



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107338231 B

(45)授权公告日 2020.04.28

(21)申请号 201610286089.1

(22)申请日 2016.05.03

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107338231 A

(43)申请公布日 2017.11.10

(73)专利权人 中国科学院遗传与发育生物学研究所

地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院2号

(72)发明人 高彩霞 颜彦 陈坤玲

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 张立娜

(51)Int.Cl.

C12N 9/12(2006.01)

C12N 15/54(2006.01)

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/00(2018.01)

A01H 6/46(2018.01)

(56)对比文件

CN 105037521 A,2015.11.11,

Shan Q等.Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system.《Nat Biotechnol》.2013,第31卷(第8期),

Shan Q等.Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system.《Nature protocols》.2014,第9卷(第10期),第2395-2410页.

李坤等.MAPK 级联途径参与 ABA 信号转导调节的植物生长发育过程.《植物科学学报》.2014,第32卷(第5期),

Jai S. Rohila等.Rice Mitogen-activated Protein Kinase Gene Family and Its Role in Biotic and Abiotic Stress Response.《Journal of Integrative Plant Biology》.2007,第49卷(第6期),

审查员 储巧玲

权利要求书1页 说明书11页
序列表14页 附图2页

(54)发明名称

OsMPK21-1蛋白及其编码基因在调控植物抗旱性中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种OsMPK21-1蛋白及其编码基因在调控植物抗旱性中的应用。本发明所提供的应用具体为OsMPK21-1蛋白或其相关生物材料在如下a)或b)中的应用:a)调控植物抗旱性;b)选育抗旱性提高或降低的植物品种;所述OsMPK21-1蛋白为如下a1)或a2)所示的蛋白质:a1)由序列3所示的氨基酸序列组成的蛋白质;a2)在序列3所示的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基得到的与植物抗旱相关的由a1)衍生的蛋白质。OsMPK21-1或与OsMPK21-1相关的生物材料可用于调控植物的抗旱,对于培育抗旱植物特别是水稻新品种具有重要意义。

1. 培育抗旱性提高的转基因植物的方法,包括如下步骤:抑制受体植物中OsMPK21-1蛋白的表达或降低受体植物中OsMPK21-1蛋白的活性,得到转基因植物;所述转基因植物与所述受体植物相比抗旱性提高;

所述OsMPK21-1蛋白为由序列表中序列3所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

所述植物为单子叶植物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述抑制受体植物中OsMPK21-1蛋白的表达通过如下实现:采用针对编码所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列的基因编辑工具对所述受体植物中的所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列进行基因编辑,使得所述受体植物中的所述OsMPK21-1蛋白的表达受到抑制;

所述基因编辑工具为序列特异核酸酶,所述序列特异核酸酶能够特异性剪切所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列中的靶标片段。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述序列特异核酸酶为转录激活因子样效应因子核酸酶、锌指核酸酶或CRISPR/Cas9核酸酶。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于:所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列为序列表中序列1。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于:所述序列特异核酸酶为转录激活因子样效应因子核酸酶,所述转录激活因子样效应因子核酸酶对所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列的两个作用靶点分别为:序列表中序列1的第208-224位,以及序列表中序列1的第243-260位。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述单子叶植物为禾本科植物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述禾本科植物为水稻。

OsMPK21-1蛋白及其编码基因在调控植物抗旱性中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程领域,涉及一种OsMPK21-1蛋白及其编码基因在调控植物抗旱性中的应用。

背景技术

[0002] 丝裂原蛋白激酶级联(Mitogen activated protein kinase cascades,MAPK cascades)是真核生物中保守的信号通路。MAPK级联包括三个层级的蛋白激酶,细胞膜表面的受体蛋白接受信号之后以直接或间接的方式激活MAP kinase kinase kinase (MAPKKK/MAP3K),依次磷酸化下游特定的MAPK kinase (MAPKK/MKK),之后MKK磷酸化并激活MAP kinase (MAPK/MPK)。激活的MPK会磷酸化细胞质或细胞核中不同的底物蛋白,这些底物蛋白包括其它蛋白激酶、各种催化酶、转录因子和结构蛋白等,将细胞外信号转导到细胞内,并引发细胞的响应。MAPK参与了植物的干旱胁迫响应(Smekalova et al.,2014)。干旱是陆生植物面临的常见的非生物胁迫类型,干旱胁迫会增加植物磷脂酶D(phospholipase D,PLD)介导的磷脂酸(PA)和活性氧(Reactive oxygen species,ROS)的产生。ROS参与植物气孔开闭的调节,气孔关闭可以减少植物的蒸腾失水(Zhao et al.,2013)。MPK9和MPK12在气孔细胞表达,干旱诱导的气孔运动主要是由MPK9和MPK12调控(Jammes et al.,2009)。植物受到干旱胁迫通常会导致由WRKY和b-Zip类转录因子介导的抗逆的基因表达谱的变化。MAPK参与了不同物种的干旱胁迫响应,同时MAPK级联还参与了抗逆相关的WRKY和b-Zip类转录因子激活(Shen et al.,2012)。MPK6是另外一个被干旱激活的MAPK,与MPK9和MPK12不同,ROS和PA的产生和积累激活MPK6。拟南芥MKK4-OE株系较野生型保水能力强(Kim et al.,2011)。

[0003] 关于MAPK级联在水稻干旱胁迫响应的研究报道较少。研究发现干旱处理会激活水稻OsMPK4/3/7/14/20-4/20-5等成员(Shen et al.,2012)。另外,水稻Raf类MAPKKK突变体Drought supersensitive mutant 1(dsm1)对于干旱处理超敏感,株系突变体苗期和成株期失水速率较野生型快,而且DSM1-RNAi转基因植株也表现出干旱敏感的表型。dsm1突变体中过氧化物酶基因(POX22.3和POX8.1)表达量显著降低,表明dsm1清除ROS能力降低,对于干旱诱导造成的氧化胁迫的敏感(Ning et al.,2010)。

[0004] 水稻是世界上近半数的人口的主食。随着全球人口的不断增加和耕地面积的减少,以及各种极端环境的出现,使得粮食安全面临巨大挑战。而我国干旱半干旱地区面积巨大,因此利用最新的生物学研究工具筛选、鉴定参与抗旱的植物基因意义重大。研究和培育高产、优质、抗逆水稻品种对我国粮食安全具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种OsMPK21-1蛋白及其编码基因在调控植物抗旱性中的应用。

[0006] 本发明所提供的应用具体为如下A或B:

- [0007] A. OsMPK21-1蛋白在如下(a)或(b)中的应用:
- [0008] (a) 调控植物抗旱性;
- [0009] (b) 选育抗旱性提高或降低的植物品种;
- [0010] 所述OsMPK21-1蛋白为如下a1)或a2)所示的蛋白质:
- [0011] a1) 由序列表中序列3所示的氨基酸序列组成的蛋白质;
- [0012] a2) 在序列表中序列3所示的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基得到的与植物抗旱相关的由a1)衍生的蛋白质。
- [0013] B. OsMPK21-1蛋白相关生物材料在如下(a)或(b)中的应用:
- [0014] (a) 调控植物抗旱性;
- [0015] (b) 选育抗旱性提高或降低的植物品种;
- [0016] 所述OsMPK21-1蛋白为如下a1)或a2)所示的蛋白质:
- [0017] a1) 由序列表中序列3所示的氨基酸序列组成的蛋白质;
- [0018] a2) 在序列表中序列3所示的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基得到的与植物抗旱相关的由a1)衍生的蛋白质;
- [0019] 所述OsMPK21-1蛋白相关生物材料,为如下b1)-b5)中任一:
- [0020] b1) 编码所述OsMPK21-1蛋白的核酸分子;
- [0021] b2) 含有步骤b1)所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系;
- [0022] b3) 针对编码所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列的基因编辑工具;
- [0023] 所述基因编辑工具为序列特异核酸酶,所述序列特异核酸酶能够特异性剪切所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列中的靶标片段;所述序列特异核酸酶为转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases,TALEN)、锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases,ZFN)或CRISPR/Cas9核酸酶;
- [0024] b4) 编码所述基因编辑工具的核酸分子;
- [0025] b5) 含有步骤b4)所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组微生物或转基因细胞系。
- [0026] 其中,所述“编码所述OsMPK21-1蛋白的核酸分子”为编码所述OsMPK21-1蛋白的DNA分子或RNA分子;所述DNA分子具体可为如下1)至5)中任一所述的DNA分子;所述RNA分子可为如下1)至5)中任一所述的DNA分子转录所得的RNA分子:
- [0027] 1) 序列表中序列1所示的DNA分子;
- [0028] 2) 序列表中序列2所示的DNA分子;
- [0029] 3) 在严格条件下与1)或2)所限定的DNA分子杂交且编码所述OsMPK21-1蛋白的DNA分子;
- [0030] 4) 与1)-3)任一限定的DNA分子具有90%以上同一性且编码所述OsMPK21-1蛋白的DNA分子。
- [0031] 所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列具体为序列表中序列1。
- [0032] 所述“编码所述基因编辑工具的核酸分子”既可为编码所述基因编辑工具(所述核酸酶)的DNA分子,也可为编码所述基因编辑工具(所述核酸酶)的RNA分子。
- [0033] 在所述应用中,所述“调控植物抗旱性”体现为:所述OsMPK21-1蛋白的表达量越低和/或活性越弱,所述植物的抗旱性越强;所述OsMPK21-1蛋白的表达量越高和/或活性越强,所述植物的抗旱性越弱。当选育抗旱性提高的植物品种时,可将所述OsMPK21-1蛋白的

表达量较低和/或活性较弱的植物品种作为亲本进行杂交;当选育抗旱性降低的植物品种时,可将所述OsMPK21-1蛋白的表达量较高和/或活性较强的植物品种作为亲本进行杂交。

[0034] 本发明还请求保护一种培育转基因植物的方法。

[0035] 本发明所提供的培育转基因植物的方法,可为如下(A)或(B):

[0036] (A) 培育抗旱性提高的转基因植物的方法,具体可包括如下步骤:抑制受体植物中OsMPK21-1蛋白的表达或降低受体植物中OsMPK21-1蛋白的活性,得到转基因植物;所述转基因植物与所述受体植物相比抗旱性提高;

[0037] (B) 培育抗旱性降低的转基因植物的方法,具体可包括如下步骤:促进受体植物中OsMPK21-1蛋白的表达或提高受体植物中OsMPK21-1蛋白的活性,得到转基因植物;所述转基因植物与所述受体植物相比抗旱性降低;

[0038] 所述OsMPK21-1蛋白为如下(a)或(b)所示的蛋白质:

[0039] (a) 由序列表中序列3所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0040] (b) 在序列表中序列3所示的氨基酸序列中经过取代和/或缺失和/或添加一个或几个氨基酸残基得到的与植物抗旱相关的由(a)衍生的蛋白质。

[0041] 在所述(A)中,可采用任何基因沉默相关技术抑制所述受体植物中OsMPK21-1蛋白的表达。如采用针对编码所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列的基因编辑工具对所述受体植物中的所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列进行基因编辑,使得所述受体植物中的所述OsMPK21-1蛋白的表达受到抑制;所述基因编辑工具为序列特异核酸酶,所述序列特异核酸酶能够特异性剪切所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列中的靶标片段;所述序列特异核酸酶为转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases,TALEN)、锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases,ZFN)或CRISPR/Cas9核酸酶。

[0042] 所述序列特异核酸酶对所述靶标片段进行特异性剪切会造成所述靶标片段发生插入突变、缺失突变和/或替换突变,从而使得所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列发生能够抑制所述OsMPK21-1蛋白表达的突变。其中,所述靶标片段可位于所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列的如下区域中的至少一种:增强子区、启动子区、外显子区、内含子区、终止子区。

[0043] 当所述序列特异核酸酶为转录激活因子样效应因子核酸酶或锌指核酸酶时,对所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列进行基因编辑,是通过如下实现的:向所述受体植物的细胞或组织中导入表达转录激活因子样效应因子核酸酶或锌指核酸酶的遗传物质,或者直接导入转录激活因子样效应因子核酸酶或锌指核酸酶,再将导入后的细胞或组织培养成完整植株。当所述序列特异核酸酶为CRISPR/Cas9核酸酶时,对所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列进行基因编辑,是通过如下实现的:向所述受体植物的细胞或组织中导入表达CRISPR/Cas9核酸酶的遗传物质或者直接导入Cas9蛋白,与向导RNA一起转化,经过细胞或组织培养成完整植株。所述遗传物质可为DNA质粒或DNA线性片段或体外转录的RNA;即根据所述核酸酶种类的不同,所述遗传物质可为能表达转录激活因子样效应因子核酸酶、锌指核酸酶、Cas9蛋白、向导RNA、tracrRNA、crRNA的DNA质粒或DNA线性片段或体外转录的RNA。所述细胞为任何能作为导入受体并能经过组织培养再生为完整植株的细胞(如原生质体细胞或悬浮细胞等);所述组织为任何能作为导入受体并能经过组织培养再生为完整植株的组织(如愈伤组织、幼胚、成熟胚、叶片、茎尖,幼穗或下胚轴等)。所述导入的方法可为基因

枪法、农杆菌侵染法、PEG诱导原生质体法、电极法、碳化硅纤维介导法、真空渗入法或其他任何导入方法。

[0044] 其中,所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列具体为序列表中序列1。

[0045] 在本发明的一个实施例中,所述序列特异核酸酶具体为转录激活因子样效应因子核酸酶,所述转录激活因子样效应因子核酸酶对所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列的两个作用靶点分别为:序列表中序列1的第208-224位,以及序列表中序列1的第243-260位。

[0046] 进一步,组成所述类转录激活因子效应物核酸酶的两个TALEN蛋白的氨基酸序列分别如序列表6的第3-950位和第995-1972位。

[0047] 在所述(B)中,所述促进受体植物中OsMPK21-1蛋白的表达可通过如下实现:向所述受体植物中导入编码所述OsMPK21-1蛋白的核酸分子,从而促进所述受体植物中所述OsMPK21-1蛋白的表达。

[0048] 其中,所述“编码所述OsMPK21-1蛋白的核酸分子”可为编码所述OsMPK21-1蛋白的DNA分子或RNA分子;所述DNA分子具体可为如下1)至5)中任一所述的DNA分子;所述RNA分子具体可为如下1)至5)中任一所述的DNA分子转录所得的RNA分子:

[0049] 1) 序列表中序列1所示的DNA分子;

[0050] 2) 序列表中序列2所示的DNA分子;

[0051] 3) 在严格条件下与1)或2)所限定的DNA分子杂交且编码所述OsMPK21-1蛋白的DNA分子;

[0052] 4) 与1)-3)任一限定的DNA分子具有90%以上同一性且编码所述OsMPK21-1蛋白的DNA分子。

[0053] 当所述“编码所述OsMPK21-1蛋白的核酸分子”为DNA分子时,可先进行如下修饰,再导入所述受体植物中,以达到更好的表达效果:

[0054] (1) 根据实际需要进行修饰和优化,以使基因高效表达;例如,可根据所述受体植物所偏爱的密码子,在保持本发明所述OsMPK21-1蛋白的氨基酸序列不改变的同时改变其密码子以符合植物偏爱性;优化过程中,最好能使优化后的编码序列中保持一定的GC含量,以最好地实现植物中导入基因的高水平表达,其中GC含量可为35%、多于45%、多于50%或多于约60%;

[0055] (2) 修饰邻近起始甲硫氨酸的基因序列,以使翻译有效起始;例如,利用在植物中已知的有效的序列进行修饰;

[0056] (3) 与各种植物表达的启动子连接,以利于其在所述受体植物中的表达;所述启动子可包括组成型、诱导型、时序调节、发育调节、化学调节、组织优选和组织特异性启动子;启动子的选择将随着表达时间和空间需要而变化,而且也取决于靶物种;例如组织或器官的特异表达启动子,根据需要受体在发育的什么时期而定;尽管证明了来源于双子叶植物的许多启动子在单子叶植物中是可起作用的,反之亦然,但是理想地,选择双子叶植物启动子用于双子叶植物中的表达,单子叶植物的启动子用于单子叶植物中的表达;

[0057] (4) 与适合的转录终止子连接,也可以提高本发明基因的表达效率,任何已知在植物中起作用的可得到的终止子都可以与本发明基因进行连接;

[0058] (5) 引入增强子序列,如内含子序列(例如来源于Adh1和bronze1)和病毒前导序列(例如来源于TMV, MCMV和AMV)。

[0059] 在本发明中,所述“同一性”指与天然核酸序列的序列相似性。“同一性”可以直接观察或采用计算机软件进行评价。使用计算机软件,两个或多个序列之间的同一性可以用百分比(%)表示,其可以用来评价相关序列之间的同一性。

[0060] 在本发明中,所述“转基因植物”理解为不仅包含将相关遗传物质或非遗传物质转化到所述受体植物中后得到的第一代转基因植物及其无性系,也包括其子代及其无性系。对于所述转基因植物,可以在该物种中繁殖该基因,也可用常规育种技术将该基因转移进入相同物种的其它品种,特别包括商业品种中。所述转基因植物可为种子、愈伤组织、完整植株或细胞。

[0061] 在上述应用或方法中,所述植物既可以为单子叶植物,也可以为双子叶植物。

[0062] 在本发明的一个实施例中,所述植物为单子叶植物中的禾本科植物,具体为水稻(具体如水稻品种日本晴)。

[0063] 本发明的实验证明,向日本晴水稻中导入针对所述OsMPK21-1蛋白的基因组DNA序列的基因编辑工具(TALEN核酸酶)的编码基因得到的OsMPK21-1突变体转基因水稻(OsMPK21-1基因发生突变,改变了OsMPK21-1基因的阅读框,使其失去功能),突变体表现出抗旱胁迫表型,说明OsMPK21-1或与OsMPK21-1相关的生物材料可用于调控植物的抗旱,对于培育抗旱植物特别是水稻新品种具有重要意义。

附图说明

[0064] 图1为pGW3-T-OsMPK21-1在水稻原生质体的活性检测。其中,Marker中各条带由大到小依次为1000bp、750bp、500bp、250bp和100bp。

[0065] 图2为T0代OsMPK21-1基因的TALEN敲除纯合突变体基因型。

[0066] 图3为T2代OsMPK21-1纯合突变体在干旱处理5天时的抗旱表型。

[0067] 图4为T2代OsMPK21-1纯合突变体在田间正常种植灌溉条件下的表型。其中,A为野生水稻(WT);B为T2代OsMPK21-1纯合突变体。

具体实施方式

[0068] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0069] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0070] 农杆菌菌株AGL1(Agrobacterium strain AGL1):文献:Hellens,R.,Mullineaux,P.,and Klee,H.(2000).Technical Focus:Aguide to Agrobacterium binary Tivectors.Trends in Plant Science 5:446-451.公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。

[0071] 水稻日本晴(Oryza sativa L.ssp.japonica cv.Nipponbare):文献:StephenA.Goff et al.A Draft Sequence of the Rice Genome(Oryza sativa L.ssp.japonica).Science.2002,(296):92,公众可从中国科学院遗传与发育生物学研究所获得。

[0072] 实施例1、OsMPK21-1的生物信息学分析

[0073] OsMPK21-1是水稻OsMPK家族中的E组成员,该基因位于第5号染色体上。其在日本水稻注释计划Rice Annotation Project Database(RAP-DB)美国水稻基因组注释计划The

MSU Rice Genome Annotation Project Database (RGAP7) 的登录号分别是Os05g0576800和LOC_Os05g50120。OsMPK21-1基因在水稻基因组中的序列如序列表中序列1所示;CDS序列如序列表中序列2所示;编码的OsMPK21-1蛋白的氨基酸序列如序列表中序列3所示。该基因共有11个外显子。本发明在基因的第一外显子上设计了转录激活子样效应因子核酸酶(TALENs)的靶序列。以期对OsMPK21-1基因进行敲除。

[0074] 实施例2、OsMPK21-1靶位点的设计及相关敲除载体的构建

[0075] 在水稻基因组中OsMPK21-1基因的第一外显子处设计一对TALEN,靶位点序列如下:

[0076] 5'-TCGAGGACGCGGGCACgcacctgcccgtgcgcacGGAGCCGCGACGCATGGA-3';其中的小写字母为间隔序列,两侧大写字母为TALEN模块识别序列(分别命名为L-arm和R-arm);下划线为FspI酶切识别序列;其左侧识别模块L-arm的RVD序列为:HD NN NN NI NN NN NI HD NN HD NN NN NN HD NI HD;右侧识别模块R-arm的RVD序列为:HD HD NI NG NN HD NN NG HD NN HD NN NN HD NG HD HD。将识别L-arm的TALEN命名为T-OsMPK21-1-L;识别R-arm模块TALEN命名为T-OsMPK21-1-R,将编码T-OsMPK21-1-L/T-OsMPK21-1-R的DNA片段分别与核酸内切酶FokI的DNA编码片段融合后得到DNA片段T-OsMPK21-1,T-OsMPK21-1-L和T-OsMPK21-1-R构建在同一表达盒中并被18个氨基酸组成T2A连接,可以在表达时断开形成两个蛋白。结合到靶位点处形成FokI二聚体,行使对OsMPK21-1靶位点的编辑。

[0077] DNA片段T-OsMPK21-1的序列如序列4所示,其中7-2850位编码L-arm的编辑蛋白T-OsMPK21-1-L:7-27位编码核定位信号NLS;第463-2052位编码L-arm的TALEN识别模块蛋白;第2248-2850位编码核酸内切酶FokI(603bp);第2851-2904位编码由18个氨基酸残基组成的T2A序列;序列4中2983-5916位编码R-arm的编辑蛋白T-OsMPK21-1-R,第2983-3003位编码核定位信号NLS;3439-5130位编码R-arm的TALEN识别模块蛋白;第5326-5916位编码FokI核酸内切酶(591bp)。

[0078] 将序列4所示的DNA片段通过Gateway克隆(Invitrogen Gateway LR Clonase II Mix克隆酶)方法插入pGW3载体的玉米ubiquitin启动子下游,获得重组载体pGW3-T-OsMPK11。

[0079] 所述载体pGW3是将载体pMDC32(Arabidopsis Biological Resource Center,网址:<http://abrcosuedu/>,Stock#CD3-738)中HindIII和Acc65I位点间的35S启动子替换为序列列表序列5的第7-1993位所示的玉米ubiquitin启动子(Shan,Q.,Wang,Y.,Chen,K.,Liang,Z.,Li,J.,Zhang,Y.,Zhang,K.,Liu,J.,Voytas,D.F.,Zheng,X.,Zhang,Y.and Gao,C.(2013)Rapid and efficient gene modification in rice and Brachypodium using TALENs.Mol.Plant 6,1365-1368.)后得到的重组质粒。

[0080] 实施例3、OsMPK21-1靶位点TALEN的活性筛选

[0081] 将实施例2构建完成的重组载体pGW3-T-OsMPK21-1大量提取之后通过PEG介导的方式转入水稻品种日本晴的原生质体,25℃避光培养48小时,然后提取原生质体的基因组DNA,用特异引物通过PCR扩增包含靶位点的OsMPK21-1基因,然后将含有靶位点OsMPK21-1的PCR扩增产物用FspI酶切(如果PCR扩增产物有部分条带不能被切开,说明实施例1中设计的靶位点有活性),将不能被限制性内切酶FspI切开的PCR扩增产物进行测序。

[0082] 用于扩增含有靶位点OsMPK21-1的引物序列如下:上游引物OsMPK21-1-iden-F:

CTCCATCCTACGCTGGCTCCGTC (序列1的第18-40位);下游引物0sMPK21-1-iden-R: ATGTAAGCATGTGAATGAACATGCC (序列1的第449-523位的反向互补序列)。

[0083] 原生质体中检测重组载体活性的酶切结果见图1,泳道1为野生型对照PCR产物未经FspI酶切(大小约为506bp);泳道2为转化后的原生质体,其中含有不能被FspI切开的PCR条带(大小约为506bp,与预期一致),同时也含有能被EcoRV切开的两个PCR条带(大小分别约为221bp和285bp,与预期一致),说明靶位点T-0sMPK21-1有活性。将泳道2中未被酶切开的条带切胶回收后测序,结果表明靶位点处产生了少量碱基的插入与缺失,证实重组载体pGW3-T-0sMPK21-1在靶位点处进行了基因定点编辑。

[0084] 将重组载体pGW3-T-0sMPK21-1热击转化农杆菌菌株AGL1,获得含有重组载体pGW3-T-0sMPK21-1的重组农杆菌,命名AGL1/pGW3-T-0sMPK21-1;同时将空载体pGW3热击转化农杆菌菌株AGL1,获得含有重组载体pGW3的重组农杆菌,命名为AGL1/pGW3。

[0085] 实施例4、定点敲除水稻基因组中的0sMPK21-1基因

[0086] 一、农杆菌介导法转基因水稻的构建

[0087] 用实施例3中获得的重组农杆菌AGL1/pGW3-T-0sMPK21-1和AGL1/pGW3分别侵染水稻品种日本晴(*Oryza sativa* L.ssp.japonica cv.Nipponbare)成熟胚诱导的愈伤组织,将获得抗性愈伤组织分别命名为抗性愈伤T-0sMPK21-1和抗性愈伤CK1。

[0088] 其中,重组农杆菌侵染愈伤组织的具体方法如下:

[0089] (1)将25%次氯酸钠消毒后的日本晴水稻种子接种于愈伤组织诱导培养基上,28℃黑暗培养7天,去除芽和残留胚乳后再置于愈伤组织继代培养基上继代培养4-6周,得到成熟胚愈伤组织。

[0090] (2)将重组农杆菌接种于YEB液体培养基(含50μg/ml卡那霉素和25μg/ml利福平)中,28℃振荡培养至OD₆₀₀为1.0-1.5;以10000rpm室温离心1min,用AAM液体培养基(其中,葡萄糖浓度为100g/L,乙酰丁香酮浓度为100μM,pH 5.2)重悬菌体并稀释至OD₆₀₀为0.1,得到菌悬液。

[0091] (3)将步骤(1)得到的成熟胚愈伤组织浸于步骤(2)得到的菌悬液中25-30min后,于含有两层滤纸的共培养培养基上,25℃黑暗下共培养3天。

[0092] (4)将经过步骤(3)共培养的愈伤组织接种于筛选培养基中28℃黑暗下筛选培养2周,转入新配置的筛选培养基中进行再次筛选培养,获得存活的淡黄色抗性愈伤组织。

[0093] (5)从经两轮筛选后长出的抗性愈伤组织中,挑选乳黄色致密的抗性愈伤组织转至含有50mg/L潮霉素的分化培养基上,先暗培养3天,然后转至15h/d光照条件下培养,一般经过15-25天左右,有绿点出现。30-40天后进一步分化出小苗。

[0094] (6)当抗性愈伤组织分化的芽长至约2cm时,将小苗移到生根培养基上,培养两周左右。选择高约10cm、根系发达的小苗,洗去培养基,移栽至田间,得到分别转入pGW3-T-0sMPK21-1和pGW3的T0代转基因植物。

[0095] 其中,所用的培养基如下:

[0096] 1、培养基母液配方:

[0097] 1) 20×N₆培养基母液:

| | | |
|--------|---|--------------------------------------|
| | KNO ₃ | 56.6g |
| | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 3.32g (相当于 CaCl ₂ 2.506g) |
| [0098] | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 2.70g |
| | KH ₂ PO ₄ | 8.0g |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 9.26g |

[0099] 注:配制时按表中所列顺序逐一添加。

[0100] 2) 100×B₅微量母液(每升含量):

| | | |
|--------|-------------------------------------|---------|
| | KI | 0.0750g |
| [0101] | H ₃ BO ₃ | 0.30g |
| | MnSO ₄ ·H ₂ O | 1.0g |

| | | |
|--------|---|---------|
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.2g |
| [0102] | Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.025g |
| | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.0025g |
| | CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.0025g |

[0103] 3) B₅有机母液:

| | | |
|--------|--------------------------|----------|
| | 烟酸 (Nicotinic acid) | 1mg/ml |
| [0104] | 盐酸吡哆醇 (VB ₆) | 1mg/ml |
| | 盐酸硫胺素 (VB ₁) | 10 mg/ml |
| | 肌醇 (myo-Inositol) | 10 mg/ml |

[0105] 4) 100×铁盐

| | | |
|--------|--|-------|
| | FeSO ₄ ·7H ₂ O | 2.78g |
| [0106] | Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 3.73g |

[0107] 注:配制顺序如下:

[0108] ①称取2.78g FeSO₄·7H₂O溶解于200ml去离子水中(A)。

[0109] ②称取3.73g Na₂EDTA·2H₂O溶解于200ml去离子水中(B)。

[0110] ③将B置于70℃水浴锅中直至溶质完全溶解(C)。

[0111] ④将A倒入C中混合,置于70℃水浴锅中保温2h。

[0112] ⑤定容至1L。

[0113] 5) AA大量元素母液(每升含量):

| | | |
|--------|---|-------|
| | KCl | 2.95g |
| [0114] | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 0.15g |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.25g |
| | NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 0.15g |

[0115] 2、培养基配方

[0116] 1) 愈伤组织诱导培养基(每升含量):

| | | | | | | |
|--------|----------|------|--------|------|-----------|------|
| | N6 大量元素: | 50ml | B5 微量: | 10ml | 铁盐: | 10ml |
| | 烟酸: | 1 ml | 盐酸吡哆醇: | 1 ml | 盐酸硫胺素: | 1 ml |
| [0117] | 肌醇: | 10ml | L-pro: | 2.8g | 蔗糖: | 30g |
| | CH: | 0.3g | 2,4-D: | 8ml | Phytigel: | 4.0g |
| | pH 值: | 5.8 | | | | |

[0118] (CH:Casein Hydrolysate,水解酪蛋白)

[0119] 2) 愈伤组织继代培养基(每升含量):

| | | | | | | |
|--------|-----------|------|--------|-------|--------|------|
| | N6 大量元素: | 50ml | B5 微量: | 10ml | 铁盐: | 10ml |
| | 烟酸: | 1 ml | 盐酸吡哆醇: | 1 ml | 盐酸硫胺素: | 1 ml |
| [0120] | 肌醇: | 10ml | L-Glu: | 0.5 g | L-pro: | 2.8g |
| | CH: | 0.3g | 2,4-D: | 8ml | 蔗糖: | 30g |
| | Phytigel: | 4.0g | pH 值: | 5.8 | | |

[0121] 3) 共培养培养基(每升含量):

| | | | | | | |
|--------|-----------------------|------|-----------|------|-----------|------|
| | N6 大量元素: | 50ml | B5 微量: | 10ml | 铁盐: | 10ml |
| | 烟酸: | 1 ml | 盐酸吡哆醇: | 1 ml | 盐酸硫胺素: | 1 ml |
| [0122] | 肌醇: | 2 g | MES: | 3.9g | 蔗糖 | 30g |
| | CH: | 0.5g | Phytigel: | 4.0g | | |
| | 55°C时加 As 至终浓度为 200μM | | | | pH 值: 5.5 | |

[0123] 4) 筛选培养基(每升含量):

| | | | | | | |
|--------|-----------|------|--------|-------|---------|-------|
| [0124] | N6 大量元素: | 50ml | B5 微量: | 10ml | 铁 盐: | 10ml |
| | 烟 酸: | 1 ml | 盐酸吡哆醇: | 1 ml | 盐酸硫胺素: | 1 ml |
| | 肌 醇: | 10ml | L-Glu: | 0.5 g | L-pro: | 0.5 g |
| | CH: | 0.3g | 2,4-D: | 8ml | 麦芽糖/蔗糖: | 30g |
| | Phytigel: | 4.0g | pH 值: | 5.8 | | |

灭菌后(55℃)再加:

| | | |
|--------|-------------|----------|
| 第一轮筛选: | Car (羧苄青霉素) | 250 mg/L |
| | Hgy (潮霉素) | 50 mg/L |
| 第二轮筛选: | Car (羧苄青霉素) | 250 mg/L |
| | Hgy (潮霉素) | 80 mg/L |

[0125] 5) 分化培养基配方 (每升含量):

| | | | | | | |
|-----------|----------|------|--------|-------|--------|--------|
| [0126] | N6 大量元素: | 50ml | B5 微量: | 10ml | 铁 盐: | 10ml |
| | 烟 酸: | 1 ml | 盐酸吡哆醇: | 1 ml | 盐酸硫胺素: | 1 ml |
| | 肌 醇: | 10ml | L-Glu: | 0.5 g | L-pro: | 0.5 g |
| | CH: | 0.3g | 6-BA: | 3 ml | NAA: | 0.5 ml |
| | 蔗 糖: | 30g | Agar: | 8 g | | |
| pH 值: 5.8 | | | | | | |

[0127] 6) 生根培养基配方 (每升含量):

| | | | | | | | |
|--------|----------|-------|--------|--------|--------|--------|-----|
| [0128] | N6 大量元素: | 25ml | B5 微量: | 5ml | 铁盐: | 5ml | |
| | 烟 酸: | 0.5ml | 盐酸吡哆醇: | 0.5 ml | 盐酸硫胺素: | 0.5 ml | |
| [0129] | 肌 醇: | 5ml | 蔗 糖: | 20g | Agar: | 8.0g | |
| | | | | | | pH | 5.8 |

[0130] 7) 悬浮农杆菌感染愈伤组织团的培养基配方 (AAM) 每升含量:

| | | | | | | |
|--------|----------|-------|--------|-------|--------|------|
| [0131] | AA 大量元素: | 100ml | B5 微量: | 10ml | 铁 盐: | 10ml |
| | 烟 酸: | 1 ml | 盐酸吡哆醇: | 1 ml | 盐酸硫胺素: | 1 ml |
| | 肌 醇: | 10ml | MES: | 3.9 g | CH: | 0.5g |
| | 麦芽糖: | 30g | | | pH 值: | 5.5 |

55℃时加 As 至终浓度为 200μM

[0132] 二、TALENs 诱导的转基因 T0 代植物突变筛选

[0133] 1、在步骤一获得 T0 代转基因植物之后, 利用 PCR/RE 对所有获得的转基因植物进行

突变筛选。涉及到引物为实施例3中描述,涉及的内切酶和检测标准在实施例3中描述。

[0134] 结果显示:经PCR/RE检测后,T0代共获得84株转入重组载体pGW3-T-0sMPK21-1的转基因植株。其中共有13株植物中0sMPK21-1基因TALEN结合位点处有突变;13株突变体中有4株为纯合突变体带型,9株为杂合突变体带型,突变效率为15.5% (携带突变的植株数目/T0代获得的转基因植物总数)。

[0135] 2.0sMPK21-1突变体基因型测序确定

[0136] 将上述T0代植物中的PCR/RE筛选出的转入重组载体pGW3-T-0sMPK21-1的突变体植株的PCR产物连接pEasyblunt克隆载体(TransGen Biotech)。转化大肠杆菌后37℃培养过夜,在蓝白斑筛选培养基上挑取白色单克隆测序,确定各株系基因型。选取其中移码突变株系(记为转入0sMPK21-1-T0-11、0sMPK21-1-T0-15和0sMPK21-1-T0-16突变体植株)进行后续试验。

[0137] 对其中3个T0代0sMPK21-1TALEN位点纯合突变体植株(T0-11、T0-16和T0-15)的测序结果见图2,其中T0-11在设计的靶位点处含有29bp的碱基删除;T0-15在设计的靶位点处含有1bp碱基的插入;T0-16在设计的靶位点处含有76bp碱基的删除。这些突变都最终改变0sMPK21-1基因的阅读框,使其失去功能,获得osmpk21-1纯合突变体。

[0138] 实施例5、水稻基因0sMPK21-1敲除突变体的抗干旱胁迫表型

[0139] 将实施例4获得的T0代0sMPK21-1TALEN位点纯合突变体植株(T0-11、T0-16和T0-15)自交种子鉴定纯合突变体,获得T2代0sMPK21-1纯合突变体,对T2代0sMPK21-1纯合突变体进行干旱处理。具体如下:

[0140] 首先将种子在75%乙醇中洗涤1min,然后将种子转移到25%次氯酸钠溶液中置于旋转摇床上消毒30min;然后将种子用无菌水洗5遍后置于37℃催芽48小时。催芽两天后,将萌芽的种子置于水培皿中培养10天。将10天的幼苗转移至无菌土中,每3天浇水一次,期间浇1/2MS营养液三次,培养30天。在第30天时,水饱和之后断水干旱处理,干旱处理5天左右拍照记录表型。处理7天之后复水,复水5天后统计存活率。

[0141] 实验同时设置未转基因的日本晴水稻为野生型对照,同时以转入pGW3空载体的转基因水稻作为空载体对照。

[0142] 实验设置3次重复,定量结果取均值。每次重复中保证供试的各水稻材料均不少于30株。

[0143] 结果显示,在干旱处理过程中野生型水稻和空载体对照水稻失水速率比T2代0sMPK21-1纯合突变体水稻要快。干旱处理5天时T2代0sMPK21-1纯合突变体水稻和野生型水稻的表型见图3。而0sMPK21-1纯合突变体在正常栽培条件下与野生水稻无明显表型差异(图4)。各水稻干旱处理7天后复水5天时统计的存活率情况如表1所示,可见与野生水稻相比,T2代0sMPK21-1纯合突变体水稻的存活率显著提高($P < 0.05$)。另外,空载体对照水稻的存活率与野生水稻的存活率基本一致,无统计学差异。

[0144] 表1 0sMPK21-1纯合突变体水稻和野生水稻在干旱处理7天后复水5天时的存活率

[0145]

| | 重复1 | 重复2 | 重复3 | 均值(%) |
|----------------|------|------|------|-------|
| 0sMPK21-1纯合突变体 | 63.3 | 76.7 | 73.3 | 71.1 |
| 野生水稻 | 53.3 | 63.3 | 60 | 58.9 |

[0146] 以上结果表明:与野生水稻相比,osmpk21-1纯合突变体水稻表现出抗干旱胁迫表型。

- <110> 中国科学院遗传与发育生物学研究所
- <120> OsMPK21-1 蛋白及其编码基因在调控植物抗旱性中的应用
- <130> GNCLN160749
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5

- <210> 1
- <211> 5086
- <212> DNA
- <213> 水稻 (*Oryza sativa* L.)
- <400> 1

[0001]

```

atggggcgcc gcgcccctc catcctacgc tggctccgtc accaccgctc ccgcccgctc      60
tctctctctt ctttccatct gaccaccacc ggtgacgaca ccgtcaagga tctccacgac      120
ccgcgccgag aggacgcgga gggcgacggg tgggaggagg tccacgaggg ccccagatcc      180
gaccccgagg agtacattgc gttgggtgctg gaggacgcgg gcacgcacct gccggtgctc      240
acggagccgc gacgcatgga tccgagcaag aaggtgggga tggccttctc ttctcttctc      300
ccctgaatgc ttttcttga ttcttgggt ttcttggatt cctctgaact gttatttact      360
agtagtaact gtttactgca tgaatgaatg gtaaagtctc tacatggagt tgcgatctct      420
gtttcatgag attgcgttgt tgccggttag tgtggatctg gttccatctc tcatttgaac      480
gatacgtttg caatccatgg catgttcatt cacatgctta cataagccaa cgcgcggaat      540
cattgctgat gtgatgctga tatagtactt acatgagtgc tgtcaattca ggaatccaag      600
ataaccgagt atgtcaattc aggataacta agtatgaate caagataacc aagtatgcca      660
attcaggaac cttttattcc agataaagggt agagctttac ggaaactaaa ggcataattc      720
tgcgggcagt agttcatatt ggaaaatggg gcctactgct tttcttgctt ctgtctcgtt      780
tgggaaaaaac caaaattcag taacagctgc ttttattttg acttttcaca atgtacagat      840
ttattttctg tctttcagaa aaaaaaaggg gggggggggg ggggggaagg gcgtacagat      900
aaggtttctc actgtacttg gaagaatcag attgcaaaat ttattgatgc tcggtcacta      960
tetaatttac atatctaatg caatctaaat ctgcatgtct ttagtacatt ttacagtagt      1020
cctaattgcc ttgaagtccc ttttcttctc tgttgcacat cacattgttt gtacccgggt      1080
gttttcaagg cacaaggttt cgttcccaag aaatatgtca tcaaccggtt cataccact      1140
agcattcagt actgttacta tagtgaactt taccctcttc cattccagga acctgacttc      1200
ttcactgaat atggtgaagc aaaccggtat aaagtcagtg aagtcattgg caaaggagat      1260
tatggtgttg tggctgccgc tgtcgacacc cagaccggcg agcgagtggc gatcaagaag      1320
atcaatgatg ttttcgatca tgtctctgat gccaccgca tccttaggga gattaagttg      1380
ctccggttgc tgcgtcacc agacatagtt gagatcaagc acataatgct tctccttca      1440
aggagggaat tcagggacat ttatgtaate tttgagctaa tggagtcaga tctccatcag      1500
gtaataaaag caaatgatga tctcacacca gagcatcacc agtttttctt gtatcagctg      1560
ctccggggaa tgaagtacat tcatgcaggt agtagattcc atatagtagg aaatcggtaa      1620
ttcttttgc ttatgtggtt gacacgctca ctttctggtt tctctttgca gcaagtgttt      1680
tccatcgggg tcttaagccc aagaatattc tagccaatgc tgattgcaag ctgaaggttt      1740
gcatattcgg ccttgcccga gtgtcattta acgatacccc atcagccata ttctggacgg      1800
ttaggcattt attaagtgtg agaagatatt tcttaacaat gaacagccat atcttggcat      1860
ctaataaatt ttccatgctt cgttctagga ttatgtggca actagatggt atcgtgcccc      1920
agagtgtgtg ggctcctttt tttcaaagggt aagggaattt ccatttaaca tggatgatggc      1980
tatattattt tttcttccaa cattgttata ttactatgat atgtttggat caatgtagca      2040
acagtgtttt gagaatgttc tcttagacat tgtcgcatta ggtgatattc tgattttat      2100

```

| | |
|---|------|
| ttgtcattg gcttttcag tacaccctg caattgatat ttggagtga ggatgtatat | 2160 |
| ttgcagagct gcttacagga aagccactct ttccagggaa aaatgttgtg catcaattgg | 2220 |
| atctcatgac tgatctactt ggcactcctt cagcagaatc ccttgetaag gtatattcaa | 2280 |
| tccttgcaag cttgtgcctt cactcaagtg caatgtattg actcctcact agtctgtgtg | 2340 |
| ttcacttctt tatgcagaat tcttcgcaac tatatttaat atttaagctt ggcatcagcc | 2400 |
| tcgttttcat atttctgtac aaatttcctc caaaatcact aacagtgaat catatagttc | 2460 |
| atatagtatt taatgtactg ttttgagtgg tatattttcc tgagcgactt catattgcat | 2520 |
| tcatagtgca caaggacaga ctctattttc ttccatgtat ttgttgtaaa aaaacgaggt | 2580 |
| gtaaattgta gaaataatgc atattgatgt gctttacatt catttattga atgggttgca | 2640 |
| gatacggaaat gagaaagctc gacgatactt gagcaacatg aggaaaaagc ctccgggttcc | 2700 |
| ttttactaaa aaatttcag gtgtggatcc tatggctctc catttgcttg aacgccttct | 2760 |
| tgcttttgat cccaaagatc gtccaagtgc agaagaggta ggagtgttca cagccaactt | 2820 |
| atgttgattg taaagacatt ccagctttga aatggttgat acattgctat cctgaatact | 2880 |
| gagatatgga attattattc aaggccctga cagaccctta ctttaatggg ctagcaaaact | 2940 |
| ctgaacgcga accaatagca cagcctatct caaagcttga gtttgagtcc gagaagagga | 3000 |
| aattggccaa agatgatgct cgggaattaa tttaccgaga ggtgccactg atgaattctt | 3060 |
| ttgtgaatat tacgacagag ctgccacttg actctttact gtactaatat acttgtaaaa | 3120 |
| tctctttaga ttttagagta tcatcccat atgctgcaag aatatttgcg cgggggagac | 3180 |
| cagatgagtt tcatgtatcc taggtaactc cagtatttct tttacgaagt tgatcacctg | 3240 |
| ttggcatatt ttatggtaac taattcactg ttctgtattg ttgcatccca caaacataaa | 3300 |
| tcaaatatgct gtattaaatt agtgacttat gctaaataat cacacaaaaa aaattgctac | 3360 |
| acgttaggtc aaggacatat tcaagtggta attctgatgt ctgtttatat atgttggatc | 3420 |
| ttgacagtgg ggtggatcgc ttcaagcgtc aattcgtca tttggaggaa ggagtttcaa | 3480 |
| agggtgaaaa atccagtcga cagcttcggc agaatgcttc cttaccaagg taatatacaa | 3540 |
| tcaccctga aatattgtctt tgatatgta gtgagccaga tagcaactgg agacggggac | 3600 |
| tgctaatgcg cgggtgatcg ctgggaccaa tcaccgcac cccctcccc tatacgtccc | 3660 |
| tcttctccc ctctctctc cctttttct ctctcctact acagtacacc acaaaattgt | 3720 |
| ttttaaaaa caaaagttag aaaaattat gtaaagaaat attatatata aaaaaattg | 3780 |
| aattcaaat caaattttaa tcaggtatgt aaacttttga cttataaact ttggatctaa | 3840 |
| agtaggtgta taaactttag atgtatagaa atactatata tagaaaaat ttgaattcaa | 3900 |
| atccaaattt aaatcagata taattcaatt caaattttaa acgggtatat aaacttttga | 3960 |
| cttataaact ttaggtctat aaactttaga tctataaact ttaggtctat aaactttaga | 4020 |
| tgatagaaaa tactatata aaaaaatatt tgaattcaaa ttcaaatttg aatcggatat | 4080 |
| ataaactttt gacttataaa cttttgtct ctaaacttta gatgtataaa cttgaggtgt | 4140 |
| ataaacttta tgtgcataaa tttactaaa taggaaagta atgcggtgcc aaaaaaggaa | 4200 |
| accaggtgga gggagggggg aactgatcgc taccagtgg ccctggcgat tgatcgcgaa | 4260 |
| tcagcctttc cgactggaga ctcttgagct gaattgtttg tcttttacca acatcttctt | 4320 |
| aaggaagttt tttattccaa caaggcagg gcattgattg tttaggcatg tagcatatga | 4380 |
| ctagatggca tggatttgag ttcaatgttt tctgtgcatc tcaggagttc tttttcagg | 4440 |
| aatacatata ggatttgtgt atctttttat taagccagga tagttaatat gttacattta | 4500 |
| catgccttga aaaggaaaa tgatgggaag aaggcaaaaca agaactagaa aatgttaatt | 4560 |
| ccaagagtac aaaagagtga tgcgcatctc aggagtaatc agaagacctt taagttgaaa | 4620 |
| atcactcttc tgtgcccttg gaattaacat tttctgcgt cttttttcag ggaaagagca | 4680 |
| attggttaaca agcatggaga tgacgagtac cacgcaaagc tgaatgtagg cgagaagcca | 4740 |
| tgccatgcat cagtgcagca cggcattagc aaaccgctca tgagtgctcg gagcttgttg | 4800 |
| aagagtgaaa gcataagcgc ttccaagtgt attggtgaaa aaccaagca agacagagat | 4860 |

[0002]

Ser Arg Arg Val Ser Ser Ser Ser Phe His Leu Thr Thr Thr Gly Asp
 20 25 30
 Asp Thr Val Lys Asp Leu His Asp Pro Arg Arg Glu Asp Ala Glu Gly
 35 40 45
 Asp Gly Trp Glu Glu Val His Glu Gly Pro Glu Ser Asp Pro Glu Glu
 50 55 60
 Tyr Ile Ala Leu Val Ser Glu Asp Ala Gly Thr His Leu Pro Val Arg
 65 70 75 80
 Thr Glu Pro Arg Arg Met Asp Pro Ser Lys Lys Glu Pro Asp Phe Phe
 85 90 95
 Thr Glu Tyr Gly Glu Ala Asn Arg Tyr Lys Val Ser Glu Val Ile Gly
 100 105 110
 Lys Gly Ser Tyr Gly Val Val Ala Ala Ala Val Asp Thr Gln Thr Gly
 115 120 125
 Glu Arg Val Ala Ile Lys Lys Ile Asn Asp Val Phe Asp His Val Ser
 130 135 140
 Asp Ala Thr Arg Ile Leu Arg Glu Ile Lys Leu Leu Arg Leu Leu Arg
 145 150 155 160
 His Pro Asp Ile Val Glu Ile Lys His Ile Met Leu Pro Pro Ser Arg
 165 170 175
 Arg Glu Phe Arg Asp Ile Tyr Val Ile Phe Glu Leu Met Glu Ser Asp
 180 185 190
 [0004] Leu His Gln Val Ile Lys Ala Asn Asp Asp Leu Thr Pro Glu His His
 195 200 205
 Gln Phe Phe Leu Tyr Gln Leu Leu Arg Gly Met Lys Tyr Ile His Ala
 210 215 220
 Ala Ser Val Phe His Arg Asp Leu Lys Pro Lys Asn Ile Leu Ala Asn
 225 230 235 240
 Ala Asp Cys Lys Leu Lys Val Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Val Ser
 245 250 255
 Phe Asn Asp Thr Pro Ser Ala Ile Phe Trp Thr Asp Tyr Val Ala Thr
 260 265 270
 Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu Leu Cys Gly Ser Phe Phe Ser Lys Tyr
 275 280 285
 Thr Pro Ala Ile Asp Ile Trp Ser Val Gly Cys Ile Phe Ala Glu Leu
 290 295 300
 Leu Thr Gly Lys Pro Leu Phe Pro Gly Lys Asn Val Val His Gln Leu
 305 310 315 320
 Asp Leu Met Thr Asp Leu Leu Gly Thr Pro Ser Ala Glu Ser Leu Ala
 325 330 335
 Lys Ile Arg Asn Glu Lys Ala Arg Arg Tyr Leu Ser Asn Met Arg Lys
 340 345 350
 Lys Pro Arg Val Pro Phe Thr Lys Lys Phe Pro Gly Val Asp Pro Met
 355 360 365
 Ala Leu His Leu Leu Glu Arg Leu Leu Ala Phe Asp Pro Lys Asp Arg
 370 375 380

Pro Ser Ala Glu Glu Ala Leu Thr Asp Pro Tyr Phe Asn Gly Leu Ala
 385 390 395 400
 Asn Ser Glu Arg Glu Pro Ile Ala Gln Pro Ile Ser Lys Leu Glu Phe
 405 410 415
 Glu Phe Glu Lys Arg Lys Leu Ala Lys Asp Asp Val Arg Glu Leu Ile
 420 425 430
 Tyr Arg Glu Ile Leu Glu Tyr His Pro His Met Leu Gln Glu Tyr Leu
 435 440 445
 Arg Gly Gly Asp Gln Met Ser Phe Met Tyr Pro Ser Gly Val Asp Arg
 450 455 460
 Phe Lys Arg Gln Phe Ala His Leu Glu Glu Gly Val Ser Lys Gly Glu
 465 470 475 480
 Lys Ser Ser Pro Gln Leu Arg Gln Asn Ala Ser Leu Pro Arg Glu Arg
 485 490 495
 Ala Ile Gly Asn Lys His Gly Asp Asp Glu Tyr His Ala Lys Leu Asn
 500 505 510
 Val Gly Glu Lys Pro Cys His Ala Ser Val Thr Asp Gly Ile Ser Lys
 515 520 525
 Pro Leu Met Ser Ala Arg Ser Leu Leu Lys Ser Glu Ser Ile Ser Ala
 530 535 540
 Ser Lys Cys Ile Gly Glu Lys Pro Lys Gln Asp Arg Asp Gln Glu Asp
 545 550 555 560
 Ser Leu Thr Glu Ser Met Asp Glu Thr Ala Asp Glu Val Ser Glu Lys
 565 570 575
 Val Ala Gln Leu Lys Thr
 580

[0005]

<210> 4
 <211> 5919
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223>
 <400> 4
 atggctccta agaaaaagcg caaagtcggt atccatggcg ttccctctag aatggtggat 60
 ctacgcacgc tgggtacag tcagcagcag caagagaaga tcaaaccgaa ggtgcgttcg 120
 acagtggcgc agcaccacga ggcactggtg ggccatgggt ttacacacgc gcacatcgtt 180
 gcgctcagcc aacacccggc agcgttaggg accgtcgtg tcacgtatca gcacataatc 240
 acggcgttgc cagagcgcac acacgaagac atcgttggcg tcggcaaaca gtggtccggc 300
 gcacgcgccc tggaggcctt gtcacggat gcgggggagt tgagaggtcc gccgttacag 360
 ttggacacag gccaaactgt gaagattgca aaacgtggcg gcgtgaccgc aatggaggca 420
 gtgcatgcat cgcgcaatgc actgacgggt gccccctga acctgacccc ggaccaagtg 480
 gtggtatcgc ccagccacga tggcggcaag caagcgcctc aaacggtgca gcggctgttg 540
 ccggtgctgt gccaggacca tggcctgacc ccggaccaag tgggtgctat cgccagcaac 600
 aatggcggca agcaagcgt cgaaacggtg cagcggctgt tgccggtgct gtgccaggac 660
 catggcctga ccccggacca agtgggtgct atgccagca acaatggcgg caagcaagcg 720
 ctcgaaacgg tgcagcggct gttgccggtg ctgtgccagg accatggcct gaccccggac 780

| | |
|--|------|
| caagtgggtgg ctatgccag caacattggc ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg | 840 |
| ctgttgccgg tgetgtgcca ggaccatggc ctgaccccg accaagtggg ggctatgcc | 900 |
| agcaacaatg gcggcaagca agcgcctcga acgggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 960 |
| caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg ttggctatcg ccagcaaca tggcggcaag | 1020 |
| caagcgtctg aaacgggtgca gcggctgttg ccgggtgtgt gccaggacca tggcctgacc | 1080 |
| ccggaccaag tgggtgctat cggcagcaac attggcggca agcaagcgtc cgaaacggtg | 1140 |
| cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggac catggcctga ccccgacca agtgggtggct | 1200 |
| atgccagcc acgatggcgg caagcaagcg ctcgaaacgg tgcagcggct gttgccggtg | 1260 |
| ctgtgccagg accatggcct gaccccgacc caagtgggtg ctatgccag caacaatggc | 1320 |
| ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgetgtgcca ggaccatggc | 1380 |
| ctgactccgg accaagtggg ggctatgcc agccacgatg gcggcaagca agcgcctcga | 1440 |
| acgggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg | 1500 |
| gtggctatcg ccagcaataa tggcggcaag caagcgtctg aaacgggtgca gcggctgttg | 1560 |
| ccgggtgtgt gccaggacca tggcctgacc ccggaccaag tgggtgctat cggcagcaac | 1620 |
| aatggcggca agcaagcgtc cgaaacggtg cagcggctgt tgcgggtgct gtgccaggac | 1680 |
| catggcctga ccccgacca agtgggtggct atgccagca acaatggcgg caagcaagcg | 1740 |
| ctcgaacgg tgcagcggct gttgccggtg ctgtgccagg accatggcct gaccccgacc | 1800 |
| caagtgggtg ctatgccag ccacgatggc ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg | 1860 |
| ctgttgccgg tgetgtgcca ggaccatggc ctgaccccg accaagtggg ggctatgcc | 1920 |
| agcaacattg gcggcaagca agcgcctcga acgggtgcagc ggctgttgcc ggtgctgtgc | 1980 |
| caggaccatg gcctgacccc ggaccaagtg ttggctatcg ccagccacga tggcggcaag | 2040 |
| caagcgtctg aaagcattgt gggccagctg agccggcctg atccggcgtt ggccgcgttg | 2100 |
| accaacgacc acctcgtcgc ctggcctgc ctcggcggac gtcctgcat ggatgcagtg | 2160 |
| aaaaagggat tgcgcacgc gccggaattg atcagaagag tcaatcgccg tattggcga | 2220 |
| cgacagtccc atcgcgttgc cggatccag ctgggtgaagt ccgagctgga agaaaaaag | 2280 |
| agcagctgc gccacaagct caagtacgtg cccacagat acatcagct gatcgagatc | 2340 |
| gcccgaaca gacccaaga ccgatcctg gagatgaaag tgatggagt ttctatgaag | 2400 |
| gtgtacggct accgcggcaa gcacctgggc ggctcccga agcccgatgg cgcctctac | 2460 |
| accgtgggct ccccatcga ctatggcgtc attgtcgaca ccaaggccta ctccggcggc | 2520 |
| tacaacttac ccatcgttca ggccgacgag atgcaacgct acgtgaagga gaaccagacc | 2580 |
| cgcaataagc acattaatcc caacgagtgg tggaaagtgt acccctctc cgtgaccgag | 2640 |
| ttcaaatcc tgttcgtgtc cggccacttc aagggaatt ataaggccca actgaccgc | 2700 |
| ctgaaccaca agaccaactg caacggcgcg gtgctgtccg tggaggaact gctgatcggc | 2760 |
| ggcgagatga tcaaggttgg taccctgacc ctggaagagg tgcgccgcaa gttcaacaat | 2820 |
| ggtgaaatca atttcaggtc cggcggcggg gagggcagag gaagtcttct aacatcggtt | 2880 |
| gacgtggagg agaatcccgg ccctagatg gactacaaag accatgacgg tgattataaa | 2940 |
| gatcatgaca tcgattaca ggatgacgat gacaagatgg ccccaagaa gaagaggaag | 3000 |
| gtgggcattc acggggtgcc ggctagaatg ttggatctac gcacgctcgg ctacagttag | 3060 |
| cagcagcaag agaagatcaa accgaaggtg cgttcgacag tggcgcagca ccacaggca | 3120 |
| ctggtgggcc atgggtttac acacgcgac atcgttgccg tcagccaaca cccggcagcg | 3180 |
| ttagggaccg tcctgtctac gtatcagcac ataatcacgg cgttgccaga ggcgacacac | 3240 |
| gaagacatcg ttggcgtcgg caaacagtgg tccggcgcac gcgccctgga ggccttgctc | 3300 |
| acggatgcgg gggagtttag aggtccgcc ttacagtgg acacaggcca acttgtgaag | 3360 |
| attgcaaac gtggcggcgt gaccgcaatg gaggcagtgc atgcatcgg caatgactg | 3420 |
| acgggtgccc cctgaacct gaccccgacc caagtgggtg ctatgccag ccacgatggc | 3480 |
| ggcaagcaag cgctcgaaac ggtgcagcgg ctgttgccgg tgetgtgcca ggaccatggc | 3540 |

[0006]

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------|
| ctgaccccg | accaagtgt | ggctatcgc | agccacgatg | gcbgcaagca | agcgctcgaa | 3600 |
| acggtgcagc | ggctgttgc | ggtgctgtgc | caggaccatg | gcctgactcc | ggaccaagtg | 3660 |
| gtggctatcg | ccagcaacat | tggcggcaag | caagcgctcg | aaacgggtgca | gcbgctgttg | 3720 |
| ccggtgctgt | gccaggacca | tggcctgact | ccggaccaag | tgggtgctat | cgccagcaac | 3780 |
| ggcggcggca | agcaagcgt | cgaaacggtg | cagcggctgt | tgcgggtgct | gtgccaggac | 3840 |
| catggcctga | ctccggacca | agtgggtggct | atgccagca | acaacggcgg | caagcaagcg | 3900 |
| ctcgaacgg | tgcagcggct | gttgcgggtg | ctgtgccagg | accatggcct | gaccccgac | 3960 |
| caagtgggtg | ctatgccag | ccacgatggc | ggcaagcaag | cgctcgaaac | ggtgcagcgg | 4020 |
| ctgttgccgg | tgtgtgcca | ggacatggc | ctgaccccg | accaagtgtg | ggctatcgc | 4080 |
| agcaacaatg | gcbgcaagca | agcgtctgaa | acggtgcagc | ggctgttgc | ggtgctgtgc | 4140 |
| caggaccatg | gcctgacccc | ggaccaagtg | gtggctatcg | ccagcaacgg | cgcbggcaag | 4200 |
| caagcgctcg | aaacgggtgca | gcbgctgttg | ccggtgctgt | gccaggacca | tggcctgact | 4260 |
| ccggaccaag | tgggtgctat | cgccagccac | gatggcggca | agcaagcgt | cgaaacggtg | 4320 |
| cagcggctgt | tgcgggtgct | gtgccaggac | catggcctga | ccccggacca | agtgggtggct | 4380 |
| atgccagca | acaacggcgg | caagcaagcg | ctcgaaacgg | tgcagcggct | gttgcgggtg | 4440 |
| ctgtgccagg | accatggcct | gaccccgac | caagtgggtg | ctatgccag | ccacgatggc | 4500 |
| ggcaagcaag | cgctcgaaac | ggtgcagcgg | ctgttgcgg | tgtgtgcca | ggacatggc | 4560 |
| ctgactccgg | accaagtgtg | ggctatcgc | agcaacaacg | gcbgcaagca | agcgtctgaa | 4620 |
| acggtgcagc | ggctgttgc | ggtgctgtgc | caggaccatg | gcctgacccc | ggaccaagtg | 4680 |
| gtggctatcg | ccagcaacaa | cgcbggcaag | caagcgctcg | aaacgggtgca | gcbgctgttg | 4740 |
| ccggtgctgt | gccaggacca | tggcctgact | ccggaccaag | tgggtgctat | cgccagccac | 4800 |
| gatggcggca | agcaagcgt | cgaaacggtg | cagcggctgt | tgcgggtgct | gtgccaggac | 4860 |
| catggcctga | ctccggacca | agtgggtggct | atgccagca | acggcggcgg | caagcaagcg | 4920 |
| ctcgaacgg | tgcagcggct | gttgcgggtg | ctgtgccagg | accatggcct | gactccggac | 4980 |
| caagtgggtg | ctatgccag | ccacgatggc | ggcaagcaag | cgctcgaaac | ggtgcagcgg | 5040 |
| ctgttgccgg | tgtgtgcca | ggacatggc | ctgaccccg | accaagtgtg | ggctatcgc | 5100 |
| agccacgatg | gcbgcaagca | agcgtctgaa | agcattgtgg | cccagctgag | ccggcctgat | 5160 |
| ccggcgttgg | ccgcgttgac | caacgaccac | ctcgtcgct | tggcctgcct | cgcbggacgt | 5220 |
| cctgccatgg | atcagtgaa | aaagggattg | ccgcacgcgc | cggaattgat | cagaagagtc | 5280 |
| aatcgccgta | tggcgaacg | cacgtcccat | cgcggttccg | gatctcaact | agtcaaaagt | 5340 |
| gaactggagg | agaagaaatc | tgaacttctg | cataaattga | aatatgtgcc | tcatgaatat | 5400 |
| attgaattaa | tgaattgc | cagaaattcc | actcaggata | gaattcttga | aatgaaggta | 5460 |
| atggaatttt | ttatgaaagt | ttatggatat | agaggtaaac | atttgggtgg | atcaaggaaa | 5520 |
| ccggacggag | caatttatac | tgtcggatct | cctattgatt | acggtgtgat | cgtggatact | 5580 |
| aaagcttata | gcbgagggtta | taatctgcca | attggccaag | cagatgaaat | ggagcgatat | 5640 |
| gtcgaagaaa | atcaaacacg | aaacaacat | ctcaacccta | atgaatggtg | gaaagtctat | 5700 |
| ccatcttctg | taacggaatt | taagttttta | ttgtgagtg | gtcactttaa | aggaaactac | 5760 |
| aaagctcagc | ttacacgatt | aatcatatc | actaattgta | atggagctgt | tcttagtgta | 5820 |
| gaagagcttt | taattggtgg | agaaatgatt | aaagccggca | cattaacctt | agaggaagtg | 5880 |
| agacggaat | ttaataacgg | cgagataaac | ttttaatag | | | 5919 |
| <210> | 5 | | | | | |
| <211> | 2156 | | | | | |
| <212> | DNA | | | | | |
| <213> | 人工序列 | | | | | |
| <220> | | | | | | |
| <223> | | | | | | |

| | | |
|--------|--|------|
| | <400> 5 | |
| | aagctttgac ceggtcgtgc ccctctctag agataatgag cattgcatgt ctaagttata | 60 |
| | aaaaattacc acatattttt ttgtcacac ttgtttgaag tgcagtttat ctatctttat | 120 |
| | acatatattt aaactttact ctacgaataa tataatctat agtactacaa taatatcagt | 180 |
| | gttttagaga atcatataaa tgaacagtta gacatggtct aaaggacaa tgagtatttt | 240 |
| | gacaacagga ctctacagtt ttatcttttt agtgtgcatg ttttctcctt tttttttgca | 300 |
| | aatagcttca cctatataat acitcatcca ttttattagt acatccattt agggtttagg | 360 |
| | gttaatggtt tttatagact aattttttta gtacatctat tttattctat tttagcctct | 420 |
| | aaattaagaa aactaaaact ctatttttagt ttttttattt aataatttag atataaaata | 480 |
| | gaataaaata aagtactaa aaattaaaca aatacccttt aagaaattaa aaaaactaag | 540 |
| | gaaacatttt tcttgtttcg agtagataat gccagcctgt taaacgccgt cgacgagtct | 600 |
| | aacggacacc aaccagcga ccagcagcgt cgcgtcgggc caagcgaagc agacggcacg | 660 |
| | gcactctctgt cgtgcctct ggacccctct cgatcgagag ttccgctcca ccgttggact | 720 |
| | tgctccgctg tcggcatcca gaaattgctg ggcggagcgg cagacgtgag ccggcacggc | 780 |
| | aggcggcctc ctctctctct cacggcaccg gcagctacgg gggattcctt tcccaccgct | 840 |
| | ccttcgcttt ccttctctcg ccgccgtaa taaatagaca cccctccac accctcttc | 900 |
| | cccaacctcg tgtgttcgg agcgcacaca cacacaacca gatctcccc aaatccacc | 960 |
| | gtcggcaact ccgcttcaag gtacgccct cgtctcccc cccccccct ctctaccttc | 1020 |
| | tctagatcgg cgttccggtc catggttagg gcccggtagt tctactctg ttcattgttg | 1080 |
| | tgtttagatcc gtgtttgtgt tagatccgtg ctgctagcgt tcgtacacgg atgcgacctg | 1140 |
| | tacgtcagac acgttctgat tgctaaactg ccagtgtttc tctttgggga atcctgggat | 1200 |
| | ggctctagcc gttccgcaga cgggatcgat ttcattgattt tttttgttc gttgcatagg | 1260 |
| [0008] | gtttggtttg cccttttctt ttatttcaat atatgccgtg cacttgtttg tcgggtcatc | 1320 |
| | ttttcatget tttttttgtc ttggttgtga tgatgtggtc tggttgggcg gtcgttctag | 1380 |
| | atcggagtag aattaattct gtttcaaaact acctgggtgga ttattaatt ttggatctgt | 1440 |
| | atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga aatatcgatc | 1500 |
| | taggataggt atacatgttg atgcggggtt tactgatgca tatacagaga tgctttttgt | 1560 |
| | tcgcttggtt gtgatgatgt ggtgtggtg ggcggtcggt cattcgttct agatcggagt | 1620 |
| | agaatactgt ttcaaaactac ctggtgtatt tattaatttt ggaactgtat gtgtgtgtea | 1680 |
| | tacatcttca tagttacgag ttttaagatgg atggaaatat cgatctagga taggtataca | 1740 |
| | tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc tattcatatg | 1800 |
| | ctctaacctt gactacctat ctattataat aaacaagat gttttataat tttttgatc | 1860 |
| | ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattttttt agccctgcct | 1920 |
| | tcatacgcta tttatttgc tggtaactgt tcttttgcg atgctcacc tgttgtttgg | 1980 |
| | tgttacttct gcaggtagc ggccccct cgagcgcgc caagctatca aacaagttg | 2040 |
| | tacaaaaaag ctgaacgaga aacgtaaaat gatataaata tcaatatatt aaattagatt | 2100 |
| | ttgcataaaa aacagactac ataactgt aaaacacaac atatccagtc actatg | 2156 |
| | <210> 6 | |
| | <211> 1971 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> 人工序列 | |
| | <220> | |
| | <223> | |
| | <400> 6 | |
| | Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ser | |
| | 1 5 10 15 | |

Arg Met Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln Glu
 20 25 30
 Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His Glu Ala
 35 40 45
 Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala Leu Ser Gln
 50 55 60
 His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val Thr Tyr Gln His Ile Ile
 65 70 75 80
 Thr Ala Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Asp Ile Val Gly Val Gly Lys
 85 90 95
 Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Leu Leu Thr Asp Ala Gly
 100 105 110
 Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu Asp Thr Gly Gln Leu Val Lys
 115 120 125
 Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser
 130 135 140
 Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala Pro Leu Asn Leu Thr Pro Asp Gln Val
 145 150 155 160
 Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 165 170 175
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 180 185 190
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 [0009] 195 200 205
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr
 210 215 220
 Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
 225 230 235 240
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly
 245 250 255
 Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys
 260 265 270
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp
 275 280 285
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 290 295 300
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 305 310 315 320
 Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn
 325 330 335
 Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 340 345 350
 Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala
 355 360 365
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 370 375 380

Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala
 385 390 395 400
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg
 405 410 415
 Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val
 420 425 430
 Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val
 435 440 445
 Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp
 450 455 460
 Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu
 465 470 475 480
 Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr
 485 490 495
 Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala
 500 505 510
 Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly
 515 520 525
 Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys
 530 535 540
 Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp
 545 550 555 560
 His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly
 [0010] 565 570 575
 Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys
 580 585 590
 Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His
 595 600 605
 Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val
 610 615 620
 Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala
 625 630 635 640
 Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu
 645 650 655
 Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala
 660 665 670
 Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Ser Ile Val Ala
 675 680 685
 Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn Asp His
 690 695 700
 Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Met Asp Ala Val
 705 710 715 720
 Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro Glu Leu Ile Arg Arg Val Asn Arg
 725 730 735
 Arg Ile Gly Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala Gly Ser Gln Leu Val
 740 745 750

Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His Lys Leu Lys
 755 760 765
 Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser
 770 775 780
 Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys
 785 790 795 800
 Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp
 805 810 815
 Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val
 820 825 830
 Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala
 835 840 845
 Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Lys Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His
 850 855 860
 Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu
 865 870 875 880
 Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala
 885 890 895
 Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Lys Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu
 900 905 910
 Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly Thr
 915 920 925
 Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu Ile Asn
 [0011] 930 935 940
 Phe Arg Ser Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
 945 950 955 960
 Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg Met Asp Tyr Lys Asp His Asp
 965 970 975
 Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 980 985 990
 Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ile His Gly Val Pro Ala
 995 1000 1005
 Arg Met Val Asp Leu Arg Thr Leu Gly Tyr Ser Gln Gln Gln Gln
 1010 1015 1020
 Glu Lys Ile Lys Pro Lys Val Arg Ser Thr Val Ala Gln His His
 1025 1030 1035
 Glu Ala Leu Val Gly His Gly Phe Thr His Ala His Ile Val Ala
 1040 1045 1050
 Leu Ser Gln His Pro Ala Ala Leu Gly Thr Val Ala Val Thr Tyr
 1055 1060 1065
 Gln His Ile Ile Thr Ala Leu Pro Glu Ala Thr His Glu Asp Ile
 1070 1075 1080
 Val Gly Val Gly Lys Gln Trp Ser Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala
 1085 1090 1095
 Leu Leu Thr Asp Ala Gly Glu Leu Arg Gly Pro Pro Leu Gln Leu
 1100 1105 1110

| | | | |
|--------|---|------|------|
| | Asp Thr Gly Gln Leu Val Lys Ile Ala Lys Arg Gly Gly Val Thr | | |
| | 1115 | 1120 | 1125 |
| | Ala Met Glu Ala Val His Ala Ser Arg Asn Ala Leu Thr Gly Ala | | |
| | 1130 | 1135 | 1140 |
| | Pro Leu Asn Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His | | |
| | 1145 | 1150 | 1155 |
| | Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro | | |
| | 1160 | 1165 | 1170 |
| | Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala | | |
| | 1175 | 1180 | 1185 |
| | Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln | | |
| | 1190 | 1195 | 1200 |
| | Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp | | |
| | 1205 | 1210 | 1215 |
| | Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Ile Gly Gly Lys Gln Ala Leu | | |
| | 1220 | 1225 | 1230 |
| | Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly | | |
| | 1235 | 1240 | 1245 |
| | Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly | | |
| | 1250 | 1255 | 1260 |
| | Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys | | |
| | 1265 | 1270 | 1275 |
| [0012] | Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser | | |
| | 1280 | 1285 | 1290 |
| | Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu | | |
| | 1295 | 1300 | 1305 |
| | Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val | | |
| | 1310 | 1315 | 1320 |
| | Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val | | |
| | 1325 | 1330 | 1335 |
| | Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro | | |
| | 1340 | 1345 | 1350 |
| | Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala | | |
| | 1355 | 1360 | 1365 |
| | Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His | | |
| | 1370 | 1375 | 1380 |
| | Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly | | |
| | 1385 | 1390 | 1395 |
| | Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu | | |
| | 1400 | 1405 | 1410 |
| | Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala | | |
| | 1415 | 1420 | 1425 |
| | Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu | | |
| | 1430 | 1435 | 1440 |
| | Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val | | |
| | 1445 | 1450 | 1455 |

| | | | |
|--------|---|------|------|
| | Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr | | |
| | 1460 | 1465 | 1470 |
| | Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr | | |
| | 1475 | 1480 | 1485 |
| | Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln | | |
| | 1490 | 1495 | 1500 |
| | Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp | | |
| | 1505 | 1510 | 1515 |
| | His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Asn | | |
| | 1520 | 1525 | 1530 |
| | Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val | | |
| | 1535 | 1540 | 1545 |
| | Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile | | |
| | 1550 | 1555 | 1560 |
| | Ala Ser Asn Asn Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg | | |
| | 1565 | 1570 | 1575 |
| | Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln | | |
| | 1580 | 1585 | 1590 |
| | Val Val Ala Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu | | |
| | 1595 | 1600 | 1605 |
| | Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu | | |
| | 1610 | 1615 | 1620 |
| [0013] | Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser Asn Gly Gly Gly Lys | | |
| | 1625 | 1630 | 1635 |
| | Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro Val Leu Cys Gln | | |
| | 1640 | 1645 | 1650 |
| | Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala Ile Ala Ser His | | |
| | 1655 | 1660 | 1665 |
| | Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Thr Val Gln Arg Leu Leu Pro | | |
| | 1670 | 1675 | 1680 |
| | Val Leu Cys Gln Asp His Gly Leu Thr Pro Asp Gln Val Val Ala | | |
| | 1685 | 1690 | 1695 |
| | Ile Ala Ser His Asp Gly Gly Lys Gln Ala Leu Glu Ser Ile Val | | |
| | 1700 | 1705 | 1710 |
| | Ala Gln Leu Ser Arg Pro Asp Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Asn | | |
| | 1715 | 1720 | 1725 |
| | Asp His Leu Val Ala Leu Ala Cys Leu Gly Gly Arg Pro Ala Met | | |
| | 1730 | 1735 | 1740 |
| | Asp Ala Val Lys Lys Gly Leu Pro His Ala Pro Glu Leu Ile Arg | | |
| | 1745 | 1750 | 1755 |
| | Arg Val Asn Arg Arg Ile Gly Glu Arg Thr Ser His Arg Val Ala | | |
| | 1760 | 1765 | 1770 |
| | Gly Ser Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu | | |
| | 1775 | 1780 | 1785 |
| | Leu Arg His Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu | | |
| | 1790 | 1795 | 1800 |

| | | |
|--------|---|-----------|
| | Ile Glu Ile Ala Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met | |
| | 1805 | 1810 1815 |
| | Lys Val Met Glu Phe Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys | |
| | 1820 | 1825 1830 |
| | His Leu Gly Gly Ser Arg Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val | |
| | 1835 | 1840 1845 |
| | Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr | |
| | 1850 | 1855 1860 |
| | Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile Gly Gln Ala Asp Glu Met Glu | |
| | 1865 | 1870 1875 |
| | Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg Asn Lys His Leu Asn Pro | |
| | 1880 | 1885 1890 |
| [0014] | Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser Val Thr Glu Phe Lys | |
| | 1895 | 1900 1905 |
| | Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn Tyr Lys Ala Gln | |
| | 1910 | 1915 1920 |
| | Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly Ala Val Leu | |
| | 1925 | 1930 1935 |
| | Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys Ala Gly | |
| | 1940 | 1945 1950 |
| | Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly Glu | |
| | 1955 | 1960 1965 |
| | Ile Asn Phe | |
| | 1970 | |

Marker 1 2

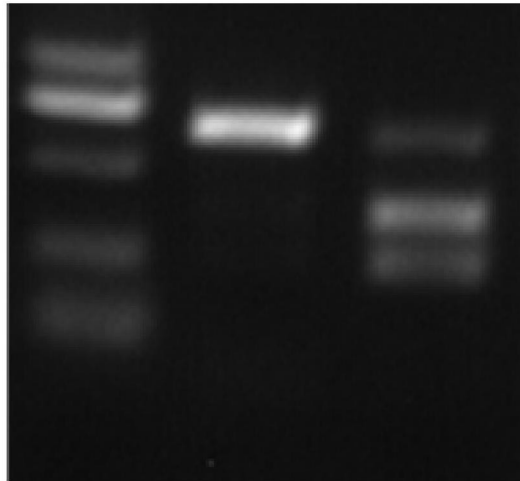


图1

OsMPK21-1 edited by TALEN

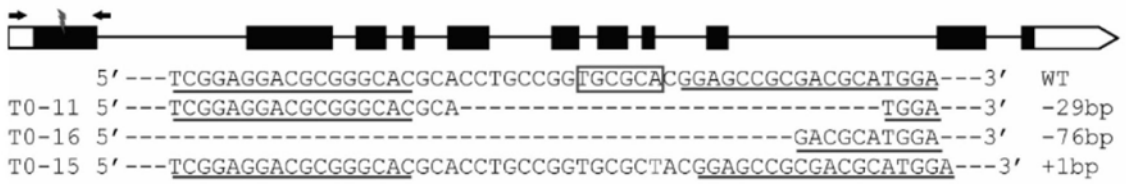


图2

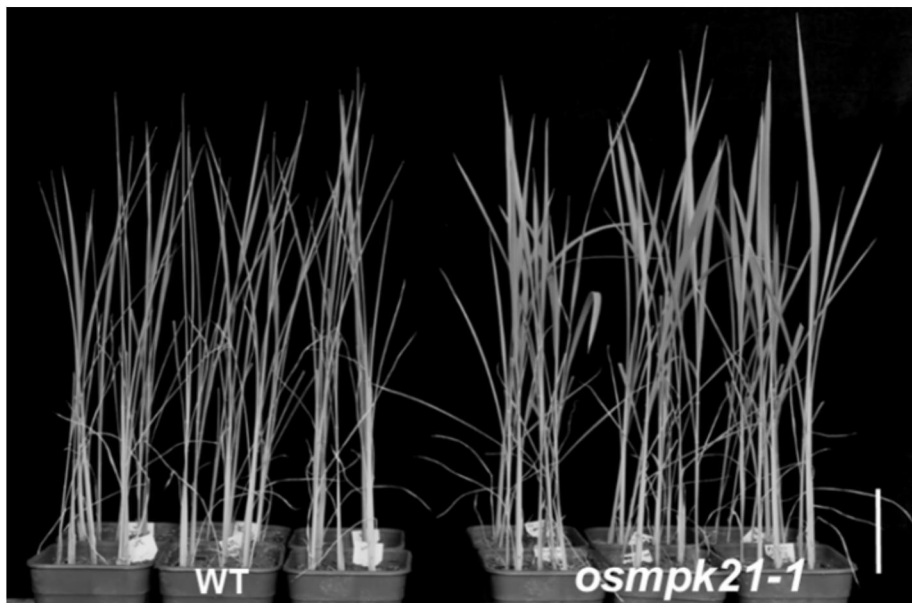


图3

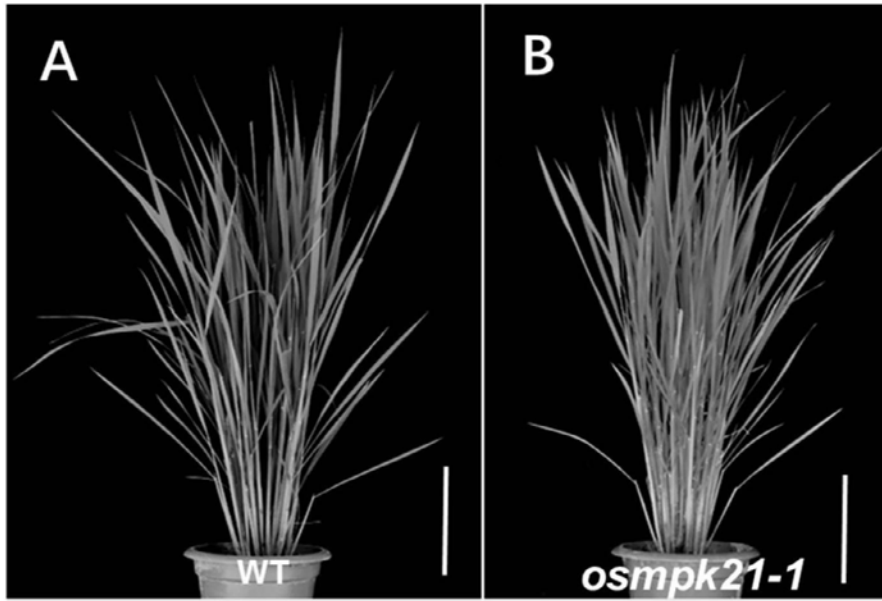


图4