



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101686646 B

(45) 授权公告日 2012.05.23

(21) 申请号 200880022516.9

(56) 对比文件

(22) 申请日 2008.06.25

US 2006/0123505 A1, 2006.06.08, 权 1,5, 12, SEQ ID NO:14746, SEQ ID NO:43186.

(30) 优先权数据

60/947,365 2007.06.29 US

60/947,590 2007.07.02 US

US 7214786 B2, 2007.05.08, 摘要, SEQ ID NO:125331.

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.28

审查员 王慧

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/068189 2008.06.25

(87) PCT申请的公布数据

W02009/006159 EN 2009.01.08

(73) 专利权人 香港中文大学

地址 中国香港新界沙田碧秋楼 226 室

(72) 发明人 辛世文 林汉明

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东 张静

(51) Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 11 页

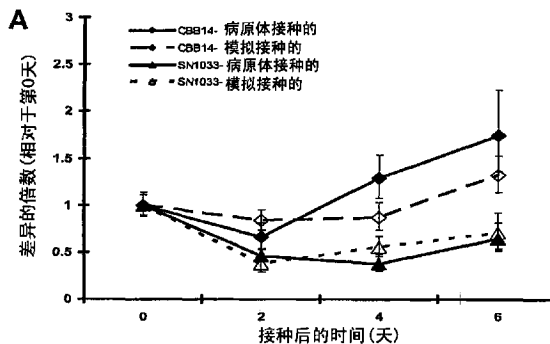
序列表 35 页 附图 12 页

(54) 发明名称

增强植物对感染的抵抗力的方法

(57) 摘要

本发明涉及在植物中产生能赋予对外伤的抵抗力的蛋白质的表达系统。所述表达系统用于修饰植物以增强它们对感染和创伤的抵抗力。



1. 一种重组表达系统,其包含编码蛋白质的核苷酸序列,所述蛋白质的氨基酸序列是 SEQ ID NO :43,其中所述核苷酸序列与在植物细胞实现表达的调控体系操作性相连。

2. 一种增强水稻对感染或创伤的抵抗力的方法,该方法包括修饰所述水稻使之含有权利要求 1 所述表达系统。

3. 一种制备蛋白质的方法,所述蛋白质的氨基酸序列为 SEQ ID NO :43,该方法包括在产生所述蛋白质的条件下培养含权利要求 1 所述表达系统的细胞以及从所述培养物中回收所述蛋白质。

4. 一种蛋白质,其氨基酸序列为 SEQ ID NO :43。

5. 一种鉴定调节水稻对感染或创伤的抵抗力的化合物或化合物组合的方法,该方法包括

将权利要求 4 所述的蛋白质作为测试蛋白与候选化合物或候选化合物组合接触,和测定所述化合物或化合物的组合结合所述蛋白质的能力,结合所述蛋白质的化合物或化合物组合是调节水稻抵抗感染能力的候选对象。

6. 一种鉴定调节水稻对感染或创伤的抵抗力的化合物或化合物组合的方法,该方法包括

将权利要求 4 所述的蛋白质作为测试蛋白与候选化合物或候选化合物的组合接触,和测定所述化合物或化合物的组合增强或降低所述蛋白质的自泛素化的能力。

增强植物对感染的抵抗力的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2007 年 6 月 29 日提交的美国序列号 60/947,365 和 2007 年 7 月 2 日提交的美国序列号 60/947,590 的优先权。这些申请的内容通过引用全文纳入本文。

[0003] 通过 EFS-WEB 提交的序列表的引用

[0004] 以下通过 USPTO EFS-WEB 服务器电子提交（由 MPEP § 1730II.B.2(a)(C) 批准并列出）的序列表的全部内容出于所有目的通过引用全文纳入本文。根据以下电子提交的文本文件识别序列表：

[0005]

文件名称	产生日期	大小（字节）
549072000740Seqlist.txt	2008 年 6 月 20 日	51,000 字节

技术领域

[0006] 本发明涉及能增强植物对感染，包括病原体和创伤所致感染的抵抗力的蛋白质。本发明还涉及通过表达编码这些蛋白质的基因来增强植物对感染抵抗力的方法。

背景技术

[0007] 预先形成的和诱导的防御机理为植物宿主对遇到的许多病原体提供广谱抵抗力。病原体特异性的防御反应通常由宿主的相应抗性 (R) 蛋白识别病原体无毒力 (Avr) 蛋白来启动。最后，植物宿主会产生一系列防御分子（包括发病机理相关蛋白质）来限制或杀伤病原体。抵抗力启动和抗性蛋白质产生之间的过程涉及尚未完全阐明的复杂信号转导网络。

[0008] 通过分子遗传学方法鉴定已在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中鉴定了防御信号转导网络的许多重要节点 (hub)，包括 EDS1 (增强疾病易感蛋白 1 (Enhanced Disease Susceptibility 1))、NPR1 (PR 基因的非表达体 1 (Non-Expresser of PR Genes 1)) 和 NDR1 (非物种特异性疾病抵抗力蛋白 1 (Non Race-Specific Disease Resistance 1))。采用相似的策略以及生物化学研究，确认了拟南芥中植物激素信号参与防御反应，特别是水杨酸 (SA)，以及其它植物激素，例如茉莉酸 (JA) 和乙烯 (ET) 的作用。

[0009] 植物防御反应中采用许多已知的信号传导策略。例如，一些 R 蛋白是受体激酶，而其它蛋白激酶也起重要作用。生物化学信号，例如钙流 (calcium flux) 和氧化爆发也是重要的。此外，有几篇报道称其它信号传导组分，例如 G-蛋白和 RING (真正感兴趣的新基因 (Really Interesting New Gene)) 锌指蛋白参与其中。

[0010] RING 锌指蛋白是具有高度保守性锌结合区的一组多样性蛋白。根据半胱氨酸 (C) 和组氨酸 (H) 残基组合的类型，RING 锌指蛋白区可分成标准的和修饰的 RING 锌指。标准的 RING 锌指可以再分成两个亚类：HC 亚类（共有：C-X₂-C-X₉₋₃₉-C-X₁₋₃-H-X₂₋₃-C-X₂-C-X₄₋₄₈-C-X₂-C）(SEQ ID NO:1) 和 H2 亚类（共有：C-X₂-C-X₉₋₃₉-C-X₁₋₃-H-X₂₋₃-H-X₂-C-X₄₋₄₈-C-X₂-C）(SEQ ID NO:2) (Stone, S. L. 等, *Plant Physiology* (2005) 137:13-30)。修饰的 RING 锌指

包括 RING-C2、RING-v、RING-D、RING-S/T 和 RING-G。

[0011] RING 锌指蛋白家族（包括 HC 和 H2 亚类）的许多成员是 E3 泛素连接酶。不同亚类的 RING 锌指区决定了针对不同 E2 泛素偶联酶的特异性。其它 RING 锌指蛋白可结合核酸或与其它蛋白质靶标相互作用。除了泛素介导的降解途径外，RING 锌指蛋白还在细胞器运输和转录 / 翻译调节中起着重要作用。

[0012] 在水稻中，鉴定了超过 30 种针对水稻黄单孢菌水稻致病变种 (*Xanthomonas oryza* pv. *oryza*) (Xoo) 的抗性基因座 (Xa 基因座)，主要通过绘图克隆方法 (map-based cloning approach) 克隆了 6 种 Xa 基因。据报道，几种发病机理 - 相关 (PR) 基因对抗性机制直接起作用。然而，从 R 蛋白 -Avr 蛋白开始相互作用到实际抵抗力产生的信号转导途径中只有少数关键组分得到研究。为获得水稻的新的 Xoo 抗性相关信号转导组分，研究了在水稻品系中差别表达的具有 Xa 基因座的 cDNA 克隆。

[0013] 本发明人克隆并表征了水稻的新型 RING 锌指蛋白基因 (OsRHC1)。在创伤情况下，OsRHC1 在含 Xa14 或 Xa23 耐受性基因座的近等同基因品系中差别表达，但在相应的易感回归亲本中不是。OsRHC1 在转基因拟南芥中的异位表达增强其对细菌病原体的抵抗力，这种保护功能取决于 26S 蛋白酶体的作用。

发明内容

[0014] 已知植物中有各种基因编码感染抗性蛋白质，已经利用了经修饰产生这些蛋白质的各种转基因植物以图赋予针对感染的抵抗力。然而，就成功识别的病原体类型而言，这些抗性蛋白质看来活性谱有限。许多还导致不利副作用（例如，程序性细胞死亡）。本发明提供可用于赋予各种植物针对感染的抵抗力，而没有明显不利副作用的材料。本发明提供产生称为 OsRHC1 的蛋白质的重组材料，该蛋白质是赋予针对广谱病原体感染的抵抗力的 RING 锌指蛋白。由于源自单子叶植物（水稻）的本发明蛋白质在双子叶植物（拟南芥）中也有效，其也适用于各种植物。

[0015] 一方面，本发明涉及产生 OsRHC1 蛋白及其密切相关蛋白的表达系统，所述蛋白是 RING 锌指蛋白并能增强植物对感染的抵抗力。用本发明表达系统修饰的转基因植物抵抗病原生物或创伤所致感染的能力增强。

[0016] 因此，在另一方面，本发明涉及经修饰而含有产生该 RING 锌指蛋白的表达系统的植物细胞或植物。这些植物可以是 OsRHC1 来源的异源植物，或者可以是经修饰而过表达该蛋白质的水稻植物。

[0017] 在还有另一方面，该表达系统产生的蛋白质可以用于实施筛选试验以鉴定能调节植物对感染的抵抗力的化合物或化合物组合。

[0018] 本发明还涉及 OsRHC1 蛋白的免疫特异性抗体。这些抗体可用于检测和纯化该蛋白质。

[0019] 附图简述

[0020] 图 1 显示 OsRHC1 基因编码区的核苷酸序列和 OsRHC1 蛋白的氨基酸序列 (SEQ ID NO :42-43)。

[0021] 图 2A 显示与表现出高度相似性的 7 种注释蛋白质 (SEQ ID NO :44-50) 比对的 OsRHC1 的全长氨基酸序列 (SEQ ID NO :43)。图 2B 显示利用抗 -OsRHC1 抗体作蛋白质印迹

分析的从 CBB23 和 JG30 提取的膜结合和可溶性蛋白质组分。

[0022] 图 3A 和 3B 显示 OsRHC1 在细菌枯萎病抗性品系 CBB14 和 CBB23 (分别携带 Xa14 基因座和 Xa23 基因座) 和它们的易感回归亲本 (分别是 SN1033 和 JG30) 中的表达情况。

[0023] 图 4A 通过实时 PCR 显示 OsRHC1 的创伤诱导表达。图 4B 显示相应蛋白质的蛋白质印迹。

[0024] 图 5A-C 显示表达 OsRHC1 的转基因拟南芥的病原体接种测试。在图 5A 中, 通过 Northern 印迹分析证实转基因 OsRHC1 在转基因拟南芥中的表达。疾病症状可见, 如图 5B 所示; 收集莲座丛 (rosette) 叶片 (不是感染的部位) 估计病原体滴度, 如图 5C 所示。

[0025] 图 6A 和 6B 显示防御标记基因在未接种 (A) 和接种 (B) 丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) DC3000 (*Pst* DC3000) 的转基因拟南芥中的表达。

[0026] 图 7A-D 显示用 MG132 (26S 蛋白酶体抑制剂) 处理时防御标记基因 (PR1 (A)、PR2 (B)、PDF1.2 (C) 和 Thi2.1 (D)) 的表达。

[0027] 图 8A 和 8B 显示在 *npr1-3* 背景中 OsRHC1 转基因拟南芥的病原体接种测试的结果。图 8A 显示 OsRHC1 基因的表达, 图 8B 显示 4 种防御标记基因的表达。

[0028] 图 9 显示在转基因水稻品系中 PCR 筛选 OsRHC1 转基因的结果。

[0029] 图 10A 通过实时 PCR 显示 OsRHC1 的表达, 图 10B 显示转基因水稻品系中相应蛋白质的产生。

[0030] 图 11A-C 显示 OsRHC1 转基因水稻品系中防御标记基因 PR1 (A)、PBZ1 (B) 和 GRCWP (C) 的表达。

[0031] 图 12 显示对 OsRHC1 的 RING-HC-C- 末端部分进行自泛素化试验 (autoubiquitination assay) 的结果。

[0032] 图 13 显示 OsRHC1 的结合伴侣的 DNA 序列 (SEQ ID NO :51) 和推导的氨基酸序列 (SEQ ID NO :52)。

[0033] 实施本发明的方式

[0034] 称为水稻 RING-HC 亚类蛋白质 -1 (OsRHC1) 的蛋白质是在水稻中对病原体或创伤诱导的感染起反应而过表达的 409 个氨基酸的蛋白质。当各种植物经修饰而产生该蛋白质及其变体 (统称为 OsRHC1 蛋白) 时, 这些蛋白质使得所述植物抵抗感染的不利影响, 所述变体在该 409 氨基酸序列的全长上有至少 90%、优选 95%、更优选 98% 或 99% 的序列相同性。本发明提供可用于修饰各种植物 (单子叶植物和双子叶植物) 以增强它们抗感染的能力的表达系统。以下实施例证实了这种表达系统赋予抗性的普遍能力, 这些实施例显示源自单子叶植物的该蛋白质能赋予双子叶植物拟南芥这些特性。

[0035] 目前, 构建在植物中可操作的表达载体、修饰植物细胞、使植物细胞再生完整的植物和植物的重组操作等技术在总体上是众所周知的。这些技术的综述见, 例如美国专利 7, 109, 033, 其有关这些技术的内容通过引用纳入本文。

[0036] 如本专利所示, 可用于植物表达的启动子可以是组成型、诱导型和 / 或组织特异性的。转化技术包括利用土壤杆菌、脂质转染、电穿孔等等。从转化的植物细胞再生植物的技术也是熟知的。

[0037] 因此, 一旦有编码 OsRHC1 蛋白的核苷酸序列可用, 本领域普通技术人员即熟知制备产生这些蛋白质的转基因植物的方法。天然产生该蛋白质的核苷酸序列以登录号

EF584506 保藏在 GenBank, 并且密码子选择有差异的合成替代物是可能的。

[0038] 因此, 按照本发明, 构建在植物中可操作的合适表达系统, 其中编码本发明蛋白质的核苷酸序列与在植物中可操作的合适控制序列操作性相连。该表达系统用于修饰植物细胞或植物, 从而该蛋白质可以在植物组织中普遍地或专门在植物的所需位置产生, 这取决于控制系统和转化方法的选择。然后得到的植物(无论单子叶植物或双子叶植物)对病原体或创伤诱导的感染起反应而产生该蛋白质, 从而增强它们抵御这些感染事件所致损伤的能力。

[0039] 如下所示, OsRHC1 是通过将不良蛋白质引向蛋白酶体而增强对它们的破坏作用的 E3 泛素连接酶。该特性与其它 RING 蛋白相同, 代表了其保护性功能的一方面。该蛋白质是首个在 N- 末端区域具有跨膜结构域并且在 C- 末端胞质尾具有 RING-HC 的 E3, 发现其参与植物疾病抵抗力。

[0040] 此外, 以足量产生并分离和纯化至合适程度(以重量计, 纯度至少 50%、优选 75%、更优选 90% 或 95%) 的该蛋白质本身可用作筛选工具。能结合该蛋白质的化合物或化合物组合是调节植物抵御感染能力的候选对象。通过结合该蛋白质而能刺激其活性的化合物或化合物组合会增强能产生该蛋白质的植物的感染 - 抵御能力。

[0041] 因此, 可采用结合试验作初步筛选。由于 OsRHC1 已证实是 E3 泛素连接酶, 可采用以下实施例 9 所述的泛素连接酶活性试验, 或该活性的类似试验来证明候选化合物的激动剂活性。因此, 合适的候选化合物会增强 OsRHC1 实现泛素化的能力。

[0042] 对所述蛋白质具有特异免疫活性的抗体也可用于纯化本发明蛋白质和检测它们。术语“抗体”应理解为表示完整的抗体(多克隆或单克隆), 其免疫特异性片段, 例如 Fab 片段, 及其重组产生的形式, 例如单链 F_v 抗体。因此, 术语“抗体”指任何形式的抗体以及保留其免疫特异性特征的任何部分。这些抗体可用在, 例如纯化用的亲和柱上。

[0043] 在以下实施例中, 从稻回收图 1 所示编码 OsRHC1 蛋白的核苷酸序列并保藏。此外, 证明了可以在对病原体起反应和对创伤起反应而表现出抗性的稻品系中在 mRNA 水平和蛋白质水平诱导 OsRHC1 表达。

[0044] 利用 OsRHC1 蛋白的表达构建物获得转基因拟南芥植物, 这些转基因植物显示在常规生长条件下和加入水杨酸或茉莉酸时, 4 种防御标记基因的表达均增强。OsRHC1 转基因拟南芥还显示 OsRHC1- 编码 DNA 的组成型表达, 当用假单胞菌 (*Pseudomonas*) 攻击时, 会因这种表达而得到保护。类似地, 稻中该 DNA 过表达导致几种防御标记基因的表达。

[0045] 提供以下实施例是为了说明而非限制本发明。

[0046] 实施例 1

[0047] OsRHC1- 编码 cDNA 的鉴定和克隆

[0048] 利用从 6-8 周龄 CBB14 和 SN1033 提取的总 RNA, 通过抑制消减杂交技术, 用克隆技术公司 (Clontech 637401) 的 PCR 选择 cDNA 消减试剂盒获得部分 cDNA 克隆, 其中 CBB14 是一种细菌枯萎病抗性株(测试者), 而 SN1033(驱动者)是病原体 (*Xoo* 属 LN44) 接种后 4 天收集的 CBB14 的易感性亲本水稻品系。通过 Zhang, Q. 等, *Acta Agr. Sin.* (1996) 22 : 135-141 所述的裁剪方法进行接种。利用该部分克隆的 DNA 序列信息, 用特异性引物进行 5' - 快速 - 扩增 cDNA 末端 (5' -RACE) 实验和随后的 PCR 扩增。5' RACE 反应中利用基因特异性引物 5' -TTCTCCATGTTTCGGTAAACCTTTC-3' (SEQ ID NO :3)、5' -TAAAGTTGTGAT

TGAGACTACATGG-3' (SEQ ID NO :4) 和 5' -ACATTGCACAACCAACATGTAC-3' (SEQ ID NO :5)。为扩增全长编码区,利用引物对 5' -CCTCACTTTTGTCTCCAC-3' (SEQ ID NO :6) 和 5' -CGACATTGCACAACCAAC-3' (SEQ ID NO :7) 进行 PCR。所有的克隆保存在斯特拉塔基因公司 (Stratagene) 的质粒载体 pBluescript[®] KSII(+) 中,在大肠杆菌菌株 DH5 α 中增殖。

[0049] 得到的 cDNA 克隆 (GenBank 登录号 EF584506) 编码 409 个氨基酸残基的完整开放读框 (图 1)。EF584506 与直接保藏的水稻 cDNA 克隆 (登录号 :NM 001057564) 有 99% 相同。水稻基因组中的相应基因看来是位于染色体 3 上的单拷贝基因。BlastP 检索显示我们的克隆编码的蛋白质与注释为锌指家族蛋白的水稻克隆 (登录号 :ABF98464) 有 99% 相同性,但在 N- 末端少了 64 个氨基酸残基。利用保守结构域数据库 (CDD) 的其它分析显示预测的蛋白质具有 RING 锌指区。RING 锌指区中保守性半胱氨酸和组氨酸残基的模式显示是 RING-HC 亚类的标志。因此,该克隆指定为 OsRHC1。

[0050] 将 OsRHC1 蛋白的预测氨基酸序列与参与疾病抵抗力的两种水稻 RING 锌指蛋白, EL5 (RING-H2 亚类) 和 XB3 (RING-HC 亚类) 作比较。除在 RING 锌指区外,未发现明显的同源性 (数据未显示)。OsRHC1 的 RING 锌指区位于 C- 末端 (图 2A),而在 EL5 和 XB3 中,该区分别位于该蛋白的中间部分或接近 C- 末端。TopPred 和 iPSORT 程序进行的预测提示 OsRHC1 可具有多个跨膜区 (图 2A),而 EL5 只有一个, XB3 几乎可以肯定没有任何跨膜区 (数据未显示)。

[0051] BlastP 分析显示 OsRHC1 与 GenBank 保藏的各种植物品种的其它 7 种注释蛋白有高度的氨基酸序列同源性 (图 2A)。这些蛋白质显示与 OsRHC1 的相同性高于 50% (在全长上),在 N- 末端那一半有多个跨膜区,在 C- 末端有 RING-HC 区。该组蛋白质的 RING-HC 区的共有序列是 Cys-X₂-Cys-X₁₁-Cys-X-His-X₃-Cys-X₂-Cys-X₆-Cys-X₂-Cys (SEQ ID NO :8)。这些同源物的功能明显未经公开。

[0052] 实施例 2

[0053] 证明 OsRHC1 是膜结合的

[0054] 为证实 OsRHC1 如生物信息学工具所示是膜结合的,采用分级方案分离膜结合和可溶性蛋白质 (从 Jiang 和 Rogers, J. Cell Biol. (1998) 143 :1183-1199 所述方法改进)。对于蛋白质印迹分析,先用聚丙烯酰胺凝胶 (4% 浓缩 ;10% 分辨) 电泳分离蛋白质,再用 BR 公司的 Trans-**Blot**[®] SD 半干式电泳转移槽 (Trans-**Blot**[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad 170-3949) 将蛋白质转移至活化的 PVDF 膜 (用无水甲醇预处理 20 分钟,再用蛋白质转移缓冲液处理 15 分钟)。按照生产商英杰公司的手册 (Western Breeze[™] 免疫检测试剂盒, InvitroGen WB7106) 进行封闭和检测步骤。通过将合成肽 ('N' -CGYPPEVVRKMPKRD- 'C') (SEQ ID NO :9) 注射入家兔,由商品化服务机构 (英杰公司,定制抗体) 制备靶向 OsRHC1 蛋白的第一抗体 (多克隆),先用亲和柱纯化抗体再使用。利用偶联于碱性磷酸酶的抗-兔第二抗体 (在 Western Breeze[™] 免疫检测试剂盒中提供,英杰公司 WB7106) 识别第一抗体。蛋白质印迹分析证实 OsRHC1 蛋白质与膜紧密相连 (图 2B)。

[0055] 实施例 3

[0056] OsRHC1 在水稻品系 CBB14 和 CBB23 中是创伤诱导的

[0057] 为研究 OsRHC1 的表达模式,利用两种近等同基因对 (含有 Xa14 的 CBB14 及其易

感性回归亲本 SN1033 ;CBB23, 含有 Xa23 的抗性品系及其易感性回归亲本 JG30) 的逆转录 RNA 样品进行实时 PCR 分析。水稻品系生长在暖房的常规田地土壤中 (温度为 24-28°C; RH 70-80%; 自然光)。通过 Zhang, Q. 等, 同上 (1996) 所述的剪切方法接种 Xoo 菌株 LN44 和 P6。模拟接种和创伤处理遵循同一方案, 除了用病原体替代水。对于时程实验, 在第 0、2、4、6 天, 大致相同的时间 (上午 8-10 点) 收集样品。第 0 天样品在处理前收集。

[0058] 为通过实时 PCR 评估 OsRHC1 的表达, 通过 Ausubel 等, 《最新分子生物学方法》(Current Protocols in Molecular Biology) (1995) JW 父子公司 (J. Wiley & Sons), 纽约所述的酚提取法提取总 RNA。通过 DNA 酶 I (英杰公司 18068-015) - 处理 RNA 样品的逆转录 (18- 聚体寡聚 -dT ; SUPERSCRIPT™ IIRNA 酶 H (英杰 18064-071)) 产生 cDNA 样品。

[0059] 利用应用生物系统公司 (Applied Biosystems) 的 ABI PRISM 7700 序列检测系统在具有圆盖的 96- 孔 PCR 平板中进行 cDNA 的实时 PCR 扩增。反应在 20 μ l 反应体积中进行, 其中含有 10 μ l SYBR 绿色 PCR 主混合物 (应用生物系统公司 4309155) 和 0.3 μ M 的各正向和反向引物。实时 PCR 的 OsRHC1 引物为: 5' -AAAGAAGAGCAAGCCCGG TTAT-3' (SEQ ID NO:10) 和 5' -GCCTCCATACCTCTTCTGCAA-3' (SEQ ID NO:11)。所有反应独立进行至少 4 次, 至少 3 组一致的数据用于分析。利用引物组 5' -CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3' (SEQ ID NO:12) 和 5' -GACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3' (SEQ ID NO:13) 的肌动蛋白 (稻 (O. sativa) OsAct1D; 登录号: X15865) 的表达水平用于标准化结果。通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法 (Livak 和 Schmittgen, Methods (2001) 25:402-408) 计算相对基因表达。

[0060] 为确认可靠性数据, 比较所有实时 PCR 反应的靶基因和持家基因之间的扩增效率, 检测所有 PCR 产物的解离曲线以确保 PCR 的质量。至少利用两个独立批次的植物样品, 观察到基因表达模式一致。所有 PCR 产物至少测序一次以证实定量测定了正确的靶标。

[0061] 当接种不相容的 Xoo 菌株 (对于 Xa14 是 LN44, 对于 Xa23 是 P6) 时, 含有 Xa14 或 Xa23 的水稻品系显示诱导了 OsRHC1 基因表达, 而易感回归亲本没有反应, 分别如图 3A 和 3B 所示。然而, 在遭受创伤的模拟接种样品中也观察到这种诱导作用, 提示 OsRHC1 可以是创伤可诱导的。在含有赋予广谱抗性的 Xa23 基因座的 CBB23 的情况中, 诱导幅度更强。

[0062] 进一步分析了创伤对 CBB23 品系及其易感回归亲本 JG30 中 OsRHC1 表达的影响。通过叶片剪切使 (植物) 受伤后收集 RNA 和蛋白质样品。通过剪切使 CBB23 和 JG30 稻品系 (8- 周龄植物) 受伤。收集受伤前的第 0 天叶片样品。剪切后第 2、4 和 6 天收集离受伤部位约 6-8mm 的叶片组织。平行制备总 RNA 和膜结合蛋白样品。如上所述进行实时 PCR 实验。如实施例 2 所述, 利用抗 -OsRHC1 抗体进行蛋白质印迹分析。

[0063] CBB23 中, OsRHC1 基因表达的诱导峰值在处理第 4 天出现 (图 4A)。膜结合蛋白的蛋白质印迹分析显示在第 4 天的基因表达诱导后, CBB23 中 OsRHC1 蛋白的产量在第 6 天大大增加 (图 4B)。与 CBB23 相比, JG30 中的反应不明显, 表明有 Xa23 基因座存在可在 OsRHC1 的创伤诱导中起作用。

[0064] 实施例 4

[0065] 转基因拟南芥品系的产生

[0066] 为检验 OsRHC1 是否能在双子叶植物中介导抗性, 修饰拟南芥以产生 OsRHC1 蛋白并用丁香假单胞菌番茄致病变种 DC3000 攻击。将 OsRHC1cDNA 插入二元载体, 转基因表达由花椰菜花叶病毒 35S 启动子驱动。采用真空侵入方法 (Bechtold, N. 等, Methods Mol.

Biol. (1998)82 :259-266) 进行野生型 Co1-0 拟南芥品系的土壤杆菌介导转化。通过后代的卡那霉素耐受性表型(由二元载体中的选择标记基因编码)筛选具有单插入基因座的转基因植物。 χ^2 检验证实 T1 代中比例为 3 : 1(抗性 : 易感性)提示有单插入事件。

[0067] 只繁殖含有单插入基因座的阳性转化体以获得纯合品系用于进一步实验。通过 Northern 印迹分析检测 3 个独立纯合转基因品系中的转基因表达。如图 5A 所示,3 个转化品系, B-1-4、G-1-5 和 H-2-9 显示高水平的 mRNA 产量。然而,野生型的 Co1-0 品系未显示有 mRNA 产生。

[0068] 拟南芥在生长室中生长(温度 22-24°C;RH 70-80%;光照强度 80-120 μ E, 16 小时白天-8 小时黑夜周期)。如以前所述(由 Kim, H. S. 等, Plant Cell (2002) 14 :1469-1482 ; Uknes, S. 等, Plant Cell (1992) 4 :645-656 改进)进行 PstDC3000 培养液的制备、接种(通过浸渍方法)和随后的滴度测定。用补加了 0.02% (v/v) Silwet L-77 的 10mM MgSO₄ 配制的浓度为 10⁸ 菌落形成单位 / 毫升的 Pst DC3000 攻击 6- 周龄幼苗 (Pieterse, C. M. J. 等, Plant Cell (1998) 10 :1571-1580 ; Ton, J. 等, Mol. Plant-Microbe Interact. (2002) 15 : 27-34)。

[0069] Pst DC3000 接种在感染的 Co1-0 和用空载体 V7 转化的转基因植物中导致严重的黄化和坏死,而在所有 OsRHC1 转基因品系中疾病症状非常轻,如图 5B 所示。

[0070] 莲座丛叶片内的病原体滴度与观察到的表型一致(图 5C)。此外,显示转基因表达水平最高的 H-2-9 品系的病原体滴度也最低(比较图 5A 和 5C)。

[0071] 实施例 5

[0072] OsRHC1 的表达增强转基因拟南芥中防御标记基因的表达

[0073] 检验了 4 种防御标记基因, PR1、PR2、PDF1.2 和 Thi2.1 在转基因拟南芥中的表达。在拟南芥中,这些基因是包括 SA、JA 和 ET 在内的不同植物激素介导防御途径的标志。

[0074] 收集表达 OsRHC1 的 6 周龄拟南芥转基因品系 (B-1-4、G-1-5 和 H-2-9) 和未转化野生型 (Co1-0) 的叶片组织以制备总 RNA, 然后进行实施例 3 所述的实时 PCR。所用引物如下所示 :

[0075] PR1 :5' TCAAGATAGCCCACAAGATTATC-3' (SEQ ID NO :14) 和 5' CTTCTCGTTCACATAAT TCCCAC-3' (SEQ ID NO :15) ;

[0076] PR2 :5' ACCACCACTGATACGTCTCCTC-3' (SEQ ID NO :16) 和 5' AACTTCATACTTAGACTG TCGATC-3' (SEQ ID NO :17) ;

[0077] PDF1.2 :5' CCCTTATCTTCGCTGCTCTTGT-3' (SEQ ID NO :18) 和 5' CCCTGACCATGTCCCACTG-3' (SEQ ID NO :19) ;

[0078] Thi2.1 :5' AGCACTGCAAGTTAGGGTGTGA-3' (SEQ ID NO :20) 和 5' ACATTGTTCCGACGCTCCAT-3' (SEQ ID NO :21)。

[0079] 利用引物组 5' -GAAGGTGCTGAGTTGATTG-3' (SEQ ID NO :22) 和 5' -GGACTTGACGTTGTTTGG-3' (SEQ ID NO :23) 的微管蛋白(拟南芥 β -微管蛋白 4, 登录号 :M21415) 用于标准化结果。

[0080] 将图 6A 所示各转基因品系中 PR1(实心)、PR2(空心)、PDF1.2(阴影线)和 Thi2.1(打点的)的表达水平与 Co1-0 的那些表达水平(表达水平设置为 1)作比较。

[0081] 在常规生长条件下的 6- 周龄幼苗中,与野生型 Co1-0 相比,所有 4 种防御标记基

因表达增强(图6A)。有两种不同信号传导途径介导的PR1和PDF1.2基因的诱导倍数尤其较高。在所测试的3种独立转基因品系中,在病原体接种实验中显示转基因表达最高和最佳保护作用的H-2-9品系的PR1和PDF1.2诱导倍数也最高(与图5和6A相比)。

[0082] 当植物经历Pst DC3000攻击时,Col-0中PR1和PR2转录物的水平增加(数据未显示),但在转基因品系中这些基因的表达水平甚至更高(图6B)。虽然病原体接种未显著改变Col-0中的Thi2.1水平(数据未显示),但在转基因品系中其表达升高(图6B)。另一方面,Col-0和转基因品系中PDF1.2的表达均受Pst DC3000接种的抑制(图6B)。

[0083] 为显示OsRHC1和泛素介导的蛋白质降解之间的关系,在转基因品系中研究了MG132(一种26S蛋白酶体抑制剂)对防御标记基因表达的影响。对4周龄幼苗进行MG132处理。采用从以前报道(Abas, L.等, Nature Cell Biol. (2006) 8:249-256; Dong, C. H.等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (2006) 103:8281-8286; Guo, H.等, Cell (2003) 115:667-677; Oñate-Sánchez, L.等, Plant Physiol. (2002) 128:1313-1322)改进的方法将26S蛋白酶体抑制剂(MG132)应用于转基因拟南芥。简言之,将溶解在补加了0.01% (v/v) SilwetL-77的1% (v/v) DMSO中的50mg/L MG132倾倒在MS方板上以覆盖幼苗的根部,但不覆盖气生组织。用同样的方法进行模拟处理,除了不加MG132。4小时后,收集幼苗以供RNA提取,然后进行实时PCR。

[0084] 该处理未影响转基因的表达(数据未显示)。在Col-0中,未观察到MG132对防御标记基因的表达有显著影响。在另一方面,MG132处理下,过表达的OsRHC1对4种防御标记基因的诱导作用降低,PR1、PR2、PDF1.2和Thi2.1分别如图7A-7D所示,其中空心柱表示模拟处理,实心柱表示MG132处理。

[0085] 总之,看来在所有情况中,OsRHC1蛋白质增强防御标记基因表达的能力受到26S蛋白酶体抑制剂的抑制。因此,看来本发明蛋白质增强防御标记基因表达的能力可能依赖于26S蛋白酶体活性。

[0086] 实施例6

[0087] 转基因拟南芥中OsRHC1克隆的保护性功能依赖于NPR1的功能

[0088] 采用模型植物系统(model plant system)定位与防御信号传导网络中已知节点相关的OsRHC1的功能。介导SA和JA/ET的NPR1传递信号并在拟南芥的防御信号传导中起中心作用。如上所述,将OsRHC1转化入消除了NPR1的npr1-3拟南芥突变体。选择含单插入基因座的独立转化体。接种时,采用实施例3所述的实时PCR检测各品系中转基因的表达(在花椰菜花叶病毒35S启动子控制下)。发现npr1-3背景中OsRHC1的稳态水平与具有Col-0背景的转基因品系中的相当(数据未显示)。

[0089] 用Pst DC3000攻击表达OsRHC1的8-周龄转基因品系(D-2、E-1、F-1、G-1和G-2),未转化的npr1-3突变体和野生型Col-0,随后评估病原体滴度,如图8A所示。如实施例5所述测定防御标记基因的表达。各品系中PR1(实心)、PR2(空心)、PDF1.2(阴影线)和Thi2.1(打点)的表达与Col-0(表达水平设置为1)的相当,如图8B所示。这些转基因品系的任一种中均未发现4种选择的防御标记基因表达有显著增加。

[0090] 当npr1-3转基因品系经历Pst DC3000攻击时,在转基因品系中未观察到保护作用。这些转基因品系的疾病症状产生(数据未显示)和病原体滴度与未转化的npr1-3突变体相似。因此,保护作用看来需要NPR1。

[0091] 实施例 7

[0092] OsRHC1 转基因水稻的构建

[0093] 将图 1 所示编码 OsRHC1 的核苷酸序列亚克隆入双 T-DNA 二元载体, pSB130 (香港中文大学 Liu Qiaoquan 博士和 Samuel Sun 教授馈赠)。载体 pSB 130 携带两份 T-DNA。一份 T-DNA 具有潮霉素抗性基因 (可选择标记), 另一份在玉米泛素启动子的下游具有多克隆位点以供克隆靶基因。将重组构建物转化入土壤杆菌 EHA105 以供水稻转化, 构建转基因水稻品系。

[0094] 图 9 显示在 T2 转基因水稻品系中 PCR 筛选 OsRHC1 转基因 (亲本: 爱知旭 (Aichi Asahi))。PCR 的正向和反向引物分别来自玉米泛素启动子和 OsRHC1 编码区, 如下所示:

[0095] 正向引物: 5' CTGATGCATATACATGATGG-3' (SEQ ID NO:24);

[0096] 反向引物: 5' -ACATTGCACAACCAACATGTAC-3' (SEQ ID NO:25)。

[0097] 总共获得 5 个 OsRHC1 转基因水稻品系。

[0098] 实施例 8

[0099] 水稻中 OsRHC1 和防御标记基因的过表达

[0100] 通过实施例 3 所述的实时 PCR 研究 OsRHC1 和 3 种水稻防御标记基因 (PR1, 富含甘氨酸的细胞壁蛋白编码基因 (GRCWP) 和 PBZ1) 的表达。PR1 是熟知的 PR 蛋白。富含甘氨酸的细胞壁蛋白 (GRCWP 所编码) 是在增强的细胞壁中常见的结构蛋白以阻碍病原体攻击。PBZ1 由噻菌灵 (probenazole) (PBZ), N-氰基甲基-2-氯-异烟酰胺 (已知诱导疾病抗性的化合物) 以及真菌枯萎性病原体稻瘟菌 (*M. grisea*) 诱导。不相容的稻瘟菌菌株诱导 PBZ1 快于相容菌株。NH1 (水稻防御反应中的关键性信号传导组分) 的过表达诱导 PR1 和 PBZ1。

[0101] 从携带单插入 OsRHC1 的 8-周龄转基因水稻品系 (T3 代) 和它们的野生型亲本 (爱知旭) 提取 RNA。实时 PCR 所用引物如下所示:

[0102] 稻 (*O. sativa*) OsRHC1 正向引物: 5' -AAAGAAGAGCAAGCCCGTTAT-3' (SEQ ID NO: 26);

[0103] 稻 OsRHC1 反向引物: 5' -GCCTCCATACCTCTTCTGCAA-3' (SEQ IDNO:27);

[0104] 稻 PR1 (BF889437) 正向引物: 5' -CGGACAGAGGCCTTACTAAGTTATTT-3' (SEQ ID NO: 28);

[0105] 稻 PR1 (BF889437) 反向引物: 5' -GACCTGTTTACATTTTACGTCTTTATT-3' (SEQ ID NO: 29);

[0106] 稻 GRCWP (BF889438) 反向引物: 5' -GAGGCAACGGACACCACTAAG-3' (SEQ ID NO:30);

[0107] 稻 GRCWP (BF889438) 反向引物: 5' -TGTAAGCAGAGAGAGAGGCTCATT-3' (SEQ ID NO: 31);

[0108] 稻 PBZ1 (D38170) 正向引物: 5' -AAGCTCAAGTCACACTCGAC-3' (SEQ ID NO:32);

[0109] 稻 PBZ1 (D38170) 反向引物: 5' -GATGTCCTTCTCCTTCTCC-3' (SEQ ID NO:33)。

[0110] 用于标准化的肌动蛋白引物是:

[0111] 稻 OsAc1D (X15865) 正向引物: 5' -CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3' (SEQ ID NO: 34);

[0112] 稻 OsAc1D (X15865) 反向引物: 5' -GACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3' (SEQ ID NO: 35)。

[0113] 图 10A 显示通过实时 PCR 检测到 OsRHC1 在转基因品系中过表达。如实施例 2 所述进行的蛋白质印迹分析得到图 10B 所示结果。转化体通常显示蛋白质含量高于野生型。

[0114] 图 11 显示过表达 OsRHC1 对 3 种水稻防御标记基因表达的诱导作用。这 3 种防御标记基因的诱导程度通常与 OsRHC1 表达水平正相关。例如,显示较高 OsRHC1 水平的两种转基因 R8 和 R12 还诱导这 3 种防御标记基因更大程度的表达(比较图 10 和 11)。

[0115] 实施例 9

[0116] OsRHC1 是 E3 泛素连接酶

[0117] 本实施例证明 OsRHC1 能自泛素化,泛素 E3 连接酶的共有特性。

[0118] 制备缺乏位于 N-末端的跨膜区的 OsRHC1 的部分片段(OsRHC1p)。只包括位于 C-末端的 RING-HC 区,因为存在跨膜区使得从大肠杆菌细胞中提取困难。

[0119] 用侧接含有 RING-HC 区的 C-末端那一半的以下引物组扩增编码序列的合适 C-末端部分:HMOL5743(5'-CCGGAATTCGTTGTTCTACTATTACGAAATGG-3')(SEQ ID NO:36)和 HMOL2625(5'-CAGGTCGACGTTAAACATCATATACGGGCATG-3')(SEQ ID NO:37)。按照以下循环进行 PCR 反应:94℃,5 分钟;30 轮的 94℃、30 秒,55℃、30 秒和 72℃、1 分钟;然后是 72℃延伸 5 分钟。将扩增的产物亚克隆入具有 EcoRI 和 XhoI 限制性位点的 pGex-4T-1 载体,从而与 GST 编码区框内融合。然后在 DE3 细胞中表达融合蛋白,生长期间在 30℃,用 1.5mM IPTG 诱导 2 小时。室温下用 1mg/ml 溶菌酶裂解细菌细胞 1 小时,然后用液氮和温水浴进行 5 轮冻/融来提取 GST-OsRHC1p 蛋白。用 GE 保健公司(GH Healthcare)的 GST SpinTrap 纯化模块纯化提取的蛋白。

[0120] 在加有 400ng GST-OsRHC1p 或只有 GST 蛋白的泛素化缓冲液(40mM Tris-HCl(pH 7.5),5mM MgCl₂,2mM ATP,2mM 二硫苏糖醇,300ng/μl 泛素,25 μM MG132,5 μl 小麦胚芽提取物(提供 E1 和 E2 酶)(普罗麦格公司(Promega)))中进行体外泛素化试验。未加 ATP 和泛素的相同反应缓冲液用作阴性对照(如 Bazirgan, O. A. 等, J. Biol. Chem. (2006) 281:38989-39001;Matsuda, N. 等, J. Cell. Sci. (2001) 114:1949-1957 所述改进)。反应混合物置于室温 2 小时,然后进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,然后用抗-OsRHC1 特异性抗体进行蛋白质印迹分析(图 12)。

[0121] 在包含 ATP 和泛素的反应中(+ve)观察到 GST-OsRHC1 的自泛素化,但在不含 ATP 和泛素的反应中(-ve)未观察到。

[0122] 这些结果证明与其它 E3 连接酶相似,OsRHC1 经历自泛素化。

[0123] 实施例 10

[0124] 鉴定 OsRHC1 结合伴侣

[0125] 以 GenBank 登录号 ABA98865.1 保藏的克隆编码的蛋白质鉴定为结合伴侣。这可采用酵母菌双杂交方案确定,并通过共沉淀验证。该保藏克隆编码的蛋白质在稻(日本栽培品种(Japonica Cultivar-Group))中表达,但其不具有鉴定的功能。然而,由于其与 OsRHC1 相互作用,估计其能调节植物防御反应。

[0126] 酵母菌双杂交方法利用商品化试剂盒, BD Matchmaker™ 文库构建和筛选试剂盒(克隆技术公司 K1516-1)。首先用寡聚物 HMOL2624(5'-CCGAATTCATGCCAGCCCCTTCGCTTC-3')(SEQ ID NO:38)和 HMOL2625(5'-CAGGTCGACGTTAAACATCATATACGGGCATG-3')(SEQ ID NO:39)扩增 OsRHC1,用 EcoRI 和 SalI 消化,亚克隆入 pGBKT7 的读框中,并转化入酵母株

Y187。从用 pGBKT7-0sRHC1 和对照 pGBKT7 转化的酵母菌克隆提取蛋白质。利用抗 -c-Myc 表位标签抗体的蛋白质印迹分析证实存在与 OsRHC1 蛋白融合的 DNA 结合区。

[0127] 按照生产商的手册,将接种相应的不相容病原体 (Xa2 为 T2 ;Xa12 为 P1 ;Xa14 为 LN44 ;Pita、Pib 和 Pik 为 Ken54-04) 4 天的几种水稻品系 (各含有以下 R 基因之一 :Xa2、Xa12、Xa14、Pita、Pib 和 Pik) 的 RNA 样品用作起始材料,在酵母菌 AH109 中来构建 AD 区融合酵母菌文库。通过在 pGBKT7-0sRHC1 转化的 Y187 和 AH109 酵母菌文库之间的配对进行两轮文库筛选。在 SD-Trp、Leu 和 His (SD/-3) 琼脂板上选择酵母菌二倍体配对产物,30°C 温育 4 天。只将生长至直径 2-3mm 的菌落划线接种到 SD-Trp、Leu、His 和 Ade (SD/-4) 琼脂板上。通过 lacZ 受体基因活性的菌落转移过滤试验 (colony-lift filter assay) (《酵母菌方案手册》(Yeast Protocols Handbook),克隆技术公司 PT3024-1) 来检验选择的克隆。编码表达的蛋白质的部分克隆 (登录号 :ABA98865.1) (标记为 HML1797) 产生阳性结果。pGBKT7-0sRHC1 和 pGADT7-HML1797 的再转化 (retransformation) 入 AH109 证实这不是因为突变。

[0128] 为验证酵母菌 -2- 杂交实验的结果,进行免疫共沉淀试验。用引物 HMOL5311 (5'-A ACCCGGGATGGCCGTGGGGTCAGAG-3') (SEQ ID NO :40) 和 HMOL5312 (5'-TTCCCGGGTCAAAATAAAAAAC AAATAAAAAACAC-3') (SEQ ID NO :41) 扩增 ABA98865.1 的全长编码区,用 SmaI 消化,亚克隆入 SmaI 线形化的 pGADT7-Rec 载体以产生含有框内 HA 标签的融合蛋白 (HA-ABA98865.1) ;这称为 HML1846。联用 RiboMAX RiboMAX™ 大规模 RNA 生产系统 -T7 (普罗麦格公司)、小麦胚芽提取物 (普罗麦格公司) 和 Transcend™ 生物素 - 赖氨酰 -tRNA 系统 (普罗麦格公司) 分别体外转录并翻译该构建物。

[0129] 从过表达 OsRHC1 的水稻品系提取总蛋白 (从 Boyes, D. C. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 95 :15849-15854 ;Greve, K. 等, Biochem. J. (2003) 371 :97-108 改进)。利用 BD Matchmaker™ 免疫共沉淀试剂盒 (克隆技术公司 630449),将含有 100 μg 蛋白质的水稻样品与 40 μl 上述 HA 标签融合蛋白混合在含有 50mM Tris/HCl (pH 7.5)、250mM NaCl、2mM MgCl₂、0.5mM CaCl₂、10% (v/v) 甘油、1.5% (v/v) Triton® X-100、1mM PMSF、2mg/L 亮氨酸的免疫共沉淀缓冲液中 (从 Boyes 等, 1998 (同上) ;Greve 等, 2003 (同上) 改进)。抗 -HA 表位标记的抗体用于沉淀蛋白质复合物。利用抗 -OsRHC1 抗体检测蛋白质信号。

[0130] 蛋白质印迹显示 HA 标签融合的 ABA98865.1 沉淀了 OsRHC1,但当用融合了 HA 标签的无关蛋白质处理水稻蛋白提取物时,蛋白质印迹未检测到蛋白质。

序列表

- <110> 林汉明 (LAM, Hon-Ming)
辛世文 (SUN, Sai-Ming Samuel)
- <120> 增强植物对感染的抵抗力的方法
- <130>549072000740
- <140>PCT/US2008/068189
<141>2008-06-25
- <150>US 60/947, 365
<151>2007-06-29
- <150>US 60/947, 590
<151>2007-07-02
- <160>52
- <170>FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210>1
<211>107
<212>PRT
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成构建物
- <220>
<221>Misc_feature
<222>(1)... (107)
<223>RING 锌指 HC 亚类共有
- <220>
<221>Misc_feature
<222>(2)... (3)
<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<220>

<221>Misc_feature

<222>(5)... (43)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸,最多可有 30 个不存在

<220>

<221>Misc_feature

<222>(45)... (47)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸,最多可有 2 个不存在

<220>

<221>Misc_feature

<222>(49)... (51)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸,最多可有 1 个不存在

<220>

<221>Misc_feature

<222>(53)... (54)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<220>

<221>Misc_feature

<222>(56)... (103)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸,最多可有 44 个不存在

<220>

<221>Misc_feature

<222>(105)... (106)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<400>1

Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10

15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

25

30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa His

35

40

45

Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

50	55	60													
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
65				70						75					80
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
				85						90					95
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Cys					
				100						105					

<210>2

<211>107

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (107)

<223>RING 锌指 H2 亚类共有

<220>

<221>Misc_feature

<222>(2)... (3)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<220>

<221>Misc_feature

<222>(5)... (43)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸,最多可有 30 个不存在

<220>

<221>Misc_feature

<222>(45)... (47)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸,最多可有 2 个不存在

<220>

<221>Misc_feature

<222>(49)... (51)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸,最多可有 1 个不存在

<220>

<221>Misc_feature

<222>(53)... (54)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<220>

<221>Misc_feature

<222>(56)... (103)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸,最多可有 44 个不存在

<220>

<221>Misc_feature

<222>(105)... (106)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<400>2

Cys	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1			5					10						15	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25						30	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	His
			35					40						45	
Xaa	Xaa	Xaa	His	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			50					55						60	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
65								70						75	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
								85						90	
Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Cys					
								100						105	

<210>3

<211>24

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223> 引物	
<400>3	
ttctccatgt tcggtaaacc tttc	24
<210>4	
<211>25	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400>4	
taaagttgtg attgagacta catgg	25
<210>5	
<211>22	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400>5	
acattgcaca accaacatgt ac	22
<210>6	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400>6	
cctcactttt gtetecceac	19
<210>7	
<211>18	

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>7

cgacattgca caaccaac

18

<210>8

<211>35

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (35)

<223>RING-HC 结构域共有

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (35)

<223>Xaa 可以是任何天然产生的氨基酸

<400>8

Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

1

5

10

15

Xaa His Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys

20

25

30

Xaa Xaa Cys

35

<210>9

<211>17

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400>9

Asn Cys Gly Tyr Pro Pro Glu Val Val Arg Lys Met Pro Lys Arg Asp

1

5

10

15

Cys

<210>10

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>10

aaagaagagc aagcccggtt at

22

<210>11

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>11

gcctccatac ctcttctgca a

21

<210>12

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>12

cttcatagga atggaagctg cgggta

26

<210>13

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>13

gaccaccttg atcttcatgc tgcta 25

<210>14

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>14

tcaagatagc ccacaagatt atc 23

<210>15

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>15

cttctcgttc acataattcc cac 23

<210>16

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>16

accaccactg atacgtctcc tc 22

<210>17

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>17

aacttcatac ttagactgtc gate 24

<210>18

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>18

cccttatctt cgctgctctt gt 22

<210>19

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>19

ccctgacat gtcccacttg 20

<210>20

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>20

agcactgcaa gttagggtgt ga 22

<210>21

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>21

acattgttcc gacgctccat 20

<210>22

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>22

gaaggtgctg agttgattg 19

<210>23

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>23	
ggacttgacg ttgtttgg	18
<210>24	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物	
<400>24	
ctgatgcata tacatgatgg	20
<210>25	
<211>22	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物	
<400>25	
acattgcaca accaacatgt ac	22
<210>26	
<211>22	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物	
<400>26	
aaagaagage aagcccggtt at	22
<210>27	
<211>21	

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

<400>27

gcctccatac ctcttctgca a

21

<210>28

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<400>28

cggacagagg ccttactaag ttattt

26

<210>29

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

<400>29

gacctgttta cattttcag tctttatt

28

<210>30

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 正向引物

<400>30	
gaggcaacgg acaccactaa g	21
<210>31	
<211>25	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物	
<400>31	
tgtaaagcag agagagagge tcatt	25
<210>32	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 正向引物	
<400>32	
aagctcaagt cacactcgac	20
<210>33	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 反向引物	
<400>33	
gatgtcette tcettetec	19
<210>34	
<211>26	
<212>DNA	
<213> 人工序列	

<220>

<223> 正向引物

<400>34

cttcatagga atggaagctg cgggta

26

<210>35

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 反向引物

<400>35

gaccaccttg atcttcatgc tgcta

25

<210>36

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>36

ccggaattcg ttgttctact attacgaaat gg

32

<210>37

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>37

caggtegacg ttaaacaatca tatacgggca tg

32

<210>38

<211>27

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>38

ccgaattcat gccagccctc tcgcttc

27

<210>39

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>39

caggtcgacg ttaaacaatca tatacgggca tg

32

<210>40

<211>26

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>40

aaccgggat ggccgtgggg tcagag

26

<210>41

<211>35

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>41

ttccccggggtc aaaataaaaa caaataaaaa aacac

35

<210>42

<211>1230

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (1230)

<223>RING 锌指蛋白基因 (OsRHCl)

<220>

<221>CDS

<222>(1)... (1230)

<400>42

atg cca gcc cct tcg ctt cct cat ggc cgt cat tgg gct cct tgc cat 48

Met Pro Ala Pro Ser Leu Pro His Gly Arg His Trp Ala Pro Cys His

1 5 10 15

tca att gtt gca gcg ccg ttg crt att gcg ttt gag ctg ctg ctt tgc 96

Ser Ile Val Ala Ala Pro Leu Leu Ile Ala Phe Glu Leu Leu Leu Cys

20 25 30

ata tat ctc gaa agt ttg aga gtt aaa agt aag ccg act gtt gat ttg 144

Ile Tyr Leu Glu Ser Leu Arg Val Lys Ser Lys Pro Thr Val Asp Leu

35 40 45

aag att gta ttc ctt cct ctt ctg gcc ttt gaa gtg att att ctt gtt 192

Lys Ile Val Phe Leu Pro Leu Leu Ala Phe Glu Val Ile Ile Leu Val

50 55 60

gac aat ttc aga atg tgt aga gct tta atg cca gga gat gaa gaa agt 240

Asp Asn Phe Arg Met Cys Arg Ala Leu Met Pro Gly Asp Glu Glu Ser

65 70 75 80

atg agc gat gaa gct att tgg gag aca ctt cct cac ttt tgg gtt gca 288

Met Ser Asp Glu Ala Ile Trp Glu Thr Leu Pro His Phe Trp Val Ala	
85	90
att tct atg gtg ttt ctt ata gct gct aca acc ttc aca ctt ttg aag	336
Ile Ser Met Val Phe Leu Ile Ala Ala Thr Thr Phe Thr Leu Leu Lys	
100	105
ctg tct ggt gat gtt ggt gct ttg gga tgg tgg gat ttg ttt ata aat	384
Leu Ser Gly Asp Val Gly Ala Leu Gly Trp Trp Asp Leu Phe Ile Asn	
115	120
tat gga atc gcg gag tgt ttt gca ttt ctt gtt tgt act aga tgg ttt	432
Tyr Gly Ile Ala Glu Cys Phe Ala Phe Leu Val Cys Thr Arg Trp Phe	
130	135
aat ccc atg att cat aaa tct cct aat cct ggg gag gct agc tca tca	480
Asn Pro Met Ile His Lys Ser Pro Asn Pro Gly Glu Ala Ser Ser Ser	
145	150
tca gcg gca att aga tac cgt gat tgg gag agt ggt ctt ctc ctc cca	528
Ser Ala Ala Ile Arg Tyr Arg Asp Trp Glu Ser Gly Leu Leu Leu Pro	
165	170
tca cta gaa gat cat gaa caa gag agg ctc tgt ggt ctt cct gac ata	576
Ser Leu Glu Asp His Glu Gln Glu Arg Leu Cys Gly Leu Pro Asp Ile	
180	185
ggc ggt cac gta atg aaa ata cca ctg gtg att ttc caa gtt ttg ctt	624
Gly Gly His Val Met Lys Ile Pro Leu Val Ile Phe Gln Val Leu Leu	
195	200
tgt atg cgc ttg gag ggt acg cct cct agt gct cag tat att ccg ata	672
Cys Met Arg Leu Glu Gly Thr Pro Pro Ser Ala Gln Tyr Ile Pro Ile	
210	215
ttt gca ctg ttc tcc cca cta ttt att tta caa ggc gct ggt gtc ctt	720
Phe Ala Leu Phe Ser Pro Leu Phe Ile Leu Gln Gly Ala Gly Val Leu	
225	230
ttc tct cta gca aga ttg ttg gag aag gtt gtt cta cta tta cga aat	768
Phe Ser Leu Ala Arg Leu Leu Glu Lys Val Val Leu Leu Leu Arg Asn	
245	250
gga cca gtt agt cct aat tac ctt aca atc tca tca aaa gtc cgt gat	816
Gly Pro Val Ser Pro Asn Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Lys Val Arg Asp	
260	265
tgc ttt gct ttt ctt cat cgt ggt tca agg ctt ctt ggt tgg tgg tct	864
Cys Phe Ala Phe Leu His Arg Gly Ser Arg Leu Leu Gly Trp Trp Ser	
275	280
att gat gaa ggc agc aaa gaa gag caa gcc cgg tta ttc tat act gaa	912

```

Ile Asp Glu Gly Ser Lys Glu Glu Gln Ala Arg Leu Phe Tyr Thr Glu
  290                295                300
tct act ggg tac aac aca ttt tgt ggc tat cca cct gag gta gtc agg 960
Ser Thr Gly Tyr Asn Thr Phe Cys Gly Tyr Pro Pro Glu Val Val Arg
305                310                315                320
aaa atg cct aag agg gat ctt gca gaa gag gta tgg agg ctc caa gca 1008
Lys Met Pro Lys Arg Asp Leu Ala Glu Glu Val Trp Arg Leu Gln Ala
                325                330                335
gct ttg gga gag caa tca gaa att acc aaa tgt acc aag cag gaa ttt 1056
Ala Leu Gly Glu Gln Ser Glu Ile Thr Lys Cys Thr Lys Gln Glu Phe
                340                345                350
gaa agg ctt caa aat gag aag gtt ctt tgt agg att tgc tac gag ggg 1104
Glu Arg Leu Gln Asn Glu Lys Val Leu Cys Arg Ile Cys Tyr Glu Gly
                355                360                365
gag ata tgc atg gtc tta ctt cct tgc cgg cac aga aca tta tgc aag 1152
Glu Ile Cys Met Val Leu Leu Pro Cys Arg His Arg Thr Leu Cys Lys
                370                375                380
act tgt tct gat aag tgc aag aaa tgt cca atc tgc cgt gtg ccc att 1200
Thr Cys Ser Asp Lys Cys Lys Lys Cys Pro Ile Cys Arg Val Pro Ile
385                390                395                400
gaa gaa cgc atg ccc gta tat gat gtt taa 1230
Glu Glu Arg Met Pro Val Tyr Asp Val *
                405

```

<210>43

<211>409

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (409)

<223>RING 锌指蛋白基因 (OsRHC1)

<400>43

Met Pro Ala Pro Ser Leu Pro His Gly Arg His Trp Ala Pro Cys His

1	5	10	15
Ser Ile Val Ala Ala Pro Leu Leu Ile Ala Phe Glu Leu Leu Leu Cys			
	20	25	30
Ile Tyr Leu Glu Ser Leu Arg Val Lys Ser Lys Pro Thr Val Asp Leu			
	35	40	45
Lys Ile Val Phe Leu Pro Leu Leu Ala Phe Glu Val Ile Ile Leu Val			
	50	55	60
Asp Asn Phe Arg Met Cys Arg Ala Leu Met Pro Gly Asp Glu Glu Ser			
65	70	75	80
Met Ser Asp Glu Ala Ile Trp Glu Thr Leu Pro His Phe Trp Val Ala			
	85	90	95
Ile Ser Met Val Phe Leu Ile Ala Ala Thr Thr Phe Thr Leu Leu Lys			
	100	105	110
Leu Ser Gly Asp Val Gly Ala Leu Gly Trp Trp Asp Leu Phe Ile Asn			
	115	120	125
Tyr Gly Ile Ala Glu Cys Phe Ala Phe Leu Val Cys Thr Arg Trp Phe			
	130	135	140
Asn Pro Met Ile His Lys Ser Pro Asn Pro Gly Glu Ala Ser Ser Ser			
145	150	155	160
Ser Ala Ala Ile Arg Tyr Arg Asp Trp Glu Ser Gly Leu Leu Leu Pro			
	165	170	175
Ser Leu Glu Asp His Glu Gln Glu Arg Leu Cys Gly Leu Pro Asp Ile			
	180	185	190
Gly Gly His Val Met Lys Ile Pro Leu Val Ile Phe Gln Val Leu Leu			
	195	200	205
Cys Met Arg Leu Glu Gly Thr Pro Pro Ser Ala Gln Tyr Ile Pro Ile			
	210	215	220
Phe Ala Leu Phe Ser Pro Leu Phe Ile Leu Gln Gly Ala Gly Val Leu			
225	230	235	240
Phe Ser Leu Ala Arg Leu Leu Glu Lys Val Val Leu Leu Leu Arg Asn			
	245	250	255
Gly Pro Val Ser Pro Asn Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Lys Val Arg Asp			
	260	265	270
Cys Phe Ala Phe Leu His Arg Gly Ser Arg Leu Leu Gly Trp Trp Ser			
	275	280	285
Ile Asp Glu Gly Ser Lys Glu Glu Gln Ala Arg Leu Phe Tyr Thr Glu			
	290	295	300
Ser Thr Gly Tyr Asn Thr Phe Cys Gly Tyr Pro Pro Glu Val Val Arg			
305	310	315	320

Tyr Ala Arg Trp Pro Pro Ala Val Ser Leu Lys Ile Ala Phe Leu Pro
 100 105 110
 Leu Leu Ala Phe Glu Leu Thr Ile Leu Val Asp Asn Leu Arg Met Cys
 115 120 125
 Arg Ala Leu Met Pro Gly Asp Asp Asp Ser Ile Thr Asp Asp Ala Ile
 130 135 140
 Trp Glu Ala Leu Pro His Phe Trp Val Ala Ile Ser Met Val Phe Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Ala Thr Phe Phe Thr Leu Leu Lys Leu Ser Gly Asp Val Val
 165 170 175
 Ala Leu Gly Trp Trp Asp Leu Phe Ile Asn Phe Gly Ile Ala Glu Cys
 180 185 190
 Phe Ala Phe Leu Val Cys Thr Lys Trp Ser Asn Pro Val Ile His Arg
 195 200 205
 Ser Ser Arg Ala Arg Glu Thr Gly Ser Ser Ser Thr Ser Ile Arg Tyr
 210 215 220
 Leu Asp Trp Asn Ser Gly Leu Val Val Ala Pro Glu Glu Asp Arg His
 225 230 235 240
 Gln Asp Arg Trp Cys Gly Leu Gln Asp Ile Gly Gly His Met Leu Lys
 245 250 255
 Ile Pro Val Ile Leu Phe Gln Val Val Leu Cys Met Tyr Leu Glu Gly
 260 265 270
 Thr Pro Glu Arg Ala Lys Asp Ile Ser Ile Pro Val Leu Phe Ser Pro
 275 280 285
 Leu Phe Leu Leu Gln Gly Leu Gly Val Leu Phe Ala Ala Ser Lys Leu
 290 295 300
 Leu Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Arg Gly Glu Ala Gly Pro Gly Leu
 305 310 315 320
 Tyr Phe Arg Phe Ser Ser Ser Ala His Asp Cys Leu Gly Phe Leu His
 325 330 335
 His Gly Ser Arg Leu Leu Gly Trp Trp Ser Ile Asp Glu Gly Ser Arg
 340 345 350
 Glu Glu Gln Ala Arg Leu Tyr Phe Asp Gln Glu Ser Gly Tyr Asn Thr
 355 360 365
 Phe Ser Gly His Pro Pro Glu Ile Val Lys Lys Met Pro Lys Glu Asp
 370 375 380
 Leu Ala Glu Glu Val Trp Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gly Glu Gln Thr
 385 390 395 400
 Glu Ile Thr Lys Phe Ser Gln Gln Glu Tyr Glu Arg Leu Gln Asn Glu

115	120	125
Arg Ala Leu Met Pro Gly Asp Glu Glu Ser Val Asn Asp Glu Ala Val		
130	135	140
Trp Glu Ala Leu Pro His Phe Trp Val Ala Ile Ser Met Val Phe Phe		
145	150	155
Leu Ala Ala Thr Val Phe Thr Leu Leu Lys Leu Ser Gly Asp Val Ala		
165	170	175
Ala Leu Gly Trp Trp Asp Leu Phe Ile Asn Phe Gly Ile Ala Glu Cys		
180	185	190
Phe Ala Phe Leu Val Cys Thr Lys Trp Ser Asn Pro Val Ile His Arg		
195	200	205
Ser Ser Arg Asp Arg Glu Thr Gly Ser Ser Ser Thr Asn Ile Arg Tyr		
210	215	220
Leu Asp Trp Asn Ser Gly Leu Gly Val Phe Ser Glu Asp Asp Arg Asn		
225	230	235
Gln Asp Thr Cys Gly Leu Gln Asp Ile Gly Gly His Ile Met Lys Ile		
245	250	255
Pro Leu Ile Val Phe Gln Val Val Leu Cys Met His Leu Glu Gly Thr		
260	265	270
Pro Glu Ala Ala Lys Ser Ile Ser Val Pro Val Leu Phe Ser Pro Leu		
275	280	285
Phe Leu Leu Gln Gly Val Gly Val Leu Phe Ala Ala Ser Lys Leu Ile		
290	295	300
Glu Lys Val Val Leu Leu Leu Arg Gly Glu Asp Asp Thr Gly Leu Tyr		
305	310	315
Phe Arg Phe Leu Ser Arg Ala His Asp Cys Leu Gly Phe Leu His His		
325	330	335
Gly Ser Arg Leu Leu Gly Trp Trp Ser Ile Asp Glu Gly Ser Arg Glu		
340	345	350
Glu Glu Ala Arg Leu Tyr Phe Asp Gln Glu Ser Gly Tyr Asn Thr Phe		
355	360	365
Cys Gly His Pro Pro Glu Ile Val Lys Lys Met Pro Lys Lys Glu Leu		
370	375	380
Ala Glu Glu Val Trp Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gly Glu Gln Thr Glu		
385	390	395
Ile Thr Lys Phe Ser Gln Gln Glu Tyr Glu Arg Leu Gln Asn Glu Lys		
405	410	415
Val Leu Cys Arg Val Cys Phe Glu Arg Glu Ile Ser Val Val Leu Leu		
420	425	430

Pro Cys Arg His Arg Val Leu Cys Arg Asn Cys Ser Asp Lys Cys Lys
 435 440 445
 Lys Cys Pro Phe Cys Arg Ile Thr Ile Glu Glu Arg Leu Pro Val Tyr
 450 455 460
 Asp Val
 465

<210>46

<211>467

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (467)

<223>注释的蛋白 AAW81737

<400>46

Met Ser Cys Arg Arg Val Leu Lys Ser Ile Gln Ala Leu Ala Ala His
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Phe Ser Phe Thr Leu Phe Leu Val Phe Lys Leu Asp His
 20 25 30
 Thr Leu Ser Cys Ser Trp Trp Met Val Phe Phe Pro Leu Trp Ala Phe
 35 40 45
 His Ala Val Val Ala Arg Gly Arg Phe Ser Leu Pro Ala Pro Ile Ala
 50 55 60
 Pro Arg Asn Arg His Trp Ala Pro Cys His Ala Val Val Ala Thr Pro
 65 70 75 80
 Leu Leu Val Ser Phe Glu Leu Leu Leu Cys Ile Tyr Leu Glu Ser Ser
 85 90 95
 Tyr Ala Ser Trp Pro Pro Ala Val Ser Leu Arg Ile Ala Ser Leu Pro
 100 105 110
 Leu Leu Ala Phe Glu Val Thr Ile Leu Ile Asp Asn Leu Arg Met Cys
 115 120 125
 Arg Ala Leu Met Pro Gly Asp Asp Asp Ser Ile Asn Asp Glu Ala Ile
 130 135 140
 Trp Glu Ala Leu Pro His Phe Trp Val Ala Ile Ser Met Val Phe Thr

145	150	155	160
Leu Ala Ala Thr Phe Phe Ala Leu Leu Lys Leu Thr Gly Asp Val Ala			
	165	170	175
Ala Leu Ser Trp Trp Asp Leu Phe Ile Asn Val Gly Ile Ala Glu Cys			
	180	185	190
Phe Ala Phe Leu Val Cys Thr Lys Trp Ser Asn Pro Val Ile His Arg			
	195	200	205
Ser Ser Arg Pro Arg Glu Thr Gly Ser Ser Ser Thr Pro Val Arg Tyr			
	210	215	220
Leu Asp Trp Asn Ser Gly Leu Val Val Thr Pro Glu Gln Asp Asn His			
225	230	235	240
Gln Asp Arg Tyr Cys Gly Leu Gln Asp Ile Gly Gly His Leu Leu Lys			
	245	250	255
Ile Pro Val Ile Val Phe Gln Val Val Leu Cys Met His Leu Glu Gly			
	260	265	270
Thr Pro Glu Arg Ala Lys Asp Ile Ser Ile Pro Val Leu Phe Ser Pro			
	275	280	285
Ile Phe Leu Leu Gln Gly Leu Gly Val Leu Phe Ala Thr Ser Lys Leu			
	290	295	300
Ile Glu Lys Ile Val Asp Leu Leu Gln Gly Glu Ala Gly Thr Gly Leu			
305	310	315	320
Tyr Phe Arg Val Ser Ser Arg Ala His Asp Cys Leu Gly Phe Leu His			
	325	330	335
His Gly Ser Arg Leu Leu Gly Trp Trp Ser Ile Asp Glu Gly Ser Arg			
	340	345	350
Glu Glu Gln Ala Arg Leu Tyr Phe Asp Gln Glu Ser Gly Tyr Asn Thr			
	355	360	365
Phe Ser Gly His Pro Pro Glu Ile Val Lys Lys Met Pro Lys Glu Asp			
	370	375	380
Leu Ala Glu Glu Val Trp Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gly Glu Gln Thr			
385	390	395	400
Glu Ile Thr Lys Phe Ser Gln Gln Glu Tyr Glu Arg Leu Gln Asn Glu			
	405	410	415
Lys Val Leu Cys Arg Val Cys Phe Glu Lys Glu Ile Ser Leu Val Leu			
	420	425	430
Leu Pro Cys Arg His Arg Val Leu Cys Arg Ile Cys Ser Asp Lys Cys			
	435	440	445
Thr Lys Cys Pro Ile Cys Arg Val Ala Ile Glu Glu Arg Leu Leu Val			
	450	455	460

Tyr Asp Val

465

<210>47

<211>466

<212>PRT

<213>人工序列

<220>

<223>合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (466)

<223>注释的蛋白 BAE71207

<400>47

Met	Ser	Trp	Ser	Arg	Val	Leu	Lys	Ser	Ala	Gln	Ala	Phe	Ala	Ala	His
1				5					10					15	
Thr	Phe	Leu	Leu	Cys	Phe	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	Asp	His
				20					25					30	
Gln	Ile	Ser	Ser	Ser	Trp	Trp	Ile	Ile	Phe	Ser	Pro	Leu	Trp	Met	Phe
		35					40						45		
His	Gly	Val	Val	Ala	Arg	Gly	Arg	Phe	Ser	Leu	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala
		50					55					60			
Pro	Arg	Asn	Arg	His	Trp	Ala	Pro	Cys	His	Ala	Val	Val	Ala	Met	Pro
65				70						75				80	
Leu	Leu	Ile	Ala	Phe	Glu	Leu	Leu	Leu	Cys	Ile	Tyr	Leu	Glu	Ser	Leu
				85						90				95	
Tyr	Val	Arg	Gly	Phe	Pro	Ala	Val	Asp	Leu	Lys	Ile	Val	Phe	Leu	Pro
				100						105				110	
Leu	Leu	Thr	Phe	Glu	Val	Ile	Ile	Leu	Ile	Asp	Asn	Phe	Arg	Met	Cys
				115						120				125	
Lys	Ala	Leu	Met	Pro	Gly	Asp	Glu	Glu	Arg	Met	Ser	Asp	Glu	Ala	Ile
				130						135				140	
Trp	Glu	Thr	Leu	Pro	His	Phe	Trp	Val	Ala	Ile	Ser	Met	Val	Phe	Phe
145					150					155				160	
Val	Ala	Ala	Thr	Val	Phe	Thr	Leu	Leu	Lys	Leu	Ser	Gly	Ser	Val	Ala
				165						170				175	

Ser Leu Gly Trp Trp Asp Leu Phe Ile Asn Phe Thr Ile Ala Glu Cys
 180 185 190
 Phe Ala Phe Leu Val Cys Thr Lys Trp Ser Asn Pro Val Ile His Arg
 195 200 205
 Ser Ser Arg Glu Pro Ser Ser Ser Ser Thr Thr Ile Arg Tyr Leu
 210 215 220
 Asp Trp Asn Asn Gly Leu Leu Val Ser Ser Glu Glu Asp Gln Arg Gln
 225 230 235 240
 Ala Arg Ile Cys Thr Leu Gln Asp Ile Gly Gly His Phe Met Lys Val
 245 250 255
 Pro Ile Ile Val Phe Gln Val Leu Leu Cys Met His Leu Glu Gly Thr
 260 265 270
 Pro Ala Phe Ala Ala Gln Leu Pro Leu Ala Val Leu Phe Ser Pro Leu
 275 280 285
 Phe Val Leu Gln Gly Val Gly Val Ile Leu Ser Ala Ser Lys Phe Val
 290 295 300
 Glu Lys Leu Val Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ala Gly Gly Gly Leu Tyr
 305 310 315 320
 Phe Arg Val Ser Ser Ile Ala His Asp Cys Leu Gly Phe Leu His His
 325 330 335
 Gly Ser Arg Leu Leu Gly Trp Trp Ser Ile Asp Glu Gly Ser Arg Glu
 340 345 350
 Glu Gln Ala Arg Leu Tyr His Glu Gly Ala Ser Gly Tyr Asn Thr Phe
 355 360 365
 Ser Gly Tyr Pro Pro Glu Ile Val Lys Lys Met Pro Lys Arg Asp Leu
 370 375 380
 Ala Glu Glu Val Trp Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gly Glu Gln Thr Glu
 385 390 395 400
 Ile Thr Lys Tyr Ser Gln Gln Glu Tyr Glu Arg Leu Lys Asn Glu Lys
 405 410 415
 Val Leu Cys Arg Ile Cys Phe Glu Gly Glu Ile Ser Val Val Leu Leu
 420 425 430
 Pro Cys Arg His Arg Val Leu Cys Ser Leu Cys Ser Glu Lys Cys Lys
 435 440 445
 Met Cys Pro Ile Cys Arg Asn Tyr Ile Ala Glu Arg Leu Pro Val Tyr
 450 455 460
 Asp Val
 465

<210>48

<211>468

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (468)

<223> 注释的蛋白 NP_564945

<400>48

```

Met Leu Val Gln Arg Arg Val Met Ser Trp Arg Arg Val Trp Lys Ser
 1             5             10             15
Phe Gln Ala Ala Ser Ala His Cys Leu Leu Phe Ser Phe Thr Leu Leu
      20             25             30
Leu Ala Leu Lys Leu Asp His Val Val Ser His Ser Trp Trp Phe Val
      35             40             45
Phe Ala Pro Leu Trp Leu Phe His Ala Val Ile Ala Arg Gly Arg Phe
 50             55             60
Ser Leu Pro Ala Pro Ser Met Pro His Asp Arg His Trp Ala Pro Phe
65             70             75             80
His Ser Val Met Ala Thr Pro Leu Leu Val Ala Phe Glu Ile Leu Leu
      85             90             95
Cys Val His Leu Glu Asp Lys Tyr Val Val Asp Leu Lys Ile Val Phe
      100            105            110
Leu Pro Leu Leu Ala Phe Glu Val Ala Ile Leu Ile Asp Asn Val Arg
      115            120            125
Met Cys Arg Thr Leu Met Pro Gly Asp Glu Glu Thr Met Ser Asp Glu
      130            135            140
Ala Ile Trp Glu Thr Leu Pro His Phe Trp Val Ser Ile Ser Met Val
      145            150            155            160
Phe Phe Ile Ala Ala Thr Thr Phe Thr Leu Leu Lys Leu Cys Gly Asp
      165            170            175
Val Ala Ala Leu Gly Trp Trp Asp Leu Phe Ile Asn Phe Gly Ile Ala
      180            185            190
Glu Cys Phe Ala Phe Leu Val Cys Thr Lys Trp Ser Asn Gln Ser Ile

```

195	200	205
His Arg Tyr Ser His Ile Pro Glu Pro Ser Ser Ser Ser Met Val Val		
210	215	220
Arg Tyr Leu Asp Trp Asn Arg Gly Leu Val Val Thr Ala Asp Asp Glu		
225	230	235
His Gln Gln Ser Asn Arg Ile Cys Gly Leu Gln Asp Ile Gly Gly His		
245	250	255
Val Met Lys Ile Pro Phe Val Thr Phe Gln Ile Ile Leu Phe Met Arg		
260	265	270
Leu Glu Gly Thr Pro Ala Ser Ala Lys Asn Ile Pro Ile Leu Val Leu		
275	280	285
Phe Val Pro Leu Phe Leu Leu Gln Gly Ala Gly Val Leu Phe Ala Met		
290	295	300
Tyr Arg Leu Val Glu Lys Ser Val Leu Leu Ile Asn Ser Gly Ser Gly		
305	310	315
Ser Tyr Gly Arg Tyr Phe Thr Ala Thr Ser Ser Ala Arg Glu Phe Leu		
325	330	335
Gly Phe Phe Gln His Gly Ala Arg Leu Leu Gly Trp Trp Ser Ile Asp		
340	345	350
Glu Gly Ser Arg Glu Glu Gln Ala Arg Leu Tyr Ser Gly Glu Ala Thr		
355	360	365
Gly Tyr Asn Thr Phe Ser Pro Glu Val Val Lys Lys Met Pro Lys Ser		
370	375	380
Asp Leu Val Glu Glu Ile Trp Arg Leu Gln Ala Ala Leu Ser Glu Gln		
385	390	395
Thr Asp Ile Thr Ser Tyr Ser Gln Gln Glu Tyr Glu Arg Leu Gln Asn		
405	410	415
Glu Lys Ile Leu Cys Arg Val Cys Phe Glu Asp Pro Ile Asn Val Val		
420	425	430
Leu Leu Pro Cys Arg His His Val Leu Cys Ser Thr Cys Cys Glu Lys		
435	440	445
Cys Lys Lys Cys Pro Ile Cys Arg Val Leu Ile Glu Glu Arg Met Pro		
450	455	460
Val Tyr Asp Val		
465		

<210>49

<211>497

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (497)

<223> 注释的蛋白 ABE90658

<400>49

```

Met Leu Val Arg Arg Arg Val Met Ser Trp Arg Arg Val Phe Lys Ser
 1           5           10           15
Leu Gln Ala Met Leu Ala His Ala Phe Leu Phe Ser Phe Ser Leu Leu
           20           25           30
Leu Val Leu Lys Leu Asp Arg Phe Phe Leu Phe Ser Trp Trp Thr Val
           35           40           45
Phe Phe Pro Leu Trp Leu Phe His Val Val Ile Ala Arg Gly Arg Phe
 50           55           60
Ser Leu Pro Ala Pro Ser Met Pro His Gly Arg Gln Trp Ala Pro Cys
65           70           75           80
His Ser Val Ile Ala Thr Pro Leu Leu Val Ala Phe Glu Leu Leu Leu
           85           90           95
Cys Ile His Leu Gly Ser Ser Tyr Val Val Asn Leu Lys Ile Val Phe
           100          105          110
Ile Pro Leu Ile Ala Phe Glu Leu Ala Ile Leu Ile Asp Asn Ile Arg
           115          120          125
Met Cys Arg Ala Leu Met Pro Gly Asp Glu Glu Asn Met Thr Asp Glu
           130          135          140
Ala Val Trp Glu Thr Leu Pro His Phe Trp Ile Ser Ile Ser MetVal
           145          150          155          160
Phe Phe Val Ala Ala Thr Val Phe Thr Leu Leu Lys Ile Cys Gly Asp
           165          170          175
Val Ala Ala Leu Gly Trp Trp Asp Leu Phe Ile Asn Tyr Gly Tyr Asn
           180          185          190
Gln Tyr Leu Leu Val Asp Cys Phe Lys His Phe Ile Leu Ile Leu Tyr
           195          200          205
Phe Phe His His Lys Leu Ile Leu Ser Phe Cys Ser Ile Ala Gln Cys
           210          215          220

```


<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (498)

<223> 注释的蛋白 AAF25982

<400>50

```

Met Val Phe Phe Pro Leu Trp Ala Phe His Ala Val Val Ala Arg Gly
 1           5           10           15
Arg Phe Ser Leu Pro Ala Pro Val Ala Pro Arg Asn Arg His Trp Ala
           20           25           30
Pro Cys His Ala Val Val Ala Thr Pro Leu Leu Val Ala Phe Glu Leu
           35           40           45
Leu Leu Cys Ile Tyr Leu Glu Ser Ser Tyr Ala Arg Trp Pro Pro Ala
 50           55           60
Val Ser Leu Lys Ile Ala Phe Leu Pro Leu Leu Ala Phe Glu Leu Thr
65           70           75           80
Ile Leu Val Asp Asn Leu Arg Met Cys Arg Ala Leu Met Pro Gly Asp
           85           90           95
Asp Asp Ser Ile Thr Asp Asp Ala Ile Trp Glu Ala Leu Pro Val Ser
           100          105          110
Pro Leu Leu Leu His Lys Ile Phe Glu Gly Leu Ser Leu Arg Leu Gly
           115          120          125
Lys Ile Asn Leu Leu Asn Met Asn Glu Asn Leu Ser Leu Ile Phe Gln
           130          135          140
Leu His Asn Ser Gly Leu Arg Arg Glu Lys Thr Leu Thr Asn His Phe
145          150          155          160
Trp Val Ala Ile Ser Met Val Phe Thr Leu Ala Ala Thr Phe Phe Thr
           165          170          175
Leu Leu Lys Leu Ser Val Phe Glu Lys Tyr Leu Pro Phe Leu Trp Leu
           180          185          190
Leu Val Lys Asn Met Lys Val Ile Tyr Met Lys Cys Ser Ala Cys Arg
           195          200          205
Ile Ala Glu Cys Phe Ala Phe Leu Val Cys Thr Lys Trp Ser Asn Pro
           210          215          220

```

Val Ile His Arg Ser Ser Arg Ala Arg Glu Thr Gly Ser Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 Ser Ile Arg Tyr Leu Asp Trp Asn Ser Gly Leu Val Val Ala Pro Glu
 245 250 255
 Glu Asp Arg His Gln Asp Arg Trp Cys Gly Leu Gln Asp Ile Gly Gly
 260 265 270
 His Met Leu Lys Ile Pro Val Ile Leu Phe Gln Val Val Leu Cys Met
 275 280 285
 Tyr Leu Glu Gly Thr Pro Glu Arg Ala Lys Asp Ile Ser Ile Pro Val
 290 295 300
 Leu Phe Ser Pro Leu Phe Leu Leu Gln Gly Leu Gly Val Leu Phe Ala
 305 310 315 320
 Ala Ser Lys Leu Leu Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Arg Gly Glu Ala
 325 330 335
 Gly Pro Gly Leu Tyr Phe Arg Phe Ser Ser Ser Ala His Asp Cys Leu
 340 345 350
 Gly Phe Leu His His Gly Ser Arg Leu Leu Gly Trp Trp Ser Ile Asp
 355 360 365
 Glu Gly Ser Arg Glu Glu Gln Ala Arg Leu Tyr Phe Asp Gln Glu Ser
 370 375 380
 Gly Leu Val Trp Arg Leu Gln Ala Ala Leu Gly Glu Gln Thr Glu Ile
 385 390 395 400
 Thr Lys Phe Ser Gln Gln Glu Tyr Glu Arg Leu Gln Asn Val Tyr Ser
 405 410 415
 Phe Ile Ser His Asp Val Phe Val Thr Phe Leu Phe Arg Phe Tyr Phe
 420 425 430
 Phe Pro Leu Leu Asn Pro Val Ser Met Cys Leu Leu Leu Gln Glu Lys
 435 440 445
 Val Leu Cys Arg Val Cys Phe Glu Lys Asp Ile Ser Leu Val Leu Leu
 450 455 460
 Pro Cys Arg His Arg Val Leu Cys Arg Thr Cys Ala Asp Lys Cys Thr
 465 470 475 480
 Thr Cys Pro Ile Cys Arg Ile Asp Ile Glu Lys Arg Leu Ser Val Tyr
 485 490 495
 Asp Val

<210>51

<211>354

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (354)

<223>OsRHC1 结合伴侣

<220>

<221>CDS

<222>(1)... (354)

<400>51

```

atg gcc gtg ggg tca gag cgg ctc ggc gag gag gcc gcc cgg cgg cag 48
Met Ala Val Gly Ser Glu Arg Leu Gly Glu Glu Ala Ala Arg Arg Gln
  1           5           10           15
ctc ggc gag gca agg aag gcc aga ggc ggc tgc tcg gcg acg agg gac 96
Leu Gly Glu Ala Arg Lys Ala Arg Gly Gly Cys Ser Ala Thr Arg Asp
           20           25           30
ggc gcc gat gat gag ggc cgg cgg cag ata aac cct ccc tcc ccg gtg 144
Gly Ala Asp Asp Glu Gly Arg Arg Gln Ile Asn Pro Pro Ser Pro Val
           35           40           45
tgg tcg tcc cct ccc tca ctc cct ctt cct ctc aga tct gcc cgg agg 192
Trp Ser Ser Pro Pro Ser Leu Pro Leu Pro Leu Arg Ser Ala Arg Arg
           50           55           60
ggg acg ggt gga ggc cgg cgg cct ccc ttc cct ctt tcc tct cag atc 240
Gly Thr Gly Gly Gly Arg Arg Pro Pro Phe Pro Leu Ser Ser Gln Ile
65           70           75           80
cgc ccg gtg ggg aga ggc cac cgg cgg cag cgg cat ggc cct ccc ctc 288
Arg Pro Val Gly Arg Gly His Arg Arg Gln Arg His Gly Pro Pro Leu
           85           90           95
tgc agc agt aga ggg cgg cag gga gga ggc cac aga gct gtg ttt ttt 336
Cys Ser Ser Arg Gly Arg Gln Gly Gly Gly His Arg Ala Val Phe Phe
           100          105          110
tat ttg ttt tta ttt tga 354
Tyr Leu Phe Leu Phe *
```

115

<210>52

<211>117

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<220>

<221>Misc_feature

<222>(1)... (117)

<223>OsRHC1 结合伴侣

<400>52

```

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

```



```

atgccagcccttcgcttccctcatggccgcatgggctccttgccattcaattgttga
M P A P S L P H G R H W A P C H S I V A
gcgccgttgcttattgcgcttgagctgctgctttgcatatatctcgaaagttgagagt
A P L L I A F E L L L C I Y L E S L R V
aaaagtaagccgactgttgattgaagattgtattccttccctctctggcctttgaagtg
K S K P T V D L K I V F L P L L A F E V
attattcttgttgacaatttcagaatgtgtagagctttaatgccaggagatgaagaaagt
I I L V D N F R M C R A L M P G D E E S
atgagcgatgaagctatttgggagacacttccctcacttttgggttgcaatttctatggtg
M S D E A I W E T L P H F W V A I S M V
ttcttatagctgtacaaccttcacacttttgaagctgtctgggtgatgttgggtccttg
F L I A A T T F T L L K L S G D V G A L
ggatggtgggattgtttataaattatggaatcgggagtggttttgcaatttcttgtttgt
G W W D L F I N Y G I A E C F A F L V C
actagatggtttaatcccatgattcataaatctcctaactcctggggaggctagctcatca
T R W F N P M I H K S P N P G E A S S S
tcagcggcaattagataccgtgattgggagagtggtcttctcctcccatcactagaagat
S A A I R Y R D W E S G L L L P S L E D
catgaacaagagaggctctgtggtcttctgacataggcggtcacgtaatgaaaatacca
H E Q E R L C G L P D I G G H V M K I P
ctggtgattttccaagtttgccttgtatgcgcttggagggtacgcctcctagtgtcag
L V I F Q V L L C M R L E G T P P S A Q
tatattccgatatttgcactgttctcccactatttattttacaaggcgtgggtgtcctt
Y I P I F A L F S P L F I L Q G A G V L
ttctctctagcaagattgttggagaaggttgttctactattacgaaatggaccagttagt
F S L A R L L E K V V L L L R N G P V S
cctaattaccittacaatctcatcaaaagtcggtgattgctttgcttttcttcacgtggt
P N Y L T I S S K V R D C F A F L H R G
tcaaggcttcttgggtggtctattgatgaaggcagcaagaagagcaagcccgtta
S R L L G W W S I D E G S K E E Q A R L
ttctatactgaatctactgggtacaacacattttgtggctatccacctgaggtagtcagg
F Y T E S T G Y N T F C G Y P P E V V R
aaaatgcctaagaggatcttgcagaagaggtatggaggctccaagcagctttgggagag
K M P K R D L A E E V W R L Q A A L G E
caatcagaaattaccaatgtaccaagcaggaatttgaaggcttcaaaatgagaaggtt
Q S E I T K C T K Q E F E R L Q N E K V
ctttgtaggatttgcacgagggggagatatgcatggtcttacttcttgcgggcacaga
L C R I C Y E G E I C M V L L P C R H R
acattatgcaagacttgttctgataagtgaagaatgtccaatctgccgtgtgcccatt
T L C K T C S D K C K K C P I C R V P I
gaagaacgcatgccgtatatgatgtttaa
E E R M P V Y D V -

```

图 1

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ObRHC1
NP_564052  -----MPAPSLPHGRHWAPCHSVAAAPLLI
NP_177535  -----MSCRRVLSIQALAAHSLFLSFTLLLVKLDHETVSSWVWVFFPLWAFHAYVARGRFSLEAPVAPRNRHWAPCHAVVATPLL
AAW81737  -----MNCWRVLSVQASVACFLSFTLLALVVKLDHSTYSWVWVCLPLWAFHAYVARGRFSLEAPVAPRNRHWAPCHAVVATPLL
BAE71207  -----MSCRRVLSIQALAAHSLFLSFTLLLVKLDHETVSSWVWVFFPLWAFHAYVARGRFSLEAPVAPRNRHWAPCHAVVATPLL
NP_564945  -----MSWRVLSKSAQAFATFLSFTLLLVKLDHETVSSWVWVFFPLWAFHAYVARGRFSLEAPVAPRNRHWAPCHAVVATPLL
ABE90658  -----MLVQRVMSWRVWKSFAASACLLSFTLLLVKLDHETVSSWVWVFFPLWAFHAYVARGRFSLEAPVAPRNRHWAPCHAVVATPLL
AAF25982  -----MLVRRVMSWRVWKSFAASACLLSFTLLLVKLDHETVSSWVWVFFPLWAFHAYVARGRFSLEAPVAPRNRHWAPCHAVVATPLL
Clustal共有
                                     :*** *:*** **;: **;

```

```

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ObRHC1
NP_564052  -----AFELLICITLESYARWPPAVSLKIAFLPLLAFFLILVNDNRMCRALMPGDDSDITDDAIWEALP
NP_177535  -----AFELLICITLESYARWPPAVSLKIAFLPLLAFFLILVNDNRMCRALMPGDDSDITDDAIWEALP
AAW81737  -----AFELLICITLESYARWPPAVSLKIAFLPLLAFFLILVNDNRMCRALMPGDDSDITDDAIWEALP
BAE71207  -----AFELLICITLESYARWPPAVSLKIAFLPLLAFFLILVNDNRMCRALMPGDDSDITDDAIWEALP
NP_564945  -----AFELLICITLESYARWPPAVSLKIAFLPLLAFFLILVNDNRMCRALMPGDDSDITDDAIWEALP
ABE90658  -----AFELLICITLESYARWPPAVSLKIAFLPLLAFFLILVNDNRMCRALMPGDDSDITDDAIWEALP
AAF25982  -----AFELLICITLESYARWPPAVSLKIAFLPLLAFFLILVNDNRMCRALMPGDDSDITDDAIWEALP
Clustal共有
:***:***: * * * * * :***:***: * * * * * :***:***: * * * * * :***:***: * * * * *

```

```

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ObRHC1
NP_564052  -----HPVVALSMVFTLAATFTLLKLSGQVVALGWNDFIN
NP_177535  -----HPVVALSMVFTLAATFTLLKLSGQVVALGWNDFIN
AAW81737  -----HPVVALSMVFTLAATFTLLKLSGQVVALGWNDFIN
BAE71207  -----HPVVALSMVFTLAATFTLLKLSGQVVALGWNDFIN
NP_564945  -----HPVVALSMVFTLAATFTLLKLSGQVVALGWNDFIN
ABE90658  -----HPVVALSMVFTLAATFTLLKLSGQVVALGWNDFIN
AAF25982  -----HPVVALSMVFTLAATFTLLKLSGQVVALGWNDFIN
Clustal共有
:***:***: * * * * * :***:***: * * * * * :***:***: * * * * *

```

```

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ObRHC1
NP_564052  -----YGIACFPALVCTKSNFVHRSSRARETGSSSTIRYLDWNSG-LVVAPEEDRHQDRWCLQDGGHMLKIPVILFQVLLCMHLEGT
NP_177535  -----YGIACFPALVCTKSNFVHRSSRARETGSSSTIRYLDWNSG-LVVAPEEDRHQDRWCLQDGGHMLKIPVILFQVLLCMHLEGT
AAW81737  -----YGIACFPALVCTKSNFVHRSSRARETGSSSTIRYLDWNSG-LVVAPEEDRHQDRWCLQDGGHMLKIPVILFQVLLCMHLEGT
BAE71207  -----YGIACFPALVCTKSNFVHRSSRARETGSSSTIRYLDWNSG-LVVAPEEDRHQDRWCLQDGGHMLKIPVILFQVLLCMHLEGT
NP_564945  -----YGIACFPALVCTKSNFVHRSSRARETGSSSTIRYLDWNSG-LVVAPEEDRHQDRWCLQDGGHMLKIPVILFQVLLCMHLEGT
ABE90658  -----YGIACFPALVCTKSNFVHRSSRARETGSSSTIRYLDWNSG-LVVAPEEDRHQDRWCLQDGGHMLKIPVILFQVLLCMHLEGT
AAF25982  -----YGIACFPALVCTKSNFVHRSSRARETGSSSTIRYLDWNSG-LVVAPEEDRHQDRWCLQDGGHMLKIPVILFQVLLCMHLEGT
Clustal共有
:***:***: * * * * * :***:***: * * * * * :***:***: * * * * *

```

```

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ObRHC1
NP_564052  -----PSAQYIPFALFSPFLFLLQAGVLFATSKLEKIVLLLRNGFVSP-NYLTSSKVRDCFAFLHGRSRLLGWNSIDEGSREEQARLYTDE
NP_177535  -----ERAKDISIPVLFSPFLFLLQAGVLFATSKLEKIVLLLRNGFVSP-NYLTSSKVRDCFAFLHGRSRLLGWNSIDEGSREEQARLYTDE
AAW81737  -----ERAKDISIPVLFSPFLFLLQAGVLFATSKLEKIVLLLRNGFVSP-NYLTSSKVRDCFAFLHGRSRLLGWNSIDEGSREEQARLYTDE
BAE71207  -----ERAKDISIPVLFSPFLFLLQAGVLFATSKLEKIVLLLRNGFVSP-NYLTSSKVRDCFAFLHGRSRLLGWNSIDEGSREEQARLYTDE
NP_564945  -----ERAKDISIPVLFSPFLFLLQAGVLFATSKLEKIVLLLRNGFVSP-NYLTSSKVRDCFAFLHGRSRLLGWNSIDEGSREEQARLYTDE
ABE90658  -----ERAKDISIPVLFSPFLFLLQAGVLFATSKLEKIVLLLRNGFVSP-NYLTSSKVRDCFAFLHGRSRLLGWNSIDEGSREEQARLYTDE
AAF25982  -----ERAKDISIPVLFSPFLFLLQAGVLFATSKLEKIVLLLRNGFVSP-NYLTSSKVRDCFAFLHGRSRLLGWNSIDEGSREEQARLYTDE
Clustal共有
:***:***: * * * * * :***:***: * * * * * :***:***: * * * * *

```

```

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
ObRHC1
NP_564052  -----TGYNITFCGYTPEVVRKMPKRDLAKEVWRLQAALGQSEITKTSQOETERLQ-----NEKVIC
NP_177535  -----SGYNITFCGYTPEVVRKMPKRDLAKEVWRLQAALGQSEITKTSQOETERLQ-----NEKVIC
AAW81737  -----SGYNITFCGYTPEVVRKMPKRDLAKEVWRLQAALGQSEITKTSQOETERLQ-----NEKVIC
BAE71207  -----SGYNITFCGYTPEVVRKMPKRDLAKEVWRLQAALGQSEITKTSQOETERLQ-----NEKVIC
NP_564945  -----SGYNITFCGYTPEVVRKMPKRDLAKEVWRLQAALGQSEITKTSQOETERLQ-----NEKVIC
ABE90658  -----SGYNITFCGYTPEVVRKMPKRDLAKEVWRLQAALGQSEITKTSQOETERLQ-----NEKVIC
AAF25982  -----SGYNITFCGYTPEVVRKMPKRDLAKEVWRLQAALGQSEITKTSQOETERLQ-----NEKVIC
Clustal共有
:***:***: * * * * * :***:***: * * * * * :***:***: * * * * *

```

```

      550     560     570     580
-----|-----|-----|-----|
ObRHC1
NP_564052  -----RVCFEKDISVLLFCRERVLCRNCADKCTPCPCIRVPIERMPYIDV
NP_177535  -----RVCFEKDISVLLFCRERVLCRNCADKCTPCPCIRVPIERMPYIDV
AAW81737  -----RVCFEKDISVLLFCRERVLCRNCADKCTPCPCIRVPIERMPYIDV
BAE71207  -----RVCFEKDISVLLFCRERVLCRNCADKCTPCPCIRVPIERMPYIDV
NP_564945  -----RVCFEKDISVLLFCRERVLCRNCADKCTPCPCIRVPIERMPYIDV
ABE90658  -----RVCFEKDISVLLFCRERVLCRNCADKCTPCPCIRVPIERMPYIDV
AAF25982  -----RVCFEKDISVLLFCRERVLCRNCADKCTPCPCIRVPIERMPYIDV
Clustal共有
:***:***: * * * * * :***:***: * * * * * :***:***: * * * * *

```

图 2A

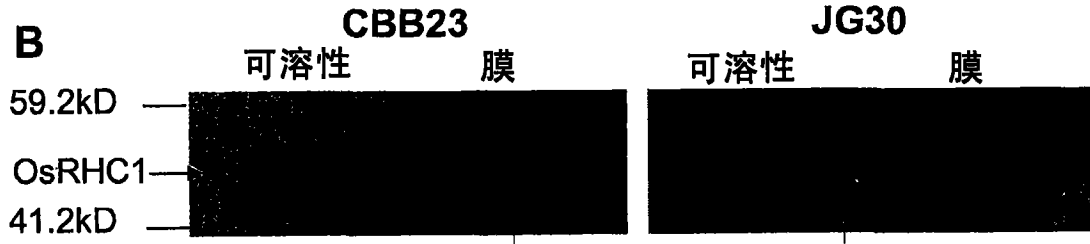


图 2B

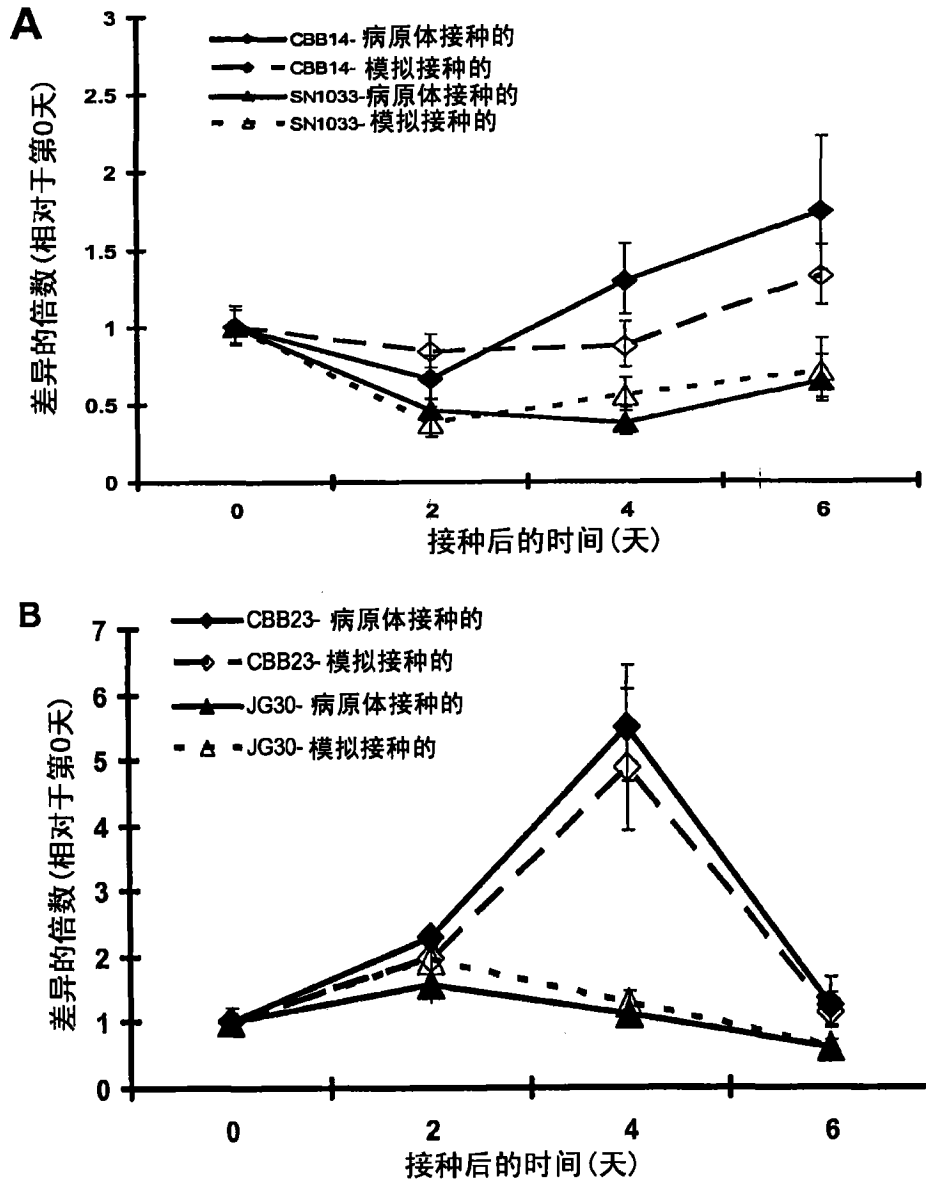


图 3

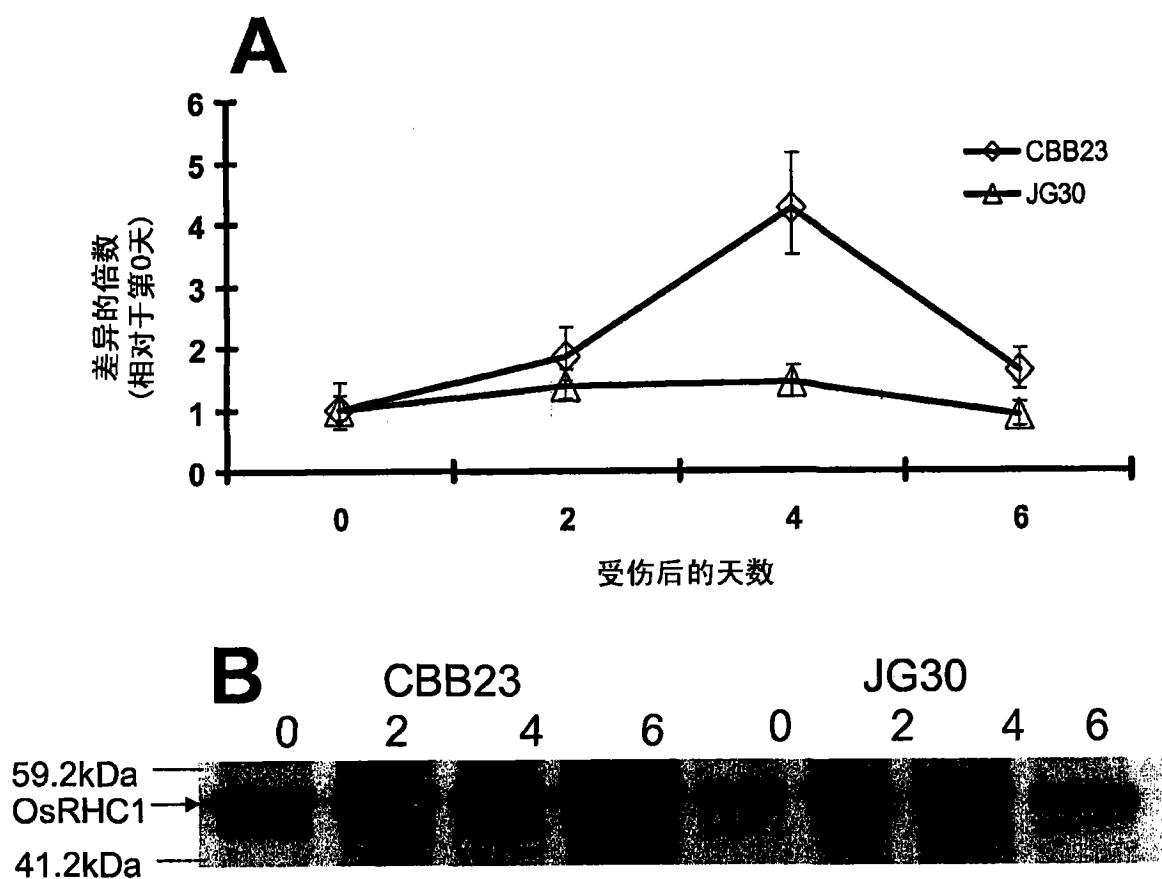


图 4

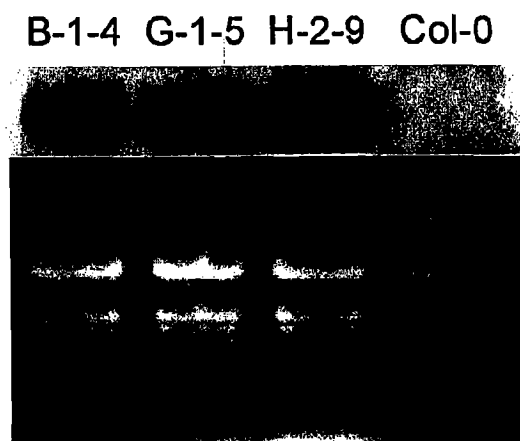


图 5A

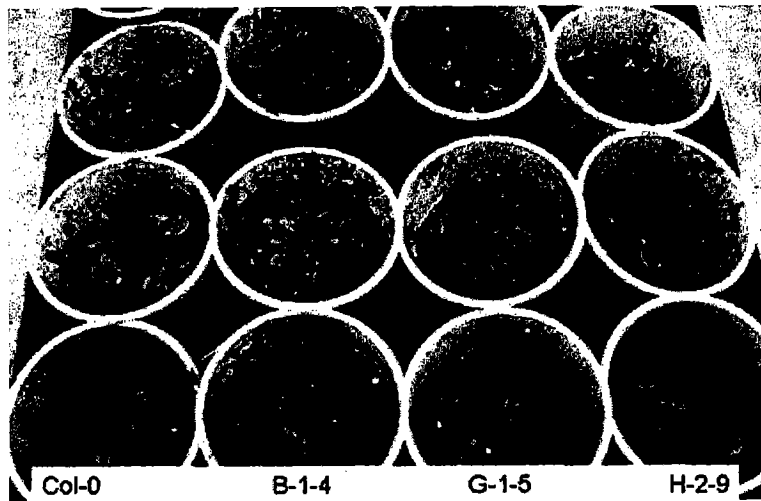


图 5B

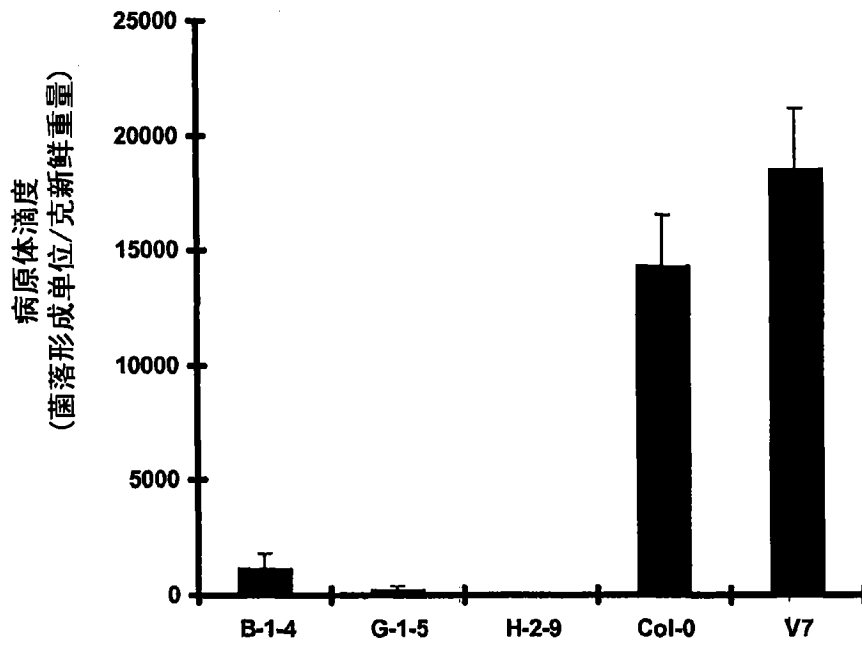


图 5C

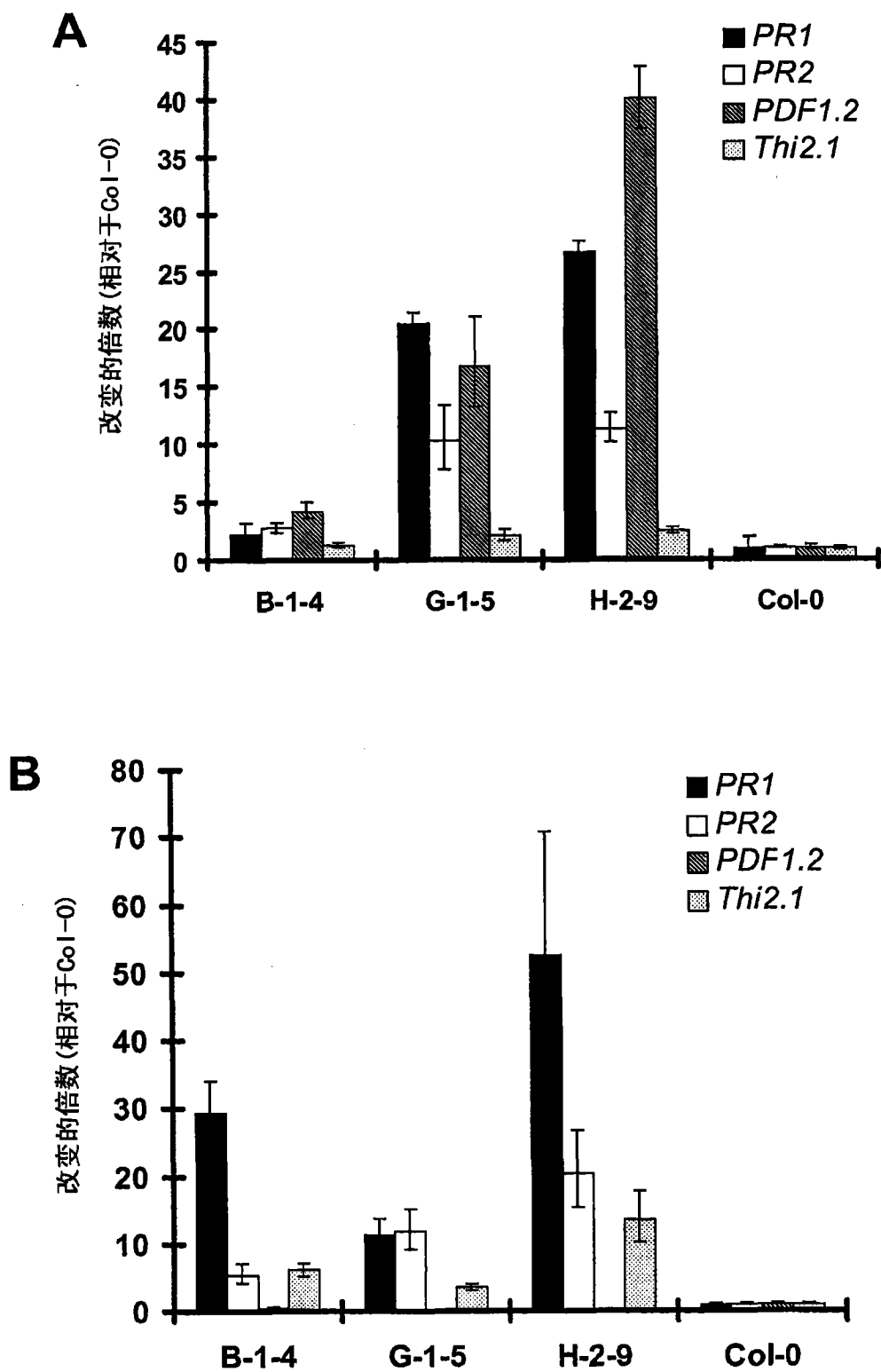
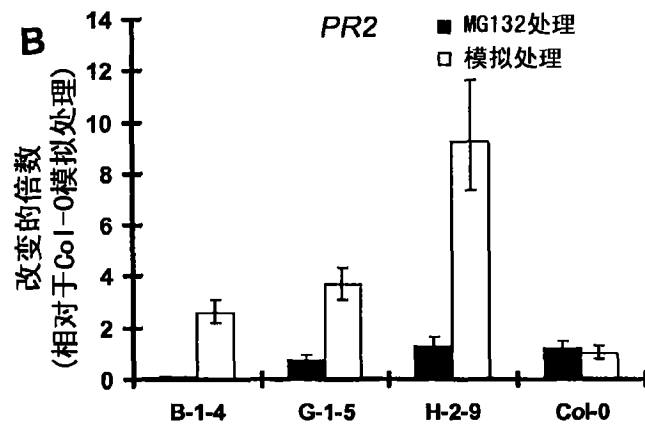
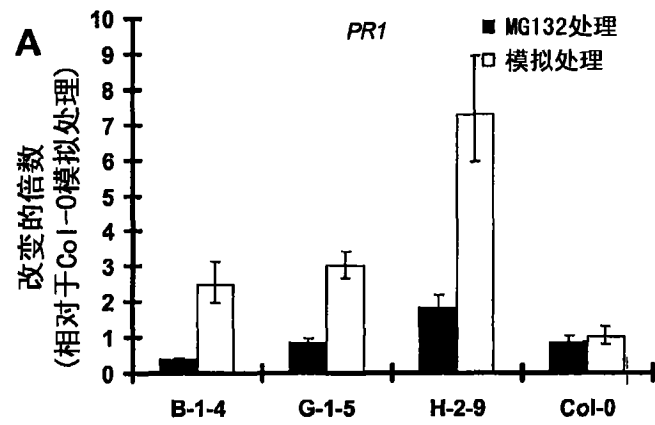


图6



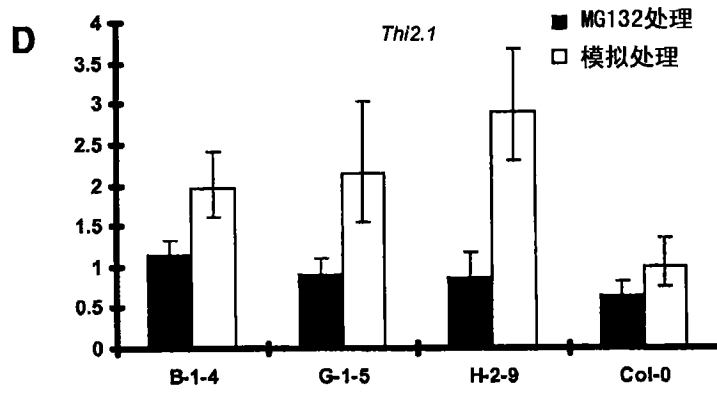
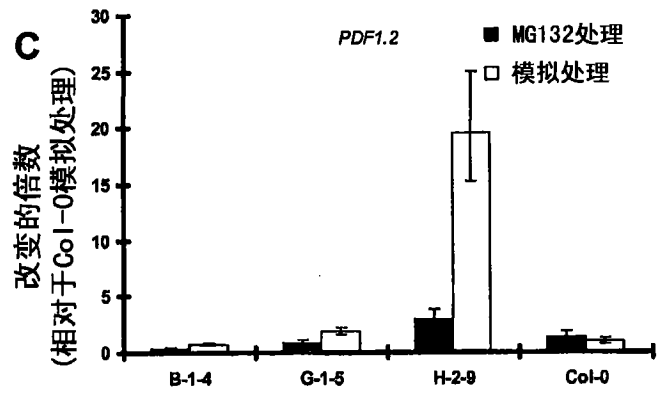


图 7

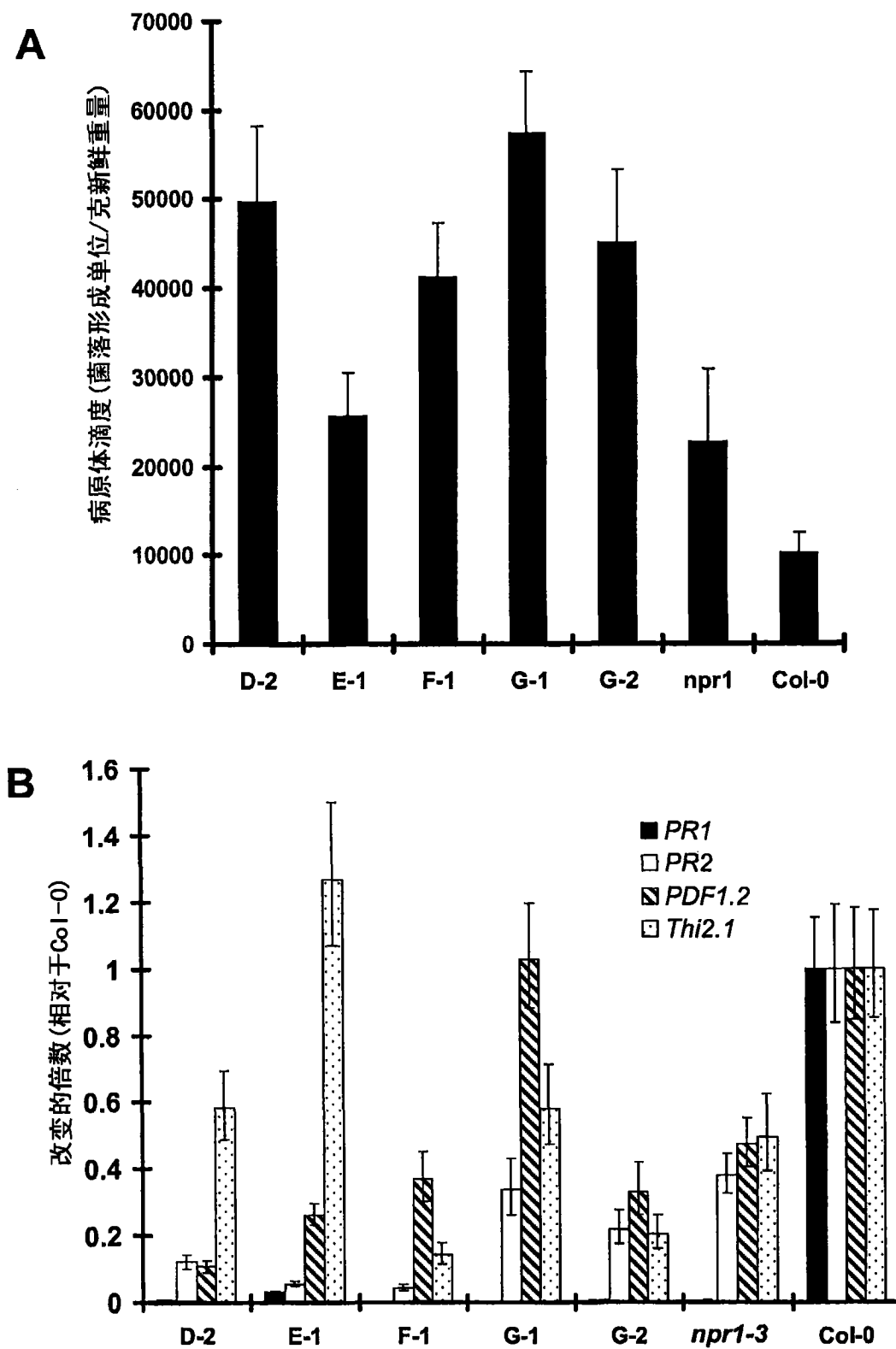


图 8

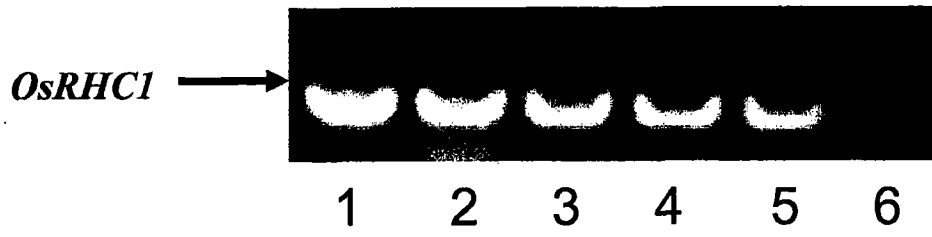


图 9

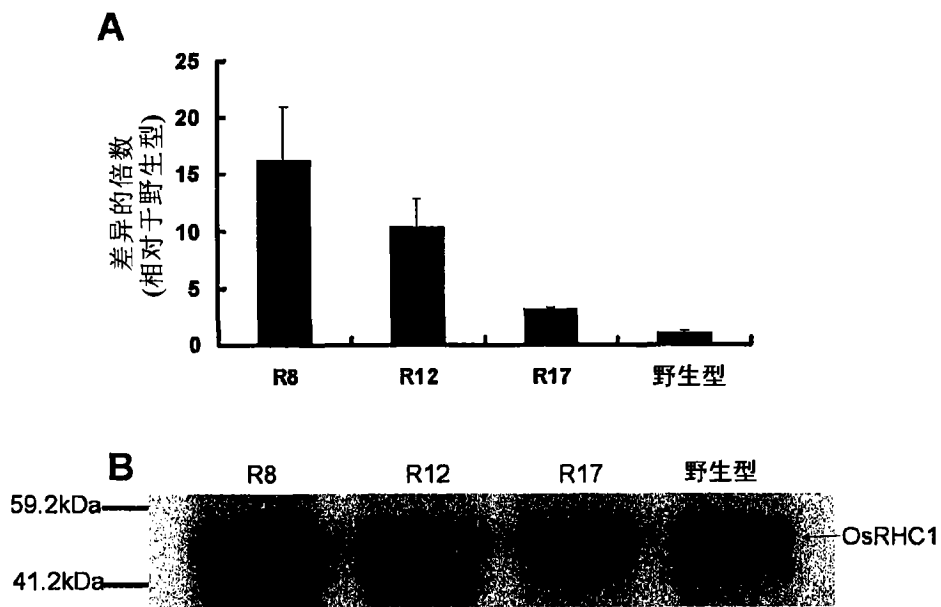


图 10

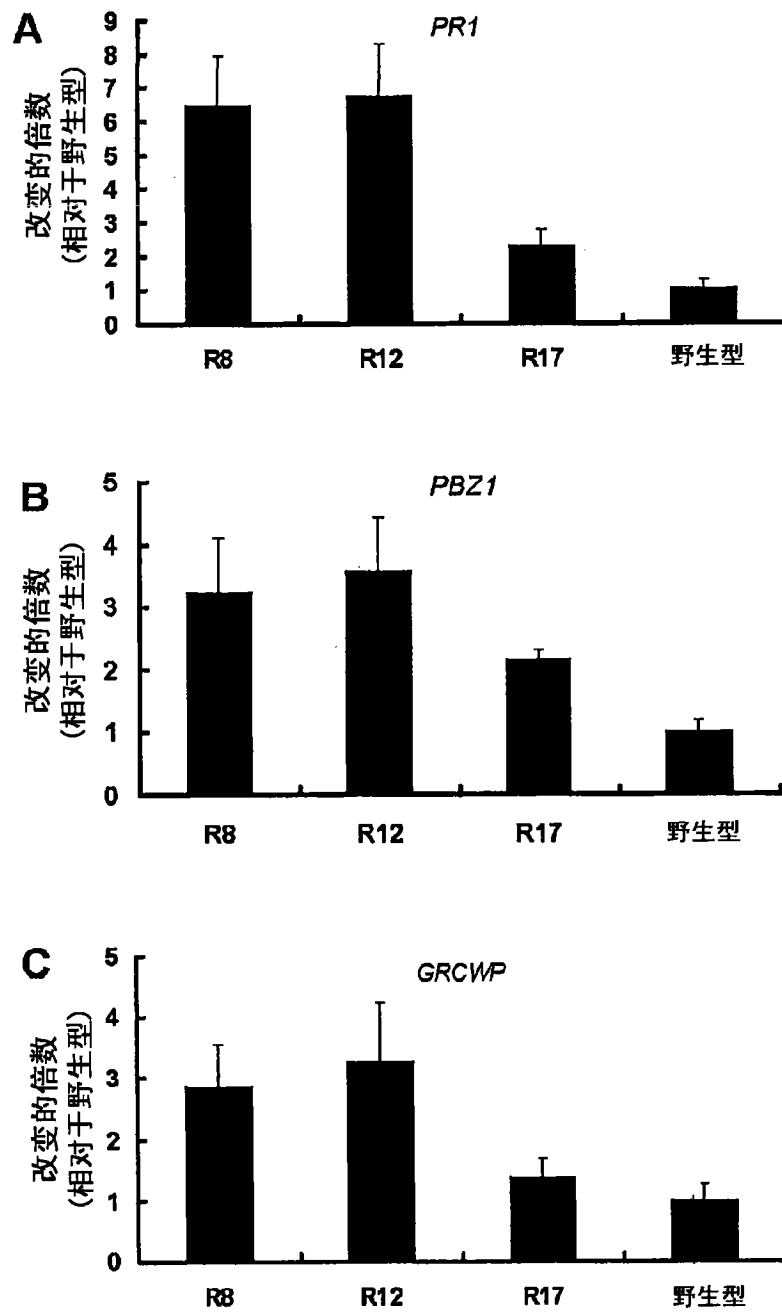


图 11

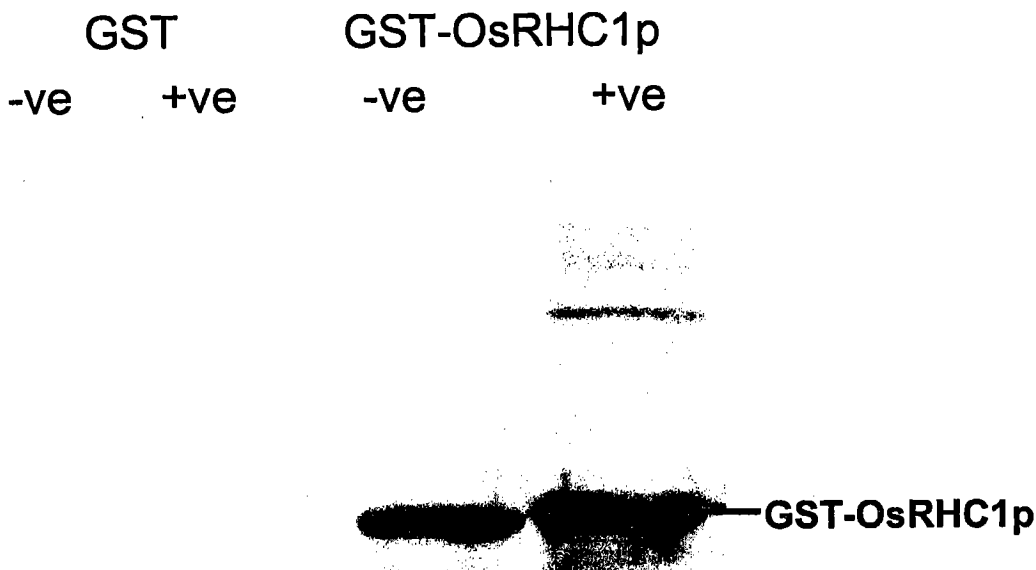


图 12

```

atggccgtggggtcagagcggctcggcgaggaggcccccggcggcagctcggcgaggca
M A V G S E R L G E E A A R R Q L G E A
aggaaggccagaggcggctgctcggcgacgaggacggcgccgatgatgaggccggcgg
R K A R G G C S A T R D G A D D E G R R
cagataaacctccctccccgggtgtggtcgtccctccctcactccctcttctctcaga
Q I N P P S P V W S S P P S L P L P L R
tctgcccggagggggacgggtggaggccggcggcctccctccctcttctctcagatc
S A R R G T G G G R R P P F P L S S Q I
cgcccgggtggggagaggccaccggcggcagcggcatggccctccctctgcagcagtaga
R P V G R G H R R Q R H G P P L C S S R
gggcggcagggaggaggccacagagctgtgttttttatttgTTTTTATTGTTTATTGTTG
G R Q G G G H R A V F F Y L F L F -
  
```

图 13