



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114262699 A

(43) 申请公布日 2022. 04. 01

(21) 申请号 202111625252.X

A01H 5/00 (2018.01)

(22) 申请日 2021.12.28

A01H 5/10 (2018.01)

(71) 申请人 中国水稻研究所

A01H 5/02 (2018.01)

地址 311400 浙江省杭州市拱墅区体育场路359号

A01H 6/46 (2018.01)

(72) 发明人 孙廉平 程式华 曹立勇 占小登  
孙志豪 陈驰 彭泽群 张迎信  
陈代波

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569  
代理人 薛红凡

(51) Int. Cl.

C12N 9/14 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12Q 1/6895 (2018.01)

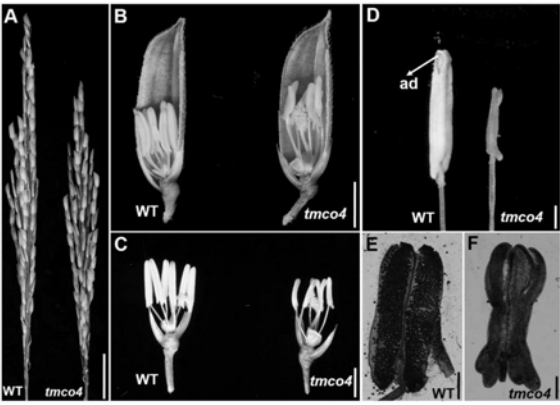
权利要求书1页 说明书12页  
序列表10页 附图5页

(54) 发明名称

水稻雄性不育基因OsLDDT1及其分子标记和应用

(57) 摘要

本发明提供了水稻雄性不育基因OsLDDT1及其分子标记和应用,属于基因工程和植物遗传育种技术领域。本发明首次揭示了水稻基因OsLDDT1具有调控植物雄性育性的生物学功能。基于图位克隆和功能互补实验在水稻中验证了该基因的功能,用pCAMBIA1300-OsLDDT1功能互补载体转化突变体lddt1后,转基因植株雄配子育性恢复,即OsLDDT1基因功能丧失型突变导致雄性部分败育而功能互补该基因育性恢复正常。本发明水稻OsLDDT1基因功能丧失后完全败育,可收获部分种子,可与其他雄性不育基因形成有利补充,为水稻智能恢复系育种提供了新的基因资源。



1. 一种水稻雄性发育基因OsLDDT1, 其特征在于, 所述水稻基因OsLDDT1为编码如下至少一种蛋白质序列的基因;

A、氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的蛋白质;

B、在SEQ ID NO:3所示序列基础上经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有同等功能的由A项衍生的蛋白质。

2. 根据权利要求1所述水稻雄性发育基因OsLDDT1, 其特征在于, 所述水稻基因OsLDDT1的序列为以下至少一种核苷酸序列:

i) SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;

ii) SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列;

iii) 在严格条件下与SEQ ID NO:1所示序列杂交且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列, 所述严格条件为在含0.1% SDS的0.1×SSPE或含0.1% SDS的0.1×SSC溶液中, 在65℃下杂交, 并用该溶液洗膜; 或

iv) 与i)、ii) 或iii) 中所述核苷酸序列具有90%以上同源性且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列。

3. 权利要求1或2所述水稻雄性发育基因OsLDDT1的应用, 其特征在于, 包括以下任一项或几项的应用:

1) 用于调控植物雄配子发育;

2) 用于调控植物育性;

3) 用于调控植物结实率;

4) 用于植物品种改良;

5) 用于制备转基因植物。

4. 根据权利要求3所述应用, 其特征在于, 所述植物包括禾本植物。

5. 一种雄性不育植株育性恢复的方法, 其特征在于, 将水稻基因OsLDDT1导入雄性不育水稻植株中, 雄配子发育恢复正常, 花粉育性和结实率恢复正常。

6. 一种用于检测水稻雄性不育的INDEL分子标记, 其特征在于, 在SEQ ID NO:1的基础上缺失5412位碱基A。

7. 根据权利要求6所述INDEL分子标记, 其特征在于, 所述INDEL分子标记采用SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的引物对扩增。

8. 权利要求6或7所述INDEL分子标记在检测水稻雄性不育中的应用。

## 水稻雄性不育基因OsLDDT1及其分子标记和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和植物遗传育种技术领域,具体涉及水稻雄性不育基因OsLDDT1及其分子标记和应用。

### 背景技术

[0002] 水稻作为主要的粮食作物之一,我国三分之二以上人口以稻米为主食。自20世纪六七十年代至今,水稻育种经历了矮化育种和杂交育种两次“绿色革命”,大大提高了水稻产量,为世界人民温饱问题的解决作出了重要贡献。其中,雄性不育系的发现和“三系法”、“两系法”杂交水稻制繁种技术的配套,为水稻单产质的飞跃和中国乃至全世界粮食安全做出了巨大贡献;这其中,不育材料为核心,创制和利用技术是关键(程式华,2008)。水稻雄性生殖发育是一个高度复杂、受到精确调控的生物学过程,直接涉及到水稻繁衍后代和产量有无,其中有大量的基因参与,这些关键因子的突变或表达异常都将会导致小孢子发育异常,致使花粉败育。因此,进一步挖掘和利用水稻雄性不育基因,通过遗传学和分子生物学等方法,克隆水稻雄性不育基因并研究其表达调控机制,阐明其调控水稻雄性生殖发育的分子机制,既可以为植物雄性不育分子机理研究奠定理论基础,增进对水稻生殖发育进程及其分子机制的认知,还可为创造新的杂种优势利用途径、直接服务于水稻育种改良和生产实践提供基因资源(程式华等,2016;轩丹丹等,2017)。因此,水稻雄性不育的研究无论是理论层面还是应用层面都具有重要的研究意义。

[0003] 植株的生长发育是一个复杂而完善的过程,在生长发育过程中,会受到多重因素的影响。例如植物近远缘杂交、植物体内生理因素或者遗传因素发生改变以及植物体外部营养供给和生长环境发生改变,以上因素均会影响到雄性器官中花粉的发育过程进而导致雄性不育。雄性不育广泛存在于拟南芥、水稻、玉米、小麦、大豆和白菜等植物中,雄性不育现象的产生主要是因为雄性器官发育出现异常而引起的。遗传分析表明,大多数雄性不育性状是由隐性核基因突变造成的,目前已有至少40以上水稻隐型核不育基因陆续被克隆(马西青等,2012;Okamuro et al.,1993;Shi et al.,2015),且其调控水稻雄性生殖发育的时期和功能等方面存在较大差异,大致可分为控制小孢子母细胞发育时期、减数分裂时期、绒毡层发育时期、花粉囊和花粉外壁发育时期以及花药开裂时期等相关的基因。

[0004] 其中,绒毡层的细胞程序性死亡和花粉囊壁的营养成分的合成与转运在花药发育和中后期花粉细胞的形成和成熟具有关键作用,对上述过程的研究也较为深入。绒毡层,作为花药壁的最内层细胞,直接与不同发育阶段的雄性生殖细胞接触,绒毡层细胞有条不紊的程序性死亡可为花药的正常发育和正常的花粉形成、成熟提供诸如孢粉素等一系列营养成分和结构组分(Jung et al.,2005;Li et al.,2006;Shi et al.,2011),以保证花粉细胞的形成、有丝分裂、充实和正常育性。此过程涉及大量的转录因子,且直接或者间接调控绒毡层PCD,进而控制绒毡层降解提前或者延迟;其中任一环节出现异常,都可能会导致小孢子发育受阻,最终导致花粉败育。如水稻中UDT1、TDR、EAT1、TIP2都编码“碱性螺旋-环-螺旋”(basic helix-loop-helix,bHLH)转录因子,在调控花药细胞层的分化、发生和降解过

程中起核心作用。其中,UDT1调控绒毡层早期发育,udt1突变体内绒毡层呈空泡化,中间层细胞不发生退化,导致小孢子母细胞发育过程受阻,花粉囊内无正常的花粉细胞(Jung et al.,2005)。TDR正向调控绒毡层发育和降解,其突变体的绒毡层细胞和中层细胞降解延迟,导致其小孢子释放后迅速降解,最终花粉彻底败育,且TDR能直接结合到PCD基因OsCP1和OsC6的启动子区,正向调控绒毡层的PCD过程和花粉壁的形成(Li et al.,2006;Ko et al.,2014);TDR还能通过结合ADF启动子的E-box基序直接调节ADF的表达,进而触发ADF介导的蛋白水解通路,从而调节绒毡层细胞发育和花粉形成(Li et al.,2015)。EAT1也在绒毡层中特异表达,该基因直接调控AP25和AP37的表达,正向调控水稻花药绒毡层细胞PCD,并与TDR协作,调控绒毡层功能和花粉发育;eat1突变体的绒毡层PCD延迟,导致其花粉粒败育,花药干瘪、不能形成正常的花粉粒,完全不育(Niu et al.,2013)。TIP2(bHLH142)作用于UDT1和GAMYB下游,且作用于TDR和EAT1上游从而调节花粉发育,在花药早期发育过程中拟分生组织的转变、分化起着关键开关的作用;在后期则能够与TDR互作,在花药发育的绒毡层降解和花粉形成起关键作用;tip2突变体表现为减数分裂迟缓和绒毡层PCD缺陷,花药壁内三层细胞不分化,绒毡层PCD过程发生中断,完全不育(Fu et al.,2014;Ko et al.,2014)。OsTGA10通过与TIP2和TDR互作影响AP25和MTR的表达进而调控绒毡层的发育和花粉形成(Chen et al.,2018)。F-box基因ADF直接作用于TDR下游,TDR可直接与其启动子的E-box模体结合,主要在绒毡层细胞和花粉中表达(Li et al.,2015)。PHD-finger蛋白OsMS1通过其PHD结构域与TDR和OsMADS15互作,并且很可能与TIP2协作,精确调控EAT1的表达,进而调控绒毡层细胞死亡,ms1突变体后,无法与TIP2形成二聚体,导致其绒毡层降解,直至第10时期才有绒毡层降解信号,最终花粉完全退化,药室内仅存微小的降解颗粒(Yang et al.,2019a)。TIP3同样编码一个PHD-finger转录因子,该蛋白可与TDR直接互作,直接或间接的激活下游靶基因进而调控绒毡层的降解和花粉壁的形成(Yang et al.,2019b)。

[0005] 花药发育中后期,小孢子细胞从四分体释放出来后,还需要经历花粉壁的形成、液泡的形成、两轮有丝分裂和淀粉充实等一系列过程,才能最终发育成为成熟的可育花粉。而这些过程的正常进行需要脂肪生物聚合物如孢粉素、乌氏体、表皮蜡质和角质层单体等物质的营养供应和结构支撑,特别是孢粉素的合成和运输。花粉囊壁外的角质蜡质等物质既是小孢子发育过程中形成完整内部结构的基本保障,又是孢粉素等必需营养物质传递的结构基础。其中,花粉囊壁内的孢粉素是由多羟基脂肪族化合物和含氧芳香族单体(如酚类化合物)通过醚键和酯键结合而成,是花粉外壁的主要成分之一,在花粉发育过程中起着保护花粉免受非生物和生物胁迫的重要作用。对花粉壁形成异常的雄性不育突变体的研究表明,许多基因参与了这些生物合成和转运机制(Zhang et al.,2016)。两个细胞色素P450家族基因,CYP704B2和CYP703A3,分别通过调控C16/C18脂肪酸在 $\omega$ 碳位置和月桂酸的羟基化,对水稻花药表皮角质层和花粉外壁的形成过程起催化作用(Li et al.,2010;Yang et al.,2014;Yang et al.,2018)。脂肪酸转运蛋白还原酶DPW和脂肪酸酰基转移酶DPW2,在花药发育和花粉形成过程中分别改变角质和蜡的数量与脂类和酚类化合物的数量,进而调控水稻花粉育性(Shi et al.,2011;Xu et al.,2017)。ATP结合蛋白ABCG15/PDA1、ABCG26和ABCG3协同工作,但又各具功能,为花药发育和花粉形成运输不同的营养物质(Qin et al.,2013;Zhu et al.,2013;Zhao et al.,2015;Chang et al.,2018)。脂质转运蛋白OsC6在TDR和GAMYB下游,负责在药室内转运绒毡层和中层之间降解所形成的花粉外壁形成所必需

的角质层等成分(Zhang et al.,2010)。甘油-3-磷酸酰基转移酶基因OsGPAT3通过调控水稻花药内脂质组分的代谢和花药各层细胞的PCD,进而调控水稻雄性生殖发育(Men et al.,2017;Sun et al.,2018)。GDSL脂肪酶基因RSM2通过调控花药中的脂质代谢,影响花药壁、花粉壁的发育过程和液泡形态变化,从而决定花粉育性(Zhao et al.,2020)。此外,WDA1(Jung et al.,2006)、OsACOS12(Li et al.,2016;Yang et al.,2017)和OsNP1(Liu et al.,2017)也被报道调节孢粉素的生物合成和沉积,这些基因的功能丧失不仅导致了花药角质层和花粉壁的缺陷,而且还导致了分泌体、油脂体的数量减少。事实上,这些基因的功能经常是相互作用的,PCD诱导基因的大多数隐性突变体在乌氏体形成和花粉外壁形成过程中都表现出明显的缺陷。特别是tdr、ptcl、eat1-1和dex1突变体在小孢子期表现出明显的小孢子塌陷和花粉壁退化(Li et al.,2006;Li et al.,2011;Niu et al.,2014;Yu et al.,2016);CYP703A3、ABCG15、ABCG26、OsACOS12在绒毡层延迟或过早降解的绒毡层细胞及其隐性突变体中也相应地显示出高表达水平(Qin et al.,2013;Li et al.,2016;Yang et al.,2017;Zhao et al.,2017;Yang et al.,2018)。

[0006] 水稻中 $\alpha/\beta$ 水解酶基因OsLDDT1调控水稻花药发育和雄性不育的研究尚未有报道,分离克隆水稻OsLDDT1基因,探讨该基因突变导致水稻雄性不育的原因,阐明水稻雄性不育花粉败育的分子机制,将进一步深化人们对水稻雄性不育分子机理的认知,为水稻雄性生殖发育的分子调控机理提供新观点。同时,将雄性不育基因应用于水稻品种的遗传改良,对水稻育种工作者具有重要的实践意义。

## 发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种水稻基因OsLDDT1的应用,阐明了水稻雄性不育花粉败育的分子机制,为水稻育种提供的了有效靶点。

[0008] 本本发明提供了一种调控水稻雄性发育的水稻基因OsLDDT1,所述水稻基因OsLDDT1为编码如下一种蛋白质序列的基因;

[0009] A、氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的蛋白质;或

[0010] B、在SEQ ID NO:3所示序列基础上经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有同等功能的由A项衍生的蛋白质。

[0011] 优选的,所述水稻基因OsLDDT1的序列为以下任一项核苷酸序列:

[0012] i) SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;

[0013] ii) SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列;

[0014] iii) 在严格条件下与SEQ ID NO:1所示序列杂交且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列,所述严格条件为在含0.1%SDS的0.1×SSPE或含0.1%SDS的0.1×SSC溶液中,在65℃下杂交,并用该溶液洗膜;或

[0015] iv) 与i)、ii)或iii)中所述核苷酸序列具有90%以上同源性且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列。

[0016] 本发明提供了所述水稻基因OsLDDT1的应用,包括以下任一项或几项的应用:

[0017] 1) 用于调控植物雄配子发育;

[0018] 2) 用于调控植物育性;

- [0019] 3) 用于调控植物结实率;
- [0020] 4) 用于植物品种改良;
- [0021] 5) 用于制备转基因植物。
- [0022] 优选的,所述植物包括禾本植物。
- [0023] 本发明提供了一种雄性不育植株育性恢复的方法,将水稻基因OsLDDT1导入雄性不育水稻植株中,雄配子发育恢复正常,花粉育性和结实率恢复正常。
- [0024] 本发明提供了一种用于检测水稻雄性不育的INDEL分子标记,在SEQ ID NO:1的基础上缺失5412位碱基A;
- [0025] 优选的,所述INDEL分子标记采用SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示的引物对扩增。
- [0026] 本发明提供了所述INDEL分子标记在检测水稻雄性不育中的应用。
- [0027] 本发明提供了水稻基因OsLDDT1的应用。本发明通过功能互补实验在水稻中验证了基因OsLDDT1的功能,用pCAMBIA1300-OsLDDT1过表达载体转化突变体lddt1后,转基因植株雄配子育性恢复,即功能互补该基因育性恢复正常。本发明水稻OsLDDT1基因功能丧失后花粉完全败育,无法收到种子,但异交结实率较高,可用于创制智能不育系,提高制种产量,应用于杂交水稻育种中。可见,OsLDDT1基因调控能够水稻植株的雄性育性的关键基因。本发明首次揭示了水稻基因OsLDDT1的生物学功能,为水稻智能不育系育种提供了新的基因资源。

## 附图说明

- [0028] 图1为突变体来源于籼稻中恢8015的EMS化学诱变群体;
- [0029] 图2为野生型中恢8015和突变体lddt1花药的横切面形态;其中图2A为野生型第8a时期花药发育形态;图2B为lddt1突变体第8a时期,花药发育形态;图2C为野生型第8b时期花药发育形态,图2D为lddt1突变体第8b时期花药发育形态,图2E为野生型第9时期花药发育形态,图2F为lddt1突变体第9时期花药发育形态,图2G为野生型第10时期花药发育形态,图2H为lddt1突变体第10时期花药发育形态;图2I为野生型第11时期花药发育形态,图2J为lddt1突变体第11时期花药发育形态;图2K为野生型第13时期花药发育形态,图2L为lddt1突变体第13时期花药发育形态
- [0030] 图3为突变体植株第13期的花药内外壁和花粉外壁进行了扫描电镜观察结果;图3A为野生型花药形态,图3B为突变体lddt1的花药形态;图3C为野生型花药外壁放大图;图3D为突变体lddt1的花药外壁放大图;图3E为野生型花药内壁放大图;图3F为突变体lddt1的花药内壁放大图;图3G为野生型花药内的乌氏单体放大图;图3H为突变体lddt1的花药内乌氏单体放大图;图3I为野生型的花粉粒结构;图3J为突变体lddt1的花粉粒结构;图3K为野生型花粉粒表面分布着规则的孢粉素;图3L为lddt1花粉粒外壁逐渐降解褶皱,形态不规则;
- [0031] 图4为突变体植株和野生型不同发育时期花药横切面的透射电镜观察结果,其中图4A为野生型中恢8015第9时期绒毡层细胞浓缩染色较深,小孢子从四分体中释放出来(图4A~图4C);图4D~图4F表示而同一时期突变体lddt1的绒毡层空泡化,并且形成一些小孢子细胞;图4G~图4I为第11时期野生型小孢子继续进行不均等分裂,相互挤压形成不规则的月牙形,绒毡层细胞继续降解为小孢子的发育提供孢粉素前提物质,乌氏体在花药内壁

形成,中间层消失退化;图4J~图4L而突变体绒毡层细胞较第9时期有降解皱缩现象,但仍然大量存在,小孢子由于绒毡层讲解延迟无法获得充足的营养物质出现降解退化现象,花药内壁光滑无乌氏体形成,同时中间层细胞仍然存在;图4M~图4O为在花药发育的第12时期,野生型内层细胞和绒毡层细胞完全降解,小孢子内被淀粉粒充实成熟花粉粒形成;图4P~图4R为突变体的内层细胞和绒毡层细胞仍未完全降解,小孢子发育过程中缺少绒毡层细胞降解产生的孢粉素前体物质,导致小孢子完全降解无法形成成熟花粉粒,药室内无小孢子,绒毡层继续降解;

[0032] 图5为选用lddt1×02428的F<sub>2</sub>群体作为定位群体,初步的连锁筛选将lddt1位点与3染色体短臂标记InD34和RM14327紧密连锁,利用本实验室的公共标记进一步将其初定位至RM14282和RM3866之间;进一步扩大定位群体并在此区间内设计InDel引物,利用1078个隐性单株、最终将lddt1基因精细定位至JF-44和JF-46之间,物理距离约为28.8kb,该区间内包含7个开放阅读框(图5A),其中不含有已报道的控制水稻花药和花粉发育相关基因,由此推断,该突变基因是一个全新的水稻雄性不育基因。通过测序比对发现,发现突变体中ORF4的第9个内含子与第10个外显子连接处发生了一个T→C转换(图5A),导致其cDNA序列插入73bp,其编码的氨基酸由精氨酸变为丝氨酸,且紧接着插入13个氨基酸后翻译提前终止(图5B),推测该突变可能是引起花药发育畸形和无花粉的原因,该基因很可能为目的基因。根据该突变位点,利用限制性内切酶BamHI设计了一个CAPS标记扩增引物,可成功的将突变体的目的片段切开,而野生型相应片段不能被切开,BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>植株则呈杂合带型(图5C);

[0033] 图6构建并测序验证成功的pCambia1300-0sLDDT1的载体(如图6A),转化到突变体lddt1后获得转基因植株,经潮霉素鉴定为阳性的植株正常种植于大田,于抽穗开花期取样观察发现,转基因植株的花药转变为乳黄色,花粉育性大于80%(图6C);待灌浆至完全成熟,发现其小穗育性和结实率已基本与野生型相同(图6B)这些表型进一步证明ORF4即为控制本研究中lddt1突变体花药发育畸形、无花粉的雄性不育基因;

[0034] 图7为OsLDDT1蛋白的序列分析我们对目前在水稻、玉米、拟南芥、小麦等植物中与LDDT1蛋白相似度高于60%的同源蛋白进行了多重序列比对,如图7A所示,LDDT1蛋白高度保守;进一步我们使用MEGA.7对目前已知的保守蛋白序列建立了LDDT1与其同源蛋白的系统进化树,结果显示LDDT1蛋白与玉米、小麦、二穗短柄草处于同一进化分枝(图7A),其同源相似度高达97%。为了进一步研究LDDT1基因的功能,我们对其编码的蛋白进行生物信息学分析。根据Rice Annotation Project(RAP)数据库中对该蛋白注释为功能包含未知的UDF726保守结构域的一类蛋白,进一步利用InterPro数据库对该蛋白进行序列分析发现,其包含有跨膜和coil螺旋结构域(2-649),保守区域为第290-615个氨基酸,在此保守结构域中包括三个跨膜结构域(第295-323、343-369、461-482位氨基酸)、1个α/β水解酶结构域(第497-587位氨基酸)和3个蛋白激酶C磷酸化位点(第497-499、558-560和589-591位氨基酸)。上述结果表明,LDDT1蛋白是在禾本科植物中一类具有高度保守的跨膜和螺旋结构域的α/β水解酶蛋白。

## 具体实施方式

[0035] 在本发明中,所述水稻基因OsLDDT1为编码如下蛋白质序列的基因;

[0036] A、氨基酸序列如SEQ ID NO:3(MATTLTPTQRYAAGALLALALRQAQIHQSVLLGAHHHHDDDD

EEQGRTSTSSGGGGSSSSSSNSGAGADADLWTHDSHGLLRPVFRFLEIDPKAWSGLEETAASSEAKHHIGAFLRI  
IFEEEDGESSLDRSVQELALAKGVDVMVMSLGNDSEVGNTIKGGDQDALPSSSGTDKSPGESSHDDQLGINKLTLDD  
IPANNHRKMALLFALLSACVADKPVSQEEEDRKSTRFRKGYDARHRVALRLLSTWLDVKWIKMEAIEVMVACSAMA  
AAKEQEQQESASPKSKWEKWKRGIIIGAAALTGGALLAITGGLAAPATAAGFGALAPTLGTLVPVIGASGFAAMA  
TAAGSVAGSVAVAASFGAAGAGLTGSKMARRIGSVKEFEFKPIGENHNQGR LAVGILISGFAFDEDDFCRPWEGWQ  
DNLERYILQWESKHI IAVSTAIQDWLTSRLAMELMKQGAMRTVLSGLLAFAWPATLLAATDFIDSKWSVAIDRSD  
KAGKMLAEVLLKGLQGNRPVTLIGFSLGARVIFKCLQELALSSDNEGLVERVVLLGAPVSVKGERWEAARKMVAGR  
FVNVYSTDDWILGVTFRASLLTQGLAGIQAIDVPGVENVDVTELVDGHSSYLSAAQQILEHLELNTYYPVFVPLSA  
ANEETDGTVAQ) 所示的蛋白质;或

[0037] B、在SEQ ID NO:3所示序列基础上经取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且具有同等功能的由A项衍生的蛋白质。

[0038] 在本发明中,所述水稻基因OsLDDT1的序列优选为以下任一项核苷酸序列:

[0039] i) SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列;

[0040] ii) SEQ ID NO:1所示的核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个核苷酸且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列;

[0041] iii) 在严格条件下与SEQ ID NO:1所示序列杂交且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列,所述严格条件为在含0.1%SDS的0.1×SSPE或含0.1%SDS的0.1×SSC溶液中,在65℃下杂交,并用该溶液洗膜;或

[0042] iv) 与i)、ii)或iii)中所述核苷酸序列具有90%以上同源性且表达相同功能蛋白质的核苷酸序列。

[0043] 所述水稻基因OsLDDT1的cDNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:2 (ATG GCC ACG ACG CTG ACG CCG ACG CAG CGC TAC GCG GCG GGG GCG



CTG CTG GCG CTC GCG CTC CGC CAG GCC CAG ATC CAC CAG TCC  
GTC CTC CTC GGC GCC CAC CAC CAC CAC GAC GAC GAC GAC GAG  
GAA CAG GGG CGC ACC AGC ACC AGC AGC GGC GGC GGC GGC GGC  
AGC TCC TCC TCC TCC TCC AAC TCC GGC GCC GGC GCG GAC GCC  
GAC CTC TGG ACA CAC GAC TCC CAC GGC CTC CTC CGC CCC GTC  
TTC AGG TTC CTG GAG ATC GAT CCC AAG GCG TGG TCG GGG CTG  
GAG GAG ACG GCG GCG TCG TCC GAG GCC AAG CAT CAC ATC GGC  
GCG TTT CTA AGG ATA ATA TTT GAA GAA GAT GGC GAA AGC TCC  
TCA GAC AGA TCC GTT CAG GAG CTT GCC TTG GCA AAA GGA GTT  
GAT GTG ATG GTA ATG AGT TTG GGC AAT GAC AGT GAA GTG GGT  
AAC ACA ATT AAA GGT GGG GAT CAA GAT GCT TTG CCT AGC AGC  
TCT GGA ACA GAT AAA TCC CCA GGG GAA AGC TCT CAT GAT GAC  
CAG TTA GGA ATC AAT AAA TTG ACC TTA GAT GAT ATT CCT GCT AAC  
AAT CAC CGG AAG ATG GCA TTG CTG TTT GCT CTT CTC TCG GCT  
TGT GTT GCT GAT AAA CCT GTA TCA CAA GAG GAA GAG GAC AGA  
AAA TTA ACC CGC TTC AGG AAG GGT TAT GAT GCT CGG CAT CGT  
GTT GCT CTT CGG CTG CTA TCT ACA TGG CTT GAT GTG AAG TGG  
ATC AAA ATG GAA GCA ATT GAG GTT ATG GTT GCA TGC TCT GCC  
ATG GCA GCA GCG AAA GAA CAA GAA CAA TCA CAG GAA AGC GCA  
TCA CCC AAA AGT AAA TGG GAA AAA TGG AAG CGT GGA GGA ATA  
ATT GGT GCA GCT GCT TTG ACT GGA GGA GCA CTG TTG GCT ATT  
ACT GGG GGT TTA GCT GCT CCA GCA ATT GCT GCA GGG TTT GGT  
GCT CTT GCT CCA ACC CTG GGC ACA CTT GTC CCT GTT ATA GGA  
GCT AGC GGA TTT GCT GCT ATG GCT ACC GCT GCA GGA TCT GTT  
GCT GGC TCT GTG GCA GTT GCT GCA TCA TTT GGA GCT GCT GGA  
GCT GGC TTG ACG GGG AGC AAA ATG GCC AGA AGA ATT GGG AGC  
GTG AAA GAA TTT GAG TTC AAA CCT ATT GGT GAA AAC CAT AAT  
CAG GGT CGG CTT GCA GTT GGC ATC TTA ATT TCC GGA TTT GCT TTT  
GAT GAG GAT GAC TTT TGT AGA CCT TGG GAA GGA TGG CAG GAT  
AAC CTA GAG AGG TAC ATC CTT CAA TGG GAG TCT AAG CAT ATA  
ATT GCA GTG AGT ACA GCA ATA CAG GAT TGG CTG ACA TCA AGA  
CTT GCT ATG GAA TTG ATG AAG CAA GGT GCA ATG AGA ACC GTA  
TTA AGT GGT CTT CTT GCA GCA TTT GCA TGG CCA GCT ACA CTG  
CTT GCG GCT ACA GAC TTT ATT GAT AGT AAA TGG TCT GTT GCT ATT  
GAC AGA TCA GAT AAG GCA GGA AAA ATG CTT GCT GAA GTG CTT  
CTC AAG GGA TTG CAA GGA AAT AGG CCT GTG ACT CTC ATT GGG  
TTT TCA CTA GGT GCA CGT GTT ATA TTT AAG TGT TTA CAG GAA CTT  
GCT TTA TCG AGT GAT AAT GAG GGA CTT GTT GAG AGG GTG GTT  
CTT CTT GGT GCT CCA GTT TCT GTG AAA GGC GAG CGG TGG GAG  
GCT GCG AGG AAG ATG GTT GCT GGA AGA TTT GTG AAT GTG TAC  
TCC ACA GAT GAC TGG ATT CTT GGT GTT ACT TTT CGT GCG AGT  
CTG CTA ACA CAA GGG TTG GCT GGC ATC CAG GCC ATT GAT GTC  
CCT GGT GTT GAA AAT GTC GAT GTT ACG GAG CTT GTC GAT GGC  
CAT TCG TCT TAC CTG TCG GCA GCA CAA CAG ATA CTG GAG CAT  
CTT GAA CTA AAT ACC TAC TAT CCG GTT TTT GTT CCC CTG AGC GCA  
GCC AAC GAA GAA ACA GAT GGA ACA GTT GCA CAG TAA) 所示。其中

加粗的A碱基为本发明实施例1中0sLDDT1基因第5416bp位碱基缺失突变位点。该碱基A缺失

后,造成水稻基因OsLDDT1发生移码突变,编码蛋白提前转录终止,使基因OsLDDT1功能丧失。

[0044] 本发明提供了水稻基因OsLDDT1的应用,包括以下任一项或几项的应用:

[0045] 1) 用于调控植物雄配子发育;

[0046] 2) 用于调控植物育性;

[0047] 3) 用于调控植物结实率;

[0048] 4) 用于植物品种改良;

[0049] 5) 用于制备转基因植物。

[0050] 在本发明中,所述植物优选包括禾本植物。在本发明实施例中,以水稻作为禾本植物的代表,举例说明基因OsLDDT1功能。在本发明中,使水稻基因OsLDDT1功能丧失,使野生型水稻雄配子发育异常、完全不育。向突变体lddt1(雄性不育材料)中过表达OsLDDT1基因后,使突变体lddt1植株雄性配子育性恢复。由上述功能互补实验可知,基因OsLDDT1与调控水稻雄性育性相关,且基因OsLDDT1的正常表达使水稻雄配子正常发育。鉴于雄配子发育直接与植物育性相关,并且雄配子正常发育使植物可育。

[0051] 在本发明中,水稻OsLDDT1基因功能丧失后花粉完全败育,无法收获种子,但败育的植物经异交,子代结实率较高,可用于创制智能不育系,提高制种产量,应用于杂交水稻育种中。

[0052] 本发明提供了一种雄性不育植株育性恢复的方法,将水稻基因OsLDDT1导入雄性不育水稻植株中,雄配子发育恢复正常,花粉育性和结实率恢复正常。

[0053] 本发明提供了一种用于检测水稻雄性不育的INDEL分子标记,在SEQ ID NO:1的基础上缺失第5412位碱基A;

[0054] 优选的,所述INDEL分子标记采用SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5所示的引物对扩增。

[0055] 本发明提供了所述INDEL分子标记在检测水稻雄性不育中的应用。

[0056] 本发明提供水稻基因OsLDDT1突变导致水稻雄性不育,阐明水稻雄性不育花粉败育的分子机制,将进一步深化人们对水稻雄性不育分子机理的认知,为水稻雄性生殖发育的分子调控机理提供新观点。同时,将雄性不育基因应用于水稻品种的遗传改良,对水稻育种工作者具有重要的实践意义。

[0057] 下面结合实施例对本发明提供的水稻雄性不育基因OsLDDT1及其分子标记和应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0058] 实施例1

[0059] lddt1突变体和野生型ZH8015分别采用尼康D800数码相机和卡尔蔡司LumuxV12立体荧光立体显微镜(德国,马尔库萨里)拍摄水稻植株和花器官组织等材料。在I<sub>2</sub>-KI花粉染色过程中,花药和花粉粒经取材后浸泡在浓度为1.2%的I<sub>2</sub>-KI溶液中(约30秒),然后在徕卡显微镜下拍照保存。

[0060] 图1为突变体来源于籼稻中恢8015的EMS化学诱变群体。该突变体lddt1成熟的花药表现为乳白色、无花粉,小穗完全败育。

[0061] 表1对lddt1突变体分别与野生型和02428杂交所产生的BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>和F<sub>1</sub>、BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>和F<sub>2</sub>群体分别进行小穗的结实率、内外轮花器官及花药发育等表型统计。

[0062] 表1 lddt1位点的遗传分析

组 合	F <sub>1</sub> 单株结实率	F <sub>2</sub>		$\chi^2$ (3:1)	$\chi^2_{0.05}$
		野生型	突变型 ( <i>lddt1</i> )		
[0063]					
<i>lddt1</i> /Zh8015	82.32	365	115	0.28	3.84
<i>lddt1</i> /02428	86.59	3322	1078	0.59	

[0064] 结果显示,BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub>和F<sub>1</sub>单株上所有性状均与野生相同,而BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>和F<sub>2</sub>分离群体内,野生型和*lddt1*突变表型的分离比均符合3:1的分离比(表1),由此可见,*lddt1*的突变性状由一对隐性核基因控制。

[0065] 实施例2

[0066] 半薄切片观察*lddt1*突变体和野生型ZH8015花药发育过程

[0067] (1) 取样固定:在活体上取野生型和突变型不同发育时期的小花,立即置于新鲜配制的FAA固定液( $V_{37\% \text{甲醛}}:V_{冰乙酸}:V_{50\% \text{乙醇}}=5:5:90$ )中固定,利用真空泵缓慢抽气,近真空状放置,缓慢放气至样品全部沉底,换用新的FAA,固定24h。

[0068] (2) 梯度酒精脱水:按颖花长度将样品放在不同的小瓶中,去掉颖壳进行酒精梯度处理:50%乙醇、60%乙醇、70%乙醇、85%乙醇、95%乙醇各级浸泡0.5h;然后100%乙醇1h、饱和番红处理2h。

[0069] (3) 预渗透:无水乙醇与Technovit 7100树脂等体积混合配成预渗透液,在4℃预渗透2h。

[0070] (4) 渗透:将1g硬化剂I溶于100ml Technovit 7100树脂中配成渗透液,在4℃过夜处理样品。

[0071] (5) 包埋:将1ml硬化剂II加入15ml渗透液中配成聚合液,加入已放入样品的包埋板中聚合,要求操作迅速,以免聚合液凝固。聚合完成后,样品块放在65℃烘箱中烘块4d左右,直到样品变硬即可切片。

[0072] (6) 切片:不同包埋块在Leica RM2265半薄切片机上切片,切片厚度为2μm。在样品上滴加少量的甲苯胺蓝染色,在烘片机上经60℃烤干后,用Leica DM2000光学显微镜观察并拍照。

[0073] 为了进一步明确突变体在花药发育过程中存在的细胞学缺陷,我们对野生型中恢8015和突变体*lddt1*花药进行了横切面观察。野生型和*lddt1*之间的形态差异在花药发育的8a时期开始愈发显著。在第8a时期,在野生型中花粉母细胞基本形成,呈椭圆形,花药内壁细胞和中间层开始细线化,绒毡层的胞质也开始浓缩(图2A);在*lddt1*突变体中,花粉母细胞可以分隔成二分体,但是绒毡层细胞空泡化和胞质染色较少(图2B)。在8b时期,野生型花药壁中间层逐渐退化,小孢子母细胞分裂形成二分体,进一步分裂成四分体(图2C);而*lddt1*突变体的中间层明显存在,直到第13时期中间层才退化,其四分体呈不均分裂(图2D)。在第9时期,野生型绒毡层细胞浓缩深染,圆球状小孢子从四分体中释放出来(图2E)。而在同一阶段的突变体*lddt1*的绒毡层细胞空泡化,形成一些小孢子细胞,但有很多是不完整(图2F)。在第10时期,野生型小孢子细胞体积明显增大,在孢子体内形成中央大液泡,中层细胞降解,而绒毡层细胞的胞质浓缩降解成带状,与第9时期比,染色明显变淡(图2G),而

1ddt1的绒毡层明显膨胀,小孢子被膨大的绒毡层挤压至药室中央,形状不规则,大多数小孢子细胞在该时期开始皱缩、降解(图2H)。第11时期,野生型花药的小孢子继续增大,形成不规则的月牙形,绒毡层细胞继续降解(图2-I);而突变体1ddt1绒毡层较之第10时期显著皱缩,仍然显著存在,小孢子则呈不规则线状,与绒毡层融合到一起,花药壁进一步降解至药室(图2J)。至第13时期,野生型花药内含成熟花粉粒,位于相邻的两个花粉囊间出现开裂的现象,为释放成熟花粉粒和授精做准备(图2K);而突变体1ddt1花药内无可见花粉粒,且不开裂,可观察到完整的花药囊壁(图2L),仅存在一些降解后的颗粒状物质。此外,野生型中恢8015花药壁的中间层在8a时期开始降解,直至第9时期就基本降解完成,内囊细胞也在第13时期降解消失,最后只剩花药外表皮一层细胞;但1ddt1突变体的花药绒毡层和中间层细胞到第11时期才开始降解消融,直至第13时期,都还保留着明显的内囊细胞,而由于这些细胞降解较晚或未降解,导致药室内的小孢子细胞营养供给不足而自身降解,不能形成成熟的花粉粒。以上结果表明,1ddt1突变体绒毡层降解和花粉囊壁的分化和退化进程均发生了延迟,最终导致其无成熟花粉和小穗完全不育。

#### [0074] 实施例3

##### [0075] 扫描电镜观察1ddt1突变体和野生型花药发育过程

[0076] 1) 样品双固定:取1ddt1突变体和野生型新鲜的颖花,立即浸在2.5%的戊二醛溶液中。花药成熟期的样品需要剪开颖壳,更好的固定样品,其他样品均不需要去掉颖壳,以免样品处理过程中破坏花药表面结构。之后的样品洗涤和饿酸处理方法同透射电镜。

[0077] 2) 脱水:脱水处理同透射电镜处理方法,唯一不同的是将最后一步的丙酮处理换成无水乙醇处理20min。

[0078] 3) 干燥及观察:临界点干燥。在Hiachai HCP-2型临界点干燥仪中进行样品干燥,花药经镀膜后,在Hiaci SU-010型扫描电镜中观察花药和花粉粒结构并拍照。

[0079] 突变体植株第13期的花药内外壁和花粉外壁进行了扫描电镜观察。由花药整体来看,野生型的花药较为饱满,而突变体1ddt1的花药明显比野生型的小且较为干瘪(图3A、图3B)。对花药外壁放大观察发现,成熟的野生型花药表面比较充实,表面线状物质排列规则;而突变体的花药外表面皱缩变小,其表面物质分布极不规则(图3C~图3E);进一步观察,成熟的野生型花药内壁表面均匀地分布着致密且规则的乌氏体单体(图3G),而突变体的花药内壁褶皱,形状不规则,其表面未观察到乌氏体单体等物质(图3H)。随后对其花粉粒结构进行观察发现,野生型的花粉粒呈规则的饱满球状,表面具有萌发孔(图3I),而突变体的花粉皱缩呈干瘪状(图3J),进一步放大倍数发现,野生型花粉粒表面分布着规则的孢粉素,而1ddt1花粉粒外壁逐渐降解褶皱,形态不规则(图3K、图3L)。可见,突变体花药囊壁的乌氏体、孢粉素等形成和转运存在显著缺陷,推测其花药囊壁的脂肪酸等物质的合成与转运发生了严重变异,也可能与绒毡层与中间层细胞的降解异常有关。

#### [0080] 实施例4

##### [0081] 透射电镜观察1ddt1突变体和野生型花药发育过程

[0082] 1) 样品双固定:取1ddt1突变体和野生型不同发育时期新鲜的颖花,去掉颖壳,浸在新配制的2.5%的戊二醛溶液(0.1M, pH 7.0的磷酸缓冲液配制)中,抽真空处理,4℃过夜固定样品;次日,弃固定液,用0.1M, pH=7.0的磷酸缓冲液洗涤样品3次,每次15min;在通风橱中用1%的饿酸溶液固定样品1.5h;倒掉饿酸溶液,同样用0.1M pH7.0的磷酸缓冲液漂洗

样品3次,每次15min。

[0083] 2) 脱水:用30%、50%、70%、80%、90%和95%的梯度乙醇溶液对样品进行脱水处理,每种酒精浓度处理15min,再用100%的乙醇处理20min;最后过度到纯丙酮处理20min。

[0084] 3) 渗透:用包埋剂与丙酮的混合液(V/V=1/1)处理样品1h;再用包埋剂与丙酮的混合液(V/V=3/1)处理样品3h;之后,样品用纯包埋剂渗透过夜。

[0085] 4) 样品包埋、切片和观察:将经过渗透处理的样品包埋起来,70℃加热过夜,即得到包埋好的样品;样品在Leica EM UC7型超薄切片机中切片,获得70-90nm的切片,切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀50%乙醇饱和溶液各染色10min,在Hitachi H-7650型透射电镜中观察花药样品并拍照。

[0086] 突变体植株和野生型不同发育时期花药横切面的透射电镜观察,进一步探究了突变体lddt1在花药发育过程中存在的缺陷。在第9时期,野生型中恢8015绒毡层细胞浓缩染色较深,小孢子从四分体中释放出来(图4A-图4C);而同一时期突变体lddt1的绒毡层空泡化,并且形成一些小孢子细胞(图4D-图4F)。第11时期野生型小孢子继续进行不均等分裂,相互挤压形成不规则的月牙形,绒毡层细胞继续降解为小孢子的发育提供孢粉素前体物质,乌氏体在花药内壁形成,中间层消失退化(图4G-图4I);而突变体绒毡层细胞较第9时期有降解皱缩现象,但仍然大量存在,小孢子由于绒毡层降解延迟无法获得充足的营养物质出现降解退化现象,花药内壁光滑无乌氏体形成,同时中间层细胞仍然存在(图4J-图4L)。在花药发育的第12时期,野生型内层细胞和绒毡层细胞完全降解,小孢子内被淀粉粒充实成熟花粉粒形成(图4M-图4O);而突变体的内层细胞和绒毡层细胞仍未完全降解,小孢子发育过程中缺少绒毡层细胞降解产生的孢粉素前体物质,导致小孢子完全降解无法形成成熟花粉粒,药室内无小孢子,绒毡层继续降解(图4P-图4R)。证实lddt1突变体是因为绒毡层细胞在大液泡时期和有丝分裂时期异常膨大、降解延迟导致花粉发育营养不足、无法形成乌氏体和孢粉素等物质,最终花粉降解,无成熟花粉形成。

[0087] 实施例5

[0088] 在lddt1/02428配组所得F<sub>1</sub>衍生的F<sub>2</sub>分离群体中,选取无花粉型雄性不育株的叶片作为定位材料。首先采用BSA(Bulk Segregant Analysis)制作正常可育植株和不育植株两个DNA池,然后利用本实验室保存的均匀分布于水稻12条染色体上且在籼稻Zh8015和粳稻02428之间有多态性的SSR和InDel分子标记进行筛选,将突变基因确定在具体一条染色体两个分子标记之间。根据Gramene(<http://www.gramene.org>)中粳稻日本晴和籼稻9311的全基因组序列,用DNASTAR软件进行序列比对,寻找InDel位点,在NCBI Primer-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LNK=LOC-BlastHome>)网站开发新的InDel分子标记,同时扩大分析1078个隐性单株,对突变基因进行精细定位。

[0089] 选用lddt1×02428的F<sub>2</sub>群体作为定位群体,初步的连锁筛选将lddt1位点与3染色体短臂标记InD34和RM14327紧密连锁,利用本实验室的公共标记进一步将其初定位至RM14282和RM3866之间;进一步扩大定位群体并在此区间内设计InDel引物,利用1078个隐性单株、最终将lddt1基因精细定位至JF-44和JF-46之间,物理距离约为28.8kb,该区间内包含7个开放阅读框(图5A),其中不含有已报道的控制水稻花药和花粉发育相关基因,由此推断,该突变基因是一个全新的水稻雄性不育基因。通过测序比对发现,发现突变体lddt1中ORF4的第9个内含子与第10个外显子连接处发生了一个T→C转换(图5A),导致其cDNA序

列插入73bp (SEQ ID NO:6),其编码的氨基酸由精氨酸变为丝氨酸,且紧接着插入13个氨基酸后翻译提前终止(图5B,SEQ ID NO:7),推测该突变可能是引起花药发育畸形和无花粉的原因,该基因很可能为目的基因。根据该突变位点,利用限制性内切酶BamHI设计了一个CAPS标记(BamHI-F:TCAGCAAGCATTTTTCCTGCCTTATCGGATC,SEQ ID NO:4;BamHI-R:CAGTGCACTGACTATCTACAGTATTGG,SEQ ID NO:5),可成功的将突变体的目的片段切开,而野生型相应片段不能被切开,BC1F1植株则呈杂合带型(图5C)。

#### [0090] 实施例6

[0091] pCAMBIA1300载体构建:根据预测的候选基因序列设计引物,以ZH8015基因组DNA为模板,扩增了LDDT1全基因组DNA片段,该片段包括2369bp上游序列,全长编码区以及862bp下游序列。采用In-Fusion (Takara)同源重组试剂盒将该片段连接到经EcoRI和PstI线性化的载体pCAMBIA1300上。转化大肠杆菌,经菌液测序挑选pLDDT1::LDDT1- $\alpha$ 质粒阳性克隆。采用农杆菌介导的转化lddt1突变体幼穗诱导的愈伤组织。

[0092] 构建并测序验证成功的pCAMBIA1300-0sLDDT1的载体(如图6A),转化到突变体lddt1后获得转基因植株,经潮霉素鉴定为阳性的植株正常种植于大田,于抽穗开花期取样观察发现,转基因植株的花药转变为乳黄色,花粉育性大于80%(图6C)。待灌浆至完全成熟,发现其小穗育性和结实率已基本与野生型相同(图6B)这些表型进一步证明ORF4即为控制本研究中lddt1突变体花药发育畸形、无花粉的雄性不育基因。

#### [0093] 实施例7

##### [0094] 0sLDDT1蛋白的序列分析

[0095] 我们对目前在水稻、玉米、拟南芥、小麦等植物中与LDDT1蛋白相似度高于60%的同源蛋白进行了多重序列比对,如图7-A所示,LDDT1蛋白高度保守;进一步我们使用MEGA.7对目前已知的保守蛋白序列建立了LDDT1与其同源蛋白的系统进化树,结果显示LDDT1蛋白与玉米、小麦、二穗短柄草处于同一进化分枝(图7A),其同源相似度高达97%。为了进一步研究LDDT1基因的功能,对其编码的蛋白进行生物信息学分析。根据Rice Annotation Project (RAP)数据库中对该蛋白注释为功能包含未知的UDF726保守结构域的一类蛋白,进一步利用InterPro数据库对该蛋白进行序列分析发现,其包含有跨膜和coil螺旋结构域(2-649),保守区域为第290-615个氨基酸,在此保守结构域中包括三个跨膜结构域(第295-323、343-369、461-482位氨基酸)、1个 $\alpha/\beta$ 水解酶结构域(第497-587位氨基酸)和3个蛋白激酶C磷酸化位点(第497-499、558-560和589-591位氨基酸)。上述结果表明,LDDT1蛋白是在禾本科植物中一类具有高度保守的跨膜和螺旋结构域的 $\alpha/\beta$ 水解酶蛋白。

[0096] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

## 序列表

&lt;110&gt; 中国水稻研究所

&lt;120&gt; 水稻雄性不育基因OsLDDT1及其分子标记和应用

&lt;160&gt; 7

&lt;170&gt; SIPOSequenceListing 1.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 7610

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 1

```

ctatgacatg attacgaatt ccatcgcta cctcacctac ggccgcgcgcg acatggcctt 60
ctcccactac ggccacttct ggcgacaggt gcgcaagctc agcgccctgc ggctcttcag 120
ccggcggcgc gcccagtcgt ggcgcgccgt ccgcgacgag tcggccaagc tggtcggcgc 180
cattgccagg agagccggcg aggccgtcga cctcggtagag ctcatcttcg ggctcaccaa 240
ggacgtcatc tttcgcgcgc ccttcggcac gcgcgacggc ggcgccacg gcgagctgga 300
ggttctcctg caggagtctt ccaagctgtt cggcgcgctt aacgtcgggg acttcatccc 360
ctggctcgcg tggctcgacc cgcacggcat caaccggcgg ctccgcgcgg cgcgcgccgc 420
cctcgacagc gtcatcgaca ggatcatcga cgagcacgtc agcaaccccg ccggcgacga 480
ggacgccgac atggtggacg acatgctcgc gttcctcgac gaggccggac gagaccaaac 540
cggcggcggc ggcgagctgc agggcacgct ccggctgacg cgcgacaaca tcaaggccat 600
cataatggta cgtgccattc tgacaccact gccatggcat gcacgtcgcg ttgcttgatg 660
gagttggcga cgacaagtgc aggacttcgt cttcggcggg acggagacgg tggcgtcggc 720
gatcgagtgg gcgatggcgg agttgctgca cagccccggc gatctccggc ggctgcaggc 780
ggagctcgcc gacgtggtgg ggctcgggcg cggcgtggag gagggcgacc tggagaagct 840
ccccttcctc aggtgcgtcg ccatggagac gctgcgtctc caccgcccga tcccgctgct 900
cctccacgag gcggcggcgg actgcgtcgt cggcgggtac tccgtgccga ggggcgcccg 960
cgtggtggtc aacgtgtgga gcgtcggccg cgacgccggc gcgtggaagg gcgacgccgg 1020
cgcggtccgg ccggcgaggt tcatggcggg cggcgaggcg gcggggatgg acctcagggg 1080
cggatgcttc gagctcctgc cgttcgggtc ggggcggagg gcgtgccccg ccatcgtgct 1140
cgggatgtac gagctagagc tcgtcgtcgc gcgcctcgtc cacgcgttcg ggtgggcgcc 1200
gccgggcggc gtggcgccgg aggagctcga catggcggac ggcttcggcc tcaccgcgcc 1260
gcgcgccgcg aggtccgcg ccgtgccgac gccccggctc acctgcccga tgtgacgcgc 1320
gttctcgatt tggcgcgaga gatgcgcaac gcagctcgaa gtgtgactgt gacagtgtga 1380
gcgtgtaatc tgggtgtggac atcgtatgca tcatgtgtgc atatggataa ttaaataatat 1440
aaataatatt tggatgtgga tttcggtga aattttctgt catttcgaaa aaaattcgtc 1500
ctagaattca aatagaatat ttttttctca ttatttttta tagttgcaca ttggctacat 1560
tatctgtaga agcttcttga ttcacgagat ctagcgggcg tgacaatatg gtcaaagaat 1620
tctttaccct agacatgggc gtcgatatgg tcgtaaagct gcttttcagc ttagtagcca 1680

```

```

catccataat ttaatcttag gattatTTTT acagttgatt ccgatatTTT ttcatcgtaa 1740
acatgggggtt ttacatcatt aaaaaccac atataaaatc ctttccctta aaagaatgat 1800
ggctcttgaa gcccttattt ctttttttaa tctccgagta tgtatgaata gtttgattac 1860
gtgcatTTTta attatgtaga gatttggaat gctattcgac aattatatta tcttaatgtt 1920
acattaagtg agatgctttt attattttaaa aatcgattat atttttaaac aaaatctgaa 1980
gcactccgtg gaccgtgggt acacgtgcca ggctcgacgtg ttcttctgga agaaatctat 2040
gtctactTTTt gaaatggaat atactacctc cgtaaaaaat aaatacaaac gtaaatatcc 2100
gtgtgactgt tcgtcttatt ccaaaaattt ataaaaataa attataaaaa aacagtcaca 2160
tataaaaatat tatttatgtt ttatcatcta atagtaaaaa aaaatattaa tcataaaaga 2220
taaagaaaaa tttaaataag atgaacgatc aaacgtgaa tataaataat attttataaa 2280
gctgtactta ttttaagacg gaaagagtaa aaaattttgg aaaaatttct agtgcagcat 2340
gctgctcatt tgggaggtgt gtgctgctgc tctccagtgt cccccaacca aaatttgacc 2400
gagtttgga cgaagaaac cgctcgacg ccgtccaact gaagccagcc gaggcagca 2460
accaagggt aggcctaggc gtaaaccctg cacctgaatc gatcgccggc gatggccacg 2520
acgtgacgc caacgcagcg ctacgcggcg ggggcgctgc tggcgctgc gctccgccag 2580
gccagatcc accagtccgt cctcctcggc gccaccacc accacgacga cgacgacgag 2640
gaacaggggc gcaccagcac cagcagcggc ggcggcggcg gcagctctc ctctctctcc 2700
aactccggcg ccggcgcgga cgccgacctc tggacacacg actccacgg cctcctccgc 2760
ccgctcttca ggtgttttct cgctcctctc cgcttgtaaa tttggggggt ttgagatgaa 2820
tgcttccgct ttacttggcg atcggggggc tctgctaggt tcctggagat cgatcccaag 2880
gcgtggctcg ggctggagga gacggcgcg tcgtccgagg ccaagcatca catcggcgcg 2940
gtacggcact cactgcattt tctgccctcg tattgtaatt ggccgtgcgt tttggtcagt 3000
gttgacgtga tggtttgggg cttaggtgtt tgattatatg cctacaagac tgttcaactt 3060
caatttccgc gtgtgcttga ccagtgaat ttgtgttttc gtagcatctc atatcactct 3120
cattttgtag tttctaagga taatatttga agaagatggc gaaagctcct cagacagatc 3180
cgttcaggag cttgccttgg caaaaggagt tgatgtgatg gtaatgagtt tgggcaatga 3240
cagtgaagtg ggtaacacaa ttaaagggtg ggatcaagat gctttgccta gcagctctgg 3300
aacagataaa tccccagggg aaagctctca tgatgaccag ttaggaatca ataaattgac 3360
cttagatgat attcctgcta acaatcaccg gaagatggca ttgctgtttg ctcttctctc 3420
ggcttgtgtt gctgataaac ctgtatcaca agaggaagag gacagaaaat taaccgcctt 3480
caggaagggt tatgatgctc ggcatcgtgt tgctcttcgg ctgctatcta catggcttga 3540
tgtgaagtgg atcaaaatgg tttgtacaga ctaaaacttt ttggattcag cagagtaatc 3600
actatgggta ccaaacaata tcctaaggca attaaagaaa aaagaacccc caatgttttt 3660
catgtttcac caaatttgc accaaccatg ctttttcgct gcaggaagca attgaggtta 3720
tggttgcag ctctgccatg gcagcagcga aagaacaaga acaatcacag gaaagcgcag 3780
caccacaaaag taaatgggaa aaatggaagc gtggaggaat aattgggtgca gctgctttga 3840
ctggaggagc actgttggtt attactgggg gtatgaaaaa acttcagaaa ttctgctgga 3900
cgctgaacat ctgaactagt ttctgtcgct catattactc taaacggttg atattctctt 3960
ccaacttgac aggttttagct gctccagcaa ttgctgcagg gtttggtgct cttgctccaa 4020

```



```

ccctgggcac acttgtccct gttataggag ctagecggatt tgctgctatg gctaccgctg 4080
caggatctgt tgctggctct gtggcagttg ctgcatcatt tggaggtgtg tctacatgtt 4140
cttcaaaacc cttctgggtga tgttgttttg agctttcgtt tcgtcatgct acattactat 4200
cagctgcagt ctccctttcc tttgtcatg agggttgcaa tattgttttag tgaacttacc 4260
caagaatatg cacacaacac ttttaggggt gcattttaca attagataat agttcgaatg 4320
attaccagaa gaaggataag acttatacaa tgtatgaccc aaaattgtga gaaacatatg 4380
gatgaaaagcg taatgagaat agttgtgggt tggaaatfff ctattttattc atgcttatcc 4440
tttgaaatga tatttttcaa ttagctgctg gagctggctt gacggggagc aaaatggcca 4500
gaagaattgg gagcgtgaaa gaatttgagt tcaaacctat tggtgaaaac cataatcagg 4560
gtgtgagttc cttttctctt tctgatgtca caacaaatff cattctacta gatttttgtt 4620
caccctttta gtagtcaaac tgatctggtc tggttaaatg ttctcaacac tttcagcggc 4680
ttgcagttgg catcttaatt tccggatttg cttttgatga ggatgacttt tgtagacctt 4740
gggaaggatg gcaggataac cttagagagt atagagtggg ttttttgaca tgttcttttt 4800
gctgatcact attctagtag tttgtcatgt gttaccagct aagagcatcc ttaaaaatat 4860
aatftcaaga gttgaataat gtctggcagg tacatccttc aatgggagtc taagcatata 4920
attgcagtga gtacagcaat acaggattgg ctgacatcaa gtaatatttg tagttttgcc 4980
catttacact atcagcaaaa acttctaatt tacactgtta tttatgattc aggacttgct 5040
atggaattga tgaagcaagg tgcaatgaga accgtattaa gtggtcttct tgcagcattt 5100
gcatggccag ctacactgct tgcggtaca gactttattg atagtaaag gtctgttgct 5160
attgacaggt aattgcaaac tctccattt ctcttatgtt gcttgacagag ttgcagtga 5220
cactgactat ctacagtatt ggtattcttc tgttgatcga cacataagtt tgtgtattca 5280
aatftatgaa gattatgacg taacatttag acaaactfff aatgtatata tcccacagta 5340
catatatgac agftaaagac atcctagcaa tttgttaact tagccaatca aaatcaactg 5400
tatcttctca gatcagataa ggcaggaaaa atgcttgctg aagtgttct caagggattg 5460
caaggaaata ggtaactcca tatgcattta tttcattagc gatgttgcc gctcagaaat 5520
atgccccct aatgccaatt tttcccagg cctgtgactc tcattgggtt ttcactaggt 5580
gcacgtgtta tatttaagt tttacaggaa cttgctttat cgagtataa tggtagctgt 5640
tctgtaacca tctccttcat ccataagagt ttccttctt ggtggcaaat tatcagtttt 5700
aaccatctcc atctcttgt tgcaaccaga gggacttggt gagagggtgg tttctcttg 5760
tgctccagtt tctgtgaaag gcgagcgggt ggaggtgctg aggaaggtaa tggcgatga 5820
atcatttttt tctctattat ctctgtagga aggggtgcaac gtaacaacaa gaaacagtga 5880
agttgctgtt cattttatcc cagcttcttc cctcggcgt taattcactc acttgtccac 5940
atggcagatg gttgctggaa gatttgtgaa tgtgtactcc acagatgact ggattcttg 6000
tgttactttt cgtgcgaggt aaacagattt atgatttcag agctcctaga aagctcatat 6060
caccattccc ccatgtgagc tatgacttaa gtaatcttct cgtgcagtct gctaacacaa 6120
gggttggtg gcacccaggc cattgatgtc cctggtgttg aaaatgtaag catctgggt 6180
gccattcttg tgttcttac tgattttcat ctatctttta cacgtctttg tgtacaatgc 6240
aatftacagg tcgatgttac ggagctgtc gatggccatt cgtcttacct gtcggcagca 6300
caacagatac tggagcatct tgaactaaat acctactatc cgttttttgt tcccctgagc 6360

```

gcagccaacg aagaaacaga tggaacagtt gcacagtaac gtgtgggcag gattcgatga 6420  
 aaatcgtatg tagacaacca aatgtaacag actatatata caaccaaag taacagacta 6480  
 actcgttcaa actgtaaacc agtctcagcc tgaggcgaat gtgtctgggt ggtgaggctt 6540  
 gctgtttctg gccgtgtcaa acaatctgtg ttcgtgaatc gcgattccgt tccttggctt 6600  
 gaagagagaa gcttatgggt aaacttagac ccaactgtat ctgggcaaaa tcaggaattt 6660  
 agaccagaaa aggccccaaag agaacgctac cttattgcaa atacatttag tacggcagtg 6720  
 atttcgctca aaaaagaaaa caaaatagta cagcagtggt acgttgccgc acaactgtcc 6780  
 attgagaatg gaaatggata caggggagac acaaatgga tctggctaca agagagccac 6840  
 gaaatggaca ctggatacag gagtaatgac gacaaccgat aaactattcc acaagtccct 6900  
 taatacaaat tcagtaatca gctgcctaac ttgtactgtt gtatatctga ccttcgacaa 6960  
 gccatcctct accaaaatttc ggtgcacagt atcagcatgt taatatcaca atcacatcat 7020  
 gtatactgtt aagtagtagt atcatttata actagtcaaa atgctaaata actatcctaa 7080  
 cccagtgtac taataccgaa tacattctgt caacataaga caaatcagaa actaaaccga 7140  
 tgggttacat atcgctatct tccgatacat ctggcggatg cgggtcaggc ctcaggcctc 7200  
 gaagaaacaa aagcggggaa caataggat aggatacac agatgcagtt caattgaacc 7260  
 aagcaaacg aaaaataggcc gtgtcccaa aagagtggaa tctgcttggg cagtacattc 7320  
 agtcatcctc ctatgctaga gctagacata tactccgtcc ttgctacggt tgaatgaaac 7380  
 caagaaaagg ttgtgtaggc tctatgttga ctaccactgt aattaggcta taaaaaaag 7440  
 tcaaaagata tgggcaaaga atgcaaacc tcgttatcta ttgcagagat caggggtgca 7500  
 ggtagttaca agatgcaccc ttcctgcagt agccattctc atgaaattta catatcccc 7560  
 tctgagtttg tccccttggg gttgatctcg acgatccacc agtgccaaat 7610

<210> 2

<211> 1986

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

atggccacga cgctgacgcc gacgcagcgc tacgcggcgg gggcgctgct ggcgctcgcg 60  
 ctccgccagg ccagatcca ccagtccgtc ctctcggcg cccaccacca ccacgacgac 120  
 gacgacgagg aacaggggcg caccagcacc agcagcggcg gcggcgggcg cagctcctcc 180  
 tcctcctcca actccggcgc cggcgcggac gccacacctt ggacacacga ctcccacggc 240  
 ctctccgcc ccgtcttcag gttcctggag atcgatccca aggctgggtc ggggctggag 300  
 gagacggcgg cgtcgtccga ggccaagcat cacatcgcg cgtttctaag gataatattt 360  
 gaagaagatg gcgaaagctc ctgagacaga tccgttcagg agcttgccct ggcaaaagga 420  
 gttgatgtga tggtaatgag tttgggcaat gacagtgaag tgggtaacac aattaaaggt 480  
 ggggatcaag atgctttgcc tagcagctct ggaacagata aatccccagg ggaaagctct 540  
 catgatgacc agttaggaat caataaattg acctagatg atattcctgc taacaatcac 600  
 cggaagatgg cattgctgtt tgctcttctc tcggcttgtg ttgctgataa acctgtatca 660  
 caagaggaag aggacagaaa attaacccgc ttcaggaagg gttatgatgc tcggcatcgt 720  
 gttgctcttc ggctgctatc tacatggctt gatgtgaagt ggatcaaaat ggaagcaatt 780

gaggttatgg ttgcatgctc tgccatggca gcagcgaaag aacaagaaca atcacaggaa 840  
 agcgcacac ccaaaagtaa atgggaaaaa tggaagcgtg gaggaataat tgggtgcagct 900  
 gctttgactg gaggagcact gttggctatt actgggggtt tagctgctcc agcaattgct 960  
 gcagggtttg gtgctcttgc tccaaccctg ggcacacttg tccctgttat aggagctagc 1020  
 ggatttgctg ctatggctac cgctgcagga tctgttgctg gctctgtggc agttgctgca 1080  
 tcatttggag ctgctggagc tggcttgacg gggagcaaaa tggccagaag aattgggagc 1140  
 gtgaaagaat ttgagttcaa acctattggt gaaaaccata atcagggtcg gcttgcaagt 1200  
 ggcaccttaa tttccggatt tgcttttgat gaggatgact tttgtagacc ttgggaagga 1260  
 tggcaggata acctagagag gtacatcctt caatgggagt ctaagcatat aattgcagtg 1320  
 agtacagcaa tacaggattg gctgacatca agacttgcta tggaattgat gaagcaaggt 1380  
 gcaatgagaa ccgtattaag tggctcttct gcagcatttg catggccagc tacactgctt 1440  
 gcggctacag actttattga tagtaaattg tctgttgcta ttgacagatc agataaggca 1500  
 ggaaaaatgc ttgctgaagt gcttctcaag ggattgcaag gaaataggcc tgtgactctc 1560  
 attgggtttt cactaggtgc acgtgttata tttaagtgtt tacaggaact tgctttatcg 1620  
 agtgataatg agggacttgt tgagagggtg gttcttcttg gtgctccagt ttctgtgaaa 1680  
 ggcgagcggg gggaggctgc gaggaagatg gttgctggaa gatttgtgaa tgtgtactcc 1740  
 acagatgact ggattccttg tgttactttt cgtgcgagtc tgctaacaca agggttggct 1800  
 ggcatccagg ccattgatgt ccctggtgtt gaaaatgtcg atgttacgga gcttgtcgat 1860  
 ggccattcgt cttacctgtc ggcagcacia cagatactgg agcatcttga actaaatacc 1920  
 tactatccgg tttttgttcc cctgagcgca gccaacgaag aaacagatgg aacagttgca 1980  
 cagtaa 1986

<210> 3

<211> 661

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

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

	100					105					110					
Gly	Ala	Phe	Leu	Arg	Ile	Ile	Phe	Glu	Glu	Asp	Gly	Glu	Ser	Ser	Leu	
	115					120					125					
Asp	Arg	Ser	Val	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Ala	Lys	Gly	Val	Asp	Val	Met	
	130					135					140					
Val	Met	Ser	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Glu	Val	Gly	Asn	Thr	Ile	Lys	Gly	
145				150					155					160		
Gly	Asp	Gln	Asp	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Asp	Lys	Ser	Pro	
	165					170					175					
Gly	Glu	Ser	Ser	His	Asp	Asp	Gln	Leu	Gly	Ile	Asn	Lys	Leu	Thr	Leu	
	180					185					190					
Asp	Asp	Ile	Pro	Ala	Asn	Asn	His	Arg	Lys	Met	Ala	Leu	Leu	Phe	Ala	
	195					200					205					
Leu	Leu	Ser	Ala	Cys	Val	Ala	Asp	Lys	Pro	Val	Ser	Gln	Glu	Glu	Glu	
	210					215					220					
Asp	Arg	Lys	Ser	Thr	Arg	Phe	Arg	Lys	Gly	Tyr	Asp	Ala	Arg	His	Arg	
225			230					235					240			
Val	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Thr	Trp	Leu	Asp	Val	Lys	Trp	Ile	Lys	
	245					250					255					
Met	Glu	Ala	Ile	Glu	Val	Met	Val	Ala	Cys	Ser	Ala	Met	Ala	Ala	Ala	
	260					265					270					
Lys	Glu	Gln	Glu	Gln	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Ser	Pro	Lys	Ser	Lys	Trp	
	275					280					285					
Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	Gly	
	290					295					300					
Gly	Ala	Leu	Leu	Ala	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu	Ala	Ala	Pro	Ala	Ile	Ala	
305			310					315					320			
Ala	Gly	Phe	Gly	Ala	Leu	Ala	Pro	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Val	
	325					330					335					
Ile	Gly	Ala	Ser	Gly	Phe	Ala	Ala	Met	Ala	Thr	Ala	Ala	Gly	Ser	Val	
	340					345					350					
Ala	Gly	Ser	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Ser	Phe	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Gly	
	355					360					365					
Leu	Thr	Gly	Ser	Lys	Met	Ala	Arg	Arg	Ile	Gly	Ser	Val	Lys	Glu	Phe	
	370					375					380					
Glu	Phe	Lys	Pro	Ile	Gly	Glu	Asn	His	Asn	Gln	Gly	Arg	Leu	Ala	Val	
385			390					395					400			
Gly	Ile	Leu	Ile	Ser	Gly	Phe	Ala	Phe	Asp	Glu	Asp	Asp	Phe	Cys	Arg	
	405					410					415					

Pro	Trp	Glu	Gly	Trp	Gln	Asp	Asn	Leu	Glu	Arg	Tyr	Ile	Leu	Gln	Trp
420				425				430							
Glu	Ser	Lys	His	Ile	Ile	Ala	Val	Ser	Thr	Ala	Ile	Gln	Asp	Trp	Leu
435				440				445							
Thr	Ser	Arg	Leu	Ala	Met	Glu	Leu	Met	Lys	Gln	Gly	Ala	Met	Arg	Thr
450				455				460							
Val	Leu	Ser	Gly	Leu	Leu	Ala	Ala	Phe	Ala	Trp	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu
465				470				475				480			
Ala	Ala	Thr	Asp	Phe	Ile	Asp	Ser	Lys	Trp	Ser	Val	Ala	Ile	Asp	Arg
				485				490				495			
Ser	Asp	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Leu	Ala	Glu	Val	Leu	Leu	Lys	Gly	Leu
500				505				510							
Gln	Gly	Asn	Arg	Pro	Val	Thr	Leu	Ile	Gly	Phe	Ser	Leu	Gly	Ala	Arg
515				520				525							
Val	Ile	Phe	Lys	Cys	Leu	Gln	Glu	Leu	Ala	Leu	Ser	Ser	Asp	Asn	Glu
530				535				540							
Gly	Leu	Val	Glu	Arg	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Pro	Val	Ser	Val	Lys
545				550				555				560			
Gly	Glu	Arg	Trp	Glu	Ala	Ala	Arg	Lys	Met	Val	Ala	Gly	Arg	Phe	Val
				565				570				575			
Asn	Val	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asp	Trp	Ile	Leu	Gly	Val	Thr	Phe	Arg	Ala
580				585				590							
Ser	Leu	Leu	Thr	Gln	Gly	Leu	Ala	Gly	Ile	Gln	Ala	Ile	Asp	Val	Pro
595				600				605							
Gly	Val	Glu	Asn	Val	Asp	Val	Thr	Glu	Leu	Val	Asp	Gly	His	Ser	Ser
610				615				620							
Tyr	Leu	Ser	Ala	Ala	Gln	Gln	Ile	Leu	Glu	His	Leu	Glu	Leu	Asn	Thr
625				630				635				640			
Tyr	Tyr	Pro	Val	Phe	Val	Pro	Leu	Ser	Ala	Ala	Asn	Glu	Glu	Thr	Asp
				645				650				655			
Gly	Thr	Val	Ala	Gln											
660															

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;400&gt; 4

tcagcaagca tttttcctgc cttatcgat 30

&lt;210&gt; 5

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

cagtgcacac tgactatcta cagtattgg 29

<210> 6

<211> 1527

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

```

atggccacga cgctgacgcc gacgcagcgc tacgcggcgg gggcgctgct ggcgctcgcg 60
ctccgccagg cccagatcca ccagtccgtc ctctcggcg cccaccacca ccacgacgac 120
gacgacgagg aacagggggcg caccagcacc agcagcggcg gcggcgggcg cagctcctcc 180
tcctcctcca actccggcgc cggcgcggaac gccgacctct ggacacacga ctcccacggc 240
ctcctccgcc ccgtcttcag gttcctggag atcgatccca aggcgtggtc ggggctggag 300
gagacggcgg cgtcgtccga ggccaagcat cacatcggcg cgtttctaag gataatatatt 360
gaagaagatg gcgaaagctc ctacagacaga tccgttcagg agcttgccctt ggcaaaagga 420
gttgatgtga tggtaatgag tttgggcaat gacagtgaag tgggtaacac aattaaaggt 480
ggggatcaag atgctttgcc tagcagctct ggaacagata aatccccagg ggaaagctct 540
catgatgacc agttaggaat caataaattg accttagatg atattcctgc taacaatcac 600
cggaagatgg cattgctgtt tgctcttctc tcggcttggt ttgctgataa acctgtatca 660
caagaggaag aggacagaaa attaaccgcg ttcaggaagg gttatgatgc tcggcatcgt 720
gttgctcttc ggctgctatc tacatggctt gatgtgaagt ggatcaaaat ggaagcaatt 780
gaggttatgg ttgcatgctc tgccatggca gcagcgaaag aacaagaaca atcacaggaa 840
agcgcatacac ccaaaagtaa atgggaaaaa tggaagcgtg gaggaataat tgggtgcagct 900
gctttgactg gaggagcact gttggctatt actgggggtt tagctgctcc agcaattgct 960
gcagggtttg gtgctcttgc tccaaccctg ggcacacttg tccctgttat aggagctagc 1020
ggatttgctg ctatggctac cgctgcagga tctgttgctg gctctgtggc agttgctgca 1080
tcatttgag ctgctggagc tggcttgacg gggagcaaaa tggccagaag aattgggagc 1140
gtgaaagaat ttgagttcaa acctatttgt gaaaaccata atcagggtcg gcttgcaatt 1200
ggcatcttaa tttccggatt tgcttttgat gaggatgact tttgtagacc ttgggaagga 1260
tggcaggata acctagagag gtacatcctt caatgggagt ctaagcatat aattgcagtg 1320
agtacagcaa tacaggattg gctgacatca agacttgcta tggattgat gaagcaaggt 1380
gcaatgagaa ccgtattaag tggctcttct gcagcatttg catggccagc tacactgctt 1440
gcggctacag actttattga tagtaaattg tctgttgcta ttgacagtac atatattgca 1500
gttaaagaca tcctagcaat ttgttaa 1527

```

<210> 7

<211> 508

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

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

290	295	300
Gly Ala Leu Leu Ala Ile Thr Gly Gly Leu Ala Ala Pro Ala Ile Ala		
305	310	315
Ala Gly Phe Gly Ala Leu Ala Pro Thr Leu Gly Thr Leu Val Pro Val		
	325	330
Ile Gly Ala Ser Gly Phe Ala Ala Met Ala Thr Ala Ala Gly Ser Val		
	340	345
Ala Gly Ser Val Ala Val Ala Ala Ser Phe Gly Ala Ala Gly Ala Gly		
	355	360
Leu Thr Gly Ser Lys Met Ala Arg Arg Ile Gly Ser Val Lys Glu Phe		
370	375	380
Glu Phe Lys Pro Ile Gly Glu Asn His Asn Gln Gly Arg Leu Ala Val		
385	390	395
Gly Ile Leu Ile Ser Gly Phe Ala Phe Asp Glu Asp Asp Phe Cys Arg		
	405	410
Pro Trp Glu Gly Trp Gln Asp Asn Leu Glu Arg Tyr Ile Leu Gln Trp		
	420	425
Glu Ser Lys His Ile Ile Ala Val Ser Thr Ala Ile Gln Asp Trp Leu		
435	440	445
Thr Ser Arg Leu Ala Met Glu Leu Met Lys Gln Gly Ala Met Arg Thr		
450	455	460
Val Leu Ser Gly Leu Leu Ala Ala Phe Ala Trp Pro Ala Thr Leu Leu		
465	470	475
Ala Ala Thr Asp Phe Ile Asp Ser Lys Trp Ser Val Ala Ile Asp Ser		
	485	490
Thr Tyr Ile Ala Val Lys Asp Ile Leu Ala Ile Cys		
500	505	



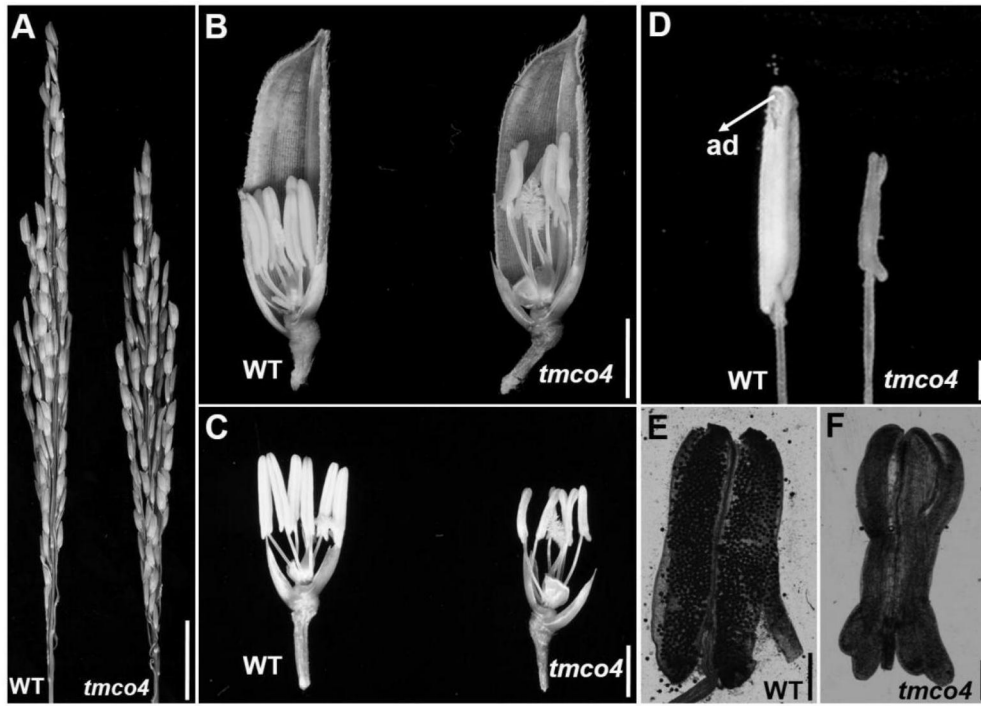


图1

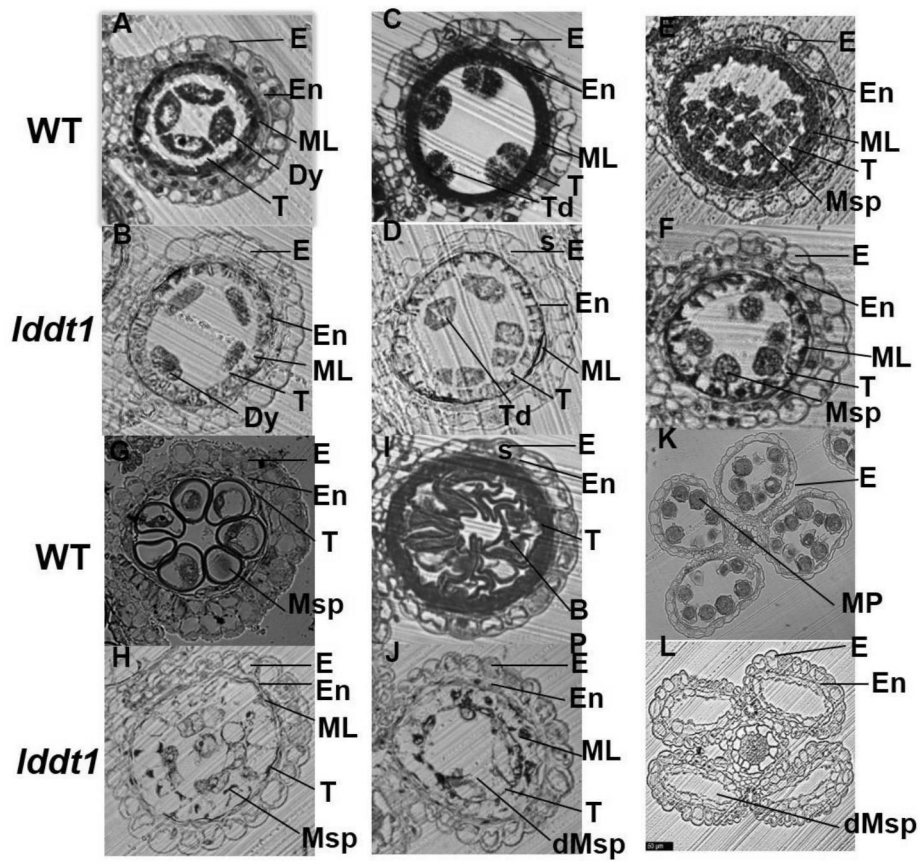


图2

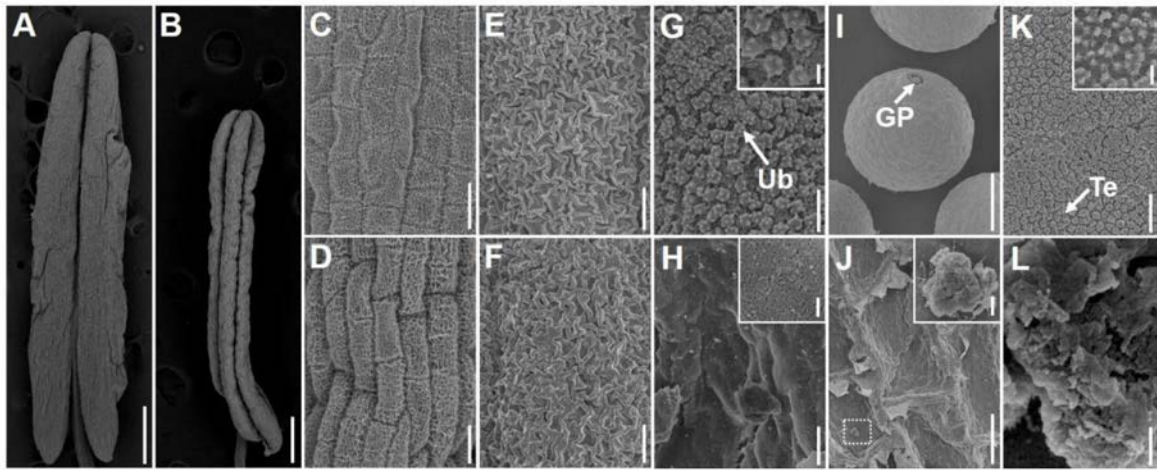


图3

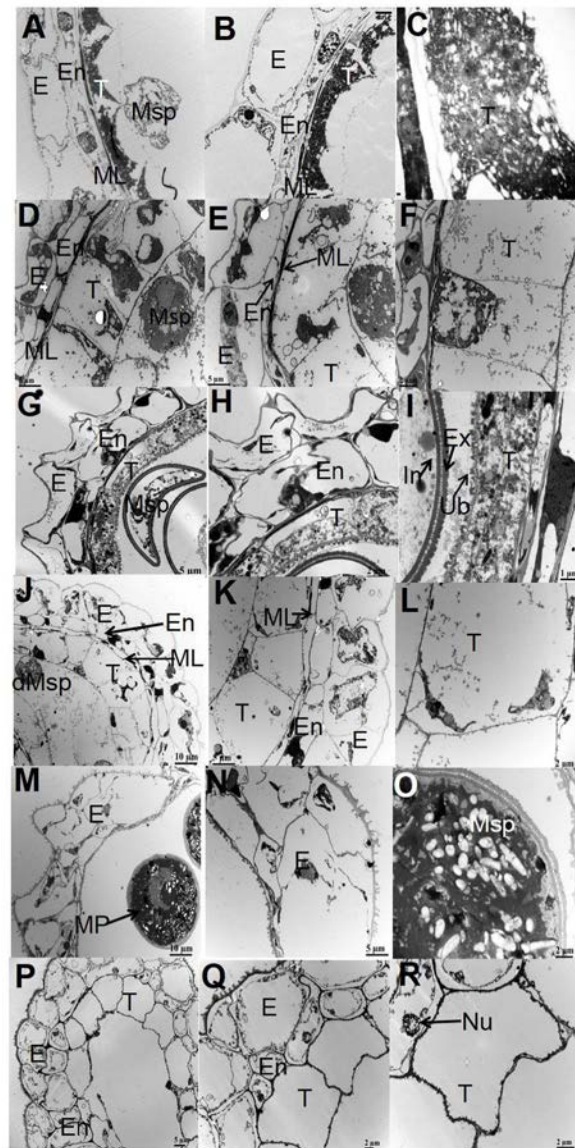


图4

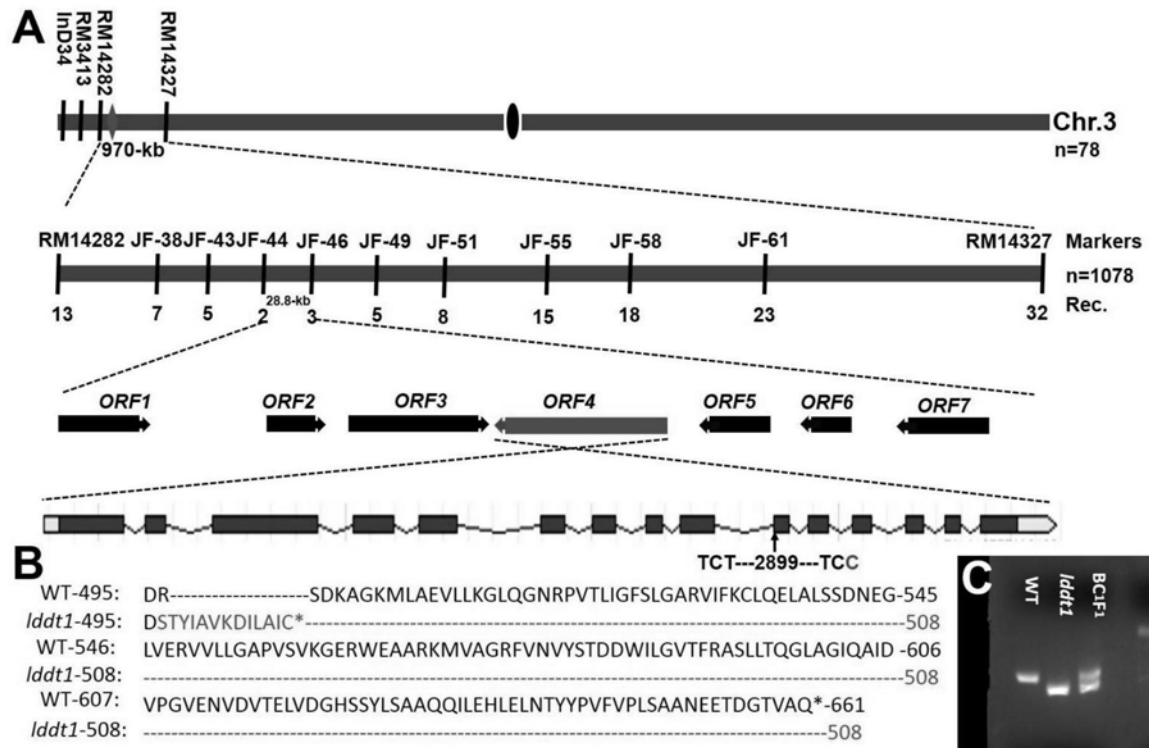


图5

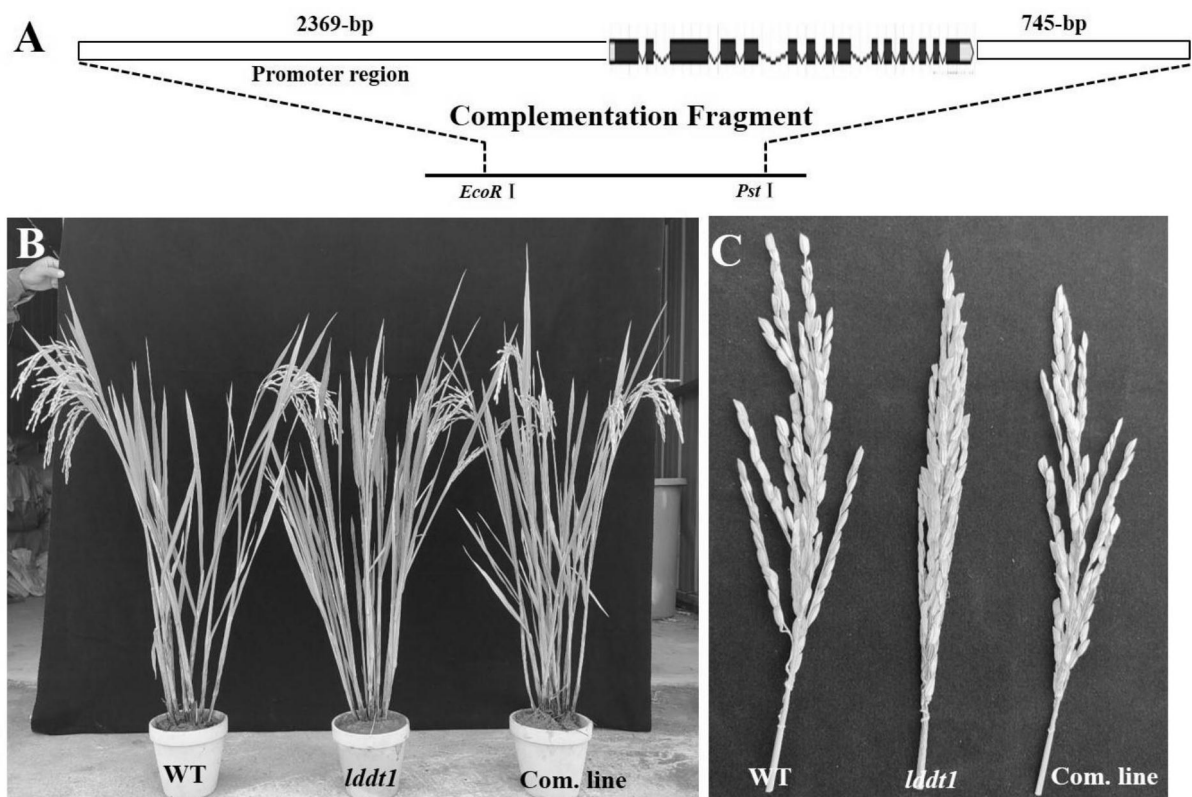


图6

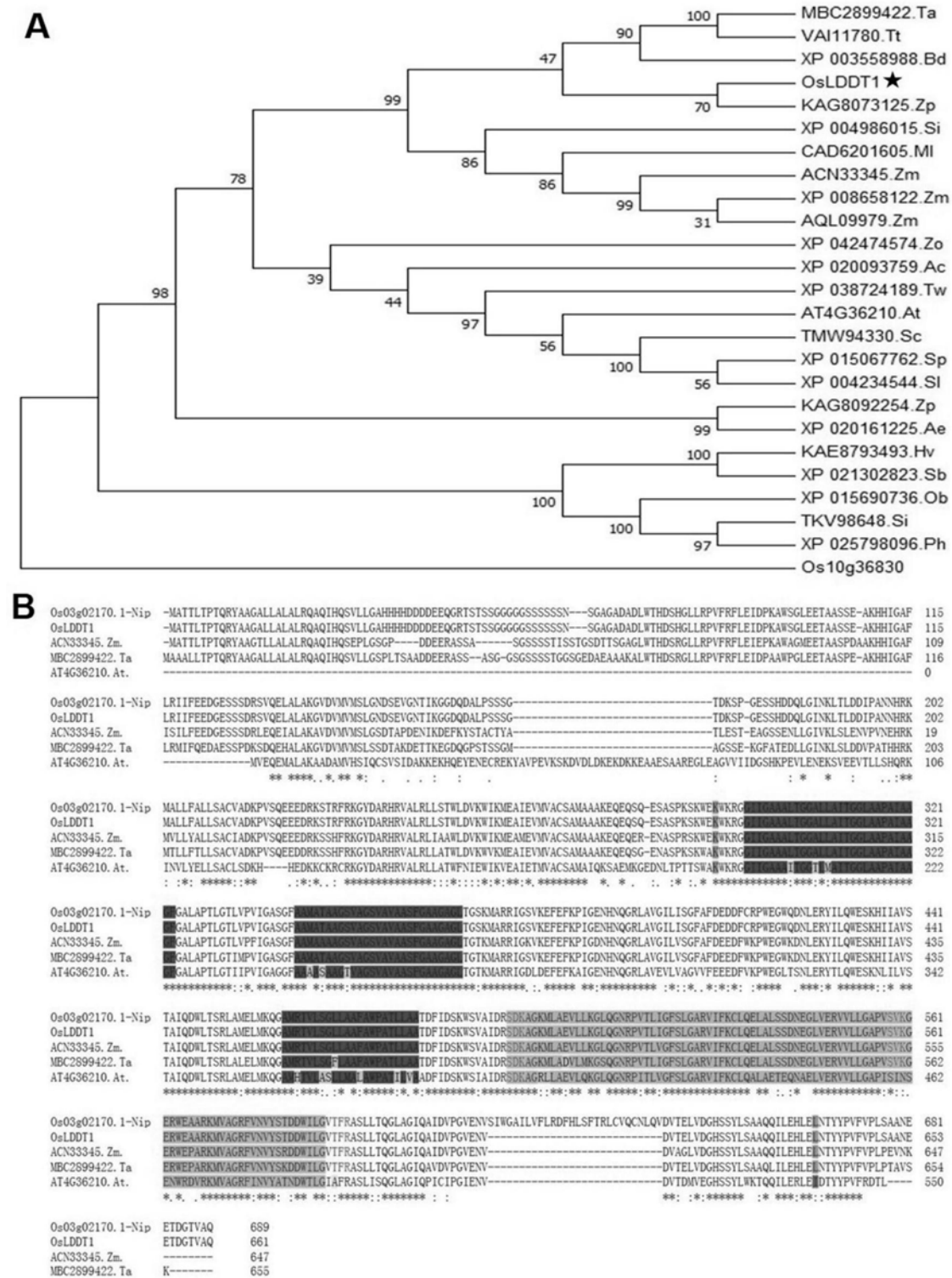


图7