 根据权利要求30的用途,其中所述三酰甘油是衍生自甘油和脂肪酸的酯,其中所述脂肪酸选自包含以下项的组:包含13至18个碳原子的长链脂肪酸(LCFA)和包含超过18个碳原子的极长链脂肪酸(VLCFA)。

32. 根据权利要求20至31中任一项的用途,其中所述种子是能够产生油的植物的种子。

33. 根据权利要求32的用途,其中所述种子是选自包含以下项的组的植物的种子:芥花(canola)、油籽油菜(oilseed rape)、甘蓝型油菜(*Brassica napus*)、白菜型油菜(*Brassica rapa*)、亚麻荠属(*camelina*)、芝麻、大豆、玉米、向日葵、红花、水稻、亚麻籽、棉花、芥菜、蓖麻子(*Ricinus communis*)和花生。

具有经修饰的脂质代谢的植物及用于制备它们的方法

发明领域

[0001] 本发明一般地涉及植物分子生物学领域,并且涉及具有经修饰的脂质代谢的植物以及用于制备此类植物的方法。具体而言,本发明涉及具有增加的三酰甘油水平的植物及其部分,包括种子。本发明还涉及用于制备此类植物的方法。本发明基于在此类植物中调节编码易位蛋白(TSPO多肽)的核酸的特定种子特异性表达。本发明进一步提供了可用于本发明的方法中的构建体、载体和宿主细胞,并且还涉及从经修饰的植物获得的产品。

[0002] 发明背景

[0003] 植物油,即植物来源的油,主要用于食品和基于饲料的应用。此类植物油在脂肪酸(FA)组成方面中提供了广泛的多样性,并具有多种应用。另外,植物可以经工程化以产生对人类或动物健康营养有益的脂肪酸。因此,植物油有可能提供营养和医学上重要的长链多不饱和脂肪酸或“鱼油”的替代来源。

[0004] 除了可食用之外,植物油现在还越来越多地用于工业应用中,如油漆、润滑剂、肥皂、生物燃料等。因此,植物油也有可能成为工业应用中不可再生石油来源的替代品,条件是其组成可以匹配最终用途需要,并且其可以以足够的规模生产,以满足当前和不断增长的工业需求。

[0005] 大多数植物油衍生自植物的种子,即所谓的种子油。种子油主要包含中性(贮藏)脂质和少数极性(膜)脂质。贮藏脂质主要由脂肪酸的甘油酯(通常>90%),也称为三酰甘油(TAG)组成。这些脂质通常存储在专门用于脂质贮藏的区室中,即脂质体。该区室存在于大多数油质植物细胞中,并根据物种用于存储各种TAG分子。三酰甘油分子主要充当碳和能量储备,其在幼苗的萌发和生长期间使用。除TAG外,植物还含有膜(极性)脂质,其主要发现于种子细胞的各种膜中,例如内质网和其他内膜以及质膜。

[0006] 种子油的脂质含量和脂肪酸组成各不相同。此外,已经使用环境变化或人为操纵,如育种或基因工程来改变种子油的脂质含量和组成。然而,尽管可以通过传统的植物育种方法在一定程度上修饰种子油的脂质和脂肪酸含量和/或组成,但是此类方法在开发新的理想品种方面通常很费力。例如,常规的杂交育种包括非常费力和费时的过程,其目的是从各种变体中选择所期望的品种并建立纯系。已经进行了其他方法,如 γ 射线辐照和体细胞克隆变异以试图从各种变体获得所期望的品种。然而,通过这些方法获得的品种通常不能用于培养,因为除了目标基因之外,这些品种中的其他基因经常同时发生突变。

[0007] 相反,重组DNA技术的出现允许更容易操纵植物的种子油含量。对种子油生物合成的基本生物化学的了解的最新进展,再加上编码参与脂肪酸修饰和油积累的酶的基因的克隆,为生产“设计者”植物种子油的作物的代谢工程化创造了可能性。在一些方法中,关键的酶促步骤是基因修饰的靶标,并且含油种子中脂肪酸的代谢工程化策略可以包括编码多步生物合成途径的多个基因的过表达和/或抑制,和/或组装完整的途径以合成长链多不饱和脂肪酸。然而,此类方法是复杂的,例如组合了异源基因表达、内源基因沉默、特定培养条件等,在一些情况下导致植物生长和产量的损失(penalty)。

[0008] 鉴于此,在本领域中仍然需要进一步修饰和/或定量和定性改善植物的油含量,并

具体地鉴定具有赋予其宿主植物或其他植物物种改变或增加的油生产的能力的基因和工程化方法。因此,可以将本发明所基于的技术问题视为提供满足上述需求的手段和方法。

[0009] 发明概述

[0010] 现已发现,通过调节植物中编码易位多肽(TSPO多肽)的核酸的表达,可以在此类植物中修饰和改善脂质代谢。具体而言,通过广泛的研究,本发明人已发现,调节植物、植物部分或植物细胞中编码易位多肽(TSPO多肽)的核酸的表达,赋予所述植物、植物部分或植物细胞与对照植物、植物部分或植物细胞相比经修饰的脂质代谢,特别是经改善的脂质代谢。根据本发明的所述核酸经调节的表达涉及所述核酸的特定且明确确定的种子特异性表达。与未经修饰的植物相比,在经修饰的植物中由此类确定的种子特异性表达赋予的改善的特性,尤其包含总体增加的三酰甘油(TAG)水平。

[0011] 因此,在第一方面,本发明涉及包含构建体的植物、植物部分或植物细胞,所述植物部分包括种子,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a)启动子序列,b)编码TSPO多肽的核酸,和任选地c)转录终止子序列,其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子;并且其中,与对照植物、植物部分或植物细胞相比,所述构建体赋予所述植物、植物部分或植物细胞经修饰的脂质代谢。

[0012] 在某些实施方案中,本发明涉及包含构建体的植物、植物部分或植物细胞,所述植物部分包括种子,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:

[0013] a)启动子序列,

[0014] b)编码TSPO多肽的核酸,和

[0015] 任选地c)转录终止子序列,

[0016] 其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子。

[0017] 在优选的实施方案中,所述编码TSPO多肽的核酸是植物来源的。

[0018] 在某些实施方案中,所述编码TSPO多肽的核酸是编码由SEQ ID NO:2所示的TSPO多肽或其同源物的核酸,所述同源物与所述TSPO具有至少25%的序列一致性。

[0019] 在另一方面提供了包含以下可操作连接的核酸序列的构建体:

[0020] a)编码TSPO多肽且优选地如本文所定义的TSPO多肽的核酸,

[0021] b)一个或多个能够驱动a)的核酸表达的控制序列;以及任选地

[0022] c)一个或多个转录终止子序列,

[0023] 其中所述控制序列的至少一个是在所述种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,优选地如本文所定义的种子特异性启动子。

[0024] 在另一方面,本发明还提供了如本文教导的构建体在用于制备与对照植物相比具有经修饰的脂质代谢的植物,并且优选地用于制备与对照植物相比具有提高的三酰甘油的量的植物的方法中的用途。

[0025] 在另一方面,本发明还提供了用如本文所定义的构建体转化的植物、植物部分或植物细胞。

[0026] 在另一方面,本发明涉及用于与对照植物相比修饰植物中脂质代谢的方法,其包括提供包含构建体的植物的步骤,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a)启动子序列,b)编码TSPO多肽,且优选地如本文所定义的TSPO多肽的核酸,和任选地c)转录终

止子序列,其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,优选地如本文所定义的种子特异性启动子。

[0027] 在又一方面,提供了用于产生与对照植物相比具有经修饰的脂质代谢的植物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0028] (i) 在所述植物或其细胞中引入和表达构建体,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽,且优选地如本文所定义的TSP0多肽的核酸,和任选地c) 转录终止子序列,其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,优选地如本文所定义的种子特异性启动子,和

[0029] (ii) 在促进植物生长和发育的条件下培养所述植物细胞或所述植物。

[0030] 本发明进一步提供可通过如本文所定义的方法获得的植物或其植物部分,或其植物细胞,所述植物部分包括其可收获部分如种子。

[0031] 因此,本文提供了与未经修饰的植物或其部分相比具有增加的三酰甘油(TAG)产生和TAG水平的经修饰的植物或其部分如种子,以及方法和工具,如用于其产生的构建体。作为以确定的种子特异性方式工程化表达编码TSP0多肽的TSP0多核苷酸的结果,根据本发明的经修饰的植物产生更高量的三酰甘油。

[0032] 出乎意料的是,TSP0多核苷酸的种子特异性表达,特别是在种子发育阶段期间的种子组织中,可以对植物的脂质代谢具有有益影响。此类发现是出乎意料的,尤其是鉴于天然TSP0多核苷酸的不同内源表达模式,据此此类TSP0是在植物的环境非生物胁迫条件下(例如盐或渗透胁迫)诱导的。在本领域中通常已知TSP0是在真核以及原核物种中发现的蛋白质。还已知植物来源的TSP0与动物和细菌TSP0享有低同源性,并且在结构上不同于细菌和动物TSP0,这在不同来源的这些TSP0之间也可以翻译成功能差异。

[0033] 现在已经证明了TSP0多核苷酸在植物中的种子特异性表达允许调节植物中的脂质代谢,并且特别是允许增加植物产生的TAG的量,而不损害植物生长、植物发育和植物产量。在自然条件下,已知TSP0是一种胁迫诱导的膜蛋白,并参与胁迫稳态。例如,已知来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的TSP0是由非生物胁迫如渗透胁迫或由植物激素脱落酸胁迫短暂诱导的。因此,当以明确限定的种子特异性方式诱导时,TSP0对脂质代谢且特别是对TAG水平的增加的作用是令人惊讶且不可预测的。

[0034] 本文公开了用于产生具有提高的TAG水平的产品的另外的方法。为此目的,在另一方面,提供了用于在植物中产生产品如油或脂肪的方法,所述方法包括以下步骤:种植如本文所定义的(经修饰的)植物,以及从所述植物或其部分或者通过所述植物或其部分产生或收集所述产品,所述部分包括种子。

[0035] 在另一方面,本文还提供了产品如油或脂肪,所述产品从如本文所定义的植物或其部分或者通过如本文所定义的植物或其部分产生,所述部分包括种子,或者可通过如本文所定义的方法获得此类产品。现在将进一步描述本发明。在以下段落中,将更详细地定义本发明的不同方面。如此定义的每个方面可以与任何一个或多个其他方面组合,除非明确地相反地指出。具体而言,指示为优选或有利的任何特征可以与指示为优选或有利的任何其他一个或多个特征组合。

[0036] 附图简述

[0037] 图1显示在来自甘蓝型油菜(*Brassica napus*)的napA基因的种子特异性napin启

动子的控制下表达拟南芥属TSP0基因(Napin::TSP0)的转基因拟南芥属干种子中测量的TAG水平,并与在野生型拟南芥属干种子(野生型)中测定的TAG水平进行了比较。

[0038] 图2显示与野生型种子(野生型)相比,表达由种子特异性napin启动子驱动的拟南芥属TSP0基因(Napin::TSP0)的转基因拟南芥干种子的相对脂肪酸组成(以 μg 脂肪酸/100 μg 种子计,总质量的百分比)。

[0039] 图3显示来自拟南芥的TSP0多肽的氨基酸序列,其对应于SEQ ID NO:2,突出显示了植物特异性的N末端延伸(斜体和下划线),以及用于生成序列的点突变变体的潜在靶位点(氨基酸以粗体、下划线和斜体表示)。来自所示氨基酸序列的Tsp0/MBR结构域从氨基酸52延伸至195。保守的(植物特异性)结构域从氨基酸42延伸至50。

[0040] 图4表示使用MUSCLE-ClustalW的各种TSP0多肽的多重比对。当使用保守氨基酸,即在比对序列中相同的氨基酸和/或高度保守的氨基酸时,这些比对可以用于定义基序或共有序列。细节参见实施例2。

[0041] 图5表示在来自拟南芥属的种子特异性FAE1启动子的控制下用包含TSP0基因的构建体转化的转基因亚麻芥(*Camelina sativa*)品系及其种子中观察到的TAG的总量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 种子)的相对比较。WT是指野生型亚麻芥种子;FAE1+AtTSP0是指表达拟南芥TSP0的转基因种子;FAE1+CsTSP0是指表达亚麻芥TSP0的转基因种子;FAE1+LuTSP0是指表达亚麻(*Linum usitatissimum*)TSP0的转基因种子。值是从每个基因构建体获得的三个独立的转基因品系的平均值。

[0042] 发明详述

[0043] 除非另有定义,否则用于公开本发明的所有术语,包括技术和科学术语,均具有本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。通过进一步的指导,包括术语定义以更好地理解本发明的教导。

[0044] 如本文所用,单数形式的“一个”、“一种”和“该”包括单数和复数指代物,除非上下文另外明确指出。

[0045] 如本文所用,术语“包含”与“包括”或“含有”同义,并且是包括性的或开放式的,并且不排除另外的、非列举的成员、要素或方法步骤。术语还涵盖“由...组成”和“基本上由...组成”,其在专利术语中享有公认的含义。

[0046] 端点对数值范围的叙述包括各个范围内归入的所有数字和分数,以及所列举的端点。

[0047] 当涉及可测量的值如参数、量、持续时间等时,如本文所用,术语“约”或“近似”旨在涵盖指定值的 $\pm 10\%$ 或更小的变化,优选 $\pm 5\%$ 或更小,更优选 $\pm 1\%$ 或更小,且仍更优选 $\pm 0.1\%$ 或更小,在这个范围此类变化适合于在所公开的发明中进行。应当理解,修饰语“约”或“近似”所指的本身也得以具体地并且优选地公开。

[0048] 尽管术语“一个或多个”或“至少一个”,如一组成员中的一个或多个或至少一个成员本身是清楚的,但通过进一步举例说明,术语尤其涵盖对任何一个所述成员,或者任何两个或更多个所述成员(如例如,任何 ≥ 3 、 ≥ 4 、 ≥ 5 、 ≥ 6 或 ≥ 7 等的所述成员)以及多达所有所述成员的引用。

[0049] 在整个说明书中,对“一个实施方案”或“实施方案”的引用意指结合实施方案描述的特定特征、结构或特性包括在本发明的至少一个实施方案中。因此,在整个说明书中各处

出现的短语“在一个实施方案中”或“在实施方案中”不一定都指的是相同的实施方案,但也可以指的是相同的实施方案。此外,如本领域技术人员从本公开中显而易见的,在一个或多个实施方案中,特定的特征、结构或特性可以以任何适当的方式组合。此外,如本领域技术人员将理解的,尽管本文所述的一些实施方案包括其他实施方案中包括的一些但不包括其他特征,但是不同实施方案的特征的组合意在在本发明的范围内,并且形成不同的实施方案。例如,在所附权利要求中,任何要求保护的实施方案可以以任何组合使用。

[0050] 本说明书中引用的所有参考文献均在此以其整体通过引用并入。具体而言,本文具体参考的所有参考文献的教导通过引用并入。

[0051] 在以下段落中,在下文中设定本发明的构建体、植物、方法、产品和用途的优选陈述(特征)和实施方案。除非明确地相反地指出,如此定义的本发明的每个陈述和实施方案可以与任何其他陈述和/或实施方案组合。具体而言,指示为优选或有利的任何特征可以与指示为优选或有利的任何其他特征或陈述组合。

[0052] 至此,本发明特别地由下面编号的方面和实施方案中的一个或多个的任何一个,或与任何其他陈述和/或实施方案的任何组合来捕获。

[0053] 陈述

[0054] 1. 包含构建体的植物、植物部分或植物细胞,所述植物部分包括种子,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:

[0055] a) 启动子序列,

[0056] b) 编码TSP0多肽的核酸,和任选地

[0057] c) 转录终止子序列,

[0058] 其中所述启动子序列是种子特异性启动子,优选地是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子;并且

[0059] 其中,与对照植物、植物部分或植物细胞相比,所述构建体赋予所述植物、植物部分或植物细胞经修饰的脂质代谢。

[0060] 2. 包含构建体的植物、植物部分或植物细胞,所述植物部分包括种子,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:

[0061] a) 启动子序列,

[0062] b) 编码TSP0多肽的核酸,和任选地

[0063] c) 转录终止子序列,

[0064] 其中所述启动子序列是种子特异性启动子,优选地是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子。

[0065] 3. 根据陈述1或2的植物、植物部分或植物细胞,其中所述启动子序列不是天然存在的TSP0启动子。

[0066] 4. 根据陈述1至3中任一项的植物、植物部分或植物细胞,所述植物部分包括种子,在所述植物、植物部分或植物细胞中引入并表达所述构建体。

[0067] 5. 根据陈述1至4中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述核酸编码TSP0多肽,所述TSP0多肽包含

[0068] a) 富含色氨酸的感觉蛋白/外围型苯二氮革受体(benzodiazepine receptor)结构域(Tsp0/MBR结构域),其与如SEQ ID NO:49所示的Tsp0/MBR结构域具有至少30%的序列

一致性,和/或

[0069] b) N末端结构域,其与如SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%的序列一致性,和/或

[0070] c) 保守结构域,其与如SEQ ID NO:51所示的序列具有至少70%的序列一致性。

[0071] 6. 根据陈述1至5中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述核酸编码TSP0多肽,所述TSP0多肽包含N末端结构域,其与如SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%的序列一致性,例如至少50%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的整体序列一致性。

[0072] 7. 根据陈述1至6中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述核酸编码由SEQ ID NO:2所示的TSP0多肽或其同源物,所述同源物与所述TSP0具有至少25%的序列一致性,或者所述同源物以优选的递增顺序与由SEQ ID NO:2所示的氨基酸具有至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的整体序列一致性。

[0073] 8. 根据陈述1至7中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述核酸编码由SEQ ID NO:2所示的TSP0多肽或其同源物,所述同源物与SEQ ID NO:2具有至少25%、优选至少30%、优选至少50%、优选至少75%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%的整体序列一致性。

[0074] 9. 根据陈述1至7中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述核酸编码由SEQ ID NO:32所示的TSP0多肽或其同源物,所述同源物与SEQ ID NO:32具有至少25%、优选至少30%、优选至少50%、优选至少75%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%的整体序列一致性。

[0075] 10. 根据陈述1至7中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述核酸编码由SEQ ID NO:34所示的TSP0多肽或其同源物,所述同源物与SEQ ID NO:34具有至少25%、优选至少30%、优选至少50%、优选至少75%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%的整体序列一致性。

[0076] 11. 根据陈述1至10中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述TSP0多肽由表1的TSP0多肽的任一个所示。

[0077] 12. 根据陈述1至11中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述核酸编码经修饰的TSP0多肽,其中与相应的未经修饰的TSP0多肽的氨基酸序列相比,所述经修饰的TSP0多肽包含一个或多个氨基酸序列变化。

[0078] 13. 根据陈述1至12中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述编码TSP0多肽的核酸是植物来源的,并且优选地对于所述植物是内源的。

[0079] 14. 根据陈述1至13中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述编码TSP0多肽的核酸由表1的TSP0核酸的任一个或其任何变体所示。

[0080] 15. 根据陈述1至14中任一项的植物或其部分,或植物细胞,其中所述种子特异性启动子是在所述种子填充期间的脂质生物合成的时段期间有活性的启动子。

[0081] 16. 根据陈述1至15中任一项的植物或其部分,或植物细胞,其中所述种子特异性启动子是编码种子贮藏蛋白的基因的启动子。

[0082] 17. 根据陈述1至16中任一项的植物或其部分,或植物细胞,其中所述种子特异性

启动子不是TSP0启动子。

[0083] 18. 根据陈述1至17中任一项的植物或其部分,或植物细胞,其中所述种子特异性启动子是napin启动子,优选来自甘蓝型油菜的napin启动子,优选具有与SEQ ID NO:43或其功能性片段或同源物具有至少90%序列一致性的多核苷酸序列的启动子。

[0084] 19. 根据陈述1至15和17中任一项的植物或其部分,或植物细胞,其中所述种子特异性启动子是FAE1启动子,优选来自拟南芥的FAE1启动子,优选具有与SEQ ID NO:44或其功能性片段或同源物具有至少90%序列一致性的多核苷酸序列的FAE1启动子。

[0085] 20. 根据陈述1至19中任一项的植物或其部分,或植物细胞,其中所述种子特异性启动子对于所述植物是外源的。

[0086] 21. 根据陈述1至19中任一项的植物或其部分,或植物细胞,其中所述种子特异性启动子对于所述植物是内源的。

[0087] 22. 根据陈述1至14或20至21中任一项的植物或其部分,或植物细胞,其中所述种子特异性启动子对应于已经经修饰以在种子填充期间,并优选地在所述种子填充期间的脂质生物合成的时段期间在种子组织中赋予种子特异性表达的TSP0启动子。

[0088] 23. 根据陈述1和3至22中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中与对照植物、植物部分或植物细胞相比,所述经修饰的脂质代谢包括在所述植物、植物部分或植物细胞中提高的三酰甘油的量。

[0089] 24. 根据陈述1至23中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中与对照植物、植物部分或植物细胞相比,所述植物、植物部分或植物细胞包含在所述植物、植物部分或植物细胞中提高的三酰甘油的量。

[0090] 25. 根据陈述23或24的植物、植物部分或植物细胞,其中所述三酰甘油是衍生自甘油和脂肪酸的酯,其中所述脂肪酸选自包含以下项的组:包含13至18个碳原子的长链脂肪酸(LCFA)和包含超过18个碳原子的极长链脂肪酸(VLCFA)。

[0091] 26. 包含以下可操作连接的核酸序列的构建体:

[0092] a) 编码TSP0多肽且优选地如陈述1至2和5至11中任一项所定义的TSP0多肽的核酸的核酸,或者如陈述12至14中任一项所定义的核酸;

[0093] b) 一个或多个能够驱动a)的核酸表达的控制序列;以及任选地

[0094] c) 一个或多个转录终止子序列,

[0095] 其中所述控制序列的至少一个是种子特异性启动子,优选地是在种子填充期间在种子组织中有活性的;和/或优选地如陈述1-3和15至22中任一项所定义。

[0096] 27. 根据陈述26的构建体在用于制备具有经修饰的脂质代谢的植物,并且优选地用于制备与对照植物相比具有提高的三酰甘油的量的植物的方法中的用途。

[0097] 28. 根据陈述27的用途,其中所述经修饰的脂质代谢如陈述23至25中任一项所定义。

[0098] 29. 包含根据陈述26的构建体的载体。

[0099] 30. 包含根据陈述26的构建体的宿主细胞,如细菌细胞。

[0100] 31. 用根据陈述26的构建体转化的宿主细胞,如细菌细胞。

[0101] 32. 用根据陈述26的构建体转化的植物、植物部分或植物细胞。

[0102] 33. 根据陈述1至25和32中任一项的植物、植物部分或植物细胞,其中所述植物是

能够产生油(可食用或不可食用)的植物,并且优选地是选自包含以下项的组的植物:芥花(canola)、油籽油菜(oilseed rape)(甘蓝型油菜(*Brassica napus*))、白菜型油菜(turnip rape)(*Brassica rapa*)、亚麻荠属(*camelina*) (亚麻荠(*Camelina sativa*))、芝麻、大豆、玉米、向日葵、红花、水稻、亚麻籽(linseed)(亚麻籽(*flaxseed*))、棉花、芥菜、蓖麻子(蓖麻(*Ricinus communis*))和花生。

[0103] 34. 用于与对照植物相比修饰植物中脂质代谢的方法,其包括提供包含构建体的植物的步骤,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽的核酸,和c) 任选地转录终止子序列,其中所述启动子序列是种子特异性启动子,优选是在种子填充期间在种子组织中有活性的。

[0104] 35. 用于与对照植物相比提高植物中三酰甘油的量的方法,其包括提供包含构建体的植物的步骤,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽的核酸,和c) 任选地转录终止子序列,其中所述启动子序列是种子特异性启动子,优选是在种子填充期间在种子组织中有活性的。

[0105] 36. 根据陈述34或35的方法,其中所述编码TSP0多肽的核酸如陈述12至14中任一项所定义和/或其中所述TSP0多肽如陈述1至2和5至11中任一项所定义。

[0106] 37. 根据陈述34至36中任一项的方法,其中所述种子特异性启动子如陈述1至3和15至22中任一项所定义。

[0107] 38. 根据陈述34和36至37中任一项的方法,其中所述经修饰的脂质代谢如陈述23至25中任一项所定义。

[0108] 39. 根据陈述34至38中任一项的方法,其中所述植物是能够产生油(可食用或不可食用)的植物,并且优选地是选自包含以下项的组的植物:芥花、油籽油菜、白菜型油菜、亚麻荠属(亚麻荠)、芝麻、大豆、玉米、向日葵、红花、水稻、亚麻籽、棉花、芥菜、蓖麻子(蓖麻)和花生。

[0109] 40. 可通过陈述34至39中任一项的方法获得的植物或其植物部分,或其植物细胞,所述植物部分包括其可收获部分如种子。

[0110] 41. 根据陈述40的植物,其与对照植物相比具有提高的三酰甘油的量。

[0111] 42. 用于产生与对照植物相比具有经修饰的脂质代谢的植物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0112] (i) 在所述植物或其细胞中引入和表达构建体,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽的核酸,和c) 任选地转录终止子序列,其中所述启动子序列是种子特异性启动子,优选是在种子填充期间在种子组织中有活性的,和

[0113] (ii) 在促进植物生长和发育的条件下培养所述植物细胞或所述植物。

[0114] 43. 用于产生与对照植物相比具有提高的三酰甘油的量的植物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0115] (i) 在所述植物或其细胞中引入和表达构建体,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽的核酸,和c) 任选地转录终止子序列,其中所述启动子序列是种子特异性启动子,优选是在种子填充期间在种子组织中有活性的,和

- [0116] (ii) 在促进植物生长和发育的条件下培养所述植物细胞或所述植物。
- [0117] 44. 根据陈述42或43的方法,其中所述编码TSP0多肽的核酸如陈述12至14中任一项所定义和/或其中所述TSP0多肽如陈述1至2和5至11中任一项所定义。
- [0118] 45. 根据陈述42至44中任一项的方法,其中所述种子特异性启动子如陈述1至3和15至22中任一项所定义。
- [0119] 46. 根据陈述42和44至45中任一项的方法,其中所述经修饰的脂质代谢如陈述23至25中任一项所定义。
- [0120] 47. 根据陈述42至46中任一项的方法,其中所述植物是能够产生油(可食用或不可食用)的植物,并且优选地是选自包含以下项的组的植物:芥花、油籽油菜、白菜型油菜、亚麻荠属(亚麻荠)、芝麻、大豆、玉米、向日葵、红花、水稻、亚麻籽、棉花、芥菜、蓖麻子(蓖麻)和花生。
- [0121] 48. 可通过陈述42至47中任一项的方法获得的植物或其植物部分,或其植物细胞,所述植物部分包括其可收获部分如种子。
- [0122] 49. 根据陈述48的植物,其与对照植物相比具有提高的三酰甘油的量。
- [0123] 50. 用于在植物中产生产品如油或脂肪的方法,所述方法包括以下步骤:种植根据陈述1至25、32至33、40至41和48至49中任一项的植物,以及从所述植物或其部分或者通过所述植物或其部分产生所述产品,所述部分包括种子。
- [0124] 51. 从根据陈述1至25、32至33、40至41和48至49中任一项的植物或其部分或者通过根据陈述1至25、32至33、40至41和48至49中任一项的植物或其部分产生的产品,如油或脂肪,所述部分包括种子,或者可通过陈述50的方法获得的产品。
- [0125] 52. 根据陈述51的产品,其与从对照植物或其部分或者通过对照植物或其部分产生的对照产品相比具有提高的三酰甘油的量。
- [0126] 本申请涉及使用主要通过有意地插入和/或修饰植物中的核酸和/或氨基酸序列而起作用的技术进行植物的基因工程。
- [0127] 本发明人已通过广泛的实验发现,以种子特异性的方式,即在种子发育期间,特别是在种子填充阶段期间(贮藏化合物生物合成),在植物中表达编码易位蛋白(TSP0)的核酸允许修饰植物中的脂质代谢。因此,已经发现编码TSP0的核酸的非组成性表达影响并且特别是改善植物中的脂质代谢。具体而言,本发明人已经显示,当与其中编码TSP0的核酸不表达,或内源表达但不以如本文所定义的种子特异性方式表达的对照植物相比,如本文所提供的编码TSP0的核酸的种子特异性表达能够赋予植物改善的脂质代谢。更具体地,与对照植物相比,编码TSP0的核酸的非组成性表达,特别是如本文所定义的种子特异性表达能够增加植物中三酰甘油分子(本文中的“TAG”)的量。因此,在植物中编码TSP0的核酸的种子特异性表达允许在数量和质量上改善植物的脂质代谢,并产生具有在数量和质量上改善的脂质特别是三酰甘油生产的植物。
- [0128] 在某些实施方案中,特定类型的三酰甘油分子可以在数量和质量上得以改变。这些发现是出乎意料的,特别是因为编码TSP0的核酸先前已与不同的植物生理机制和不同的植物途径相关,具体而言,先前报道编码TSP0的植物核酸与植物中的非生物胁迫调节相关。
- [0129] 因此,本发明涉及调节编码易位蛋白的核酸的表达。
- [0130] 术语“表达”或“核酸的表达”或“基因表达”意指特定的一个基因或特定的多个基

因或特定构建体的转录。术语“表达”或“基因表达”具体是指一个或多个基因或构建体转录成结构RNA (rRNA, tRNA) 或mRNA, 有或没有随后将后者翻译成蛋白质。过程包括DNA的转录和所得mRNA产物的加工。如本文所用, 术语“调节表达”意指与原始野生型表达水平和/或模式不同的任何表达形式。

[0131] 本发明中应用的“易位蛋白”是指属于含有富含色氨酸的感觉蛋白/外围型苯二氮䓬受体 (Tsp0/MBR) 结构域的蛋白质家族的蛋白质。该家族的含有易位蛋白 (TSP0)/外围型苯二氮䓬受体 (MBR) 结构域的蛋白质是膜锚定蛋白, 其从细菌到哺乳动物都显示出高度保守。易位蛋白也已在植物中鉴定出来, 其中据报道, 它们在适应不利的环境条件 (如渗透和盐胁迫) 中具有生理功能。例如, 拟南芥属易位蛋白 (AtTSP0) 是由拟南芥属中的单个基因座编码的多位 (polytopic) 膜蛋白。AtTSP0是一种多胁迫调节剂, 并且植物细胞中AtTSP0的水平受到严格调节。AtTSP0仅在胁迫期间在拟南芥属中瞬时表达, 而已知组成型表达的AtTSP0通过选择性自噬途径得以主动下调。靶向该自噬途径的AtTSP0需要血红素结合 (Vanhee et al., 2011, The Plant Cell:23, 785-805; Hachez et al., 2014, The Plant Cell:26, 4974-4990)。

[0132] 下面进一步阐述如本发明中应用的编码易位蛋白的核酸的各种实施方案。

[0133] 在一方面, 本发明涉及包含以下可操作连接的核酸序列的构建体:

[0134] a) 编码如本文所定义的TSP0多肽的核酸,

[0135] b) 一个或多个能够驱动a)的核酸表达的控制序列; 以及任选地

[0136] c) 一个或多个转录终止子序列,

[0137] 其中所述控制序列的至少一个是如本文所定义的在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子。

[0138] 如本文所教导的构建体的特征具体在于其含有启动子序列, 所述启动子序列是在种子组织中和在种子填充期间有活性的种子特异性启动子, 用于驱动编码TSP0多肽的核酸的表达。与缺乏所述构建体的对照植物、植物部分或植物细胞相比, 当引入植物、植物部分或植物细胞并在其中表达时, 此类构建物赋予所述植物、植物部分或植物细胞如本文所定义的经修饰的脂质代谢。在本发明的上下文中, 启动子序列、编码TSP0多肽的核酸和任选地转录终止子序列因此得以可操作地连接以提供本发明的构建体。表述“可操作地连接的核酸序列”意指核酸序列以这样的方式彼此连接, 使得表达控制序列 (例如启动子和转录终止子) 有效地控制感兴趣的编码序列 (例如本文所定义的TSP0多核苷酸) 的表达。

[0139] 本发明还涉及所述构建体在植物、植物部分 (包括种子) 和植物细胞中的用途, 以及用于修饰靶定植物中脂质代谢的本发明的载体、宿主细胞和方法。

[0140] 现在将首先在下文中更详细地描述如本文所教导的构建体的不同元件。

[0141] 启动子

[0142] 术语“启动子”、“调节元件”和“控制序列”在本文中均可互换使用, 并且在广义上应理解是指能够影响它们所连接的序列的表达的调节核酸序列。术语“启动子”通常是指位于基因或核酸转录起点上游的核酸控制序列 (DNA序列), 并且其参与RNA聚合酶和其他蛋白质的识别和结合, 从而指导可操作地连接的核酸的转录。因此, 启动子含有直接与RNA聚合酶结合或参与其募集的DNA序列。术语“启动子”涵盖了衍生自经典真核基因组基因的转

录调节序列(包括TATA框,其可能是准确的转录起始所需要的,有或没有CCAAT框序列)和另外的调节元件(即上游激活序列、增强子和沉默子),其响应某些刺激或以组织特异性方式改变基因表达。例如,启动子序列也可以包括“增强子区”,其是可以与蛋白质(即反式作用因子)结合以增强基因簇中基因的转录水平的DNA的一个或多个区域。增强子虽然通常在编码序列的5'端,但是也可以与启动子序列分开,例如可以在基因的内含子内。启动子序列可以包含5' UTR和/或一个或多个内含子(任选地位于5' UTR内)。

[0143] 术语中还包括经典原核基因的转录调节序列,在这种情况下,它可以包括-35框序列和/或-10框转录调节序列。术语“调节元件”还涵盖赋予、激活或增强核酸分子在细胞、组织或器官中表达的合成融合分子或衍生物。

[0144] 根据本发明,如本文教导的应用于植物、构建体和方法中的启动子序列是“种子特异性”启动子。

[0145] 如本文所用,术语“种子特异性”是指在种子填充期间在种子组织中有活性的启动子。换句话说,如本文所用的种子特异性启动子具有特定的空间(在种子组织中)和时间依赖性(在种子填充期间)表达模式。

[0146] 如本文所用,术语“种子组织”应以其最广义理解,并因此包括胚乳、糊粉和胚组织。

[0147] 在某些实施方案中,种子特异性启动子基本上在种子组织中有活性,并且更优选仅在种子组织中有活性。在该上下文中,术语“基本上”可以指在种子组织以外的其他组织中没有活性或在种子组织以外的其他组织中具有微不足道的活性的启动子。

[0148] 在某些实施方案中,如本发明中所使用的种子特异性启动子在绿色组织中没有活性或具有微不足道的活性。

[0149] 如本文所用,术语“种子填充”或“种子填充阶段”是指种子发育期间的阶段,在所述阶段中生物合成贮藏化合物如淀粉、脂质(油)和蛋白质并存储在种子组织中。在某些实施方案中,“种子填充”或“种子填充阶段”是指在所述种子填充阶段期间脂质(油)生物合成的时段(或阶段)。

[0150] 种子发育通常可以示于三个子序列阶段,对应于:(a)胚胎发生,(b)种子填充和(c)脱水,从而形成干燥成熟的种子。因此,种子填充阶段之前是胚胎发生阶段,并且随后是种子的脱水和成熟。成熟后,获得干种子,其准备在合适的条件下萌发。在种子填充阶段期间,植物在其种子中积累各种类型的贮藏化合物以允许胚萌发并将其自身确立为苗。根据物种,主要的贮藏化合物可以是淀粉、蛋白质或脂质(油)。在种子填充阶段期间,胚通常扩大以适应随后萌发所需的贮藏化合物的沉积。

[0151] 在某些实施方案中,种子特异性启动子基本上在种子填充期间有活性,并且优选仅在种子填充期间有活性。在本上下文中,术语“基本上”可以指在种子发育的其他阶段期间没有活性的启动子或在种子发育的其他阶段期间具有微不足道的活性的启动子。

[0152] 在某些实施方案中,种子特异性启动子基本上在所述种子填充期间的脂质(油)生物合成期间是有活性的,并且优选仅在所述种子填充期间的脂质(油)生物合成期间有活性的。

[0153] 在某些实施方案中,种子特异性启动子在萌发期间或萌发后的生长阶段期间不具有活性或具有微不足道的活性。

[0154] 在本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,如本文所述的种子特异性启动子是植物来源的启动子序列。“植物来源的启动子”包括调节元件,其介导植物细胞中编码序列的表达并且起源自植物细胞。

[0155] 在某些实施方案中,如本文所述的种子特异性启动子可以起源自或可以衍生自单子叶植物,并且优选地起源自或衍生自选自包含以下项的组的单子叶植物:水稻、油棕、小麦、玉米、大麦、高粱和二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)。

[0156] 在某些其他实施方案中,如本文所述的种子特异性启动子可以起源自或可以衍生自双子叶植物,优选地起源自或衍生自选自包含以下项的组的双子叶植物:拟南芥属、芥花、油籽油菜、亚麻籽(linseed)(也称为“亚麻籽(flaxseed)”)、大豆、向日葵、棉花、花生、芝麻、蓖麻子(蓖麻)。

[0157] 在如本文所教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,如本文所应用的种子特异性启动子可以是来自对于所述植物是外源的基因的启动子序列,在本文中称为“外源启动子”。换句话说,所述种子特异性启动子对于所述植物是外源的,即不是源自该植物内部。例如,植物可以是油菜籽(甘蓝型油菜),并且启动子序列可以是来自拟南芥属的种子特异性启动子;或者植物可以是亚麻籽(亚麻),并且种子特异性启动子可以是来自甘蓝型油菜的种子特异性启动子序列。

[0158] 在如本文所教导的构建体、植物或方法的某些其他实施方案中,种子特异性启动子可以是来自对于所述植物是内源的基因的启动子序列,在本文中称为“内源启动子”。换句话说,所述种子特异性启动子对于所述植物是内源的,即源自该植物内部。例如,植物可以是油菜籽(甘蓝型油菜),并且种子特异性启动子序列可以是来自油菜籽的种子特异性启动子;或者植物可以是亚麻籽(亚麻),并且种子特异性启动子可以是来自亚麻籽的种子特异性启动子。

[0159] 如本文所用,在核酸序列(核酸或氨基酸序列)的上下文中,术语“外源”是指外来序列,即不是天然发现于给定的感兴趣的植物中;而术语“内源”是指天然发现于给定感兴趣的植物中的序列。本文中提到的术语“内源”也应理解为是指在感兴趣的植物中以其天然形式(即,没有任何人为干预)发现的所讨论的核酸序列,但也指以分离形式的相同核酸序列随后(重新)引入到所述植物中。分离的核酸序列可以从感兴趣的生物体/植物分离或者可以是人造的,例如通过化学合成。

[0160] 在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子可以例如包括编码种子贮藏蛋白的基因的启动子。因此,在某些实施方案中,所述种子特异性启动子是编码种子贮藏蛋白的基因的启动子。种子贮藏蛋白在本文中旨在指在种子发育期间合成并存储在种子中的蛋白质。

[0161] 在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,种子特异性启动子不同于天然存在的TSP0启动子。在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,种子特异性启动子不是天然存在的TSP0启动子。术语“与天然存在的TSP0启动子不同”或“不是天然存在的TSP0启动子”在本文中可以用作同义词。术语“与天然TSP0启动子不同”或“不是天然存在的TSP0启动子”旨在涵盖不是TSP0启动子的启动子序列或启动子,或者是已经经修饰的TSP0启动子的启动子序列或启动子。

[0162] 在一个实例中,如本文所定义的种子特异性启动子包括不是TSP0启动子的启动子

(并因此不同于TSP0启动子),并且其对于所述植物可以是内源的或外源的。

[0163] 在某些实施方案中,种子特异性启动子是napin启动子(即来自编码napin的基因的启动子),优选来自芸薹属物种如甘蓝型油菜的napin启动子。在一个实例中,用于本文的种子特异性启动子是来自甘蓝型油菜的2S贮藏蛋白NapA基因的启动子的截短形式(截短形式-309至-152)(参见Ericson et al.1991,Eur.J.Biochem 197:741-746)或其来自另一植物物种的同源物。在一个优选的实施方案中,所述种子特异性启动子是napin启动子,其具有与SEQ ID NO:43具有至少90%的序列一致性,并且例如与SEQ ID NO:43具有至少95%或至少97%或至少98%或至少99%的序列一致性的多核苷酸序列,或其功能片段或同源物。在一个优选的实施方案中,所述napin启动子由SEQ ID NO:43或其功能片段所示。

[0164] 在某些实施方案中,种子特异性启动子是FAE1启动子(即来自编码FAE1的基因的启动子),优选来自拟南芥的FAE1启动子。在一个实例中,用于本文的种子特异性启动子是来自拟南芥的脂肪酸延伸酶1(FAE1)(AT4G34520)基因的启动子(Rossak et al.2001, Plant Molecular Biology 46:717-725)或其在一植物物种中的同源物。在一个优选的实施方案中,所述种子特异性启动子是FAE1启动子,其具有与SEQ ID NO:44具有至少90%的序列一致性,并且例如与SEQ ID NO:44具有至少95%或至少97%或至少98%或至少99%的序列一致性的多核苷酸序列,或其功能片段或同源物。在一个优选的实施方案中,所述FAE1启动子由SEQ ID NO:44或其功能片段所示。

[0165] 在某些实施方案中,种子特异性启动子是油质蛋白启动子(即来自编码油质蛋白的基因的启动子),优选来自稻(*Oryza sativa*)的油质蛋白启动子(Qu and Takaiwa 2004, Plant Biotech 2:113-125)或功能片段,或其在一植物物种中的同源物。

[0166] 在本上下文文中,术语“功能片段”或“活性片段”或“具有启动子活性的片段”在本文中可互换使用,并且是指能够在植物中赋予如本文所述的种子特异性转录的核酸片段。为了鉴定具有功能活性的启动子片段,可以例如通过将启动子片段可操作地连接至报告物基因并使用本领域公知的技术定性地(时空转录)和/或定量地测定启动子活性来分析候选启动子片段的启动子强度和/或表达模式。合适的众所周知的报告物基因包括例如 β -葡萄糖醛酸糖苷酶或荧光蛋白变体。例如通过测量 β -葡萄糖醛酸糖苷酶的酶活性来测定启动子活性。然后将启动子片段的强度和/或表达模式与参照启动子(如本发明的方法中使用的启动子)的强度和/或表达模式进行比较。

[0167] 为了在植物中表达,如上所述,编码TSP0的核酸序列必须与合适的启动子可操作地连接或者包含合适的启动子,所述启动子在正确的时间点以所需的空间表达模式表达多核苷酸。可以通过一种或多种核苷酸取代、插入和/或缺失来修饰可用于本发明的植物、构建体和方法中的TSP0多核苷酸序列上游的启动子,而不干扰启动子、开放阅读框(ORF)或3'调节区(如终止子或其他远离ORF的3'调节区)的功能或活性。此外有可能通过修饰启动子的序列来增加其活性。

[0168] 因此,在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,所应用的启动子序列可以衍生自不具有种子特异性表达模式但已经经修饰以赋予如上文所定义的种子特异性表达的启动子。例如,在某些实施方案中,应用于如本文所教导的构建体、植物或方法中的启动子序列可以衍生自TSP0多核苷酸的启动子(“TSP0启动子”),其是对于所述植物内源或外源的TSP0多核苷酸,条件是所述TSP0启动子已经经修饰以赋予如上文所定义的种子特

异性表达。此类TSP0启动子的修饰可以例如通过基因组编辑来实现。因此,如本文所用的种子特异性启动子不同于天然存在的(即未经修饰的)TSP0启动子,其对于其所应用的植物是内源的或外源的。因此,在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,种子特异性启动子不是TSP0启动子,且例如不是天然存在的TSP0启动子。“天然存在的”TSP0启动子意指驱动TSP0基因表达的启动子,所述启动子是未经修饰的。在某些实施方案中,“天然存在的TSP0启动子”和“TSP0启动子”可以用作同义词。

[0169] 因此,在如本文所教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,使用衍生自经修饰的TSP0启动子的启动子序列,其中所述经修饰的TSP0启动子是已经经修饰以赋予如上文所定义的种子特异性表达的TSP0启动子。在一个优选的实施方案中,此类经修饰的TSP0启动子衍生自内源TSP0启动子。在另一个优选的实施方案中,此类经修饰的TSP0启动子衍生自外源TSP0启动子。

[0170] 在一个实例中,使用经修饰的TSP0启动子序列,其衍生自如由SEQ ID NO:41所示的来自拟南芥属的TSP0启动子或其功能片段,其已经经修饰以赋予如本文所定义的种子特异性表达。

[0171] 在另一个实例中,使用经修饰的TSP0启动子序列,其衍生自如由SEQ ID NO:42所示的来自亚麻(亚麻)的TSP0启动子或其功能片段,其已经经修饰以赋予如本文所定义的种子特异性表达。

[0172] 在如本文所教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,如本文所定义的种子特异性启动子和编码TSP0的核酸两者均对于所述植物是内源的。

[0173] 编码TSP0多肽的核酸

[0174] 在本发明的上下文中,术语“易位蛋白”或“易位多肽”或“TSP0蛋白”或“TSP0多肽”或“TSP0”可互换使用,并且认为是指本文所定义的TSP0多肽。术语“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,且是指通过肽键连接在一起的任何长度的聚合形式的氨基酸。本文中对“TSP0核酸”或“TSP0多核苷酸”的任何提及均意指能够编码此类TSP0多肽的核酸。

[0175] 在如本文教导的构建体、植物或方法的优选实施方案中,术语TSP0蛋白或TSP0核苷酸旨在指植物来源的蛋白质或核苷酸。如本文所定义的“TSP0多肽”是指由SEQ ID NO:2所示的多肽或其同源物,所述同源物与所述TSP0具有至少25%的序列一致性。

[0176] 编码TSP0多肽的核酸的实例在本文表1中给出。此类核酸可用于应用于如本文教导的构建体、植物和方法中。表1中包括由SEQ ID NO:2所示的TSP0多肽的同源物(直系同源物和旁系同源物)的氨基酸序列,术语“直系同源物”和“旁系同源物”如本文所定义。其他直系同源物和旁系同源物可以通过如下所述进行所谓的Reciprocal BLAST检索来容易地鉴定;在查询序列为SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2的情况下,第二BLAST(反向BLAST)将针对拟南芥属序列。

[0177] 如本文所定义的蛋白质的“同源物”涵盖相对于所讨论的未经修饰的蛋白质具有氨基酸取代、缺失和/或插入的肽、寡肽、多肽、蛋白质和酶,并且与它们所衍生自的未经修饰的蛋白质具有相似的生物学和功能活性。

[0178] 缺失是指从蛋白质中去除一个或多个氨基酸。

[0179] 插入是指引入到蛋白质中预定位点的一个或多个氨基酸残基。插入可以包含N末端和/或C末端融合以及单个或多个氨基酸的序列内插入。通常,氨基酸序列内的插入将小

于N末端或C末端融合,约1至10个残基的量级。N或C末端融合蛋白或肽的实例包括用于酵母双杂交系统、噬菌体外壳蛋白、(组氨酸)-6-标签、谷胱甘肽S-转移酶-标签、蛋白A、麦芽糖结合蛋白、二氢叶酸还原酶、c-myc表位、lacZ、CMP(钙调蛋白结合肽)、HA表位、蛋白C表位和VSV表位的转录激活物的结合结构域或激活结构域。

[0180] 取代是指用具有相似特性(如相似的疏水性、亲水性、抗原性、形成或破坏 α -螺旋结构或 β -折叠结构的倾向)的其他氨基酸替换蛋白质的氨基酸。氨基酸取代通常是单个残基,但可以根据置于多肽上的功能限制而聚簇,并且范围可以是1至10个氨基酸;插入通常为约1至10个氨基酸残基的量级。氨基酸取代优选是保守氨基酸取代。保守取代表是本领域众所周知的(参见例如Creighton(1984)Proteins.W.H.Freeman and Company(Eds)和下表A)。

[0181] 表A:保守氨基酸取代的实例

残基	保守取代	残基	保守取代
Ala	Ser	Leu	Ile;Val
Arg	Lys	Lys	Arg;Gln
Asn	Gln;His	Met	Leu;Ile
Asp	Glu	Phe	Met,Leu,Tyr
Gln	Asn	Ser	Thr,Gly
Cys	Ser	Thr	Ser;Val
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Pro	Tyr	Trp;Phe
His	Asn;Gln	Val	Ile;Leu
Ile	Leu;Val		

[0183] 使用本领域众所周知的肽合成技术,如固相肽合成等,或通过重组DNA操纵,可以容易地进行氨基酸取代、缺失和/或插入。用于操纵DNA序列以产生蛋白质的取代、插入或缺失变体的方法是本领域众所周知的。例如,用于在DNA中预定位点处进行取代突变的技术是本领域技术人员众所周知的,并且包括M13诱变、T7-Gen体外诱变(USB,Cleveland,OH)、QuickChange定点诱变(Stratagene,San Diego,CA)、PCR介导的定点诱变或其他定点诱变方案。

[0184] 直系同源物和旁系同源物涵盖用于描述基因的祖先关系的进化概念。旁系同源物是同一物种内的基因,这些基因是通过祖先基因的复制而起源的。直系同源物是来自不同生物体的基因,这些基因是通过物种形成而起源的,并且也衍生自共同的祖先基因。

[0185] Reciprocal BLAST通常涉及第一BLAST,该第一BLAST涉及针对任何序列数据库(如可公开获得的NCBI数据库)对查询序列(例如,使用实施例部分的表1中列出的任何序列)进行BLAST。从核苷酸序列开始时,通常使用BLASTN或TBLASTN(使用标准默认值),而从蛋白质序列开始时,通常使用BLASTP或TBLASTX(使用标准默认值)。BLAST结果可以任选地得以过滤。然后,将过滤结果或未过滤结果的全长序列针对来自衍生查询序列的生物体的序列进行反向BLAST(第二BLAST)。然后比较第一和第二BLAST的结果。如果第一BLAST的高级命中来自与从中衍生查询序列的物种相同的物种,然后理想情况下,反向BLAST理想地结果是查询序列位于最高命中中,则鉴定为旁系同源物;如果第一BLAST中的高级命中不是来

自与从中衍生查询序列的物种相同的物种,并且优选在反向BLAST时结果是查询序列位于最高命中中,则鉴定为直系同源物。高级命中是具有低E值的命中。E值越低,得分越显著(换句话说,偶然发现命中的机会就越小)。E值的计算在本领域中是众所周知的。除E值外,还通过百分比一致性对比较进行评分。百分比一致性是指在特定长度上两个比较的核酸(或多肽)序列之间相同核苷酸(或氨基酸)的数量。对于大家族,可以使用ClustalW,然后使用邻接树(neighbor joining tree),以帮助可视化相关基因的聚类并鉴定直系同源物和旁系同源物。

[0186] 表1:用于本发明的TSP0多肽的实例

[0187]

名称	核酸 SEQ ID NO:	多肽 SEQ ID NO:
拟南芥	1	2
拟南芥	3	4
拟南芥	5	6
拟南芥	7	8
拟南芥	9	10
拟南芥	11	12
拟南芥	13	14
拟南芥	15	16
甘蓝型油菜	17	18
甘蓝型油菜	19	20
甘蓝型油菜	21	22
甘蓝型油菜	23	24

[0188]	白菜型油菜	25	26
	白菜型油菜	27	28
	稻	29	30
	亚麻荠	31	32
	亚麻	33	34
	玉米(<i>Zea mays</i>)	35	36
	向日葵 (<i>Helianthus annuus</i>)	37	38
	向日葵	39	40

[0189] 在一个优选的实施方案中,可用于本发明的构建体、植物和方法中的TSP0多肽或其同源物以优选的递增顺序与SEQ ID NO:2所示的氨基酸具有至少25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的整体序列一致性。使用全局比对算法,如程序GAP(GCG Wisconsin Package, Accelrys)中的Needleman Wunsch算法,优选地使用默认参数,并且优选地使用成熟蛋白质的序列(即,不考虑分泌信号或转运肽)来确定整体序列一致性。

[0190] 在一个优选的实施方案中,可用于本发明的植物和方法中的TSP0多肽由SEQ ID NO:2或其与SEQ ID NO:2具有至少25%、或至少60%、或至少75%、或至少85%、或至少90%的整体序列一致性的同源物所示。

[0191] 在一个优选的实施方案中,可用于本发明的植物和方法中的TSP0多肽由SEQ ID NO:32或其与SEQ ID NO:32具有至少25%、或至少60%、或至少75%、或至少85%、或至少90%的整体序列一致性的同源物所示。

[0192] 在一个优选的实施方案中,可用于本发明的植物和方法中的TSP0多肽由SEQ ID NO:34或其与SEQ ID NO:34具有至少25%、或至少60%、或至少75%、或至少85%、或至少90%的整体序列一致性的同源物所示。

[0193] 在某些实施方案中,可用于本发明的构建体、植物和方法中的TSP0多肽的同源物还可以包括“经修饰的TSP0多肽”。如本文所教导的TSP0多肽可以方便地表示为“经修饰的”,或“突变的”或“突变体”,或表示为包含一个或多个突变,即,与未突变的TSP0多肽的氨基酸序列相比,如具体地与野生型TSP0多肽的氨基酸序列相比,包含一个或多个氨基酸序列变化。

[0194] 拟南芥属TSP0多肽在其由SEQ ID NO:2所示的序列中位置91(H91)处和位置115(H115)处含有两个组氨酸残基。两个残基在被子植物TSP0中似乎相对保守(参见Vanhee et al. 2011)。

[0195] 因此,在一个实施方案中,本文提供了经修饰的TSP0多肽,用于如本文所教导的植物和方法中,其包含在对应于SEQ ID NO:2的位置91的位置处用丙氨酸氨基酸替换组氨酸氨基酸的突变。具体而言,本文提供了经修饰的TSP0多肽,其由SEQ ID NO:4所示并由SEQ ID NO:3所示的核酸编码。

[0196] 在另一个实施方案中,提供了经修饰的TSP0多肽,其包含在对应于SEQ ID NO:2的位置115的位置处将组氨酸氨基酸替换为丙氨酸氨基酸的突变。具体而言,本文提供了经修饰的TSP0多肽,其由SEQ ID NO:6所示并由SEQ ID NO:5所示的核酸编码。

[0197] 在另一个实施方案中,提供了经修饰的TSP0多肽,其包含在对应于SEQ ID NO:2的位置91的位置处用丙氨酸氨基酸替换组氨酸氨基酸的第一突变和在对应于SEQ ID NO:2的位置115的位置处将组氨酸氨基酸替换为丙氨酸氨基酸的第二突变。具体而言,本文提供了经修饰的TSP0多肽,其由SEQ ID NO:8所示并由SEQ ID NO:7所示的核酸编码。

[0198] 在另一个实施方案中,提供了经修饰的TSP0多肽,其包含在对应于SEQ ID NO:2的位置94的位置处用色氨酸氨基酸替换半胱氨酸氨基酸的突变。具体而言,本文提供了经修饰的TSP0多肽,其由SEQ ID NO:10所示并由SEQ ID NO:9所示的核酸编码。

[0199] 在另一个实施方案中,提供了经修饰的TSP0多肽,其包含在对应于SEQ ID NO:2的位置122的位置处用丙氨酸氨基酸替换酪氨酸氨基酸的突变。具体而言,本文提供了经修饰的TSP0多肽,其由SEQ ID NO:12所示并由SEQ ID NO:11所示的核酸编码。

[0200] 在另一个实施方案中,提供了经修饰的TSP0多肽,其包含在对应于SEQ ID NO:2的位置124的位置处用丙氨酸氨基酸替换酪氨酸氨基酸的突变。具体而言,本文提供了经修饰的TSP0多肽,其由SEQ ID NO:14所示并由SEQ ID NO:13所示的核酸编码。

[0201] 在另一个实施方案中,提供了经修饰的TSP0多肽,其包含在对应于SEQ ID NO:2的位置122的位置处用丙氨酸氨基酸替换酪氨酸氨基酸的第一突变和在对应于SEQ ID NO:2的位置124的位置处用丙氨酸氨基酸替换酪氨酸氨基酸的第二突变。具体而言,本文提供了经修饰的TSP0多肽,其由SEQ ID NO:16所示并由SEQ ID NO:15所示的核酸编码。

[0202] 由于植物TSP0多肽、TSP0多肽和编码它们的核酸之间存在序列同源性,在对应于野生型拟南芥属TSP0(由SEQ ID NO:2所示)的上述位置的位置处带有如上所述的一个或多个突变,无论这些氨基酸相对于如上所示野生型拟南芥属TSP0的位置的相对位置如何,都可以用于本发明。为了应用该原理,本领域技术人员将能够容易地通过使用标准的序列比对技术在任何TSP0多核苷酸序列中找到待突变的一个或两个氨基酸和/或核苷酸。或者,使用遗传密码,本领域技术人员也将能够在TSP0多核苷酸序列中找到适当的核苷酸修饰。

[0203] 在本上下文,术语“对应于”将被技术人员直接理解为两种形式的TSP0多核苷酸的核苷酸之间的对应。举例来说,此类相应的核苷酸可以在两种形式的TSP0多核苷酸的核苷酸序列的比对中位于相同位置。可以如在别处解释的那样结合序列一致性程度的确定来产生序列比对。同样,技术人员将对两种形式的TSP0多肽的氨基酸之间的对应具有直接的了解。举例来说,此类相应的氨基酸可以在两种形式的TSP0多肽的一级氨基酸序列的比对中位于相同位置。可以如说明书中其他地方所解释的那样结合序列一致性程度的确定而产生序列比对。

[0204] 在某些实施方案中,可用于本发明的构建体、植物和方法中的“TSP0多肽”是指具有某些共有序列、基序和/或结构域的多肽。

[0205] 术语“结构域”是指沿进化相关蛋白质的序列的比对在特定位置处保守的一组氨基酸。尽管其他位置处的氨基酸在同源物之间可能有所不同,但在特定位置处高度保守的氨基酸表明可能在蛋白质的结构、稳定性或功能中至关重要的氨基酸。通过它们在蛋白质同源物家族的比对序列中的高度保守性来鉴定,它们可以用作确定是否任何所讨论的多肽属于先前鉴定的多肽家族的鉴定物。

[0206] 术语“基序”或“共有序列”是指进化相关蛋白质的序列中的短的保守区域。基序通常是结构域的高度保守部分,但也可以仅包括该结构域的一部分,或位于保守结构域之外(如果基序的所有氨基酸都落在定义的结构域之外)。

[0207] 存在本领域公知的用于鉴定结构域的专家数据库,例如SMART、InterPro、Prosites或Pfam。结构域或基序也可以使用常规技术如通过序列比对来鉴定。使用全局比对算法,如程序GAP(GCG Wisconsin Package, Accelrys)中的Needleman Wunsch算法,优选地使用默认参数,并且优选地使用成熟蛋白质的序列(即,不考虑分泌信号或转运肽)来确定整体序列一致性。与整体序列一致性相比,当仅考虑保守结构域或基序时,序列一致性通常更高。

[0208] 通过将其他蛋白质序列与SEQ ID NO:2进行比对,可以容易地鉴定如本文所提及的相应结构域。这样,可以使用本领域公知的常规技术,如通过序列比对,容易地鉴定TSP0多肽或其同源物(包括直系同源物和旁系同源物)。用于比较的序列比对的方法是本领域众所周知的,此类方法包括GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA。GAP使用Needleman和Wunsch的算法以找到使匹配数最大化并使空位数最小化的两个完整序列的比对。BLAST算法计算百分比序列一致性,并对两个序列之间的相似性进行统计分析。用于进行BLAST分析的软件可以通过国家生物技术信息中心(National Centre for Biotechnology Information)公开获得。同源物可以使用例如具有默认的成对比对参数的ClustalW多重序列比对算法和以百分比计的得分方法来容易地鉴定。也可以使用MatGAT软件包中可用的方法之一来确定相似性和一致性的全局百分比。如本领域技术人员显而易见的,可以进行较小的手动编辑以优化保守基序之间的比对。此外,代替使用全长序列来鉴定同源物,还可以使用特定的结构域(如以上定义的)。使用默认参数,使用上述程序,在整个保守结构域或核酸或氨基酸序列上确定序列一致性值,其在本文中以百分比表示。

[0209] 在某些实施方案中,将TSP0多肽定义为包含富含色氨酸的感觉蛋白/外围型苯二氮䓬受体结构域(Tsp0/MBR结构域)。Tsp0/MBR结构域可以由几个(例如5个)跨膜结构域的存在在结构上定义,并且就其3-D折叠结构而言,跨不同物种呈现高度保守性。使用众所周知的数据库鉴定具有Tsp0/MBR结构域的多肽在本领域技术人员的技术范围内。

[0210] 在某些实施方案中,将TSP0多肽定义为包含N末端结构域(N末端延伸结构域)。优选地,此类TSP0 N末端结构域富含具有净正电荷的碱性残基。技术人员将容易地知道如何鉴定具有此类N末端结构域的蛋白质。

[0211] 在某些实施方案中,将TSP0多肽定义为包含结构域,具体地富含色氨酸的感觉蛋白/外围型苯二氮䓬受体结构域(Tsp0/MBR结构域),其与由SEQ ID NO:49所示的Tsp0/MBR结构域具有至少30%的序列一致性,且例如与由SEQ ID NO:49所示的氨基酸具有至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的整体序列一致性。

[0212] 在某些实施方案中,将TSP0多肽定义为包含N末端结构域,其与由SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%的序列一致性;且例如与由SEQ ID NO:50所示的氨基酸具有至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的整体序列一致性。

[0213] 在某些实施方案中,TSP0多肽包含与由SEQ ID NO:51所示的氨基酸具有至少70%序列一致性的保守结构域(或基序);且例如与由SEQ ID NO:51所示的氨基酸具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的整体序列一致性。

[0214] 如上所述,本文对“TSP0核酸”或“TSP0多核苷酸”或“编码TSP0的核酸”的任何提及均指能够编码如本文定义的TSP0多肽的核酸。本文提及“TSP0核酸”或“TSP0多核苷酸”或“编码TSP0的核酸”是指任何长度的双链或单链的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的聚合物形式或其类似物,其具有天然核糖核苷酸的基本特征,在于它可以以类似于天然存在的多核苷酸的方式与核酸序列杂交。

[0215] 在某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以起源自或可以衍生自野生型或天然TSP0多核苷酸。

[0216] 在某些实施方案中,如本文教导的TSP0多核苷酸可以包含TSP0基因的基因组序列或由之组成,其以翻译起始密码子开始并以本身已知的翻译终止密码子结束(并且不含有任何内部框内翻译终止密码子)。在某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以包含(编码)外显子和一个或多个(非编码)内含子或由之组成。在某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以包含本身已知的开放阅读框(ORF)或由之组成,其可以跨越多个外显子。术语“基因组序列”是指在生物体(例如植物)的基因组中发现的一连串核苷酸。

[0217] 在某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以包含TSP0基因的编码区或由之组成。在某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以包含一连串编码核苷酸三联体(密码子)或由之组成,其以翻译起始密码子开始并以本身已知的翻译终止密码子结束(并且不含有任何内部框内翻译终止密码子)。在某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以包含(编码)外显子或由之组成。术语“基因的编码区”、“编码序列”、“编码DNA序列”或“CDS”是指基因的该部分,其包含编码蛋白质的一连串编码核苷酸三联体(密码子)。

[0218] 在某些实施方案中,所述编码TSP0多肽的核酸是编码由SEQ ID NO:2所示的TSP0多肽或其同源物的核酸,所述同源物与由SEQ ID NO:2所示的氨基酸具有至少25%的序列一致性,并例如与由SEQ ID NO:2所示的氨基酸具有至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的整体序列一致性,并且其进一步包含与由SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%序列一致性的N末端结构域,并例如与由SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性。

[0219] 在某些实施方案中,所述编码TSP0多肽的核酸是编码由SEQ ID NO:32所示的TSP0多肽或其同源物的核酸,所述同源物与由SEQ ID NO:32所示的氨基酸具有至少25%的序列

一致性,并例如与由SEQ ID NO:32所示的氨基酸具有至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的整体序列一致性,并且其进一步包含与由SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%序列一致性的N末端结构域,并例如与由SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性。

[0220] 在某些实施方案中,所述编码TSP0多肽的核酸是编码由SEQ ID NO:34所示的TSP0多肽或其同源物的核酸,所述同源物与由SEQ ID NO:34所示的氨基酸具有至少25%的序列一致性,并例如与由SEQ ID NO:34所示的氨基酸具有至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的整体序列一致性,并且其进一步包含与由SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少30%序列一致性的N末端结构域,并例如与由SEQ ID NO:50所示的N末端结构域具有至少35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性。

[0221] 来自拟南芥属的TSP0多核苷酸和其他示例性TSP0多核苷酸的实例在本文给出的表1中呈现。在一个实例中,来自拟南芥属的示例性野生型TSP0多核苷酸的编码序列如SEQ ID NO:1中所示。所述来自拟南芥属的示例性野生型TSP0多肽的相应氨基酸序列如SEQ ID NO:2中所示。

[0222] 如上文定义的TSP0多核苷酸的变体也可以可用于本发明的构建体、植物或方法中。TSP0多核苷酸的变体可以选自包含以下项的组:

[0223] (i) 与如本文定义的TSP0多核苷酸杂交的核酸;

[0224] (ii) 如本文定义的TSP0多核苷酸的剪接变体;

[0225] (iii) 如本文定义的TSP0多核苷酸的等位基因变体;

[0226] (iv) 如本文定义的经修饰的TSP0多核苷酸。

[0227] TSP0多核苷酸的变体的其他实例也可以包括如本文定义的TSP0多核苷酸,其中密码子使用经优化或者其中miRNA靶位点得以去除。

[0228] 术语杂交序列、剪接变体、等位基因变体或经修饰的多核苷酸如下所述。

[0229] 在某些实施方案中,可用于本发明的构建体、植物和方法中的TSP0多核苷酸的变体是能够优选在严格条件下与如上文定义的TSP0多核苷酸杂交的核酸。

[0230] 当核酸的单链形式可以在适当温度和溶液离子强度的条件下与另一核酸退火时,该核酸与另一种核酸(如cDNA、基因组DNA或RNA)“可杂交”。

[0231] 杂交和洗涤条件是众所周知的,并在Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989); 和Sambrook, J. and Russell, W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001) 中举例说明。

[0232] 如本文所用,杂交的“严格”条件是指在低于 $6 \times$ SSPE, $5 \times$ Denhardt溶液, 0.1% SDS, 0.1mg/ml变性的DNA中的DNA杂交体的解链温度(T_m)于20-25°C进行过夜杂交的条件。解链温度 T_m 由以下公式描述(Beltz et al., 1983, *Methods Enzymol.* 100:266-285):

[0233] $T_m = 81.5C + 16.6 \log [Na^+] + 0.41 (\%G+C) - 0.61 (\% \text{甲酰胺}) - 600 / \text{碱基对中双链体的长度}$ 。

[0234] 洗涤通常如下进行：

[0235] (1) 在 $1 \times \text{SSPE}$, $0.1\% \text{SDS}$ 中于室温两次, 每次15分钟 (低严格洗涤)。

[0236] (2) 在 $0.2 \times \text{SSPE}$, $0.1\% \text{SDS}$ 中于 $T_m - 20^\circ\text{C}$ 15分钟。

[0237] 杂交需要两个核酸含有互补序列, 尽管取决于杂交的严格性, 碱基之间的错配是可能的。杂交核酸的合适严格性取决于核酸的长度和互补程度, 这是本领域众所周知的变量。两个核苷酸序列之间的相似性或同源性越高, 具有那些序列的核酸的杂交体的解链温度 (T_m) 的值就越大。核酸杂交的相对稳定性 (对应于更高的 T_m) 按以下顺序降低: RNA:RNA, DNA:RNA, DNA:DNA。对于长度大于100个核苷酸的杂交体, 已经导出了计算 T_m 的方程式 (参见 Sambrook et al. 1989)。对于与较短的核酸, 即寡核苷酸的杂交, 错配的位置变得更重要, 并且寡核苷酸的长度决定了它的特异性 (参见 Sambrook et al. 1989)。通常, 可杂交核酸的长度为至少约10个核苷酸。可杂交核酸的说明性最小长度为: 至少约15个核苷酸; 至少约20个核苷酸; 至少约30个核苷酸。此外, 本领域技术人员将认识到, 温度和洗涤溶液盐浓度可以根据因素如探针的长度根据需要进行调整。

[0238] 在某些实施方案中, 长于50个核苷酸的DNA杂交体的高严格杂交条件可以涵盖于 65°C 在 $1x \text{SSC}$ 中或于 42°C 在 $1x \text{SSC}$ 和 $50\% \text{甲酰胺}$ 中杂交, 然后于 65°C 在 $0.3x \text{SSC}$ 中洗涤。长于50个核苷酸的DNA杂交体的中等严格杂交条件的实例涵盖于 50°C 在 $4x \text{SSC}$ 中或于 40°C 在 $6x \text{SSC}$ 和 $50\% \text{甲酰胺}$ 中杂交, 然后于 50°C 在 $2x \text{SSC}$ 中洗涤。

[0239] 优选地, 如根据本发明教导的杂交序列是能够与表1中所呈现的任何TSP0核苷酸序列所示的核酸杂交的序列。

[0240] 在某些实施方案中, 可用于本发明的构建体、植物和方法中的TSP0多核苷酸的变体是编码如上文所定义的TSP0多肽的剪接变体。如本文所用, 术语“剪接变体”涵盖核酸序列的变体, 其中已将选择的内含子和/或外显子切除、替换、置换或添加, 或其中已将内含子缩短或延长。此类变体将是其中蛋白质的生物学活性得以基本保留的变体; 这可以通过选择性地保留蛋白质的功能区段来实现。此类剪接变体可以在自然界发现或者可以是人造的。用于预测和分离此类剪接变体的方法是本领域众所周知的。

[0241] 在某些实施方案中, 可用于本发明的构建体、植物和方法中的TSP0多核苷酸的变体是编码如上文所定义的TSP0多肽的TSP0多核苷酸的等位基因变体。等位基因或等位基因变体是给定基因的替代形式, 位于相同的染色体位置。等位基因变体涵盖单核苷酸多态性 (SNP) 和小插入/缺失多态性 (INDEL)。INDEL的大小通常小于100bp。在大多数生物体的天然存在的多态种类中, SNP和INDEL形成了最大的序列变体集。

[0242] 在某些实施方案中, 可用于本发明的构建体、植物和方法中的TSP0多核苷酸的变体还可以包括经修饰的TSP0多核苷酸。如本文所教导的TSP0多核苷酸可以方便地表示为“经修饰的”, 或“突变的”或“突变体”, 或表示为包含一个或多个突变, 即, 与未突变的TSP0多核苷酸的核酸序列相比, 如具体地与野生型TSP0多核苷酸的核酸序列相比, 包含一个或多个核酸序列变化。

[0243] 在某些实施方案中, 经修饰的TSP0多核苷酸可以是经修饰以编码如上文所定义的经修饰的TSP0多肽的TSP0多核苷酸。

[0244] 例如,在一个实施方案中,经修饰的TSP0多核苷酸可以是来自拟南芥属的TSP0多核苷酸,如SEQ ID NO:3、5、7、9、11、13或15中的任一个所示。

[0245] TSP0多核苷酸或其变体可以衍生自任何天然或人工来源。这些多核苷酸可以如上所述通过有意的人为操纵进行修饰。

[0246] 在某些实施方案中,如本文定义的TSP0多核苷酸或其变体可以起源于或者可以衍生自植物或微生物。在一个优选的实施方案中,TSP0多核苷酸或其变体衍生自植物。

[0247] 例如,TSP0多核苷酸可以起源于或者可以衍生自单子叶植物。在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以起源于或者可以衍生自选自包含以下项的组的植物:水稻、油棕、小麦、玉米、大麦和高粱。

[0248] 在另一个实例中,TSP0多核苷酸可以起源于或者可以衍生自双子叶植物。在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以起源于或者可以衍生自来自选自包含以下项的组的植物家族的植物:十字花科 (Brassicaceae) (例如,拟南芥属、油籽油菜、芥菜、亚麻芥属、白菜型油菜)、茄科 (Solanaceae) (例如土豆)、亚麻科 (Linaceae) (例如亚麻)、大戟科 (Euphorbiaceae) (例如蓖麻)、葡萄科 (Vitaceae) (例如葡萄 (*Vitis vinifera*))、豆科 (Fabaceae) (例如大豆、花生、苜蓿)、菊科 (Asteraceae) (例如红花、向日葵) 和唇形科 (Lamiaceae) (例如芝麻) 和杨柳科 (Salicaceae) (例如杨 (*Populus*))。在如本文所教导的植物或方法的某些实施方案中,TSP0多核苷酸可以起源于或者可以衍生自选自包含以下项的组的植物:拟南芥属、油籽油菜 (甘蓝型油菜)、芥花、白菜型油菜 (白菜型油菜)、亚麻籽 (亚麻籽) 或亚麻芥属。

[0249] 在一个实施方案中,TSP0多核苷酸是拟南芥序列。在另一个实施方案中,TSP0多核苷酸是亚麻芥属序列。在另一个实施方案中,TSP0多核苷酸是亚麻属序列。在另一个实施方案中,TSP0多核苷酸是芸薹属序列。在另一个实施方案中,TSP0多核苷酸是向日葵序列。在另一个实施方案中,TSP0多核苷酸是玉米序列。在另一个实施方案中,TSP0多核苷酸是水稻序列。

[0250] 转录终止子序列

[0251] 如本文所用,转录终止子序列是指控制序列,其是转录单元末端处的DNA序列,其标志初级转录物的3' 加工和聚腺苷酸化以及转录终止。终止子序列可以衍生自天然TSP0基因、多种其他植物基因或T-DNA。实例包括例如从胭脂碱合酶或章鱼碱合酶基因,或可替代地从其他植物基因获得或衍生的终止子。

[0252] 在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,转录终止子序列的长度可以是至少100个核苷酸,如长度为至少150个核苷酸,至少200个核苷酸,至少250个核苷酸或至少300个核苷酸。

[0253] 在如本文提供的构建体、植物或方法的某些实施方案中,转录终止子序列的长度可以是至多4000个核苷酸,例如长度为至多3500个核苷酸,至多3000个核苷酸,至多2750个核苷酸或至多2500个核苷酸。

[0254] 在如本文教导的构建体、植物或方法中有用的转录终止子序列可以是植物来源的任何转录终止子序列。

[0255] 在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中,转录终止子序列可以起源于或者可以衍生自单子叶植物。在某些实施方案中,转录终止子序列可以起源于或者可

以衍生自选自包含以下项的组的植物：水稻、油棕、小麦、玉米、大麦和高粱。

[0256] 在如本文教导的构建体、植物或方法的某些其他实施方案中，转录终止子序列可以起源自或者可以衍生自双子叶植物。在某些实施方案中，转录终止子序列可以起源自或者可以衍生自选自包含以下项的组的双子叶植物：拟南芥属、油籽油菜、芥花、白菜型油菜、亚麻籽、大豆、向日葵、棉花、蓖麻子、花生和芝麻。

[0257] 在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中，转录终止子序列是对于所述植物是内源的转录终止子序列（来自基因）。在如本文教导的构建体、植物或方法的某些其他实施方案中，转录终止子序列是对于所述植物是外源的转录终止子序列（来自基因）。

[0258] 在如本文教导的构建体、植物或方法的某些实施方案中，转录终止子序列不衍生自TSP0终止子序列。在如本文教导的构建体、植物或方法的某些其他实施方案中，转录终止子序列可以衍生自TSP0终止子序列，其对于所述植物是内源的或外源的。

[0259] 根据本发明的构建体可以进一步提供有另外的调节元件。另外的调节元件可以包括转录增强子和翻译增强子。本领域技术人员将意识到可能适合用于进行本发明的增强子序列。内含子序列也可以添加到5' 非翻译区（UTR）或编码序列中。其他控制序列（除了启动子、增强子、沉默子、内含子序列、3' UTR和/或5' UTR区域）可以是蛋白质和/或RNA稳定元件。此类序列是本领域技术人员已知的或可以容易地获得的。

[0260] 根据本发明的构建体可以进一步包括在特定细胞类型中维持和/或复制所需的复制起点序列。一个实例是当需要将遗传构建体作为附加型遗传元件（例如质粒或粘粒分子）维持在细菌细胞中时。优选的复制起点包括但不限于colE1。

[0261] 为了检测如本发明的方法中使用的核酸序列的成功转移和/或选择包含这些核酸的转基因植物，使用标志物基因（或报告物基因）是有利的。因此，构建体可以任选地包含可选择的标志物基因。可选择的标志物是本领域技术人员已知的或可以容易地获得的。一旦不再需要标志物基因，就可以将其从转基因细胞中去除或切除。用于去除标志物的技术是本领域已知的。

[0262] 载体、宿主细胞

[0263] 在某些实施方案中，可以将如本文所教导的构建体引入表达该构建体的细胞（例如植物的细胞）的基因组中。如本文所教导的构建体可以瞬时引入其中表达如本文所教导的TSP0多核苷酸的细胞（例如植物的细胞）中，或者可以稳定地引入其中表达如本文所教导的TSP0多核苷酸的细胞（例如植物的细胞）的基因组中。可以经由本领域已知的方法如转化将TSP0多核苷酸引入表达蛋白质的细胞（例如植物的细胞）中。然后可以将根据本发明的构建体插入到载体中，该载体可以商购获得，其适合转化到植物中并且适合（瞬时或稳定地）在经转化的细胞中表达感兴趣的基因，即TSP0多核苷酸。

[0264] 术语“引入”或“转化”或“经转化的”在本文中可与“遗传修饰”或“经遗传修饰的”互换使用，并且是指在引入核酸（即对于细胞是外源的DNA）后在细胞中诱导的永久或瞬时的遗传变化。遗传变化（“修饰”）可以通过将新的DNA掺入宿主细胞的基因组中来实现，或通过瞬时或稳定地维持新的DNA作为附加型元件来实现。当细胞是真核细胞时，通常通过将DNA引入细胞的基因组或细胞的质体基因组中来实现永久的遗传变化。在原核细胞中，可以将永久的变化引入到染色体中或经由染色体外元件，如质粒、质体和表达载体，其可以含有

一种或多种可选择的标志物以帮助其在重组宿主细胞中维持。

[0265] 在另一个实施方案中,本发明涉及包含如本文定义的构建体的重组载体(例如质粒),及其在本发明的方法中的用途。

[0266] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含如本文所定义的构建体的宿主细胞。在又一个实施方案中,本发明提供了用如本文所定义的构建体转化的宿主细胞。优选地,所述宿主细胞是细菌细胞,例如大肠杆菌细胞或农杆菌细胞,或酵母细胞或植物细胞。

[0267] 在一个实施方案中,用包含上述任何TSP0多核苷酸的载体转化植物。技术人员充分了解载体上必须存在的遗传元件,以成功地转化、选择和繁殖含有感兴趣的基因的宿主细胞。

[0268] 在某些其他实施方案中,与内源TSP0构建体相比,如本文教导的构建体可以不存在于相同的染色体位置。因此,如本文公开的构建体可以存在于与内源TSP0构建体的染色体位置不同的染色体位置中。

[0269] 在某些其他实施方案中,与内源(未经修饰的)TSP0构建体相比,如本文定义的构建体存在于相同的染色体位置。例如,在某些优选的实施方案中,如本文教导的构建体可以是经修饰以赋予种子特异性表达的内源构建体,因此包含以下可操作连接的核酸序列的构建体:内源TSP0多核苷酸及其内源TSP0启动子序列,以及任选地其内源TSP0转录终止子序列,其中所述内源TSP0启动子序列已经经修饰(例如通过基因组编辑)以赋予TSP0核酸如本文所定义的种子特异性表达。

[0270] 用于经修饰的脂质代谢的植物和方法

[0271] 已经发现调节编码如本文定义的TSP0多肽的TSP0核酸在植物中的表达产生了与对照植物相比具有经修饰的脂质代谢的植物。更具体而言,已经发现在植物中以种子特异性方式在植物中表达编码如本文定义的TSP0多肽的TSP0核酸,产生与对照植物相比具有提高的三酰甘油(TAG)水平的植物。

[0272] 在整个说明书中使用的术语“植物”涵盖整个植物、植物的祖先和后代以及植物部分,包括种子、芽、茎、叶、根(包括块茎)、花、组织和器官,其中每个前面提及的都包含感兴趣的基因/核酸。在某些实施方案中,术语“植物”还涵盖植物细胞、悬浮培养物、愈伤组织、胚、分生组织区、配子体、孢子体、花粉和小孢子,同样,其中每个前面提及的都包含感兴趣的核酸和构建体。

[0273] 在本发明的方法中特别有用的植物包括所有产油植物,即能够产生可食用或不可食用油的植物。如本文所用,术语“能够产生油的植物”是指可以用于从其种子获得油(脂肪)的植物。此类植物已广泛地栽培为可食用油如油菜籽油和芝麻油的来源,或者为多种用于工业用途的(不可食用)油的来源。例如,在世界各地栽培芸薹属植物,其种子包括种子重量的约60%的脂质。种子粉含有高水平的蛋白质,并且已用作饲料。技术人员充分了解什么是产油植物。

[0274] 可以用于从其种子中提取油(脂肪)的任何产油植物均可以用于本发明。在一个优选的实施方案中,根据本发明的植物可以选自包含以下项的列表:芥花、油籽油菜、白菜型油菜、芝麻、亚麻荠属、花生、大豆、玉米、向日葵、红花、水稻、亚麻籽、棉花、芥菜、蓖麻子和花生。

[0275] 选择合适的“对照植物”是实验设置的常规部分,并且可以包括相应的野生型植

物。对照植物通常与待评价的植物是相同的植物物种,甚至是相同的品种。如本文所用的“对照植物”不仅可以指整株植物,而且还可以指植物部分,包括种子和种子部分。对照植物通常可以是野生型,即未经修饰的植物。

[0276] 如本文所用,术语“经修饰的脂质代谢”应以其最广义来理解,并且涉及与对照植物相比,经修饰的植物中脂质的合成、积累、存储或分解的变化。

[0277] 在一个优选的实施方案中,“经修饰的脂质代谢”旨在指与对照植物(或其部分)相比,在经修饰的植物(或其部分)中产生提高量的三酰甘油(TAG)。

[0278] 如本文所用,术语“TAG”或“三酰甘油”旨在指衍生自甘油和脂肪酸的酯,其中所述脂肪酸选自包含长链脂肪酸(LCFA)和极长链脂肪酸(VLCFA)的组。如本文所用,术语“LCFA”旨在指包含13至18个碳原子的长链脂肪酸,例如但不限于棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)。如本文所用,术语“VLCFA”旨在指包含超过18个碳原子的极长链脂肪酸。

[0279] 在本发明的上下文中,植物(或其部分)中术语“增加”或“提高”TAG的量应意指与如本文定义的对照植物(或其部分)相比,在经修饰的植物(或其部分)中TAG的总量为至少3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%,优选地至少15%或20%,优选地至少25%、30%、35%、40%、45%或50%更高。

[0280] 在某些实施方案中,在根据本发明的植物(或其部分)中术语“增加”或“提高”TAG的量也可以意指TAG的总量为至少1.5倍,且例如至少1.8倍,或至少2.0倍高于对照植物中TAG的总量。

[0281] 在某些实施方案中,在根据本发明的植物(或其部分)中术语“增加”或“提高”TAG的量还可以指与对照植物相比,(某些)脂肪酸的量的增加,该脂肪酸选自包含如所定义的长链脂肪酸(LCFA)和极长链脂肪酸(VLCFA)的组,并且量为例如至少1.5倍更高,例如至少1.8倍更高,或至少2.0倍更高于对照植物中所述脂肪酸的量。

[0282] 在某些实施方案中,本发明涉及包含构建体的植物、植物部分(包括种子)或植物细胞,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a)启动子序列,b)编码TSP0多肽的核酸,和任选地c)转录终止子序列,其中所述启动子序列是种子特异性启动子,其在种子填充期间在种子组织中有活性;且其中与对照植物、植物部分或植物细胞相比,所述构建体赋予所述植物、植物部分或植物细胞经修饰的脂质代谢。

[0283] 在某些实施方案中,本发明提供了包含如本文定义的构建体的植物、植物部分或植物细胞。

[0284] 在某些实施方案中,本发明提供了用如本文定义的构建体转化的植物、植物部分或植物细胞。

[0285] 根据本发明的植物可以在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子的控制下,将包括TSP0基因的构建体传给后代。如本文所用,“后代”包括在如本文定义的种子特异性启动子的控制下,包含衍生自祖先植物的构建体和/或如本文定义的TSP0基因的任何植物、种子、植物细胞和/或植物部分。植物、植物部分或植物细胞、后代和种子对于该构建体或本文定义的种子特异性启动子-TSP0基因组合而言可以是纯合的或杂合的。

[0286] 在另一个实施方案中,本发明涉及如本文教导的植物、植物部分或植物细胞,其中与对照植物、植物部分或植物细胞相比,所述经修饰的脂质代谢包括在所述植物、植物部分或植物细胞中提高量的三酰甘油。

[0287] 在另一个实施方案中,本发明涉及如本文所教导的植物、植物部分或植物细胞,其中所述经修饰的脂质代谢包括提高量的三酰甘油,其中所述三酰甘油是衍生自甘油和脂肪酸的酯,其中所述脂肪酸选自包含以下项的组:包含13至18个碳原子的长链脂肪酸(LCFA)和包含超过18个碳原子的极长链脂肪酸(VLCFA)。

[0288] 本发明还涉及用于修饰植物或其部分中脂质代谢的方法,以及用于制备具有经修饰的脂质代谢的(转基因)植物的方法。

[0289] 在一个实施方案中,本发明涉及与对照植物相比修饰植物或其部分中脂质代谢的方法,其包括调节植物中编码如本文定义的TSP0多肽的核酸表达的步骤。具体而言,本发明提供了与对照植物相比修饰植物中脂质代谢的方法,其包括赋予植物中种子特异性表达编码如本文所定义的TSP0多肽的核酸的步骤。

[0290] 在本上下文文中,术语“调节”是指与表达或基因表达有关,过程中与对照植物相比,所述基因表达改变表达水平和/或表达模式。

[0291] 在另一个实施方案中,本发明涉及与对照植物相比修饰植物中脂质代谢的方法,其包括提供包含构建体的植物的步骤,其中所述构建体包含以下可操作地连接的核酸序列:启动子序列,编码TSP0多肽的核酸,和任选地转录终止子序列,其中所述启动子序列是种子特异性启动子,其在种子填充期间在种子组织中有活性。在一个优选的实施方案中,所述构建体如本文所定义。

[0292] 在一个优选的实施方案中,提供了如本文所定义的方法,其中所述脂质代谢的修饰包括与对照植物相比提高所述植物中三酰甘油的量,并且优选地包括提高所述植物中衍生自甘油和脂肪酸的三酰甘油的量,其中所述脂肪酸选自包含以下项的组:包含13至18个碳原子的长链脂肪酸(LCFA)和包含超过18个碳原子的极长链脂肪酸(VLCFA)。

[0293] 在本发明的方法的某些实施方案中,提供包含构建体的植物的步骤,所述方法包括以下步骤:

[0294] a) 在所述植物或其细胞中引入和表达构建体,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:启动子序列,编码TSP0多肽的核酸,和任选地转录终止子序列,其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,和

[0295] b) 在促进植物生长和发育的条件下培养所述植物细胞或所述植物。

[0296] 用于产生转基因植物的方法

[0297] 本发明进一步提供了用于产生与对照植物相比具有经修饰的脂质代谢的转基因植物的方法。

[0298] 因此,出于本发明的目的,“转基因植物”应理解为意指本发明的方法中使用的核酸不存在于或不起源自所述植物的基因组,或者存在于所述植物的基因组中,但不在所述植物的基因组中的天然基因座处。然而,“转基因的”还意味着,尽管根据本发明或本发明的方法中使用的核酸在植物基因组中处于其天然位置,但是该核酸已经针对天然序列进行了修饰和/或与所述核酸可操作连接的天然序列的遗传控制序列(例如启动子序列)已得以修饰。优选地将转基因理解为意指根据本发明的核酸在基因组中的非天然基因座处的表达。本文提及了优选的转基因植物。

[0299] 根据本发明,提供了用于产生与对照植物相比具有经修饰的脂质代谢的植物,特别是转基因植物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0300] a) 在所述植物或其细胞中引入和表达构建体,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:启动子序列,编码TSP0多肽的核酸,和任选地转录终止子序列,其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,和

[0301] b) 在促进植物生长和发育的条件下培养所述植物细胞或所述植物。

[0302] 如上所述,可以将包含编码如本文定义的TSP0的核酸的构建体直接引入到植物细胞或植物本身中,包括引入到植物的组织、器官或任何其他部分中。根据一个优选的实施方案,通过转化将包含编码如本文定义的TSP0的核酸的构建体引入到植物中。

[0303] 现在,植物物种的转化是一项相当常规的技术。可以用本发明的遗传构建体转化能够随后通过器官发生或胚胎发生进行克隆繁殖的植物组织,并从中再生出整株植物。选择的特定组织将取决于可用于且最适合于被转化的特定物种的克隆繁殖系统。示例性的组织靶标包括叶盘、花粉、胚、子叶、下胚轴、巨型配子体、愈伤组织、现有的分生组织(例如,顶端分生组织、腋芽和根分生组织)以及诱导的分生组织(例如,子叶分生组织和下胚轴分生组织)。

[0304] 可以使用已建立的技术将构建体稳定或瞬时地引入到亲本宿主(植物)细胞中,所述技术包括但不限于电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、粒子轰击、农杆菌介导的转化等。为了稳定转化,核酸通常将进一步包括选择性标志物,例如,几种众所周知的选择性标志物中的任一种,如荧光蛋白、庆大霉素抗性、潮霉素抗性、卡那霉素抗性等。

[0305] 转基因植物优选经由农杆菌介导的转化产生。为此,优选将如本文定义的构建体克隆到适合于转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的二元载体中。然后可以将通过此类载体转化的农杆菌以已知的方式用于植物的转化。然后可以将所得的经转化的植物细胞以本领域技术人员已知的方式用于再生经转化的植物,例如通过在适当的培养基中种植以促进细胞增殖和再生,或从植物的经转化的花芽(胚珠)中产生转基因种子。

[0306] 优选地,应用于如本文教导的植物、植物部分或方法中的所述构建体是如本文定义的构建体。

[0307] 优选地,应用于如本文教导的植物、植物部分或方法中的所述编码TSP0多肽的核酸是编码如本文定义的TSP0多肽的核酸。

[0308] 优选地,应用于如本文教导的植物、植物部分或方法中的所述启动子序列是如本文定义的种子特异性启动子。

[0309] 优选地,应用于如本文教导的植物、植物部分或方法中的所述转录终止子序列是如本文定义的转录终止子序列。

[0310] 显然,本发明还扩展到通过本文所述的任何方法产生的任何植物细胞或植物,以及其所有植物部分和繁殖体。本发明涵盖可通过本发明的方法获得的植物或其部分,包括种子。

[0311] 本发明进一步扩展到涵盖通过任何前述方法产生的原代转化或转染的细胞、组织、器官或整株植物的后代,唯一的要求是后代展现出与在根据本发明的方法中由亲本产生的基因型和/或表型特征相同的基因型和/或表型特征。

[0312] 用于从植物制造产品的方法和产品

[0313] 在另一方面,提供了用于在植物中产生产品如油或脂肪的方法,所述方法包括以

下步骤:种植如本文所定义的植物,以及从所述植物或通过所述植物产生所述产品;或其部分,包括种子。

[0314] 具体而言,提供了用于在植物中产生产品的方法,所述方法包括以下步骤:

[0315] (i) 提供如本文定义的植物或其部分,并且特别是包含构建体的植物,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽的核酸,和任选地c) 转录终止子序列,其中所述启动子序列是在种子组织中和种子填充期间有活性的种子特异性启动子;所述构建体赋予所述植物、植物部分或植物细胞与对照植物、植物部分或植物细胞相比经修饰的脂质代谢;

[0316] (ii) 从植物或其部分或者通过植物或其部分产生产品。

[0317] 在某些实施方案中,提供了用于在植物中产生产品如油或脂肪的方法,并且优选用于产生与从对照植物或其部分或者通过对照植物或其部分产生的对照产品相比,具有提高的三酰甘油的量的产品的方法,其包括以下步骤:

[0318] i) 在所述植物或其细胞中引入和表达构建体,其中所述构建体包含以下可操作连接的核酸序列:a) 启动子序列,b) 编码TSP0多肽,且优选地如本文所定义的TSP0多肽的核酸,和任选地c) 转录终止子序列,其中所述启动子序列是在种子填充期间在种子组织中有活性的种子特异性启动子,优选地如本文所定义的种子特异性启动子,

[0319] ii) 在促进植物生长和发育且促进所述产品的产生的条件下培养所述植物细胞或所述植物,和

[0320] iii) 从所述植物或其部分或者通过所述植物或其部分产生收集的所述产品,所述部分包括种子。

[0321] 在某些实施方案中,提供了根据本发明从植物或其部分(包括种子)或者通过植物或其部分(包括种子)产生的产品,如油或脂肪,或通过本发明的方法可获得或获得的产品,其中所述产品与从对照植物或其部分产生的对照产品或者通过对照植物或其部分产生的对照产品相比,具有提高的三酰甘油的量。

[0322] 优选地,应用于以上提及的用于产生产品如油或脂肪的方法中的所述植物是如本文所定义的植物。优选地,应用于以上提及的用于在植物中产生产品如油或脂肪的方法中的所述构建体是如本文定义的构建体。优选地,应用于以上提及的用于在植物中产生产品如油或脂肪的方法中的所述编码TSP0多肽的核酸是如本文所定义的编码TSP0多肽的核酸。优选地,应用于以上提及的用于在植物中产生产品如油或脂肪的方法中的所述启动子序列是如本文定义的启动子序列。优选地,应用于以上提及的用于在植物中产生产品如油或脂肪的方法中的所述转录终止子序列是如本文所定义的转录终止子序列。

[0323] 在本上下文文中,术语“产品”旨在指衍生自植物或其部分的食物、饲料或工业产品,并且优选地指油或脂肪或其分离的组分,如脂肪酸或植物固醇。

[0324] 显然,本发明还扩展到通过任何前述方法,或通过任何前述植物或其部分,或从任何前述植物或其部分产生的产品,如油或脂肪。

[0325] 在一个实施方案中,本发明涉及可从或由本文定义的植物或其部分(包括种子)获得或生产的产品,例如油或脂肪。

[0326] 在另一个实施方案中,本发明涉及通过如本文定义的任何前述方法可获得或获得的产品,如油或脂肪。

[0327] 虽然已经结合本发明的特定实施方案描述了本发明,但是显然,根据前述描述,许多替代、修改和变化对于本领域技术人员将是显而易见的。因此,在所附权利要求书的精神和广泛范围内,旨在包含如下所有这些替代、修改和变化。

[0328] 以下非限制性实施例进一步支持本文公开的方面和本发明的实施方案。

[0329] 序列表

[0330] 在整个说明书和实施例中,参考以下序列:

[0331] SEQ ID NO:1:拟南芥TSP0(AtTSP0)的cDNA序列

[0332] SEQ ID NO:2:拟南芥TSP0(AtTSP0)的氨基酸序列

[0333] SEQ ID NO:3:拟南芥经修饰的TSP0(H91A)的cDNA序列

[0334] SEQ ID NO:4:拟南芥经修饰的TSP0(H91A)的氨基酸序列

[0335] SEQ ID NO:5:拟南芥经修饰的TSP0(H115A)的cDNA序列

[0336] SEQ ID NO:6:拟南芥经修饰的TSP0(H115A)的氨基酸序列

[0337] SEQ ID NO:7:拟南芥经修饰的TSP0(H91A/H115A)的cDNA序列

[0338] SEQ ID NO:8:拟南芥经修饰的TSP0(H91A/H115A)的氨基酸序列

[0339] SEQ ID NO:9:拟南芥经修饰的TSP0(C94W)的cDNA序列

[0340] SEQ ID NO:10:拟南芥经修饰的TSP0(C94W)的氨基酸序列

[0341] SEQ ID NO:11:拟南芥经修饰的TSP0(Y122A)的cDNA序列

[0342] SEQ ID NO:12:拟南芥经修饰的TSP0(Y122A)的氨基酸序列

[0343] SEQ ID NO:13:拟南芥经修饰的TSP0(Y124A)的cDNA序列

[0344] SEQ ID NO:14:拟南芥经修饰的TSP0(Y124A)的氨基酸序列

[0345] SEQ ID NO:15:拟南芥经修饰的TSP0(Y122A/Y124A)的cDNA序列

[0346] SEQ ID NO:16:拟南芥经修饰的TSP0(Y122A/Y124A)的氨基酸序列

[0347] SEQ ID NO:17:甘蓝型油菜TSP0的cDNA序列

[0348] SEQ ID NO:18:甘蓝型油菜TSP0的氨基酸序列

[0349] SEQ ID NO:19:甘蓝型油菜TSP0的cDNA序列

[0350] SEQ ID NO:20:甘蓝型油菜TSP0的氨基酸序列

[0351] SEQ ID NO:21:甘蓝型油菜TSP0的cDNA序列

[0352] SEQ ID NO:22:甘蓝型油菜TSP0的氨基酸序列

[0353] SEQ ID NO:23:甘蓝型油菜TSP0的cDNA序列

[0354] SEQ ID NO:24:甘蓝型油菜TSP0的氨基酸序列

[0355] SEQ ID NO:25:白菜型油菜TSP0的cDNA序列

[0356] SEQ ID NO:26:白菜型油菜TSP0的氨基酸序列

[0357] SEQ ID NO:27:白菜型油菜TSP0的cDNA序列

[0358] SEQ ID NO:28:白菜型油菜TSP0的氨基酸序列

[0359] SEQ ID NO:29:稻TSP0的cDNA序列

[0360] SEQ ID NO:30:稻TSP0的氨基酸序列

[0361] SEQ ID NO:31:亚麻芥TSP0的cDNA序列

[0362] SEQ ID NO:32:亚麻芥TSP0的氨基酸序列

[0363] SEQ ID NO:33:亚麻TSP0的cDNA序列

- [0364] SEQ ID NO:34:亚麻TSP0的氨基酸序列
- [0365] SEQ ID NO:35:玉米TSP0的cDNA序列
- [0366] SEQ ID NO:36:玉米TSP0的氨基酸序列
- [0367] SEQ ID NO:37:向日葵TSP0的cDNA序列
- [0368] SEQ ID NO:38:向日葵TSP0的氨基酸序列
- [0369] SEQ ID NO:39:向日葵TSP0的cDNA序列
- [0370] SEQ ID NO:40:向日葵TSP0的氨基酸序列
- [0371] SEQ ID NO:41:拟南芥TSP0的启动子序列
- [0372] SEQ ID NO:42:亚麻TSP0的启动子序列
- [0373] SEQ ID NO:43:甘蓝型油菜napin基因的启动子序列
- [0374] SEQ ID NO:44:拟南芥FAE1基因的启动子序列
- [0375] SEQ ID NO:45:引物序列SeM5'
- [0376] SEQ ID NO:46:引物序列SeM3'
- [0377] SEQ ID NO:47:引物序列NeM5'
- [0378] SEQ ID NO:48:引物序列NeM3'
- [0379] SEQ ID NO:49:AtTSP0的TSP0/MBR结构域
- [0380] SEQ ID NO:50:AtTSP0的N末端结构域
- [0381] SEQ ID NO:51:AtTSP0的基序

实施例

[0382] 以下实施例说明了实践本发明的规程。实施例不应解释为限制性的。

[0383] 实施例1

[0384] 实施例1说明了具有高TAG含量的表达TSP0的纯合转基因拟南芥属植物的生成。

[0385] 拟南芥属TSP0的克隆

[0386] 直接从拟南芥属基因组DNA PCR扩增出无内含子拟南芥属TSP0 (AtTSP0) 编码序列。使用分别含有加下划线的克隆限制位点XbaI和BglIII的引物SeM5' (aaatctagaaagcttaccatggattctcaggacatcag) (SEQ ID NO:45) 和SeM3' (aaaagatcttcacgcgactgcaagctttacattaac) (SEQ ID NO:46) 进行扩增。为此, 将从10日龄幼苗新鲜收获的拟南芥叶转移到Eppendorf管中, 并于室温用杵在10 μ l的0.5M NaOH中匀浆。将混合物于室温在30秒期间以15000rpm离心。用45 μ l的Tris-HCl缓冲液(100mM, pH 8.0) 稀释5 μ l的上清液, 并将1 μ l的稀释的提取液用作PCR模板。通过结合引物SeM5' 和SeM3' 可以获得扩增子。

[0387] 将扩增子克隆到用XbaI和BamHI打开的质粒pPILY (NCBI Genbank登录号AY720433, 版本AY720433.1) 中。

[0388] 对于种子特异性表达, 将pPILY中的双35S CaMV启动子替换为甘蓝型油菜napin启动子的截短形式(对应于SEQ ID NO:43)。将从10日龄温室种植的幼苗新鲜收获的甘蓝型油菜叶转移到Eppendorf管中, 并于室温用杵在10 μ l的0.5M NaOH中匀浆。将混合物于室温在30秒期间以15000rpm离心。用45 μ l的Tris-HCl缓冲液(100mM, pH 8.0) 稀释5 μ l的上清液, 并将1 μ l的稀释的提取液用作PCR模板以扩增napin启动子。通过组合分别含有加下划线的克隆位点XhoI和XbaI的引物NeM5' (aaactcgagggtacctaccttgttttttaaaaagaatcgc) (SEQ ID

NO:47)和Nem3' (aaatctagagatttgcatggcgatcacgtg) (SEQ ID NO:48)获得扩增子。

[0389] 使用标准分子生物学技术在大肠杆菌DH5 α 菌株中扩增得到的质粒。通过KpnI消化从pPILY中回收具有由上述种子特异性napin启动子驱动的AtTSP0的表达盒,并将其亚克隆到二元载体pCambia 1300中(产品ID:M1591,Marker Gene Technologies,Inc.)中。通过用HindIII和EcoRI/XbaI的限制性消化检查在大肠杆菌中扩增的二元质粒的表达盒的方向。通过测序AtTSP0编码序列进一步验证了正确的定向克隆。通过电穿孔在根癌农杆菌菌株GV3101::pMP90(Koncz and Schnell,1986,Molecular General Genetics 204:383-396)中调用两个独立的克隆,并在补充有100 μ g/ml的卡那霉素的酵母提取液上选择经转化的克隆。

[0390] 拟南芥属遗传转化及AtTSP0的表达

[0391] 通过Clough(1998,Plant Journal,16:735-743)修改的“花浸(floral dipping)”方法对土壤种植的野生型拟南芥属(Columbia 0;Col0)植物进行了遗传转化。在补充有20 μ g/ml潮霉素的半强度Murashige和Skoog(MS/2)培养基(Murashige and Skoog,1962,Physiol.Plant.15:473-497)上选择转基因T1种子。将抗性植物转移到土壤中,并在自花授粉后,将T2种子筛选为潮霉素抗性的T1种子。在潮霉素上以3:1(抗性:敏感)比例分离的品系,用于指示后代中潜在的纯合子,用于后续分析。通过蛋白质印迹法测试了在正常生长条件下生长的T3纯合子植物在营养组织中的AtTSP0表达(Guillaumot et al.,2009,Plant Journal,60:242-256)。来自经确认的T3纯合子转基因品系及其后代的种子用于脂质分析。对于分析,使用2-4个独立的品系,并使用10-20mg的种子,其对应于每测定/重复200-500个种子。

[0392] 脂质提取和分析

[0393] 在存在或不存在放射性标记乙酸盐的情况下(2 μ Ci/测定),在连续光照下于22 $^{\circ}$ C使种子吸胀(或不吸胀)。吸胀24小时后,将种子在异丙醇中加热至70 $^{\circ}$ C 15分钟以灭活脂肪酶,并使用Ultra-Turrax匀浆机进行研磨。将脂质于室温用氯仿:甲醇(1:1,v/v)提取3次,然后用0.9%NaCl洗涤3次。在N₂下蒸发溶剂,并将脂质溶解在适当体积的氯仿:甲醇(1:1,v/v)中。使用溶剂系统乙酸甲酯:正丙醇:氯仿:甲醇:0.25%氯化钾水溶液(25:25:25:10:9,v/v)通过HPTLC(60F254板,Merck,Darmstadt,Germany)分离极性脂质(Heape et al.1985,J Chromatogr.Apr 5;322(2):391-5),并且使用溶剂系统己烷:乙醚:乙酸(90:15:2,v/v)通过HPTLC分离中性脂质(Laloi et al.,2007,Plant Physiol.Jan;143(1):461-72)。在樱草灵(primuline)染色后使用TLC扫描仪3(CAMAG,Muttenz,Switzerland)通过与已知标准品的共迁移来鉴定脂质并通过光密度分析法对其进行定量(Macala et al.,1983,J Lipid Res.Sep;24(9):1243-50)(van Echten-Deckert,2000,Methods Enzymol.312:64-79)。为了更精确地定量,将个别脂质从HPTLC板上刮下来,然后根据Browse等人(1986,Anal.Biochem 152:141-145),使用热甲醇H₂SO₄将其脂肪酸转化为相应的甲酯后,通过气相色谱法鉴定和定量脂肪酸。相对于C17内部标准品对脂肪酸进行定量。需要时,将放射性标记的乙酸盐添加到吸胀种子中。放射性标记的脂质通过HPTLC分离,并使用Storm PhosphorImager(GE Healthcare)和ImageQuant软件(Applied Biosystems)进行分析。

[0394] 结果

[0395] 结果示于图1和2中。结果显示,以干种子重量为基准,在T3世代中在SEQ ID NO:43所示的种子特异性napin启动子的控制下表达SEQ ID NO:2所示的拟南芥属TSP0多肽的转化品系,种子中的总TAG含量高于相应的未经转化的植物(图1)。图2显示出与野生型拟南芥属品系相比,转基因拟南芥属品系的分析种子中不同的特定TAG的量。

[0396] 发明人已发现,在种子填充阶段期间,植物中编码TSP0的核酸的种子特异性表达允许增加植物中的TAG含量,而对生长或产量没有任何明显的有害影响。发明人进一步表明,在食品工业中,油中营养上重要的脂肪酸(例如棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸)的量,与对照(未经修饰)植物相比,在以种子特异性方式表达TSP0的经修饰的植物中分别增加高达2倍。

[0397] 实施例2

[0398] 使用MUSCLE(版本3.8,2010年5月)(通过对数期望进行多重序列比较(Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation))和ClustalW输出(无碱基/残基编号的ClustalW比对格式)进行TSP0多肽序列的比对。使用<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>中指定的MUSCLE的默认参数进行分析。多肽在图4中比对。使用氨基酸的单字母代码。当使用保守氨基酸,即在比对序列中相同的氨基酸和/或高度保守的氨基酸时,这些比对可以用于定义其他基序或共有序列。图4中的序列以其短名称标识。表B提供了每个序列的详细信息。

[0399] 表B-显示于图4中的序列

	生物体	氨基酸序列(SEQ ID NO:)	
[0400]	OsTSP0	稻	30
	LuTSP0	亚麻	34
	BnTSP03	甘蓝型油菜	22
	BnTSP01	甘蓝型油菜	18
	BrTSP01	白菜型油菜	26
	BnTSP02	甘蓝型油菜	20
[0401]	BnTSP04	甘蓝型油菜	24
	BrTSP02	白菜型油菜	28
	AtTSP0	拟南芥	2
	CsTSP0	亚麻荠	32

[0402] 实施例3

[0403] 实施例3说明了具有高TAG含量的表达TSP0的转基因亚麻荠植物的生成。亚麻荠(*Camelina sativa*)是来自十字花科的一种产油植物,通常也被称为亚麻荠(*camelina*)、幸福金(*gold-of-pleasure*)、假亚麻(*false flax*)或亚麻籽菟丝子(*linseed dodder*)。

[0404] 构建体

[0405] 在亚麻荠植物中体内评估了三种不同的构建体,并因此评估了三种不同的启动

子-TSP0基因组合。在每个构建体中,来自拟南芥属脂肪酸延长酶 (FAE1) 基因 (SEQ ID NO: 44) 的种子特异性启动子用于驱动植物TSP0基因的表达。编码TSP0蛋白的TSP0基因选自拟南芥 (AtTSP0:SEQ ID NO:2) 或亚麻荠 (CsTSP0:SEQ ID NO:32), 或亚麻 (LuTSP0:SEQ ID NO:34)。在每个构建体中,将胭脂碱合酶终止子序列 (如在Dymock et al., Plant Mol. Biol. (1991), 17:711-725中公开) 用作转录终止子序列。

[0406] 合成如上所示设计的构建体 (GeneScript, USA), 其两端侧接限制性位点I-SCEI, 并克隆到pUC57 (GeneScript) 中。用I-SCEI消化大肠杆菌中扩增的pUC57以回收每种构建体, 并将其亚克隆到使用相同酶打开的pMODUL中。通过限制性消化检查克隆, 然后将其转移到根癌农杆菌菌株GV3101::pMP90中 (Konecz and Schnell, 1986, Molecular General Genetics 204:383-396)。

[0407] TSP0的亚麻荠转化和种子特异性表达

[0408] 将亚麻荠植物种植在温室中的单个盆中直至开花期。在补充有适当抗生素的YEB培养基中, 携带期望的遗传构建体的根癌农杆菌过夜生长的液体培养物用于制备接种物。通过以3500g离心沉淀细胞, 并重悬于含有10mM MgSO₄、10mM MES (pH 5.5)、200μM乙酰丁香酮 (新鲜制备) 的缓冲液中。重悬的细菌于室温在缓冲液中温育两个小时。使用镊子手动地从亚麻荠植物中剥离开的花。使用装有21Gx1”针头的注射器将细菌注入单个花芽中。一周后对产生的新的花芽重复此步骤。允许经转化的植物生成种子。在含有半强度Murashige和Skoog培养基以及潮霉素 (20μg/ml) 的琼脂平板上选择干种子。针对TSP0转基因的存在进一步对潜在的潮霉素抗性植物进行基因分型, 并使其在温室中自花授粉。对于脂质分析, 从同时生长的植物中收获干种子。从收获的种子中提取脂质并以与拟南芥属种子相同的方式进行分析 (参见实施例1)。

[0409] 结果

[0410] 结果显示在图5中, 其中显示了总TAG与野生型植物 (WT = 设定为值1) 相比的相对比较。值是从每个基因构建体获得的三个独立的转基因品系的平均值。结果表明, 在种子特异性FAE1启动子的控制下, 表达拟南芥属TSP0多肽的经转化的品系比相应的未经转化的植物在种子中具有更高的总TAG含量。对于在所述种子特异性FAE1启动子的控制下表达亚麻荠或亚麻TSP0的品系也进行了相同的观察。

[0411] 表C说明了对于三种评估的构建体, 与野生型亚麻荠品系相比, 转基因亚麻荠品系的经分析的种子中不同特定脂肪酸的量。

	WT	FAE1+AtTSP0	FAE1-CsTSP0	FAE1-LuTSP0
[0412] C16:0	1	1.72	1.46	1.66
C18:0	1	1.93	1.75	1.84
C18:1n9	1	1.85	1.71	1.88
C18:2n6	1	1.92	1.52	1.92
C18:3n3	1	2.99	2.62	2.6
C20:0	1	1.9	1.6	1.78
C20:1n9	1	2.44	1.95	2.25
C20:2n6	1	2.88	1.97	2.53
C20:3n3	1	3.57	2.97	2.86
C22:0	1	1.64	1.27	1.52
C22:1n9	1	2.32	1.66	2.15
C22:3n3	1	4.02	3.44	3.59
[0413] C24:0	1	1.21	1.06	1.23
C24:1n9	1	2	1.54	1.93
C24:2n6	1	1.46	1.25	1.46

[0414] 表C中的量表示为特定脂肪酸与野生型植物中获得的脂肪酸相比的相对倍数增加。将每种脂肪酸的相对量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 种子) 相对于野生型种子 (WT) 水平 (值设置为1) 进行标准化。特别可以观察到, 对于某些多不饱和 ω -3脂肪酸, 特别是C18:3n3、C20:3n3和C22:3n3, 在转基因品系中获得了2.5至4倍的增加。该值是三个独立的转基因品系的平均值, 如图5中所示。

[0415] 实施例4

[0416] 通过用实施例3中所述的三种构建体, 以与实施例1中所讨论的相同的方式转化拟南芥属植物, 获得了具有高TAG含量的表达TSP0的转基因拟南芥植物。生成初级转化体 (T1), 并且种子可以经受分离用于选择纯合子品系。如上所述, 分析T2种子中的TAG含量, 并将其与野生型/未经转化的植物的TAG含量进行比较。如上所述, 还进一步分析了从转化事件获得的独立纯合子品系的TAG含量。

[0417] 总的来说, 从以上可以得出结论, 在种子填充阶段期间在植物中编码TSP0的核酸的种子特异性表达允许增加植物中的TAG含量, 而对生长或产量没有任何明显的有害影响。当应用不同的TSP0基因 (来自拟南芥属、亚麻芥属或亚麻属) 时, 在不同植物 (拟南芥属、亚麻芥属) 中针对不同种子特异性启动子 (napin、FAE1) 已经证明了这一点。

[0418] 进一步表明, 用于食品工业中的油中营养重要的脂肪酸 (例如棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和 α -亚麻酸) 的量, 与对照 (未经修饰) 植物相比, 在以种子特异性方式表达TSP0的经修饰的植物中分别增加高达2倍或更多。因此, 目前的结果表明, 当TSP0基因在种子填

充阶段期间有活性的种子特异性启动子下表达时,某些重要脂肪酸的水平可以显著增加。令人惊讶地,这不是处于植物中诱导天然存在的(内源)TSPO基因的阶段,并且在现有技术中没有此类特异性效果的指示。

[0001] 序列表

[0002] <110> 天主教鲁汶大学

[0003] 波尔多大学

[0004] 国家科学研究中心

[0005] <120> 具有经修饰的脂质代谢的植物及用于制备它们的方法

[0006] <130> UCL-112-PCT

[0007] <150> 17290107.6

[0008] <151> 2017-08-25

[0009] <160> 51

[0010] <170> PatentIn version 3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 591

[0013] <212> DNA

[0014] <213> 拟南芥

[0015] <400> 1

[0016] atggattctc aggacatcag ataccgcggc ggagacgaca gagacgctgc aacgacggct 60

[0017] atggccgaga cagagaggaa aagcgcctgac gacaacaaag gaaaacgcga tcaaaagagg 120

[0018] gcgatggcga aacgtggtct caagtctctg acggtagcgg ttgcggctcc tgtgctcgtg 180

[0019] acgctcttcg ctacgtatct cctcggcaca agcgcacggat acgggaatcg agctaagtcc 240

[0020] tcgtcgtgga tcccacctct gtggctccta cacacaacgt gtctcgttc tagtggtctg 300

[0021] atgggtttgg ctgcgtggct tgtatgggtt gacgggtggct tccacaagaa gcccaatgct 360

[0022] ctgtatcttt acttagctca gtttttgctc tgtttggttt gggatccggg tacgttccgc 420

[0023] gtcgggtcgg gtagtagcgg gcttgccggtg tggttggttc aatcggctgc gttattcggg 480

[0024] tgctacaagg cctttaatga gataagtccg gtcgctggta atctggtaaa gccgtgtttg 540

[0025] gcttgggctg cctttgtagc cgctgttaat gtaaagcttg cagtcgcgtg a 591

[0026] <210> 2

[0027] <211> 196

[0028] <212> PRT

[0029] <213> 拟南芥

[0030] <400> 2

[0031] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala

[0032] 1 5 10 15

[0033] Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn

[0034] 20 25 30

[0035] Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys

[0036] 35 40 45

[0037] Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala

[0038] 50 55 60

[0039] Thr Tyr Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser
 [0040] 65 70 75 80
 [0041] Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu His Thr Thr Cys Leu Ala
 [0042] 85 90 95
 [0043] Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly
 [0044] 100 105 110
 [0045] Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe
 [0046] 115 120 125
 [0047] Leu Leu Cys Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly
 [0048] 130 135 140
 [0049] Val Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly
 [0050] 145 150 155 160
 [0051] Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val
 [0052] 165 170 175
 [0053] Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys
 [0054] 180 185 190
 [0055] Leu Ala Val Ala
 [0056] 195
 [0057] <210> 3
 [0058] <211> 591
 [0059] <212> DNA
 [0060] <213> 拟南芥
 [0061] <400> 3
 [0062] atggattctc aggacatcag ataccgcggc ggagacgaca gagacgctgc aacgacggct 60
 [0063] atggccgaga cagagaggaa aagcgctgac gacaacaaag gaaaacgcga tcaaaagagg 120
 [0064] gcgatggcga aacgtggtct caagtctctg acggtagcgg ttgctgctcc tgtgctcgtg 180
 [0065] acgctcttcg ctacgtatct cctcggcaca agcgacggat acgggaatcg agctaagtcc 240
 [0066] tcgtcgtgga tcccacctct gtggctccta gcaacaacgt gtctcgtctc tagtggctctg 300
 [0067] atgggtttgg ctgctggctt gtgtatgggtt gacggtggct tccacaagaa gcccaatgct 360
 [0068] ctgtatcttt acttagctca gtttttgctc tgtttggttt gggatccggt tacgttccgc 420
 [0069] gtcgggtcgg gagtagcggg gcttgcggtg tggttgggtc aatcggtgc gttattcgga 480
 [0070] tgctacaagg cctttaatga gataagtccg gtcgctggta atctggtaaa gccgtgtttg 540
 [0071] gcttgggctg cctttgtagc cgctgttaat gtaaagcttg cagtcgctg a 591
 [0072] <210> 4
 [0073] <211> 196
 [0074] <212> PRT
 [0075] <213> 拟南芥
 [0076] <400> 4
 [0077] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala

[0078]	1	5	10	15
[0079]	Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn			
[0080]		20	25	30
[0081]	Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys			
[0082]		35	40	45
[0083]	Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala			
[0084]		50	55	60
[0085]	Thr Tyr Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser			
[0086]	65	70	75	80
[0087]	Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu Ala Thr Thr Cys Leu Ala			
[0088]		85	90	95
[0089]	Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly			
[0090]		100	105	110
[0091]	Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe			
[0092]		115	120	125
[0093]	Leu Leu Cys Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly			
[0094]		130	135	140
[0095]	Val Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly			
[0096]	145	150	155	160
[0097]	Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val			
[0098]		165	170	175
[0099]	Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys			
[0100]		180	185	190
[0101]	Leu Ala Val Ala			
[0102]		195		
[0103]	<210> 5			
[0104]	<211> 591			
[0105]	<212> DNA			
[0106]	<213> 拟南芥			
[0107]	<400> 5			
[0108]	atggattctc aggacatcag ataccgcggc ggagacgaca gagacgctgc aacgacggct 60			
[0109]	atggccgaga cagagaggaa aagcgtgac gacaacaaag gaaaacgcga tcaaaagagg 120			
[0110]	gcgatggcga aacgtggtct caagtctctg acggtagcgg ttgctgctcc tgtgctcgtg 180			
[0111]	acgctcttcg ctacgtatct cctcggcaca agcgcggat acgggaatcg agctaagtcc 240			
[0112]	tcgtcgtgga tcccacctct gtggctccta gcaacaacgt gtctcgttc tagtggctctg 300			
[0113]	atgggtttgg ctgcgtggct tgtatgggtt gacgggtgct tcgcaaagaa gcccaatgct 360			
[0114]	ctgtatcttt acttagctca gtttttgctc tgtttggttt gggatccggt tacgttccgc 420			
[0115]	gtcgggtcgg gtagtagcgg gcttgcggtg tggttgggtc aatcggtcgt gttattcggg 480			
[0116]	tgctacaagg cctttaatga gataagtccg gtcgctggta atctggtaaa gccgtgtttg 540			

[0117] gcttgggctg cctttgtagc cgctgttaat gtaaagcttg cagtcgctg a 591
 [0118] <210> 6
 [0119] <211> 196
 [0120] <212> PRT
 [0121] <213> 拟南芥
 [0122] <400> 6
 [0123] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala
 [0124] 1 5 10 15
 [0125] Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn
 [0126] 20 25 30
 [0127] Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys
 [0128] 35 40 45
 [0129] Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala
 [0130] 50 55 60
 [0131] Thr Tyr Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser
 [0132] 65 70 75 80
 [0133] Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu His Thr Thr Cys Leu Ala
 [0134] 85 90 95
 [0135] Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly
 [0136] 100 105 110
 [0137] Gly Phe Ala Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe
 [0138] 115 120 125
 [0139] Leu Leu Cys Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly
 [0140] 130 135 140
 [0141] Val Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly
 [0142] 145 150 155 160
 [0143] Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val
 [0144] 165 170 175
 [0145] Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys
 [0146] 180 185 190
 [0147] Leu Ala Val Ala
 [0148] 195
 [0149] <210> 7
 [0150] <211> 591
 [0151] <212> DNA
 [0152] <213> 拟南芥
 [0153] <400> 7
 [0154] atggattctc aggacatcag ataccgcggc ggagacgaca gagacgctgc aacgacggct 60
 [0155] atggccgaga cagagaggaa aagcgctgac gacaacaaag gaaaacgcga tcaaaagagg 120

[0156] gcgatggcga aacgtggtct caagtctctg acggtagcgg ttgcggtcc tgtgctcgtg 180
 [0157] acgctcttcg ctacgtatctt cctcggcaca agcgacggat acgggaatcg agctaagtcc 240
 [0158] tcgtcgtgga tcccacctct gtggctccta gcaacaacgt gtctcgtctc tagtgggtctg 300
 [0159] atggggttgg ctgctgggct tgtatgggtt gacgggtggct tcgcaaagaa gcccaatgct 360
 [0160] ctgtatcttt acttagctca gtttttgctc tgtttgggtt gggatccggg tacgttccgc 420
 [0161] gtcgggtcgg gagtagcggg gcttgccggg tggttgggtc aatcggtcgc gttattcggg 480
 [0162] tgctacaagg cctttaatga gataagtccg gtcgctggta atctggtaaa gccgtgtttg 540
 [0163] gcttgggctg cctttgtagc cgctgttaat gtaaagcttg cagtcgctg a 591
 [0164] <210> 8
 [0165] <211> 196
 [0166] <212> PRT
 [0167] <213> 拟南芥
 [0168] <400> 8
 [0169] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala
 [0170] 1 5 10 15
 [0171] Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn
 [0172] 20 25 30
 [0173] Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys
 [0174] 35 40 45
 [0175] Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala
 [0176] 50 55 60
 [0177] Thr Tyr Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser
 [0178] 65 70 75 80
 [0179] Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu Ala Thr Thr Cys Leu Ala
 [0180] 85 90 95
 [0181] Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly
 [0182] 100 105 110
 [0183] Gly Phe Ala Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe
 [0184] 115 120 125
 [0185] Leu Leu Cys Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly
 [0186] 130 135 140
 [0187] Val Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly
 [0188] 145 150 155 160
 [0189] Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val
 [0190] 165 170 175
 [0191] Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys
 [0192] 180 185 190
 [0193] Leu Ala Val Ala
 [0194] 195

[0195] <210> 9
 [0196] <211> 591
 [0197] <212> DNA
 [0198] <213> 拟南芥
 [0199] <400> 9
 [0200] atggattctc aggacatcag ataccgcggc ggagacgaca gagacgctgc aacgacggct 60
 [0201] atggccgaga cagagaggaa aagcgctgac gacaacaaag gaaaacgcga tcaaaagagg 120
 [0202] gcgatggcga aacgtggtct caagtctctg acggtagcgg ttgcggtcc tgtgctcgtg 180
 [0203] acgctcttcg ctacgtatct cctcggcaca agcgacggat acgggaatcg agctaagtcc 240
 [0204] tcgtcgtgga tcccacctct gtggctccta cacacaacgt ggctcgttc tagtggctctg 300
 [0205] atggggttgg ctgctgggct tgtatgggtt gacgggtgct tccacaagaa gcccaatgct 360
 [0206] ctgtatcttt acttagctca gtttttgctc tgtttggttt gggatccggt tacgttccgc 420
 [0207] gtcgggtcgg gtagtagcgg gcttgcggtg tggttgggtc aatcggtgc gttattcgga 480
 [0208] tgctacaagg cctttaatga gataagtccg gtcgctggta atctggtaaa gccgtgtttg 540
 [0209] gcttgggctg cctttgtagc cgctgttaat gtaaagcttg cagtcgctg a 591
 [0210] <210> 10
 [0211] <211> 196
 [0212] <212> PRT
 [0213] <213> 拟南芥
 [0214] <400> 10
 [0215] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala
 [0216] 1 5 10 15
 [0217] Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn
 [0218] 20 25 30
 [0219] Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys
 [0220] 35 40 45
 [0221] Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala
 [0222] 50 55 60
 [0223] Thr Tyr Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser
 [0224] 65 70 75 80
 [0225] Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu His Thr Thr Trp Leu Ala
 [0226] 85 90 95
 [0227] Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly
 [0228] 100 105 110
 [0229] Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe
 [0230] 115 120 125
 [0231] Leu Leu Cys Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly
 [0232] 130 135 140
 [0233] Val Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly

[0234]	145	150	155	160
[0235]	Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val			
[0236]		165	170	175
[0237]	Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys			
[0238]		180	185	190
[0239]	Leu Ala Val Ala			
[0240]		195		
[0241]	<210> 11			
[0242]	<211> 591			
[0243]	<212> DNA			
[0244]	<213> 拟南芥			
[0245]	<400> 11			
[0246]	atggattctc aggacatcag ataccgcggc ggagacgaca gagacgctgc aacgacggct	60		
[0247]	atggccgaga cagagaggaa aagcgctgac gacaacaaag gaaaacgcga tcaaaagagg	120		
[0248]	gcgatggcga aacgtggtct caagtctctg acggtagcgg ttgcggctcc tgtgctcgtg	180		
[0249]	acgctcttcg ctacgtatct cctcggcaca agcgcacggat acgggaatcg agctaagtcc	240		
[0250]	tcgtcgtgga tcccacctct gtggctccta cacacaacgt gtctcgttc tagtggtctg	300		
[0251]	atgggtttgg ctgcgtggct tgtatgggtt gacggtggct tccacaagaa gcccaatgct	360		
[0252]	ctggctcttt acttagctca gtttttgctc tgtttggttt gggatccggt tacgttccgc	420		
[0253]	gtcgggtcgg gtagtagcggg gcttgcggtg tggttgggtc aatcggtcgc gttattcgga	480		
[0254]	tgctacaagg cctttaatga gataagtccg gtcgctggta atctggtaaa gccgtgtttg	540		
[0255]	gcttgggctg cctttgtagc cgctgttaat gtaaagcttg cagtcgctg a	591		
[0256]	<210> 12			
[0257]	<211> 196			
[0258]	<212> PRT			
[0259]	<213> 拟南芥			
[0260]	<400> 12			
[0261]	Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala			
[0262]	1	5	10	15
[0263]	Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn			
[0264]		20	25	30
[0265]	Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys			
[0266]		35	40	45
[0267]	Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala			
[0268]		50	55	60
[0269]	Thr Tyr Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser			
[0270]	65	70	75	80
[0271]	Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu His Thr Thr Cys Leu Ala			
[0272]		85	90	95

[0273] Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly
 [0274] 100 105 110
 [0275] Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Ala Leu Tyr Leu Ala Gln Phe
 [0276] 115 120 125
 [0277] Leu Leu Cys Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly
 [0278] 130 135 140
 [0279] Val Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly
 [0280] 145 150 155 160
 [0281] Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val
 [0282] 165 170 175
 [0283] Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys
 [0284] 180 185 190
 [0285] Leu Ala Val Ala
 [0286] 195
 [0287] <210> 13
 [0288] <211> 591
 [0289] <212> DNA
 [0290] <213> 拟南芥
 [0291] <400> 13
 [0292] atggattctc aggacatcag ataccgcggc ggagacgaca gagacgctgc aacgacggct 60
 [0293] atggccgaga cagagaggaa aagcgctgac gacaacaaag gaaaacgcga tcaaaagagg 120
 [0294] gcgatggcga aacgtggtct caagtctctg acggtagcgg ttgctgctcc tgtgctcgtg 180
 [0295] acgctcttcg ctacgtatct cctcggcaca agcgacggat acgggaatcg agctaagtcc 240
 [0296] tcgtcgtgga tcccacctct gtggctccta cacacaacgt gtctcgtctc tagtggtctg 300
 [0297] atggggttgg ctgcgtggct tgtatgggtt gacgggtgct tccacaagaa gcccaatgct 360
 [0298] ctgtatcttg ctttagctca gtttttgctc tgtttgggtt gggatccggt tacgttccgc 420
 [0299] gtcgggtcgg gagtagcggg gcttgcggtg tggttgggtc aatcggtcgc gttattcgga 480
 [0300] tgctacaagg cttttaatga gataagtccg gtcgctggta atctggtaaa gccgtgtttg 540
 [0301] gcttgggctg cttttgtagc cgctgttaat gtaaagcttg cagtcgctg a 591
 [0302] <210> 14
 [0303] <211> 196
 [0304] <212> PRT
 [0305] <213> 拟南芥
 [0306] <400> 14
 [0307] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala
 [0308] 1 5 10 15
 [0309] Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn
 [0310] 20 25 30
 [0311] Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys

[0312]	35	40	45
[0313]	Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala		
[0314]	50	55	60
[0315]	Thr Tyr Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser		
[0316]	65	70	75
[0317]	Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu His Thr Thr Cys Leu Ala		
[0318]	85	90	95
[0319]	Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly		
[0320]	100	105	110
[0321]	Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Ala Leu Ala Gln Phe		
[0322]	115	120	125
[0323]	Leu Leu Cys Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly		
[0324]	130	135	140
[0325]	Val Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly		
[0326]	145	150	155
[0327]	Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val		
[0328]	165	170	175
[0329]	Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys		
[0330]	180	185	190
[0331]	Leu Ala Val Ala		
[0332]	195		
[0333]	<210> 15		
[0334]	<211> 591		
[0335]	<212> DNA		
[0336]	<213> 拟南芥		
[0337]	<400> 15		
[0338]	atggattctc aggacatcag ataccgcggc ggagacgaca gagacgctgc aacgacggct 60		
[0339]	atggccgaga cagagaggaa aagcgctgac gacaacaaag gaaaacgcga tcaaaagagg 120		
[0340]	gcatggcga aacgtggtct caagtctctg acggtagcgg ttgcggtcc tgtgctcgtg 180		
[0341]	acgctcttcg ctacgtatct cctcggcaca agcgacggat acgggaatcg agctaagtcc 240		
[0342]	tcgtcgtgga tcccacctct gtggctccta cacacaacgt gtctcgcttc tagtggtctg 300		
[0343]	atgggtttgg ctgcgtggct tgtatgggtt gacgggtggct tccacaagaa gcccaatgct 360		
[0344]	ctggctcttg ctttagctca gtttttgctc tgtttggtt gggatccggt tacgttccgc 420		
[0345]	gtcgggtcgg gtagtagcgg gcttgcggtg tggttgggtc aatcggtgc gttattcgga 480		
[0346]	tgctacaagg cctttaatga gataagtccg gtcgctggta atctggtaaa gccgtgtttg 540		
[0347]	gcttgggctg cctttgtagc cgctgttaat gtaaagcttg cagtcgctg a 591		
[0348]	<210> 16		
[0349]	<211> 196		
[0350]	<212> PRT		

[0351]	<213>	拟南芥
[0352]	<400>	16
[0353]	Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala	
[0354]	1	5 10 15
[0355]	Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn	
[0356]		20 25 30
[0357]	Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys	
[0358]		35 40 45
[0359]	Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala	
[0360]		50 55 60
[0361]	Thr Tyr Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser	
[0362]	65	70 75 80
[0363]	Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu His Thr Thr Cys Leu Ala	
[0364]		85 90 95
[0365]	Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly	
[0366]		100 105 110
[0367]	Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Gln Phe	
[0368]		115 120 125
[0369]	Leu Leu Cys Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly	
[0370]		130 135 140
[0371]	Val Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly	
[0372]	145	150 155 160
[0373]	Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val	
[0374]		165 170 175
[0375]	Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys	
[0376]		180 185 190
[0377]	Leu Ala Val Ala	
[0378]		195
[0379]	<210>	17
[0380]	<211>	537
[0381]	<212>	DNA
[0382]	<213>	甘蓝型油菜
[0383]	<400>	17
[0384]	atggattctc aggacatcag gtaccgtgcc ggagacgccg ctatggctga gacggagagg	60
[0385]	aaacaagccg acgacaaca caacaacaaa ggcaaacgcg atcaaaagag ggcatggct	120
[0386]	aaacgcggtc tcaaatecct gacgttagct gttgcagctc ctgtgctcct gactctcttc	180
[0387]	acatcctact tctcgggaa tcaggctcgg tctcgtcgt gggtccttca cctcatgcgt	240
[0388]	ctcgcctcga gcggtctgat gggcttgct gcggtgctcg tatgggtcga cgctgggttc	300
[0389]	cacaagaagc ccaacgctct gtatctttac ttggctcagt ttgtgctttg tttgactacg	360

[0390] tgcattggtc ggtcgggact agcagggcctt gcagtgtgct tgtgtcagtc tgcggccttg 420
 [0391] ttccgatgct acaaggcctt taatgagacc agtccggctg ctggtaatat ggtaatgccg 480
 [0392] tgtttggctt ttgctgcgct tgtagcagcc gttaatgtga agctagcaat cgcgtga 537
 [0393] <210> 18
 [0394] <211> 178
 [0395] <212> PRT
 [0396] <213> 甘蓝型油菜
 [0397] <400> 18
 [0398] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Ala Gly Asp Ala Ala Met Ala
 [0399] 1 5 10 15
 [0400] Glu Thr Glu Arg Lys Gln Ala Asp Asp Asn Asn Asn Asn Lys Gly Lys
 [0401] 20 25 30
 [0402] Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys Ser Leu Thr
 [0403] 35 40 45
 [0404] Leu Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Leu Thr Leu Phe Thr Ser Tyr Phe
 [0405] 50 55 60
 [0406] Leu Gly Asn Gln Ala Arg Ser Ser Ser Trp Val Leu His Leu Met Arg
 [0407] 65 70 75 80
 [0408] Leu Ala Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val
 [0409] 85 90 95
 [0410] Asp Ala Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala
 [0411] 100 105 110
 [0412] Gln Phe Val Leu Cys Leu Thr Thr Cys Met Val Gly Ser Gly Leu Ala
 [0413] 115 120 125
 [0414] Gly Leu Ala Val Cys Leu Cys Gln Ser Ala Ala Leu Phe Arg Cys Tyr
 [0415] 130 135 140
 [0416] Lys Ala Phe Asn Glu Thr Ser Pro Val Ala Gly Asn Met Val Met Pro
 [0417] 145 150 155 160
 [0418] Cys Leu Ala Phe Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys Leu Ala
 [0419] 165 170 175
 [0420] Ile Ala
 [0421] <210> 19
 [0422] <211> 588
 [0423] <212> DNA
 [0424] <213> 甘蓝型油菜
 [0425] <400> 19
 [0426] atggattctc aggacacagt caggcatcgt ggaggagacg aaagagacgc ggcaaccacc 60
 [0427] gctacggccg agacggacag gaaacacgca gatgacaaca acaaaggcca acgcgaccaa 120
 [0428] aagagggcga tggccaaacg cggctcttaa tcgcttacgg tagcggttgc ggctcctgtg 180

[0429] ctcgtgatgc tcttcgaaac gtatttcctc ggcggctacg gcagtcgtgc tcggtcctcg 240
 [0430] tcgtggatcc cacctccgtg ggtcctacac gtcactegcc tggcgtcgag cggctctgatg 300
 [0431] ggcttggctg cgtggctcgt atgggtggac ggtggattcc acaagaagcc taatgctctg 360
 [0432] tatctttact tggctcagtt tacgctttgt ttgctttggg gtccggttac gttcctggtc 420
 [0433] gggtcaggat tggccgggct tgtggtgtgg ctgggtcagt ctgcggcctt gtttggatgc 480
 [0434] tacaaggcct ttaatgagat cagtcctgtc gctggtaatt tggtaaagcc gtgtttggct 540
 [0435] tgtactgcgt ttgtagctgc cgtgaatgta aagctcgcaa tcgacctga 588
 [0436] <210> 20
 [0437] <211> 195
 [0438] <212> PRT
 [0439] <213> 甘蓝型油菜
 [0440] <400> 20
 [0441] Met Asp Ser Gln Asp Thr Val Arg His Arg Gly Gly Asp Glu Arg Asp
 [0442] 1 5 10 15
 [0443] Ala Ala Thr Thr Ala Thr Ala Glu Thr Asp Arg Lys His Ala Asp Asp
 [0444] 20 25 30
 [0445] Asn Asn Lys Gly Gln Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly
 [0446] 35 40 45
 [0447] Leu Lys Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Met Leu
 [0448] 50 55 60
 [0449] Phe Glu Thr Tyr Phe Leu Gly Gly Tyr Gly Ser Arg Ala Arg Ser Ser
 [0450] 65 70 75 80
 [0451] Ser Trp Ile Pro Pro Pro Trp Val Leu His Val Thr Arg Leu Ala Ser
 [0452] 85 90 95
 [0453] Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly Gly
 [0454] 100 105 110
 [0455] Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe Thr
 [0456] 115 120 125
 [0457] Leu Cys Leu Leu Trp Gly Pro Val Thr Phe Leu Val Gly Ser Gly Leu
 [0458] 130 135 140
 [0459] Ala Gly Leu Val Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly Cys
 [0460] 145 150 155 160
 [0461] Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val Lys
 [0462] 165 170 175
 [0463] Pro Cys Leu Ala Cys Thr Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys Leu
 [0464] 180 185 190
 [0465] Ala Ile Ala
 [0466] 195
 [0467] <210> 21

[0468] <211> 549
 [0469] <212> DNA
 [0470] <213> 甘蓝型油菜
 [0471] <400> 21
 [0472] atggattctc aggacatcag gtcccgtgcc ggagacgccg caatggctga gaccgagagg 60
 [0473] aaacacgcct cgcacgtaaa caacaaaggg aaacgcgatc aaaagagggc gatggctaaa 120
 [0474] cgcggtctca aatccctgac gttagctggt gcagctcctg tgctcctgac tctcttcgca 180
 [0475] tcctacttcc tcgggaatcg ggctcggctt tcctcgtgga ttctacctct gtgggtcctt 240
 [0476] cacctcatgc gtctcgcctc gacggtctg atgggcttgg ctgcgtggct cgtatgggtc 300
 [0477] gacggtgggt tccacaagaa gcccaacgct ctctatcttt acttggctca gtttgtgctt 360
 [0478] tctttgacta cgtgcatggt cgggtcggga ctacgagggc ttgcagtgtg cttgggtcag 420
 [0479] tctgcggcct tgttcggatg ctacaaggcc tttaatgaga ccagtccggt cgctggtaat 480
 [0480] atggtaaagc cgtgtttggc ttttgctgcg tttgtagcag ccgttaatgt aaagctagca 540
 [0481] atcgcgtaa 549
 [0482] <210> 22
 [0483] <211> 182
 [0484] <212> PRT
 [0485] <213> 甘蓝型油菜
 [0486] <400> 22
 [0487] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Ser Arg Ala Gly Asp Ala Ala Met Ala
 [0488] 1 5 10 15
 [0489] Glu Thr Glu Arg Lys His Ala Ser Asp Val Asn Asn Lys Gly Lys Arg
 [0490] 20 25 30
 [0491] Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys Ser Leu Thr Leu
 [0492] 35 40 45
 [0493] Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Leu Thr Leu Phe Ala Ser Tyr Phe Leu
 [0494] 50 55 60
 [0495] Gly Asn Arg Ala Arg Ser Ser Ser Trp Ile Leu Pro Leu Trp Val Leu
 [0496] 65 70 75 80
 [0497] His Leu Met Arg Leu Ala Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp
 [0498] 85 90 95
 [0499] Leu Val Trp Val Asp Gly Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr
 [0500] 100 105 110
 [0501] Leu Tyr Leu Ala Gln Phe Val Leu Ser Leu Thr Thr Cys Met Val Gly
 [0502] 115 120 125
 [0503] Ser Gly Leu Ala Gly Leu Ala Val Cys Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu
 [0504] 130 135 140
 [0505] Phe Gly Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Thr Ser Pro Val Ala Gly Asn
 [0506] 145 150 155 160

[0507] Met Val Lys Pro Cys Leu Ala Phe Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn
 [0508] 165 170 175
 [0509] Val Lys Leu Ala Ile Ala
 [0510] 180
 [0511] <210> 23
 [0512] <211> 591
 [0513] <212> DNA
 [0514] <213> 甘蓝型油菜
 [0515] <400> 23
 [0516] atggattctc aggacatcag gcatcgtgga ggagacgaca gagacgcagc aaccaccgct 60
 [0517] atggccgaga cggacaggaa acaggcagat gacaacaaca aaggccaacg cgaccaaaaag 120
 [0518] agggcgatgg ccaaacgegg tcttaaatcg ctaacggtag cggttgcggc tcctgtgctc 180
 [0519] gtgatgctct tcgaaacgta tttctcggc ggcggcggct acggcagtcg tgctcggctc 240
 [0520] tcgtcgtgga tcccacctcc gtgggtccta cacgccactc gcctggcgctc gagcggctctg 300
 [0521] atgggcttgg ctgcgtggct cgtatgggtg gacgggtgat tccacaagaa gcccaatgct 360
 [0522] ctgtatcttt acttggctca gtttacgctt tgtttgcttt ggggtccggt tacgttcctg 420
 [0523] gtcgggtcag gattagccgg gcttgtggtg tggttaggcc aatctgcggc cttgttcgga 480
 [0524] tgctacaagg cctttaatga gatcagtcg gtagctggta atctggtaaa gccgtgtttg 540
 [0525] gcttgtgctg cgtttgttac tgccgtgaat gtaaagctcg caatcgccctg a 591
 [0526] <210> 24
 [0527] <211> 196
 [0528] <212> PRT
 [0529] <213> 甘蓝型油菜
 [0530] <400> 24
 [0531] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg His Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala
 [0532] 1 5 10 15
 [0533] Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Asp Arg Lys Gln Ala Asp Asp Asn
 [0534] 20 25 30
 [0535] Asn Lys Gly Gln Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu
 [0536] 35 40 45
 [0537] Lys Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Met Leu Phe
 [0538] 50 55 60
 [0539] Glu Thr Tyr Phe Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Arg Ala Arg Ser
 [0540] 65 70 75 80
 [0541] Ser Ser Trp Ile Pro Pro Pro Trp Val Leu His Ala Thr Arg Leu Ala
 [0542] 85 90 95
 [0543] Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly
 [0544] 100 105 110
 [0545] Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe

[0546]	115	120	125
[0547]	Thr Leu Cys Leu Leu Trp Gly Pro Val Thr Phe Leu Val Gly Ser Gly		
[0548]	130	135	140
[0549]	Leu Ala Gly Leu Val Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly		
[0550]	145	150	155
[0551]	Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val		
[0552]	165	170	175
[0553]	Lys Pro Cys Leu Ala Cys Ala Ala Phe Val Thr Ala Val Asn Val Lys		
[0554]	180	185	190
[0555]	Leu Ala Ile Ala		
[0556]	195		
[0557]	<210> 25		
[0558]	<211> 537		
[0559]	<212> DNA		
[0560]	<213> 白菜型油菜		
[0561]	<400> 25		
[0562]	atggattctc aggacatcag gtaccgtgcc ggagacgccg ctatggctga gacggagagg	60	
[0563]	aaacaagccg acgacaaca caacaacaaa ggcaaacgcg atcaaaagag ggcgatggct	120	
[0564]	aaacgcggtc tcaaatccct gacgttagct gttgcagctc ctgtgctcct gactctcttc	180	
[0565]	acatcctact tctcgggaa tcaggctcgg tctcgtcgt gggtccttca cctcatgcgt	240	
[0566]	ctcgcctcga gcggtctgat gggcttggtc gcgtggctcg tatgggtcga cgctgggttc	300	
[0567]	cacaagaagc ccaacgctct gtatctttac ttggctcagt ttgtgctttg tttgactacg	360	
[0568]	tgcattggtc ggtcgggact agcagggtt gcagtgtgct tgtgtcagtc tgcggccttg	420	
[0569]	ttcggatgct acaaggcctt taatgagatc agtccggctc ctggtaatat ggtaaagccg	480	
[0570]	tgtttggtt ttgctgcgtt tgtagcagcc gttaatgtaa agctcgcaat cgcgtga	537	
[0571]	<210> 26		
[0572]	<211> 178		
[0573]	<212> PRT		
[0574]	<213> 白菜型油菜		
[0575]	<400> 26		
[0576]	Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Ala Gly Asp Ala Ala Met Ala		
[0577]	1	5	10
[0578]	Glu Thr Glu Arg Lys Gln Ala Asp Asp Asn Asn Asn Asn Lys Gly Lys		
[0579]	20	25	30
[0580]	Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys Ser Leu Thr		
[0581]	35	40	45
[0582]	Leu Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Leu Thr Leu Phe Thr Ser Tyr Phe		
[0583]	50	55	60
[0584]	Leu Gly Asn Gln Ala Arg Ser Ser Ser Trp Val Leu His Leu Met Arg		

[0585] 65 70 75 80
 [0586] Leu Ala Ser Ser Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val
 [0587] 85 90 95
 [0588] Asp Ala Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala
 [0589] 100 105 110
 [0590] Gln Phe Val Leu Cys Leu Thr Thr Cys Met Val Gly Ser Gly Leu Ala
 [0591] 115 120 125
 [0592] Gly Leu Ala Val Cys Leu Cys Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly Cys Tyr
 [0593] 130 135 140
 [0594] Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Met Val Lys Pro
 [0595] 145 150 155 160
 [0596] Cys Leu Ala Phe Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys Leu Ala
 [0597] 165 170 175
 [0598] Ile Ala
 [0599] <210> 27
 [0600] <211> 591
 [0601] <212> DNA
 [0602] <213> 白菜型油菜
 [0603] <400> 27
 [0604] atggattctc aggacatcag gcatcgtgga ggagacgaca gagacgcagc aaccaccgct 60
 [0605] atggccgaga cggacaggaa acaggcagat gacaacaaca aaggccaacg cgaccaaag 120
 [0606] agggcgatgg ccaaacgcgg tcttaaatcg ctaacggtag cggttgcggc tctgtgtctc 180
 [0607] gtgatgctct tcgaaacgta tttcctcggc ggcggcggct acggcagtcg tgctcggctc 240
 [0608] tcgtcgtgga tcccacctcc gtgggtccta cacgccactc gcctggcgtc ggcggtctg 300
 [0609] atgggcttgg ctgcgtggct cgtatgggtg gacgggtgggt tccacaagaa gcccaatgct 360
 [0610] ctgtatcttt acttggtca gtttacgctt tgtttgcttt ggggtccggt tacgttctg 420
 [0611] gtcgggtcag gagtagccgg gcttgtggtg tggttaggcc aatctgcggc cttgttcgga 480
 [0612] tgctacaagg ctttaatga gatcagtcg gtagctgta atctggtaaa gccgtgtttg 540
 [0613] gcttgtgctg cgtttgttac tgccgtgaat gtaaagctcg caatcgcctg a 591
 [0614] <210> 28
 [0615] <211> 196
 [0616] <212> PRT
 [0617] <213> 白菜型油菜
 [0618] <400> 28
 [0619] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg His Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala
 [0620] 1 5 10 15
 [0621] Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Asp Arg Lys Gln Ala Asp Asp Asn
 [0622] 20 25 30
 [0623] Asn Lys Gly Gln Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu

[0624]	35	40	45
[0625]	Lys Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Met Leu Phe		
[0626]	50	55	60
[0627]	Glu Thr Tyr Phe Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Arg Ala Arg Ser		
[0628]	65	70	75
[0629]	Ser Ser Trp Ile Pro Pro Pro Trp Val Leu His Ala Thr Arg Leu Ala		
[0630]	85	90	95
[0631]	Ser Arg Gly Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly		
[0632]	100	105	110
[0633]	Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe		
[0634]	115	120	125
[0635]	Thr Leu Cys Leu Leu Trp Gly Pro Val Thr Phe Leu Val Gly Ser Gly		
[0636]	130	135	140
[0637]	Val Ala Gly Leu Val Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly		
[0638]	145	150	155
[0639]	Cys Tyr Lys Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val		
[0640]	165	170	175
[0641]	Lys Pro Cys Leu Ala Cys Ala Ala Phe Val Thr Ala Val Asn Val Lys		
[0642]	180	185	190
[0643]	Leu Ala Ile Ala		
[0644]	195		
[0645]	<210> 29		
[0646]	<211> 582		
[0647]	<212> DNA		
[0648]	<213> 稻		
[0649]	<400> 29		
[0650]	atggcctccg cgcgcccgcc cgccgcccgc gcgcaggaag ggatcactca ccgcgccgtg 60		
[0651]	agaggggatg gcggcgatgc tgcggcgacg gcgggtggtg gcgaggcggc gagccgggat 120		
[0652]	ccgaggaagg cggggcgcgc caagcgcggg ctgcggtcgc tcgccccgc cgtgtccgtg 180		
[0653]	tcggttgcgc tgatggccgc ctggttttac ggctccgggt cggcgtcggc gtcggcgtcg 240		
[0654]	gcggcgaggg tgacggtcgc gcgggcgggg tcggtggcgg cggaggcggg gatggcgtg 300		
[0655]	gcggcgtgga tgggtgtggc ggaggcggg ctccaccgcc gccccggcgc gacgctggcg 360		
[0656]	ccgttcgtgg cgcagctggt cgccgcgctg gcgtgggcgc cgctcgcgt ggggctcgcc 420		
[0657]	gcgcccgcgg cgggctggc gtgctgcgc gcgatggccg ccggcggcgc ggcgtgcgcg 480		
[0658]	cgcggttcg gcggcgtaa ccccgtcgcc ggcgacctg ccaagccgtg cgctgcctgg 540		
[0659]	gcccctctcc tcgcagtcac caactacaag atgatgaact ga 582		
[0660]	<210> 30		
[0661]	<211> 193		
[0662]	<212> PRT		

[0663] <213> 稻
 [0664] <400> 30
 [0665] Met Ala Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Glu Gly Ile Thr
 [0666] 1 5 10 15
 [0667] His Arg Ala Val Arg Gly Asp Gly Gly Asp Ala Ala Ala Thr Ala Gly
 [0668] 20 25 30
 [0669] Gly Gly Glu Ala Ala Ser Arg Asp Pro Arg Lys Ala Gly Arg Ala Lys
 [0670] 35 40 45
 [0671] Arg Gly Leu Arg Ser Leu Ala Ala Ala Val Ser Val Ser Val Ala Leu
 [0672] 50 55 60
 [0673] Met Ala Ala Ser Phe Tyr Gly Ser Gly Ser Ala Ser Ala Ser Ala Ser
 [0674] 65 70 75 80
 [0675] Ala Ala Arg Val Thr Val Ala Arg Ala Gly Ser Val Ala Ala Glu Ala
 [0676] 85 90 95
 [0677] Val Met Ala Leu Ala Ala Trp Met Val Trp Ala Glu Gly Gly Leu His
 [0678] 100 105 110
 [0679] Arg Arg Pro Gly Ala Thr Leu Ala Pro Phe Val Ala Gln Leu Val Ala
 [0680] 115 120 125
 [0681] Ala Leu Ala Trp Ala Pro Leu Ala Leu Gly Leu Ala Ala Pro Ala Ala
 [0682] 130 135 140
 [0683] Gly Leu Ala Cys Cys Ala Ala Met Ala Ala Gly Ala Ala Ala Cys Ala
 [0684] 145 150 155 160
 [0685] Arg Gly Phe Gly Gly Val Asn Pro Val Ala Gly Asp Leu Ala Lys Pro
 [0686] 165 170 175
 [0687] Cys Val Ala Trp Ala Val Leu Leu Ala Val Ile Asn Tyr Lys Met Met
 [0688] 180 185 190
 [0689] Asn
 [0690] <210> 31
 [0691] <211> 591
 [0692] <212> DNA
 [0693] <213> 亚麻荠
 [0694] <400> 31
 [0695] atggattctc aggacatcag gtaccgtggc ggagacgaca gagacgccgc aacgacggct 60
 [0696] atggccgaga cggaaaggaa acacgctgac gacaacaaag ggaaactcca tcaaaaaagg 120
 [0697] gccatggcga aacgcggtct caggtctctg accgtagcag ttgcggctcc tgtcctcgtg 180
 [0698] acgctcttcg ccacgttttt cctcggcaca agcgcaggct acgggaaccg tgctcggctca 240
 [0699] tcgtcatgga tcccacctct atggctccta cacaccacgt gtctcgcgtc gagctgtctc 300
 [0700] atgggcctgg ctgcgtggct cgtatgggtc gacggtggtt tccacaagaa gcctaagtct 360
 [0701] ttgtatcttt acttggctca gtttttagtt tgtttgcttt gggatccggt tacgtttcgg 420

[0702] ctcgggtcgg gaatagcggg gcttgcggtg tggttgggtc aatctgcggc gttattcggg 480
 [0703] tgtttcaagg cctttagtga gataagcccg gtcgctggta atttggtaaa gccgtgtctg 540
 [0704] gcttgggctg cgttttagc cgctgttaat gtaaagcttg caatcgcgta a 591
 [0705] <210> 32
 [0706] <211> 196
 [0707] <212> PRT
 [0708] <213> 亚麻荠
 [0709] <400> 32
 [0710] Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala
 [0711] 1 5 10 15
 [0712] Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys His Ala Asp Asp Asn
 [0713] 20 25 30
 [0714] Lys Gly Lys Leu His Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Arg
 [0715] 35 40 45
 [0716] Ser Leu Thr Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala
 [0717] 50 55 60
 [0718] Thr Phe Phe Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Arg Ser
 [0719] 65 70 75 80
 [0720] Ser Ser Trp Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu His Thr Thr Cys Leu Ala
 [0721] 85 90 95
 [0722] Ser Ser Cys Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly
 [0723] 100 105 110
 [0724] Gly Phe His Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe
 [0725] 115 120 125
 [0726] Leu Val Cys Leu Leu Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Leu Gly Ser Gly
 [0727] 130 135 140
 [0728] Ile Ala Gly Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly
 [0729] 145 150 155 160
 [0730] Cys Phe Lys Ala Phe Ser Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val
 [0731] 165 170 175
 [0732] Lys Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys
 [0733] 180 185 190
 [0734] Leu Ala Ile Ala
 [0735] 195
 [0736] <210> 33
 [0737] <211> 546
 [0738] <212> DNA
 [0739] <213> 亚麻
 [0740] <400> 33

[0741] atgaatacat cagggacaaa caacataagc agtacgagag accaaggaga gaagaggatg 60
 [0742] gtcattggcaa agagggggct acggtcgctt gccgtagccc taggtcttcc tccttccta 120
 [0743] acgattctaa gcatctactt cctcgggtggc ggtggctaca acagcgacga cgagctattg 180
 [0744] ccgggtgctgt cgtataagaa gccgttttgg ttcccacat cgtgggtgat ccacgttttt 240
 [0745] tgcgtgacta gcactttttt aatgggcctt tctgggtggc tagtttgggc ggagggtagg 300
 [0746] tttcacaacg aacctgcgac attgtacata tatggagtcc agatgggatt caactcgatt 360
 [0747] ttgatccga ttgtgtgtgg gttaaatata ccatcattag ggctcatcat atctatgtgt 420
 [0748] ttgcttgggg cactaataag ctgttctcgc cattttagga tcacgaatcc tattgctgct 480
 [0749] gatttggta agccatgcat tgcttgggct gccttcttga ttattctcaa tctcaaactc 540
 [0750] atttag 546
 [0751] <210> 34
 [0752] <211> 181
 [0753] <212> PRT
 [0754] <213> 亚麻
 [0755] <400> 34
 [0756] Met Asn Thr Ser Gly Thr Asn Asn Ile Ser Ser Thr Arg Asp Gln Gly
 [0757] 1 5 10 15
 [0758] Glu Lys Arg Met Val Met Ala Lys Arg Gly Leu Arg Ser Leu Ala Val
 [0759] 20 25 30
 [0760] Ala Leu Gly Leu Pro Pro Ser Leu Thr Ile Leu Ser Ile Tyr Phe Leu
 [0761] 35 40 45
 [0762] Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Ser Asp Asp Glu Leu Leu Pro Val Ser Ser
 [0763] 50 55 60
 [0764] Tyr Lys Lys Pro Phe Trp Phe Pro Pro Ser Trp Val Ile His Val Phe
 [0765] 65 70 75 80
 [0766] Cys Val Thr Ser Thr Phe Leu Met Gly Leu Ser Gly Trp Leu Val Trp
 [0767] 85 90 95
 [0768] Ala Glu Gly Arg Phe His Asn Glu Pro Ala Thr Leu Tyr Ile Tyr Gly
 [0769] 100 105 110
 [0770] Val Gln Met Gly Phe Asn Ser Ile Leu Ile Pro Ile Val Cys Gly Leu
 [0771] 115 120 125
 [0772] Asn Ile Pro Ser Leu Gly Leu Ile Ile Ser Met Cys Leu Leu Gly Ala
 [0773] 130 135 140
 [0774] Leu Ile Ser Cys Ser Arg His Phe Arg Ile Thr Asn Pro Ile Ala Ala
 [0775] 145 150 155 160
 [0776] Asp Leu Val Lys Pro Cys Ile Ala Trp Ala Ala Phe Leu Ile Ile Leu
 [0777] 165 170 175
 [0778] Asn Leu Lys Leu Ile
 [0779] 180

[0780] <210> 35
 [0781] <211> 582
 [0782] <212> DNA
 [0783] <213> 玉米
 [0784] <400> 35
 [0785] atggccaccg cacaggaagg tctgaccag cgcgctgttg ccagtgccag cagggacgac 60
 [0786] ggcgccggcg agagcgcggc ggccgtctcg ggtcccaaca agaagccggg cggcggccgc 120
 [0787] gcaaacagca gcaggcgtgg gctccgttcg ctcgccgccg cgggtgtcctt ctccgtggcg 180
 [0788] ctcacggcgc tgtcgttctt cgccgcgggg cagtcgccac cgtcgcccaa gaccgccacg 240
 [0789] gcgtcgactg tggcgttggg gcgggcccgg tcggtggcgt tggaggcggg gctggcgctg 300
 [0790] gcggcgtgga tggcgtgggc ggaggcggg ctgcacgcgc gcccggcagc cacgctgctc 360
 [0791] ccctatgccg cgcacctggg cgccgccctc gcatgggcgc cactcgtgct gtgcagccac 420
 [0792] gccgcggcgc gcgcgggect cgctgctgc gccgtcatgg ccgcgggcgc cgtggcgtgc 480
 [0793] gcgcgcgggt tcggcgccgt caaccccgtg gctggcgacc tcgcgaagcc cgccgtcgcc 540
 [0794] tgggccgtca tctcgcctt cgtcaactac aagatgctct ga 582
 [0795] <210> 36
 [0796] <211> 193
 [0797] <212> PRT
 [0798] <213> 玉米
 [0799] <400> 36
 [0800] Met Ala Thr Ala Gln Glu Gly Leu Thr Gln Arg Val Val Ala Ser Ala
 [0801] 1 5 10 15
 [0802] Ser Arg Asp Asp Gly Ala Gly Glu Ser Ala Ala Ala Val Ser Gly Pro
 [0803] 20 25 30
 [0804] Asn Lys Lys Pro Gly Gly Gly Arg Ala Asn Ser Ser Arg Arg Gly Leu
 [0805] 35 40 45
 [0806] Arg Ser Leu Ala Ala Ala Val Ser Phe Ser Val Ala Leu Thr Ala Leu
 [0807] 50 55 60
 [0808] Ser Phe Phe Ala Ala Gly Gln Ser Pro Pro Ser Pro Lys Thr Ala Thr
 [0809] 65 70 75 80
 [0810] Ala Ser Thr Val Ala Val Val Arg Ala Gly Ser Val Ala Leu Glu Ala
 [0811] 85 90 95
 [0812] Val Leu Ala Leu Ala Ala Trp Met Ala Trp Ala Glu Gly Gly Leu His
 [0813] 100 105 110
 [0814] Ala Arg Pro Ala Ala Thr Leu Leu Pro Tyr Ala Ala His Leu Gly Ala
 [0815] 115 120 125
 [0816] Ala Leu Ala Trp Ala Pro Leu Val Leu Cys Ser His Ala Ala Ala Arg
 [0817] 130 135 140
 [0818] Ala Gly Leu Ala Cys Cys Ala Val Met Ala Ala Gly Ala Val Ala Cys

[0819]	145	150	155	160
[0820]	Ala Arg Gly Phe Gly Ala Val Asn Pro Val Ala Gly Asp Leu Ala Lys			
[0821]		165	170	175
[0822]	Pro Ala Val Ala Trp Ala Val Ile Leu Ala Val Val Asn Tyr Lys Met			
[0823]		180	185	190
[0824]	Leu			
[0825]	<210> 37			
[0826]	<211> 507			
[0827]	<212> DNA			
[0828]	<213> 向日葵			
[0829]	<400> 37			
[0830]	atgacttaca atgtcgcaag aacgagatct caaaagaaac catcaacagc tagccgtggt	60		
[0831]	atccgatcac tgagcctagc cattgtggtc cccgtgggtc tcaccctaac aaccatcata	120		
[0832]	tggtttggag agagcaacac ctacaagaac ctaaccggac ctttctggat ccctcccttg	180		
[0833]	tgggccatac acctaacctc tgtgtcaacg gctttcttaa tggggttatc ggcttggctc	240		
[0834]	gtgtgggccg agagcgggtt tcaccgcaaa cccatggcta tggttatgta cttggctcag	300		
[0835]	ctcgggcttg gcttggcttg gaacaagatc tttttcaaaa cgggccccac tcaaattgggc	360		
[0836]	ttagccatga gtttgggcca attggttacc attttaattt gttcaciaat gtttagccgg	420		
[0837]	ataaatccaa tagccggtga catagtgaag ctttgtttgg tttggaccgg gtttttaacg	480		
[0838]	tctgtaaate tatattatgt acttttag	507		
[0839]	<210> 38			
[0840]	<211> 168			
[0841]	<212> PRT			
[0842]	<213> 向日葵			
[0843]	<400> 38			
[0844]	Met Thr Tyr Asn Val Ala Arg Thr Arg Ser Gln Lys Lys Pro Ser Thr			
[0845]	1	5	10	15
[0846]	Ala Ser Arg Gly Ile Arg Ser Leu Ser Leu Ala Ile Val Val Pro Val			
[0847]		20	25	30
[0848]	Gly Leu Thr Leu Thr Thr Ile Ile Trp Phe Gly Glu Ser Asn Thr Tyr			
[0849]		35	40	45
[0850]	Lys Asn Leu Thr Arg Pro Phe Trp Ile Pro Pro Leu Trp Ala Ile His			
[0851]		50	55	60
[0852]	Leu Thr Ser Val Ser Thr Ala Phe Leu Met Gly Leu Ser Ala Trp Leu			
[0853]	65	70	75	80
[0854]	Val Trp Ala Glu Ser Gly Phe His Arg Lys Pro Met Ala Met Val Met			
[0855]		85	90	95
[0856]	Tyr Leu Ala Gln Leu Gly Leu Gly Leu Ala Trp Asn Lys Ile Phe Phe			
[0857]		100	105	110

[0858] Lys Thr Gly Pro Thr Gln Met Gly Leu Ala Met Ser Leu Gly Gln Leu
 [0859] 115 120 125
 [0860] Val Thr Ile Leu Ile Cys Ser Gln Met Phe Ser Arg Ile Asn Pro Ile
 [0861] 130 135 140
 [0862] Ala Gly Asp Ile Val Lys Leu Cys Leu Val Trp Thr Gly Phe Leu Thr
 [0863] 145 150 155 160
 [0864] Ser Val Asn Leu Tyr Tyr Val Leu
 [0865] 165
 [0866] <210> 39
 [0867] <211> 576
 [0868] <212> DNA
 [0869] <213> 向日葵
 [0870] <400> 39
 [0871] atggactcca cctcacaaga actcaaacac agagccacca ccaccaccac agaagaccaa 60
 [0872] tctccaacce ttcaacccaa cacaaaaact caaaaacaac gtatcccgac acgtggcatc 120
 [0873] cgctcactgg ctgtcgggat cgcgatcccg ttagctctaa ccttagccaa catatctatc 180
 [0874] ttcggctgga accgaacctc ccgaaccatc cacaaaccgt tctgggtccc accgttatgg 240
 [0875] gctctacatt taacatgttt gggttcggct tttattatgg gtttatcggc ttggcttgtt 300
 [0876] tgggctgaag gggggtttca taagaaccgc agtgcggctc ggttttattt ggggcagttg 360
 [0877] gggctgagcc tggcttggga cccggtgttt ttttaagatgg gtgcggctag gttgggtttg 420
 [0878] ttggtgtgtt tgggtcagat ggcgactatg tggctctgtt tgaagatgtt tgggcgggtt 480
 [0879] aaccggactg cgggtgattt gggatgtgtg aagggggttt ttgtgtatag aagtttatgc 540
 [0880] tttcatgttt tgtggtcttg caatgtaata atatga 576
 [0881] <210> 40
 [0882] <211> 191
 [0883] <212> PRT
 [0884] <213> 向日葵
 [0885] <400> 40
 [0886] Met Asp Ser Thr Ser Gln Glu Leu Lys His Arg Ala Thr Thr Thr Thr
 [0887] 1 5 10 15
 [0888] Thr Glu Asp Gln Ser Pro Thr Leu Gln Pro Asn Thr Lys Thr Gln Lys
 [0889] 20 25 30
 [0890] Gln Arg Ile Pro Thr Arg Gly Ile Arg Ser Leu Ala Val Gly Ile Ala
 [0891] 35 40 45
 [0892] Ile Pro Leu Ala Leu Thr Leu Ala Asn Ile Ser Ile Phe Gly Trp Asn
 [0893] 50 55 60
 [0894] Arg Thr Tyr Arg Thr Ile His Lys Pro Phe Trp Val Pro Pro Leu Trp
 [0895] 65 70 75 80
 [0896] Ala Leu His Leu Thr Cys Leu Gly Ser Ala Phe Ile Met Gly Leu Ser

[0936] atatttggtt accatacaaa cgggaggtat tggcttctta acaaaccaac aaaaaaatat 600
 [0937] tttatttggtg tgttttctct tttggatatt tctgagcaaa aaattatttt gtatttcttc 660
 [0938] ataacaaacc aacaaaaata tatatgcaag aatataatcc taaattttct ccataacac 720
 [0939] aaattatttt atctggtttt ttaataattht attgtgtctt aactctttca atcttcccat 780
 [0940] caaacctcat tcaactgttt cttctcttac cctatataga atggcataaa acatttcatt 840
 [0941] gcttcttaat ctcttgtctc tagctccttc atgccctaht aagataaaaa agcgattcat 900
 [0942] tttgcaatca actaacaata atatatctat tcatcgacat tccgagcatc gcgatctaca 960
 [0943] ttctacaccc gagggcaaca acaacaacat cacaacgatg 1000
 [0944] <210> 43
 [0945] <211> 200
 [0946] <212> DNA
 [0947] <213> 甘蓝型油菜
 [0948] <400> 43
 [0949] taccttgttt ttaaaaagaa tcgctcataa gatggcatgc cagaacatta gctacacgtt 60
 [0950] acacaaagca tgcagacgcg gaggattggt tttgttcgtc acttgtcact cccttcaaac 120
 [0951] acctaagagc ttctctctca cagcacacac atacaatcac atgcgtgcat gcattattac 180
 [0952] acgtgatcgc catgcaaate 200
 [0953] <210> 44
 [0954] <211> 786
 [0955] <212> DNA
 [0956] <213> 拟南芥
 [0957] <400> 44
 [0958] ggttcttgag accgatgaga gatgggagca gaactaaaga tgatgacata attaagaacg 60
 [0959] aatttgaaag gctcttaggt ttgaatccta ttcgagaatg tttttgtcaa agatagtggc 120
 [0960] gattttgaac caaagaaaac atttaaaaaa tcagtatccg gttacgttca tgcaaataga 180
 [0961] aagtggctca ggatctgatt gtaatttttag acttaaagag tctcttaaga ttcaatcctg 240
 [0962] gctgtgtaca aaactacaaa taatatattht tagactattht ggccttaact aaacttccac 300
 [0963] tcattattht ctgaggtttag agaatagact tgcgaataaa cacattcccg agaaatactc 360
 [0964] atgatcccat aattagtcag agggatgccc aatcagatct aagaacacac attccctcaa 420
 [0965] attttaaatgc acatgtaate atagtttagc acaattcaaa aataatgtag tattaagac 480
 [0966] agaaattht agactthttht ttggcgthta aagaagacta agthttatacg tacatthttht 540
 [0967] ttttaagtga aaaccgaaat tttccatcga aatatatgaa tttagtatat atatthtctgc 600
 [0968] aatgtactat tttgctattht tggcaacttht cagtggacta ctactthttht acaatgtgta 660
 [0969] tggatgcatg agthttgagta tacacatgct taaatgcatg cthttgtaaaa cgtaacggac 720
 [0970] cacaaaagag gatccataca aatacatctc atagcttctt ccattattht ccgacacaaa 780
 [0971] cagagc 786
 [0972] <210> 45
 [0973] <211> 38
 [0974] <212> DNA

- [0975] <213> 人工序列
 [0976] <220>
 [0977] <223> 引物序列 SeM5'
 [0978] <400> 45
 [0979] aaatctagaa agcttaccat ggattctcag gacatcag 38
 [0980] <210> 46
 [0981] <211> 36
 [0982] <212> DNA
 [0983] <213> 人工序列
 [0984] <220>
 [0985] <223> 引物序列 SeM3'
 [0986] <400> 46
 [0987] aaaagatcct caccgactg caagctttac attaac 36
 [0988] <210> 47
 [0989] <211> 39
 [0990] <212> DNA
 [0991] <213> 人工序列
 [0992] <220>
 [0993] <223> 引物序列 NeM5'
 [0994] <400> 47
 [0995] aaactcgagg gtacctacct tgttttttaa aagaatcgc 39
 [0996] <210> 48
 [0997] <211> 30
 [0998] <212> DNA
 [0999] <213> 人工序列
 [1000] <220>
 [1001] <223> 引物序列 NeM3'
 [1002] <400> 48
 [1003] aaatctagag atttgcattg cgatcacgtg 30
 [1004] <210> 49
 [1005] <211> 144
 [1006] <212> PRT
 [1007] <213> 拟南芥
 [1008] <400> 49
 [1009] Val Ala Val Ala Ala Pro Val Leu Val Thr Leu Phe Ala Thr Tyr Phe
 [1010] 1 5 10 15
 [1011] Leu Gly Thr Ser Asp Gly Tyr Gly Asn Arg Ala Lys Ser Ser Ser Trp
 [1012] 20 25 30
 [1013] Ile Pro Pro Leu Trp Leu Leu His Thr Thr Cys Leu Ala Ser Ser Gly

[1014]	35	40	45
[1015]	Leu Met Gly Leu Ala Ala Trp Leu Val Trp Val Asp Gly Gly Phe His		
[1016]	50	55	60
[1017]	Lys Lys Pro Asn Ala Leu Tyr Leu Tyr Leu Ala Gln Phe Leu Leu Cys		
[1018]	65	70	75
[1019]	Leu Val Trp Asp Pro Val Thr Phe Arg Val Gly Ser Gly Val Ala Gly		
[1020]	85	90	95
[1021]	Leu Ala Val Trp Leu Gly Gln Ser Ala Ala Leu Phe Gly Cys Tyr Lys		
[1022]	100	105	110
[1023]	Ala Phe Asn Glu Ile Ser Pro Val Ala Gly Asn Leu Val Lys Pro Cys		
[1024]	115	120	125
[1025]	Leu Ala Trp Ala Ala Phe Val Ala Ala Val Asn Val Lys Leu Ala Val		
[1026]	130	135	140
[1027]	<210> 50		
[1028]	<211> 49		
[1029]	<212> PRT		
[1030]	<213> 拟南芥		
[1031]	<400> 50		
[1032]	Met Asp Ser Gln Asp Ile Arg Tyr Arg Gly Gly Asp Asp Arg Asp Ala		
[1033]	1	5	10
[1034]	Ala Thr Thr Ala Met Ala Glu Thr Glu Arg Lys Ser Ala Asp Asp Asn		
[1035]	20	25	30
[1036]	Lys Gly Lys Arg Asp Gln Lys Arg Ala Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys		
[1037]	35	40	45
[1038]	Ser		
[1039]	<210> 51		
[1040]	<211> 9		
[1041]	<212> PRT		
[1042]	<213> 拟南芥		
[1043]	<400> 51		
[1044]	Met Ala Lys Arg Gly Leu Lys Ser Leu		
[1045]	1	5	

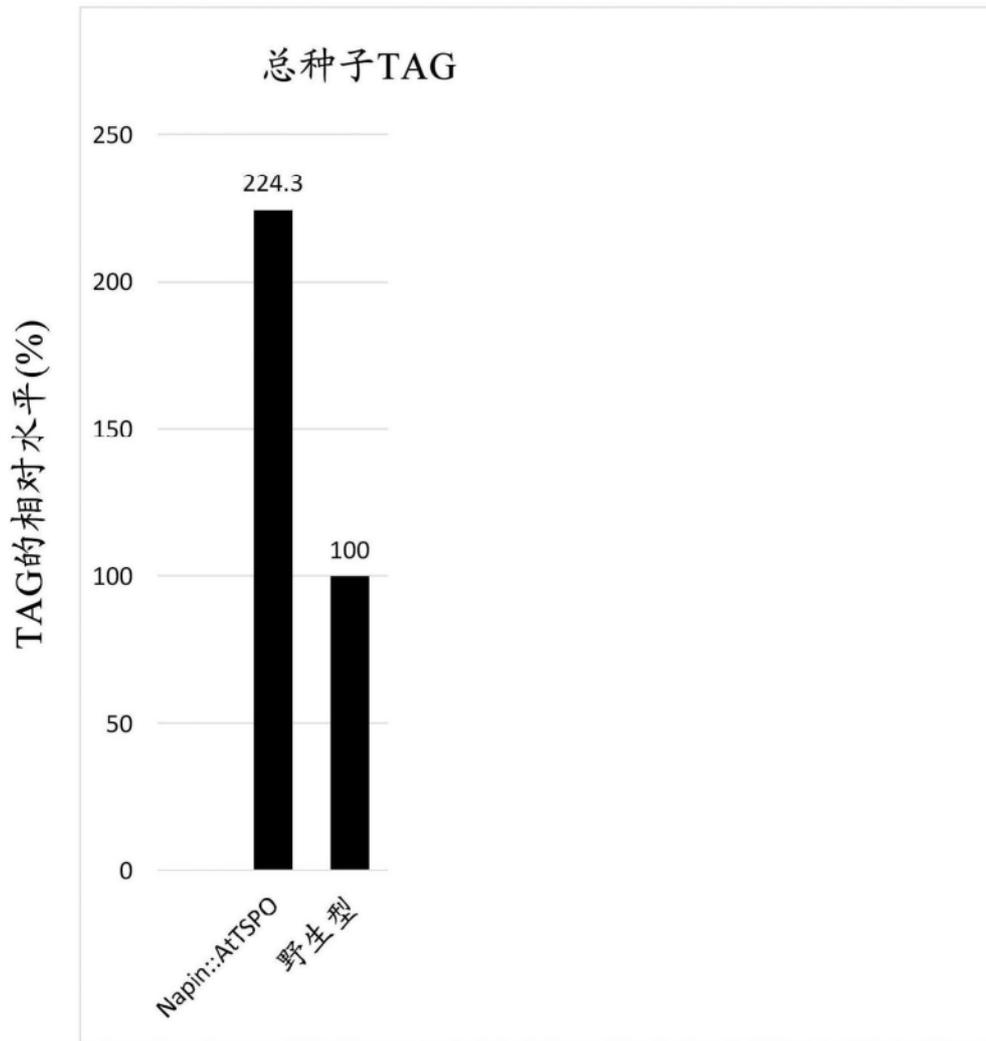


图1

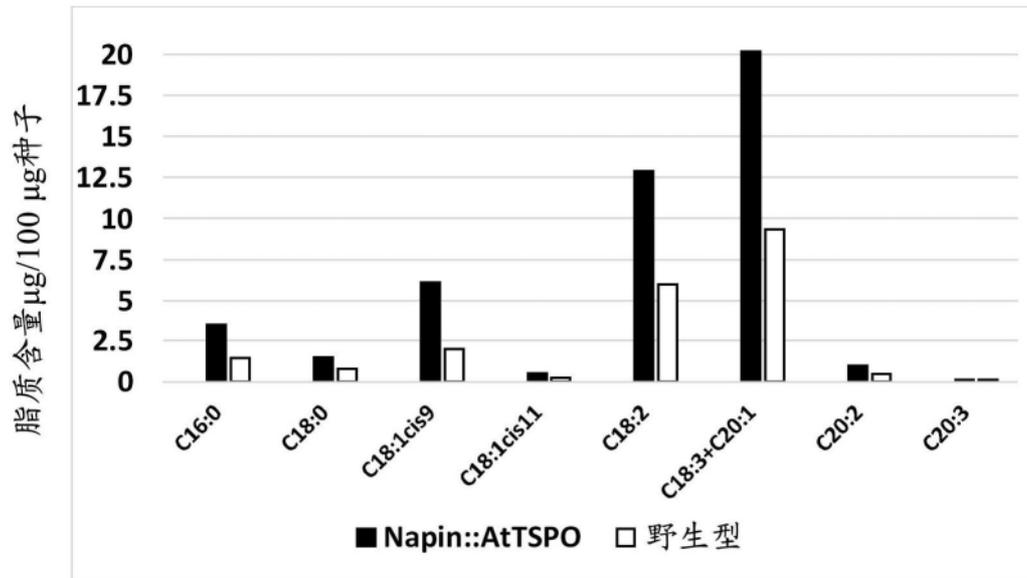


图2

*MDSQDIRYRGGDDRDAATTAMAETERKSADDNKGKRDQKRAMAKRGLKSLTVAVAAPVLVTLFATY
 FLGTSDGYGNRAKSSSWIPPLWLLHTTCLASSGLMGLAAWLWVDGGFHKKPNALYL₁LAQFLLCLV
 WDPVTFRVGSVAGLAVWLGQSAALFGCYKAFNEISPVAGNLVKPCLAWAAFVAAVNVKLAVA*

图3

```

OsTSPO      MASAA-AAAAAQEGITHRAVRGDGGDAAATAGGGEAASRDPRKAGRAKRLRSLAAVVS
LuTSPO      MNTSG-----TNNISSTRDQGEKRMV-MAKRGLRSLAVALG
BnTSPO3     MDSQD-IRSRAGD-----AAMAETERKHASD-VNNKGKRDQKRA-MAKRGLKSLTLAVA
BnTSPO1     MDSQD-IRYRAGD-----AAMAETERKQADDNNNNKKGKRDQKRA-MAKRGLKSLTLAVA
BrTSPO1     MDSQD-IRYRAGD-----AAMAETERKQADDNNNNKKGKRDQKRA-MAKRGLKSLTLAVA
BnTSPO2     MDSQDITVRHRGGDERDAATTATAETDRKHADD--NKGKRDQKRA-MAKRGLKSLTVAVA
BnTSPO4     MDSQD-IRHRGGDDRDAATTAMAETDRKQADD--NKGKRDQKRA-MAKRGLKSLTVAVA
BrTSPO2     MDSQD-IRHRGGDDRDAATTAMAETDRKQADD--NKGKRDQKRA-MAKRGLKSLTVAVA
AtTSPO      MDSQD-IRYRGGDDRDAATTAMAETERKSADD---NKGKRDQKRA-MAKRGLKSLTVAVA
CsTSPO      MDSQD-IRYRGGDDRDAATTAMAETERKHADD---NKGKLDQKRA-MAKRGLRSLTVAVA
* :                :                . . . *****:** :..

OsTSPO      VSVALMAASFYGSGSASASASAA-----RVT-----VARAGSVAAEAVMALAAWM
LuTSPO      LPPSLTILSIYFLG-GGGYNSDDELLPVSSYKPPFWFPPSWVIHVFCVTSTFLMGLSGWL
BnTSPO3     APVLLTLFASYFLG-----NRA-----RSSSWILPLWVLHLMRLASSGLMGLAANL
BnTSPO1     APVLLTLFTSYFLG-----NQA-----RSSH-----WVLHLMRLASSGLMGLAANL
BrTSPO1     APVLLTLFTSYFLG-----NQA-----RSSH-----WVLHLMRLASSGLMGLAANL
BnTSPO2     APVLVMLFETYFLG---GYGSRA-----RSSSWIPPPWVLHVTRLASSGLMGLAANL
BnTSPO4     APVLVMLFETYFLG-GGGYGSRA-----RSSSWIPPPWVLHATRLASSGLMGLAANL
BrTSPO2     APVLVMLFETYFLG-GGGYGSRA-----RSSSWIPPPWVLHATRLASSGLMGLAANL
AtTSPO      APVLVTLFATYFLGTSDGYGNA-----KSSSWIPPLWLLHTTCLASSGLMGLAANL
CsTSPO      APVLVTLFATFFLGTSDGYGNA-----RSSSWIPPLWLLHTTCLASSGLMGLAANL
. : : * . . . : . : : : *.*.*

OsTSPO      VWAEGGLHRRPGATLAPFVAQLVAALAWAPLALGLAAPAAGLACCAAMAAGAACARGFG
LuTSPO      VWAEGRFHNEPAT-LYIYGVQMGFNSILIPIVCGLNIPSLGLIISMCLLGALISCSRHRFR
BnTSPO3     VWVDGGFHKKPNA-LYLYLAQFVLSL----TTCMVGSLAGLAVCLGQSAALFGCYKAFN
BnTSPO1     VWVDAGFHKKPNA-LYLYLAQFVLCCL----TTCMVGSLAGLAVCLCQSAALFRCYKAFN
BrTSPO1     VWVDAGFHKKPNA-LYLYLAQFVLCCL----TTCMVGSLAGLAVCLCQSAALFGCYKAFN
BnTSPO2     VWVDGGFHKKPNA-LYLYLAQFTLCLLWGPVTFLVGSGLAGLVVWLGQSAALFGCYKAFN
BnTSPO4     VWVDGGFHKKPNA-LYLYLAQFTLCLLWGPVTFLVGSGLAGLVVWLGQSAALFGCYKAFN
BrTSPO2     VWVDGGFHKKPNA-LYLYLAQFTLCLLWGPVTFLVGSVAGLVVWLGQSAALFGCYKAFN
AtTSPO      VWVDGGFHKKPNA-LYLYLAQFLLCLVWDPVTFRVGSVAGLVVWLGQSAALFGCYKAFN
CsTSPO      VWVDGGFHKKPNA-LYLYLAQFLVCLLWDPVTFRLGSGIAGLAVWLGQSAALFGCFKAFS
**.. :*. * : * : .* : : ** .. * . *

OsTSPO      GVNFVAGDLAKPCVAVAVLLAVINYKMMN-
LuTSPO      ITNPIAADLVKPCIAWAAFLIILNLKLI--
BnTSPO3     ETSFVAGNMVKPCLAFAAFVAAVNVKLAIA
BnTSPO1     ETSFVAGNMVMPCLAFAAFVAAVNVKLAIA
BrTSPO1     EISFVAGNMVKPCLAFAAFVAAVNVKLAIA
BnTSPO2     EISFVAGNLVKPCLACTAFVAAVNVKLAIA
BnTSPO4     EISFVAGNLVKPCLACAAFTAVNVKLAIA
BrTSPO2     EISFVAGNLVKPCLACAAFTAVNVKLAIA
AtTSPO      EISFVAGNLVKPCLAWAAFVAAVNVKLAVA
CsTSPO      EISFVAGNLVKPCLAWAAFVAAVNVKLAIA
.*.*. :. *.* : : : * *

```

图4

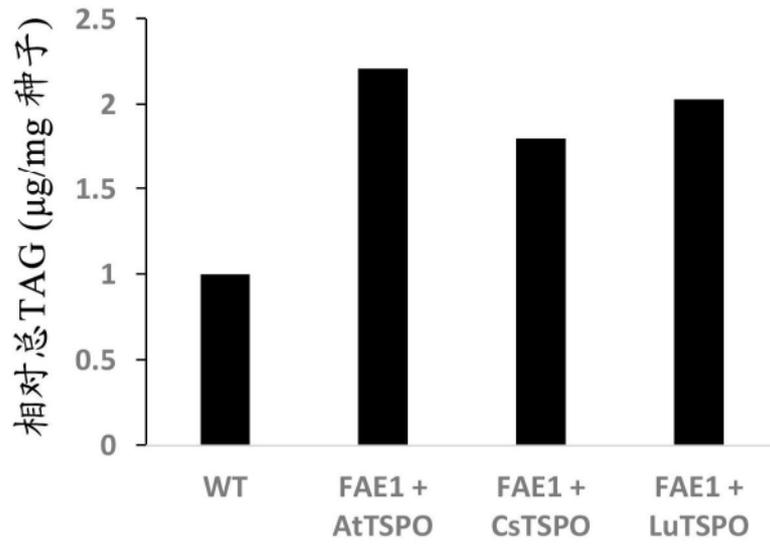


图5