



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104394686 B

(45)授权公告日 2018.02.06

(21)申请号 201380031819.8

C·耶基斯 A·E·罗宾逊

(22)申请日 2013.04.17

(74)专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 11484

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104394686 A

代理人 刘彬

(43)申请公布日 2015.03.04

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/625,222 2012.04.17 US

C12N 15/29(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.16

C12N 15/82(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/036980 2013.04.17

(56)对比文件

US 5510471 A, 1996.04.23,

CN 1541270 A, 2004.10.27,

CN 1541270 A, 2004.10.27,

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/158766 EN 2013.10.24

审查员 王航

(73)专利权人 陶氏益农公司

地址 美国印第安纳州

权利要求书2页 说明书83页

序列表26页 附图41页

(72)发明人 J·M·里拉 R·M·西奇洛

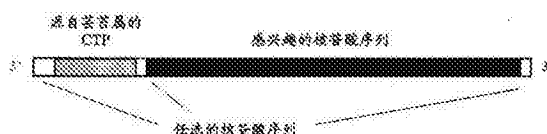
(54)发明名称

人造的芸苔属衍生的叶绿体转运肽

(57)摘要

本公开涉及用于将肽、多肽和蛋白质导向到含质体细胞的质体上的组合物和方法。在一些实施方案中,本公开涉及可以将多肽导向到质体上的叶绿体转运肽(chloroplast transit peptide),及编码它的核酸分子。在一些实施方案中,本公开涉及用于产生含有叶绿体转运肽的转基因植物材料(例如转基因植物)的方法,以及通过这种方法产生的植物材料,和从其产生的植物商业产品。

包含源自芸苔属的叶绿体转运肽编码序列的mRNA分子



1. 一种分离的核酸分子,其包含编码嵌合蛋白的多核苷酸,所述嵌合蛋白包含叶绿体转运肽(CTP)和感兴趣的多肽,所述多核苷酸包含:

编码CTP的核苷酸序列,其中CTP选自SEQ ID NO: 3和SEQ ID NO: 4,该编码CTP的核苷酸序列可操作地连接于编码所述感兴趣的多肽的核苷酸序列。

2. 权利要求1的分离的核酸分子,其中该CTP为SEQ ID NO: 3。

3. 权利要求1的分离的核酸分子,其中该CTP为SEQ ID NO: 4。

4. 权利要求1的分离的核酸分子,其中该感兴趣的多肽不是SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 2。

5. 权利要求1的分离的核酸分子,其中所述编码CTP的核苷酸序列能够与由SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 9的核苷酸序列组成的探针特异性杂交。

6. 权利要求1的分离的核酸分子,其中所述多核苷酸还包含至少一个额外的编码CTP的核苷酸序列,其中所述额外的核苷酸序列与编码所述感兴趣的多肽的核苷酸序列可操作地连接。

7. 权利要求6的分离的核酸分子,其中所述额外的CTP来自选自下组的生物:原核生物、低等光合真核生物、和绿藻。

8. 权利要求1的分离的核酸分子,其中所述多核苷酸与一个或多个调节序列可操作地连接。

9. 权利要求8的分离的核酸分子,其中所述一个或多个调节序列包括在植物细胞中有功能的启动子。

10. 权利要求1的分离的核酸分子,其中所述嵌合蛋白由所述CTP、所述感兴趣的多肽、以及连接氨基酸序列组成,其中该CTP和该感兴趣的多肽由该连接氨基酸序列所分隔,且其中所述连接氨基酸序列不具有叶绿体转运活性。

11. 由权利要求1的核酸分子编码的嵌合蛋白。

12. 权利要求11的嵌合蛋白,其中所述感兴趣的多肽被导向到含质体细胞中的质体。

13. 权利要求12的嵌合蛋白,其中当所述感兴趣的多肽被导向到质体时,所述CTP从该感兴趣的多肽被除去。

14. 权利要求11的嵌合蛋白,其中该感兴趣的多肽是生物活性多肽。

15. 权利要求11的嵌合蛋白,其中该感兴趣的多肽是荧光多肽。

16. 权利要求14的嵌合蛋白,其中该生物活性多肽是酶。

17. 权利要求14的嵌合蛋白,其中该生物活性多肽正常表达于天然表达所述多肽的细胞的质体中。

18. 权利要求14的嵌合蛋白,其中该生物活性多肽参与选自下组的植物过程:除草剂抗性,病毒抗性,细菌病原体抗性,昆虫抗性,线虫抗性,真菌抗性,植物活力,植物产量,温度耐受性,土壤条件耐受性,低光照水平耐受性,低水位耐受性,高水位耐受性,化学环境耐受性,种子颜色,淀粉改性,氨基酸合成,光合作用,脂肪酸合成,油合成,类胡萝卜素合成,蒽类合成,和淀粉合成。

19. 权利要求14的嵌合蛋白,其中该生物活性多肽选自下组:玉米黄质环氧酶,胆碱单加氧酶,亚铁螯合酶, ω -3脂肪酸去饱和酶,谷氨酰胺合成酶,维生素原A,激素,和Bt毒素蛋白。

20. 权利要求18的嵌合蛋白,其中所述生物活性多肽参与植物除草剂抗性。
21. 权利要求20的嵌合蛋白,其中所述多肽选自下组:乙酰乳酸合酶(ALS),突变的ALS,ALS的前体,和3-烯醇式丙酮酰莽草酸-5-磷酸合酶(EPSPS)。
22. 权利要求9的核酸分子,其中该分子是植物表达载体。
23. 包含权利要求9的核酸分子的植物细胞,其中所述植物细胞不能再生而产生植物。
24. 一种用于产生转基因植物材料的方法,该方法包括:
用权利要求9的核酸分子转化植物材料。
25. 根据权利要求24的方法,其中所述植物材料选自下组:植物细胞、植物组织培养物、植物部分、和全植物。
26. 根据权利要求25的方法,其中所述植物材料是植物组织或愈伤组织培养物。
27. 根据权利要求24的方法,其中该植物材料不是全植物。
28. 包含权利要求1的核酸分子的商业产品,其中所述商业产品选自下组:粕、油、压碎的或无活力的颗粒或种子,其中该商业产品是从包含所述核酸分子的重组植物或种子制备的。

人造的芸苔属衍生的叶绿体转运肽

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求获得2012年4月17日提交的美国临时专利申请系列号No.61/625,222的利益。

[0003] 根据37C.F.R. §1.821 (c) 或 (e) -作为ASCII文本文件提交的序列表的声明

[0004] 根据37C.F.R. §1.821 (c) 或 (e) ,含有ASCII文本格式的序列表的文件已经和本专利申请一起提交。

技术领域

[0005] 本公开涉及用于遗传编码和表达被导向到含质体细胞的质体上的多肽的组合物和方法。在某些实施方案中,本公开涉及将多肽导向到(例如高等植物的)叶绿体上的氨基酸序列,和/或编码所述氨基酸序列的核酸分子。在某些实施方案中,本公开涉及嵌合多肽,其含有控制该嵌合多肽到质体的转运的氨基酸序列,和/或编码该嵌合多肽的核酸分子。

[0006] 背景

[0007] 植物细胞含有多种不同的亚细胞细胞器,它们被统称为“质体”,由特征性的膜系统限定边界并在细胞内执行专化的功能。某些质体负责光合作用,以及特定化合物的合成和储存。所有质体均来源于存在于植物的分生组织区内的原质体(proplastids)。原质体可能发育成,例如:叶绿体,黄化体(etioplasts),有色体,老质体(gerontoplasts),白色体(leucoplasts),淀粉体,油质体(elaioplasts)和蛋白质体(proteinoplasts)。质体以一种半自主的方式存在于细胞内,它们含有其自身的遗传体系和蛋白质合成机构,但其发育和生物合成活性依赖与细胞核-细胞质系统的密切合作。

[0008] 在高等植物的光合作用叶细胞中,最让人关注的质体是叶绿体。叶绿体最基本的功能是实施光驱动的光合作用反应。但是,叶绿体还实施许多其它对于植物细胞重要的生物合成过程。例如,细胞的所有脂肪酸均是由位于叶绿体基质内的酶使用在叶绿体基质内容易获得的ATP、NADPH和碳水化合物制造的。而且,在叶绿体中,光活化电子的还原力驱动亚硝酸盐(NO_2^-)还原成氨(NH_3);这种氨为植物提供了合成氨基酸和核苷酸所需的氮。

[0009] 叶绿体还参与农用化学品工业中的特别重要的过程。例如,已知许多除草剂通过阻断在叶绿体内运作的功能来发挥作用。新近的研究已经鉴定了多种除草剂的特定靶标。例如,三嗪衍生的除草剂通过将质体醌分子从其在光系统II的32kD多肽中的结合位点上取代下来而抑制光合作用。这个32kD多肽由叶绿体基因组编码,并由细胞器机构合成。已经获得了对三嗪类除草剂有抗性的突变体植物。这些植物含有突变的32kD多肽,其上面的质体醌不再能够被三嗪类除草剂取代。磺酰脲类抑制叶绿体中的乙酰乳酸合酶。乙酰乳酸合酶参与异亮氨酸和缬氨酸的合成。草甘膦抑制5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS),其是一种参与芳香族氨基酸人造的酶。所有这些酶都是由细胞核基因组编码的,但它们被转运到叶绿体内,实际的氨基酸合成在叶绿体内进行。

[0010] 大多数叶绿体蛋白质在植物细胞的细胞核内编码,在胞浆中合成为更大的前体蛋白,并在翻译后被转运到叶绿体中。跨越外层和内层包膜而转运进入基质是以基质、类囊体

膜和类囊体腔为目的地的蛋白质的主要进入机制。被转入的前体蛋白向类囊体膜和类囊体腔的定位通过四种不同的机制完成,其中两种与细菌蛋白质转运系统同源。因此,将蛋白定位在叶绿体内的机制在一定程度上是来源于原核共生菌。Cline and Henry (1996), *Annu.Rev.Cell.Dev.Biol.*12:1-26。

[0011] 运往叶绿体表达的前体蛋白含有称作叶绿体转运肽(CTP)的N端延伸(extension)。转运肽在叶绿体表面的特异性识别中起作用,并参与介导在翻译后将前体蛋白转运通过叶绿体包膜,并从叶绿体包膜转运到叶绿体的各个亚室(sub-compartment)(如基质、类囊体和类囊体膜)。这些N端转运肽序列包含将叶绿体蛋白转运到质体内所需的全部信息;转运肽序列对于质体引入是必要而充分的。

[0012] 据报道在其N端具有天然编码的转运肽序列的植物基因包括:核酮糖1,5二磷酸羧化酶(RuBisCo)的叶绿体小亚基(de Castro Silva-Filho et al. (1996), *Plant Mol.Biol.*30:769-80; Schnell et al. (1991), *J.Biol.Chem.*266:3335-42); EPSPS(见,例如,Archer et al. (1990), *J.Bioenerg.and Biomemb.*22:789-810和美国专利6,867,293, 7,045,684,和Re.36,449);色氨酸合酶(Zhao et al. (1995), *J.Biol.Chem.*270:6081-7);质体蓝素(Lawrence et al. (1997), *J.Biol.Chem.*272:20357-63);分支酸合酶(Schmidt et al. (1993), *J.Biol.Chem.*268:27447-57);捕光叶绿素a/b结合蛋白(LHBP)(Lamppa et al. (1988), *J.Biol.Chem.*263:14996-14999),和拟南芥的叶绿体蛋白(Lee et al. (2008), *Plant Cell*120:1603-22)。美国专利公开No.US 2010/0071090提供了一些来自衣藻的叶绿体导向性肽。

[0013] 然而,由于叶绿体导向肽的序列有高度多样性且缺少共同或共有序列基序,虽然有可能存在具有独立结构基序的叶绿体导向肽的独特亚群,但是叶绿体导向肽所编码信息的结构要求仍然难以把握。Lee等人.(2008),同上。此外,并非所有这些序列均可用于在高等植物中异源表达叶绿体导向的蛋白质。

[0014] 公开

[0015] 本文描述了用于植物中多肽的质体导向的组合物和方法。在一些实施方案中,组合物包含核酸分子,核酸分子包含至少一个编码与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的人造芸苔属来源叶绿体转运肽(例如TraP8肽和TraP9肽)。在特定的实施方案中,这些核酸分子可用于单子叶或双子叶植物中由感兴趣的核苷酸序列编码的多肽的表达和导向。进一步描述了包含核酸分子的载体,所述核酸分子含有至少一个编码与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的人造芸苔属来源叶绿体转运肽的核苷酸序列。

[0016] 在一些实施方案中,编码人造芸苔属来源CTP的核苷酸序列可以是这样的核苷酸序列,该序列衍生自从芸苔属物种基因(欧洲油菜(*B.napus*)、芜菁(*B.rapa*)、芥菜(*B.Junceae*)和埃塞俄比亚芥(*B.carinata*))获得的参考核苷酸序列,或其功能性变体。在一些实施方案中,编码人造芸苔属来源CTP的核苷酸序列可以是嵌合核苷酸序列,其包含来自芸苔属物种基因的部分CTP编码核苷酸序列,或其功能性变体。在特定的实施方案中,编码人造芸苔属来源CTP的核苷酸序列可含有多个连续的核苷酸序列,这些核苷酸序列分别获自:参考芸苔属物种CTP,和来自该芸苔属物种的不同基因、不同芸苔属物种、或不同生物体(例如植物、原核生物和低等光合真核生物)的CTP,或任何前述者的功能性变体。在特定的实施方案中,某个连续的核苷酸序列可以从参考芸苔属CTP的直系同源核苷酸序列获得,所

述直系同源核苷酸序列从所述参考芸苔属植物基因在不同生物体中的直系同源物(例如不同的芸苔属植物基因组)获得。在这些和进一步的实施方案中,编码人工芸苔属来源的CTP的核苷酸序列可以是嵌合核苷酸序列,其包含多于一种编码CTP的核苷酸序列。

[0017] 在一些实例中,编码人造芸苔属来源CTP的核苷酸序列可以是嵌合核苷酸序列,其包含来自欧洲油菜(*B.napus*)或芜菁(*B.rapa*)的部分CTP核苷酸序列,或其功能性变体。在具体的实例中,编码人造芸苔属来源CTP的核苷酸序列可含有多个连续的从欧洲油菜或芜菁获得的核苷酸序列,或其功能性变体。。

[0018] 在一些实施方案中,组合物包括一种核酸分子,其包含至少一个芸苔属来源的用于将多肽导向到叶绿体上的手段(means)。进一步描述了多个核酸分子,其包含如下的核酸分子,该核酸分子包含至少一个与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的、用于将多肽导向到叶绿体的芸苔属来源的手段。在特定的实施方案中,这种核酸分子可用于在单子叶植物或双子叶植物中表达和导向由感兴趣的核苷酸序列编码的多肽。为本公开的目的,用于将多肽导向到叶绿体上的芸苔属来源的手段是指特定的人造核苷酸序列。在特定的实施方案中,用于将多肽导向到叶绿体上的芸苔属来源的手段选自下组:编码在本文中被称作TraP8和TraP9的多肽的核苷酸序列。

[0019] 本文还描述了植物材料(例如但不限于:植物、植物组织和植物细胞),其包含核酸分子,该核酸分子包含至少一个与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的、编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列。在一些实施方案中,植物材料可以具有这种稳定整合到其基因组中的核酸分子。在一些实施方案中,植物材料可以瞬时表达如下所述的核酸分子的产物,该核酸分子含有至少一个与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的、编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列。在某些实施方案中,所述植物材料是不能再生为植物的植物细胞。

[0020] 还描述了用于在含质体细胞(例如植物)中的质体(例如叶绿体)内表达核苷酸序列的方法。在特定的实施方案中,可以使用含有至少一个与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的、编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列的核酸分子转化植物细胞,从而在植物细胞的细胞质中产生包含与感兴趣的核苷酸序列的表达产物融合的人造的芸苔属来源的CTP的前体融合多肽,然后该融合多肽被体内转运到该植物细胞的叶绿体中。在某些实施方案中,所述植物材料是不能再生为植物的植物细胞。

[0021] 进一步描述了用于产生包含核酸分子的转基因植物的方法,其中该核酸分子包含至少一个与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的、编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列。还描述了从这种转基因植物产生的植物商业产品(例如种子)。在一些实施方案中,这些转基因植物或植物商业产品含有不能再生为植物的转基因细胞。

[0022] 通过下文参考附图对多个实施方案的详细说明,前述和别的特征将不言自明。

[0023] 附图简述

[0024] 图1示出的mRNA分子代表了与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的、编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列(例如TraP8和TraP9)。在一些实施方案中,mRNA分子(如所示的这些)可以从DNA分子转录而来,DNA分子其含有开放阅读框,开放阅读框包含与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的、编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列。在一些实施方案中,感兴趣的核苷酸序列可以是编码感兴趣的肽的序列,例如但不限于,要被导向到质体上的标记基因产物或肽。

- [0025] 图2示出的是pDAB101977的质粒图谱。
- [0026] 图3示出的是pDAB101908的质粒图谱。
- [0027] 图4包括的显微镜图片显示了浸润到烟草叶组织中的TraP8-YFP被转位到烟草叶组织的叶绿体内。
- [0028] 图5包括的显微镜图片显示了浸润到烟草叶组织中的TraP9-YFP被转位到烟草叶组织的叶绿体内。
- [0029] 图6包含显微镜图片,其显示了浸润到烟草叶组织中的非导向YFP对照没有掺入到烟草叶组织的叶绿体内。
- [0030] 图7示出的是pDAB106597的质粒图谱。
- [0031] 图8包含转化到玉米原生质体中的TraP8-YFP构建体显微镜图片,显示到玉米原生质体的叶绿体内的转位。
- [0032] 图9显示的是pDAB105526的质粒图谱。
- [0033] 图10示出的是pDAB105527的质粒图谱。
- [0034] 图11示出的是pDAB109807的质粒图谱。
- [0035] 图12示出的是pDAB107687的质粒图谱。
- [0036] 图13示出的是pDAB111481的质粒图谱。
- [0037] 图14示出的是pDAB111479的质粒图谱。
- [0038] 图15示出的是pDAB111338的质粒图谱。
- [0039] 图16示出的是pDAB112710的质粒图谱。
- [0040] 图17包括对来自欧洲油菜 (*Brassica napus*) (SEQ ID NO:1) 和芜菁 (*Brassica Rapa*) (SEQ ID NO:2) 的EPSPS蛋白的预测叶绿体转运肽的比对。星号表示两序列被断开并重组形成Trap8和Trap9之处。
- [0041] 图18示出的是pDAB107527的质粒图谱。
- [0042] 图19示出的是pDAB105530的质粒图谱。
- [0043] 图20示出的是pDAB105531的质粒图谱。
- [0044] 图21示出的是pDAB105532的质粒图谱。
- [0045] 图22示出的是的pDAB105533的质粒图谱。
- [0046] 图23显示pDAB105534的质粒图谱。
- [0047] 图24显示pDAB107532的质粒图谱。
- [0048] 图25示出的是pDAB107534的质粒图谱。
- [0049] 图26示出的是pDAB107533的质粒图谱。
- [0050] 图27示出的是pDAB4104的质粒图谱。
- [0051] 图28示出的是pDAB102715的质粒图谱。
- [0052] 图29示出的是pDAB102716的质粒图谱。
- [0053] 图30示出的是pDAB102717的质粒图谱。
- [0054] 图31示出的是pDAB102785的质粒图谱。
- [0055] 图32示出的是pDAB102719的质粒图谱。
- [0056] 图33示出的是pDAB102718的质粒图谱。
- [0057] 图34示出的是pDAB107663的质粒图谱。

- [0058] 图35示出的是pDAB107664的质粒图谱。
- [0059] 图36示出的是pDAB107665的质粒图谱。
- [0060] 图37示出的是pDAB107666的质粒图谱。
- [0061] 图38示出的是pDAB109812的质粒图谱。
- [0062] 图39示出的是pDAB101556的质粒图谱。
- [0063] 图40示出的是pDAB107698的质粒图谱。
- [0064] 图41示出的是pDAB108384的质粒图谱。
- [0065] 图42示出的是pDAB108385的质粒图谱。
- [0066] 图43示出的是pDAB108386的质粒图谱。
- [0067] 图44示出的是pDAB108387的质粒图谱。
- [0068] 序列表
- [0069] 随附序列表中列出的核酸序列系使用如37C.F.R. §1.822中定义的核苷酸碱基标准字母缩写显示。仅显示了每个核酸序列的一条链,但应理解对任何所示出的链的提述都包含了其互补链。在随附的序列表中:
- [0070] SEQ ID NO:1显示欧洲油菜EPSPS叶绿体转运肽的氨基酸。
- [0071] SEQ ID NO:2显示茼蒿EPSPS叶绿体转运肽的氨基酸。
- [0072] SEQ ID NO:3显示TraP8嵌合叶绿体转运肽的氨基酸。
- [0073] SEQ ID NO:4显示TraP9嵌合叶绿体转运肽的氨基酸。
- [0074] SEQ ID NO:5显示编码TraP8嵌合叶绿体转运肽的多核苷酸序列。
- [0075] SEQ ID NO:6显示编码TraP9嵌合叶绿体转运肽的多核苷酸序列。
- [0076] SEQ ID NO:7显示编码接头序列的多核苷酸序列。
- [0077] SEQ ID NO:8显示编码TraP8v2嵌合叶绿体转运肽的多核苷酸序列。
- [0078] SEQ ID NO:9显示编码TraP9v2嵌合叶绿体转运肽的多核苷酸序列。
- [0079] SEQ ID NO:10显示编码cry2aa基因的多核苷酸序列。
- [0080] SEQ ID NO:11显示编码vip3ab1v6基因的多核苷酸序列。
- [0081] SEQ ID NO:12显示编码vip3ab1v7基因的多核苷酸序列。
- [0082] SEQ ID NO:13显示具有氨基酸序列Ser-Val-Ser-Leu的肽。
- [0083] SEQ ID NO:14显示编码SEQ ID NO:1的欧洲油菜EPSPS叶绿体转运肽的多核苷酸序列。
- [0084] SEQ ID NO:15显示编码SEQ ID NO:2的茼蒿EPSPS叶绿体转运肽的多核苷酸序列。
- [0085] SEQ ID NO:16显示编码dgt-28v5的多核苷酸序列。
- [0086] SEQ ID NO:17显示编码dgt-28v6的多核苷酸序列。
- [0087] SEQ ID NO:18显示密码子优化的dgt-1的多核苷酸序列。
- [0088] SEQ ID NO:19显示密码子优化的dgt-3v2 (G173A) 的多核苷酸序列。
- [0089] SEQ ID NO:20显示密码子优化的dgt-3v3 (G173A;P178S) 的多核苷酸序列。
- [0090] SEQ ID NO:21显示密码子优化的dgt-3v4 (T174I;P178S) 的多核苷酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:22显示密码子优化的dgt-7v4 (T168I;P172S) 的多核苷酸序列。
- [0092] SEQ ID NO:23显示密码子优化的dgt-32v3的多核苷酸序列。
- [0093] SEQ ID NO:24显示密码子优化的dgt-33v3的多核苷酸序列。

- [0094] SEQ ID NO:25显示密码子优化的dgt-31v3的多核苷酸序列。
- [0095] SEQ ID NO:26显示编码转运肽TraP4v2的多核苷酸序列。
- [0096] SEQ ID NO:27显示编码转运肽TraP5v2的多核苷酸序列。
- [0097] SEQ ID NO:28显示编码转运肽TraP8v2的多核苷酸序列。
- [0098] SEQ ID NO:29显示编码转运肽TraP9v2的多核苷酸序列。
- [0099] SEQ ID NO:30显示编码转运肽TraP12v2的多核苷酸序列。
- [0100] SEQ ID NO:31显示编码转运肽TraP13v2的多核苷酸序列。
- [0101] SEQ ID NO:32显示TraP4v2:dgt-28v5的多核苷酸序列。
- [0102] SEQ ID NO:33显示TraP5v2:dgt-28v5的多核苷酸序列。
- [0103] SEQ ID NO:34显示TraP8v2:dgt-28v5的多核苷酸序列。
- [0104] SEQ ID NO:35显示TraP9v2:dgt-28v5的多核苷酸序列。
- [0105] SEQ ID NO:36显示TraP12v2:dgt-28v5的多核苷酸序列。
- [0106] SEQ ID NO:37显示TraP13v2:dgt-28v5的多核苷酸序列。
- [0107] SEQ ID NO:38显示编码转运肽TraP14v2的多核苷酸序列。
- [0108] SEQ ID NO:39显示编码转运肽TraP23v2的多核苷酸序列。
- [0109] SEQ ID NO:40显示编码转运肽TraP24v2的多核苷酸序列。
- [0110] SEQ ID NO:41显示编码与dgt-32v3融合的TraP14v2转运肽的多核苷酸序列。
- [0111] SEQ ID NO:42显示编码与dgt-33v3融合的TraP24v2转运肽的多核苷酸序列。
- [0112] SEQ ID NO:43显示编码与dgt-31v3融合的TraP23v2转运肽的多核苷酸序列。
- [0113] SEQ ID NO:44显示DSM2A引物的寡核苷酸序列。
- [0114] SEQ ID NO:45显示DSM2S引物的寡核苷酸序列。
- [0115] SEQ ID NO:46显示DSM2Cy5探针的寡核苷酸序列。
- [0116] SEQ ID NO:47显示DGT28F引物的寡核苷酸序列。
- [0117] SEQ ID NO:48显示DGT28R引物的寡核苷酸序列。
- [0118] SEQ ID NO:49显示TAFY-HEX探针的寡核苷酸序列。
- [0119] SEQ ID NO:50显示TAFI15-F引物的寡核苷酸序列。
- [0120] SEQ ID NO:51显示TAFI15-R引物的寡核苷酸序列。
- [0121] SEQ ID NO:52显示用于dgt-28基因表达盒验证的正向寡聚物的寡核苷酸序列。
- [0122] SEQ ID NO:53显示用于dgt-28基因表达盒验证的反向寡聚物的寡核苷酸序列。
- [0123] SEQ ID NO:54显示AT26410LP引物的寡核苷酸序列。
- [0124] SEQ ID NO:55显示AT26410RP引物的寡核苷酸序列。
- [0125] SEQ ID NO:56显示DGT28F引物的寡核苷酸序列。
- [0126] SEQ ID NO:57显示DGT28R引物的寡核苷酸序列。
- [0127] SEQ ID NO:58显示GAAD1F引物的寡核苷酸序列。
- [0128] SEQ ID NO:59显示GAAD1P探针的寡核苷酸序列。
- [0129] SEQ ID NO:60显示GAAD1R引物的寡核苷酸序列。
- [0130] SEQ ID NO:61显示IV-探针的寡核苷酸序列。
- [0131] SEQ ID NO:62显示IVF-Taq引物的寡核苷酸序列。
- [0132] SEQ ID NO:63显示IVR-Taq引物的寡核苷酸序列。

[0133] SEQ ID NO:64显示zmDGT28F引物的寡核苷酸序列。

[0134] SEQ ID NO:65显示zmDGT28FAM探针的寡核苷酸序列。

[0135] SEQ ID NO:66显示zmDGT28R引物的寡核苷酸序列。

[0136] 详述

[0137] 1. 多个实施方案概览

[0138] 叶绿体转运肽(CTP) (或质体转运肽) 以共翻译(co-translationally)或翻译后方式发挥功能,将包含CTP的多肽引导到质体(例如叶绿体)上。在本发明的一些实施方案中,内源性叶绿体蛋白质或是异源蛋白质均可通过将该蛋白表达为含有CTP的较大前体多肽而被导向到叶绿体中。在特定的实施方案中,CTP可以衍生自从芸苔属物种基因获得的核苷酸序列,通过例如,但不限于,纳入至少一个来自从不同生物体获得的直系同源基因的连续序列,或其功能性变体衍生而来。

[0139] 在一个示例实施方案中,从获自欧洲油菜的EPSPS基因序列(NCBI数据库登录号P17688)和芜菁(NCBI数据库登录号AAS80163)中分离多个核酸序列,每一个核酸序列均编码CTP。CTP编码核酸序列是通过用ChloroP预测服务器分析EPSPS基因序列分离的。Emanuelsson et al. (1999), Protein Science 8:978-84 (可以在cbs.dtu.dk/services/ChloroP访问)。分离的CTP编码序列的预测蛋白产物是大约60-70个氨基酸长的转运肽。在该实例中,使用天然欧洲油菜CTP作为参考序列来设计示例性的人造的芸苔属来源的CTP,方法是在欧洲油菜CTP中的特定位置处融合来自其他CTP的连续序列。该设计过程例示了根据某些方面从芸苔属物种物种的核酸序列开发新型人工CTP的过程。这些示例性的人造的芸苔属来源的CTP在本公开全文中被称作TraP8和TraP9。测试这些示例的人造TraP的质体导向功能,发现它们显示的质体导向至少不逊于对单独的天然芸苔属序列观察到的质体导向。

[0140] 在进一步的示例实施方案中,独立地合成多个核酸序列,每一个均编码本发明的人造TraP肽,并将它们与编码黄色荧光蛋白(YFP)的核酸序列可操作地连接,从而产生多个人造的核酸分子,每一个均编码嵌合TraP:YFP融合多肽。将这些核酸分子,它们每一个均编码嵌合TraP:YFP多肽,分别导入到双元载体中,使得每一个TraP:YFP编码核酸序列与AtUbi 10启动子可操作地连接。

[0141] 在更进一步的示例实施方案中,将多个包含与AtUbi 10启动子可操作地连接的TraP:YFP编码核酸序列的双元载体通过土壤杆菌介导的转化分别独立地瞬时转化到烟草(本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*))中。共聚焦显微术和Western印迹分析证实,每一个TraP均成功地将YFP导向到了烟草叶绿体上。

[0142] 在进一步的示例实施方案中,独立地合成了多个核酸序列,每一个均编码本发明的人造TraP肽,并将它们与编码农艺学上重要的基因序列的核酸序列可操作地连接。将TraP序列与除草剂耐受性性状(例如dgt-28和dgt-14)融合,从而产生多个人造的核酸分子,每一个均编码嵌合的TraP:DGT-28或TraP:DGT-14融合多肽。将这些核酸分子,它们中每一个均编码嵌合的TraP:DGT-28或TraP:DGT-14多肽,分别引入双元载体中,从而使每一个TraP:dgt-28或TraP:dgt-14编码核酸序列均与启动子或其它基因调节元件可操作地连接。用这些含有TraP:dgt-28或TraP:dgt-14编码核酸序列的双元载体转化各种植物物种。对转基因植物测定由于DGT-28或DGT-14酶的表达和转位到叶绿体导致的除草剂耐受性。

[0143] 在进一步的示例实施方案中,独立地合成多个核酸序列,每一个均编码本发明的人造TraP肽,并与编码农艺学上重要的基因序列的核酸序列可操作地连接。将TraP序列与赋予昆虫耐受性性状的基因(例如cry2Aa和vip3ab1)融合,从而产生多个人造的核酸分子,其每一个均编码嵌合的TraP:Cry2Aa或TraP:Vip3Ab1融合多肽。将这些核酸分子,其中每一个均编码嵌合的TraP:cry2Aa或TraP:vip3ab1多肽,分别引入双元载体中,使得每一个TraP:cry2Aa或TraP:vip3ab1编码核酸序列均与启动子或其它基因调节元件可操作地连接。用含有TraP:cry2Aa或TraP:vip3ab1编码核酸序列的双元载体转化各种植物物种。对转基因植物测定由于Cry2Aa或Vip3Ab1酶的表达和转位到叶绿体导致的除草剂耐受性。

[0144] 鉴于前述的详细工作实施例,本发明的人造的芸苔属来源的CTP序列和编码它们的核酸,可用于在广大范围的含质体细胞内将任何多肽引导到质体上。例如,通过通过本公开提供给本领域技术人员的方法,可以将包含人造的芸苔属来源的CTP序列、且该序列与任意的第二个肽序列的N端融合的嵌合多肽引入到含质体的宿主细胞内(或在其中表达),以便将所述第二个肽序列导向到质体上。因此,在特定的实施方案中,本发明的TraP肽,与天然CTP相比,可以提供期望在质体上表达的肽的更高的引入和加工效率。

[0145] II. 缩写

[0146] CTP 叶绿体转运肽

[0147] Bt 苏云金芽孢杆菌

[0148] EPSPS 3-烯醇式丙酮酰莽草酸-5-磷酸合酶

[0149] YFP 黄色荧光蛋白

[0150] Ti 肿瘤诱导型(来源于根癌土壤杆菌的质粒)

[0151] T-DNA 转运DNA

[0152] III. 术语

[0153] 为了便于审阅本公开的各个实施方案,提供了特定术语的如下解释:

[0154] 叶绿体转运肽:如本文所使用的,术语“叶绿体转运肽”(CTP)(或“质体转运肽”)可以指如下的氨基酸序列,当其存在于多肽的N端时,会指导该多肽进入含质体细胞(例如植物细胞,例如在全植物或植物细胞培养物中)的质体内。CTP对于指导蛋白质转运进入宿主细胞的质体(例如,初级、二级或三级质体,例如叶绿体)而言一般是必要而且充分的。通过多种可用的算法中的任一种(例如PSORT,和ChloroP(可以在cbs.dtu.dk/services/ChloroP获得))可以鉴定推定的叶绿体转运肽。ChloroP可以提供特别好的CTP预测。Emanuelsson et al. (1999), Protein Science 8:978-84。然而,任何现有算法均不能以100%的效率实现功能性CTP的预测。因此,确认所鉴定出的假定CTP是否确实如预期的那样发挥功能(例如,在体外或体内方法中)是重要的。

[0155] 叶绿体转运肽可以位于被转运到质体内的多肽的N端。CTP可以帮助含有CTP的多肽的共翻译或翻译后的向质体中的转运。叶绿体转运肽通常含有大约40-大约100个氨基酸,这些CTP已经被观察到含有某些共同的特征。例如:CTP所含的带负电荷氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺)非常少(即使有的话);CTP的N端区缺少带电氨基酸、甘氨酸和脯氨酸;CTP的中心区还很可能含有非常高比例的碱性或羟基化氨基酸(例如丝氨酸和苏氨酸);并且CTP的C端很可能富含精氨酸,并具有构成两亲性 β 折叠片结构的能力。在包含CTP的多肽被转运到质体内之后,质体蛋白酶可以将CTP与包含CTP的多肽的其余部分

切离。

[0156] 接触:如本文关于核酸分子所使用的,术语与细胞、组织或生物体(例如植物细胞;植物组织;和植物)“接触”,或被细胞、组织或生物体“摄取”,包括核酸分子被内化到生物体中,例如但不限于:使生物体与包含该核酸分子的组合物接触;和用含有该核酸分子的溶液浸泡生物体。

[0157] 内源的:如本文所使用的,术语“内源的”是指源自于特定生物体、组织或细胞的物质(例如,核酸分子和多肽)。例如,植物细胞内表达的“内源”多肽可以指通常在来自相同物种的非遗传工程化植物的相同类型的细胞内表达的多肽。在一些实例中,可以利用来自芸苔属物种的内源基因(例如EPSPS基因)来获得参考芸苔属CTP基因。

[0158] 表达:如本文所使用的,编码序列(例如基因或转基因)的“表达”是指核酸转录单元(包括例如基因组DNA或cDNA)的编码信息转变成细胞的运作性(operational)、非运作性或结构性部分的过程,往往包括蛋白质的合成。基因表达可能受到外部信号(例如,细胞、组织或生物体暴露于可以增加或降低基因表达的作用剂)的影响。基因的表达还可以在从DNA到RNA到蛋白的通路中的任何地方被调节。基因表达的调节可以通过例如下述方式发生:对转录、翻译、RNA转运和加工、中间分子如mRNA的降解等的控制,或者通过在特定蛋白分子产生后使其活化、失活、区室化(compartmentalization)或降解,或者通过前述的任何组合。基因表达可以通过本领域已知的方法在RNA水平或蛋白水平进行测量,这些方法包括但不限于Northern印迹、RT-PCR、Western印迹,和体外、原位或体内蛋白活性测定。

[0159] 遗传材料:如本文所使用的,术语“遗传材料”包括全部基因,和核酸分子,例如DNA和RNA。

[0160] 异源的:如本文所使用的,术语“异源的”是指并非源自于特定生物体、组织或细胞的内部的物质(例如核酸分子和多肽)。例如,在植物细胞内表达的“异源”多肽可以指通常不在来自相同物种的非遗传工程化植物的相同类型细胞中表达的多肽(例如,在相同生物体的不同细胞中,或者在不同生物体的细胞中表达的多肽)。

[0161] 分离的:如本文所使用的,术语“分离的”是指如下的分子(例如,核酸分子或多肽),该分子已与天然存在该分子的生物体细胞内通常与该分子伴随的其它同类分子(例如其它核酸分子和其它多肽)实质上分离或提纯脱离。例如,分离的核酸分子可以与天然存在该核酸分子的生物体细胞内的染色体DNA或染色体外DNA实质性分离或提纯脱离。因此,该术语包括经过生化纯化从而除去其它的核酸分子、多肽和细胞组分的重组核酸分子和多肽。该术语还包括重组核酸分子、化学合成的核酸分子、和重组产生的多肽。

[0162] 如本文所使用的,术语“基本上纯化的”是指这样的分子,其与通常在天然状态下与之伴随的其它分子是分离的。基本上纯化的分子可以是组合物中存在的主导种类。基本上纯化的分子可以是,例如,除了天然混合物中存在的溶剂之外,其它分子有至少60%、至少75%、或至少90%不存在。术语“基本上纯化的”不是指以天然状态存在的分子。

[0163] 核酸分子:如本文所使用的,术语“核酸分子”可以指聚合物形式的核苷酸,其可以包括RNA、cDNA、基因组DNA、和合成形式的上述混合聚合物的有义和反义链。核苷酸可以指核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸,或两者任一类型核苷酸的修饰形式。如本文所使用的,“核酸分子”与“核酸”和“多核苷酸”同义。除非另有说明,核酸分子的长度通常为至少10个碱基。该术语包括单链和双链形式的DNA。核酸分子包括二聚体(所谓的串联)形式,和核酸分子的

转录产物。核酸分子可包括天然存在的和/或经过修饰的核苷酸,其中核苷酸通过天然存在的和/或非天然存在的核苷酸连接键连接在一起。

[0164] 核酸分子可以被化学或生物化学修饰,或者可以含有非天然的或衍生化的核苷酸碱基,如本领域技术人员所容易理解的。这些修饰包括,例如,标记物、甲基化、用类似物取代一个或多个天然存在的核苷酸、核苷酸间修饰(例如,不带电的连接键:例如,甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等;带电荷的连接键:例如,硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等;侧基部分:例如,肽;嵌入剂:例如,吡啶、补骨脂素等;螯合剂;烷化剂;和经过修饰的连接键:例如, α 异头核酸等)。术语“核酸分子”也包括任何拓扑构象,包括单链、双链、部分双链体化(duplexed)、三链体化(triplexed)、发夹(hairpinned)、环形、和挂锁构象。

[0165] 如本文关于DNA所使用的,术语“编码序列”、“结构核苷酸序列”或“结构核酸分子”是指这样的核苷酸序列,当其置于合适调节序列的控制之下时,可以通过转录和mRNA最终被翻译成多肽。关于RNA,术语“编码序列”是指被翻译成肽、多肽或蛋白质的核苷酸序列。编码序列的边界可以由5'端的翻译起始密码子和3'端的翻译终止密码子确定。编码序列包括,但不限于:基因组DNA;cDNA;EST;和重组核苷酸序列。

[0166] 在一些实施方案中,本发明包括可以用分离方法分离、纯化或部分纯化的核苷酸序列,分离方法例如离子交换色谱、基于分子量或亲和性的排除、基于在不同溶剂中的溶解性的分级技术、和遗传工程化方法如扩增、克隆和亚克隆。

[0167] 序列同一性:术语“序列同一性”或“同一性”,如本文在两个核酸或多肽序列的语境中所使用的,可以指当在特定比较窗口上对齐以实现最大对应性时,两个序列中相同的残基数。

[0168] 如本文所使用的,术语“百分比序列同一性”可以指通过比较两个在比较窗口上最佳对齐的序列(例如,核酸序列和氨基酸序列)确定的数值,其中为了实现两个序列的最佳对齐,比较窗口中的序列部分与参考序列(其不含添加或缺失)相比可以包括添加或缺失(即缺口)。百分比的计算是通过确定在两个序列中均出现的相同核苷酸或氨基酸的位置的数目,从而产生匹配位置数,并用匹配位置数除以比较窗中的位置总数,并将结果乘以100,得到百分比序列同一性。

[0169] 用于对齐序列以供比较的方法是本领域众所周知的。在例如下列文献中描述了各种程序和对齐算法:Smith and Waterman(1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482;Needleman and Wunsch(1970) *J. Mol. Biol.* 48:443;Pearson and Lipman(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444;Higgins and Sharp(1988) *Gene* 73:237-44;Higgins and Sharp(1989) *CABIOS* 5:151-3;Corpet et al.(1988) *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90;Huang et al.(1992) *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65;Pearson et al.(1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-31;Tatiana et al.(1999) *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50。在例如Altschul et al.(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10中可以找到一种序列对齐方法和同一性计算的详细论述。

[0170] 美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)基础本地比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool)(BLASTTM;Altschul等(1990))可从几个来源获得,包括美国国家生物技术信息中心(Bethesda,MD)和在因特网上,与几个序列分析程序联合使用。关于如何使用该程序来测定

序列同一性的描述可在因特网上BLAST™的“帮助”部分获得。对于核酸序列的比较,可使用缺省参数来采用BLAST™(Blastn)程序的“Blast 2 sequences”函数。在通过此方法评估时,与参照序列具有越大的相似性的核酸序列将显示越高的序列同一性。

[0171] 能够特异性杂交/能够特异性互补:如本文所使用的,术语“能够特异性杂交”和“能够特异性互补”是表明互补性的程度充分,使得在核酸分子和靶核酸分子之间产生稳定而特异的结合的术语。两个核酸分子之间的杂交涉及在两个核酸分子的核酸序列之间形成反平行对齐。两个分子随后能够与相对链的相应碱基形成氢键,从而形成一个二聚体分子,如果它足够稳定,则可以使用本领域众所周知的方法进行检测。核酸分子不需要与靶分子100%互补才能特异性杂交。然而,发生特异性杂交必须存在的序列互补性的量因杂交条件而变化。

[0172] 产生特定程度的严格性的杂交条件会随着所选杂交方法的性质和杂交核酸序列的组成和长度的不同而改变。一般地,杂交温度和杂交缓冲液的离子强度(尤其是Na⁺和/或Mg⁺⁺浓度)将决定杂交的严格性,虽然清洗时间也会影响严格性。关于为获得特定程度严格性所需的杂交条件的计算是本领域普通技术人员众所周知的,并且在例如Sambrook等人(编辑),分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual),2nd Ed., vol.1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,1989, chapters 9 and 11;和Hames和Higgins(编辑)Nucleic Acid Hybridization,IRL Press,Oxford,1985中有讨论。有关核酸杂交的更详细的说明和指导可以参见,例如,《Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes》,第一部分,第2章,Elsevier,NY,1993中的Tijssen,“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”一文,以及Ausubel等编辑,Current Protocols in Molecular Biology,第2章,Green Publishing and Wiley-Interscience,NY,1995。

[0173] 如本文所使用的,“严格条件”包括在其中只有当杂交分子与靶核酸分子内的同源序列之间的错配小于20%时才发生杂交的条件。“严格条件”包括进一步特定水平的严格性。因此,如本文所使用的,“中等严格”条件是指在其中序列错配超过20%的分子将不会杂交的条件;“高严格”条件是指在其中序列错配超过10%的分子将不会杂交的条件;和“极高严格”条件是指在其中序列错配超过5%的分子将不会杂交的条件。“极高严格”条件是指在其中序列错配超过6%的分子将不会杂交的条件。

[0174] 下面是代表性的、非限制的杂交条件:

[0175] 高严格条件(检测具有至少90%序列同一性的序列):在65℃的5x SSC缓冲液中杂交16小时;在室温下用2x SSC缓冲液清洗2次,每次15分钟;和在65℃的0.5x SSC缓冲液中清洗2次,每次20分钟。

[0176] 中等严格条件(检测具有至少80%序列同一性的序列):在65-70℃的5x-6x SSC缓冲液中杂交16-20小时;在室温下用2x SSC缓冲液清洗2次,每次5-20分钟;和在55-70℃的1x SSC缓冲液中清洗2次,每次30分钟。

[0177] 非严格对照条件(检测具有至少50%序列同一性的序列):在55℃的6xSSC缓冲液中杂交16-20小时;在室温至55℃下用2x-3x SSC缓冲液清洗至少2次,每次20-30分钟。

[0178] 如本文关于连续核酸序列所使用的,术语“基本上同源的”或“基本上同源”是指如

下的连续核苷酸序列,其在严格条件下与参考核酸序列杂交。例如,与参考核酸序列基本上同源的核酸序列是如下的核酸序列,其在严格条件下(例如,上文示明的中等严格条件)与参考核酸序列杂交。基本上同源的序列可具有至少80%序列同一性。例如,基本上同源的序列可具有大约80%-100%的序列同一性,例如大约81%;大约82%;大约83%;大约84%;大约85%;大约86%;大约87%;大约88%;大约89%;大约90%;大约91%;大约92%;大约93%;大约94%;大约95%;大约96%;大约97%;大约98%;大约98.5%;大约99%;大约99.5%;和大约100%。基本上同源的性质与特异性杂交密切相关。例如,当具有充分程度的互补性,从而在期望特异性结合的条件下(例如严格杂交条件下)避免核酸与非靶序列的非特异性结合时,核酸分子是能够特异性杂交的。

[0179] 如本文所使用的,术语“直系同源物”或“直向同源物”是指两个或多个物种中的基因,其从一个共同的祖先核苷酸序列进化而来,并可以在两个或多个物种中保留相同的功能。

[0180] 如本文所使用的,对于两个核酸分子而言,当沿着5'-3'方向阅读的序列的每一个核苷酸均与沿着3'-5'方向阅读的另一个序列的每一个核苷酸互补时,则称这两个核酸分子显示“完全互补性”。与参考核苷酸序列互补的核苷酸序列将显示与参考核苷酸序列的反向互补序列相同的序列。这些术语和描述在本领域中有确切的定义,且本领域的普通技术人员容易理解。

[0181] 在确定氨基酸序列之间的百分比序列同一性时,本领域技术人员众所周知,在不影响包含该对齐序列的多肽的期望性质的情况下,某个对齐所提供的给定位置上的氨基酸的身份可以不同。在这些情况下,可以调整百分比序列同一性以解释被保守取代的氨基酸之间的相似性。这些调整是本领域技术人员众所周知并且普遍使用的。见,例如Myers and Miller(1988),Computer Applications in Biosciences 4:11-7。

[0182] 本发明的实施方案包括示例性的质体转运肽氨基酸序列的功能性变体,和编码它们的核酸序列。示例性的转运肽序列的功能性变体可以是,例如,示例转运肽氨基酸序列的片段(例如N端或C端片段),或全长示例性转运肽氨基酸序列或示例性转运肽氨基酸序列的片段的修饰序列。在一些实施方案中,示例性的转运肽氨基酸序列可以被修饰而引入一个或多个保守的氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是指如下的氨基酸取代,其中氨基酸残基被另一个具有相似功能侧链、相似大小、和/或相似疏水性的氨基酸残基代替。可用于代替相同家族中的另一个氨基酸以便引入保守取代的氨基酸家族是本领域已知的。例如,这些氨基酸家族包括:碱性氨基酸(例如,赖氨酸,精氨酸和组氨酸);酸性氨基酸(例如,天冬氨酸和谷氨酸);不带电的(在生理pH下)的极性氨基酸(例如,甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,和半胱氨酸);非极性氨基酸(例如丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,甲硫氨酸,和色氨酸); β 支链氨基酸(例如,苏氨酸,缬氨酸,和异亮氨酸);和芳香族氨基酸(例如酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,和组氨酸)。见,例如,Sambrook et al. (Eds.),同上;和Innis et al.,PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,1990,Academic Press,NY,USA。

[0183] 可操作地连接:当第一核苷酸序列与第二核苷酸序列存在功能关系时,则该第一核苷酸序列与第二核苷酸序列“可操作地连接”。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则启动子与该编码序列可操作地连接。如果可操作地连接的核苷酸序列是重组产生

的,则这些核苷酸序列通常是连续的,并且在需要连接两个蛋白编码区时,这些核苷酸序列将共阅读框。然而,可操作地连接的核苷酸序列不一定连续的。

[0184] 术语“可操作地连接的”,在用来指基因调节序列和编码序列时,其意思是调节序列影响所连接的编码序列的表达。“调节序列”或“控制元件”是指影响转录的时机和水平/量,RNA加工或稳定性,或相关编码序列的翻译的核苷酸序列。调节序列可以包括启动子;翻译前导序列;内含子;增强子;茎环结构;阻遏物结合序列;终止序列;多聚腺苷酸化识别序列;等。特定的调节序列可位于与之可操作地连接的编码序列的上游和/或下游。此外,与编码序列可操作地连接的特定调控序列可位于双链核酸分子的相关互补链上。

[0185] 当用于指示两个或多个氨基酸序列时,术语“可操作地连接”是指第一个氨基酸序列与至少一个额外的氨基酸序列存在功能关系。例如,在包含转运肽和第二氨基酸序列的多肽内,如果该转运肽影响该多肽或该第二氨基酸序列的表达或运输,则该转运肽(例如CTP)与该第二氨基酸序列可操作地连接。

[0186] 启动子:如本文所使用的,术语“启动子”是指一段DNA区域,其可以位于转录起点的上游,并参与RNA聚合酶和其它蛋白的识别和结合以起始转录。启动子可以与用于在细胞内表达的编码序列可操作地连接,或者启动子可以与编码信号序列的核苷酸序列可操作地连接,而该信号序列与用于在细胞内表达的编码序列可操作地连接。“植物启动子”可以是能够在植物细胞中起始转录的启动子。处于发育控制之下的启动子的实例包括:优先在某些组织(例如但不限于,叶、根、种子、纤维、木质部导管、管胞或厚壁组织)中起始转录的启动子。这些启动子被称为“组织优选的”。仅在特定组织中启动转录的启动子被称为“组织特异的”。“细胞类型特异的”启动子主要在一个或多个器官的特定细胞类型中的驱动转录,例如根或叶中的导管细胞。“可诱导的”启动子可以是可受环境控制的启动子。可能通过可诱导的启动子触发转录的环境条件的实施例包括,例如但不限于,缺氧条件和光的存在。组织特异的、组织优选的、细胞类型特异的、和可诱导的启动子构成了“非组成型”启动子类型。“组成型”启动子是在大多数环境条件下可以有活性的启动子。

[0187] 任何可诱导的启动子均可用于本发明的一些实施方案。见Ward et al.(1993), Plant Mol.Biol.22:361-366。使用可诱导的启动子,转录速度可响应诱导剂而增加。可诱导的启动子的实例包括,但不限于:来自ACEI系统的对铜响应的启动子;来自玉米的对苯磺酰胺除草剂安全剂响应的In2基因;来自Tn10的Tet阻遏物;和来自类固醇激素基因的可诱导启动子,其转录活性可以被糖皮质激素诱导(Schena et al.(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:0421)。

[0188] 组成型启动子的实例包括,但不限于:来自植物病毒的启动子,如来自CaMV的35S启动子;来自水稻肌动蛋白基因的启动子;泛素启动子;pPEMU;MAS;玉米H3组蛋白启动子;和ALS启动子,欧洲油菜ALS3结构基因5'端的Xba1/NcoI片段(或与所述Xba1/NcoI片段相似的核苷酸序列)(国际PCT公开No.WO 96/30530)。

[0189] 另外,任何组织特异的或组织优选的启动子均可用于本发明的一些实施方案。用包含与组织特异的启动子可操作地连接的编码序列的核酸分子转化的植物,可以在特定组织中排他地或优先地产生该编码序列的产物。组织特异的或组织优选的启动子包括,但不限于:根优选的启动子,例如来自菜豆蛋白基因的启动子;叶特异的和光诱导的启动子,例如来自cab或rubisco的启动子;花药特异性启动子,例如来自LAT52的启动子;花粉特异的

启动子,例如来自Zm13的启动子;和小孢子优选的启动子,例如如来自apg的启动子。

[0190] 转化:如本文所使用的,术语“转化”或“转导”是指将一个或多个核酸分子转移到细胞内。当被转导到细胞内的核酸分子被细胞稳定复制时(无论是通过该核酸分子整合到细胞基因组中,还是通过附加体型复制),则称细胞被转导到细胞内的核酸分子“转化”。如本文所使用的,术语“转化”包括所有可以将核酸分子引入到这种细胞内的技术。实例包括但不限于:用病毒载体转染;用脂质体载体转化;电穿孔(Fromm et al. (1986) Nature 319: 791-3);脂质转染(Felgner et al. (1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7413-7);显微注射(Mueller et al. (1978) Cell 15:579-85);土壤杆菌介导的转移(Fraley et al. (1983) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:4803-7);DNA直接摄取;和微粒轰击(Klein et al. (1987) Nature 327:70)。

[0191] 转基因:一种外源核酸序列。在一些实例中,转基因可以是编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的序列。在特定实例中,转基因可以编码这样的多肽,其包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP和至少一个期望质体表达的额外的肽序列(例如,赋予除草剂抗性的肽序列)。在这些和其它的实例中,转基因可以含有与转基因的编码序列可操作地连接的调节序列(例如启动子)。为本公开的目的,术语“转基因(的)”在用于指示生物体(例如植物)时,是指包含外源核酸序列的生物体。在一些实例中,包含外源核酸序列的生物体可以是其中通过分子转化技术引入了该核酸分子的生物体。在其它实例中,包含外源核酸序列的生物体可以通过例如基因渗入或植物异花授粉而引入了该核酸序列的生物体。

[0192] 转运:如本文所使用的,术语“转运”、“导向”和“转移”是指本发明的某些氨基酸序列帮助包含该氨基酸序列的多肽从宿主细胞的细胞核移动进入宿主细胞的质体内的性质。在特定的实施方案中,这种氨基酸序列(例如人造的芸苔属来源的CTP序列)可能能够将包含该氨基酸序列的多肽的大约100%、至少大约95%、至少大约90%、至少大约85%、至少大约80%、至少大约70%、至少大约60%、和/或至少大约50%转运到宿主细胞的质体内。

[0193] 载体:一种被引入到细胞内,例如为了产生转化细胞而被引入到细胞内的核酸分子。载体可以包括允许它在宿主细胞中复制的核酸序列,例如复制起点。载体的实例包括,但不限于:质粒;粘粒;噬菌体;和携带外源DNA进入细胞的病毒。载体还可以包括一个或多个基因、反义分子、和/或选择标志物基因,以及其它本领域已知的遗传元件。载体可以转导、转化或感染细胞,借此导致细胞表达由该载体编码的核酸分子和/或蛋白质。载体任选地包括可帮助核酸分子实现细胞进入的材料(例如脂质体、蛋白质包壳等)。

[0194] 除非特别说明或暗示,如本文所用的,术语“一种”、“一个”和“该”意味着“至少一个”。

[0195] 除非另有具体说明,否则本文所用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。分子生物学中常见术语的定义可见,例如Lewin B., Genes V, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); 和 Meyers R.A. (编辑), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。除非另有具体说明,否则所有的百分比均为重量百分比,所有溶剂混合比例均为体积比。所有温度均为摄氏度。

[0196] IV. 包含人造的芸苔属来源的CTP编码序列的核酸分子

[0197] 在一些实施方案中,本公开提供了一种核酸分子,其包含与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的至少一个编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列。在特定的实施方案中,感兴趣的核苷酸序列可以是编码感兴趣的多肽的核苷酸序列。在特定的实例中,提供了单个核酸分子,其编码多肽,该多肽中TraP8或TraP9序列被融合到感兴趣的多肽的N端。

[0198] 人造的芸苔属来源的CTP可以来自于芸苔属EPSPS基因。在这些实施方案的特定实例中,芸苔属EPSPS基因可以包括如SEQ ID NO:14所示的核酸序列,或来自另一不同EPSPS基因的同源核酸序列,或可以为包含如SEQ ID NO:14所示的核酸序列的芸苔属EPSPS基因的直系同源物(例如,包含如SEQ ID NO:15所示的核酸序列的芸苔属EPSPS基因)。

[0199] 在一些实施方案中,人造的芸苔属来源叶绿体转运肽可以是嵌合的芸苔属来源CTP。人造的嵌合芸苔属来源CTP可以从参考芸苔属CTP序列获得,方法是通过将参考芸苔属CTP序列内包含的第一连续氨基酸序列与包含于另一不同CTP序列(例如第二芸苔属CTP序列)内的第二连续氨基酸序列相连。在特定的实施方案中,包含所述第二连续氨基酸序列的另一不同CTP序列可以由来自基因组的同源基因编码,该基因组不是从其获得所述参考序列的芸苔属物种的基因组(例如另一不同的芸苔属物种,芸苔属物种之外的植物;低等光合真核生物,例如绿藻;和原核生物,例如蓝藻或土壤杆菌)。因此,编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列可以通过下属方式从参考芸苔属物种CTP编码基因序列获得:将编码参考芸苔属CTP序列的连续氨基酸序列的核苷酸序列与编码来自另一不同CTP序列的、与参考芸苔属CTP序列的其余部分同源的连续氨基酸序列的核苷酸序列融合。在这些和其它的实例中,参考芸苔属CTP序列的连续氨基酸序列可以位于人造的芸苔属来源的CTP的5'端或3'端。

[0200] 在一些实施方案中,人造的嵌合芸苔属来源CTP可以衍生自多个芸苔属CTP序列(包括参考芸苔属CTP序列),其方式是将一个芸苔属CTP序列内包含的连续氨基酸序列与另一不同芸苔属物种CTP序列内包含的连续氨基酸序列连接在一起。在特定的实施方案中,所述多个芸苔属CTP序列可以由不同芸苔属物种中的直系同源基因序列编码。在一些实施方案中,所述多个芸苔属CTP序列可以正好是两个芸苔属CTP序列。因此,编码人造的嵌合芸苔属来源CTP的核苷酸序列可以衍生自两个同源的(例如基本上同源的)芸苔属CTP编码基因序列(例如直系同源基因序列),其方式是将编码来自其中一个芸苔属CTP序列的连续氨基酸序列的核苷酸序列与编码来自另一个芸苔属CTP序列的、与前述第一个芸苔属CTP序列的其余部分同源的连续氨基酸序列的核苷酸序列融合。TraP8和TraP9是这种人造的嵌合芸苔属来源CTP的示例。

[0201] 本领域的普通技术人员会理解,在选定参考芸苔属CTP序列内的第一连续氨基酸序列之后,根据前述衍生过程从同源CTP序列的其余部分鉴定和选择连续氨基酸序列是明确且自动的。在一些实例中,第一连续氨基酸序列的长度可以为大约25至大约40个氨基酸(例如长度为24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41和42个氨基酸)。在一些实施方案中,参考芸苔属CTP序列内的第一连续氨基酸序列由一些芸苔属EPSPS基因内保守的“SVSL”(SEQ ID NO:13)基序的3'端位置界定。

[0202] 根据前述过程人造的嵌合芸苔属来源CTP序列的实例是SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。鉴于遗传密码子的简并性,本领域普通技术人员能马上想到编码这些肽的核苷酸序

列的类群。此类多核苷酸序列的例子包括SEQ ID NO:5、6、8和9。这些特定的实例从来自欧洲油菜ESPSP基因的几种ESPSP直系同源物之一的同源CTP纳入了连续序列,从而例示了人造嵌合芸苔属来源CTP的结构特征。

[0203] 一些实施方案包括所述人造芸苔属来源叶绿体转运肽的功能性变体,和/或编码它们的核酸。这些功能性变体包括,例如但不限于:人造的芸苔属来源的CTP编码序列,其衍生自如SEQ ID NO:14和/或SEQ ID NO:15所示的芸苔属CTP编码序列之一或二者的同源物和/或直系同源物,和/或由该核酸编码的CTP;编码人造的芸苔属来源的CTP的核酸,所述人造的芸苔属来源的CTP包含SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2内的连续氨基酸序列,和/或由该核酸编码的CTP;编码截短的人造的芸苔属来源的CTP的序列,其包含SEQ ID NO:5,6,8,和9其中之一内的连续核酸序列;编码截短的人造的芸苔属来源的CTP的序列,其包含与SEQ ID NOs:5,6,8,和9其中之一基本上同源的连续核酸序列;截短的人造的芸苔属来源的CTP,其包含SEQ ID NOs:3和4之一内的连续氨基酸序列;核酸序列,其编码包含SEQ ID NOs:5,6,8,和9之一内的连续氨基酸序列的截短的人造的芸苔属来源的CTP,和/或其编码的CTP;编码人造的芸苔属来源的CTP的核酸,该CTP包含SEQ ID NO:3和4之一内的连续氨基酸序列,所述连续氨基酸序列具有一个或多个保守氨基酸取代,和/或由该核酸编码的CTP;以及编码人造的芸苔属来源的CTP的核酸,该CTP包含SEQ ID NOs:3和4其中之一内的连续氨基酸序列,并具有一个或多个非保守的氨基酸取代,并被证明可以指导可操作地连接的肽进入含质体细胞内的质体内,和/或由该核酸编码的CTP。

[0204] 因此,本发明的一些实施方案包括含有如下核苷酸序列的核酸分子,该核苷酸序列编码人造的嵌合芸苔属来源CTP,其包含一个或多个保守的氨基酸取代。这种核酸分子可用于,例如,在分子生物学技术中帮助本发明CTP编码序列的操作。例如,在一些实施方案中,可将本发明的CTP编码序列引入到合适的用于将序列亚克隆到表达载体内的载体中,或者可以将本发明的CTP编码序列引入到这样的核酸分子中,该核酸分子可以帮助产生其他包含与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的CTP编码序列的核酸分子。在这些和进一步的实施方案中,人造的嵌合芸苔属来源CTP序列中的一个或多个氨基酸位置可以被删除。例如,人造的嵌合芸苔属来源CTP的序列可以被修饰,使得该序列中的1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19或20个位置上的氨基酸被删除。对同源CTP序列的比对可以提供哪些氨基酸可以被删除而不会影响人造CTP的功能的指导。

[0205] 在特定的实施方案中,人造的芸苔属来源叶绿体转运肽的长度小于80个氨基酸。例如,人造的芸苔属来源的CTP的长度可以是79,78,77,76,75,74,73,72,71,70,69,68,67,66,65,64,63,62,61,60或者更少的氨基酸。在某些实例中,人造的芸苔属来源的CTP的长度可以为大约65,大约68,大约72或大约74个氨基酸。在这些和进一步的实例中,人造的芸苔属来源的CTP可以包含SEQ ID NOs:3和4中其中一个所示的氨基酸序列,或任何前述的功能性变异体。因此,人造的芸苔属来源的CTP可以包含SEQ ID NOs:3和4中其中一个的氨基酸序列,或其功能性变体,其中人造的芸苔属来源的CTP的长度小于80个氨基酸。在某些实例中,人造的芸苔属来源的CTP可以包含与SEQ ID NO:3和4中的一个例如至少80%,至少85%,至少90%,至少92%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%,至少99%或100%相同的氨基酸序列。

[0206] 本领域的技术人员鉴于本公开能识别编码某一具体的人造芸苔属来源的CTP的所

有核苷酸序列,例如SEQ ID NO:3的TraP8肽,和SEQ ID NO:4的TraP9肽,或任意前述者的功能性变体,包括任何特定缺失和/或保守氨基酸取代。遗传密码的简并性为特定氨基酸序列提供了有限数目的编码序列。选择特定的序列编码人造的芸苔属来源的CTP属于从业者的自由裁量。在不同的应用中可能期望使用不同的编码序列。例如,为了提高人造的芸苔属来源的CTP在特定宿主内的表达,可以选择反映宿主密码子使用偏好的编码序列。作为举例,人造的芸苔属来源的CTP可以由如SEQ ID NOs:5,6,8,和9其中之一中所示的核苷酸序列编码。

[0207] 在本发明的一些实施方案中提供的核酸分子中,编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列的最后一个密码子和感兴趣的核苷酸序列的第一个密码子可以由任意数量的核苷酸三联体所分隔,例如不编码内含子或“终止(STOP)”。在一些实例中,编码在天然前体多肽中通常与叶绿体转运肽相伴随的成熟蛋白质的第一个氨基酸的序列可以存在于编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列的最后一个密码子与感兴趣的核苷酸序列的第一个密码子之间。将编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列和感兴趣的核苷酸序列第一个密码子隔开的序列可以例如由任何序列构成,使得所编码的氨基酸序列很可能不会显著改变嵌合多肽的翻译及其向质体的转位。在这些和进一步的实施方案中,编码人造芸苔属来源叶绿体转运肽的核苷酸序列的最后一个密码子可以与直接与该序列毗邻、或者仅以短肽序列与之相隔的感兴趣的核苷酸序列的第一个密码子相位对准(phase-register)地融合,所述短肽序列例如是由人造核苷酸接头(例如,可能已经被用于实现该融合的核苷酸接头)编码的短肽序列。

[0208] 在一些实施方案中,可能期望修饰感兴趣的核苷酸序列的核苷酸和/或与之融合在一个编码序列中的、人造的芸苔属来源的CTP编码序列的核苷酸,以便例如增强该编码序列在特定宿主中的表达。遗传密码是冗余的,具有64个可能的密码子,但是大多数生物优先使用这些密码子中的一个子集。在某个物种中最经常使用的密码子被称为最优密码子,而那些不经常使用的被归类为稀有或低使用率密码子。Zhang et al. (1991) Gene 105:61-72.可更换密码子以反映特定宿主的优先密码子使用率,这个过程有时被称作“密码子优化”。可以制备含有特定原核或真核宿主优选的密码子的优化密码子序列,以便,例如,增加翻译速度或者产生具有期望性质(例如,与从非优化序列产生的转录本相比具有更长的半衰期)的重组RNA转录本。

[0209] 任何多肽均可以通过纳入人造的芸苔属来源的CTP序列而被导向到含质体细胞的质体上。例如,在一些实施方案中,可以将多肽与人造的芸苔属来源的CTP序列连接,从而将多肽引导到的细胞的质体上,在质体中该多肽-CTP连接分子被表达。在特定的实施方案中,通过纳入人造的芸苔属来源的CTP序列而被导向到质体上的多肽可以是在天然表达该多肽的细胞内通常在质体中表达的多肽。例如但不限于,通过纳入人造的芸苔属来源的CTP序列被导向到质体上的多肽可以是参与除草剂抗性,病毒抗性,细菌性病原体抗性,昆虫抗性,线虫抗性,或抗真菌多肽的多肽。参见,例如,美国专利5,569,823;5,304,730;5,495,071;6,329,504和6,337,431。通过纳入人造的芸苔属来源的CTP序列被导向到质体上的多肽抑或可以是,例如但不限于,参与植物活力和产量的多肽(包括参与对极端温度、土壤条件、光照水平、水的水平、和化学环境的耐受性的多肽),或者可以用作鉴定含有感兴趣的性状的植物的标志物的多肽(例如,选择标志物基因产物、参与种子颜色的多肽,等)。

[0210] 在本发明的一些实施方案中,可以和人造的芸苔属来源的CTP序列连接的、参与除草剂抗性的多肽的非限制性实例包括:乙酰乳酸合酶(ALS)、突变的ALS和ALS的前体(例如,见美国专利5,013,659);EPSPS(见,例如,美国专利4,971,908和6,225,114),例如CP4EPSPS、III类EPSPS、或IV类EPSPS;可修饰质体中发生的生理过程的酶,这些生理过程包括但不限于,光合作用和脂肪酸、氨基酸、油、类胡萝卜素(carotenoids)、萜类和淀粉的合成。在特定实施方案中,可以和人造的芸苔属来源叶绿体转运肽连接的多肽的其它非限制性实例包括:玉米黄素环氧酶,胆碱单加氧酶,亚铁螯合酶, ω -3脂肪酸去饱和酶,谷氨酰胺合成酶,淀粉修饰酶,参与必需氨基酸、维生素A、激素、Bt毒素蛋白之合成的多肽,等等。编码上述多肽的核苷酸序列在本领域中是已知的,可以将这些核苷酸序列和编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列可操作地连接,其中该CTP将被表达进入如下的多肽,其包含与该人造的芸苔属来源的CTP连接的感兴趣的多肽。此外,编码任何上述多肽的额外核苷酸序列可以由本领域的技术人员鉴定(例如,通过克隆与编码该特定多肽的其它基因高度同源的基因)。一旦鉴定了这样的核苷酸序列,设计包括与所鉴定核苷酸序列可操作地连接的人造的芸苔属来源的CTP编码序列,或编码等价多肽的序列,都会是直截了当的过程。

[0211] V. 包含人造芸苔属来源叶绿体转运肽的多肽的表达

[0212] 在一些实施方案中,可以将至少一种核酸分子引入细胞、组织或生物体中,这些核酸分子包含编码包含至少一种人造的芸苔属来源的CTP或其功能等价物的多肽的核苷酸序列,以在所述细胞、组织或生物体中表达该多肽。在特定的实施方案中,核酸分子可以包含与所述编码人造的芸苔属来源的CTP的核苷酸序列可操作地连接的感兴趣的核苷酸序列。例如,核酸分子可以包括编码如下多肽的编码序列,该多肽包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP和至少一个由感兴趣的核苷酸序列编码的其他肽序列。在一些实施方案中,可以将本发明的核酸分子引入含质体的细胞、组织或生物体(例如,植物细胞,植物组织和植物)中,使得在该含质体宿主细胞、组织或生物体中从所述核酸分子表达多肽,其中该表达的多肽包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP和至少一个由感兴趣的核苷酸序列编码的其他肽序列。在某些实例中,被表达的多肽的人造的芸苔属来源的CTP可以帮助将该多肽的至少含有所述其他肽序列的一部分导向到宿主细胞、组织或生物体的质体上。

[0213] 在一些实施方案中,本发明的核酸分子可以通过任何本领域技术人员已知的方法引入到含质体的细胞内。在特定的实施方案中,可以使宿主细胞、组织或生物体和本发明的核酸分子接触,以便将该核酸分子引入到细胞、组织或生物体内。在特定的实施方案中,可用本发明的核酸分子转化细胞,从而将该核酸分子导入细胞内,并且将核酸分子稳定整合到细胞的基因组中。在一些实施方案中,可以使用包含至少一个与感兴趣的核苷酸序列可操作地连接的人造芸苔属来源CTP的核苷酸序列的核酸分子转化细胞,例如含质体的细胞(例如植物细胞)。为了引发或增强表达,核酸分子可以包含一个或多个调节序列,该调节序列可以和编码包含至少一个人造芸苔属来源CTP的多肽的核苷酸序列可操作地连接。

[0214] 核酸分子可以是,例如,载体系统,其包括例如线性质粒和闭合环状质粒。在特定的实施方案中,该载体可以是表达载体。本发明的核酸序列可以,例如,插入到载体中,使该核酸序列与一个或多个调节序列可操作地连接。有许多载体可用于该目的,并且特定载体的选择可以取决于,例如,待插入到载体内的核酸的大小,和要用载体转化的具体宿主细胞。载体通常含有多种组分,这些组分的身份取决于载体的功能(例如,DNA扩增和DNA表

达),以及与载体相容的特定宿主细胞。

[0215] 一些实施方案可以包括植物转化载体,其包括含有至少一个上述的调节序列的核苷酸序列,其中该调节序列与一个或多个编码含有至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列可操作地连接。该一个或多个核苷酸序列可以在该调节序列的控制下在植物细胞、组织或生物体中表达,从而产生包含人造的芸苔属来源的CTP的多肽,该CTP将多肽的至少一部分导向到植物细胞、组织或生物体的质体上。

[0216] 在一些实施方案中,与编码含有至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列可操作地连接的调节序列可以是启动子序列,其可以在宿主细胞中,例如要在其中扩增该核酸分子的细菌细胞,或者要在其中表达该核酸分子的植物细胞中发挥功能。适用于根据本发明的核酸分子的启动子,包括诱导型启动子、病毒启动子、人造启动子、或组成型启动子,所有这些是本领域中众所周知的。可用于本发明实施方案的启动子的非限制性实例在下列文献中提供:美国专利Nos.6,437,217(玉米RS81启动子);5,641,876(水稻肌动蛋白启动子);6,426,446(玉米RS324启动子);6,429,362(玉米PR-1启动子);6,232,526(玉米A3启动子);6,177,611(组成型玉米启动子);5,322,938,5,352,605,5,359,142和5,530,196(35S启动子);6,433,252(玉米L3的油质蛋白启动子);6,429,357(水稻肌动蛋白2启动子和稻肌动蛋白内含子2);6,294,714(光诱导型启动子);6,140,078(盐诱导型启动子);6,252,138(病原体诱导型启动子);6,175,060(磷缺乏诱导的启动子);6,388,170(双向启动子);6,635,806(γ -coixin启动子);和美国专利申请序列No.09/757,089(玉米叶绿体醛缩酶启动子)。

[0217] 其它示例性启动子包括,胭脂碱合酶(NOS)启动子(Ebert et al.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84(16):5745-9);章鱼碱合酶(OCS)启动子(其被携带于根瘤土壤杆菌的肿瘤诱导型质粒上);花椰菜花叶病毒启动子,例如花椰菜花叶病毒(CaMV)19S启动子(Lawton et al.(1987) Plant Mol.Biol.9:315-24);CaMV 35S启动子(Odell et al.(1985) Nature 313:810-2);玄参花叶病毒35S启动子(Walker et al.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84(19):6624-8),蔗糖合酶启动子(Yang and Russell(1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA87:4144-8);R基因复合体启动子(Chandler et al.(1989) Plant Cell 1:1175-83);叶绿素a/b结合蛋白基因启动子;CaMV35S(美国专利Nos.5,322,938,5,352,605,5,359,142,和5,530,196);FMV35S(美国专利Nos.6,051,753,和5,378,619);PC1SV启动子(美国专利No.5,850,019);SCP1启动子(美国专利No.6,677,503),以及AGRtu.nos启动子(GenBank登录号V00087;Depicker et al.(1982) J.Mol.Appl.Genet.1:561-73;Bevan et al.(1983) Nature 304:184-7)。

[0218] 在特定的实施方案中,本发明的核酸分子可以包含组织特异性启动子。组织特异性启动子是一种核苷酸序列,其在该启动子特异针对的组织中导致可操作地连接的核苷酸序列发生与该生物体的其它组织相比更高水平的转录。组织特异性启动子的实例包括但不限于:绒毡层特异性启动子;花药特异性启动子;花粉特异性启动子(参见,例如,美国专利No.7,141,424,和国际PCT公开No.WO 99/042587);胚珠特异性启动子;(参见,例如,美国专利申请No.2001/047525A1);果实特异性启动子(参见,例如,美国专利Nos.4,943,674,和5,753,475);和种子特异性启动子(参见,例如,美国专利Nos.5,420,034,和5,608,152)。在一些实施方案中,发育阶段特异性启动子(例如,在发育晚期活跃的启动子)可以在本发明的

组合物或方法中使用。

[0219] 其他可在一些实施方案中与核酸分子可操作地连接的调节序列包括位于启动子序列和充当翻译前导序列的编码序列之间的5' UTR。翻译前导序列存在于完全加工的mRNA中,并且它可能影响初级转录物的加工,和/或RNA稳定性。翻译前导序列的实例包括玉米和矮牵牛热休克蛋白前导序列(美国专利No.5,362,865),植物病毒外壳蛋白前导序列,植物rubisco(核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶)前导序列,及其他。参见,例如,Turner and Foster(1995)Molecular Biotech.3(3):225-36。下列文献中提供了5' UTR的非限制性实例:GmHsp(美国专利No.5,659,122);PhDnaK(美国专利No.5,362,865);AtAnt1;TEV(Carrington and Freed(1990)J.Virol.64:1590-7);和AGRtunos(GenBank登录号V00087;和Bevan et al.(1983),Nature 304:184-7)。

[0220] 其他可在一些实施方案中与核酸分子可操作地连接的调节序列还包括3' 非翻译序列、3' 转录终止区或多聚腺苷酸区。这些都是位于核苷酸序列下游的遗传元件,并包括提供多聚腺苷酸化信号,和/或其它能够影响转录或mRNA加工的调控信号的多核苷酸。多聚腺苷酸化信号在植物中发挥功能,导致在mRNA前体的3' 端添加多聚腺苷酸核苷酸。多聚腺苷酸序列可以来自于各种植物基因,或T-DNA基因。3' 转录终止区的一个非限制性实例是胭脂碱合酶3' 区(nos 3';Fraley et al.(1983)Proc.Natl.Acad.Sci.USA80:4803-7)。在Ingelbrecht et al.(1989)Plant Cell 1:671-80中提供了一个使用不同3'非翻译区的实例。多聚腺苷酸信号的非限制性实例包括来自豌豆RBCS2基因的多聚腺苷酸信号(Ps.RbcS2-E9;Coruzzi et al.(1984)EMBO J.3:1671-9)和AGRtu.nos(GenBank登录号No.E01312)。

[0221] 本发明的重组核酸分子或载体可包含选择标志物,其赋予被转化的细胞(例如植物细胞)可选择的表型。选择标志物也可以用于选择包含本发明核酸分子的植物或植物细胞。该标记可以编码杀生物剂抗性、抗生素抗性(例如,卡那霉素、遗传霉素(G418)、博来霉素,和潮霉素)或除草剂抗性(例如草甘膦)。选择标志物的实例包括,但不限于:neo基因,其赋予卡那霉素抗性并可用例如卡那霉素和G418进行筛选;pat或bar基因,其赋予双丙氨膦抗性;突变的EPSP合酶基因,其赋予草甘膦抗性;腈水解酶基因,其赋予溴苯腈抗性;突变的乙酰乳酸合酶基因(ALS),其赋予咪唑啉酮或磺酰脲抗性;和氨甲喋呤抗性DHFR基因。存在多种可赋予对氨苄青霉素;博来霉素;氯霉素;庆大霉素;潮霉素;卡那霉素;林可霉素;甲氨蝶呤;草铵膦;嘌呤霉素;大观霉素;利福平;链霉素;和四环素等抗性的选择标志物。这些选择标志物的实例在,例如,美国专利5,550,318;5,633,435;5,780,708和6,118,047中有举例。

[0222] 本发明的核酸分子或载体可额外地/作为替代地包含筛选标志物。筛选标志物可用于监视表达。筛选标志物的实例包括 β -葡萄糖醛酸糖苷酶或uidA基因(GUS),其编码已知有多种发色底物的酶(Jefferson et al.(1987)Plant Mol.Biol.Rep.5:387-405);R-座位基因,其编码的产物可调节植物组织中花青素色素(红色)的产生(Dellaporta et al.(1988)“Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon tagging with Ac.”见18th Stadler Genetics Symposium,P.Gustafson and R.Appels,编辑,Plenum,NY(第263-82页); β -内酰胺酶基因(Sutcliffe et al.(1978)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:3737-41);编码其各种发色底物已知的酶的基因(例如,PADAC,一种发色头孢菌素);荧光素

酶基因 (Ow et al. (1986) Science 234:856-9); xylE 基因, 其编码一种儿茶酚双加氧酶, 转换发色的儿茶酚 (Zukowski et al. (1983) Gene 46 (2-3):247-55); 淀粉酶基因 (Ikata et al. (1990) Bio/Technol. 8:241-2); 酪氨酸酶基因, 其编码的酶能够氧化酪氨酸为 DOPA 多巴醌, 进一步缩合成黑色素 (Katz et al. (1983) J.Gen.Microbiol. 129:2703-14); 和 α -半乳糖苷酶。

[0223] 适用于转化宿主细胞的方法包括任何能够将 DNA 引入到细胞内的方法, 例如但不限于: 原生质体转化 (参见, 例如, 美国专利 5,508,184); 干燥/抑制介导的 DNA 摄取 (desiccation/inhibition-mediated DNA uptake) (参见, 例如 Potrykus et al. (1985) Mol.Gen.Genet. 199:183-8); 电穿孔 (参见, 例如, 美国专利 5,384,253); 用碳化硅纤维搅拌 (参见, 例如, 美国专利 5,302,523 和 5,464,765); 土壤杆菌介导的转化 (参见, 例如, 美国专利 5,563,055, 5,591,616, 5,693,512, 5,824,877, 5,981,840, 和 6,384,301); 和 DNA 涂覆颗粒的加速 (acceleration of DNA-coated particles) (参见, 例如, 美国专利 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 6,160,208, 6,399,861, 和 6,403,865) 等。通过诸如这些技术的应用, 几乎任何物种的细胞均可以被稳定地转化。在一些实施方案中, 转化 DNA 被整合到宿主细胞的基因组中。在多细胞物种的情况下, 转基因细胞可以再生为转基因生物。或者, 转基因细胞可能不能再生为植物。任何这些技术均可用于产生转基因植物, 例如, 在转基因植物的基因组中包含一个或多个本发明的核酸序列。

[0224] 最广泛使用的用于将表达载体导入到植物中的方法是基于土壤杆菌的天然转化系统。根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌是可遗传转化植物细胞的植物致病性土壤细菌。根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌的 Ti 和 Ri 质粒分别携带负责植物遗传转化的基因。Ti (肿瘤诱导) 质粒含有一个大区段, 称为 T-DNA, 其可以转移到被转化的植物中。Ti 质粒的另一个片段, vir 区, 负责 T-DNA 转移。T-DNA 区域的边界由重复序列构成。在某些经修饰的双元载体中, 肿瘤诱导的基因已被删除, 并且 vir 区的功能被利用来转移被 T-DNA 边界序列包围的外源 DNA。T-区还可以包括, 例如, 选择标志物, 其用于高效回收转基因植物和细胞, 和多克隆位点, 其用于插入供转移的序列, 例如人造的芸苔属来源的 CTP 编码核酸。

[0225] 因此, 在一些实施方案中, 植物转化载体可衍生自根癌土壤杆菌的 Ti 质粒 (参见, 例如, 美国专利 Nos. 4,536,475, 4,693,977, 4,886,937 和 5,501,967, 以及欧洲专利 EP 0 122 791) 或发根土壤杆菌的 Ri 质粒。其他的植物转化载体包括, 例如但不限于, 在下列文献中描述的那些: Herrera-Estrella et al. (1983) Nature 303:209-13; Bevan et al. (1983), 同上; Klee et al. (1985) Bio/Technol. 3:637-42; 和欧洲专利 EP 0120516, 以及从前述任一种衍生的那些。其它天然与植物互作的细菌, 例如中华根瘤菌、根瘤菌属、和慢生根瘤菌属, 也可以被修饰从而介导将基因转移到多种不同的植物中。这些植物相关的共生菌可以通过获取卸甲 (disarmed) 的 Ti 质粒和合适的双元载体而拥有基因转移能力。

[0226] 在向受体细胞提供外源 DNA 之后, 一般对被转化细胞进行鉴定, 以用于进一步的培养和植株再生。为了提高鉴定被转化的细胞的能力, 可能期望采用与用于产生转化体的载体相伴的选择或筛选标志物基因, 如先前所述。在使用选择标志物的情况下, 通过使细胞暴露于选择试剂, 在潜在的被转化细胞群体中鉴定被转化的细胞。在使用筛选标志物的情况下, 可以通过期望的标记基因性状对细胞进行筛选。

[0227] 对于暴露于选择试剂时存活的细胞, 或在筛选测定中具有阳性得分的细胞, 可以

在支持植株再生的培养基中培养。在一些实施方案中,对任何合适的植物组织培养基(例如,MS和N6培养基)均可加以修饰使其包含更多的物质,如生长调节剂。组织可以保持在含有生长调节剂的基本培养基中,直到获得足够的组织用于开始植物再生,或者进行多轮重复的人工选择,直到组织的形态适合于再生(例如,至少2周),然后转移到有利于芽形成的培养基中。培养被周期性转移,直到形成足够的芽。一旦芽形成,即将它们转移到有利于根形成的培养基中。一旦有足够的根部形成,可以将植物转移到土壤中进一步生长和成熟。

[0228] 为了确认再生植物中感兴趣的核酸分子(例如编码含有至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列)的存在,可以实施的测定有很多种。这些测定包括,例如:分子生物学测定,如Southern和Northern杂交、PCR和核酸测序;生物化学测定,例如通过如免疫学方法(ELISA和/或Western印迹)或通过酶促作用检测蛋白质产物的存在;植物部分测定,如叶或根测定;和全再生植物的表型分析。

[0229] 作为举例,整合事件可以通过PCR扩增进行分析,其使用,例如,特异针对感兴趣的核苷酸序列的寡核苷酸引物。PCR基因分型理解为包括,但不限于,来自预测含有被整合到基因组中的感兴趣的核酸分子的分离宿主植物组织的基因组DNA的聚合酶链反应(PCR)扩增,随后是标准克隆和PCR扩增产物的序列分析。PCR基因分型的方法已经有详细的描述(参见,例如,Rios,G.et al. (2002) Plant J. 32:243-53),并可应用于衍生自任何植物物种(例如玉米或大豆)或组织类型(包括细胞培养物)的基因组DNA。

[0230] 使用土壤杆菌依赖的转化方法形成的转基因植物通常含有被插入到一个染色体上的单一重组DNA序列。该单一重组DNA序列被称作“转基因事件”或“整合事件”。这样的转基因植物对于所插入的DNA序列而言是杂合的。在一些实施方案中,可以获得对转基因而言为纯合的转基因植物,这是通过使含有单个外源基因序列的独立分离的转基因植物与自身(例如F₀植物)有性交配(自交)产生F₁种子。所产生的F₁种子中四分之一对转基因而言是纯合的。萌发F₁种子产生能够用于杂合性测试的植物,其中杂合性测定通常使用允许区分杂合子和纯合子的SNP测定或热扩增测定法(即,合子型测定)。

[0231] 在特定的实施方案中,在其中已经引入了至少一个包含编码至少一个含有至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核酸分子的含有质体的细胞内,产生了至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的多个拷贝。每个含有至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽可以由被引入到不同转化事件中的多个核酸序列表达,或者由被引入到单个转化事件中的单个核酸序列表达。在一些实施方案中,多个这样的多肽可以在单个启动子的控制下表达。在其它实施方案中,多个这样的多肽可以在多个启动子的控制下表达。可以表达含有多个肽序列的单一多肽,其中每一个肽序列均将被导向到质体。

[0232] 除了用重组核酸分子直接转化植物之外,还可以通过将具有至少一个转基因事件的第一植物与缺少这种事件的第二植物杂交,来制备转基因植物。例如,可以将含有编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列的重组核酸分子引入到适于转化的第一植物品系内,从而产生转基因植物,可以将转基因植物和第二植物品系杂交,从而将编码该多肽的核苷酸序列引入到该第二植物品系内。

[0233] VI. 包含被人造芸苔属来源叶绿体转运肽引导的多肽的植物材料

[0234] 在一些实施方案中,提供了植物细胞,其中该植物细胞包含编码包含至少一个人造的芸苔属来源CTP的多肽的核苷酸序列。在具体地实施方案中,这样的植物细胞可以通过

转化不能再生而产生植物的植物细胞而产生。在一些实施方案中,提供了一种植物,其中该植物包含这样的植物细胞:该植物细胞中含有编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列。在特定的实施方案中,这样的植物可以通过转化植物组织或植物细胞,并再生整株植物来产生。在进一步的实施方案中,这样的植物可以从商业来源获得,或者通过将含有编码含有至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列的核酸渗入到种质中而获得。在具体的实施方案中,所述植物包含这样的植物细胞,此类植物细胞包含编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列,且所述细胞不能再生以产生植物。还提供了这样的植物材料,其包含植物细胞,该植物细胞中含有编码含有至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列。这样的植物材料可以从包含该植物细胞的植物中获得。

[0235] 包含编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列的转基因植物、不可再生的植物细胞、或植物材料在一些实施方案中可表现出一个或多个以下的特征:在植物的细胞内表达该多肽;在植物细胞的质体内表达该多肽的一部分;将多肽从植物细胞的细胞质导入到细胞的质体内;在植物细胞内质体特异性地表达该多肽;和/或将多肽定位在植物的细胞内。除了表达编码的多肽之外,这样的植物可以额外具有一个或多个期望的性状。这些性状可以包括例如:抗昆虫等害虫以及致病剂;耐除草剂;增强稳定性、产量或保质期;环境抗性;药物生产;工业产品生产;和营养强化。

[0236] 根据本发明的转基因植物可以是任何能够被本发明核酸分子转化的植物。因此,该植物可以是双子叶植物或单子叶植物。本发明方法中可以使用的双子叶植物的非限制性实例包括:拟南芥属,苜蓿,豆类,西兰花,卷心菜,胡萝卜,花椰菜,芹菜,大白菜,棉花,黄瓜,茄子,莴苣,甜瓜,豌豆,胡椒,花生,马铃薯,南瓜,萝卜,油菜,菠菜,大豆,倭瓜(squash),甜菜,向日葵,烟草,番茄,和西瓜。本发明方法中可以使用的单子叶植物的非限制性实例包括:玉米,芸苔属植物(Brassica),洋葱,水稻,高粱,小麦,黑麦,黍,甘蔗,燕麦,黑小麦,柳枝稷,以及草坪草。根据本发明的转基因植物可以按照任何方式使用或栽培。

[0237] 一些实施方案还提供了含有一个或多个编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列的商业产品,例如从含有一个或多个这样的核苷酸序列的重组植物或种子中产生的商业产品。含有一个或多个编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列的商业产品包括,例如但不限于:含有一个或多个编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列的植物的食品、粕、油、压碎的或完整的颗粒或种子。在一个或多个商品或商业产品中检测到一个或多个编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列,是事实上的证据,表明该商品或商业产品至少部分地是由包含一个或多个编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列的植物产生的。在特定的实施方案中,本发明的商品产品包括可检测量的、编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,这种商品产品可以通过,例如,获得转基因植物并从它们制备食物或饲料来生产。

[0238] 在一些实施方案中,含有转基因的转基因植物、不能再生的植物细胞、或种子(该转基因包含编码包含至少一个人造的芸苔属来源的CTP的多肽的核苷酸序列)在其基因组中还可以包含至少一个其它的转基因事件,包括但不限于:可转录RNAi分子的转基因事件;编码杀虫蛋白的基因(例如,苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白);除草剂耐受性基因(例如,提供对

草甘膦耐受性的基因);和有助于在转基因植物中产生期望表型的基因(例如,增加产量,改变脂肪酸代谢,或恢复细胞质雄性不育性)。

[0239] VII.人造芸苔属来源叶绿体转运肽介导基因产物定位在质体上

[0240] 本发明的一些实施方案提供了一种用于将基因产物表达和/或定位于质体(例如叶绿体)上的方法。在特定的实施方案中,基因产物可以是标志物基因产物,例如,荧光分子。基因产物作为还包含人造的芸苔属来源的CTP的多肽的一部分的表达,可以提供一种用来评估特定的人造芸苔属来源的CTP序列的质体定位能力的系统。在一些实施方案中,利用标记基因产物的表达,其中该标记基因产物作为包含人造的芸苔属来源的CTP的多肽的一部分,来将标记基因产物的表达导向到表达该多肽的细胞的质体上。在某些实施方案中,这样的标记基因产物被定位在宿主细胞的质体上。例如,标志物基因产物在质体中的表达水平可能比在宿主细胞细胞质或其他细胞器中更高;标志物基因产物可能在质体中的表达水平高得多;标记基因产物可能基本上只在质体中表达;或者标记基因产物可能完全在质体中表达,从而不能检测到其在细胞质或非质体细胞器中的表达。

[0241] 在一些实施方案中,包括人造的芸苔属来源的CTP的功能性变体的多肽,其中该多肽与标志物基因产物可操作地连接,用于评估功能性变体肽的特性。例如,可以改变人造的芸苔属来源的CTP,例如在人造的芸苔属来源的CTP中引入至少一个保守突变,并且可将所得的变体肽和标志物基因产物可操作地连接。在合适的宿主细胞(例如,其中表达构建体中的一个或多个调节元件可运作的细胞)中表达后,可以确定标志物基因产物的表达。通过在参考人造的芸苔属来源的CTP-标记物构建体和变异体肽-标记物构建体之间比较标志物基因产物的亚细胞定位,可以确定变异体肽是否提供,例如,更大的(greater)质体定位,或基本上相同的质体定位。这样的变体可认为是功能性变体。通过鉴定人造的芸苔属来源的CTP的能提供更大质体定位的功能性变体,可以将这样的变体中的突变纳入到进一步的人造芸苔属来源的CTP的变体中。执行多轮该评估过程,并随后将被鉴定的有利突变纳入到人造的芸苔属来源的CTP序列内,可以产生一个迭代的过程,用于优化人造的芸苔属来源的CTP序列。这种优化的人造的芸苔属来源的CTP序列,和编码它们的核苷酸序列,被认为是本发明的一部分,无论此类优化的人造芸苔属来源CTP序列是否能够通过添加额外的突变而进一步被优化。

[0242] 本文讨论的参考文献仅仅是由于它们公开于本专利申请提交日之前。本文中的任何内容不应被理解为本发明人承认没有资格由于先前的发明而早于这些公开。

[0243] 下面提供的实例用于例证某些特定的特征和/或实施方案。这些实例不应视为将本公开限制在所例证的这些特定特征或实施方案中。

实施例

[0244] 实施例1:嵌合叶绿体转运肽(TraP)序列的设计和产生

[0245] 质体是在高等植物物种中发现的细胞器,并存在于所有植物组织中。叶绿体是在绿色光合组织中发现的一种特化型质体,负责至关重要的生理功能。例如,其中一种这样的主要生理功能是合成植物所需的芳香族氨基酸。细胞核编码的酶是此生物合成途径必需的,这些酶从细胞质被转运到叶绿体的内部。这些细胞核编码的酶通常具有N端转运肽,其与叶绿体膜相互作用,从而促进肽转运到叶绿体的基质。Bruce B. (2000) Chloroplast

transit peptides:structure,function,and evolution.Trends Cell Bio.10:440-447。在输入时,基质肽酶切掉该转运肽,而使成熟的功能蛋白被输入到叶绿体内。Richter S, Lamppa GK.(1999) Stromal processing peptidase binds transit peptides and initiates their ATP-dependent turnover in chloroplasts.Journ.Cell Bio.147:33-43。叶绿体转运肽是可变的序列,其在长度、组成和组织上有高度多样性。Bruce B. (2000) Chloroplast transit peptides:structure,function,and evolution.Trends Cell Bio.10:440-447。叶绿体转运肽的序列相似性在来自不同植物物种的同源蛋白之间有显著差异。叶绿体转运肽之间的差异大小出乎人们的预料,因为比较加工成熟的功能蛋白时,从不同植物物种获得的同源蛋白通常具有相对高水平的序列相似度。

[0246] 设计、产生并在植物内测试了新的嵌合叶绿体转运肽序列。新的嵌合叶绿体转运肽显示具有高效的转位和加工性能,用于将农艺学上重要的蛋白转运到叶绿体中。首先,通过ChloroPTM计算机程序分析来自不同植物物种的天然5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSPS)蛋白序列,以鉴定推定的叶绿体转运肽序列(Emanuelsson O,Nielsen H,von Heijne G,(1999)ChloroP,a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites,Protein Science 8:978-984),该程序可以在<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>获得。在鉴定出天然叶绿体转运肽序列之后,将第一叶绿体转运肽序列与来自第二生物体的第二叶绿体转运肽序列进行对齐。图17示出了欧洲油菜(NCBI登录No:P17688)和芜菁(NCBI登录No.NP_AAS80163)的EPSPS叶绿体转运肽序列的对齐结果。利用叶绿体转运肽的序列对齐,通过将来自第一生物体的叶绿体转运肽的一半与来自第二生物体的叶绿体转运肽序列的另一半以大约1:1的近似比合并,设计了新的嵌合叶绿体转运肽。新设计嵌合叶绿体转运肽的示例性序列是TraP8(SEQ ID NO:3)和TraP9(SEQ ID NO:4)。这些新的嵌合叶绿体转运肽序列来源于欧洲油菜[ATCC登录No:P17688]和芜菁[ATCC登录No:AAS80163]的EPSPS蛋白。TraP8(SEQ ID NO:3)嵌合叶绿体转运肽序列包括来源于欧洲油菜的N末端,而该叶绿体转运肽的C端来源于芜菁。TraP9(SEQ ID NO:4)叶绿体转运肽序列包括来源于芜菁的N末端,而该叶绿体转运肽的C端来源于欧洲油菜。对该嵌合叶绿体转运肽通过多种包括瞬时植物内表达系统的测定法进行测试,还通过转基因手段,将其作为包含与农艺学上重要的转基因序列融合的基因表达元件的稳定转化事件加以测试。

[0247] 实施例2:嵌合叶绿体转运肽(TraP)序列的瞬时植物内测试

[0248] 烟草瞬时测定:

[0249] 首先通过瞬时植物内测定对Trap8和Trap9嵌合叶绿体转运肽序列进行测试。合成了编码Trap8(SEQ ID NO:5)和TraP9(SEQ ID NO:6)嵌合叶绿体转运肽序列的多核苷酸序列。在TraP序列和yfp编码序列之间加入了一个接头序列(SEQ ID NO:7)。所得的构建体含有两个植物转录单元(PTU)。第一个PTU包括拟南芥泛素10启动子(AtUbi10启动子;Callis, et al., (1990) J.Biol.Chem., 265:12486-12493)、TraP-黄色荧光蛋白融合基因(TraP-YFP;美国专利申请号2007/0298412)、和根癌土壤杆菌ORF 23的3'非翻译区(AtuORF233' UTR;美国专利号5,428,147)。第二个PTU包括木薯叶脉花叶病毒启动子(CsVMV promoter; Verdaguer et al., (1996) Plant Molecular Biology, 31:1129-1139)、磷丝菌素乙酰转移酶(PAT;Wohlleben et al., (1988) Gene, 70:25-37)、和根癌土壤杆菌ORF 1的3'非翻译区

(AtuORF1 3'UTR;Huang et al., (1990) J.Bacteriol.,172:1814-1822)。构建体pDAB101977包含TraP8嵌合叶绿体转运肽(图2)。构建体pDAB101978包含TraP9嵌合叶绿体转运肽。在本研究中构建并选用了对照质粒101908,其在yfp基因的上游不含有叶绿体转运肽序列(图3)。通过限制酶消化和测序验证了这些构建体。最后,将构建体转化到根癌土壤杆菌中,并作为甘油储液存储。

[0250] 从土壤杆菌甘油储液,将一滴接种环的冷冻培养物接种到含有2ml YPD (100 μ g/ml 壮观霉素)的14ml无菌管中。将接种后的培养基在28 $^{\circ}$ C温育过夜,同时以200rpm震荡。翌日,将大约100 μ l培养物接种在含有25mlYPD (100 μ g/ml壮观霉素)的125ml无菌三隔挡板烧瓶(tri-baffled flask)中,并在28 $^{\circ}$ C下温育过夜,同时以200rpm振荡。第二天,用无菌的ddH₂O (pH 8.0)将培养物稀释至OD₆₀₀为0.5。将稀释的土壤杆菌菌株以1:1的比例与含有P19辅助蛋白的第二土壤杆菌菌株混合。使用该培养物通过下列文献中所述的方法浸润烟草叶片:Voinnet O,Rivas S,Mestre P,and Baulcombe D., (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19protein of tomato bushy stunt virus,The Plant Journal,33:949-956。将经过浸润的烟草植株置于Convicon™组件中,在16小时光照、24 $^{\circ}$ C下放置至少三天,直到测定。

[0251] 显微观察结果

[0252] 从植物切下经土壤杆菌浸润的烟草叶片,并置于含有水的培养皿(petri-dish)中防止脱水。通过蓝光激发,使用装配好长通滤光片(long-pass filter glasses)的Dark Reader Hand Lamp™(Clare Chemical Research Co.;Dolores,CO)并使用对经过浸润的烟草叶片进行观察,以鉴定成功表达YFP报告蛋白的叶片的未损伤区域。将具体鉴定的叶片区域从叶片切下,并置于水中,通过共聚焦显微镜(Leica TCS-SP5A0BS™;Buffalo Grove,IL)成像。YFP报告蛋白使用多谱线氩离子激光器用514nm激光谱线激发。使用一个无表达的(暗)对照叶片样品调节检测狭缝(slits)的宽度,以排除背景叶自发荧光。同时在另一个通道内收集叶绿素自发荧光,用于与确定叶绿体定位用的荧光报告蛋白的信号进行直接比较。

[0253] 显微镜成像的结果表明,包含TraP8或TraP9叶绿体转运肽的YFP荧光蛋白积累在位于烟草细胞细胞质中的叶绿体内,与之相比,对照YFP荧光蛋白不会转位到烟草细胞细胞质叶绿体内(图4和图5)。这些显微镜成像结果提示,YFP蛋白转位到叶绿体内是由于TraP8或TraP9叶绿体转运肽造成的。如图5和图6所示,YFP荧光信号被定位在叶绿体内,而叶绿体由于自发荧光在显微镜成像条件下还发红色荧光。相比之下,图7提供了用不含叶绿体转运肽的对照构建体pDAB101908浸润的烟草叶组织的显微图像。在显微镜成像条件下,该图像中的叶绿体仅由于自发荧光而显示红色荧光,而没有任何在TraP浸润的烟草细胞中所显示的YFP荧光信号。相反,对照烟草植物细胞中的YFP荧光在整个烟草植物细胞的细胞质中弥散表达。

[0254] Western印迹结果:

[0255] 通过Western印迹对经过浸润的烟草植物样品进行测定。收集叶冲孔(leaf punches)样品并进行球珠研磨。将大约100-200mg叶材料与2BBs(钢球)(Daisy;Rogers,AR)和500ml PBST在Kleco™珠磨机中混合3分钟。然后将样品在离心机中4 $^{\circ}$ C下以14,000x g离心沉降。移出上清液,直接通过Western印迹进行分析,或者进行免疫沉淀。免疫沉淀使用

Pierce Direct IP Kit™ (Thermo Scientific; Rockford, IL) 并按照制造商的方案进行。大约50μg抗-YFP被结合在树脂上。样品与树脂在4℃温育过夜。接着,次日早晨对样品进行清洗和洗脱,并通过与等体积的2X 8M尿素样品缓冲液混合后煮沸样品5分钟准备用于分析的样品。将煮沸过的样品在MOPS缓冲液中的4-12% SDS-Bis Tris凝胶上运行40分钟。然后,使用Invitrogen iBlot™ (Life Technologies; Carlsbad, CA) 按照制造商的方案对凝胶进行印迹。印迹过的膜用PBS-吐温溶液中5%的脱脂奶粉封闭10分钟。用PBS-吐温溶液中5%的脱脂奶粉以1:1000稀释第一抗体(兔单克隆抗-GFP),并用该第一抗体探测膜1小时。接着,用PBS-吐温将膜漂洗三次,每次5分钟,以除去所有未结合的第一抗体。用1:1000稀释的第二单克隆山羊抗兔抗体(Life Technologies)探测膜60分钟。如前所述地清洗膜,并通过添加Thermo BCIP/NBT底物进行显影。让比色底物显影5-10分钟,然后用水漂洗印迹,再令印迹干燥。

[0256] Western印迹结果表明,在被浸润的烟草细胞中表达了YFP蛋白。在pDAB101977和pDAB101978浸润的烟草植物叶组织中均表达了YFP蛋白,其表现是存在与YFP抗体反应的蛋白条带,并且该条带大小与从用YFP对照构建体浸润的烟草植物叶组织获得的YFP蛋白条带相当。而且,这些结果表明,TraP嵌合叶绿体转运肽被加工,并且从YFP蛋白切除。TraP8-YFP和TraP9-YFP构建体表达一个被前处理的蛋白条带,其分子量大于对照YFP蛋白。在Western印迹上存在与对照YFP大小相当的条带,表明该TraP8和TraP9叶绿体转运肽序列被加工,由此减少了YFP的大小,使其分子量大小与YFP对照相当。

[0257] 玉米原生质体瞬时测定

[0258] 将TraP8嵌合叶绿体转运肽编码多核苷酸序列(SEQ ID NO:5)和接头编码多核苷酸序列(SEQ ID NO:7)克隆在黄色荧光蛋白基因的上游,并且纳入到构建体pDAB106597(图7)中,用于通过玉米原生质体瞬时植物内测定法进行测试。所得的构建体含有单一植物转录单元(PTU)。第一个PTU包括玉米泛素1启动子(ZmUbi1启动子;Christensen, A., Sharrock R., and Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, Plant Molecular Biology, 18:675-689), TraP-黄色荧光蛋白融合基因(TraP8-YFP; 美国专利申请2007/0298412), 和玉米过氧化物酶5' 3'非翻译区(ZmPer5 3'UTR; 美国专利No.6384207)。该构建体通过限制酶消化和测序得到了确认。

[0259] 对玉米栽培种B104的种子在含有2~3滴吐温20的50%Clorox (3%次氯酸钠) 中剧烈震荡大约20分钟进行表面灭菌。将种子用无菌蒸馏水彻底漂洗。将无菌的种子点种在放有1/2MS培养基的Phytatrays或相似类型盒子中,并让它们在黑暗中(28℃)中生长12至20天。使用玉米原生质体瞬时测定法获得并转染来自B104-玉米叶片的原生质体。这种玉米原生质体测定法是下列文献所述系统的修改版本:Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J., (2007), Arabidopsis Mesophyll Protoplasts: A Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis, Nature Protocols, 2:1565-1572。溶液的制备如Yoo et.al. (2007)所述,只是用于下述实验的甘露醇浓度改为0.6M。

[0260] 100-500μl原生质体($1-5 \times 10^5$)的转染通过在室温下将原生质体加入到含有约40μg质粒DNA(pDAB106597)的2ml微量离心管中来完成。DNA的体积优选地保持为原生质体体积

的约10%。在5分钟的温育期间偶尔对原生质体和DNA进行混合。将等体积的PEG溶液缓慢加入到原生质体和DNA中,每次加2滴,在各次加PEG溶液之间的间隔进行混合。将试管再温育约10分钟,并偶尔轻轻混合。接着,加入1ml W5+溶液,并颠倒试管数次混匀。将管在4℃下75x g离心5分钟。最后除去上清液,并将沉淀物重悬浮于1ml WI溶液中,并将原生质体放置在小培养皿(35x 10mm)中或放置于6孔多孔平板中,并在室温下黑暗温育过夜。温育12小时后,通过显微镜观察YFP荧光。使用前述的显微镜条件进行成像。

[0261] 显微镜成像的结果表明,包含TraP8嵌合叶绿体转运肽的YFP荧光蛋白积累在玉米细胞细胞质中的叶绿体内,相比之下,对照YFP荧光蛋白不转位到玉米细胞细胞质叶绿体内(图8)。这些显微镜成像结果提示,YFP蛋白转位到叶绿体内是由于TraP8嵌合叶绿体转运肽造成的。

[0262] 实施例3:用于在拟南芥中表达农艺学上重要的转基因的嵌合叶绿体转运肽(TraP)序列

[0263] 大肠杆菌5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(EPSP合酶)中的一个单氨基酸突变(G96A)会导致草甘膦不敏感性(Padgett et al., (1991); Eschenburg et al., (2002); Priestman et al., (2005); Haghani et al., (2008))。尽管该突变会赋予对草甘膦的耐受性,但是它已知也会不利地影响EPSP合酶与其天然底物——磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的结合。由此造成的底物结合效率的改变可能会使得突变酶不适合于在植物内提供对草甘膦的耐受性。

[0264] 在计算机上对NCBI GenBank数据库筛选在EPSP合酶的与该酶的大肠杆菌版本中引入的G96A突变类似的位置上天然含有丙氨酸的EPSP合酶蛋白和多核苷酸序列(Padgett et al., (1991); Eschenburg et al., (2002); Priestman et al., (2005); Haghani et al., (2008))。

[0265] 一种被鉴定为在该位置含有天然丙氨酸的酶是来自斯维链霉菌(*Streptomyces sviveus*) ATCC29083的DGT-28 (GENBANK登录号NO:ZP_06917240.1)。进一步的计算机数据挖掘显示了3个另外的与DGT-28具有更大同源性的独特链霉菌酶:DGT-31 (GENBANK ACC NO:YP_004922608.1); DGT-32 (GENBANK ACC NO:ZP_04696613); 和DGT-33 (GENBANK ACC NO:NC_010572)。这些酶中的每一个都在EPSP合酶的与该酶的大肠杆菌形式中引入的G96A突变类似的位置上含有一个天然的丙氨酸。图1。

[0266] 因为来自不同生物体的EPSP合酶蛋白具有不同的长度,所以对大肠杆菌版本的EPSP合酶的突变编号不一定与对来自其它生物体的EPSP合酶的突变编号相对应。这些鉴定的EPSP合酶先前并未就其草甘膦耐受性或PEP底物亲和力被表征过。而且,这些EPSP合酶代表了一类新的EPSP合酶,且它们不含有任何已经被用于表征先前描述的I类(在美国专利No. RE39247中进一步描述的植物来源序列)、II类(在美国专利No. RE39247中进一步描述的细菌来源序列)、和III类(在国际专利申请WO 2006/110586中进一步描述的细菌来源序列)EPSP合酶的序列基序。

[0267] 对新型DGT-14, DGT-28, DGT-31, DGT-32和DGT-33酶的草甘膦耐受性和PEP底物亲和性进行了表征,并与I类EPSP合酶进行了比较。使用如下的I类酶进行比较:来自大豆的DGT-1,来自欧洲油菜的DGT-3 (GENBANK登录号NO:P17688),来自小麦的DGT-7 (GENBANK登录号NO:EU977181)。合成并评估了I类EPSP合酶及其突变变体。在植物EPSP合酶中导入的一个

突变是与该酶的大肠杆菌版本中的G96A突变的相似位置处导入的甘氨酸向丙氨酸的突变。此外,在如Funke et al., (2009)所述的大肠杆菌EPSP合酶的氨基酸97 (T变为I) 和氨基酸101 (P变为S) 的相似位置处,在这些I类EPSP合酶中引入了苏氨酸向异亮氨酸和脯氨酸向丝氨酸的突变。

[0268] DGT14:

[0269] 使用来自Clough and Bent (1998), Plant J. 16:735-743的花序浸渍法产生了含有与dgt-14转基因融合的TraP8和TraP9嵌合叶绿体转运肽的转基因的T₁拟南芥植物。获取转基因拟南芥植物并通过分子验证验证其含有转基因。用不同比率的草甘膦喷洒转基因植物。在本研究中采用了不同浓度的草甘膦比率的分布,其中包括高比率,用于确定耐受性的相对水平 (105, 420, 1, 680或3, 360g ae/ha)。草甘膦的典型1X田间使用比例为1, 120g ae/ha。本研究中使用的T₁拟南芥植物的dgt-14转基因拷贝数不同。通过分子确认方法鉴定低拷贝dgt-14T₁拟南芥植物,并自花受粉,用于产生T₂植物。表1示出了dgt-14转基因植物的耐受性,与包含草甘膦除草剂抗性基因dgt-1 (如美国专利申请号No. 12558351中描述的) 的对照植物进行比较。

[0270] 拟南芥T₁转化体首先用草甘膦筛选方案从未转化种子的背景中选择出来。为每个T₁构建体分析3个浅箱 (flat) 或30,000个种子。对选出的T₁植物进行分子表征,并随后将植物转移到单独的地块,并用如前所述的不同比例的商业草甘膦喷洒。这些植物的剂量响应应用处理2周后 (WAT) 的%目测损伤表示。下面表中提供的数据显示了展示很少或没有损伤 (<20%)、中等损伤 (20~40%) 或严重损伤 (>40%) 的各个植株。为每个用于拟南芥转化的构建体提供了算术平均和标准差。还在最后一列中对每个比率和转化示明了个体响应的范围。野生型,非转化的拟南芥 (哥伦比亚栽培种), 用作草甘膦敏感型对照。

[0271] 在T₁拟南芥植物中植物的响应水平有不同。该变差可能是由于这样的事实,即每株植物代表一个独立的转化事件,因此感兴趣的基因的拷贝数在每个植物之间有不同。表1中提供了按比率别的总群体损伤平均值,证明与dgt-1和非转化野生型对照相比,与TraP8v2或TraP9v2叶绿体转运肽连锁的每一个dgt-14构建体均提供了对不同比例草甘膦的耐受性。这些事件含有与TraP8v2 (SEQ ID NO:8) 连锁的dgt-14,其包含在构建体pDAB105526 (图9) 中,和与TraP9v2 (SEQ ID NO:9) 连锁的dgt-14,其包含在构建体pDAB105527 (图10) 中。来自对T₁植物的草甘膦选择的数据证明,当dgt-14与这些叶绿体转运肽连锁时,可以提供强的对高水平草甘膦的耐受性。相比之下,在用相似比率的草甘膦处理非转化的 (或野生型) 对照时,没有提供对高浓度草甘膦处理的耐受性。此外,有些情况下,显示含有3个或更多个拷贝的dgt-14的事件对高比例的草甘膦更加敏感。这可能是由于,拟南芥植物中存在的高拷贝数转基因导致转基因沉默或者表观遗传效应,结果虽然存在dgt-14转基因仍对草甘膦敏感。

[0272] 表1. dgt-14转化的T₁拟南芥对萌发后施用的一定范围的草甘膦比例的响应,与dgt-1 (T₂) 分离群体和非转化对照比较。施用后2周的目测%损伤

[0273]

TraP8 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105526)						
施用比例	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ac/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ac/ha 草甘膦	0	2	2	40.0	14.1	20-50
420 g ac/ha 草甘膦	3	0	1	23.8	31.5	0-70
1680 g ac/ha 草甘膦	0	1	3	66.3	28.4	25-85
3360 g ac/ha 草甘膦	3	0	1	26.5	42.5	0-90

TraP9 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105527)						
施用比率	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ac/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ac/ha 草甘膦	2	1	1	23.0	25.7	0-50
420 g ac/ha 草甘膦	2	0	2	37.5	37.7	0-70
1680 g ac/ha 草甘膦	2	0	2	48.8	39.0	15-85
3360 g ac/ha 草甘膦	1	0	3	63.8	39.2	5-85

<i>dgt-1</i> (pDAB3759)						
施用比率	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ac/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ac/ha 草甘膦	0	3	1	40.0	14.1	30-60
420 g ac/ha 草甘膦	0	4	0	30.0	0.0	30
1680 g ac/ha 草甘膦	0	3	1	55.0	30.0	40-100
3360 g ac/ha 草甘膦	0	0	4	57.5	8.7	45-65

非转化对照						
施用比率	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ac/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ac/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
420 g ac/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ac/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100

[0274]

3360 g ac/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
------------------	---	---	---	-------	-----	-----

[0275] 将鉴定为含有低拷贝数转基因插入(1-3个拷贝)的选定选T₁拟南芥植物自花受粉,产生第二代用于进一步的草甘膦耐受性评估。对于含有1-3个拷贝的与TraP8和TraP9嵌

合叶绿体转运肽融合的dgt-14转基因的第二代拟南芥植物(T₂),进一步表征它们的草甘膦耐受性和草胺膦耐受性(草胺膦抗性表明PAT表达盒是完整的,在T₁植物的自交期间没有经历重排)。在T₂代中,可以获得半合子和纯合子植物用于测试每个事件,因此将它们选用于每个测试的草甘膦比率。与在一个座位含有两个相同等位基因的纯合子植物相比,半合子植物在一个座位含有两个不同的等位基因。分子分析规程确认了T₂植物的拷贝数和倍性水平。类似地,使用如前所述的方法和比率施用草甘膦。植物的剂量响应以处理2周(WAT)后的%目测损伤为单位表示。将数据显示为展示很少或没有损伤(<20%)、中等损伤(20~40%)或严重损伤(>40%)的个体数的柱状图。为每个用于拟南芥转化的构建体提供了算术平均和标准差。还在最后一列中针对每种比率和转化示出了个体响应的范围。野生型,非转化的拟南芥(哥伦比亚栽培种),用作草甘膦敏感性对照。此外,还选用含有草甘膦除草剂抗性基因dgt-1的植物(如美国专利申请号No.12558351中所述)作为阳性对照。

[0276] 在T₂代中,同时对单拷贝和低拷贝(2-3个拷贝)的dgt-14事件表征了草甘膦耐受性。表2中提供的按比率别的总群体损伤平均值证明,与dgt-1和非转化野生型对照相比,与叶绿体转运肽连锁的每种dgt-14构建体都提供了对不同比率草甘膦的耐受性。T₂代事件含有与TraP8v2(pDAB105526)和TraP9v2(pDAB105527)连锁的dgt-14。这两个事件均对草甘膦高度抗性。结果表明,对于所用的全部浓度的草甘膦,T₂拟南芥植物的损伤范围均小于20%。相比之下,非转化的(或野生型)对照在用相似比率的草甘膦处理时,没有提供对高浓度草甘膦处理的耐受性。总之,这些结果显示,含有并表达与TraP8和TraP9嵌合转运肽蛋白融合的DGT-14的植物,对高达田间比率3倍的水平草甘膦(1120g ae/ha)产生了产业水平的抗性。

[0277] 表2.dgt-14转化的T₂拟南芥对萌发后施用的一定范围的草甘膦比率的响应,与dgt-1(T₂)分离群体和非转化对照比较。施用后2周的目测%损伤。数据代表来自每个构建体的所选单拷贝品系,该构建体在可遗传性筛选中作为单个座位分离。

[0278]

TraP8 v2::dgt-14 (pDAB105526)		%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率		<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	0.5	1.0	0-2
840 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	2.5	2.9	0-5
3360 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	5.0	4.8	0-10

[0279]

TraP9 v2::dgt-14 (pDAB105527)		%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率		<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha 草甘膦		4	0	0	1.8	2.4	0-5
3360 g ae/ha 草甘膦		2	2	0	17.5	17.6	0-35

[0280]

<i>dgt-1</i> (pDAB3759)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	2	0	2	40.0	40.4	5-75
840 g ae/ha 草甘膦	0	2	2	47.5	31.8	20-75
1680 g ae/ha 草甘膦	0	2	2	41.3	23.9	20-70
3360 g ae/ha 草甘膦	0	4	0	35.0	0.0	35

[0281]

非转化对照	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
840 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100

[0282] 将随机选择的、鉴定为含有低拷贝数转基因插入物(1-3个拷贝)的T₂拟南芥植物自花受粉,产生第三代,用于进一步的草甘膦耐受性评估。种植来自第三代(T₃)的拟南芥种子,并使用如前所述的相同方案评估草甘膦耐受性。在T₃代中测试的事件含有来自每个纯合品系(通过使用草甘膦抗性筛选鉴定是否任何后代植物显示转基因分离,加以确定)的重复。通过LC-MS-MS对这些事件进行测定,以确认植物表达DGT-14蛋白。表3提供的T₃代对各个草甘膦比率的总群体损伤平均值显示,每一个*dgt-14*构建体均提供了对不同比率草甘膦的耐受性。示例的抗性T₃代事件包含与TraP8v2 (pDAB105526)和TraP9v2 (pDAB105527)连锁的*dgt-14*。这两个事件均对草甘膦高度抗性。结果表明,对于所用的全部浓度的草甘膦,T₃拟南芥植物的损伤范围均小于20%。相比之下,非转化的(或野生型)对照在用相似比率的草甘膦处理时,没有提供对高浓度草甘膦处理的耐受性。总之,这些结果显示,含有并表达DGT-14的植物,对高达田间比率3倍水平的草甘膦(1120g ae/ha)产生了产业水平的抗性。

[0283] 表3.*dgt-14*转化的T₃拟南芥对萌发后施用的一定范围的草甘膦比率的响应,与*dgt-1* (T₂) 分离群体和非转化对照比较。施用后2周的目测%损伤。数据代表来自每个构建体的所选单拷贝品系,该构建体在可遗传性筛选中作为单个座位分离。

[0284]

TraP8 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105526)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	4.0	4.0	2-10

[0285]

TraP9 v2:: <i>dgt-14</i> (pDAB105527)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	4.3	1.5	2-5

[0286]

<i>dgt-1</i> (pDAB3759)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0

[0287]

420 g ae/ha 草甘膦	0	2	2	42.5	9.6	30-50
840 g ae/ha 草甘膦	0	4	0	40.0	0.0	40
1680 g ae/ha 草甘膦	0	3	1	47.5	15.0	40-70
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	77.5	17.1	60-100

[0288]

非转化对照	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
840 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100

[0289] 这些数据显示当被融合蛋白中的TraP转运肽导向到植物细胞的叶绿体中时,草甘膦抗性酶(例如DGT-28)的表达能够赋予该植物细胞以及包含该植物细胞的植物以草甘膦抗性。

[0290] DGT-28、DGT-31、DGT-32和DGT-33:

[0291] SEQ ID NO:16中列出了新设计的、双子叶植物优化的dgt-28v5多核苷酸序列。SEQ ID NO:17中列出了新设计的、双子叶植物优化的dgt-28v6多核苷酸序列;该序列进行了微小的修饰,在第二个氨基酸位置处包含一个丙氨酸,从而引入一个限制酶位点。所得的DNA序列具有更高层次的密码子多样性,理想的碱基组成,含有策略性设置的限制酶识别位点,并且不含可能会干扰基因转录或产物mRNA翻译的序列。

[0292] 由商业供应商(DNA2.0, Menlo Park, CA)合成了含有SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17的DNA片段,其含有额外的序列,例如6-终止框(全部6个阅读框中的终止密码子均被添加在编码序列的3'端),和一个用于克隆的5'限制位点。然后,如下面实施例所述地,将该人造的核酸分子克隆到表达载体中,并转化到植物或细菌中。

[0293] 使用相似的密码子优化策略设计了dgt-1, dgt-3v2 (G173A), dgt-3v3 (G173A;

P178S), dgt-3v4 (T174I;P178S), dgt-7v4 (T168I;P172S), dgt-32v3, dgt-33v3, 和 dgt-31v3。这些基因的密码子优化版本分别如SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22, SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, 和SEQ ID NO:25所列。

[0294] 植物双元表达载体 使用通用克隆方法构建入门载体,其含有一个与dgt-28对框融合的叶绿体转运肽多核苷酸序列。将含有与dgt-28融合的转运肽(TraP)的入门载体用IN-FUSION™ Advantage技术(Clontech, Mountain View, CA)进行组装。作为融合的结果,第一个氨基酸,甲硫氨酸,被从dgt-28中除去。用DNA2.0 (Menlo Park, CA) 分别合成转运肽TraP4v2 (SEQ ID NO:26), TraP5v2 (SEQ ID NO:27), TraP8v2 (SEQ ID NO:28), TraP9v2 (SEQ ID NO:29), TraP12v2 (SEQ ID NO:30), 和TraP13v2 (SEQ ID NO:31), 并融合于dgt-28的到唯一的AccI限制性核酸内切酶识别位点为止(含)的5'端片段。

[0295] 含有各种TraP和dgt-28表达盒的双元质粒由拟南芥泛素10启动子(AtUbi10v2; Callis, et al., (1990) J. Biol. Chem., 265:12486-12493) 驱动,并且侧翼是根癌土壤杆菌开放阅读框23的3'非翻译区(AtuORF233'UTR v1; U.S. Pat. No. 5,428,147)。

[0296] 使用GATEWAY®技术(Invitrogen, Carlsbad, CA) 构建组装的TraP和dgt-28表达盒,并通过土壤杆菌介导的植物转化将其转化进植物中。限制性核酸内切酶从New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) 获得,并使用T4DNA连接酶(Invitrogen) 进行DNA连接。使用GATEWAY®LRCLONASE®酶混合物(Invitrogen) 实施Gateway反应,以将一个入门载体组装到单一目标载体中,该目标载体含有一个选择标志物盒:木薯叶脉花叶病毒启动子(CsVMV v2; Verdaguer et al., (1996) Plant Mol. Biol., 31:1129-1139)-DSM-2(美国专利申请No. 2007/086813)-根癌土壤杆菌开放阅读框1的3'非翻译区(AtuORF13'UTR v6; Huang et al., (1990) J. Bacteriol. 172:1814-1822)。使用NUCLEOSPIN®质粒试剂盒(Macherey-Nagel Inc., Bethlehem, PA) 或质粒Midi试剂盒(Qiagen) 按照供应商的指导进行质粒制备。琼脂糖Tris-乙酸凝胶电泳后,使用QIAquick™凝胶提取试剂盒(Qiagen) 分离DNA片段。

[0297] 所有组装质粒的集落首先通过微量制备DNA的限制性消化进行筛选。将选定的集落的质粒DNA由商业测序公司(Eurofins™ MWG Operon, Huntsville, AL) 进行测序。使用SEQUENCHER™软件(Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI) 对序列数据进行组装和分析。

[0298] 下列双元构建体表达各种TraP:dgt-28融合基因序列:pDAB107527(图18) 含有TraP4v2:dgt-28v5 (SEQ ID NO:32); pDAB105530(图19) 含有TraP5v2:dgt-28v5 (SEQ ID NO:33); pDAB105531(图20) 含有TraP8v2:dgt-28v5 (SEQ ID NO:34); PDAB105532(图21) 含有TraP9v2:dgt-28v5 (SEQ ID NO:35); pDAB105533(图22) 含有TraP12v2:dgt-28v5 (SEQ ID NO:36); 且pDAB105534(图23) 含有TraP13v2:dgt-28v5 (SEQ ID NO:37)。对pDAB105534的dgt-28v5序列进行修饰,其中第一个密码子(GCA) 被变成(GCT)。

[0299] 其它植物双元载体构建 使用与上述相似的克隆策略构建含有dgt-31, dgt-32, dgt-33, dgt-1, dgt-3, 和dgt-7的双元质粒。

[0300] 如前所述地,将微生物来源的基因;dgt-31, dgt-32, 和dgt-33, 与不同的叶绿体转运肽融合。使用如下的叶绿体转运肽:TraP14v2 (SEQ ID NO:38), TraP23v2 (SEQ ID NO:39), TraP24v2 (SEQ ID NO:40)。pDAB107532(图24) 含有与TraP14v2 (SEQ ID NO:41) 融合的

dgt-32v3, pDAB107534 (图25) 含有与TraP24v2 (SEQ ID NO:42) 融合的dgt-33v3, pDAB107533 (图26) 含有与TraP23v2 (SEQ ID NO:43) 融合的dgt-31v3。dgt表达盒由拟南芥泛素10启动子 (AtUbi10启动子v2) 驱动, 并且侧翼是根癌土壤杆菌开放阅读框23的3' 非翻译区 (AtuORF233'UTR v1)。在二元载体中还存在一个DSM-2选择标志物盒, 其含有木薯叶脉花叶病毒启动子 (CsVMV v2) -DSM-2-根癌土壤杆菌开放阅读框1的3' 非翻译区 (AtuORF13'UTR v6)。

[0301] 构建了额外的二元载体, 其中dgt-31v3, dgt-32v3, 和dgt-33v3与前述的叶绿体转运肽序列融合。例如, TraP8v2序列与dgt-31v3、dgt-32v3和dgt-33v3融合, 并被如上所述地克隆到二元载体中。

[0302] 构建了含有I类基因 (dgt-1, dgt-3, 和dgt-7) 的二元载体。构建了如下的二元载体, 并转化进植物中: pDAB4104 (图27), 其含有如美国专利申请公开No. 2011/0124503所述的dgt-1v4序列, 侧翼是如美国专利申请公开No. 2009/0064376所述的烟草Osmotin序列; pDAB102715 (图28); pDAB102716 (图29); pDAB102717 (图30); 和pDAB102785 (图31)。为将与dgt-28, dgt-31, dgt-32, 和dgt-33融合的各种TraP叶绿体转运肽没有添加到I类基因, 因为这些植物来源的序列具有天然的叶绿体转运肽。这些载体在表4中有更详细的描述。

[0303] 表4. 含有I类EPSP合酶基因 (即, dgt-1, dgt-3, 或dgt-7) 的二元载体的描述

[0304]

名称	描述	EPSPS 突变
pDAB4104	RB7 MAR v2 :: CsVMV 启动子 v2 / NtOsm 5' UTR v2 / dgt-1 v4 / NtOsm 3' UTR v2 / AtuORF24 3' UTR v2 :: AtUbi10 启动子 v4 / pat v3 / AtuORF1 3'UTR v3 二元载体	TI PS
pDAB102715	AtUbi10 启动子 v2 / dgt-3 v2 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV 启动子 v2 / pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 二元载体	GA
pDAB102716	AtUbi10 启动子 v2 / dgt-3 v3 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV 启动子 v2 / pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 二元载体	GA PS
pDAB102717	AtUbi10 启动子 v2 / dgt-3 v4 / AtuORF23 3'UTR v1 :: CsVMV 启动子 v2 / pat v9 / AtuORF1 3'UTR v6 二元载体	TI PS
pDAB102785	AtUbi10 启动子 v2 / dgt-7 v4 / AtuORF23 3'UTR :: CsVMV 启动子 v2 / DSM-2 v2 / AtuORF1 3'UTR v6 二元载体	TI PS

[0305] 拟南芥转化 用Clough和Bent (1998) 所述的花序浸渍 (floral dip) 法转化拟南芥。使用含有上述二元质粒其中之一的选定土壤杆菌菌落接种一个或多个100mL含有壮观霉素 (100mg/L) 和卡那霉素 (50mg/L) 的YEP肉汤预培养物。将培养物在28℃并以225rpm恒定搅拌, 温育过夜。在室温下通过大约5000xg 10分钟离心沉淀细胞, 并弃去所得上清液。将细胞沉淀物轻柔重悬在含有5% (w/v) 蔗糖、10μg/L 6-苄基氨基嘌呤和0.04% Silwet™L-77的400mL浸渍培养基 (dunking media) 中。大约1个月大的植物被浸渍在培养基中5-10分钟, 并轻轻搅拌。将植物侧向放倒, 用透明或不透明的塑料袋覆盖2-3小时, 然后直立放置。使植物在22℃, 16小时光照/8小时黑暗的光周期中生长。浸渍后大约4周, 采收种子。

[0306] 被转化植物的筛选 新鲜采收的T₁种子 (含有dgt和DSM-2表达盒) 在室温干燥7天。将T₁种子播种在26.5x 51-cm发芽托盘 (germination tray) 中, 每个盘中装入200mg等份层积 (stratified) T₁种子 (~10,000个种子), 这些种子预先已混悬于40mL 0.1% 琼脂糖溶液

中并在4℃保存2天,以完成休眠要求并确保种子同步萌发。

[0307] 将Sunshine Mix LP5用细蛭石覆盖,并用Hoagland溶液从地下灌溉至湿润,然后通过重力排水。用移液器将每个40mL等份的层积种子均匀播种在蛭石上,并用保湿盖(humidity dome)覆盖4-5天。除去保湿盖1天后,利用草胺膦萌发后喷洒进行初始转化体筛选(筛选共转化的DSM-2基因)。

[0308] 在种植后7天(DAP)和11DAP,使用DeVilbiss压缩空气喷嘴用0.2%Liberty除草剂溶液(200g ai/L草胺膦,Bayer Crop Sciences,Kansas City,MO)喷洒T₁植物(分别为子叶期和2-4叶期),喷洒体积为10mL/盘(703L/ha),每个施用提供280g ai/ha有效比率的草胺膦。在最终喷洒4-7天后鉴定存活者(活跃生长的植物),并单独移植到用盆栽培养基(Metro Mix 360)准备的3英寸(7.62厘米)盆(pot)中。移植的植物用保湿盖覆盖3-4天,如前所述地置于22℃培养室中,或者直接转移到温室中。随后除去保湿盖,将植物在温室中培养(22±5℃,50±30%RH,14h光照:10黑暗,最低500μE/m²s⁻¹自然光+辅助光)。对存活的T₁植株进行分子确认分析,以确认草甘膦耐受基因已经被稳定整合到植物的基因组中。

[0309] 分子确认 确认了用pDAB107527,pDAB105530,pDAB105531,pDAB105532,pDAB105533,或pDAB105534转化的拟南芥植物的基因组中存在dgt-28和DSM-2转基因。这些多核苷酸序列的存在通过水解探针测定、基因表达盒PCR(也称作植物转录单元PCR—PTU PCR)、Southern印迹分析和定量反转录PCR分析得到了确认。

[0310] 首先通过一种与TAQMAN™类似的水解探针测定对T₁拟南芥植物进行筛选,确认DSM-2和dgt-28转基因的存在。通过基因表达盒PCR对事件进行筛选,以确定dgt表达盒是否完全整合到植物基因组中而没有重排。使用从这些研究所得的数据确定转基因拷贝数,并甄别选定的拟南芥事件,用于白花授粉和产生T₂代。对产生的T₂代拟南芥植物,也通过水解探针测定进行筛选,以确认植物染色体DSM-2和dgt基因的存在并估计拷贝数。最后,使用Southern印迹分析对T₁拟南芥植物中的一个子集确认估算的拷贝数。

[0311] 使用类似的测定法确认用pDAB4101转化的植物中dgt-1转基因的存在,用pDAB107532转化的植物中dgt-32转基因的存在,用pDAB107534转化的植物中dgt-33转基因的存在,用pDAB102715转化的植物中dgt-3转基因的存在,用pDAB102716转化的植物中dgt-3转基因的存在,用pDAB102717转化的植物中dgt-3转基因的存在,和用pDAB102785转化的植物中dgt-7转基因的存在。

[0312] 水解探针测定 使用下文所述的水解探针测定确定T₁和T₂拟南芥植物中的拷贝数。鉴定了具有不同数目的转基因的植物,并进行随后的草甘膦耐受性研究。

[0313] 将组织样品收集到96孔平板中,并冻干2天。用KLECO™组织粉碎机和钨珠(tungsten bead)(Environ Metal INC.,Sweet Home,Oregon)进行组织浸解(tissue maceration)。组织浸解后,使用Biosprint™96植物试剂盒(Qiagen™,Germantown,MD)根据制造商建议的方案以高通量格式分离基因组DNA。借助QUANT-IT™PICO GREEN DNA测定试剂盒(Molecular Probes,Invitrogen,Carlsbad,CA)对基因组DNA进行定量。将经过定量的基因组DNA用BIOROBOT3000™自动液体操作仪(Qiagen,Germantown,MD)调整到大约2ng/μL,用于水解探针测定。通过水解探针测定法确定转基因拷贝数的过程应用实时定量PCR来实现,实时定量PCR使用LIGHTCYCLER®480系统(Roche Applied Science,Indianapolis,IN)。为DSM-2,dgt-28和内参基因TAFII15(Genbank ID:NC 003075;Duarte et al.,(201)

BMC Evol.Biol.,10:61) 设计了测定法。

[0314] 为了扩增,准备1X终浓度的LIGHTCYCLER®480Probes Master Mix (Roche Applied Science),其在10 μ L体积的多重反应体系中含有每种DSM-2和dgt-28引物各0.1 μ M、每种TAFII15引物各0.4 μ M、和0.2 μ M每种探针。

[0315] 表5.实施两步扩增反应,60℃延伸40秒,同时进行荧光捕获。运行所有样品,并且对每个样品的分析使用平均循环阈值(Ct)值。使用LightCycler™软件1.5发布版进行实时定量PCR数据的分析,该分析使用相对定量模块(relative quant module),并且基于 $\Delta\Delta$ Ct方法。为此,每个运行中包含一个来自单拷贝校准品(calibrator)和已知的2拷贝检验标准(check)的基因组DNA样品。确定了T₁和T₂转基因拟南芥植物的水解探针筛选的拷贝数结果。

[0316] 表5.用于DSM-2,dgt-28和内参基因(TAFII15)水解探针测定的引物和探针信息

[0317]

引物名称	序列
DSM2A (SEQ ID NO:44)	5'AGCCACATCCCAGTAACGA 3'
DSM2S (SEQ ID NO:45)	5'CCTCCCTCTTTGACGCC 3'

[0318]

DSM2Cy5探针 (SEQ ID NO:46)	5'CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3'
DGT28F (SEQ ID NO:47)	5'CTTCAAGGAGATTGCGGATTGT 3'
DGT28R (SEQ ID NO:48)	5'GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
UPL154探针	Cat#04694406001 (Roche,Indianapolis,IN)
TAFFY-HEX探针 (SEQ ID NO:49)	5'AGAGAAGTTTCGACGATTTCGGGC 3'
TAFII15-F (SEQ ID NO:50)	5'GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3'
TAFII15-R (SEQ ID NO:51)	5'GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3'

[0319] 通过Southern印迹分析确认dgt-28的整合 使用Southern印迹分析证实了插入的T-链DNA片段的整合模式并鉴定含有dgt-28的事件。得到了展示拟南芥基因组中转基因插入物的整合和完整性的数据。使用Southern印迹数据鉴定了T-链DNA的一个完整拷贝的简单整合。使用一个PCR扩增的、特异针对dgt-28基因表达盒的探针进行了详细的Southern印迹分析。该探针与用特定限制性内切酶消化过的基因组DNA的杂交鉴定了具有特定分子量的基因组DNA片段,利用这些片段的模式鉴定全长、单插入的T₁转基因事件,以便用于产生下一代。

[0320] 将组织样品收集于2mL锥形管中(Eppendorf™)并冷冻干燥2天。用KLECKO™组织粉碎机和钨珠进行组织浸解。组织浸解后,用CTAB分离程序分离基因组DNA。基因组DNA进一步用Qiagen™ Genomic Tips试剂盒进行纯化。通过Quant-IT™ Pico Green DNA测定试剂盒(Molecular Probes,Invitrogen,Carlsbad,CA)对基因组DNA进行定量。将经过定量的基因组DNA调整到4 μ g以达到浓度一致。

[0321] 对于每个样品,用限制酶SwaI (New England Biolabs,Beverly,MA)完全消化4 μ g基因组DNA,并在25℃温育过夜,然后向反应中添加NsiI,并在37℃温育6小时。用Quick Precipitation Solution™ (Edge Biosystems,Gaithersburg,MD)根据制造商建议的规程,通过沉淀来浓缩经过消化的DNA。然后于65℃下将基因组DNA重悬于25 μ L水中1小时。将重悬

的样品加载到在1X TAE中制备的0.8%琼脂糖凝胶上,并在1X TAE缓冲液中以1.1V/cm电泳过夜。将凝胶依次进行变性(0.2M NaOH/0.6M NaCl) 30分钟,和中和(0.5M Tris-HCl (pH 7.5)/1.5M NaCl) 30分钟。

[0322] 使用色谱纸捻(wick)和纸巾将20X SSC缓冲液通过凝胶过夜被动吸取(wicking)到经过处理的IMMOBILON™ NY+转移膜(Millipore,Billerica,MA),以将DNA片段转移到尼龙膜上。转移后,将膜用2X SSC短暂地清洗,与STRATALINKER™1800(Stratagene,LaJolla,CA)交联,并在80℃真空烘烤3小时。

[0323] 使用Model 400杂交培养箱(Robbins Scientific,Sunnyvale,CA),在玻璃滚瓶中将印迹与预杂交液(Perfect Hyb plus,Sigma,St.Louis,MO)一起65℃温育1小时。从含有完整编码序列的PCR片段制备探针。使用QIAEX™ II凝胶提取试剂盒纯化PCR扩增子,并借助Random RT Prime IT™标记试剂盒(Stratagene,La Jolla,CA)用 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP对PCR扩增子进行标记。将变性探针直接添加到预杂交液中至大约200万计数每个印迹每mL,与印迹一起在65℃杂交过夜。杂交后,在65℃用0.1XSSC/0.1%SDS继续清洗印迹40分钟。最后,将印迹暴露于储磷光体成像屏,并利用Molecular Dynamics Storm860™成像系统成像。

[0324] 使用在本研究中完成的Southern印迹分析确定拷贝数,并确认含有dgt-28转基因的选定事件位于拟南芥的基因组中。

[0325] 通过PCR分析确认dgt-28基因表达盒 通过端点(end point)PCR反应检测在T₁植物事件中所含的dgt-28基因表达盒的存在。使用特异针对dgt-28基因表达盒的AtUbi10启动子v2和AtuORF233'UTR v1区的引物(表6)进行检测。

[0326] 表6.用于dgt-28基因表达盒确认的寡核苷酸引物

[0327]

引物名称	序列
正向寡核苷酸(SEQ ID NO:52)	5'CTGCAGGTCAACGGATCAGGATAT 3'
反向寡核苷酸(SEQ ID NO:53)	5'TGGGCTGAATTGAAGACATGCTCC 3'

[0328] PCR反应需要一个标准的3步PCR循环规程来扩增基因表达盒。所有PCR反应均使用下述的PCR条件完成:94℃3分钟,接着35个循环的94℃30秒,60℃30秒,和72℃3分钟。该反应用EX-TAQ™PCR试剂盒(TaKaRa Biotechnology Inc.Otsu,Shiga,Japan)按照制造商的说明完成。最后一个循环之后,将反应在72℃温育10分钟。使用TAE琼脂糖凝胶电泳确定PCR扩增子的大小。具有预期大小的PCR扩增子的存在,表明在转基因拟南芥事件的基因组中全长基因表达盒的存在。

[0329] 通过定量反转录PCR分析确认dgt-28相对转录 将dgt-28转基因植物的组织样品收集在96孔平板中,并冷冻于80℃。用KLECO™组织粉碎机和钨珠(Environ Metal INC., Sweet Home,Oregon)进行组织浸解。组织浸解后,使用Qiagen™ Rneasy 96试剂盒(Qiagen™,Germantown,MD)根据制造商建议的方案以高通量格式分离总RNA,该方案包括任选的柱上DNA酶I处理。随后对洗脱的总RNA进行额外的DNA酶I(Ambion™,Austin,TX)处理。使用总RNA作为模板并用High Capacity cDNA Reverse Transcription™试剂盒(Applied Biosystems,Austin,TX)按照制造商建议的方案,同时添加寡核苷酸TVN,进行cDNA合成。表达的定量用水解探针测定来实施,且使用LIGHTCYCLER®480系统(Roche Applied Science,Indianapolis,IN)通过实时定量PCR来进行。使用LIGHTCYCLER®探针设计软

件2.0,为dgt-28和内参基因“未知蛋白”(GenBank登录号:AT4G24610)设计了测定法。为了扩增,以1X终浓度准备LIGHTCYCLER[®]480Probe Master Mix (Roche Applied Science),其在10 μ L体积的多重反应体系中含有每种引物各0.4 μ M和每种探针各0.2 μ M。表7。

[0330] 表7.用于dgt-28定量反转录PCR分析的PCR引物

[0331]

引物名称	序列
AT26410LP (SEQ ID NO:54)	5'CGTCCACAAAGCTGAATGTG 3'
AT26410RP (SEQ ID NO:55)	5'CGAAGTCATGGAAGCCACTT3'
UPL146	Cat#04694325001 (Roche, Indianapolis, IN)
DGT28F (SEQ ID NO:56)	5'CTTCAAGGAGATTTGGGATTTGT3'
DGT28R (SEQ ID NO:57)	5'GAGGGTCGGCATCGTAT 3'
UPL154探针	Cat#04694406001 (Roche, Indianapolis, IN)

[0332] 实施两步扩增反应,60℃延伸40秒,并进行荧光捕获。所有样品运行3个重复,使用平均循环阈值(Ct)值分析每个样品。每个样品运行负逆转录反应(minus reverse transcription),以确保不存在gDNA污染。基于 $\Delta\Delta$ Ct方法分析实时定量PCR数据分析。利用该测定确定了dgt-28在转基因拟南芥事件(确定为半合和纯合)中的相对表达。dgt-28mRNA的相对转录水平比内部对照高2.5-207.5倍。这些数据表明,dgt-28转基因植物含有功能性dgt-28基因表达盒,并且植物能够转录dgt-28转基因。

[0333] Western印迹分析 在从转基因拟南芥植物获得的叶片样品中检测DGT-28。将来自dgt-28转基因植物的植物提取物和DGT-28蛋白标准品用含有DTT的NUPAGE[®]LDS样品缓冲液(Invitrogen, Carlsbad, CA)在90℃温育10分钟,并在丙烯酰胺预制胶中电泳分离。然后,使用制造商的方案将蛋白质电转移到硝酸纤维素膜上。用WESTERNBREEZE[®]封闭混合物(Invitrogen)封闭后,先后用抗-DGT-28抗血清和山羊抗兔磷酸酶检测DGT-28蛋白。通过化学发光底物BCIP/NBT Western分析试剂(KPL, Gaithersburg, MD)将被检测的蛋白可视化。Western印迹产生完整DGT-28蛋白,表明接受测定的dgt-28转基因植物表达了DGT-28蛋白。

[0334] 用不同比率的草甘膦喷洒含有dgt-28转基因的转基因T₁拟南芥植物。在本研究中采用高比率确定相对抗性水平(105,420,1,680或3,360g ae/ha)。会控制未转化的拟南芥的典型草甘膦1X田间使用比率是1120g ae/ha。用校准为187L/ha的履带式喷洒器将加有硫酸铵的草甘膦配制剂施用于T₁植物。本研究使用的各T₁拟南芥植物在dgt-28转基因的拷贝数上有变化。将低拷贝dgt-28T₁拟南芥植物自花授粉,并用于产生T₂植物。表8显示了具有草甘膦除草剂抗性基因的dgt-28转基因植物与dgt-1和野生型对照的比较。表9显示了具有草甘膦除草剂抗性基因的dgt-32和dgt-33与dgt-1和野生型对照的比较。表10显示了新型细菌EPSP合酶与I类EPSP合酶及对照在1,680g ae/ha草甘膦比率下的比较。

[0335] 转化有dgt-28的拟南芥植物的草甘膦选择结果 首先使用草胺膦筛选方案从非转化种子的背景中选出拟南芥T₁转化体。对每种T₁构建体分析3个浅箱或30,000个种子。对上面选出的T₁植物进行分子表征,随后将不同拷贝数的代表性植物转移到单独的浅箱,并用如前所述的不同比率的商业草甘膦喷洒。以处理2周后(WAT)的%目测损伤为单位表示这些

植物的响应。下面的表中提供的数据显示了展示很少或没有损伤 (<20%)、中等损伤 (20~40%) 或严重损伤 (>40%) 的植株个体数。为每种用于拟南芥转化的构建体提供了算术平均和标准差。还在最后一列中针对每种比率和转化示出了个体响应的范围。野生型, 非转化的拟南芥 (哥伦比亚栽培种), 用作草甘膦敏感性对照。

[0336] 植物的响应水平存在差异。该变差可能是由于以下的事实, 即每株植物代表一个独立的转化事件, 因此感兴趣的基因的拷贝数在每个植物之间有不同。我们注意到, 一些含有转基因的植物对草甘膦不耐受; 关于确定这些植物是否表达转基因的彻底分析尚未完成。很可能是, T₁拟南芥植物中存在的高拷贝数转基因会导致转基因沉默或者表现遗传效应, 结果导致虽然存在dgt-28转基因, 但仍对草甘膦敏感。

[0337] 表10中提供的按比率别的总群体损伤平均值中对于1,680g ae/ha比率的草甘膦的数值证明, 用dgt-3, dgt-7, dgt-28, dgt-32, 和dgt-33转化的植物与dgt-1和野生型对照相比有显著差异。

[0338] 由新的细菌EPSP合酶提供的耐受性随着具体的酶而不同。DGT-28、DGT-32和DGT-33出人意料地提供了对草甘膦显著的耐受性。dgt基因可以为具有所有测试转运肽中任意一种的单个T₁拟南芥植物赋予除草剂抗性。因此, 使用额外的叶绿体转运肽 (即TraP8-dgt-32或TraP8-dgt-33) 可以提供对草甘膦的保护, 在给定的处理中具有与报道相似的损伤水平。

[0339] 表8. dgt-28转化的T₁拟南芥对萌发后施用的一定范围草甘膦比率的响应, 与dgt-1 (T₄) 纯合抗性群体和非转化对照比较。施用后14天的目测%损伤。

[0340]

pDAB107527: TraP4 v2 -- dgt-28 v5				%损伤		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	3.8	7.5	0-15
420 g ae/ha 草甘膦	2	1	1	28.8	28.1	0-65
1680 g ae/ha 草甘膦	0	2	2	55.0	26.8	35-85
3360 g ae/ha 草甘膦	0	2	2	43.8	18.0	30-70
pDAB105530: TraP5 v2 -- dgt-28 v5				%损伤		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	6	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	2	2	2	39.3	37.4	8-100
420 g ae/ha 草甘膦	1	4	1	33.0	26.6	8-85
1680 g ae/ha 草甘膦	0	4	2	47.5	27.5	25-85
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	6	76.7	13.7	50-85
pDAB105531: TraP8 v2 -- dgt-28 v5				%损伤		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	6	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	2	2	2	39.3	37.4	8-100
420 g ae/ha 草甘膦	1	4	1	33.0	26.6	8-85
1680 g ae/ha 草甘膦	0	4	2	47.5	27.5	25-85
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	6	76.7	13.7	50-85

[0341]

平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	3	1	0	10.8	10.4	0-25
420 g ae/ha 草甘膦	3	0	1	22.8	18.6	8-50
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	5.3	3.8	0-8
3360 g ae/ha 草甘膦	0	4	0	29.3	6.8	22-35
pDAB105532: TraP9 v2 -- dgt-28 v5						
	%损伤			%损伤		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	3	0	1	17.5	28.7	0-60
420 g ae/ha 草甘膦	1	1	2	39.5	25.1	18-70
1680 g ae/ha 草甘膦	3	0	1	26.3	36.1	5-80
3360 g ae/ha 草甘膦	3	0	1	25.8	32.9	8-75
pDAB105533: TraP12 v2 -- dgt-28 v5						
	%损伤			%损伤		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	5	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	4	1	0	10.0	10.0	0-25
420 g ae/ha 草甘膦	1	1	3	53.6	34.6	8-85
1680 g ae/ha 草甘膦	4	1	0	11.0	8.2	0-20
3360 g ae/ha 草甘膦	0	2	3	55.0	25.5	25-80
pDAB105534: TraP13 v2 -- dgt-28 v5						
	%损伤			%损伤		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	5	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	4	0	1	14.0	20.6	0-50
420 g ae/ha 草甘膦	3	1	1	17.6	19.5	0-50
1680 g ae/ha 草甘膦	3	0	2	39.0	47.1	5-100
3360 g ae/ha 草甘膦	2	2	1	31.2	22.3	18-70
pDAB4104: dgt-1 (转化对照)						
	%损伤			%损伤		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	5	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	80.0	0.0	80
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	80.0	0.0	80
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	80.0	0.0	80
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	81.3	2.5	80-85

[0342]

WT (非转化对照)	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	5	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100

[0343] 表9.dgt-32和dgt-33转化的T₁拟南芥对萌发后施用的一定范围草甘膦比率的响应,与dgt-1 (T₄) 纯合抗性群体和非转化对照比较。施用后14天的目测%损伤。

[0344]

pDAB107532: TraP14 v2 - dgt-32 v3	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	2	0	2	30.0	29.4	0-60
1680 g ae/ha 草甘膦	3	0	1	17.5	21.8	5-50
3360 g ae/ha 草甘膦	0	3	1	35.0	30.0	20-80
pDAB107534: TraP24 v2 -- dgt-33 v3	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	2	2	0	21.3	14.9	5-40
420 g ae/ha 草甘膦	1	1	2	46.3	30.9	5-70
1680 g ae/ha 草甘膦	1	0	3	62.5	38.8	5-90
3360 g ae/ha 草甘膦	1	0	3	62.0	36.0	8-80
pDAB4104: dgt-1 (转化对照)	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	0	2	3	42.5	15.0	20-50
420 g ae/ha 草甘膦	0	1	2	38.8	11.1	25-50
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	79.0	19.4	50-90
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	50.0	0.0	50
WT (非转化对照)	%损伤			%损伤		

[0345]

平均值	<20%	20-40%	>40%		平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0		0.0	0.0	0
105 g ae/ha 草甘膦	0	0	4		85.0	0.0	85
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4		100.0	0.0	100
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4		100.0	0.0	100
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4		100.0	0.0	100

[0346] 表10. dgt-28, dgt-32, dgt-33, dgt-3和dgt-7转化的T₁拟南芥对萌发后施用1, 680g ae/ha草甘膦的响应, 与dgt-1 (T₄) 纯合抗性群体和非转化对照比较。施用后14天的目测%损伤。

[0347]

			%损伤			%损伤		
			<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
细菌酶	pDAB107527	TraP4 v2 -- dgt-28 v5	0	2	2	55.0	26.8	35-85
	pDAB105530	TraP5 v2 -- dgt-28 v5	0	4	2	47.5	27.5	25-85
	pDAB105531	TraP8 v2 -- dgt-28 v5	4	0	0	5.3	3.8	0-8
	pDAB105532	TraP9 v2 -- dgt-28 v5	3	0	1	26.3	36.1	5-80
	pDAB105533	TraP12 v2 -- dgt-28 v5	4	1	0	11.0	8.2	0-20
	pDAB105534	TraP13 v2 -- dgt-28 v5	3	0	2	39.0	47.1	5-100
	pDAB107532	TraP14 v2 -- dgt-32 v3	3	0	1	17.5	21.8	5-50
	pDAB107534	TraP24 v2 -- dgt-33 v3	1	0	3	62.5	38.8	5-90
I类酶	pDAB102715	dgt-3 v2	4	0	3	42	48	0-100
	pDAB102716	dgt-3 v3	2	0	1	14	23	0-40
	pDAB102717	dgt-3 v4	3	2	1	28	35	10-100
	pDAB102785	dgt-7 v4	0	1	1	45	21	30-60
	pDAB4104	dgt-1 (转化对照)	0	0	4	80.0	0.0	80
	--	WT (非转化对照)	0	0	4	100.0	0.0	100

[0348] dgt-28作为选择标志物 使用如上所述的拟南芥转化植物测试dgt-28作为草甘膦筛选剂的选择标志物。将大约50个T₄代拟南芥种子(对dgt-28是纯合的) 掺杂(spiked into) 到大约5,000个野生型(对草甘膦敏感) 种子中。萌发种子, 并用筛选剂量的草甘膦喷洒幼苗。比较数个草甘膦处理; 对每盘(tray) 植物在如下的处理方案之一中的1个或2个时间应用草甘膦: 7DAP(种植后天数)、11DAP、或7DAP及11DAP。因为所有植物还含有一个置于同一转化载体内的草胺膦抗性基因, 用草甘膦选出的含dgt-28的植物可以与用草胺膦选出的含DSM-2或pat的植物直接进行比较。

[0349] 如前所述地用DeVilbiss™喷头施用草胺膦处理。在17DAP, 含有dgt-28的转基因植

物被鉴定为“抗性”或“敏感性”。种植后7和11天(DAP)施用26.25-1680g ae/ha草甘膦处理,显示可以有效筛选含有dgt-28的转基因拟南芥植物。计数敏感性和抗性植物,发现草甘膦抗性植物的数目与所种植的含有dgt-28转基因的转基因种子的原始数目相关。这些结果表明,dgt-28可以有效地用针对经转化的拟南芥群体的一种替代的筛选标志物。

[0350] 可遗传性 将已确认的T₁转基因拟南芥事件自花授粉,产生T₂种子。通过向100颗随机的T₂同胞(sibling)施用含有草胺膦(200g ae/ha)的Ignite™除草剂,对这些种子的同胞进行测试。在施用喷洒(用履带式喷洒器以187L/ha比率施用)之前,将每个单独的T₂植物移植到7.5-cm方盆中。通过卡方分析(P>0.05)确定了按照孟德尔遗传以预期对于显性遗传单座位的3耐受性:1敏感性模式分离的T₁家族(T₂植物)。表11示出了以预期孟德尔遗传分离的T₁家族的百分比,证明dgt-28性状是通过孟德尔遗传传递给T₂代的。从5-15个T₂个体收集种子(T₃种子)。如前所述地对来自3-4个随机选择T₂家族中每一个的25个T₃同胞进行后代测试。数据显示没有分离,因此证明dgt-28和dgt-3被稳定整合在染色体内,并以孟德尔方式遗传至少3代。

[0351] 表11. 在100株植物的后代试验中作为单个孟德尔遗传分离的T₁家族(T₂植物)的百分比

[0352]

感兴趣的基因	在1个座位分离的测试T ₁ 家族(%)
dgt-3v2	64%
dgt-3v3	60%
dgt-3v4	80%
dgt-7v4	63%
TraP5v2-dgt-28v5	100%
TraP8v2-dgt-28v5	100%
TraP9v2-dgt-28v5	100%

[0353]

TraP12v2-dgt-28v5	50%
TraP13v2-dgt-28v5	75%
yfp转基因对照植物	100%

[0354] T₂拟南芥数据 对含有低拷贝数dgt-28转基因的所选T₁拟南芥事件的第二代植物(T₂)进行进一步的草甘膦耐受性表征。草甘膦的施用如前所述。用处理2周后(WAT)的%目测损伤表示植物响应。数据用展示很少或没有损伤(<20%)、中等损伤(20-40%)或严重损伤(>40%)的个体数的柱状图表示。为每个用于拟南芥转化的构建体提供了算术平均和标准差。还在最后一列中针对每种比率和转化示出了个体响应的范围。野生型,非转化的拟南芥(哥伦比亚栽培种),用作草甘膦敏感性对照。在T₂代中,可以获得半合子和纯合子植物用于测试每个事件,因此每个草甘膦测试比率都包括了这些植物。半合子植物在一个座位含有两个不同的等位基因,相比之下,纯合子植物在一个座位含有两个相同的等位基因。由于半合子和纯合子植物相比在基因剂量上的差异,导致T₂代中预期存在对草甘膦响应的差异性。对草甘膦响应的差异性用标准差和响应范围表示。

[0355] 在T₂代中,对单拷贝和多拷贝dgt-28事件均表征其草甘膦耐受性。在一个事件内,

各单拷贝植物显示相似的草甘膦耐受性。表12提供了单拷贝T₂事件的特征数据。含有与TraP5v2连锁的dgt-28的事件与含有其它TraP转运肽的dgt-28构建体相比,没有提供对草甘膦的强抗性。然而,与非转化的哥伦比亚对照相比,dgt-28TraP5构建体确实提供了低水平的草甘膦耐受性。有的情况下,显示含有2个或多个拷贝的dgt-28的事件对高比率的草甘膦更加敏感(数据未显示)。这种对草甘膦敏感性的增加与先前关于对同样含有高拷贝数dgt-28转基因的T₁植物的描述数据相似。这可能是由于,拟南芥植物中存在的高拷贝数转基因会导致转基因沉默或者表观遗传效应,结果导致虽然存在dgt-28转基因,但仍对草甘膦敏感。

[0356] 这些事件含有与TraP5v2 (pDAB105530), TraP12v2 (pDAB105533) 和TraP13v2 (pDAB105534) 连锁的dgt-28。

[0357] 除了dgt-28之外,表13还提供了用dgt-3转化的T₂拟南芥事件。与表12中关于dgt-28事件所述的一样,该数据表含有一个代表性事件,其是每个构建体对草甘膦的响应特征。为了表征dgt-3,对含有受AtUbi10启动子驱动的dgt-3基因的单个PTU(植物转录单元)的构建体(pDAB102716,图29和pDAB102715,图28),与含有该相同基因2个PTU的构建体(pDAB102719,图32;pDAB102718,图33)进行比较。含有2个PTU的构建体使用AtUbi10启动子驱动基因的一个拷贝,并使用CsVMV启动子驱动另一个拷贝。使用两个PTU是为了比较dgt-3转基因植物和含有两个转基因拷贝的dgt-28转基因植物。数据证明,仅含有一个单PTU的单拷贝T₂dgt-3事件比所测试的单拷贝dgt-28事件对草甘膦更敏感,但是比非转化对照更耐受。含有dgt-3基因的2个PTU的T₁家族比1个PTU的构建体提供了更高水平的目测草甘膦耐受性。在两种情况下,T₁家族均与dgt-1和野生型对照进行比较。T₂数据证明,dgt-28作为单拷贝事件提供了强耐受性。

[0358] 表12. 含有dgt-28的所选单个T₂拟南芥事件对以不同比率萌发后施用的草甘膦的响应,与dgt-1 (T₄) 纯合抗性群体和非转化对照比较。施用后14天的目测%损伤

[0359]

pDAB105530: TraP5 v2 - <i>dgt-28</i> v5	%损伤			%损伤		
1 个拷贝	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	75.0	17.8	50-90
840 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	80.0	20.0	50-90
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	75.0	10.8	60-85
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	76.3	4.8	70-80
pDAB105531: TraP8 v2 - <i>dgt-28</i> v5	%损伤			%损伤		
1 个拷贝	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.5	1.0	0-2
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	7.5	5.0	5-15
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	7.5	6.5	0-15
pDAB105532: TraP9 v2 - <i>dgt-28</i> v5	%损伤			%损伤		
1 个拷贝	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	2.0	4.0	0-8
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	9.0	2.0	8-12

[0360]

1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	7.3	4.6	2-12
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	11.0	1.2	10-12
pDAB105533: TraP12 v2 - <i>dgt-28</i> v5						
	%损伤			%损伤		
1 个拷贝	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
3360 g ae/ha 草甘膦	3	1	0	13.3	7.9	8-25
pDAB105534: TraP13 v2 - <i>dgt-28</i> v5						
	%损伤			%损伤		
1 个拷贝	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	3	1	0	5.0	10.0	0-20
840 g ae/ha 草甘膦	3	1	0	5.0	10.0	0-20
1680 g ae/ha 草甘膦	2	2	0	10.0	11.5	0-20
3360 g ae/ha 草甘膦	2	2	0	15.0	12.2	5-30
WT (非转化对照)						
	%损伤			%损伤		
	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
840 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
pDAB4104: <i>dgt-1</i> (转化对照)						
	%损伤			%损伤		
1 个拷贝	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	0	4	0	37.5	2.9	35-40
840 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	45.0	0.0	45
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	47.5	2.9	45-50
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	50.0	0.0	50

[0361] 表13. 用*dgt-3*转化的所选T₂拟南芥事件对以不同比率萌发后施用的草甘膦的响应。施用后14天的目测%损伤

[0362]

pDAB102716: <i>dgt-3</i> v3 (1 PTU)	%损伤	%损伤
-------------------------------------	-----	-----

[0363]

1 拷贝分离	<20%	20-40%	>40%		平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0		0	0	0
420 g ae/ha 草甘膦	1	1	2		39	25	15-65
840 g ae/ha 草甘膦	0	2	2		50	23	30-70
1680 g ae/ha 草甘膦	0	1	3		69	19	40-80
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4		79	6	70-85

[0364]

pDAB102719: <i>dgt-3 v3</i> (2 PTU)	%损伤				%损伤		
1 拷贝分离	<20%	20-40%	>40%		平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0		0	0	0
420 g ae/ha 草甘膦	0	4	0		20	0	20
840 g ae/ha 草甘膦	0	3	1		38	5	35-45
1680 g ae/ha 草甘膦	3	1	0		15	7	10-25
3360 g ae/ha 草甘膦	2	2	0		21	8	15-30

[0365]

pDAB102715: <i>dgt-3 v2</i> (1 PTU)	%损伤				%损伤		
1 拷贝分离	<20%	20-40%	>40%		平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0		0	0	0
420 g ae/ha 草甘膦	2	2	0		26	16	10-40
840 g ae/ha 草甘膦	0	2	2		55	17	40-70
1680 g ae/ha 草甘膦	0	2	2		56	22	35-75
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4		65	17	50-80

[0366]

pDAB102718: <i>dgt-3 v2</i> (2 PTU)	%损伤				%损伤		
1 拷贝分离	<20%	20-40%	>40%		平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0		0	0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0		5	7	0-15
840 g ae/ha 草甘膦	2	2	0		23	10	15-35
1680 g ae/ha 草甘膦	3	0	1		20	20	5-50
3360 g ae/ha 草甘膦	1	1	2		36	22	15-60

[0367] T₃拟南芥数据 对含有低拷贝数*dgt-28*转基因的所选T₂拟南芥事件的第三代植物(T₃)进行进一步的草甘膦耐受性表征。草甘膦的施用如前所述。如前所述用草铵膦选出了二十五个品系,且来自测试的每一种构建体的各品系就选择标志物基因而言没有发生分离。用处理2周后(WAT)的%目测损伤为单位表示植物响应。数据用展示很少或没有损伤(<20%)、中等损伤(20-40%)或严重损伤(>40%)的个体的柱状图表示。为每个用于拟南芥转化的构建体提供了算术平均和标准差。还在最后一列中针对每种比率和转化示出了个体响应的范围。野生型,非转化的拟南芥(哥伦比亚栽培种),用作草甘膦敏感性对照。

[0368] 表14. 含有*dgt-28*的所选单个T₃拟南芥事件对以不同比率萌发后施用的草甘膦的响应,与*dgt-1*(T₄)纯合抗性群体和非转化对照比较。施用后14天的目测%损伤

[0369]

<i>dgt-28</i> (pDAB107602)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	73.8	2.5	70-75
840 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	71.3	7.5	60-75
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	77.5	2.9	75-80
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	77.5	2.9	75-80

[0370]

TraP4:: <i>dgt-28</i> (pDAB107527)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	5.0	0.0	5
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	10.0	0.0	10
3360 g ae/ha 草甘膦	1	3	0	18.8	2.5	15-20

[0371]

TraP5 v1:: <i>dgt-28</i> (pDAB102792)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	3	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha 草甘膦	3	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha 草甘膦	3	0	0	6.0	1.7	5-8
3360 g ae/ha 草甘膦	2	0	0	6.5	2.1	5-8

[0372]

TraP5 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105530)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	6.0	1.7	5-8
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	8.0	0.0	8
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	14.3	1.5	12-15
3360 g ae/ha 草甘膦	1	3	0	18.7	2.5	15-20

[0373]

TraP8 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105531)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	2.5	5.0	0-10
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	3.3	3.9	0-8
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	2.5	2.9	0-5
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	7.3	6.4	2-15

[0374]

TraP9 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105532)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	1.3	2.5	0-5
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	1.8	2.4	0-5
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	10.0	4.4	5-15

[0375]

TraP12 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105533)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	3.8	7.5	0-15
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	6.3	4.8	0-10

[0376]

TraP13 v2:: <i>dgt-28</i> (pDAB105534)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	2	2	0	10.0	11.5	0-20
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	2.8	1.5	2-5
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	8.0	0.0	8

[0377]

TraP23:: <i>dgt-28</i> (pDAB107553)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1680 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	7.8	2.1	5-10
3360 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	10.8	3.0	8-15

[0378]

WT (无转化对照)	%损伤范围(重复数)			%损伤分析		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
840 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha 草甘膦	0	0	4	100.0	0.0	100

[0379] 转化植物的筛选 将新鲜采收的T₁种子[dgt-31, dgt-32, 和dgt-33v1基因]在室温下干燥, 并运输到印第安纳波利斯进行测试。将T₁种子播种在26.5x 51-cm发芽托盘(T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN)中, 每盘接收200mg等份的层积(stratified)T₁种子(~10,000个种子), 这些种子先前已经被混悬于40mL 0.1%琼脂糖溶液中并在4℃保存2天, 以完成休眠要求并确保种子同步萌发。

[0380] 将Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA)用细蛭石覆盖, 并用Hoagland溶液从地下灌溉至湿润, 然后通过重力排水。用移液器将每个40mL等份的层积种子均匀播种在蛭石上, 并用保湿盖(KORD™ Products, Bramalea, Ontario, Canada)覆盖4-5天。一旦植物萌发即除去保湿盖, 然后用草胺膦萌发后喷洒进行初始转化体筛选(筛选共转化的dsm-2基因)。

[0381] 在种植后6天(DAP)和10DAP, 使用DeVilbiss压缩空气喷嘴用0.1%IGNITE™除草剂溶液(280g ai/L草胺膦, Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO)喷洒T₁植物(分别为子叶期和2-4叶期), 喷洒体积为10mL/盘(703L/ha), 提供每次施用200g ae/ha有效比率的草胺膦。在最终喷洒4-7天后鉴定存活者(植物生长活跃者)。将存活的植物单独移植到用盆栽培养基(Metro Mix360™)准备的3英寸(7.62厘米)盆(pot)中。在组织采样用于拷贝数分析之前, 植物在温室中培养至少1天。

[0382] 对T₁植物采样, 并完成对dgt-31, dgt-32, 和dgt-33v1基因的拷贝数分析。然后, 对T₁植物分配至各种比率的草甘膦, 使得每个比率均涵盖一定范围的拷贝。对于拟南芥, 26.25g ae/ha草甘膦是用于区分敏感性植物与具有有意义抗性水平的植物的有效剂量。施用更高的比率, 用于确定相对抗性水平(105, 420, 1680, 或3360g ae/ha)。表15显示了关于dgt-1的比较

[0383] 所有草甘膦除草剂施用均用履带式喷洒器以187L/ha喷洒体积完成。所用草甘膦是商业Durango二甲胺盐制剂(480g ae/L, Dow AgroSciences, LLC)。对显示草胺膦或草甘

膦耐受性的低拷贝T₁植物进一步在T₂代中进行评估。

[0384] 第一次拟南芥转化用dgt-31, dgt-32, 和dgt-33v1实施。首先用草胺膦筛选方案将T₁转化体从未转化种子的背景中选择出来。为每个T₁构建体分析3个浅箱(flat)或30,000个种子。计算了转化频率, 并且表15列出了T1dgt-31, dgt-32, 和dgt-33构建体的结果。

[0385] 表15. T1dgt-31, dgt-32和dgt-33拟南芥构建体的转化频率, 用草胺膦选择选择标志物基因DSM-2

[0386]

构建体	盒	转化频率(%)
pDAB107532	AtUbi10/TraP14dgt-32v1	0.47
pDAB107533	AtUbi10/TraP23dgt-31v1	0.36
pDAB107534	AtUbi10/TraP24dgt-33v1	0.68

[0387] 随后将上面选出的T₁植物移植到单独的盆中, 并用各种比率的商业草甘膦喷洒。表16比较了为拟南芥T₁转化体赋予草甘膦抗性的dgt-31, dgt-32, 和dgt-33v1和对照基因的响应。植物响应用2WAT的%目测损伤为单位表示。数据用展示很少或没有损伤(<20%)、中等损伤(20-40%)或严重损伤(>40%)的个体的柱状图表示。为每个用于拟南芥转化的构建体提供了算术平均和标准差。还在最后一列中针对每种比率和转化示出了个体响应的范围。野生型非转化的拟南芥(哥伦比亚栽培种)用作草甘膦敏感性对照。与阴性对照相比, 具有转运肽TraP23的DGT-31(v1)基因为各个T₁拟南芥植物引入了微弱的除草剂耐受性, 但在具有转运肽TraP8时该基因展现了改善的耐受性。DGT-32和DGT-33与TraP8以及与其各自不同的叶绿体转运肽(分别为TraP14和TraP24)都展示了对所测试比率的草甘膦的强耐受性。在给定的处理中, 植物的响应水平变化很大, 这可能是由于以下的事实, 即每株植物代表一个独立的转化事件, 因此感兴趣的基因的拷贝数在每个植物之间有不同。尤其值得注意的是, 在所测试的每个草甘膦比率下, 均存在比其它个体更加耐受的个体。表16提供的按比率别的总群体损伤平均值证明, 用dgt-31, dgt-32, 和dgt-33v1转化的植物与dgt-1v1或野生型对照相比存在显著差异。

[0388] 表16. dgt-31, dgt-32和dgt-33v1转化T₁拟南芥对萌发后以一定范围施用的草甘膦的响应, 与dgt-1(T₄)纯合抗性群体和非转化对照比较。施用后14天的目测%损伤

[0389]

TraP23 dgt-31	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均值	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	0	4	81.3	2.5	80-85
420 g ae/ha	0	0	4	97.3	4.9	90-100
1680 g ae/ha	0	0	4	90.0	7.1	85-100
3360 g ae/ha	0	0	4	91.3	6.3	85-100
TraP14 dgt-32	%损伤			%损伤		
平均	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	2	0	2	30.0	29.4	0-60
1680 g ae/ha	3	0	1	17.5	21.8	5-50
3360 g ae/ha	0	3	1	35.0	30.0	20-80
TraP24 dgt-33	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	2	2	0	21.3	14.9	5-40
420 g ae/ha	1	1	2	46.3	30.9	5-70
1680 g ae/ha	1	0	3	62.5	38.8	5-90
3360 g ae/ha	1	0	3	62.0	36.0	8-80
TraP8 dgt-31	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0.0
105 g ae/ha	0	1	3	0.0	43.8	17.0
420 g ae/ha	1	2	1	0.0	43.8	32.5
1680 g ae/ha	0	1	3	0.0	71.3	27.8
3360 g ae/ha	0	0	4	0.0	81.3	8.5
TraP8 dgt-32	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	4	0.0	0.0	0.0
105 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0.0
420 g ae/ha	4	0	0	0.0	7.5	5.0

[0390]

1680 g ae/ha	3	1	0	0.0	10.8	9.6
3360 g ae/ha	4	0	0	0.0	12.8	3.2
TraP8 dgt-33	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0.0
105 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0.0
420 g ae/ha	4	0	0	0.0	2.5	3.8
1680 g ae/ha	4	0	0	0.0	6.3	2.5
3360 g ae/ha	3	1	0	0.0	20.0	13.5
dgt-1 (转化对照)	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	1	3	42.5	15.0	20-50
420 g ae/ha	0	2	2	38.8	11.1	25-50
1680 g ae/ha	0	0	4	79.0	19.4	50-90
3360 g ae/ha	0	0	4	50.0	0.0	50
WT (非转化对照)	%损伤			%损伤		
平均值	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
105 g ae/ha	0	0	4	85.0	0.0	85
420 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
1680 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
3360 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[0391] 玉米转化 使用如上所述的标准克隆方法构建用于根癌土壤杆菌介导的玉米转化的双元载体。表17列出了被构建用于玉米转化的载体。在包含dgt-28的载体中使用如下的基因元件：使用玉米泛素1启动子(ZmUbi1;美国专利No.5,510,474)驱动dgt-28编码序列，该编码序列侧翼是玉米脂肪酶3'非翻译区(ZmLip 3'UTR;美国专利No.7179902)，选择标志物盒的组成为被用于驱动aad-1编码序列(美国专利No.7,838,733)的玉米泛素1启动子，该编码序列侧翼是玉米脂肪酶3'非翻译区。aad-1编码序列赋予对苯氧基生长素除草剂，例如2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)，和对芳基氧基苯氧基丙酸(AOPP)类除草剂的耐受性。

[0392] dgt-28构建体被构建为标准双元载体和土壤杆菌超双元系统载体(Japan Tobacco, Tokyo, JP)。标准双元载体包括：pDAB107663, pDAB107664, pDAB107665, 和 pDAB107665。土壤杆菌超双元系统载体包括pDAB108384, pDAB108385, pDAB108386, 和 pDAB108387。

[0393] 完成了其它的构建体，它们含有黄色荧光蛋白(yfp;美国专利申请2007/0298412)报告基因。pDAB109812含有一个yfp报告基因盒，其由玉米泛素1启动子驱动，侧翼为玉米per 5 3'非翻译区(Zm per5 3'UTR;美国专利No.7179902)，该选择标志物盒的组成为用于驱动aad-1表达的甘蔗杆状病毒启动子(SCBV;美国专利No.5,994,123)，其侧翼是玉米脂肪酶3'非翻译区。pDAB101556含有一个yfp盒，其由玉米泛素1启动子驱动，侧翼为玉米per 5 3'非翻译区，选择标志物盒的组成为用于驱动aad-1表达的玉米泛素1启动子，其侧翼是玉

米脂肪酶3'非翻译区。pDAB107698含有：一个dgt-28盒，其由玉米泛素1启动子驱动，侧翼为玉米脂肪酶3'非翻译区；一个yfp盒，其由玉米泛素1启动子驱动，侧翼为玉米per 5 3'非翻译区；选择标志物盒包括用于驱动aad-1表达的甘蔗杆状病毒启动子，其侧翼是玉米脂肪酶3'非翻译区。所有这三个构建体均是标准的双元载体。

[0394] 表17. 玉米转化载体

[0395]

质粒 No.	图号	基因元件说明
pDAB107663	34	ZmUbi1/TraP4 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 双元载体
pDAB107664	35	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 双元载体
pDAB107665	36	ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 双元载体
pDAB107666	37	ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 双元载体
pDAB109812	38	ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmPer5 3'UTR :: SCBV / <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 双元载体
pDAB101556	39	ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmPer5 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> / ZmLip 3'UTR 双元载体
pDAB107698	40	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>yfp</i> /ZmLip 3'UTR::SCBV/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR
pDAB108384	41	ZmUbi1/TraP4 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR:: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 超双元载体
pDAB108385	42	ZmUbi1/TraP8 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 超双元前体
pDAB108386	43	ZmUbi1/TraP23 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR :: ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 超双元前体
pDAB108387	44	ZmUbi1/TraP5 <i>dgt-28</i> /ZmLip 3'UTR::ZmUbi1/ <i>aad-1</i> /ZmLip 3'UTR 超双元前体

[0396] 穗灭菌和胚分离 为了获得玉米未成熟的胚，在温室中生长玉米近交系B104的植株，并自花授粉或同胞授粉(sib-pollinated)产生穗。在授粉后大约9-12天采集穗。在实验当天，对穗进行表面灭菌，方法是在20%次氯酸钠(5%)溶液中浸泡穗，并震荡20-30分钟，随后在无菌水中漂洗3次。灭菌后，从每个穗无菌切出未成熟的合子胚(1.5-2.4mm)，并随机分配到含有液体感染培养基(LS基础培养基, 4.43gm/L; N6维生素溶液[1000X], 1.00mL/L; L-脯氨酸, 700.0mg/L; 蔗糖, 68.5gm/L; D(+) 葡萄糖, 36.0gm/L; 10mg/ml 2,4-D, 150μL/L)的微离心管中。对于给定系列的实验，使用从3个穗汇集的胚用于每个转化。

[0397] 土壤杆菌起始培养：

[0398] 将含有上述双元转化载体的土壤杆菌甘油储液在含有合适抗生素的AB基本培养基平板上划线，在20℃生长3-4天。挑取单个菌落并在含有相同抗生素的YEP平板上划线，并在28℃温育1-2天。

[0399] 土壤杆菌培养和共培养 从YEP平板获取土壤杆菌菌落，悬浮在置于50mL一次性管中的10mL感染培养基中，使用分光光度计将细胞密度调整到OD_{600nm}为0.2-0.4。将土壤杆菌培养物置于旋转摇床上，室温125rpm振荡，同时进行胚解剖。从无菌玉米谷粒分离大小为1.5-2.4mm的未成熟合子胚，并置于在1mL感染培养基中，用相同培养基清洗1次。将土壤杆菌悬液(2mL)加入到每个管中，将管置于振荡器平台上10-15分钟。将胚转移到共培养培养

基 (MS盐, 4.33gm/L; L-脯氨酸, 700.0mg/L; 肌醇, 100.0mg/L; 酪蛋白酶促水解物 100.0mg/L, 30mM 麦草畏-KOH, 3.3mg/L; 蔗糖, 30.0gm/L; Gelzan™, 3.00gm/L; 改良的MS-维生素 [1000X], 1.00ml/L, 8.5mg/ml AgNO₃, 15.0mg/L; DMSO, 100μM), 调整方向使胚子叶朝上, 并在25℃温育3天, 24小时光照, 50μmole m⁻²sec⁻¹光强。

[0400] 愈伤组织选择和推定事件再生 共培养周期后, 将胚转移到没有选择剂的恢复培养基 (resting media) (MS盐, 4.33gm/L; L-脯氨酸, 700.0mg/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-六羟基环己烷, 100mg/L; MES [(2- (n-吗啉代) -乙磺酸) , 游离酸] 0.500gm/L; 酪蛋白水解酶 100.0mg/L; 30mM 的麦草畏-KOH, 3.3mg/L; 蔗糖, 30.0gm/L; Gelzan 2.30gm/L; 改良的MS-维生素 [1000X], 1.00ml/L; 8.5mg/ml AgNO₃, 15.0mg/L; 羧苄青霉素, 250.0mg/L), 在25℃、24小时光照, 50μmole m⁻²sec⁻¹光强下温育3天。

[0401] 生长抑制剂量响应实验提示, 0.25mM和更高的草甘膦浓度足以抑制非转化B104玉米品系的细胞生长。将胚转移到含有0.5mM草甘膦的选择1培养基 (MS盐, 4.33gm/L; L-脯氨酸, 700.0mg/L; 肌醇, 100.0mg/L; MES [(2- (n-吗啉代) -乙磺酸) , 游离酸] 0.500gm/L; 酪蛋白酶促水解物 100.0mg/L; 30mM 的麦草畏-KOH, 3.3mg/L; 蔗糖, 30.0gm/L; Gelzan™ 2.30gm/L; 改良的MS-维生素 [1000X], 1.00ml/L; 8.5mg/ml AgNO₃, 15.0mg/L; 羧苄青霉素, 250.0mg/L), 并在28℃温育7-14天, 黑暗和/或24小时光照, 50μmole m⁻²sec⁻¹光强。

[0402] 将增殖性胚愈伤组织转移到含有1.0mM草甘膦的选择2培养基 (MS盐, 4.33gm/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-六羟基环己烷, 100mg/L; L-脯氨酸, 700.0mg/L; MES [(2- (n-吗啉代) -乙磺酸) , 游离酸] 0.500gm/L; 酪蛋白酶促水解物 100.0mg/L; 30mM 的麦草畏-KOH, 3.3mg/L; 蔗糖, 30.0gm/L; Gelzan™ 2.30gm/L; 改良的MS-维生素 [1000X], 1.00ml/L; 8.5mg/ml AgNO₃, 15.0mg/L; 羧苄青霉素, 250.0mg/L; R-吡氟氯禾灵酸 (R-Haloxyfop acid) 0.1810mg/L), 并在28℃, 黑暗和/或24小时光照, 50μmole m⁻²sec⁻¹光强下温育14天。这一选择步骤允许转基因愈伤组织进一步增殖和分化。愈伤组织选择周期持续3-4周。

[0403] 将增殖性胚愈伤组织转移到含有0.5mM草甘膦的PreReg培养基 (MS盐, 4.33gm/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-六羟基环己烷, 100mg/L; L-脯氨酸, 350.0mg/L; MES [(2- (n-吗啉代) -乙磺酸) , 游离酸] 0.250gm/L; 酪蛋白酶促水解物 50.0mg/L; NAA-NaOH 0.500mg/L; ABA-EtOH 2.50mg/L; BA 1.00mg/L; 蔗糖, 45.0gm/L; Gelzan™ 2.50gm/L; 改良的MS-维生素 [1000X], 1.00ml/L; 8.5mg/ml AgNO₃, 1.00mg/L; 羧苄青霉素, 250.0mg/L), 并在28℃, 24小时光照, 50μmole m⁻²sec⁻¹光强下温育7天。

[0404] 将具有抽芽状芽 (shoot-like bud) 的胚愈伤组织转移到含有0.5mM草甘膦的再生培养基 (MS盐, 4.33gm/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-六羟基环己烷, 100mg/L; 蔗糖, 60.0gm/L; Gellan Gum G434™ 3.00gm/L; 改良的MS-维生素 [1000X], 1.00ml/L; 羧苄青霉素, 125.0mg/L), 并在24小时光照, 50μmole m⁻²sec⁻¹光强培养7天。

[0405] 将具有初生根的小抽芽转移到含有生根培养基 (MS盐, 4.33gm/L; 改良的MS-维生素 [1000X], 1.00ml/L; 1, 2, 3, 5/4, 6-六羟基环己烷, 100mg/L; 蔗糖, 60.0gm/L; Gellan Gum G434™ 3.00gm/L; 羧苄青霉素, 250.0mg/L) 的植物托盘 (phytotray) 中, 并在27℃, 16/8小时光照/黑暗, 140-190μmole m⁻²sec⁻¹光强下温育7天。对推定的转基因植物小苗进行分析, 使用上述方案评估转基因拷贝数, 并转移到土壤中。

[0406] 分子确认玉米植物中存在dgt-28和aad-1转基因通过水解探针测定确认存在dgt-

28和aad-1多核苷酸序列。通过类似于TAQMAN™的水解探针测定对分离的T₀玉米植株进行初始筛选,确认dgt-28和aad-1转基因的存在。使用这些研究产生的数据确定转基因拷贝数,并用于选择用于回交和进行到T₁代的转基因玉米事件。

[0407] 将组织样品收集在96孔板中,用KLECO™组织粉碎机和不锈钢珠(Hoover Precision Products,Cumming,GA)在Qiagen™RLT缓冲液中进行组织浸解(tissue maceration)。组织浸解后,使用Biosprint™96植物试剂盒(Qiagen™,Germantown,MD)根据制造商建议的方案以高通量模式分离基因组DNA。通过Quant-IT™Pico Green DNA测定试剂盒(Molecular Probes,Invitrogen,Carlsbad,CA)对基因组DNA进行定量。用BIOROBOT3000™自动移液器(Qiagen,Germantown,MD)将定量的基因组DNA调整到大约2ng/μL,用于水解探针测定。类似于TAQMAN™的水解探针测定通过实时定量PCR来实施,使用LIGHTCYCLER®480系统(Roche Applied Science,Indianapolis,IN),用以确定转基因拷贝数。使用LIGHTCYCLER®探针设计软件2.0为aad-1,dgt-28和内参基因转换酶(Genbank登录号No:U16123.1)设计了测定。为了扩增,制备1X终浓度的LIGHTCYCLER®480Probe Master Mix(Roche Applied Science),多重反应物体积为10μL,含有0.4μM的每种aad-1和dgt-28引物和0.2μM的每种探针(表18)。

[0408] 进行两步扩增反应,60℃延伸40秒,并进行荧光获取。运行所有样品,并使用平均循环阈值(Ct)数值分析每个样品。使用LightCycler™软件发布版1.5使用相对定量模块,并根据ΔΔCt方法,进行实时定量PCR数据的分析。对照在每个运行中包含一个来自单拷贝校准品(calibrator)和已知的2拷贝检验标准(check)的基因组DNA样品。表19列出了水解探针测定的结果。

[0409] 表18.用于aad-1,dgt-28和内参(转化酶)水解探针测定的引物和探针序列

寡核苷酸名称	探测的基因	SEQ ID NO:	寡核苷酸序列
GAAD1F	aad-1 正向引物	58	TGTTCGGTTCCTCTACCA A
GAAD1P	aad-1 探针	59	CACAGAACCGTCGCTTCA GCAACA
GAAD1R	aad-1 反向引物	60	CAACATCCATCACCTTGAC TGA
IV-Probe	转化酶探针	61	CGAGCAGACCGCCGTGTA CTTCTACC
IVF-Taq	转化酶正向引物	62	TGGCGGACGACGACTTGT
IVR-Taq	转化酶反向引物	63	AAAGTTTGGAGGCTGCCG T
zmDGT28 F	dgt-28 正向引物	64	TTCAGCACCCGTCAGAAT
zmDGT28 FAM	dgt-28 探针	65	TGCCGAGAACTTGAGGAG GT
zmDGT28 R	dgt-28 反向引物	66	TGGTCGCCATAGCTTGT

[0411] 表19.dgt-28事件T₀拷贝量结果。低拷贝事件由1-2个转基因拷贝组成,括号中列

出了单拷贝数目。高拷贝事件包含3个或更多个转基因拷贝。

[0412]	用于转化的质粒	#低拷贝事件 (单拷贝)	#高拷贝事件
	pDAB107663	43 (31)	10
	pDAB107664	30 (24)	5
	pDAB107665	40 (27)	10
	pDAB107666	24 (12)	12
	pDAB109812	2 (1)	0
	pDAB101556	25 (15)	10
	pDAB107698	3 (1)	2

[0413] dgt-28转化玉米中的除草剂耐受性使玉米dgt-28转化事件(T₀) 在温室中驯化,并生长至植物从组织培养转向温室生长条件(即,从轮生体(whorl)生出2-3片新的外观正常的叶片)。植物在27℃,16小时光照:8小时黑暗条件的温室中生长。然后,用DURANGO DMA™商业制剂(含有除草剂草甘膦)并添加2%w/v硫酸铵对植物进行处理。除草剂施用用履带式喷洒器以187L/ha喷洒体积,50-cm喷洒高度进行。用280-4480g ae/ha草甘膦的草甘膦范围对T₀植物进行喷洒,其能够对非转化玉米品系造成显著损伤。致死剂量的定义为导致B104近交系>95%损伤的比率。

[0414] T₀dgt-28玉米植物的结果表明,实现了对高达4480g ae/ha比率的草甘膦的耐受性。在T₀代中使用了一种特定培养基类型。与非转化对照相比,转化植物的极小生长停滞(stunting)和整体植物生长表明,当与TraP5,TraP8,和TraP23叶绿体转运肽连锁时,dgt-28提供了对草甘膦的强耐受性。

[0415] 将所选T₀植物自交和回交,以进一步在下一代中进行表征。用140-1120g ae/ha草胺膦或105-1680g ae/ha草甘膦喷洒100个含有T₁植物的选定dgt-28品系。选择标志物和草甘膦抗性基因被构建在同一质粒中。因此,如果通过用除草剂喷洒选出一个除草剂抗性基因,则认为这两个基因同时存在。在14DAT,对抗性和敏感植物进行计数,用于确定通过卡法分析确定作为单个座位分离并具有显性孟德尔性状(3R:1S)的品系的百分比。这些数据证明,dgt-28作为一种强草甘膦抗性基因在单子叶物种中是可遗传的。向T₁或F₁存活者施用更高比率的草甘膦,以进一步表征由dgt-28基因提供的耐受性和保护。

[0416] dgt-28转化的T₀玉米中的萌发后除草剂抗性 通过土壤杆菌转化产生与TraP4,TraP5,TraP8和TraP23连锁的dgt-28的T₀事件,并在可控生长室条件下驯化,直至从轮生体(whorl)生出2-4片新的外观正常的叶片。给植物单独指定鉴定编号,并采样用于进行dgt-28和aad-1拷贝数分析。根据拷贝数分析,选出植物用于蛋白表达分析。将植物移植到含有新生长培养基的更大的盆中,在27℃,16小时光照:8小时黑暗的温室条件下生长。然后用DURANGO DMA™商业制剂(草甘膦)并添加2%w/v硫酸铵对没有采样用于蛋白表达的剩余植物进行处理。处理的分布使得每组植物含有具有不同拷贝数的T₀事件。除草剂施用使用履带式喷洒器以187L/ha喷洒体积,50-cm喷洒高度执行。用280-4480g ae/ha草甘膦的草甘膦范围对T₀植物进行喷洒,该范围能够对非转化玉米品系造成显著损伤。致死剂量的定义为

导致B104近交系>95%损伤的比率。B104是转化体的遗传背景。

[0417] Tdgt-28玉米植物的结果表明,实现了对高达4480g ae/ha比率的草甘膦的耐受性。表20.与非转化对照相比,转化植物的极小生长停滞(stunting)和整体植物生长表明,当与TraP5,TraP8,和TraP23连锁时,dgt-28提供了对草甘膦的强耐受性。

[0418] 表20.各种拷贝数的Tdgt-28事件在处理14天后对280-4480g ae/ha草甘膦+2.0%w/硫酸铵的响应

[0419]

TraP4 dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
280 g ae/ha	5	0	0	1.0	2.2	0-5
560 g ae/ha	6	0	0	2.0	4.0	0-10
1120 g ae/ha	12	0	0	1.3	3.1	0-10
2240 g ae/ha	7	0	0	1.7	4.5	0-12
4480 g ae/ha	7	0	0	1.1	3.0	0-8
TraP8 dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	6	0	0	0.0	0.0	0
280 g ae/ha	5	1	0	6.7	8.8	0-20
560 g ae/ha	0	2	0	20.0	0.0	20
1120 g ae/ha	7	0	0	1.4	2.4	0-5
2240 g ae/ha	3	1	0	7.5	15.0	0-30
4480 g ae/ha	6	0	0	1.7	4.1	0-10
TraP23 dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	6	0	0	0.8	2.0	0-5
280 g ae/ha	7	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1120 g ae/ha	10	2	0	3.3	7.8	0-20
2240 g ae/ha	6	0	0	1.3	3.3	0-8
4480 g ae/ha	6	1	0	4.3	7.9	0-20
TraP5 dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0

[0420]

280 g ae/ha	7	1	0	5.0	14.1	0-40
560 g ae/ha	8	0	0	0.6	1.8	0-5
1120 g ae/ha	7	1	0	5.0	14.1	0-40
2240 g ae/ha	8	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	8	0	0	0.0	0.0	0

[0421] 通过标准ELISA进行的蛋白表达分析证明,所测试构建体之间的平均DGT-28蛋白

范围是12.6-22.5ng/cm²。

[0422] 确认F₁代在温室条件下的草甘膦耐受性 将没有喷药的单拷贝T₀植物与非转化背景B104回交,用于在下一代中进行进一步的表征。在T₁代中评估草甘膦耐受性以确认dgt-28基因的遗传。对于T₁植物,在V1生长期施用除草剂ASSURE II™ (35g ae/ha喹禾灵-甲酯 (quizalofop-methyl)) 以选出AAD-1蛋白。选择标志物和草甘膦抗性基因构建在同一质粒上。因此,如果选出一个基因,则认为两个基因同时存在。7DAT后,对抗性和敏感性植物进行计数,并从群体中除去空 (null) 植物。这些数据证明,dgt-28 (v1) 作为一种强草甘膦抗性基因在单子叶物种中是可遗传的。将植物采样,用于通过标准ELISA和RNA转录本水平表征DGT-28蛋白。如前所述地用560-4480gae/ha草甘膦喷洒抗性植物。数据表明,与叶绿体转运肽TraP4,TraP5,TraP8和TraP23连锁的dgt-28对高达4480g ae/ha草甘膦具有强耐受性。表21。

[0423] 表21.F₁单拷贝dgt-28事件在处理14天后对560-4480g ae/ha草甘膦+2.0%w/v硫酸铵的响应

[0424]

B104 / TraP4::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10
2240 g ae/ha	4	0	0	2.5	2.9	0-5
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
B104 / TraP8::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	5.0	4.1	0-10

[0425]

4480 g ae/ha	4	0	0	6.3	2.5	5-10
B104 / TraP23::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	3	1	0	10.0	10.0	5-25
1120 g ae/ha	2	2	0	18.8	11.8	10-35
2240 g ae/ha	4	0	0	12.5	2.9	10-15
4480 g ae/ha	3	1	0	10.0	7.1	5-20
B104 / TraP5::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	8.0	0.0	8
1120 g ae/ha	4	0	0	11.3	3.0	8-15
2240 g ae/ha	4	0	0	12.5	2.9	10-15
4480 g ae/ha	4	0	0	10.0	2.5	10-15
非转化的B104	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[0426] 蛋白表达数据证明,在所测试的T₁事件和构建体中,DGT-28蛋白的平均范围是42.2-88.2ng/cm²,由此证明了T₁代中的蛋白表达。

[0427] 田间条件下的dgt-28玉米的表征 将单拷贝T₁事件送至田间地点,以产生杂交半合子和近交纯合子种子用于进一步的表征。杂交种子的产生是通过将玉米转化系B104的T₁事件与近交系4XP811杂交,产生对该事件而言以1:1(半合子:空)分离的杂交群体。将所得种子运送到2个不同的地点。按照完全随机区组设计(randomized complete block design),在每个地点为每个构建体种植总共5个单拷贝事件,设置3个重复。田地设计为用于在V4生长期施用草甘膦,而单独一组植物在V8生长期施用。4XP811/B104常规杂交体用作阴性对照。

[0428] 实验行用184g ae/ha ASSURE II™(106g ai/L喹禾灵-甲酯(quizalofop-methyl))处理,以消除空分离体。所有实验入选对象(entries)相对于ASSURE II™施用以1:1(敏感:抗性)分离(p=0.05)。从每个事件的所选抗性植物采样,用于通过标准ELISA定量DGT-28蛋白。

[0429] 喹禾灵-甲酯(quizalofop-methyl)抗性植物在V4或V8生长期用商业除草剂DURANGO DMA™(480g ae/L)加2.5%w/v硫酸铵进行处理。除草剂施用使用喷管式喷洒器(boom sprayer)实施,其被校准以输送187L/ha的体积,50-cm喷洒高度。用1120-4480g ae/ha草甘膦的草甘膦范围喷洒植物,该范围能够对非转化玉米品系造成显著损伤。致死剂量

的定义为导致4XP811近交系>95%损伤的比率。目测损伤评估表示为在7、14和21DAT (处理后天数)的目测失绿百分比、坏死百分比、生长抑制百分比和总目测损伤。评估与每个品系的未处理检验标准和阴性对照进行比较。

[0430] 所有评估时机的目测损伤数据证明,在两个地点和两种施用时机下,对高达4480g ae/ha DURANGO DMA™具有强耐受性。提供了来自一个地点的V4施用的代表性事件,它们与其它事件、施用时机和地点一致。表22。一个来自含有与TraP23连锁的dgt-28的构建体(pDAB107665)的事件对用于AAD-1蛋白的ASSURE II™选择耐受,但是对所有施用比率的草甘膦敏感。

[0431] 表22.dgt-28事件在V4生长期对施用1120-4480g ae/ha草甘膦+2.5%w/v硫酸铵的响应

[0432]

4XPB11//B104/TraP4::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	<20%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP8::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP23::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0

[0433]

2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4XPB11//B104/TraP5::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
非转化的4XPB11//B104	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[0434] 在生殖生长期对4480g ae/ha草甘膦比率进行了额外评估。对于所有构建体、施用时机和地点,抽穗、授粉时间和穗充满的目测评估均与每个品系的未处理检验标准(check)相似。DGT-28蛋白的定量结果证明,蛋白表达的平均范围是186.4-303.0ng/cm²。数据证明,dgt-28转化玉米在田间条件下在整个生殖生长期对高达4480g ae/ha的草甘膦具有强耐受性。数据还证明了基于喷洒耐受性结果的DGT-28蛋白检测和功能。

[0435] 确认dgt-28玉米在纯合状态下的遗传性和耐受性 如前所述地将来自T₁S₂的种子在温室条件下种植。对在田间条件下表征过的相同的5个单拷贝品系在纯合状态下进行了表征。植物生长至V3生长期,并分成3个草甘膦比率,范围是1120-4480g ae/ha草甘膦(DURANGO DMATM),每个处理4个重复。施用履带式喷洒器如前所述地进行,并在2.0%w/v硫酸铵中配制。施用硫酸铵作为每个品系的未处理检验标准。如前所述地在处理后7和14天进行目测评估。数据证明,所有测试事件对高达4480g ae/ha草甘膦具有强耐受性。表23。

[0436] 表23. 纯合dgt-28事件对施用1120-4480g ae/ha草甘膦+2.0%w/v硫酸铵的响应

[0437]

TraP4::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)

[0438]

0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	3.8	2.5	0-5
4480 g ae/ha	4	0	0	14.3	1.5	12-15
TraP8::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	<20%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10
4480 g ae/ha	4	0	0	11.3	2.5	10-15
TraP23::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	4.5	3.3	0-8
2240 g ae/ha	4	0	0	7.5	2.9	5-10
4480 g ae/ha	4	0	0	15.0	0.0	15
TraP5::dgt-28	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	1.3	2.5	0-5
2240 g ae/ha	4	0	0	9.0	2.0	8-12
4480 g ae/ha	4	0	0	15.0	2.4	12-18
非转化的B104	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围 (%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[0439] 来自在田间条件下不耐受的pDAB107665的品系未展现对草甘膦的耐受,因此与田间观察结果一致(数据未显示)。除了先前提到的一个品系之外,其它品系的所有用草甘膦处理的重复均对草甘膦不敏感。因此,数据证明了dgt-28玉米的纯合群体以孟德尔方式的遗传性。通过标准ELISA确定的DGT-28蛋白的表达证明,在对草甘膦耐受的单拷贝事件中,蛋白表达的平均范围是27.5-65.8ng/cm²。证据证明了DGT-28蛋白是功能性蛋白并且在世代之间稳定。

[0440] 使用草甘膦作为选择标志物的萌发后除草剂耐受性如前所述,从组织培养物中除去T₀转化植物,并在温室内驯化。所测的事件含有与TraP5, TraP8, 和TraP23叶绿体转运肽连锁的dgt-28。结果显示,这些T₀植物提供了高达4480g ae/ha草甘膦的强耐受性,而未转化植物受到低至280g ae/ha草甘膦浓度的控制。这些数据证明,在使用范围为280-4480g ae/ha的草甘膦浓度的条件下,dgt-28能够用作选择标志物。

[0441] 将若干来自含有dgt-28转基因的玉米固定品系的种子掺杂到(spiked into)若干非转化玉米种子中。种植种子并使之生长至V1-V3发育期,此时用280-4480g ae/ha范围的选择剂量的草甘膦喷洒幼苗。7-10天后,对敏感性和耐受性植株进行计数,草甘膦耐受植株的量与所种植的含有dgt-28转基因的转基因种子的原始数目相关。

[0442] dgt-28玉米的叠加(stackings)为研究目的,使用AAD-1蛋白作为dgt-28转基因玉米中的选择标志物。aad-1也可以在玉米中用作除草剂耐受性性状,为作物提供强2,4-D耐受性,直至V8施用。对来自构建体pDAB107663 (TraP4::dgt-28), pDAB107664 (TraP8::dgt-28) 和pDAB107666 (TraP5::dgt-28)的4个事件表征其对草甘膦和2,4-D桶混合施用的耐受性。表征研究用F₁种子在温室条件下完成。用履带式喷洒器以如下的比率如前所述地实施施用:1120-2240g ae/ha草甘膦(对dgt-28基因选择),1120-2240g ae/ha 2,4-D(对aad-1基因选择),或两种处于所述比率的除草剂的桶混合物。在7和14DAT对植物进行打分。表24显示了以2240g ae/ha施用除草剂的喷洒结果。

[0443] 表24.F₁aad-1和dgt-28玉米在处理14天对喷洒2240g ae/ha 2,4-D、草甘膦和两种除草剂的桶混合组合剂(tank mix combination)的响应

[0444]

F ₁ 事件	2240 g ae/ha 2,4-D		2240 g ae/ha草甘膦		2240 g ae/ha 2,4-D + 2240 g ae/ha草甘膦	
	平均%损伤	标准差	平均%损伤	标准差	平均%损伤	标准差
107663[3]-012.AJ001	5.0	4.1	3.8	4.8	8.8	3.0
107663[3]-029.AJ001	2.5	5.0	1.3	2.5	5.0	5.8
107663[3]-027.AJ001	2.5	2.9	11.8	2.9	13.8	2.5
107663[3]-011.AJ001	3.8	2.5	11.5	1.0	12.8	1.5
B104	27.5	17.7	100.0	0.0	100.0	0.0

[0445] 结果确认,dgt-28能够成功地与aad-1叠加,从而增加可用于感兴趣的作物的除草剂谱(草甘膦+苯氧乙酸类,分别用于dgt-28和aad-1)。在存在难以控制的阔叶杂草或抗性杂草生物型的作物生产中,该叠加可用作杂草控制和保护感兴趣的作物的手段。在玉米和其它植物中,其他的输入或输出性状也可以和dgt-28基因叠加。

[0446] 大豆转化通过土壤杆菌介导的大豆子叶节外植体(cotyledonary node explant)转化产生了含有稳定整合dgt-28转基因的转基因大豆(Glycine max)。使用携带含有功能性dgt-28的双元载体的卸甲土壤杆菌菌株起始转化。

[0447] 土壤杆菌介导的转化用Zeng et al. (Zeng P.,Vadnais D.A.,Zhang Z.,Polacco J.C.,(2004),Plant Cell Rep.,22(7):478482)的改良半子叶节程序实施。简而言之,将大豆种子(Maverick栽培种)在基本培养基上萌发,分离子叶节,并用土壤杆菌感染。抽芽起始、抽芽延伸和生根培养基补充有头孢噻肟、特美汀和万古霉素以除去土壤杆菌。通过除草剂进行选择,抑制非转化抽芽生长。将经过选择的抽芽转移到生根培养基用于根发育,然后转移到土壤混合物中,使幼苗驯化。

[0448] 所选幼苗的顶生小叶(terminal leaflet)用除草剂局部处理(叶喷涂技术(leaf paint technique),以筛选出推定的转化体。将筛选到的幼苗转移至温室,驯化,然后用除草剂叶片喷涂以确认耐受性。从这些推定的转化T₀植物采样,并使用分子分析确认除草剂选择标志物和dgt-28转基因的存在。使T₀植物在温室中自花授粉,产生T₁种子。

[0449] 可以使用第二种大豆转化方法产生额外的转基因大豆植物。使用携带含有功能性dgt-28的卸甲土壤杆菌菌株起始转化。

[0450] 土壤杆菌介导的转化使用下面参考文献的改良半种子程序进行:Paz et al., (Paz M.,Martinez J.,Kalvig A.,Fonger T.,and Wang K.,(2005)Plant Cell Rep.,25:206-213)。简而言之,将成熟大豆种子用氯气过夜灭菌,并用无菌H₂O浸润20小时,然后进行土壤杆菌介导的植物转化。将种子沿种脐纵向对半切开,分开种子并去除种皮。切下胚轴,并从子叶节点除去任何轴向抽芽/芽。所得的半种子外植体用土壤杆菌感染。在抽芽起始、抽芽延伸和生根培养基中补充有头孢噻肟、特美汀和万古霉素以去除土壤杆菌。利用除草剂选择抑制非转化抽芽的生长。将所选抽芽转移到生根培养基中进行根发育,然后转移到土壤混合物中,使幼苗驯化。

[0451] 从推定的转化T₀植物采样,并使用分子分析确认除草剂选择标志物和dgt-28转基因的存在。数个事件被鉴定为含有这些转基因。对这些T₀植物进行进一步的分析,并允许在温室中自花授粉,产生T₁种子。

[0452] 确认dgt-28向T₁代的可遗传性 DGT-28蛋白向T₁代的可遗传性使用两种方法中的一种进行评估。第一种方法包括将T₁种子种植到Metro-mix培养基中,并在第1三小叶(trifoliate)生长期在发芽植物上施用411g ae/ha IGNITE™280SL。第二种方法包括使用滚珠轴承(ball bearing)和genogrinder研磨机对总共8个重复样品的种子匀浆。然后使用用于检测PAT蛋白的ELISA测试条试验检测遗传事件,这是因为选择标志物与dgt-28在相同质粒上。对于这两种方法的任一种,如果单个植物对草胺磷耐受或者被PAT ELISA条试验检测到,则该事件显示出能够遗传到T₁代。

[0453] 对总共5个构建体如前所述地进行了可遗传性筛选。在所有构建体中含有与TraP4,TraP8和TraP23连锁的dgt-28的质粒均显示有68%的PAT::DGT-28蛋白可以遗传到T₁代。

[0454] dgt-28转化的T₁大豆的萌发后除草剂耐受性 对于来自通过如前所述的筛选方法被确认为可遗传的T₁事件的种子,在温室条件下将其种植在Metro-mix培养基中。当植物生长至第1三小叶(trifoliate)完全展开时,如前所述地用411g ae/ha IGNITE™280SL处理,用于选择pat基因。给来自每个事件的抗性植株提供唯一的标识,并采样用于dgt-28基因的合子型分析。使用合子型数据为每个草甘膦施用比率指定2个半合子和2个纯合子重复,从而在存在足够植物时,每个处理可以有4个重复。这些植物与野生型Petite havana烟草进行比较。所有植物用设定为187L/ha的履带式喷洒器喷洒。对植物喷洒560-4480g ae/ha范围的DURANGO™二甲胺盐(DMA)。所有施用物用水配制,并添加2%w/v硫酸铵(AMS)。植物在处理7和14天进行评估。给植物评定关于总体目测生长停滞、失绿和坏死的损伤分级。T₁代是有分离的,因此可以预期由于合子型的不同存在一些不同的响应。

[0455] 表25.喷洒结果证明,表征的每个构建体的至少一个dgt-28事件在14DAT(处理天数)可对高达4480g ae/ha的草甘膦具有强耐受性。构建体的代表性单拷贝事件与Maverick阴性对照相比,均可提供对高达4480g ae/ha的耐受性。

[0456]

pDAB107543 (TraP4::dgt-28)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	4	0	33.8	7.5	25-40
1120 g ae/ha	2	2	0	25.0	11.5	15-35
2240 g ae/ha	2	2	0	17.5	2.9	15-20
4480 g ae/ha	0	2	2	33.8	13.1	20-45
pDAB107545 (TraP8::dgt-28)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.5	1.0	0-2
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	5.0	2.4	2-8
4480 g ae/ha	4	0	0	9.5	1.9	8-12
pDAB107548 (TraP4::dgt-28)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	1.8	2.4	0-5
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	3.5	1.7	2-5
4480 g ae/ha	4	0	0	8.8	3.0	5-12
pDAB107553 (TraP23::dgt-28)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	5.0	0.0	5
1120 g ae/ha	4	0	0	9.0	1.2	8-10
2240 g ae/ha	4	0	0	10.5	1.0	10-12
4480 g ae/ha	4	0	0	16.5	1.7	15-18
Maverick (阴性对照)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha 草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	82.5	12.6	70-100
1120 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[0457]

4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
--------------	---	---	---	-------	-----	-----

[0458] dgt-28在T₂代中对高比率草甘膦的保护 对每个构建体的2-5个T₂品系进行45株植物后代测试。根据在前一代中完成的合子型分析选择纯合品系。如前所述地种植种子。然后

用411g ae/ha IGNITE 280SL喷洒植物,如前所述地对pat选择标志物加以选择。3DAT后,对抗性和敏感性植物进行计数。

[0459] 对于含有与dgt-28连锁的TraP4的构建体(pDAB107543和pDAB107548),所测试的12个品系中有9个没有分离,从而确认了T₂代中的纯合品系。关于含有与dgt-28连锁的TraP8的品系(pDAB107545),4个品系中有2个没有分离,并且显示dgt-28在大豆中以孟德尔遗传方式遗传至少2代。从抗性植物获取组织样品,并通过标准ELISA方法对DGT-28蛋白进行定量。数据表明,DGT-28蛋白在无分离的T₂测试品系中的平均范围是32.8-107.5ng/cm²。来自构建体pDAB107553 (TraP23::dgt-28)的品系先前没有用草胺磷选择过,利用其草甘膦剂量响应测试纯合性和对高比率草甘膦的耐受性。来自构建体pDAB107553的品系的重复样品对560-4480g ae/ha范围的草甘膦比率耐受,因此被确认是一个纯合群体,并可以遗传至少2代。

[0460] 如前所述地向2-3个三小叶大豆施用比率范围在560-4480g ae/ha草甘膦中变化的DURANGO DMA。14DAT的目测损伤数据确认了在T₁中证明的耐受性结果。

[0461] 表26.数据证明,与非转化对照相比,dgt-28烟草在两代内对高达3360gae/ha草甘膦具有强耐受性

[0462]

pDAB107543 (TraP4::dgt-28)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	8.0	0.0	8
1120 g ae/ha	4	0	0	14.3	1.5	12-15
2240 g ae/ha	4	0	0	18.0	0.0	18
4480 g ae/ha	0	4	0	24.5	3.3	20-28
pDAB107545 (TraP8::dgt-28)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0

[0463]

560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	2.8	1.5	2-5
2240 g ae/ha	4	0	0	5.0	0.0	5
4480 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
pDAB107548 (TraP4::dgt-28)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
4480 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
pDAB107553 (TraP23::dgt-28)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	-	0.0	0.0
560 g ae/ha	4	0	0	-	10.0	0.0
1120 g ae/ha	4	0	0	-	10.0	-4.4
2240 g ae/ha	4	0	0	-	13.0	-2.4
4480 g ae/ha	3	1	0	-	15.5	4.1
Maverick (阴性对照)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	77.5	15.0	70-100
1120 g ae/ha	0	0	4	97.5	2.9	95-100
2240 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100
4480 g ae/ha	0	0	4	100.0	0.0	100

[0464] 用dgt-28转化水稻通过土壤杆菌介导的无菌水稻种子转化产生了含有稳定整合的dgt-28转基因的转基因水稻(*Oryza sativa*)。使用携带含有功能性dgt-28的双元载体的卸甲土壤杆菌菌株起始转化。

[0465] 将培养基用1M KOH调节到pH 5.8,并用2.5g/l植物凝胶(Sigma-Aldrich, St.Louis,MO)固化。将胚愈伤组织培养在含有30ml半固体培养基的100x 20mm培养皿中。水稻幼苗在含有50ml培养基的MAGENTA盒中生长。细胞悬浮液保持在含有35ml液体培养基的125ml锥形瓶中,并以125rpm旋转。胚培养物的诱导和维持在25-26℃黑暗中进行,植物再生和全株植物培养在16-h光周期的光照室内进行(Zhang et al.1996)。

[0466] 胚愈伤组织的诱导和维持在如前所述的改良NB基础培养基(Li et al.1993)中进行,其中该培养基被修改为含有500mg/L谷氨酰胺。悬浮培养在含有用30g/L蔗糖代替麦芽糖的SZ液体培养基(Zhang et al.1998)中启动和保持。渗透性培养基(NB0)由添加了甘露醇和山梨醇各0.256M的NB培养基组成。在补充了合适除草剂筛选剂的NB培养基上对除草剂抗性愈伤组织选择3-4周。预再生(pre-regeneration)在含有NB培养基并添加了,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D),1mg/l α -萘乙酸(NAA),5mg/l脱落酸(ABA)和选择性除草剂的培养基(PRH50)上实施1周。在含有NB培养基和2,4-D,0.5mg/l NAA,和选择性除草剂的再生培养基

(RNH50) 上培养之后,进行幼苗再生,直至再生出推定的转基因抽芽。将抽芽转移到生根培养基中,其具有半强度的Murashige和Skoog基本盐和Gamborg B5维生素,并补充有1%蔗糖和选择性除草剂。

[0467] 对水稻粳稻品种Taipei 309的成熟干燥的种子进行灭菌,如Zhang et al.1996所述。通过在NB培养基上黑暗培养无菌成熟水稻种子诱导胚组织。从盾片取出直径大约1mm的初级愈伤组织,并用于在SZ液体培养基中起始细胞悬液。然后如Zhang 1996所述地维持悬液。在先前预培养之后3-5天,从液体培养物取出源自悬液的胚发生组织,并放置在NB0渗透性培养基中,用于在培养皿中形成大约2.5cm直径的圆环,并在轰击之前培养4h。轰击后16-20小时,将组织从NB0培养基转移到NBH50选择培养基中,确保被轰击表面朝上,并在黑暗中温育14-17天。然后将新形成的愈伤组织从原始轰击的外植体分离,并放置在相同培养基上的附近位置。再过8-12天后,目测鉴定相对致密的、不透明的愈伤组织,并转移到PRH50预再生培养基中,在黑暗中7天。然后将生长的愈伤组织,其变得更加致密和不透明,亚培养到RNH50再生培养基中,在16小时光周期下14-21天。将再生的抽芽转移到含有1/2MSH50培养基的MAGENTA盒中。从单个外植体再生的多个植株视为同胞,并作为一个独立的植物品系对待。如果植株在1/2MSH50培养基上产生厚而白的根并且生长旺盛,则将该植物评定为对dgt-28基因呈阳性。一旦幼苗达到的MAGENTA盒的顶部,便将它们转移到6-cm盆的土壤中,在100%湿度下保持1周,然后移到生长室中,在30℃14-h光周期和黑暗中21℃的条件下,保持2-3周,然后转移到温室的13-cm盆中。采集种子,并在37℃干燥1周,随后在4℃保存。

[0468] dgt-28水稻的T₀分析 将通过土壤杆菌转化方法获得的水稻移植转化体移植到培养基中,并在温室条件下驯化。对所有植物进行采样,用于PCR检测dgt-28。结果表明,对pDAB110827 (TraP8::dgt-28) 有22个PCR阳性事件,对pDAB110828 (TraP23::dgt-28) 有最少16个PCR阳性事件。PCR阳性事件的dgt-28Southern分析证明,两个构建体均为简单(1-2个拷贝)事件。选出的T₀事件的蛋白质表达表明,DGT-28的蛋白质表达从低于检测水平到130ng/cm²不等。用2240g ae/ha DURANGO DMA™如前所述地对从构建体pDAB110828选出的T₀事件进行处理,并在处理后7和14天进行评估。数据证明对所施用比率的草甘膦具有强耐受性。使所有PCR阳性植株产生T₁种子,用于进一步的表征。

[0469] Dgt-28在水稻中的可遗传性 对来自含有叶绿体转运肽TraP8的构建体pDAB110827的4个dgt-28的T₁品系进行100株后代测试。将种子种植于填满培养基的盆中。然后如前所述地用560g ae/ha DURANGO DMA™喷洒所有植物,用于选择dgt-28基因。7DAT后,对抗性和敏感性植株进行计数。通过卡方分析确定,对每个构建体所测试的4个品系中有2个作为单座位、显性孟德尔性状(3R:1S)分离。Dgt-28是一种在多个物种中可遗传的草甘膦抗性基因。

[0470] dgt-28转化的T₁水稻的萌发后除草剂耐受性 为来自用于后代测试的每个事件的T₁抗性植株指定唯一的标识,并采样用于dgt-28基因的合子型分析。使用合子型数据为每个草甘膦施用比率指定2个半合子和2个纯合子重复,从而可以为每个处理提供总共4个重复。将这些植物与野生型kitaake水稻进行比较。所有植株用设定为187L/ha的履带式喷洒器喷洒。用560-2240g ae/ha范围的DURANGO DMA™喷洒植物。所有施用物用水配制,并添加2%w/v硫酸铵(AMS)。在处理后7和14天对植物进行评估。给植物评定关于总体目测生长停滞、失绿和坏死的损伤分级。T₁代发生了分离,因此可以预期由于合子型的不同存在某些不

同的响应。

[0471] 喷洒结果表明,在7DAT(处理后天数),更高比率的草甘膦仅造成微小的植物损伤(数据未显示)。

[0472] 表27.14DAT的目测损伤数据证明对高达2240g ae/ha的草甘膦,平均目测损伤小于15%

[0473]

TraP8::dgt-28事件1	%损伤	%损伤
-------------------------	-----	-----

[0474]

施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
1120 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
2240 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
TraP8::dgt-28事件2	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3.8	4.8	0-10
1120 g ae/ha	4	0	0	12.0	3.6	8-15
2240 g ae/ha	4	0	0	15.0	6.0	8-20
非转化对照	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	81.3	2.5	80-85
1120 g ae/ha	0	0	4	95.0	5.8	90-100
2240 g ae/ha	0	0	4	96.3	4.8	90-100

[0475] 为来自pDAB110827的所有4个T₁测试品系的重复评估DGT-28蛋白检测。数据表明,对于半合子和纯合子重复体,DGT-28蛋白的平均范围分别为20-82ng/cm²和21-209ng/cm²。这些结果表明稳定的蛋白表达传到了T₁代,并且dgt-28水稻在经过施用用于选择的560g ae/ha草甘膦之后,可对高达2240g ae/ha的草甘膦耐受。

[0476] 用dgt-28转化烟草用含有dgt-28转基因的根癌土壤杆菌转化烟草(Petit Havana栽培种)叶片。将含有包含dgt-28转基因的质粒的单菌落接种到4mL含有壮观霉素(50μg/mL)和链霉素(125μg/mL)的YEP培养基中,并在28℃、190rpm摇床上过夜温育。随后使用4mL种子培养物接种含有25mL培养基相同的培养物的125mL挡板锥形瓶中。该培养物在28℃温育,190rpm震荡,直至达到OD₆₀₀~1.2。然后,将10mL土壤杆菌悬浮物置于无菌60x 20mm Petri™盘中。

[0477] 从无菌生长于含有30g/L蔗糖的MS培养基(Phytotechnology Labs, Shawnee Mission, KS,)的PhytaTrays™(Sigma, St. Louis, MO)中的植物上新鲜切下叶片(0.5cm²),并浸泡在10mL土壤杆菌过夜培养物中数分钟,在无菌滤纸上吸干水分,然后置于添加了1mg/L吲哚乙酸和1mg/L 6-苄氨基嘌呤的相同培养基上。3天后,将用携带有dgt-28转基因的土壤杆菌共培养的叶片转移到含有5mg/L Basta™和250mg/头孢噻肟的相同培养基。

[0478] 3周后,将各个T₀幼苗转移到含有10mg/L BastaTM和250mg/L头孢噻肟的MS培养基中,再经过3周后,转移到土壤中并移至温室。使所选的T₀植物(使用上述的分子分析方法进行鉴定)自花授粉,在荚果完全干燥后从其收集种子。对T₁苗进行合子型和报告基因表达的筛选(如下文所述),并鉴定了含有dgt-28转基因的所选植物。

[0479] 将植物移至温室,操作流程为:从根部洗掉琼脂,移植到13.75cm方盆的土壤中,将盆置于Ziploc[®]袋(SC Johnson&Son, Inc.)中,在袋子的底部放置自来水,并在30℃温室中置于间接光下1周。3-7天后,打开袋子;给植物施肥,让其在打开的袋子中生长,直至让植物在温室条件下驯化,此时除去袋子。将植物在普通暖温室条件下生长(白天27℃,夜晚24℃,16小时白天,最小自然+辅助光=1200μE/m²s¹)。

[0480] 繁殖前,从T₀植物采样进行DNA分析,通过实时定量PCR确定插入的dgt-28的拷贝数。将新鲜组织置于试管中,并在4℃冻干2天。在组织完全干燥后,在试管中放置钨珠(Valenite),并用Kelco球磨机对样品干磨1分钟。然后进行标准DNeasyTMDNA分离程序(Qiagen,DNeasy 69109)。然后,用Pico Green(Molecular Probes P7589)对提取的DNA等份进行染色,并在具有已知标准的荧光分光光度计(BioTekTM)中阅读,获得以ng/μl为单位的浓度。使用总共100ng总DNA作为模板。PCR反应在9700GeneampTM热循环仪(Applied Biosystems)上执行,使样品经历:94℃3分钟,35个循环的94℃30秒、64℃30秒、和72℃1分45秒,随后是72℃10分钟。通过在1%琼脂糖凝胶上电泳,用EtBr染色,对PCR产物进行分析,并通过Southern印迹进行确认。

[0481] 从3个含有不同叶绿体转运肽序列(TraP4, TraP8和TraP23)的构建体再生5-9个具有1-3个dgt-28基因拷贝的PCR阳性事件,并移至温室中。

[0482] 对所有PCR阳性植物进行采样,用于通过标准ELISA定量DGT-28蛋白。在所有PCR阳性植物中均检测到了DGT-28蛋白,并且注意到,随着dgt-28拷贝数的增加,蛋白浓度有增加趋势。

[0483] 烟草中的aad-12(v1)可遗传性 对每个构建体的5个dgt-28T₁品系进行100株后代测试。构建体含有如下叶绿体转运肽序列之一:TraP4、TraP8或TraP23。将种子层积、播种并移植,与上文举例的拟南芥规程非常相似,只是在移植之前,不通过初始筛选将空植物除去。随后用280g ae/ha IGNITE280SL喷洒所有植物,用于如前所述地选择pat选择标志物。3DAT后,对抗性和敏感性植物进行计数。

[0484] 通过卡方分析确定,所测试的5个品系中的4个对每个构建体作为单座位、显性孟德尔性状分离(3R:1S)。Dgt-28在多个物种中是一种可遗传的草甘膦抗性基因。

[0485] dgt-28转化的T₁烟草的萌发后除草剂耐受性 为来自用于后代测试的每个事件的T₁抗性植株指定唯一的标识,并采样用于dgt-28基因的合子型分析。使用合子型数据为每个草甘膦施用比率指定2个半合子和2个纯合子重复,从而可以为每个处理提供总共4个重复。将这些植物与野生型Petite havana烟草进行比较。所有植株用设定为187L/ha的履带式喷雾器喷洒。用560-2240g ae/ha范围的DURANGO DMATM喷洒植物。所有施用物用水配制,并添加2%w/v硫酸铵(AMS)。在处理7和14天对植物进行评估。给植物评定关于总体目测生长停滞、失绿和坏死的损伤分级。T₁代发生了分离,因此可以预期由于合子型的不同存在某些不同的响应。

[0486] 喷洒结果表明,在7DAT(处理后天数),高比率的草甘膦仅造成了微小的植物损伤

(数据未显示)。14DAT后,目测损伤数据表明,含TraP4的构建体的单拷贝事件与来自含TraP8和TraP23的构建体的单拷贝事件相比,损伤增加。表28。

[0487] 表28.在2240g ae/ha草甘膦比率下,含有TraP4的事件显示的平均损伤为37.5%而含有TraP8和TraP23的事件显示的平均损伤分别为9.3%和9.5%

[0488]

TraP4::dgt-28 (pDAB107543)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	2	2	0	18.0	8.1	10-25
1120 g ae/ha	1	3	0	24.5	4.9	18-30
2240 g ae/ha	0	3	1	37.5	6.5	30-45
4480 g ae/ha	0	2	2	42.5	2.9	40-45

[0489]

TraP8::dgt-28 (pDAB107545)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	3.3	3.9	0-8
1120 g ae/ha	4	0	0	6.5	1.7	5-8
2240 g ae/ha	4	0	0	9.3	3.0	5-12
4480 g ae/ha	2	2	0	17.5	6.5	10-25
TraP23::dgt-28 (pDAB107553)	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	4	0	0	10.0	1.6	8-12
1120 g ae/ha	4	0	0	8.8	3.0	5-12
2240 g ae/ha	4	0	0	9.5	4.2	5-15
4480 g ae/ha	4	0	0	15.8	1.5	15-18
Petite havana	%损伤			%损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
560 g ae/ha	0	0	4	85.0	4.1	80-90
1120 g ae/ha	0	0	4	91.3	2.5	90-95
2240 g ae/ha	0	0	4	94.5	3.3	90-98
4480 g ae/ha	0	0	4	98.3	2.4	95-100

[0490] 这些结果表明,dgt-28对高达4480g ae/ha的草甘膦具有耐受性,并且显示了各种与dgt-28基因连锁的叶绿体转运肽序列提供的耐受性的差异。

[0491] Dgt-28在T₂代中对更高比率草甘膦的保护对每个构建体的2-3个T₂品系进行25株植物后代测试。根据在前一代中完成的合子型分析选择纯合品系。如前所述地对种子进行灭菌、播种和移植。然后用280g ae/ha Ignite 280SL喷洒所有植物,如前所述地选择pat选

择标志物。3DAT后,对抗性和敏感性植物进行计数。所测试的全部品系对每个构建体均没有分离,从而确认了T₂代的纯合品系,并证明dgt-28在烟草中可以孟德尔遗传至少2代。

[0492] 如前所述地对2-3叶烟草施用比率范围为420-3360g ae/ha草甘膦的DURANGO DMA™。14DAT的目测损伤数据确认了在T₁代中证明的耐受性结果。来自含有TraP4的构建体的二拷贝品系的叶数据表明,单拷贝的TraP8和TraP23品系具有相似的耐受性(数据未显示)。

[0493] 表29. 来自含有TraP4与dgt-28的构建体的单拷贝系与来自含有TraP8和TraP23与dgt-28的构建体的品系相比,显示损伤增加

[0494]

TraP4::dgt-28 (pDAB107543)	%损伤			% 损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	0	4	0	23.8	4.8	20-30
840 g ae/ha	0	4	0	30.0	4.1	25-35
1680 g ae/ha	0	4	0	35.0	5.8	30-40
3360 g ae/ha	0	4	0	31.3	2.5	30-35
TraP8::dgt-28 (pDAB107545)	%损伤			% 损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha	4	0	0	2.5	2.9	0-5
1680 g ae/ha	4	0	0	9.3	3.4	5-12
3360 g ae/ha	4	0	0	10.5	1.0	10-12
TraP23::dgt-28 (pDAB107553)	%损伤			% 损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	4	0	0	0.0	0.0	0
840 g ae/ha	4	0	0	6.3	2.5	5-10
1680 g ae/ha	4	0	0	10.0	0.0	10
3360 g ae/ha	3	1	0	13.8	4.8	10-20
Petite havana	%损伤			% 损伤		
施用比率	<20%	20-40%	>40%	平均	标准差	范围(%)
0 g ae/ha草甘膦	4	0	0	0.0	0.0	0
420 g ae/ha	0	0	4	95.0	0.0	95
840 g ae/ha	0	0	4	98.8	1.0	98-100
1680 g ae/ha	0	0	4	99.5	1.0	98-100
3360 g ae/ha	0	0	4	100	0.0	100

[0495] 这些结果表明,与非转化对照相比,dgt-28烟草在2代内对高达3360gae/ha的草甘膦具有强耐受性。

[0496] 在施用草甘膦之前从每个事件的所选植株采样,用于通过标准DGT-28ELISA分析DGT-28蛋白。数据表明,在各构建体中,简单(1-2个拷贝)品系的DGT-28蛋白平均表达量范

围是72.8–114.5ng/cm²。该数据表明,dgt-28在T₂代转化烟草中表达蛋白,并且耐受性数据确认了有功能的DGT-28蛋白。

[0497] 在烟草(Petit Havana栽培种)中叠加dgt-28以增加除草剂谱对纯合dgt-28(pDAB107543和pDAB107545)和aad-12v1(pDAB3278)植物(对于后者,见PCT/US2006/042133)进行相互杂交,并收集F₁种子。对来自每个基因的2次相互杂交的F₁种子进行层积,并用1120g ae/ha草甘膦(对dgt-28基因具有选择性),1120g ae/ha 2,4-D(对aad-12基因具有选择性),或所述比率的两种除草剂的桶混合物,对每个杂交的6个重复实验进行处理。在14DAT对植物进行评级。喷洒结果如表30所示。

[0498] 表30.F₁aad-12和dgt-28的响应

[0499]

	<i>aad-12</i> TraP4:: <i>dgt-28</i>	<i>aad-12</i> TraP8:: <i>dgt-28</i>	<i>Petite</i> <i>havana</i>
施用比率	耐受性		
1120 g ae/ha 2,4-D	++++	++++	-
1120 g ae/ha 草甘膦	++	++	-
1120 g ae/ha 2,4-D + 1120 g ae/ha 草甘膦	++	++	-

[0500] 结果确认dgt-28能够与aad-12(v1)成功叠加,从而增加可用于感兴趣的作物的除草剂谱(草甘膦+苯氧乙酸,分别对于dgt-28和aad-12)。在存在难以控制的阔叶杂草或者抗性杂草生物型的作物生产中,叠加可用作杂草控制和感兴趣的作物保护的手段。其他的输入或输出性状也可以和dgt-28基因叠加。

[0501] 在小麦中对草甘膦的抗性 编码DGT-28的双元载体的产生 设计含有DGT-28表达盒和PAT选择盒的双元载体,并用本领域公知的手段和技术进行组装。每个DGT-28表达盒包含:启动子,来自玉米泛素(Ubi)基因的5'非翻译区和内含子(Toki et al., Plant Physiology 1992,1001503-07),随后是编码序列,其由与人工版本的5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶基因(DGT-28)的5'端融合的4种转运肽(TraP4, TraP8, TraP23或TraP5)之一构成,其经过了密码子优化以便于在植物中表达。DGT-28表达盒以一个3'非翻译区(UTR)终止,该3'UTR包含来自玉米脂肪酶基因(Vp1)的转录终止子和多聚腺苷酸化位点(Paek et al., Mol. Cells 199830;8(3) 336-42)。PAT选择盒包括启动子、来自水稻肌动蛋白(Act1)基因的5'非翻译区、和内含子(McElroy et al., The Plant Cell 19902(2) 163171),随后是人工版本的从绿色产色链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)分离的膦丝菌素乙酰转移酶基因(PAT),其经过了密码子优化,以便在植物中表达。PAT基因编码一个蛋白质,其赋予对谷氨酰胺合成酶抑制剂(包括草铵膦、草胺膦和双丙氨磷)的抗性(Wohlleben et al., Gene 1988,70(1), 25-37)。该选择盒以3'UTR结尾,该3'UTR包含来自花椰菜花叶病毒(CaMV)35S基因的转录终止子和多聚腺苷酸化位点(Chenault et al., Plant Physiology 1993101(4), 1395-1396)。

[0502] 选择盒由商业基因合成公司(GeneArt, Life Technologies)合成,并克隆到Gateway双元载体中。将DGT-28表达盒亚克隆到pDONR221中。使用所得入门克隆与编码膦丝菌素乙酰转移酶(PAT)表达盒的Gateway双元载体进行LR Clonase II(Invitrogen, Life

Technologies) 反应。通过使用得自于New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) 和Promega (Promega Corporation, WI) 的限制性核酸内切酶对经纯化的DNA进行限制性消化, 对所有组装质粒的集落进行初始筛选。质粒DNA的制备用QIAprep Spin Miniprep试剂盒 (Qiagen, Hilden) 或Pure Yield Plasmid Maxiprep系统 (Promega Corporation, WI) 按照制造商的使用说明进行。对选出的克隆的质粒DNA用ABI Sanger测序和Big Dye Terminator v3.1循环测序规程 (Applied Biosystems, Life Technologies) 进行测序。使用Sequencher™软件 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) 组装和分析序列数据。

[0503] 将所得的4个二元表达克隆: pDAS000122 (TraP4-DGT28), pDAS000123 (TraP8-DGT28), pDAS000124 (TraP23-DGT28) 和pDAS000125 (TraP5-DGT28) 各自转化进入根癌土壤杆菌菌株EHA105。

[0504] 用dgt-28表达构建体产生转基因小麦事件 通过土壤杆菌介导的转化使用供体小麦品系Bobwhite MPB26RH, 按照与Wu et al., Transgenic Research 2008, 17:425-436相似的规程, 产生表达4种DGT-28表达构建体其中之一的转基因小麦植物。对推定的T₀转基因事件进行草铵膦 (PPT) 耐受性选择 (草铵膦耐受性是由PAT选择标志物赋予的表型), 并转移到土壤中。将T₀植物在温室封闭 (containment) 条件下生长, 并产生T₁种子。总的来说, 每个DGT-28表达构建体产生了大约45个独立的T₀事件。

[0505] T₀小麦dgt-28小麦事件的草甘膦耐受性 让T₀事件在温室中驯化, 生长至从轮生体生出2-4片新的、外观正常的叶片 (即植物已经从组织培养转向温室生长条件)。使植物在25℃温室中12小时补光条件下生长, 直至成熟。如前所述地对在相同条件下生长的T₁植物进行草甘膦耐受性的初始筛选和Taqman分析。数据为确定可用于进一步表征的可遗传T₁事件提供了可能。将6个低拷贝 (1-2个拷贝) 和2个多拷贝T₁事件再次种植在温室条件下, 并生长至3叶期。用420-3360g ae/ha范围的草甘膦商业制剂 (Durango DMATM) 喷洒T₁植物, 该范围能够对非转化小麦品系造成显著损伤。在施用物中添加了2% w/v硫酸铵。致死剂量的定义为导致Bob White MPB26RH非转化对照>75%损伤的比率。施用除草剂。

[0506] 在本实施例中, 利用草甘膦施用来同时确定dgt-28基因在T₁代中的分离以及证明对高水平的草甘膦的耐受性。用处理21天 (DAT) 后目测损伤的分级为单位来表示植物响应。数据显示为展示少于25%目测损伤 (4)、25-50%目测损伤 (3)、50-75%目测损伤 (2) 和大于75%目测损伤 (1) 的个体数的柱状图。为每个用于小麦转化的构建体提供了算术平均和标准差。还在最后一列中为每个比率和转化指示了个体响应的打分范围。野生型, 非转化的小麦 (Bob White MPB26RH栽培种), 用作草甘膦敏感性对照。在T₁代中, 可以获得半合子和纯合子植物用于测试每个事件, 因此每个草甘膦测试比率都包括这些植物。半合子植物将含有纯合子植物一半的基因剂量, 因此在T₁代中可以预期对草甘膦的响应存在差异。

[0507] T₁dgt-28小麦植株的结果证明, 用叶绿体转运肽TraP4, TraP5, TraP8和TraP23实现了对高达3360g ae/ha草甘膦比率的耐受性。表31。数据是低拷贝T₁事件的, 但是代表了每个构建体的群体。

[0508] 表31. 低拷贝T₁dgt-28小麦事件在处理21天对草甘膦的响应

[0509]

TraP4::<i>dgt-28</i>	%损伤				%损伤		
施用比率	<25%	25-50%	50-75%	>75%	平均	标准差	范围(%)
420 g ae/ha	5	0	0	0	4.00	0.00	4
840 g ae/ha	6	2	0	0	3.75	0.46	3-4
1680 g ae/ha	4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
3360 g ae/ha	4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
TraP8::<i>dgt-28</i>	%损伤			%损伤	%损伤		

[0510]

施用比率	<25%	25-50%	50-75%	>75%	平均	标准差	范围(%)
420 g ae/ha	5	3	0	0	3.63	0.52	3-4
840 g ae/ha	3	5	0	0	3.38	0.52	3-4
1680 g ae/ha	4	3	0	0	3.57	0.53	3-4
3360 g ae/ha	5	5	0	0	3.50	0.53	3-4
TraP23::<i>dgt-28</i>	%损伤			%损伤	%损伤		
施用比率	<25%	25-50%	50-75%	>75%	平均	标准差	范围(%)
420 g ae/ha	9	2	0	0	3.82	0.40	3-4
840 g ae/ha	8	1	0	0	3.89	0.33	3-4
1680 g ae/ha	7	5	0	0	3.58	0.0	3-4
3360 g ae/ha	8	2	0	0	3.80	4.8	3-4
TraP5::<i>dgt-28</i>	%损伤			%损伤	%损伤		
施用比率	<25%	25-50%	50-75%	>75%	平均	标准差	范围(%)
420 g ae/ha	5	2	0	0	3.71	0.49	3-4
840 g ae/ha	4	2	0	0	3.67	0.52	3-4
1680 g ae/ha	7	3	0	0	3.70	0.48	3-4
3360 g ae/ha	6	0	0	0	4.00	0.00	3-4
Bobwhite MPB26RH	%损伤			%损伤	%损伤		
施用比率	<25%	25-50%	50-75%	>75%	平均	标准差	范围(%)
420 g ae/ha	0	1	1	10	1.25	0.62	1-3
840 g ae/ha	0	0	0	10	1.00	0.00	1
1680 g ae/ha	0	0	0	12	1.17	0.58	1-3
3360 g ae/ha	0	0	0	10	1.00	0.00	1

[0511] 在21DAT,对抗性和敏感性植株进行计数,确定了通过卡方分析确定作为单一座位显性孟德尔性状(3R:1S)分离的品系的百分比。表32.这些数据证明,*dgt-28*是一种在单子叶物种中可以遗传的强草甘膦抗性基因。

[0512] 表32.基于420-3360g ae/ha范围的草甘膦选择,按构建体别的显示孟德尔方式可遗传性的T₁*dgt-28*事件的百分比

[0513]

构建体ID	CTP:GOI	作为单一座位分离的测试T ₁ 事件的%	作为2个座位分离的测试T ₁ 事件的%	测试的T ₁ 事件数目
pDAS000122	TraP4:: <i>dgt-28</i>	62.5%	37.5%	8
pDAS000123	TraP8:: <i>dgt-28</i>	87.5%	12.5%	8
pDAS000124	TraP23:: <i>dgt-28</i>	12.5%	87.5%	8
pDAS000125	TraP5:: <i>dgt-28</i>	62.5%	0.0%	8

[0514] 实施例4:用于在玉米中表达农艺学上重要的转基因的嵌合叶绿体转运肽 (TraP) 序列

[0515] Cry2Aa:

[0516] 来自苏云金芽孢杆菌的Cry2Aa蛋白已被证明具有针对棉铃虫 (CEW) 和欧洲玉米螟 (ECB) 的活性。在玉米中对cry2Aa基因的一个为玉米偏好调整了密码子的版本 (SEQ ID NO: 10) 进行了试验。在该实验中,在玉米中,对单独的Cry2Aa与TraP8嵌合叶绿体转运肽结合的Cry2Aa进行了评估,以确定昆虫耐受性活性和评估TraP8v2嵌合叶绿体转运肽序列在玉米中是否会对Cry2Aa蛋白的表达有影响。

[0517] 将含有TraP8v2嵌合叶绿体转运肽序列 (SEQ ID NO:8) 和一个GCA密码子接头的pDAB109807构建体克隆在cry2Aa基因的上游,并纳入到构建体pDAB109807中(图11),用于在玉米植物中进行昆虫耐受性测试。所得构建体含有2个植物转录单元 (PTU)。第一个PTU由玉米泛素1启动子 (ZmUbi1启动子;Christensen,A.,Sharrock R.,and Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes:structure,thermal perturbation of expression and transcript splicing,and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation,Plant Molecular Biology,18:675-689)、TraP8-cry2Aa融合基因 (TraP8Cry2Aa)、和玉米脂肪酶3'非翻译区 (ZmLip 3'UTR;美国专利No 7,179,902) 构成。通过限制酶消化和测序确认了各构建体。第二个PTU包含甘蔗杆状病毒启动子 (SCBV启动子;美国专利No.6,489,462),含有MSV前导序列和醇脱氢酶1内含子6的aad-1除草剂耐受性基因 (AAD-1;美国专利No.7,838,733,和MSV前导序列;Genbank登录号No.FJ882146.1,和醇脱氢酶1内含子;Genbank登录号No.EF539368.1),以及玉米脂肪酶3'非翻译区 (ZmLip 3'UTR)。还构建了一个对照质粒并加入研究中,pDAB107687,其不含有位于cry2Aa基因上游的叶绿体转运肽序列(图12)。将该质粒导入根癌土壤杆菌中用于植物转化。

[0518] 在授粉后大约10-12天从玉米栽培种B104采集穗。对穗进行去壳和表面灭菌,方法是在20%市售漂白剂 (Ultra **Clorox**® Germicidal Bleach,6.15%次氯酸钠) 和两滴吐温20中浸泡穗20分钟,随后在层流罩内用无菌去离子水漂洗3次。从每个穗无菌切出未成熟的合子胚 (1.8-2.2mm长),并分配到一个或多个含有2.0ml土壤杆菌悬浮液的微离心管中,其中添加了2μl 10% **Break-Thru**® S233表面活性剂。

[0519] 胚分离完成后,封闭含有胚的试管,并置于摇动平台上5分钟。然后将管中的内容物倾倒入共培养培养基平板上,用无菌一次性移液管除去液体土壤杆菌悬液。将含有胚的共培养平板放置在层流罩的背面,并使盖半开30分钟;之后用显微镜将胚定向成盾片朝上。然后,将含有胚的共培养平板返回到层流罩的背面,使盖半开再维持15分钟。然后将平板封闭,用3M微孔胶带密封,并放置在培养箱中,25℃,24小时/天光照,光强为大约60μmolm⁻²s

-1。

[0520] 共同培育期之后,将胚转移到恢复培养基中。每个平板转移不超过36个胚。将平板用3M微孔胶带包裹,并在27℃温育7-10天,期间24小时/天光照,光强为大约 $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。然后将愈伤胚(callused embryos)转移到选择I培养基上。向每个选择I平板中移入不超过18个愈伤胚。将板用3M微孔胶带包裹,并在27℃温育7天,期间24小时/天光照,光强为大约 $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。然后将愈伤胚转移到选择II培养基中。向每个选择II培养基平板中移入不超过12个愈伤胚。将板用3M微孔胶带包裹,并在27℃温育14天,期间24小时/天光照,光强为大约 $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。

[0521] 在此阶段,将抗性愈伤组织转移到预再生培养基。向每个预再生培养基平板中移入不超过9个愈伤组织。将板用3M微孔胶带包裹,并在27℃温育7天,期间24小时/天光照,光强为大约 $50\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。然后将预再生的愈伤组织转移到含再生培养基的Phytatrays™中,在28℃温育7-14天或直至抽芽发生,每天16小时光照/8小时黑暗,光强为大约 $150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。每个Phytatray™中放置不超过5个愈伤组织。然后分离具有初生根的小抽芽,并转移到抽芽/根培养基。将大约6cm或者更高的生根幼苗转移到土壤中,并移出到用于晾苗(hardening off)的生长室中。

[0522] 为各转基因植物指配唯一的标识,并定期转移到温室中。将植物从Phytatrays™移植到充满生长培养基(Premier Tech Horticulture, ProMix BX, 0581P)的小盆(T.O. Plastics, 3.5英寸(8.89厘米)SVD, 700022C)中,并用保湿盖覆盖,以帮助植物驯化。将植物置于Convicon™生长室内(28℃/24℃, 16-小时光周期, 50-70%RH, $200\mu\text{mol}$ 光强度),直至达到V3-V4期。这帮助了植株适应土壤和更严苛的温度。然后,将植株移至温室中(光暴露类型:照射(Photo)或同化(Assimilation);高光限(High Light Limit):1200PAR;16-小时日长;27℃白天/24℃夜晚),并从小盆移植到5.5英寸(13.97厘米)盆中。移植到更大盆后大约1-2周,对植物进行采样进行生物测定。每个事件对一个植物进行生物测定。

[0523] 根据基因的拷贝数、Western印迹的蛋白检测和针对生物测定昆虫的活性来辨识选定的事件,并推进到下一代。对含有壮观霉素抗性基因的事件加以记录,但是一定将它们从推进到下一代的范围内排除。将选出用于推进的事件移植到5加仑(19L)盆中。周期性观察以监视任何异常的表型。在长出须之前,在抽芽上方放置芽袋(Shoot bag),防止飘来花粉的交叉污染。记录任何在覆盖之前产生了须的抽芽,并除去该抽芽。然后覆盖第二个抽芽,并用于授粉。在数据库中记录下产生了异常抽芽或无抽芽的植物。在授粉前一天,修剪须以提供平齐的刷(brush)来接受花粉,并且对植物进行自花授粉。

[0524] 用于T₁筛选的植物在播种后7天进行喷洒。它们在含有Metro 360盆栽土的4英寸盆(10.16厘米)中生长,每个浅箱15个盆。苗生长期为V1-V1.5。对萌发差或含有极小植物(轮生体依然关闭)的盆做标记,以免将它们纳入选择评估。然后将整个浅箱的植物置于第二载体托盘内,用履带式喷洒器施用。每次在Mandel履带式喷洒器中放置2个托盘,并校准喷洒器使之用8002E T形喷嘴(Tee Jet)向靶区域输送187L/ha的量。配制35g ae/ha Assure II(精喹禾灵)+1%COC(作物油浓缩物)溶液用于施用。使用15mls./喷洒体积计算所需的总喷洒溶液。计算: $(35\text{g ae/ha}) \times (1\text{ha}/187\text{L}) \times (1\text{L}/97.7\text{g ae Assure II}) = 0.192\%$ 溶液或28.74μl/15ml H₂O+1%v/v)。施用后,将植物在喷洒实验室内干燥1小时,然后返回到温室中。移植到大盆大约1-2周后,对植物进行采样,用于生物测定。每个事件使用一个植

物进行生物测定。

[0525] 对通过了分子分析筛选的所有T₀事件分析Cry2Aa蛋白表达水平。来自对照构建体pDAB107687——其包含不带TraP的Cry2Aa——的事件,其Cry2Aa的平均表达水平(15.0ng/cm²)比来自含有TraP8的Cry2Aa的pDAB109807事件(5.0ng/cm²)显著更高。尽管pDAB109807事件的表达水平降低,但是这些事件仍然表达Cry2Aa蛋白。

[0526] 还对T₁事件进行了Cry2Aa蛋白表达水平分析。来自对照构建体pDAB107687(包含不带TraP的Cry2Aa)的事件的Cry2Aa的平均表达水平(55和60ng/cm²)比来自含有TraP8的pDAB109807事件(大约20–40ng/cm²)显著更高。尽管spDAB109807事件的表达水平降低,但是这些事件仍然表达了Cry2Aa蛋白。

[0527] 在用转基因植物的叶片喂养新生鳞翅目幼虫的生物测定中,对含有单个Bt基因的T-链的转基因植物的杀昆虫活性进行了测试。所测定的鳞翅目物种是欧洲玉米螟(*Ostrinia nubilalis* (Hübner)) (ECB) 和玉米穗虫(美洲棉铃虫(*Helicoverpa zea*) (CEW))。

[0528] 32孔托盘(C-D International, Pitman, NJ)用2%琼脂溶液部分填充,并让琼脂固化。从每株植物获取叶片切片,大致1in²,并单个放置在32孔托盘的孔中。每孔放置一个叶片,每个植物、每种昆虫测试2个叶片。昆虫用画笔集中播撒(mass-infested),每个孔中放置10个新生幼虫。托盘用穿孔粘盖密封,这使其在测试期间保持通气。将托盘置于28℃, 40%RH, 16小时光照:8小时黑暗,历时3天。测试期结束后,对每个叶片进行简单的百分比损伤评分。将每个测试的损伤评分取平均,与蛋白表达分析一起用于进行相关性分析。

[0529] T₀和T₁生物测定的结果表明,TraP8嵌合叶绿体转运肽序列是有功能的,因为pDAB109807事件提供了针对所测试昆虫的保护。在T₁事件中,对所有测试的昆虫种,表达不带TraP的Cry2Aa蛋白的植物(pDAB107687)的平均叶损伤与表达带有TraP8的Cry2Aa蛋白的植物(pDAB109807)无显著差异。这些结果是出人预料的,因为表达不带TraP的Cry2Aa蛋白(pDAB107687)的植物表达该蛋白的水平比表达带有TraP8的Cry2Aa(pDAB109807)的植物更高。

[0530] VIP3Ab1:

[0531] 来自苏云金芽孢杆菌的vip3Ab1蛋白已被证明具有针对美洲棉铃虫(CEW)和秋粘虫(FAW)和耐性秋粘虫(rFAW)的活性。在玉米中表达了vip3Ab1v6(SEQ ID NO:11)和vip3Ab1v7(SEQ ID NO:12)基因,并进行了昆虫耐受性测试。在该实验中,在玉米中评估了单独的vip3Ab1v6和vp3Ab1v7以及它们与TraP8嵌合叶绿体转运肽结合的形式,以确定昆虫耐受活性,和评估TraP8v2嵌合叶绿体转运肽序列对vip3Ab1v6和vp3Ab1v7蛋白表达的影响。

[0532] pDAB111481(图13)构建体含有Trap8v2嵌合叶绿体转运肽编码核苷酸序列(SEQ ID NO:8),和克隆在vip3ab1v6基因上游的GCA密码子接头,并在玉米植株中测试昆虫耐受性。所得构建体含有2个植物转录单元(PTU)。第一个PTU包括玉米泛素1启动子(ZmUbi1启动子;Christensen, A., Sharrock R., and Quail P., (1992) Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, Plant Molecular Biology, 18:675–689)、TraP8–vip3ab1v6融合基因(TraP8–Vip3Ab1v6)、和玉米

过氧化物酶5的3'非翻译区(ZmPer 5 3'UTR)。对该构建体通过限制酶消化和测序进行了确认。第二个PTU包括甘蔗杆状病毒启动子(SCBV启动子;美国专利No.6,489,462)、含有MSV前导序列和醇脱氢酶1内含子6的aad-1除草剂耐受基因(AAD-1;美国专利No.7,838,733,和MSV前导序列;Genbank登录号No.FJ882146.1,和醇脱氢酶内含子;Genbank登录号No.EF539368.1)、和玉米脂肪酶3'非翻译区(ZmLip 3'UTR)。构建了一个对照质粒pDAB111479并纳入本研究,其在Vip3Ab1v6基因的上游其不含有叶绿体转运肽序列(图14)。将质粒引入到根癌土壤杆菌中用于植物转化。

[0533] 对于含有Trap8v2嵌合叶绿体转运肽序列(SEQ ID NO:8)、和克隆在vip3ab1v7基因上游的GCA密码子接头的pDAB111338(图15)构建体,在玉米植株中对其进行了昆虫耐受性测试。所得的构建体含有2个植物转录单元(PTU)。第一个PTU由玉米泛素1启动子(ZmUbi1启动子;Christensen,A.,Sharrock R.,and Quail P.,(1992)Maize polyubiquitin genes:structure,thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation, Plant Molecular Biology,18:675-689)、TraP8-Vip3Ab1v7融合基因(TraP8-vip3ab1v7)、和玉米过氧化物酶5的3'非翻译区(ZmPer 5 3'UTR)构成。该构建体通过限制酶消化和测序进行了确认。第二个PTU的组成为甘蔗杆状病毒启动子(SCBV启动子;美国专利No.6,489,462)、含有MSV前导序列和醇脱氢酶1内含子6的aad-1除草剂耐受基因(AAD-1;美国专利No.7,838,733,和MSV前导序列;Genbank登录号No.FJ882146.1,和醇脱氢酶内含子;Genbank登录号No.EF539368.1)、和玉米脂肪酶3'非翻译区(ZmLip 3'UTR)。构建了对照质粒pDAB112710并纳入研究中,其在Vip3Ab1v7基因的上游不含有叶绿体转运肽序列(图16)。将质粒引入到根癌土壤杆菌中用于植物转化。

[0534] 按照前文所述地完成玉米转化、蛋白表达和昆虫生物测定,结果如表33所示。昆虫生物测定的结果表明,TraP8嵌合叶绿体转运肽序列是有功能的,并且pDAB111338和pDAB111481事件提供了针对在生物测定中测试的昆虫的保护。在被测试的事件中,表达没有TraP的Vip3Ab1蛋白的植物事件(pDAB112710和pDAB111479)与表达具有TraP8的Vip3Ab1蛋白的植物事件(pDAB111338和pDAB111481)相比,其平均叶损伤并没有显著不同。总之,Western印迹和生物测定表明,测试事件的所有pDAB111338和pDAB111481均表达了Vip3Ab1蛋白。

[0535] 表33.与TraP8融合的Vip3Ab1v6和Vip3Ab1v7编码序列的生物化学和生物测定结果,与不具有叶绿体转运肽序列的Vip3Ab1v6和Vip3Ab1v7编码序列进行比较

[0536]

质粒	描述	生物化学分析结果			生物测定结果						
		平均表达	分析方法 ELISA (ng/cm ²) LC/MS/MS (fmole/cm ²)	Western 阳性事件	测试的事件数	总 CEW 损伤	CEW 平均%叶损伤	总 FAW 损伤	FAW 平均%叶损伤	总 rFAW 损伤	rFAW 平均%叶损伤
pDAB111479	Vip3Ab1 v6 No TraP	59	ELISA	14/17	19	205.0	10.8	368.0	19.4	325.0	17.1
pDAB111481	Vip3Ab1 v6 TraP8 v2	239	ELISA	4/4	17	124.0	7.3	110.0	6.5	77.0	4.5
pDAB112710	Vip3Ab1 v7 No TraP	143	ELISA	18/20	20	79.0	4.0	107.0	5.4	117.0	5.9
pDAB111338	Vip3Ab1 v7 TraP8 v2	180	ELISA	5/6	9	63.0	7.0	99.0	11.0	111.0	12.3

[0537] 实施例5:嵌合叶绿体转运肽(TraP)序列的植物内(in Planta)切割

[0538] 通过MALDI谱和N端Edman降解测序对TraP8和TraP9嵌合叶绿体转运肽的切割位点进行了测定。从含有TraP8-dgt14, TraP8-dgt28, TraP9-dgt14, 和TraP9-dgt28融合基因的转基因植物获得植物材料, 并进行测定以确定嵌合叶绿体转运肽在叶绿体内转位期间发生的切割的位点。

[0539] MALDI结果:

[0540] 对来自植物样品的半纯化蛋白通过SDS-PAGE进行分离。从凝胶切下大小与YFP分子量相当的蛋白条带, 脱色并干燥。接着, 用溶于25mM碳酸氢铵中的胰蛋白酶(Promega; Madison, WI) 在37℃对干燥的蛋白条带进行过夜胶内消化。通过C18ZipTip™(Millipore, Bedford, MA) 纯化肽, 并用50%乙腈/0.1%TFA洗脱。将样品与基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸以1:1的比率混合, 将混合物转移到MALDI样品板上, 并风干。

[0541] 使用Voyager DE-PRO MALDI-TOF Spectrometer™(Applied Biosystems; Framingham, MA) 产生肽质谱。使用Calibration Mixture 2™(Applied Biosystems) 进行外部校准。使用m/z 842.508, 1045.564和2211.108的胰蛋白酶自溶峰进行内部校准。所有的质量谱用正离子反射模式收集。用Proteometrics LLC的PAWS™(Protein Analysis WorkSheet) 免费软件实施肽质量指纹(PMF) 分析, 通过将样品的PMF与靶蛋白的理论PMF进行匹配来确认样品是否为靶蛋白。蛋白鉴定通过用MASCOT(MatrixScience, London, UK) 针对NCBI NR蛋白数据库进行数据库搜索加以实施。

[0542] 通过Edman化学降解进行N-端测序

[0543] 在Applied Biosystems公司(Foster City, CA) 的Procise蛋白测序仪(model494) 上进行N端测序。蛋白样品首先通过SDS-PAGE进行分离, 然后印迹到PVDF膜上。从膜上切下蛋白条带, 并加载到Procise测序仪中。为每个样品运行8个循环的Edman化学降解, 从而获

得N端的5个氨基酸残基。与每个样品同时运行20种PTH-氨基酸的标准混合物 (Applied Biosystems)。来自每次Edman降解的氨基酸残基根据它们在C-18柱上的保留时间,并与标准物进行比对,来予以确定。

[0544] MALDI测序的结果表明,DGT-28和DGT-14蛋白有表达,并且TraP嵌合叶绿体转运肽序列被加工掉。表34列出了使用N端Edman降解和MALDI测序得到的加工序列。

[0545] 表34. 与dgt-14或dgt-28编码序列融合的TraP8和TraP9的切割位点。灰框指示剪接位点

[0546]

构建体	序列														有剪接的序列数
TraP8-DGT 14v2	S	V	I	R	P	V	K	A							66/67
										A	S	T	G	G	
TraP8-DG T28v1	S	V	I	R	P	V	K	A							66/67
										A	R	G	M	P	
TraP9-DG T14v2	K	V	T	A	S	V	S	A							62/63
					S	V	S	A		A	S	T	G	G	
TraP9-DG T28v1	K	V	T	A	S	V	S	A							--
					S	V	S	A		A	R	G	M	P	

序列表

<110> Lira, Justin
Cicchillo, Robert
Yarkes, Carla
Robinson, Andrew

<120> 人造的芸苔属衍生的叶绿体转运肽

<130> 2971-P10294.1US (69717)

<160> 66

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 69
<212> PRT
<213> 欧洲油菜

<400> 1

Met Ala Gln Ser Ser Arg Ile Cys His Gly Val Gln Asn Pro Cys Val
1 5 10 15

Ile Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Asn Gln Asn Lys Ser Pro Phe Ser
20 25 30

Val Ser Leu Lys Thr His Gln Pro Arg Ala Ser Ser Trp Gly Leu Lys
35 40 45

Lys Ser Gly Thr Met Leu Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val Lys Val
50 55 60

[0001]

Thr Ala Ser Val Ser
65

<210> 2
<211> 61
<212> PRT
<213> 欧洲油菜

<400> 2

Met Ala Gln Ala Ser Arg Ile Cys Gln Asn Pro Cys Val Ile Ser Asn
1 5 10 15

Leu Pro Lys Ser Asn His Arg Lys Ser Pro Phe Ser Val Ser Leu Lys
20 25 30

Thr His Gln Gln Gln Arg Arg Ala Tyr Gln Ile Ser Ser Trp Gly Leu
35 40 45

Lys Lys Ser Asn Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val Lys
50 55 60

<210> 3
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP8 嵌合叶绿体转运肽

<400> 3

Met Ala Gln Ser Ser Arg Ile Cys His Gly Val Gln Asn Pro Cys Val
1 5 10 15

Ile Ile Ser Asn Leu Ser Lys Ser Asn Gln Asn Lys Ser Pro Phe Ser
20 25 30

Val Ser Leu Lys Thr His Gln Gln Gln Arg Arg Ala Tyr Gln Ile Ser
35 40 45

Ser Trp Gly Leu Lys Lys Ser Asn Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val
50 55 60

Lys
65

<210> 4
<211> 65
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP9 嵌合叶绿体转运肽

<400> 4

Met Ala Gln Ala Ser Arg Ile Cys Gln Asn Pro Cys Val Ile Ser Asn
1 5 10 15

Leu Pro Lys Ser Asn His Arg Lys Ser Pro Phe Ser Val Ser Leu Lys
20 25 30

Thr His Gln Pro Arg Ala Ser Ser Trp Gly Leu Lys Lys Ser Gly Thr
35 40 45

[0002]

Met Leu Asn Gly Ser Val Ile Arg Pro Val Lys Val Thr Ala Ser Val
50 55 60

Ser
65

<210> 5
<211> 195
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 TraP8 的多核苷酸

<400> 5
atggetcaat cttctaggat ttgcccaggt gttcaaaacc ctgctgigat catctctaac 60
ctttccaagt ccaaccagaa caagtctctt ttcagcgttt ctcttaagac tcatcagcaa 120
cagagaaggg cttaccagat ttcttcattg ggactcaaga agtctaacaa cggactctgt 180
atcagacctg tgaag 195

<210> 6
<211> 195
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码 TraP9 的多核苷酸

<400> 6
atggetcaag cttctagaat ttgcccagaa ccttgcgtta ttccaacct ccttaagctt 60
aaccatagga agtctccatt ctccgtttct ctaagacac atcagccctag agcttcctct 120
tggggactta agaaaicgg aaccatgcct aacggactct ttaicaggcc tgtaagggtt 180

	accgcttctg tgtct	195
	<210> 7	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Linker	
	<400> 7	
	gtttcttct	9
	<210> 8	
	<211> 195	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 TraP8 v2 的多核苷酸	
	<400> 8	
	atggctcaat ctacacagaat ctgccacggt gtgcagaacc catgttgat catlccaat	60
	ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcc tctcagtc gcccaagac tcaccagcag	120
	cagcgctcgt ctaccagat atctagctgg ggaligaaga agtcaacaa cgggtccgtg	180
	atcgtccgg ttaag	195
	<210> 9	
	<211> 195	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 TraP9 v2 的多核苷酸	
	<400> 9	
	atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgttga tatccaatct ccccaaaagc	60
	aaccaccgtg agtcccttt ctcgtctca ctcaagacc atcagcctag agcccttca	120
	tggggactta agaagctgg caccatgctg aacggttcag tgattagacc cgtaaggig	180
	acagcttctg ttctc	195
	<210> 10	
	<211> 1902	
	<212> DNA	
	<213> 苏云金芽孢杆菌	
	<400> 10	
	atgaacaacg ttctcaactc tgggagaacc accatctcg agcggtacaa tgggtggca	60
	cacgacccat tctcattga gcacaagac ctggatacga tcagaaaga gggatggaa	120
	tggaaaagga cggaccattc ctgtacgtt gctccagtgg tgggcactgt gtctctcttc	180
	ctctcaaga aagtggtgtc gctgacggg aagcggatc tctccgaact ctggggaatc	240
	atctttcgt ctggtcaac aaacttgaig caagacatac tgagagagac tgagcagtc	300
	tigaatcaga ggcigaatac ggacacgtg gcgagggtga acgtgaact cattggctc	360
	caagcgaaca tiagagagtt caatcagcaa gtigataact ttctgaacc cacacagaat	420
	ccagtgcctc tgtccatcac atcatctgtg aacacaaigc agcagctgt ctigaatagg	480
	ctgccacagt ttcatatca agctataca ctgtctcttc tgcctctgt tgcctaaagt	540
	ggaacatgc acccagctt catcagagac gtgattctga acgcagatga gtggggaatc	600
	agcgtgcca ctgtgaggac ctacagagat tacttgagga actatacag cgattactca	660
	aactactgca tcaacacctc tcaaacagcg tttaggggac ttaacaccag actgcacgac	720

[0003]

	atgcttgagt tccggactta catgttcctc aacgtctttg agtatgtctc gatttggitcc	780
	ctcttcaagt atcagagcct tatggctccc tcgggtgcta acctctacgc ctccgggtcc	840
	ggaccgcagc agaccgcagc attcacigcc cagaactggc caticcctctc cagccttttc	900
	caagtgaaca gcaactacat cttgtctggc atctctggca caaggtctctc tatcacattt	960
	ccgaacattg gggccctgcc tggcctccgc acgacacaca gccccaattc cgcacgcgtc	1020
	aaactactcg gttgggtctc ctccggactc atgggtgcca ctaacttgaa ccaatacttc	1080
	aacgtttcaa cgggtctgcc acccttttca acctcgtttg tcagatcgtg gcttgattct	1140
	ggcactgaca gagaggaggt tggcagcagc accaaciggc agaccgagtc ctccagacc	1200
	acactttcgc tgcgtctcgg tgccttttca gcgaggggaa actcgaacta ctcccgagc	1260
	tactttatcc gcaacattag cggagtcctg tigggtatcc ggaatgagga cctcaccaga	1320
	ccctttcact acaatcagat acgcaacatc gaaagcccat ctgggacacc tggaggtgca	1380
	agggcatact tggttagcgt tcacaaccgg aagaacaaca tctatgtctc taatgagaat	1440
	gggaccatga ttcatcttgc accggaagat tacactggct tcaagatctc acctatccat	1500
	gcacccaag tgaacaacca gactcgcacg ttcatctcag agaagttcgg caaccaaggt	1560
	gacagcctcc gcttcgaaca gacgaacacc acagccagat acacccctag aggcattggc	1620
	aacagctaca atctctatct gaggtgtctc agcatlggca attcgaacct tgggttgacg	1680
	atcaatggtc gcgtttacac ggtctccaac gtcaatcaga ccaataacaa tgatggggtc	1740
	aatgacaatg gtgtctcgtt ctccgacatc aacatcggca acaicgtctc ttcgacaac	1800
	accaatgtta cgtctgacat caatgtcacc tgaactctg gcacaccttt cgatctgatg	1860
[0004]	aacatcatgt ttgtccccac caatcttctt cccctctact ga	1902
<210>	11	
<211>	2364	
<212>	DNA	
<213>	苏云金芽孢杆菌	
<400>	11	
	atgaatatga ataatactaa attaaacgca agagcgcctc ctctgttcat cgactacttc	60
	aacggcatct acggattcgc aaciggatc aaagacaica tgaacaatg ctccaagacg	120
	gacacgggig gaaaicctac attggaatg attctgaaga atcagcagtt gctcaacgaa	180
	atctctggca aactcgacgg agttaacggg tcccttaacg acctcatagc acaaggcaat	240
	cttaatacag agctgtccaa ggagattctc aagattgcca atgagcaaaa tcaagtcttg	300
	aacgaigtca acaacaagct ggacgccatc aacacantgt tgcacatcta tctgccccag	360
	atcacctcta tctctccga tgttatgaag cagaactatg cgtctctcgt tcaagtcgag	420
	tacttgicaa agcaacigaa agagatttcc gacaaacigg atgttatcaa tgttaacgtg	480
	ttagtcaata gcacactgac cgaaatcacc ccagcttata aaaggattaa atactgtaat	540
	gaaaagttcg aggaattaac ctctgctacg gagacaactc tgaagtgaa gaaagattcg	600
	tcaccagccg acattcttga cgagttgacc gaattaaactg aactggcgaa gtccgttaca	660
	aagaatgacg ttgatggcct cgagttctat ctcaatacat tccacgatgt tatgttgggc	720
	aaataicgtt tggagcgtc tgccttgaaa acigccttcg antlaalcgc aaaggaaaac	780
	gttaagacgt cgggttccga ggtcgggaac gtgtacaact tcttgatagt gctcagcgca	840
	ctgcaagcga aagcgtttct caccctgacc acgtgcagaa agttcctggg attggctgat	900
	atcgattata caiccatcat gaacgagcac cttaacaaag aaaaggagga gttcagagtg	960

	aacattcttc caacattgtc caacacattc tccaatccga actacgcaaa ggtgaaaggt	1020
	tctgacgaag atgcaaagat gatcgtcgag gcgaaaccig ggcacgctct ggtcggcttc	1080
	ggattttcca acgaactgat gacggtatta aagggtacg aggciaagtt gaagcaaac	1140
	tatcaagtgg acaaggactc cctttcagag gtagctatt cagatattga caagctgctg	1200
	tgiccggaic aatcigagca aatctactac accaataata tagttttccc taacgaatac	1260
	gtcattacca agattgattt cacgaagaag atgaaaaccc ttagataiga ggttacigcc	1320
	aatagctacg attcatctac ggttgaaac gatcttaaca agaagaaggi tgaalcaagc	1380
	gaagccgagt atcggactct gtcagccaat atgacggig tttacatgcc tcttggigig	1440
	atttcagaga cattccttac accaattaat ggtttcggig tgcagctga tgaaaactcc	1500
	agattaatca ctctgacgig taagtctac ttgagggagt tgcctctcgc cactgafctt	1560
	tccaataaag aaacaaagct gatigticca ccgactctgt tcatctcaaa catttggag	1620
	aacgggaacc tcgaaggcga gaatctcgaa ccgiggatig cgaacaacaa gaacgcttac	1680
	giggatcata ctggagggat caacggcacg aaggctctgt acgtgcataa ggacggagag	1740
	ttctcacagt tctggggigg gaagtigaag agcaagaccg agtacgtcat ccagtacatt	1800
	gigaaggcga aggcctcaat ctatctcaag gataaaaaga atgagaacac tatctacgag	1860
	gaaataaata atgaccttga gggtttccaa acigtgacca agcggttcat aaccggaacg	1920
	gactcttcgc gaatccatct gatctttact tccagaaacg gagaaggctc ttctggtgga	1980
	aaettcatca tccgcgagat ccgcacgtca gaggagtgc tttagccaga attgatcag	2040
	tcggacgctt gggigggaag ccaaggcacg tggatctcgt gcaactccct caccattaat	2100
	tccaacgtga atggcacgtt taggcagaat ctccctcttg agtcttatt aacctatagc	2160
[0005]	atgaacttca cggttaacgg atttgggaag gtagcggicc gcaattctcg cgaggigctc	2220
	tttgaagaat cgtactctca gctctctcca aaggacaica gcgagaagtt caccaccgca	2280
	gcgaataata ctggatttga tctgaacac tcaagatcga ctctgggttg tcaataaac	2340
	tttcgggact tctcaattaa giga	2364
	<210> 12	
	<211> 2364	
	<212> DNA	
	<213> 苏云金芽孢杆菌	
	<400> 12	
	atgaacatga ataatactaa attaaacgcg agggcgcgic cgagcttcat cgactacttc	60
	aacggcatct acggtctcgc caccggcatc aaggacatca tgaacatgat cttaagacg	120
	gataccggcg gcaaccigac ccggacgag atcctgaaga accagcagct gcigaacgag	180
	atcagcggca agctggacgg cgtgaacggc agccgaacg accgatctgc ccaaggcaac	240
	ctgaatacag agctgagcaa ggagatccig aagatcgca acgagcagaa tcaagtgttg	300
	aacgacgiga acaacaagct ggacgcgac aacaccaigc tgcacatcia ctgcccag	360
	atcaccctca tgcctgagcga ctgaltgaag cagaactacg cgcgttccct ccaagtgag	420
	tacctgagca agcagctgaa ggagatcagc gacaagctgg acgtgatcaa cgtgaacgtg	480
	ctgatcaact ccacctgac cgagatcacc ccggcctacc agaggattaa atacgtgaat	540
	gaaaagtctg aggaattaac ctccgccacc gagaccacc tgaaggtaga gaaggacagc	600
	tccccggcgg acatcttga cgagctgacc gaaltaaccg agciggcgaa gtccgtgacc	660
	aagaacgacg tggacggctt cgagtcttac ctgaatacat tccacgacgt gatggggggc	720
	aafaatctgt tggggaggag cgcctcaag accgccagcg aafiaatcgc caaggagAAC	780

	gfcagaccga gggcgagcga ggigggcac gctacaact tccgatcgt gctgaccgcc	840
	ctccaagcga aggcgttctt gacctgacc acctgcccga agcigtctgg cctggcggac	900
	atcgactata catccatcat gaacgagcac ctgaacaagg agaaggagga gticcgcgtg	960
	aacatcctgc cgacctgtc caacacctc agcaaccga actacgcaa ggigaagggg	1020
	lccgacgagg acgcgaagat galcglggag gccaaagccg gccacgcgtt ggigggttc	1080
	gagatcagca acgacagcat gaccgtatca aagggtatcg aggcgaagct gaagcagaac	1140
	taccaagtgg acaaggactc cctgagcggg gtgatctaca ggcacatgga caagctgctg	1200
	tgcccgacc agtcgagca aatctactac accaataata tccgtgtccc gaacgagtac	1260
	gigatcacca agatcgacti caccaagaag atgaaaaccc tgcgctacga agtgaccgcc	1320
	aacagctacg actcctcaac cggcgagatc gaccigaaca agaagaaggt ggaatcaagc	1380
	gaggcggagt accgcacctt gaggcggaat aaigaaggcg tgtacatgcc gctggcgctg	1440
	atctccgaga ccttctgac cccaattaat gggttcggcc tccaagccga tgaanaactc	1500
	agattaatca ccttgaccig caagtcctac ctgagggagc tgcgtctggc gaccgaccig	1560
	agcaataaag agaccaagct gatcgigccg ccgactcctt tcaatccaa catcgiggag	1620
	aacggcaacc tggggggcga gaacctggag ccgtggatcg cgaacaacaa gaacgcgtac	1680
	giggatcaca cgggaggcat caacggcacc aagggtctgt acgtcccaa ggacggcgag	1740
	ttcagccagt tctggggcgg caagctgaag agcaagaccg agtacgigt ccagtacaic	1800
	gtgaagggca aggcctccat ctacctgaag gataaaaaga acgagaactc catctacgag	1860
	gaantaataa atgacctgga gggtctccag accgtgacca agaggttcat caaccgcacc	1920
[0006]	gactctctcg gcatccacct gatcttacc tctcagaacg gcgagggcgc gticggcggc	1980
	aacttcaica tcagcgagat ccgcacctcc gaggagctgc tgtcccggga gctgaicatg	2040
	lccgacgcct gggtgggcga ccaaggcacc tggatctccg gcaactccct gacctataat	2100
	agcaacgtga acggcacctt ccgcagaaac ctgcgctgg agagctacag cactactcc	2160
	atgaacttca ccgigaacgg gticggcaag gtagcgga ggaactcccg cgaggigctg	2220
	ttcgagaagt cctacccgca gctcagcccc aaggacatct cagagaagtt caccaccgcc	2280
	gccataataa ccggccctga cgtggagctg tcaaggagca ccagcgcgcg cgcaataaac	2340
	ttccgcgact tctcaattaa gtag	2364
	<210> 13	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> SVSL 序列	
	<400> 13	
	Ser Val Ser Leu	
	1	
	<210> 14	
	<211> 207	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码欧洲油菜 EPSPS 的多核苷酸	
	<400> 14	
	atggcgcaat ctacgagaat ctgccatggc gtcgagaacc catgigtat catctccaat	60

	ctctccaaat ccaacaaaa caaacacct ttctccgict ccttgaagac gcatacagct	120
	cgagcttctt cgtggggatt gaagaagagt ggaacgaigc taaacggttc tgaatttcgc	180
	ccggtaagg taacagcttc tgtttcc	207
	<210> 15	
	<211> 183	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 Brassica rapa BPSPS 的多核苷酸	
	<400> 15	
	atggcgcaag ctacgagaat ctgccagaac ccatgtgita tctccaatct ccccaaatcc	60
	aaccaccgca aatcgccctt ctctgtctcg ctgaagacgc accagcagca gcgtcgagct	120
	taicagatat ctctgtgggg attgaagaag agtaacaacg gctccgtgat tcttccggtt	180
	aag	183
	<210> 16	
	<211> 1248	
	<212> DNA	
	<213> Streptomyces sviveus	
	<400> 16	
	atgagaggga tgcagacct gtccttacct ggaicaaaga gtaicacagc tagggcactc	60
	ttctttgtcg ctgctgtcga tgggttact acittggiga ggccattgag aagtgcagac	120
	acagaaggat tgcctgaggg gttagttctg ttaggctatc gtgtaggag gacacccgat	180
	acttggcaag tcatggcag accacaagga ccagcagtggt ctgaggtga cgtctactgt	240
[0007]	agagacggag caaccaccgc tagattcttg ccaaccttag cagctgctgg tcacggaaca	300
	tacagatttg atgctcacc acagatgagg agacgtctc ttttgcctt aagcagagcc	360
	ttgaggaatt tgggtgtcga tcttagacac gaagaagctg aaggctatca cctctgact	420
	gtccgtgtcg ctgggttga aggaggagag gtactttgg atgttggtca gtaagtcag	480
	tatctactcg cctttgtgt ccttggctcc ctacaagac aaggactgag gataagggtt	540
	actgatttgg tgcagcacc atacttgag attacgctg caatgaigag gcttttcgga	600
	gttgaaggg caaggaggg agaigtgtc gttgttccac ctggggata tctgtcaact	660
	acgtatgcta tagaaccgca cgcaggaact gcttcttact tcttcgcagc tctgtctttg	720
	actcctggag ctgaagtgc tgtacctggg ttaggcacgg gaggacttca aggagattg	780
	ggattttag atgtcttaag gagaatggga gccgaggtgt ccgtaggagc tgatgaacc	840
	actgttagag gaactgtga attgcgtggc ctacagcca acatgagaga cataagtgat	900
	acgatccga cctctgtgc aatagcacc ttgtctagtg ctccagttag aatcaggat	960
	gttgccaaca ctctgtcaa agaattgac agacttgagg ctgtgcaga gaaccttagg	1020
	aggttgggag taagggttc aacgggtccg gacttgattg agatacacc tggtcagct	1080
	actgtgtctc aagtcacaag ctatgggat cacagaattg tgatgtcatt tgcagtgaat	1140
	ggacttctgt tgcctggat cagcttcgac gacctgggt gtttctgtaa gacttttct	1200
	gggtttcag aggttttcgc agaattgagg ctgggcaatg ggagctga	1248
	<210> 17	
	<211> 1251	
	<212> DNA	
	<213> Streptomyces sviveus	

[0008]	<400> 17	
	atggcaagag ggaatgccagc cttgtcgtc cciggaicac agtcgaicac ggcagagca	60
	ctctttctcg cagcagcagc cgacggagtc accacgcttg tgagaccgtt ggggtcagac	120
	gacaccgagg gttttgcgga aggcctcgtc agactgggtt atcgggttgg gaggacitcc	180
	gacacgtggc aagtggaagg aaggccacaa ggiccagcag ttgccgaggg tgaigtgtat	240
	tgtagagacg gtgcaacaac ggctagggtc ctccccacac tcgcagctgc tggacacggg	300
	acctacagat ttgatgcctc tcccagatg aggagaaggc cactgcctgc tctttctagg	360
	gctttgaggg acctggcggt tgatcttcgc cagcaggaag cggaaaggga ccacctcttg	420
	acctgtagag ctgcctgggt cgaggagggt gaggttacac tcgatgcctg acagictctt	480
	cagtacttga cggcactgct gctgtcgtt ccgttcacac gccaaagggt ggggtctgc	540
	gtacatgac ttggttagcg tccgtacgtg gagattacac ttgcgatgat gagagctttt	600
	gggtctgagg ttgcacgca aggcgacgtt ttctgtgtgc ctctgtgtgg ctacagagcg	660
	actacgtacg cgtatgagcc agatgccagc accgcaagct acttcttgc agctgtctgc	720
	ttgacacctg gagccgaggt cactgtgctt ggactcggga ccggagcgtt tcaaggggat	780
	ctcggcttcg tggacgtgct gggaggaat gggtccgagg tcagcgtggg agcagacgct	840
	acgactgtta gaggcaggg tgagctttag ggccttacag caaacatgag ggacatatcc	900
	gacacgatgc cgacgtctgc tgcacgtct ccgttcgtt cagcaccgtt cagaattgaa	960
	gagtgtggca acactcgtt caaagagtc gacagacttg aagcgtgtgc cgagaacttg	1020
	aggaggttgg gagttagagt cgcaactgtt ccagactgga tcagatcca cctgtgtcca	1080
	gtactgttag cgaagtcac aagctatggc gaccatagga ttgttatgtc attcgcagtg	1140
	accggactca gattctctgg gatctcttc gacgacctg gttgcgtgcg gaaaacgttc	1200
	ccgtgcttcc acgaggcatt tgcggagcgt cggagaggaa ttggtctctg a	1251
	<210> 18	
	<211> 1599	
	<212> DNA	
	<213> 大豆	
	<400> 18	
	atggctcaag tctccgtgtt tcacaattct gctcagtcac cccaaattct ttgacattca	60
	agcaactcaa acaaaactgaa gtctgtgaat tctgtctcac ttgcccacg cctttgggga	120
	gcatccaaga gtgcataacc aatgcacaag aatgggagtt tcatgggcaa cticaatgtt	180
	gggaaaggca attctgggtt cticaaagtt tcagcttcgt ttgcagccgc agagaaaccc	240
	agcaattccc ctgagattgt tctigaaccc attaaggact tcagtggaac aatcaetctg	300
	ccgtgatcaa agagtcttcc aaacagaata cttctcttgg cagctctgag tgaaggaaac	360
	actgtagtgg acaacctttt gtactctgaa gatattcatt acaigtgtgg tgcctcaga	420
	actcttgggt tgagagttag agatgacaag accacaaaac aagccatagt tgaaggatgt	480
	gggtgggtgt ttccaacaag caaagaatcc aaagatgaga tcaacttgtt tcttggcaat	540
	gcgtgaaatt caatgagaag cctcactgct gcagtgttg cagctgtggg gaatgcaagt	600
	taigtctctg atgggtctcc cagaatgagg gaaaggccca tcggtgacct ttgtgtctgc	660
	ctgaaacagc ttggagcaga ttgtatgtc ttcttgggca caaactgccc tcagtgaga	720
	gtgaatggga agggagggtt gccgtgttga aggttcaaac tgagtggtat agtctcttcc	780
	cagtatctga ctgccttctt catgtctgcc cctctggctt tgggtgatgt ggagatigaa	840
	atagtggaca agttgatttc tgttccatat gtggaatga ccttcaaac catggagagg	900

	tttggagttt cigtgaaca ttctggcaac tgggacgtt tecttgiaca tggaggfcag	960
	aagtacaaaa gccctggcaa tgccttltgt gaaggggaig caagctctgc ttcctatctc	1020
	ttggctgggg ctgccatcac tggtagggacc atcacigtga atggctgigg caccctcatcc	1080
	cttcaaggig atgtaaagt tgcagaggtc ttggagaaaa tgggtgcca ggfcaccctgg	1140
	ttcgagaaca gigtacgtt gcttggacct cccagagact tcaaggccag aaagggtctc	1200
	cgtagaatig atgtgaacat gaacaagatg ccagatgtgg ccaagaccct cgtgtttgta	1260
	gccctgtttg caaatggacc aactgcaatc cgtgatgttg ctctatggag ggtgaaggag	1320
	acagagagga tgaatgccat ttgcacagaa ccccaaaac ttgggtgcaac agttgaagag	1380
	ggaccagatt acgtgtgtat aacccacact gagaagctca atgtgacagc cattgacacc	1440
	tatgatgacc acagaatggc aatggcttct tcccttgcgt cctgtgttga ttgtcctgtg	1500
	actatcaaa accctgggtg cacaaggaag acattccag actacttga agtttggag	1560
	aggttgacaa agcacgtagt agtagctta atcacctag	1599
	<210> 19	
	<211> 1551	
	<212> DNA	
	<213> 欧洲油菜	
[0009]	<400> 19	
	atggctcaat ctccaaggat ttcccaggat gtccagaacc ctgtgtgtat cataccaat	60
	ctcaglaaga gcaatcngaa caaatcacc ttctctgtct ccccaaaaac tcatcaacca	120
	cgtagctcta gttagggatt gaagaaaagt gggacaatgc tgaacggatc agtcattagg	180
	ccgttaaagg ttacagcttc tgtgtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttacaa	240
	ccgattagag aaatctcttg gcttatcaag ttgcctggct ccaaatcaat ctccaatagg	300
	atacttcttt tggctgcact gagtgaaggc acaactgttg tggacaactt gctcaactcc	360
	gatgatafca actacatgct tgacgcttgc aagaagttag gactcaatgt ggagagagat	420
	agcgttaaca atcgtgtgtt cgtagaagga tgtgtgtgca tctttcttgc atctctggat	480
	tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgtgtcaa cagccatgag accgttaact	540
	gtgtgttga cgcagcttg aggaatgtct agttatgtgc ttgatgtgtt tccaagaatg	600
	agggaaaggc caatagggga ttgtgtctgc ggaactgaac agctcgggtc tgacgttgaa	660
	tgtactttag gcacaaactg tcttcccgig cgtgttaacg caaalggttg actgcttgg	720
	ggaaaggica agttgtcttg ctccatctcc agtcaatacc ttacggcttt gctcagctct	780
	gcaccacttg ccttaggtga ttgttgagat gagatcattg acaagctcat atctgttccg	840
	tacgttgaaa tgacacttaa gctgaaggaa agattcggag ttccagccga acattccgat	900
	agctgggacg gtctctttgt aaagggtggg cagaagtaca agtctccttg caatgcttat	960
	gtggaaggig acgtcttctc agctagttaa ttcttggctg gtgcagccat aactggcgag	1020
	acagttaccg ttgaaggatg cggaaactacc agcctccaag gtgatgtcaa gtctgcagag	1080
	gtgttgaaaa agatgggttg caaagtctcc tggacagaga actcagttac tgaacggga	1140
	cctagttagg atgtcttttg gatgcgtcac cttagggcag ttgacgtgaa catgaacaag	1200
	atgccagatg tgcctatgac tttagcagtt gtggcacigt ttcccgatgg tcttacaacg	1260
	attagggacg tagcttcttg gagagtcaaa gaaactgaga ggaigatcgc catttgtact	1320
	gagcttctga agttgggtgc cacagtgaag gaagggtccg attactcgtt gattactctt	1380
	ccagctaaag ttaagcctgc tgagattgat acctatgatg accacagaat ggcctatggc	1440
	tttagcctcg ctgatgtgc cgaatgtcca gtcacgaica aggaccttgg ctgtactaga	1500

	aagacatttc cgcactactt tcaagtgctt gaggcaatca cgaaacacig a	1551
<210>	20	
<211>	1551	
<212>	DNA	
<213>	欧洲油菜	
<400>	20	
	atggctcaat ctccaaggat ttgccacggt gticagaacc ctigtgtgat catatccaat	60
	ctcagtaaga gcaatcagaa caaatcaccc ttctctgtct ccccaaaaac tcataacca	120
	cgigcatcta gtgggggatt gaagaaaagc ggaacaatgc tgaacggatc agicattagg	180
	ccgttaaagg ttactgcctc tgggtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttaca	240
	ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcciggt ccaaatcact ctccaatagg	300
	atacttcttt tggcgcact gagtgaaggc acaactgttg tggacaactt gctcaactcc	360
	gaigatatca actacatgtc tgacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat	420
	agcgtaaca atcgtgtgtg cgtagaagga tgggtggaa tcttctctgc atctctggat	480
	tctaagagcg acatcgagct ttacttgggc aatgcigcaa cagccatgag atcttiaact	540
	gcgtctgita ccgcagcttg tggaaatgct agttaigtgc ttgatgggtt tccaagaatg	600
	agggaaagcg caatagggga ttgggtctgc ggactcaaac agctcgggtc tgacgttgaa	660
	tgtactttag gcacaaactg tcttcccgig cgtgttaacg caaatgggtg actgcctgtt	720
	ggaaaagica agttgtcttg ctcatttccc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct	780
	gcaccacttg ccttaggtga tgggagatt gagatcatg acaagctcat atctgtccg	840
	tacgttgaaa tgacacttaa gctgatggaa agattcggag ttctagccga acattccgat	900
[0010]	agctgggacg gtctcttgtt aaaggaggcg cagaagtaca agcttcttg aaacgcatac	960
	gttgaagggt acgcttcttc agctagtta cttcttggctg gtgcagccat aactggcgag	1020
	acagttaccg ttgaaggatg cggaaatcacc agcttccaa gttgaigtcaa gtgcgcagag	1080
	gtgttggaag aaatgggggt caaagtcttc tggacagaga actcagttac tgaacggga	1140
	ccatgtaggg atgcttttgg gatgcgtcac cttagagccg ttgacgtgaa catgaacaag	1200
	atgccagatg tgcctatgac cttagctgtg gtgtcactgt ttgccgatgg tcttacaacg	1260
	attaggggag tagctctctg gagagicaaa gaaaccgaga ggaatgacgc catttgtact	1320
	gagcttcgtt agttgggtgc cacagtigaa gaagggtccg attactgcgt gattactcct	1380
	ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgat accacagaat ggctatggct	1440
	ttcagcctcg ctgcatgtgc cgtgtttcca gtcacgatac aggaacctgg ctgtactaga	1500
	aagacatttc cgcactactt tcaagtgctt gaggcaatca cgaaacacig a	1551
<210>	21	
<211>	1551	
<212>	DNA	
<213>	欧洲油菜	
<400>	21	
	atggctcaat ctccaaggat ttgccacggt gticagaacc ctigtgtgat catatccaat	60
	ctcagtaaga gcaatcagaa caaatcaccc ttctctgtct cccgaaaaac tcataacca	120
	cgigcatcta gtgggggatt gaagaaaagt ggcacaatgc tgaacggatc agicattagg	180
	ccgttaaagg ttacagcttc tgggtccacg agtgaaaagg caagcgagat cgtcttaca	240
	ccgattagag aaatctctgg gcttatcaag ttgcciggt ccaaatcact ctccaatagg	300
	atacttcttt tggcgcact gagtgaaggc acaactgttg tggacaactt gctcaactcc	360

gaigatatca actacatgct igacgccttg aagaagttag gactcaatgt ggagagagat	420
agcgtaaca atcgtgctgt cgtagaagga tgggtggaa tctttccitg aletctggat	480
tctaagagcg acaicgagct ttacttgggc aatgctggca tggccatgag atccctaaat	540
gcigctgtta ccgcagctgg tggaaatgct agttatgtgc ttgatgggtt tccaagaatg	600
agggaaaggc caatagggga ttgggtgtc ggacicaaac agctcgggtg tgacgttgaa	660
tgtactttag gcacaaacgt tcttcccggt cggtttaacg caaatgggtg actgctgggt	720
ggaaagggtc agttgtctgg ctccatttcc agtcaatacc ttacggcttt gctcatggct	780
gcaccacttg ccttaggtga tgtggagatt gagaicattg acaagctcat atcgtttccg	840
tacgtggaaa tgacactta gctgaaggaa agattcggag ttacagccga acattccgat	900
agctgggact gtttcttctg aaaggagggt cagaagtaca agtctcctgg gaacgcaac	960
gtggaagggt acgtttcttc agctagtta tcttggctg gtgcagccat aactggcgag	1020
acagttaccg tggaaagatg cggaaactac agccttcaag gtgatgtcaa gttcgcagag	1080
gtgttgaaa agatgggggt caaagtctcc tggacagaga actcagtac tgaacggga	1140
ccatagtagg atgttttgg aatgagacac cttagggcag ttacgtgaa catgaacaag	1200
atgccagatg tgcctatgac tttagctgt gggcacctgt tgcagatgg tccctacaacg	1260
ataaggagcg tagctcttgg gaggtcaaa gaaaccgaga ggaatgctg catttgtact	1320
gagcttcgtg agttgggtgc cacagttaga gaagggtccg attactgctg gattactcct	1380
ccagctaaag ttaagccagc agagattgat acctatgat accacagaa tggctatggcc	1440
tttagcctcg ctgcatgtgc cgaagtcca gtacagatca aggaccctgg ctgtactaga	1500
aaagacttcc cgcactacti tcaagtgtct gagicaatca cgaanacatg a	1551

[0011]

<210> 22
 <211> 1533
 <212> DNA
 <213> 普通小麦

<400> 22	
atggcaatgg ctgtctgtgc tactatggct gcangcgtt cctcttccgc tgtgagctta	60
gacagagcag ctccagcacc atctaggcgt ctgccaatgc cagcagctag accagctagg	120
agagggtcag tccgttltgt gggaccaagg ggagcagctg caccgtctac aagtgctgca	180
gcaccagcag caccagatgg agctgaggaa gtcgtgttcc aacctatcag agagatcagc	240
ggtgccgtcc agctccctgg gtcaaatgca cttagcaaca gaatacttct tttagcgcga	300
ttgtcagagg gcacgacagt ggtggataac cttctgaact ctgaagatgt tcactacatg	360
cttagagctt tggaggcatt aggtcttctt gtgaagccg ataagggtgc taagcgtgct	420
gtgtgtgttg gtgcggagg gagattccca gttagaaaag atgctcaaga ggaagttaag	480
ctgtttctgg gaaatgctgg gattgcaatg aggagcttga ctgtctgtgt ggttctgtct	540
ggtggaaatg ccacatacgt ccttgatgga gtgcctagaa tgagagagag accgattggg	600
gactctggtg ttggccttca gcaacttga gcagacgtg actgtttct tggaaacaaac	660
tgtccaccgc ttaggatcaa cgggaaagga ggtctccctg gtgggaaggt taagtgtct	720
ggaicaaatc ctagttagta tctgtcatca ctctcaatgg ctgcacctct tgcacttgaa	780
gatgttgaga ttgaaatcat agacaaactc atatcagttc catacgttga aatgacgtg	840
aagctgatgg agaggttcgg agtgacagca gagcactcag atcttggga taggttctac	900
atcaagggag gtcaagaata caaatcacc tgggaacgtt acgtggaagg tgatgcctct	960

	teigtctect acttctctgc tggagcagca atcaccggag gaactgttac tgcgaaggt	1020
	tgccgaacta ctctcttga aggggacgtc aagtctgcag aagtcctaga aatgaigga	1080
	gctaaagtta ctggaccga tacaagtgt acagtgactg gtcctccag tcaaccttt	1140
	gganggaagc acctcaaagc cgttgaigt aacatgaaca agaigccaga tgcgccatg	1200
	acgttgcgc ttgtggctct gttgcaga ggicccacag ccattagaga cgtggccagc	1260
	tggagggiga aagaaactga aaggatggc gccattagaa cagagttaac caaacttga	1320
	gctactgttg aagagggaac cgactatgc atcattacac ctcccagaa gctgaacata	1380
	accgttatig acacttaiga tgatcatgt atggctatgg ccttttcatt agcagcttgc	1440
	gctgagggtc cagtaacct tagagatcti ggggttacta ggaaaacttt cctaactac	1500
	ttcgaigtcc ttcaacatt cgtgaagaat tga	1533
	<210> 23	
	<211> 1281	
	<212> DNA	
	<213> 玫瑰链霉菌	
	<400> 23	
	atgacggiga tagagalacc tgggtctaac tctgttacag ccagagcact gtctctggca	60
	gctctgcgc atgggacgac tactcttctt agaccattgc gtacgata cactgagggc	120
	ttcgacgaag gactgaggaa tctggctat gctgtgganc aagaggctga taggtggcgt	180
	gtccaaggca gaccagctgg accagcagcc acggaagcag atgtctattg cagagatgtt	240
	gccaccaccg ctaggttctt tccgacactg gcagcagcag cgtctccgg aacctacaga	300
	ttcgacgttt cagcacagat ggtctgtctt ccccttgcct catgacaag ggcacttaca	360
[0012]	gccttgggtg ttgatcttag acaegaagga gcagacggac atcatccgtt caccgttctt	420
	gcagctggca tcgaaggagg agaattgacg ctgcacgtct gcgagtcag ccaatacttg	480
	acagcacctg tcatgtctgg acctcttaca acaagggaac ttgcatacga agttacagaa	540
	ctcgtctctg caccctactt ggaaatcacc ctgcctatga tgagagactt tgggtggag	600
	gttgagaggg aggggaatcc ctccaccgtt ccaagcccat ctccaagact taggtccaat	660
	agagggtgac ccataggagg ctatagagct actacgtatg ctgtcgagcc agatgccctc	720
	actgcctctt acttctttgc agctgtctgc ctccactgtc gcgaggtaac agtgccttga	780
	ttggggactg gagctttgca aggtgatttg cgtttctggt atgtgtgag agaaatgggt	840
	gccgagggtt cgtgtgtgac ggacgccaca actgtgtgtt caactggcag attgaggga	900
	atactgttga acatgagaga tatctcagac acgatgccca cactcgcagc tattgcacct	960
	tatgccgttg gtccagtgtt gattgaagat gtgccaaca cccgtgtgaa ggagtgtgac	1020
	cgtctggagg ctgtgtgtga gaattctagg gcaatgggaa tcaccgtcca tacgggtccg	1080
	gataggatag aaatccatcc tggaacacct aaaccgacgt ggatgccacc ccacggagat	1140
	caccgcatag tcatgtcatt tgcctgtctt ggccttgcga ctcctgtgct cacttacgac	1200
	gaccttggct gcgtgtgtga gaccttccct agatttcacg aggtgtttgc cgaattcgtt	1260
	cacgaccttg agggagggtg a	1281
	<210> 24	
	<211> 1248	
	<212> DNA	
	<213> 灰色链霉菌	
	<400> 24	
	atgggtgcag tgacagtcct cgacattcct ggaagcagaa gcgtgacagc nagggcactc	60

ttcttggcag cagcagccga tggaaacgaca acactgcttc gtcctctgag gtcagacgac	120
acggaggggt ttgcggaggg tettaagaat ctgggitaig ccgttgagca agaggcigac	180
cgttggaggg tgaaggcag accggatggi ccagctgctc cggatgcaga tgcctactgc	240
cgigatggig caacgactgc acgttticcti ccaaccctcg tcgcagcagc agcttctgga	300
acgtatcgii tcgacgccic agcacagatg aggagacgic ccttggcicc acicaciagg	360
gcactgacag ctcttggcgt ggatttgaga caiggiggag agggaggica tcateccatg	420
actgtcagag ctgctggcat agaagggtggc gatgttgtcc ttgacgttgg tgaatcttct	480
cagtatctca cagccctict tatgttgggt ccgttgactg ccaaggctc tagaatcgaa	540
gicactgac tcgtagcgcc tecttactgt gaaatcactc tggccatgat gagagatttc	600
ggagttagtg ttagcagaga aggaacacac ttaccctgic cgtccggagg ctatagagct	660
acagctiagc cgttggagcc agacgcaagc acggcttctt acttcttgc agcagctgcc	720
ctcactggac gcgaggtgac ggtccctggg ctgggaatig gtcctcttca aggagacctt	780
cgttttggg acgtgctgag tgataggga gcagaggtgt cgttggacc agaigccacg	840
acagtgccgt caactggcag actccgtggc attacagria ctatagaga catttcagac	900
acgatgccaa cactcgtgic tatggacct cactcgtatg gaccctccg tatgaggac	960
gtggcaacaa ctctgtcaa ggaatgtgat aggtttaggg catgtgtca aaacctaga	1020
gctatgggaa tcacgggtga tactgggcac gatgggatig agattctccc tgggactcca	1080
aagccaacgg gaatatgtac gcacggagat cacagaatcg tlatgtctt cgcagtggt	1140
ggttcttga cccctgggt gacatagat gatctgggt cgcctcgca gacttttcca	1200
aggttccacg aagttttcgc tgactttgtc gcatcacccc aagcctga	1248

[0013]

<210> 25

<211> 1245

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DGT-31 v3 核苷酸

<400> 25

atgactgiga ttgacatccc tggctcaang tcagttaactg ccagagcatt gttctctgca	60
gcagctgtgt aiggcactac aactcttttg agacctcttc acagcgatga cacggaaggc	120
ttcactgagg gtcctactcg ttggggatac gcagtggtta gagaaccga taggtggcac	180
atagaaggac gtcctctcgg tcacgagca gcagaigcag aagticactg tagggacggt	240
gctacaactg ctgcctticti tccaaccti gcagctgtgt ctgcctcgg aacgtatgt	300
ttcgacgcat cagctcagat gaggcgtaga cccctcgtc ccctcagga agctcttga	360
acacttggag tggaccttag gcatgatgga gcgaaggcc accacctct gacaatcaa	420
gctcttgggt ttaagggttg aggaattacg ctgcagcgtg gtagtctatc tcagtacttg	480
acagctcgtc tcatgcttgg tctctgacc gcagagggac tgagaataga agttacggag	540
cttgcctctg ctctttagt ggagatcacc ctgtcaatga tgagaggttt tgggtggag	600
gttgttaggg aggggaatac tticactgtg cctcttggag gttacagagc tacaacttat	660
gcatagaaac cggacgcaag cacagcttcc tacttcttg cagcagcagc cctcactggg	720
aggggaagta cgttgccttg ctgggcacti ggagcacttc aaggtatct taggttcacg	780
gaggtcttca gaaggatgga cgtgaigtg gcacacaagt ccgactctac aacagtgggc	840
tcagatggtc gcttctgttg gttagctgtc aacatgaggg acataagcga cacaatgcca	900

	acacitggcag ctatagetcc gtacgcaage tcaccagtta ggaicgagga tctcgcaaac	960
	acccgtigiga aggaatgiga taggciggag gcttgcgcgc agaatctccg ctcaatgggc	1020
	atcacogtfc gcacigggacc agattggati gagaiccatc cigggacicc tagaccgacc	1080
	gagatagcca cacacggiga tcatagaate gtcattgcat ttgcctgtgc tggacttaga	1140
	acccctggga tgcctiacga tgaccctggc tgcgttcgca agacttttcc tcttttcat	1200
	gaagagtttg cagccttctt ggagcgcica tccgciggag agtga	1245
	<210> 26	
	<211> 213	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 叶绿体转运肽	
	<400> 26	
	atgcttggta gacaaggtag aagtcigaga gctttcicat gcaacgctgg acttgctaga	60
	agagtigaag ttgggtgcct tgttgttctt agacciatct cgttaacga cgttgttctt	120
	cacgtttact ctgtccact ttctgttctt agaaggctt gctctaatgc ctccattagg	180
	tccactagaa ggttcaaac tactgtgige tct	213
	<210> 27	
	<211> 186	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 叶绿体转运肽	
[0014]	<400> 27	
	atgcaacicc tgaatcagag gcaagccctg cgtcttggtc gttaacicc ttcaaaagac	60
	cagcaagtig ctccactggc ctctaggctt gcttttctt tgcagctcag cgcattcagc	120
	gtgcacctg caccgtctg ctccagctct gctggagctg gaaggcgigc tgtgtctgtg	180
	agagca	186
	<210> 28	
	<211> 198	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 叶绿体转运肽	
	<400> 28	
	atggtctaat ctacgagaat ctgccacgtt gtgcagaacc catgtgtgat caattccaat	60
	ctctccaat ccaaccagaa caaatctctt ttctcagica gcctcaagac tcaccagcag	120
	cagcgtcgig cttaaccagat atctagctgg ggaatgaaga agtcaaacaa cgggtccgtg	180
	attcgtccgg ttaaggca	198
	<210> 29	
	<211> 198	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 叶绿体转运肽	
	<400> 29	
	atggcacaag ccagccgtat ctgccagaat ccatgtgtga tatccaatct ccccaaaagc	60
	aaccaccgtt agtccctttt ctctgtctca ctcaagagc atcagccatg agcctcttca	120

tagggactta agaagtcctg caccatgctg aacggitcag tgattagacc cgtaaggig	180
acagcttcig ttccgca	198
<210> 30	
<211> 225	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 叶绿体转运肽	
<400> 30	
atggcacaat ctacgagaat cggcacggt ggcagaaac caigigigat catitcaaat	60
ctctcaaagt ccaatcagaa caaatcacct ttctccgtct ccccaagac acaccagcat	120
ccaagggcat acccgataag cagctcatgg ggactcaaga agagcggast gactctgatt	180
ggctctgagc ttgctcctct taaggttatg tctctggtt ccgca	225
<210> 31	
<211> 207	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 叶绿体转运肽	
<400> 31	
atggcacaag ttacgagaat ctgtaatgt ggcagaaac catctcttat ctccaatctc	60
tcaaaatcca gccaacgtaa gtctcccttc agcggtctct tgaanaatca gcagccagaa	120
gtctctcat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgctta acggctcagt catctgtccg	180
gtaagggtga cagctcctgt ctccgt	207
<210> 32	
<211> 1464	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> dgt-28 v5 和 TraP4 v2 的合框融合	
<400> 32	
atgtctgcta gacaaggctg aagtctgaga gtctctcaat gcaacgcctg acttgctaga	60
agagtgaag ttgggtctct tgtgttctt agacctatct ctgtaacga cgtgttctt	120
cacgttact ctgtccact ttctgttct agaaggctt gctctaagtc ctccattagg	180
tccactagaa ggttcaaac tactgtgtgc ttgtgtcaa gagggaigcc agcctgtct	240
ttacctggat caaagagtat cacagctagg gcactcttc ttgtgtctgc tgtgtatggg	300
gttactactt tggtagggcc attgagaagt gacgacacag aaggattcgc tgagggtta	360
gttctgttag gctatctgt agggaggaca cccgatact ggcaagtcga tggcagacca	420
caaggaccag cagtggctga ggtgtgtgc tactgttag agggagcaac caccgtaga	480
ttcttgccaa ccttagcagc tctgtgtac ggaacataca gatttatgc ttaccacag	540
atgaggagac gtctcttct gcccttaagc agagcctga gggatttggg tctgactct	600
agacacgaag aagctgaagg tcatcaccct ctgactgtcc gtctgtctgg ggttgaagga	660
ggagagggtt ctltggatgc tggcagta agtcagtatc tcatgtctt gtgtctctt	720
gttccctta caagacaagg actgaggata agggttactg atttgggtgc agcaccatac	780
gtggagatta cgttgcatt gatgagggt tctgggttg aatgggcaag ggaggagat	840
gtgtctgtt ttccacctg tggatatct gcaactact atgtataga acccgacga	900

[0015]

	agctactgctt cttacttctt cgcagctgct gctttgactc ctggagctga agtgactgta	960
	ccctgggttag gcacgggagc acttcaagga gatttgggat tttagatgt cttaggaga	1020
	atgggagccg aggtgtccgt agggagctgt gcaaccactg tttagggaac tggtaattg	1080
	cgiggcccta cagccaacat gagagacata agtgatacga tgcggacct cgttgaata	1140
	gcacctttg ctatgtctcc agttagaac gaggatgtt ccaacactcg tgtcaaagaa	1200
	tgtgacagac ttgaggttg tgcagagaac cttaggaggt tgggagtaag ggttgcaacg	1260
	gggccggact ggattgagat acaccttgtt ccagctactg gtgtcaagt cacaagctat	1320
	gggatcaca gaatttgtat gtcatitgca gtgactggac ttctgtgtcc tgggatcagc	1380
	ttcgacgacc ctggcttgtt tctgaagact ttctctgggt ttacagaggc ttctgcagaa	1440
	ttgaggcgtg gcattgggag ctga	1464
	<210> 33	
	<211> 1434	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> dgi-28 v5 和 TraP5 v2 的合框融合	
	<400> 33	
	atgcaactcc tgaacagag gcaagccctg cgtcttggc gttcactgc ticaaagaac	60
	cagcaagttg ctccactggc ctctaggcct gcttcttctt tgagctcag cgcctccagc	120
	gtcgcaccig cacctgttg ctccagctct gctggagctg gaaggcgtg tgttgtctg	180
	agagcagcaa gagggaigcc agccttgtct ttacctggat caaagagtat cacagctagg	240
	gcactctttc ttgtgtctgc tgcgtatgg gttactactt ttgttgggct attgagaagt	300
	gacgacacag aaggattcgc tgaggggtaa gtctgtttag gctatcgtgt agggaggaca	360
	cccgatactt ggcaagtcga tggcagacca caaggaccag cagtggctga ggcctacgtc	420
	tactgttagg acggagcaac caccgttaca ttcttgccaa ccttagcagc tgcgtgtcac	480
	ggaacataca gattgatgc ttaccacag atgaggagac gtctcttttt gcccttaagc	540
	agagccttga gggatttggg tgcgatctt agacacgaag aagctgaagg tcatcacctt	600
	ctgactgtcc gtgtgtctgg ggttgaagga ggagaggtaa ctttggatgc tggctcagtc	660
	agtcagtatc tcactgtctt gtgtctctt ggctccctta caagacaagg actgaggata	720
	agggttactg atttgggtgc agcaccatac gttgagatta cgttgcatt gatgaggct	780
	ttcggagtig aagtggaag ggaggagat ggttctgtt ttccacctga tggatctgt	840
	gcaactacgt atgtataga acccgacgca agtactgtt cttactctt cgcagctgtt	900
	gctttgactc ctggagctga agtgactgta cctgggttng gcacgggagc acttcaagga	960
	gatttgggat tttagatgt cttaggaga atgggagccg aggttccgt aggagctgat	1020
	gcaaccactg tttagggaac tggtaattg cgtggcccta cagccaacat gagagacata	1080
	agtatataca tgcggacct cgttgcata gcacctttg ctatgtctcc agttagaac	1140
	gaggatgtt ccaacactcg tgtcaaagaa ttgacagac ttgagcttg tgcagagaac	1200
	cttaggaggt tgggagtaag ggttgcacg ggtccggact ggaatgagat acaccttgtt	1260
	ccagctactg gtgtcaagt cacaagctat ggtatcaca gaatttgtat gtcatitgca	1320
	gtgactggac ttctgtgtcc tgggatcagc ttcgacgacc ctggcttgtt tctgaagact	1380
	tttccgggtt ttacagaggc ttctgcagaa ttgaggcgtg gcattgggag ctga	1434
	<210> 34	

<211> 1446
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> dgt-28 v5 和 TraP8 v2 的合框融合

<400> 34
 atggcicaat ciagcagaat cagccacggt ggcagaaacc caigigigat catiiccaat 60
 ctctccaaat ccaaccagaa caaatctcct ttctcagica gccicaagac tcaccagcag 120
 cagcgtcgtg ctiaccagat atciagcttg ggaitgaaga agtcaaacaa cgggtccgtg 180
 attcgtccgg ttaaggcagc aagagggaig ccagccitgt cttaccctgg atcaaagagt 240
 atcacagcta gggcactctt tcttgcgtgt gctgcigaig gggitactac ttgggtgagg 300
 ccatigagaa gtagcagacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggtatctgt 360
 gtaggaggga caccgcatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagtggct 420
 gaggtctagc tctactgtag agacggagca accaccgcta gattcttgcc aaccttagca 480
 gctgctgggc acggaacata cagatttgaat gcttaccacac agatgaggag acgtcccttt 540
 ttgcctttaa gcagagcctt gagggatttg gggtctgcat ttagacacga agaagcigaa 600
 ggicacacc cctgactgtt cctgctgtgt ggggttgaag gaggagaggt tactttgat 660
 gctggctcagt caagtcagta tctacatgcc ttgttgctcc ttggicccct tacaagacaa 720
 ggactgagga taagggttac tgatttgggt tcagcaccat acgtggagat tacgtttgca 780
 atgatgaggg ctttcggagt tgaagtggca agggagggag atgtgttctt ttttccacct 840
 ggtgataatc gtagcaactac gtagctata gaaccgcagc caagtaactc ttcttacttc 900
 ttgcagcgtg ctgctttgac tcttgagct gaagtgactg tacttgggtt aggcacggga 960
 gcacttcaag gagatttggg atttttagat gcttfaagga gaattggagc caggtgttcc 1020
 glaggagctg atgcaaccac tgltagagga acgttggaat tgcgtggcct tacagccaac 1080
 atgagagaca taagtgatac gatgccgacc ctgcctgcaa tagcaccctt tgcctagtgt 1140
 ccagttagaa tggaggaigt tgcacacact cggtcaaac aaatgagcag actttaggtt 1200
 tggcagaga acccttaggag gttaggagta aggttgcaa cgggtccgga ctgatttag 1260
 atacaccctg gtcagctac tgggtctcaa gtcacaagct atgggatca cagaattgtg 1320
 atgtcatttg cagtacatg acttctgtgt cctgggatca gcttcagca ccttggctgt 1380
 gtctgtaaga ctttccctgg gtttccagag gcttccgag aattgaggcg tggcattggg 1440
 agctga 1446

[0017]

<210> 35
 <211> 1446
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> dgt-28 v5 和 TraP9 v2 的合框融合

<400> 35
 atggcacaag ccagccgtat cagccagaat ccaigigtga tatccaatct ccccaaaagc 60
 aaccaccgta agtccctttt ctctgtctca ctcaagacgc atcagcctag agcctcttca 120
 tggggactta agaagtcttg caccatgtgt aacggctcag tgattagacc cgtcaagggt 180
 acagcttctg ttccgcagc aagagggaig ccagccitgt cttaccctgg atcaaagagt 240
 atcacagcta gggcactctt tcttgcgtgt gctgcigaig gggitactac ttgggtgagg 300
 ccatigagaa gtagcagacac agaaggattc gctgaggggt tagttcgttt aggtatctgt 360

```

giaggaggga caccogatac ttggcaagtc gatggcagac cacaaggacc agcagiggct 420
gagggcigacg tctacigtac agacggagca accaccgcta gattccttgc aaccttagca 480
gcctcctggc acggaacata cagattgai gcttaccac agataggag acgicctcct 540
ttgcccttaa gcagagccctt gagggatttg gggtcgaic ttagacacga agaagctgaa 600
ggtaicaccc cctcagctgt cctgctgctt ggggtigaag gaggagaggt taccitggat 660
gcctggcagc caagtcagta tctcactgcc ttgttgcctc ttggicccct tacaagacaa 720
ggactgagga taagggttac tgatttggg tcagcaccat acgtggagat taccttgcga 780
atgatgaggg ctttcggagt tgaagtgga agggaggag atgtgttcgt gtctccacct 840
gggtgataic gtgcaactac gtatgctata gaaccgacg caagtactgc ttcttacttc 900
ttcgcagctg ctgcttggac tctggagct gaagtgactg taccitgggt aggcacggga 960
gcacttcaag gagatttggg attttagat gtcttaagga gaatgggagc cagggtgtcc 1020
gtaggagctg atgcaaccac tcttagagga actggigaat tgcgtggcct tacagccaac 1080
atgagagaca taagtgatac gatccgacc ctgcctgcaa tagcaccct tgcctagctc 1140
ccagtttaga tcgaggtatg tgcctacac cgtgtcaaa aatgtgacg acttgaggct 1200
tgctcagaga accttaggag gtggggagta aggtttgcaa cgggtccgga ctggattgag 1260
atacaccctg gtcagctac tgggtctcaa gtcaaacgt atgtgtatca cagaattgtg 1320
atgtcatttg cagtacttg acctcgtgt cctgggatac gcttcgacga ccttggctgt 1380
gttcgtaaag ctttcctgg gtctacgag gcttccgag aattgaggcg tggcattggg 1440
agctga 1446

```

[0018]

```

<210> 36
<211> 1473
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> dgt-28 v5 和 TraP12 v2 的合框融合

```

```

<400> 36
atggcacaat ctacagaat ctgccaggt gtgcagaacc catgttgat cattcaaat 60
ctctcaagt ccaatcaga caaatccct ttctccgtct cctcaagac acaccagcat 120
ccaaggcat acccgataag cagctcagg ggaactaaga agagcggat gactctgatt 180
ggctctgagc ttctctctct taaggttatg tctctgttt ccgcagcaag agggatgcca 240
gccttgtctt taccitggat aaagagiatc acagctaggg cactcttctt tgcctgctc 300
gtctatgggg ttactacttt ggtagggcca ttgagaagt acgacacaga aggtatcgt 360
gaggggtag ttctttagg ctatcgtgt gggaggacac ccgatactg gcaagtcgat 420
ggcagaccac aaggaccagc agtggctgag gcctacgtct actgtagaga cggagcaacc 480
accgttagat tcttgcctac cttagcagct gctggctacg gaacatacag attttagct 540
tcaccacaga tgaggagacg tctcttttg ccttaagca gagccttag ggatttgggt 600
gtctatctta gacacgaaga agctgaagg catcaacctc tgaactgtcc tctgtctggg 660
gttgaaggag gagaggttac ttggatgct ggtaagtcaa gtcagtatct cactgccttg 720
ttgtctcttg gtcccttac aagacaagga ctgaggataa gggttactga ttgtgtgta 780
gcaccatacg tggagattac gcttgcatt atgagggctt tctgagttga agtggcaagg 840
gagggagaig tcttctgtgt tccacciggt ggatactgt caactacgta tcttatagaa 900
cccgacgcaa gtaactgttc ttacttcttc gcagctgctg ctttgaactc tggagctgaa 960

```

	gigactgtac ctgggttagg cacgggagca cttcaaggag atttgggatt ttagatgtc	1020
	ttaaggagaa tgggagccga gggtccgta ggagctgaig caaccactgt tagaggaact	1080
	ggtagaattgc gggcccttac agccaacatg agagacataa gtagatcat gccgaccctc	1140
	gttgcaatag caccctttgc tagtgctcca gttagaatcg aggaigtgtc caacactcgt	1200
	gtcaagaat gigacagact tgaggcttgi gcagagaacc ttaggagggt gggagtaagg	1260
	gttgcaacgg gtcgggactg gatlgagata caccctggc cagctacagg tgcacaagtc	1320
	acaagctatg gtagacacag aatttgaig lcatltgcag tgactggact tegtggcct	1380
	gggactcagct tcgacgaccc tggctgtgtt cgtaagactt ttctgggtt tcacgaggct	1440
	ttcgcagaat tgaggcgagg catggggagc tga	1473
	<210> 37	
	<211> 1455	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> dgt-28 v5 和 TraP13 v2 的合框融合	
	<400> 37	
	atggcacaa ttacagaat ctgtatgtt gtcagaaac caictctat ctccaatctc	60
	lcaaaagtcga gccaacgtaa gtctccctc agcgtgtctc tgaanaacta gcagcccgaa	120
	gtctctctat ggggtttgaa gaaatctgga acgatgtta acggctcagt cattegtccg	180
	gttaaggta cagcctccgt ctccgtctgt agaggatgc cagccctgtc ttacctgga	240
	tcaaaagta tcacagctag ggcactctt ctgtctgtc ctgtctatgg ggttactact	300
	ttgttgaggc cattgagaag tgacgacaca gaaggatcg ctgaggggtt agttcgttta	360
[0019]	ggctatctgt tagggaggac acccgatact tggcaagtc atggcagacc acaaggacca	420
	gcagtggtgt aggcctcagt ctactgtaga gacggagcaa ccaccgctag attcttgcca	480
	accttagcag ctgtctgtca cggaaacata agatttgaig ctaccacaca gatgaggaga	540
	cgctctctt tgcctttaag cagagccttg agggatttgg gtgtcgtat tagacacgaa	600
	gaagctgaag gtcacaccc ctgtactgtc cgtgtgtgtc ggttgaagg agggaggggt	660
	acttggatg ctgtctgtc aagtcgtat ctacatgtct tgtgtctctc tggctccctt	720
	acaagacaag gactgaggat aagggttact gatttgggt cagcaccata cgttgagatt	780
	acgtttgcaa tgatgagggc ttctggagt gaagtggcaa gggagggaga tgggtctgt	840
	gttcacctg gggatctg tgcaactac tatgtatag aaccgacgc aagtactgt	900
	tcttactctc tcgagctgc tgccttgact cctggagctg aagtactgt acctgggtta	960
	ggcacgggag cacttcaagg agatttggga ttgtatgtc tcttaaggag aatgggagcc	1020
	gaggtgtccg taggagctga tgcaaccact gttagaggaa ctggtagaatt gcgtggcctt	1080
	acagccaaca tgagagacat aagtgatag atgcccagcc tegtgtcaat agcaccctt	1140
	gctagtgtc cagttagaatt caggatgtt gccaacactc gtgtcaaga atgtgacaga	1200
	cttgaggctt gtcagagaa ccttaggagg ttgggagta ggggtgcaac gggctccgac	1260
	tggattgaga tacaccctgg tccagctact ggtgtctcag tcacaagcta tgggtatcac	1320
	agaatttga tgctattgc agtgatgga ctctgtgtc cgggacacag ctctgacgac	1380
	cttggctgtc ttctgaagac ttctctggg ttccagagg ctctgcaga attgagcggt	1440
	ggcataggga gctga	1455
	<210> 38	

[0020]

```

<211> 186
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 叶绿体转运肽

<400> 38
atgatacttg gatctagccc aactctgcca cagcatcac atccagccag acctggicct 60
gccagaccga ttctagttaa cgacgtcgtt ccccaigtct actccgcctc tcctcccgig 120
gctaggcggt ctgttagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtatattga gaccacagtc 180
tgcica 186

<210> 39
<211> 186
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 叶绿体转运肽

<400> 39
atggcacaga tcaacaagtc tgcataggg gtaggaacg ctctactgat aagcaacttc 60
tccnataccc gtaagccaa atccccttcc tcccctcctat ggggaacaag actgaagaac 120
agcagcagag gtttgaagaa ggtaggcagt aggtctatig gctcccggtt caaagtgtct 180
gccica 186

<210> 40
<211> 207
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 叶绿体转运肽

<400> 40
atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggtcggga ggtctctcgc ctctaagaat 60
cagcaagtgg caccgctgc cagccgtccc attctgtga acgacgtcgt gccacacgtc 120
tacagcgca cctgtctcgt tcttagacgc tctgtctcta agtcatcaat ccgcagcact 180
agaaggttcc agacgacctg ttgttca 207

<210> 41
<211> 1467
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> dgi-32 v3 和 TraP14 v2 的合框融合

<400> 41
atgatacttg gatctagccc aactctgcca cagcatcac atccagccag acctggicct 60
gccagaccga ttctagttaa cgacgtcgtt ccccaigtct actccgcctc tcctcccgig 120
gctaggcggt ctgttagcaa gtccagcatt aggtctacgc gtatattga gaccacagtc 180
tgcicaatga cggtagatga gatacctggg tctaagtcgt ttaacagccag agcactgttc 240
ttggcagctg ctgccgatgg gacgactact ctcttagac catigcgtag cgatgacact 300
gagggcttcc cagaaggact gaggaactg ggctatgctg tggacaaga ggcigalagg 360
tggcgtgtcc aaggcagacc agctggacca gcagccaagg aagcagaigt ctatgcaga 420
gatgttgcca ccaccgctag gttccctccg acactggcag cagcagctgc ttccggaacc 480
tacagattcg acgttccagc acagatgcgt cgtcgtcccc ttgtccatt gacaaggcca 540

```

```

cttacagcct tgggtgtgga tcttagacac gaaggagcag acggacatca tccgtcacc 600
gttcgtgcag ctggcatcga aggaggagaa ttgacgctcg acgctggcga gtccagccaa 660
tacttgacag cactgcicai gctcggacct cttaacaaca agggacttcg catcgaagt 720
acagaactcg tctcgcacc ctacttgaa atcaccctcg ctatgatgag agacttggg 780
gtggagggtg agaggaggg gaataccctc accgttccaa gcccatcttc aagactiagg 840
tccaatagag gtggacctat aggaggctat agagctacta cgtatgctgt cgagccagat 900
gcctcaactg cctcttacti ctitgcagct gctgccctca ctggctgcga ggtcacagt 960
cciggtattg ggactggagc ttgcaaggi gatttgcgtt tctgtgagt gtgagagaa 1020
atgggtgcgc aggtgtctgt ttgtccggac gccacaacig tgcgtcaac tggcagatt 1080
aggggaatca ctgigaacat gagagatctc tcagacagca tgcctacact cgcagctatt 1140
gcacctatg ccgatggctc agtggtgatt gaagaigtg ccaacaccg tgaagagg 1200
tgtagccgtc tggaggcttg tctgagaat ctgagggcaa tgggaatcac cgtccatag 1260
ggtcgggata ggaatagaat ccaicctgga acacciaaac cgactgggat cgcacccac 1320
ggagatcacc gcatagtcct gtcatttgcg gtcgtggccc ttgcacttcc tggcctcact 1380
tacgacgacc ctggctgcgt gcgtaagacc ttccctagat ttacagaggi gtttgcggac 1440
ttcgtcacg accgtgaggg aagggtga 1467

```

<210> 42
 <211> 1455
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0021]

<220>
 <223> dgt-33 v3 和 TraP24 v2 的合框融合

```

<400> 42
atgcaactgc tcaaccagag acaagccttg aggtctggga ggctctcgc ctctaagaat 60
cagcaagtgg caccgcttgc cagccgtccc atttcgtga acgacgtct gccacagtc 120
tacagcgcac cctgtccgt tcttagacgc tctgtctcta agtcatcaat ccgcagcact 180
agaaggcttc agacgacctt ttgtcaatg ggtgcagtga cagtcacga catctctgga 240
agcaagagcg tgacagcaag ggcactcttc ttggcagcag cagccgatgg aacgacaaca 300
ctgcttcgtc ctctgaggtc agacgacacg gaggggttgg ccgagggctc tangaatctc 360
ggtaatgccg ttgagcaaga ggcctgacct tggagggctg aaggcagacc ggaigtcca 420
gtctctccgg atcgagaagt ctactgcctt gatgtgcaa cgactgcacg ctctcttcca 480
acctctgtcg cagcagcagc ttctggaacg tatctttcgc acgctcagc acagatgagg 540
agacgtccct tggctccact cactagggca ctgacagctc ttggcgtgga ttgagacat 600
ggggagagg agggcatca tccactgaat gtcagagctg ctggcataga aggtggcgat 660
gtgtctcttg acgtctgga atctctcag tatctcacag cctctcttat gttgggtccg 720
ttgactgcca aaggtcttag aatcgaagtc actgatctcg tgagcgtccc ttacgttga 780
atcactctgg ccatgatgag agatttcgga gttgaigta gcagagaagg aaacacttct 840
accgtgccgt ccggaggcta tagagctaca gccacgctg tggagccaga cgcaagcacg 900
gcttcttact tcttgcagc agctgccttc actggacgcg aggtgacggt ccttgggctg 960
ggaaattggg ctcttcaagg agacttctgt ttgtggacg tgcgtcgtga tatgggagca 1020
gaggtgtctg ttggaccaga tgcacgaca gtgcgtcaa ctggcagact ccttggcaat 1080
acagttacta tgagagacat ttacagacg atgccaacac tgcgtctat tgcacctcac 1140

```

```

gtgtatggac cgtccglat tgaggacgtg gcaaacactc gtgtcaagga atgtgatagg 1200
ctttagggcat gtgtcaaaa ccttagagct atgggaatca cgggtcatac tgggcacgat 1260
tggattgaga ttctccctgg gactccaaag ccaacgggaa tagctacgca cggagatcac 1320
agaatcgta ttctcttcgc agtggctggt ttgttgacc cttggctgac atacgatgat 1380
cctggcgtcg tccgcaagac ttctcaagg ttccacgaag ttctcgtga ctttgcgtga 1440
tcaccccaag cctga 1455

```

<210> 43
 <211> 1431
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> DGT-31 和 TRAP23 构建体

```

<400> 43
atggcacaga tcaacaagtc tgctaatggg gtaaggaacg cttcacatgat aagcaacttc 60
tccaataccg gtaagccaa atcccccttc tcccctcctc ggggaacaag actgaagaac 120
agcagcagag gttgaagaa gggtgcagtt aggtctatgg gctcccggtt caaagtgtct 180
gcccaatga ctgtatga catccctggc tcaaaagtcg ttactgccag agcatgttct 240
ctgcagcag cttcgtatgg cactacaact ctttgagac ctcttcacag cgtatgacag 300
gaaggttca ctgaggtgt cactcgtttg ggatcgcag tggtagaga acccgatagg 360
tggcacatag aaggacgtc ctccgtcca gcagcagcag atgcagaagt tcactgtagg 420
gacgggtgta caactgtcgt cttctctcca acccttgcag ctgtctgtgc ctccggaacg 480
tatcgtttcg acgcatcagc tcagatgagg cgttagacccc tgcctccctc caggaagct 540
cttagaacac ttgagtgga ccttaggcat gaaggagctg aaggccacca cccctgaca 600
attcaagcct ctgggtgtaa ggggtgagga ctacgcctcg acgtgtgtga gtcattctag 660
tacttgacag ctctgtcat gcttggctct ctgaccgcag agggacgtg aatagaagtt 720
acggagcttg tctcgtctcc ttatgtggag atcacccctg caatgatgag aggtttgtgt 780
gtggaggttg ttaggagggg gaatacttcc actgtgcctc ctggagggtt cagagctaca 840
acttatgcca tagaacgga cgcaagcaca gcttccctact tcttgcagc agcagccctc 900
actgggaggg aagtgacgtt gctcgtcttg ggcactggag cacttcaagg tgatcttagg 960
ttcacggagg tctcagaag gaaggacgt gatgttcgca caacgtccga ctctacaaca 1020
gtgcgtcag aigtgcctt tctcgtgttg acgtgaaca tgaggacat angcagaca 1080
atgccaacac tggcagctat agctcgtac gcaagctcac cagttaggat cgaggatgtc 1140
gcaaacaccc gtgtgaagga atgtgatagg ctggaggttt gcgtcagaa tctcgtctca 1200
atgggcata cgttcgcac tggacagat tggattgaga tccatccttg gactcctaga 1260
ccgaccgaga tagccacaca cgttgatcat agaatcgtca tgcatttgc cgtggtgga 1320
cttagaaccc ctgggaigtc ttacgatgac cctggctgag ttgcgaagac tttctctgt 1380
tttcaigaag agtttgcagc ctctgaggag cgtcatccg ctggagagtg a 1431

```

<210> 44
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 寡核苷酸引物序列

<400> 44

[0022]

	agccacaccc cagliaacga	19
	<210> 45 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸引物序列	
	<400> 45 cctccctcttt tgacgcc	17
	<210> 46 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸探针序列	
	<400> 46 cagcccaatg aggcacacgc	20
	<210> 47 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸引物序列	
	<400> 47 cttcaaggag atttgggatt tgt	23
[0023]	<210> 48 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸引物序列	
	<400> 48 gagggctcggc atcgat	17
	<210> 49 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸探针序列	
	<400> 49 agagaagttt cgacggattt cgggc	25
	<210> 50 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸引物序列	
	<400> 50 gaggattagg gtttcaacgg ag	22
	<210> 51 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	51	
		gagaattgag ctgagacgag g	21
	<210>	52	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	52	
		ctgcaggtca acggtcagg atat	24
	<210>	53	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	53	
		tgggctgaat tgaagacatg ctcc	24
	<210>	54	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
[0024]	<400>	54	
		cgtcacaaa gctgaatgig	20
	<210>	55	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	55	
		cgaagtcatg gaagccatt	20
	<210>	56	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	56	
		cttcaggag atttggatt tgt	23
	<210>	57	
	<211>	17	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	57	
		gagggtcggc atcgat	17
	<210>	58	

[0025]	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	58	
		tggttcggttc cctctaccaa	20
	<210>	59	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸探针序列	
	<400>	59	
		cacagaaccg tcgttcagc aaca	24
[0025]	<210>	60	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	60	
		caacatccat cacttgact ga	22
	<210>	61	
	<211>	26	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸探针序列	
	<400>	61	
		cgagcagacc gccgtgact ctacc	26
[0025]	<210>	62	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	62	
		tggcggacga cgacttgt	18
	<210>	63	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	63	
		aaagtltgga ggctgccgt	19
[0025]	<210>	64	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物序列	
	<400>	64	

	ttcagcaccc gtcagaat	18
	<210> 65	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸探针序列	
[0026]	<400> 65	
	tgccgagaac ttgaggaggt	20
	<210> 66	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸引物序列	
	<400> 66	
	tggtcgccat agcttgt	17

包含源自芸苔属的叶绿体转运肽编码序列的mRNA分子

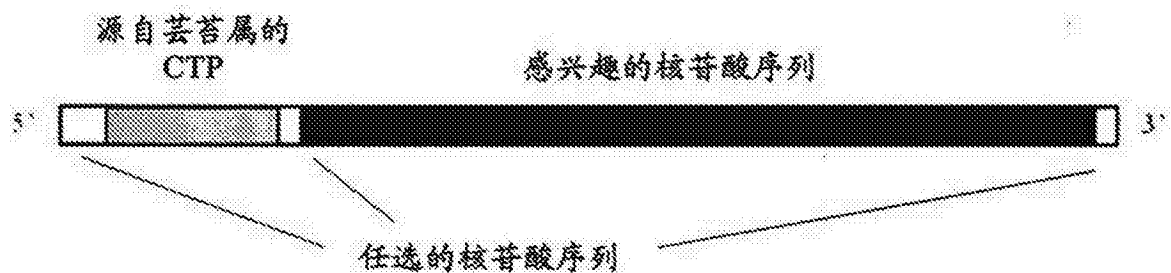


图1

pDAB101977的质粒图

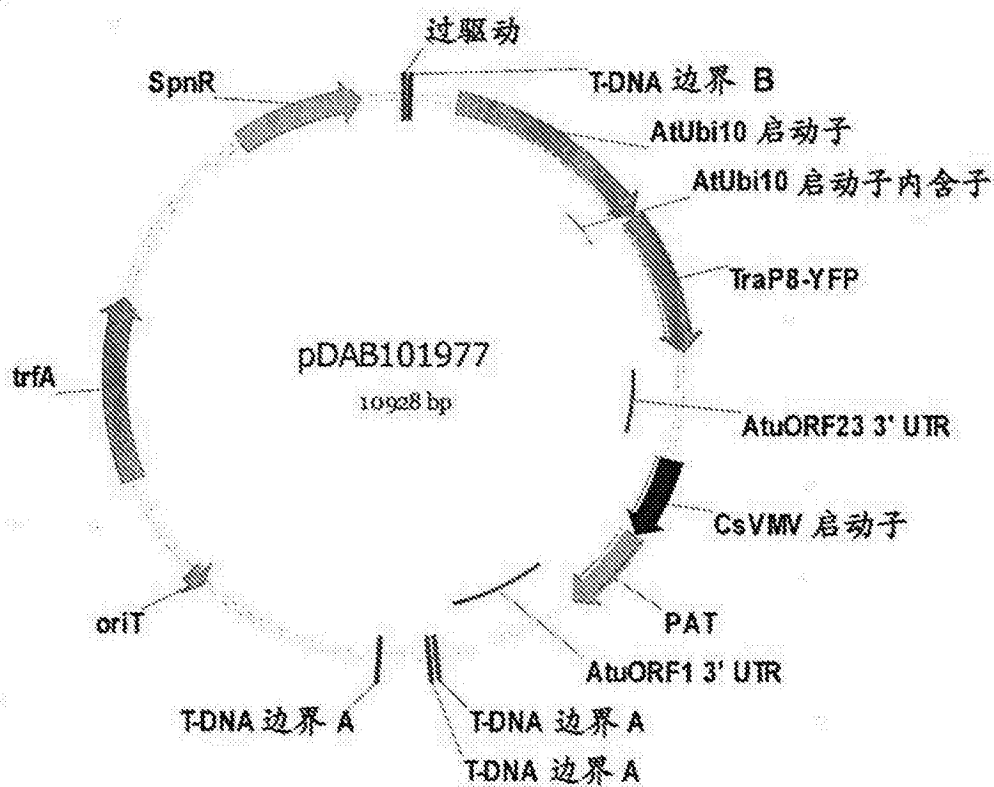


图2

pDAB101908的质粒图

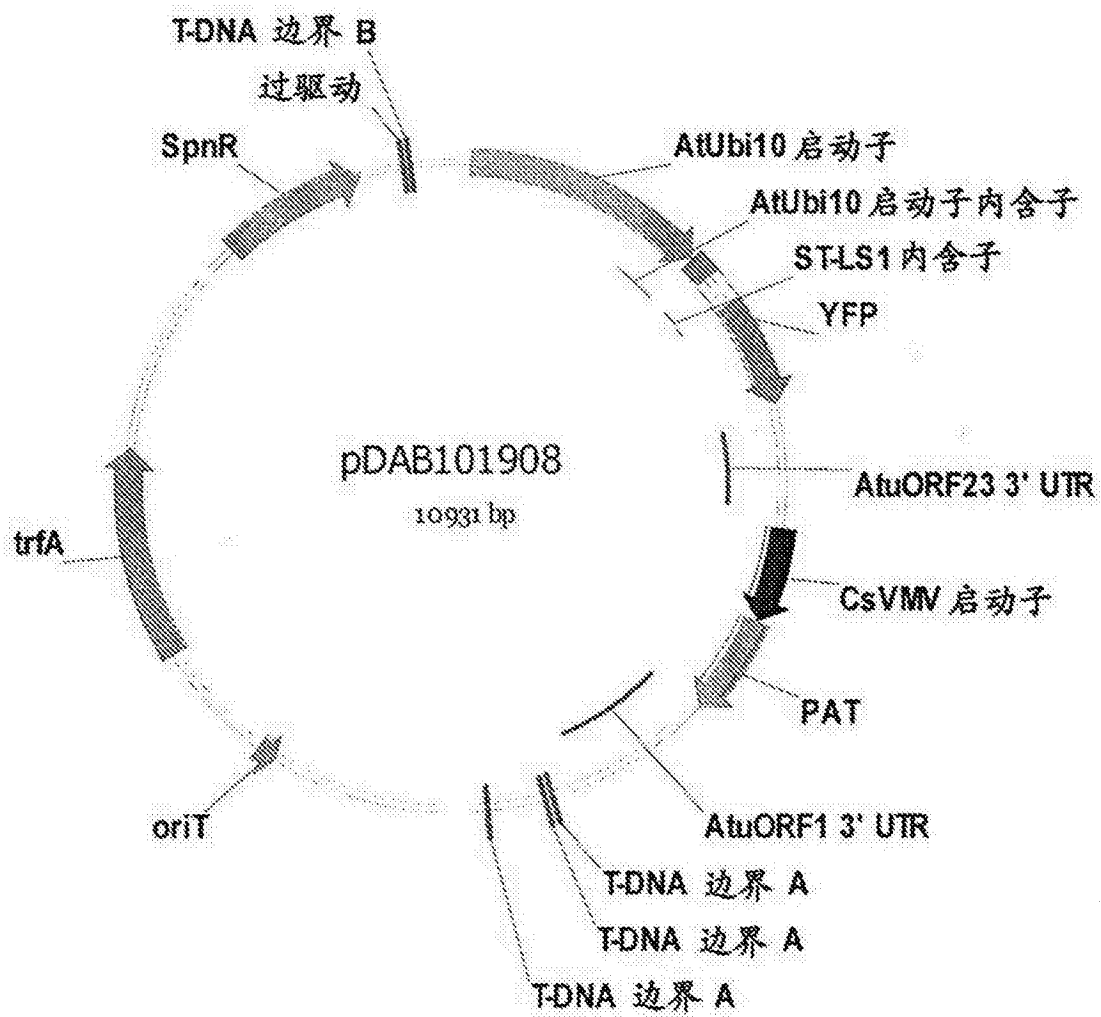


图3

浸润到烟草叶组织中的TraP8-YFP转位到烟草叶组织的叶绿体中

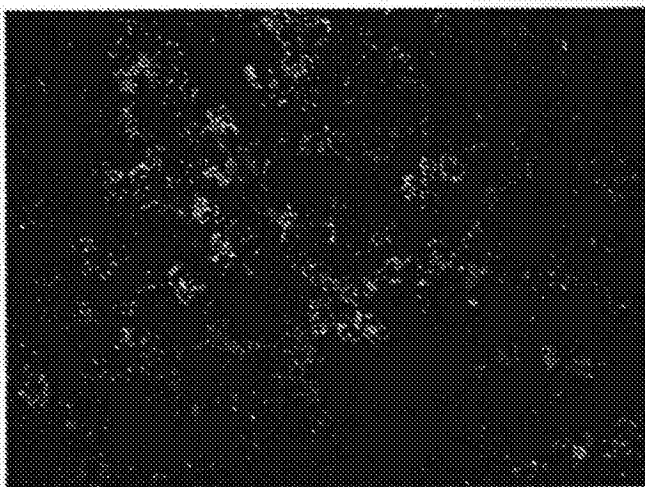


图4

浸润到烟草叶组织中的TraP9-YFP转位到烟草叶组织的叶绿体中

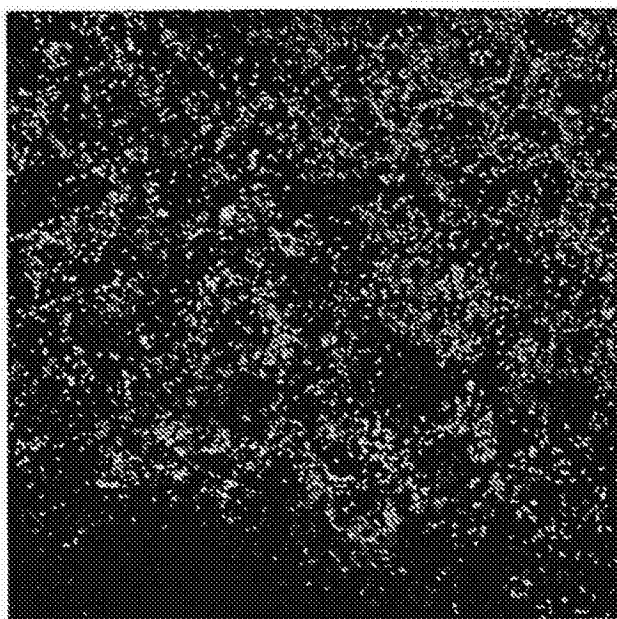


图5

浸润到烟草叶组织中的非导向YFP对照未掺入
烟草叶组织的叶绿体中



图6

pDAB106597的质粒图

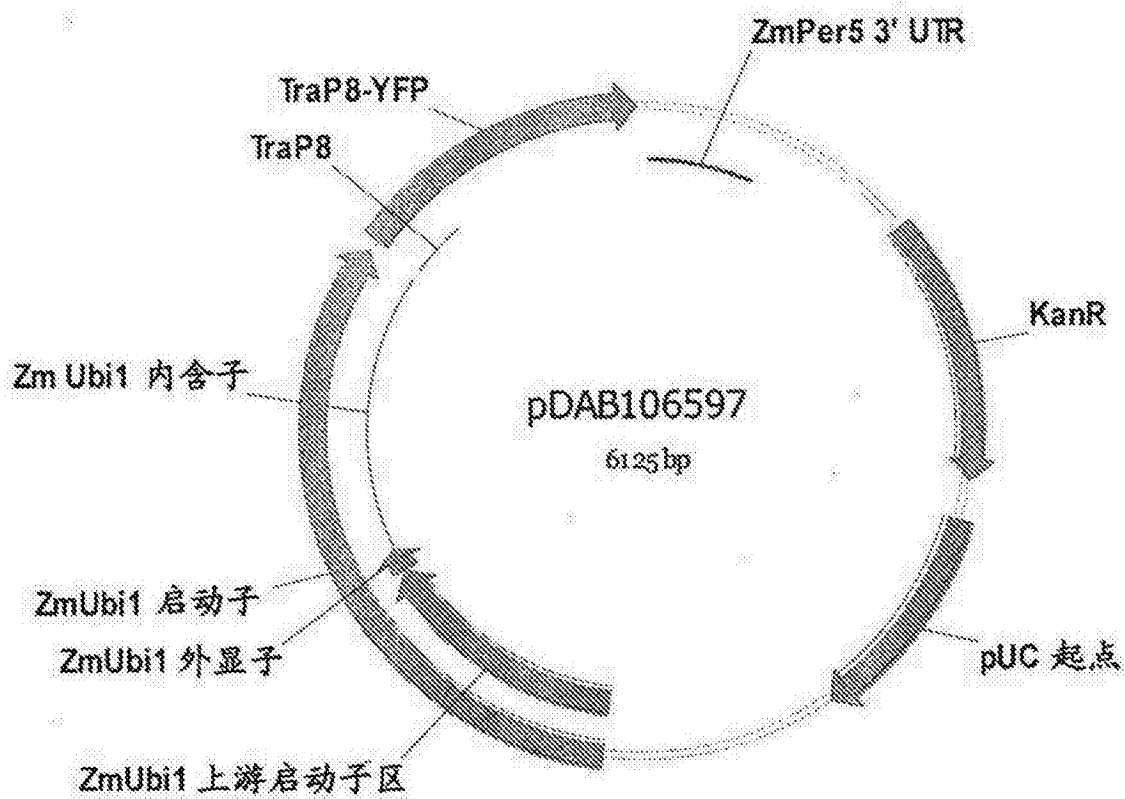


图7

转化到玉米原生质体中的TraP8 YFP转位到玉米
原生质体的叶绿体中

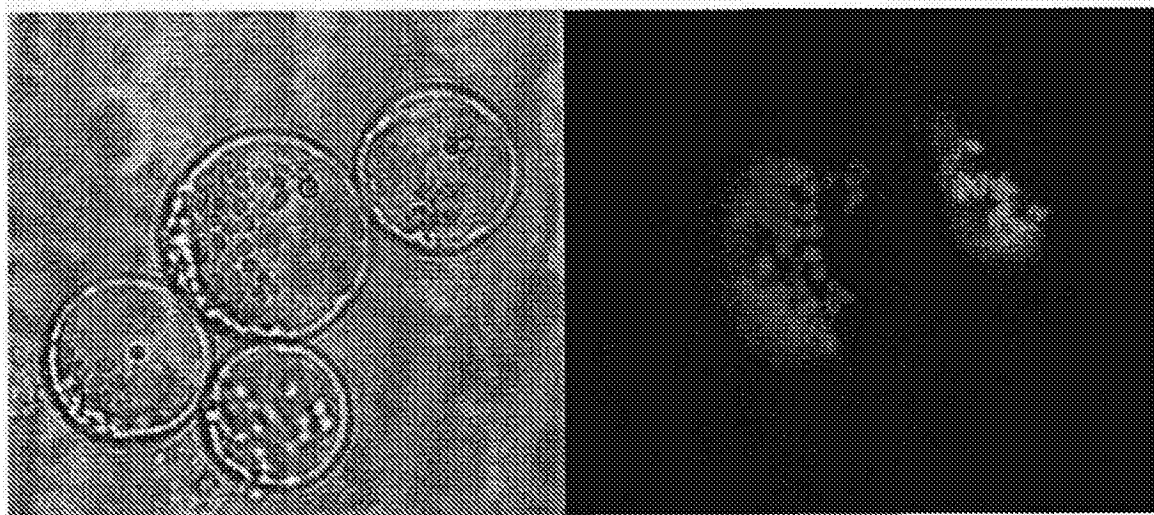


图8

pDAB105526的质粒图

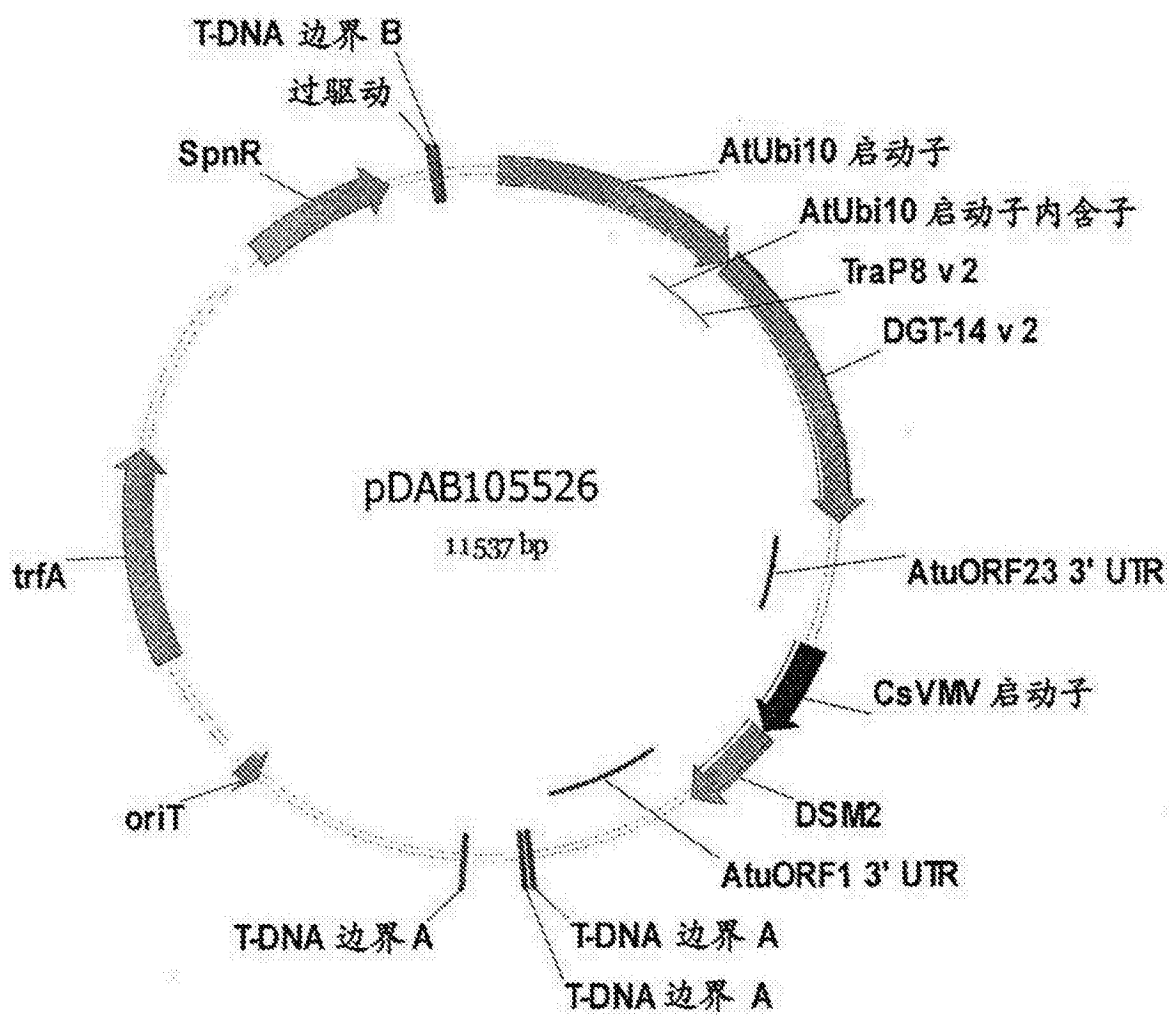


图9

pDAB105527的质粒图

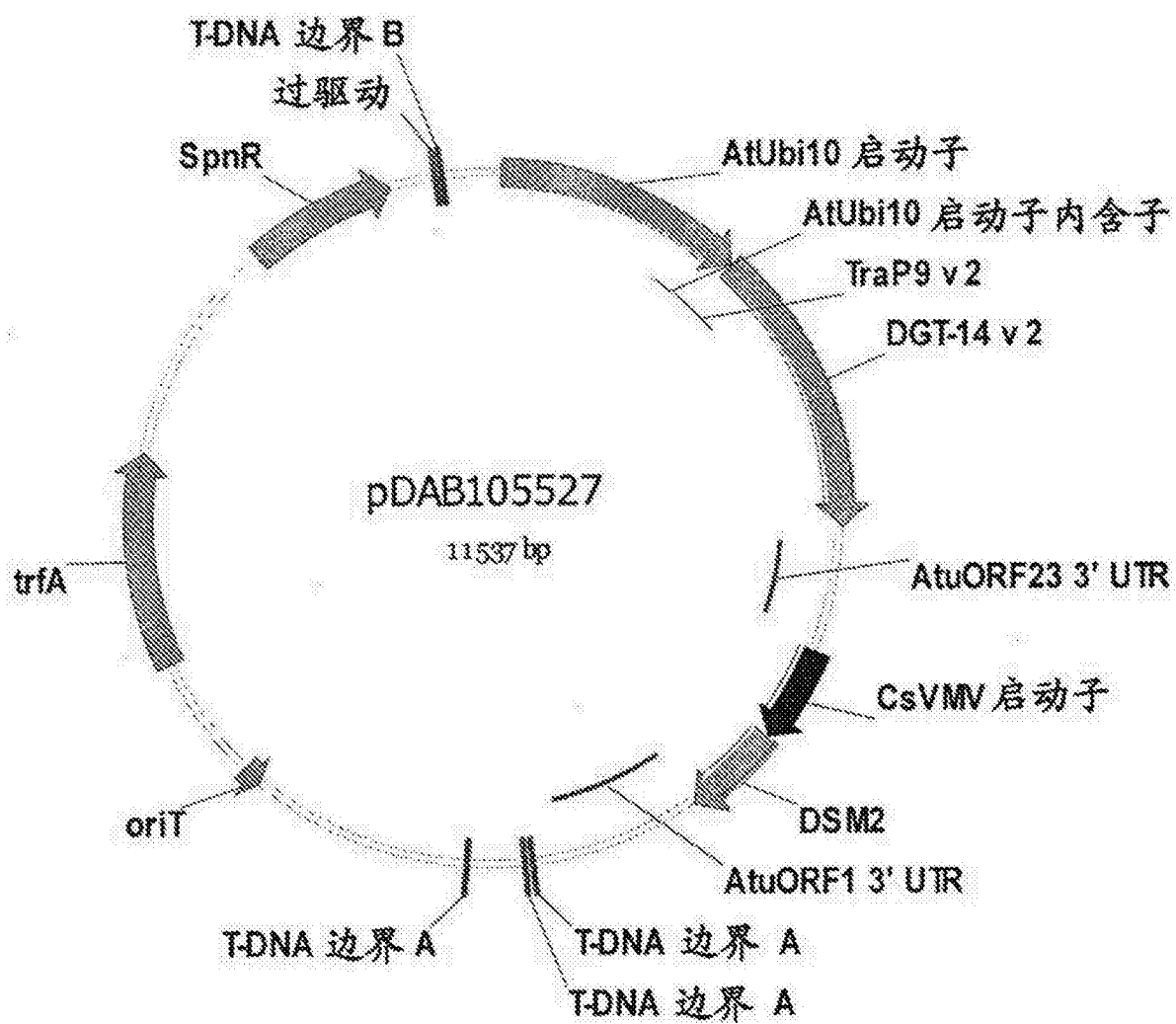


图10

pDAB109807的质粒图

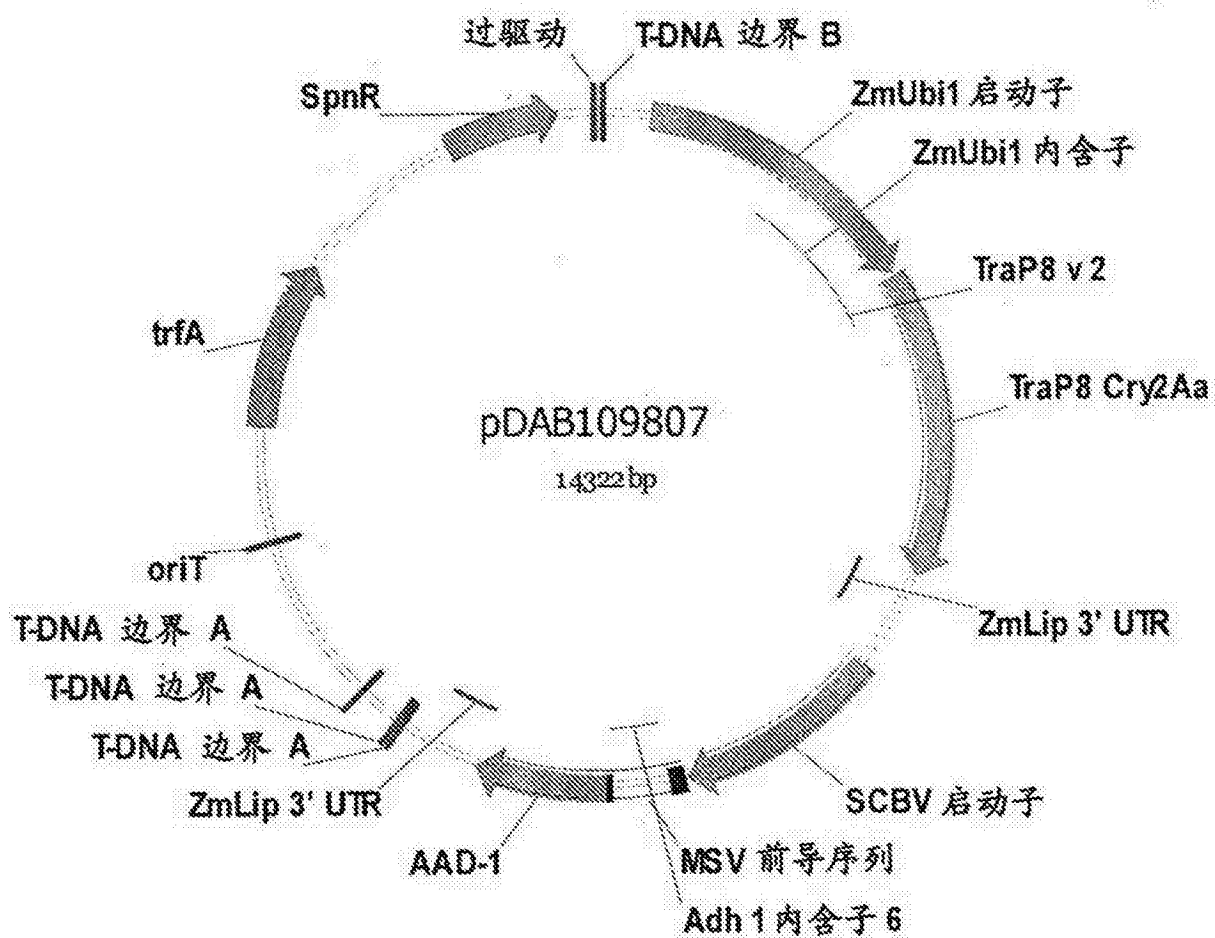


图11

pDAB107687的质粒图

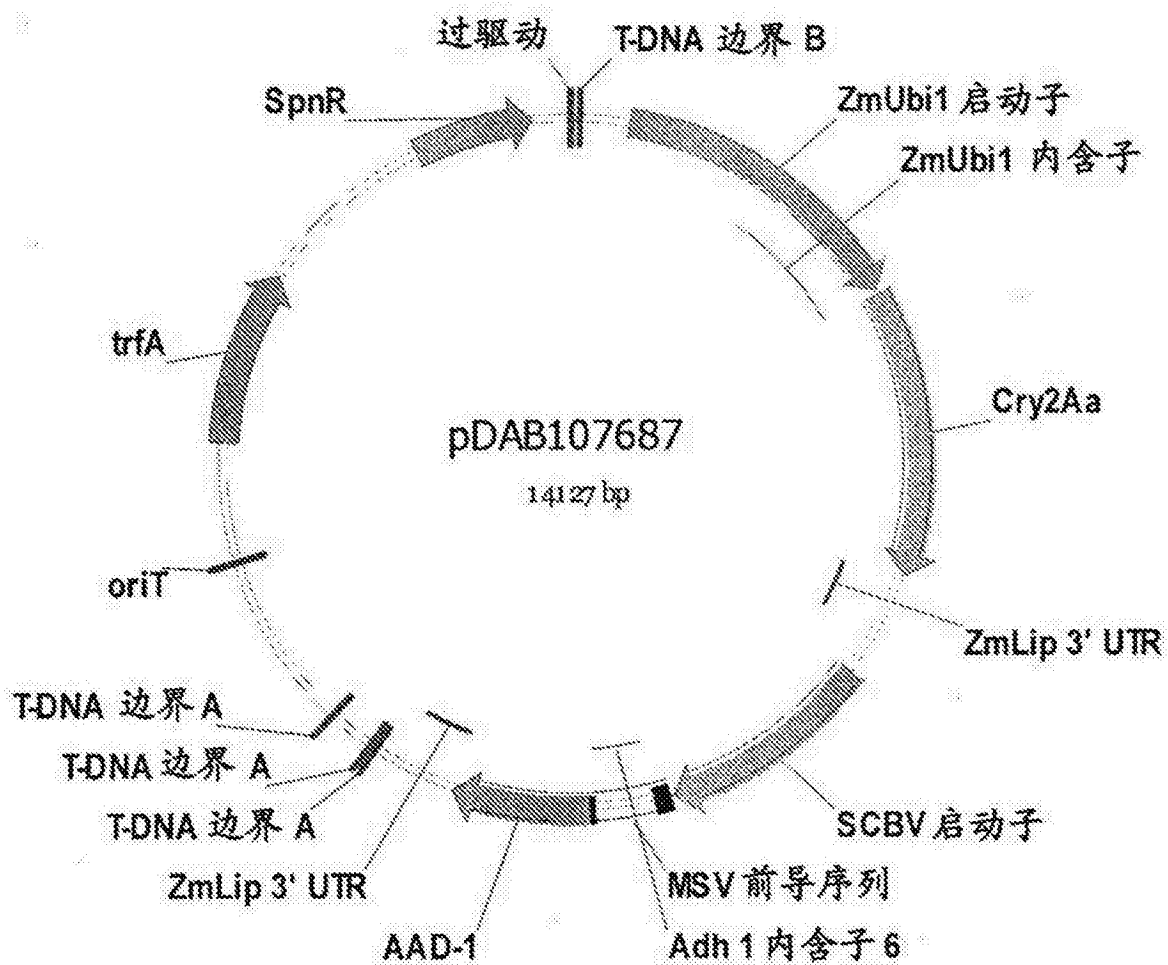


图12

pDAB111481的质粒图

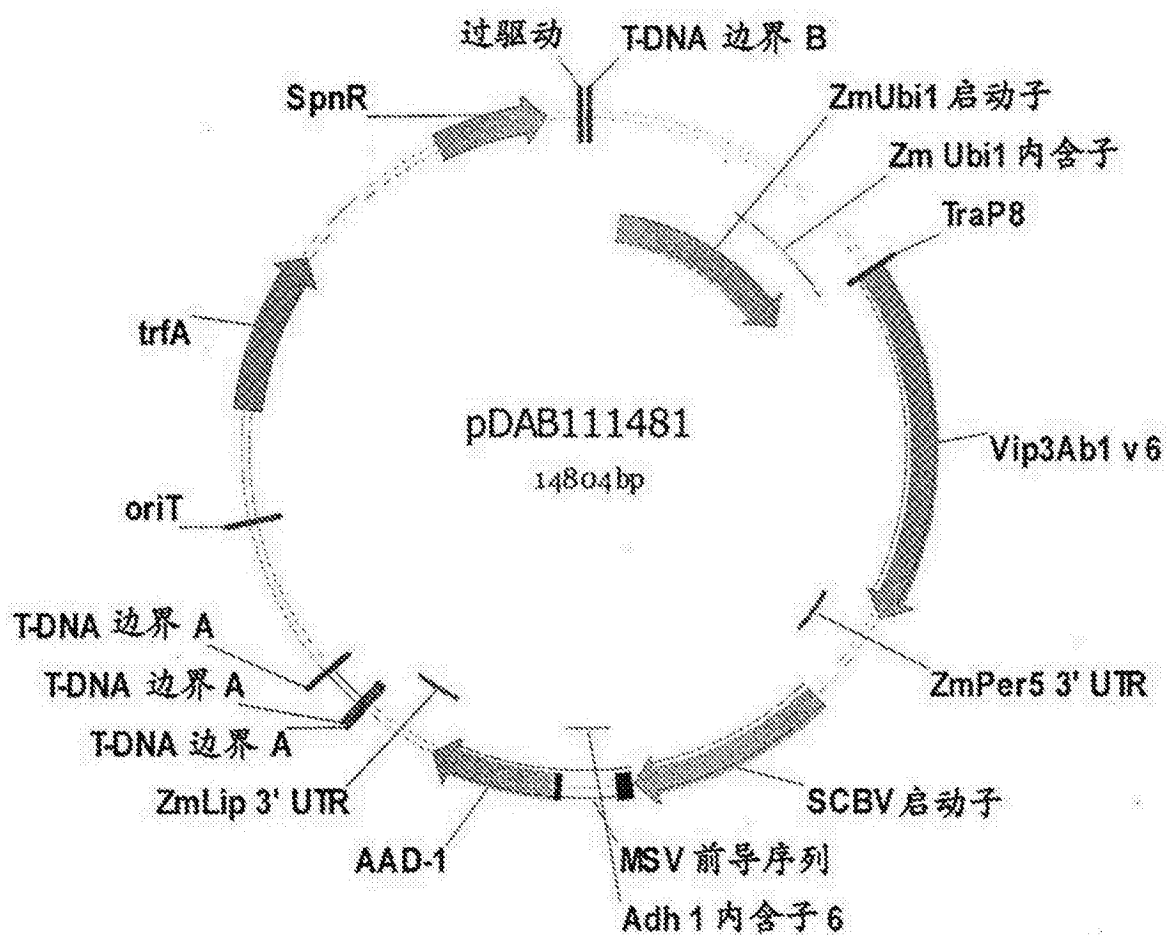


图13

pDAB111479的质粒图

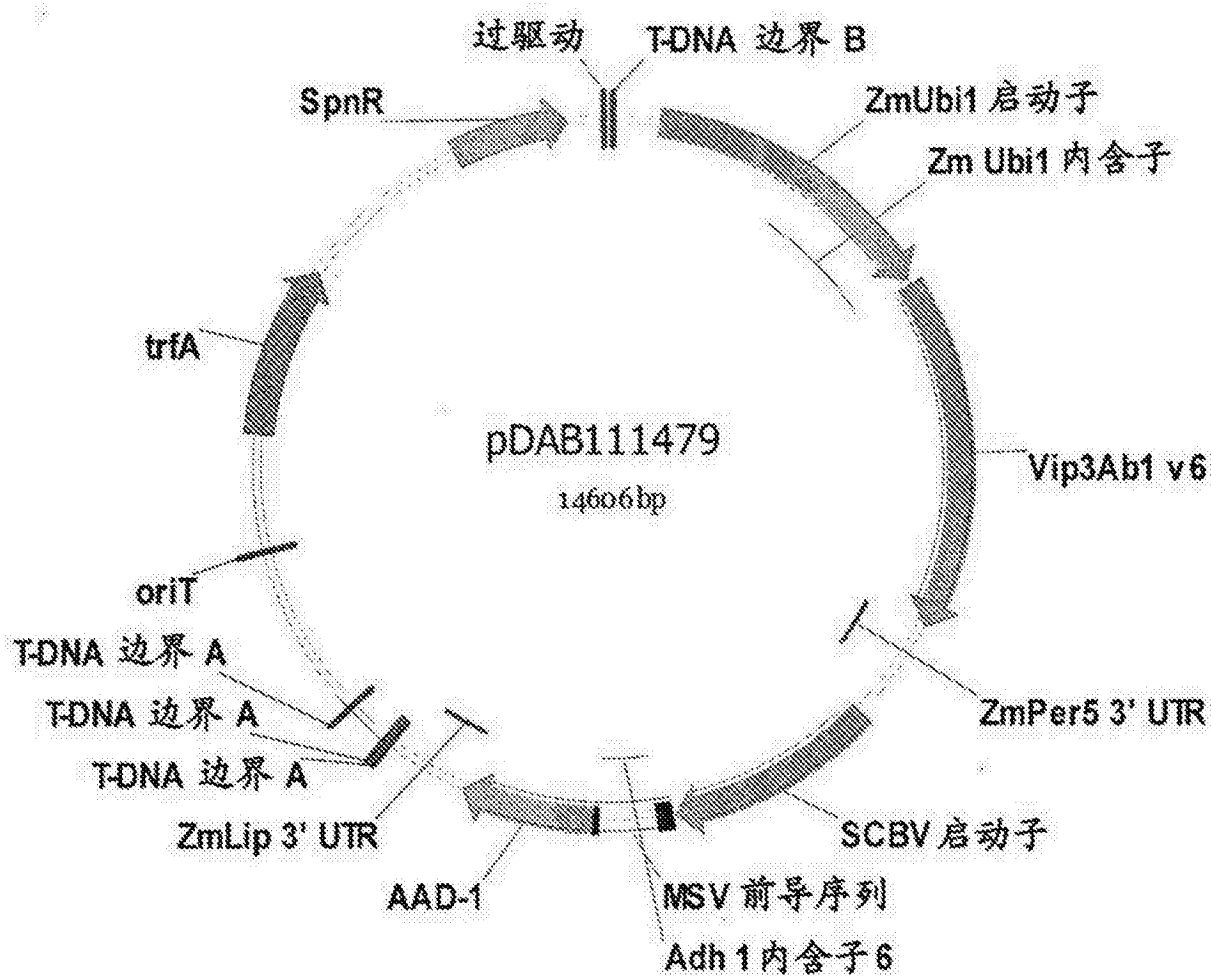


图14

pDAB111338的质粒图

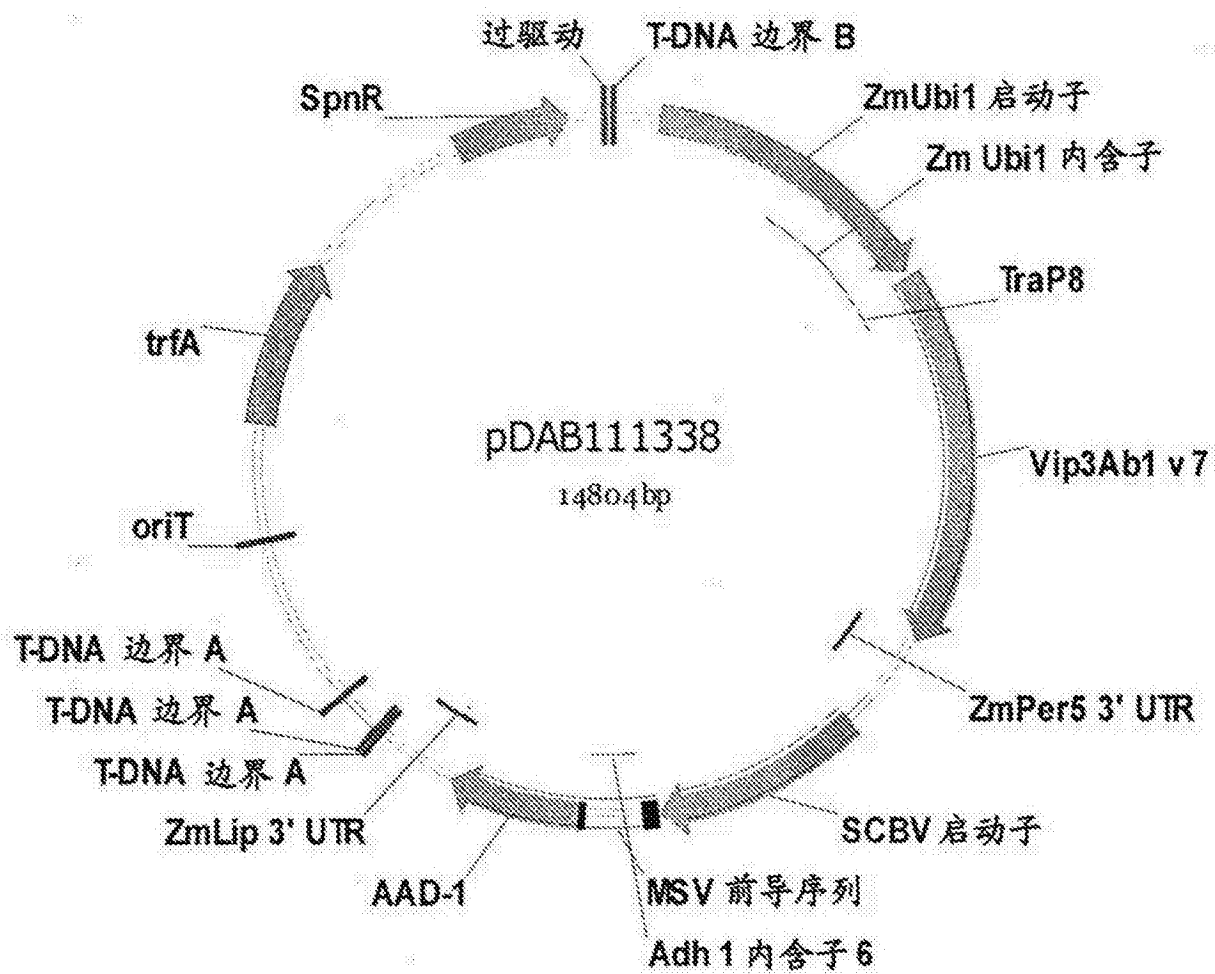


图15

pDAB112710的质粒图

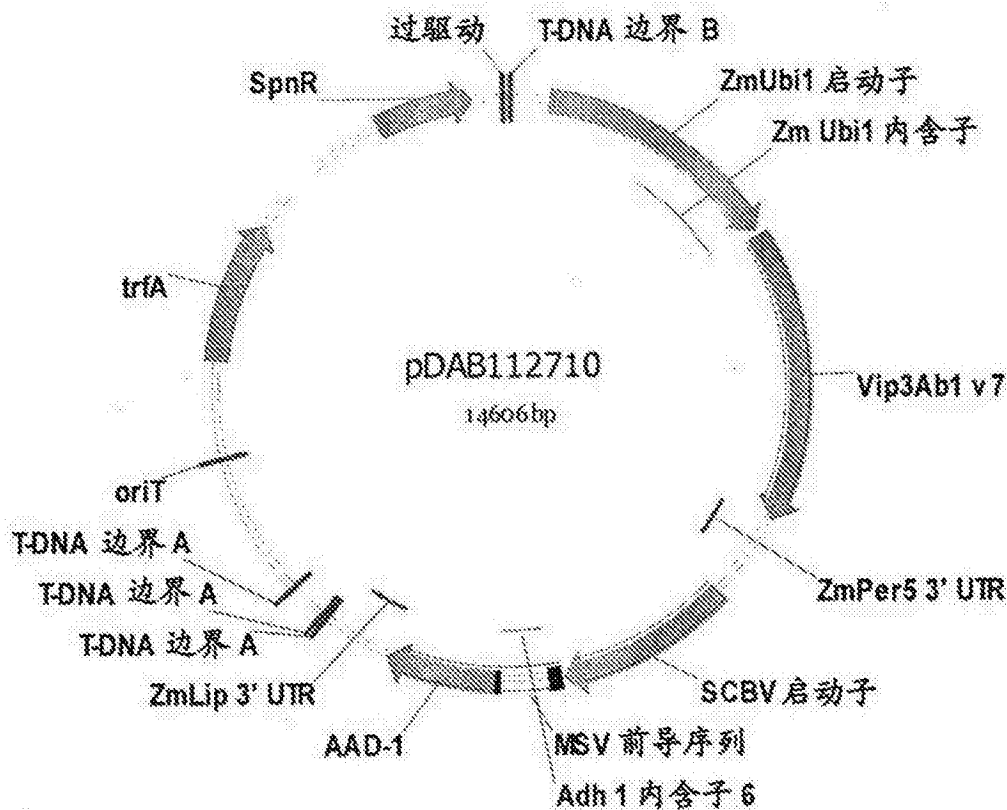


图16

来自欧洲油菜(*Brassica napus*) (SEQ ID NO:1)和芜菁(*Brassica rapa*) (SEQ ID NO:2)的EPSPS蛋白的预测叶绿体转运肽的比对。星号表示各序列被断开以重组形成TraP8和TraP9之处。

			1		*	40
欧洲油菜	(SEQ ID NO:1)	(1)	MAQSPRICHGVNPGVTISNLSKSNQNGPFSVSL	KTHQF		
芜菁	(SEQ ID NO:2)	(1)	MAQSPICQ---NPGVIS-NLPKSNHPKSPFSVSL	KTHQQ		
			41		74	
欧洲油菜	(SEQ ID NO:1)	(41)	R-----ASSWGLKKSGTMLNGSVIRPVKVTASVS			
芜菁	(SEQ ID NO:2)	(37)	QPPAYQISWGLKKS---N-NGSVIRPVK-----			

图 17

pDAB107527的质粒图

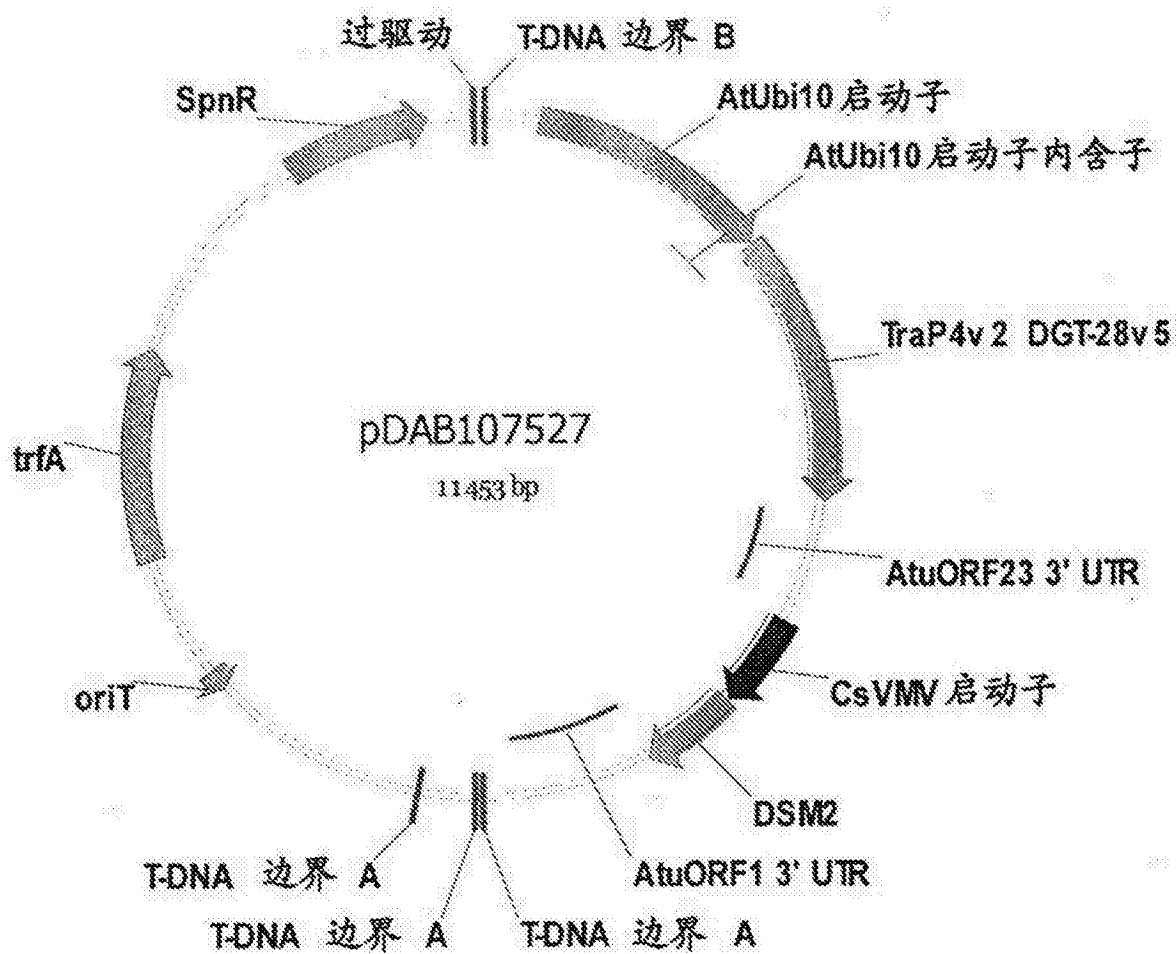


图18

pDAB105530的质粒图

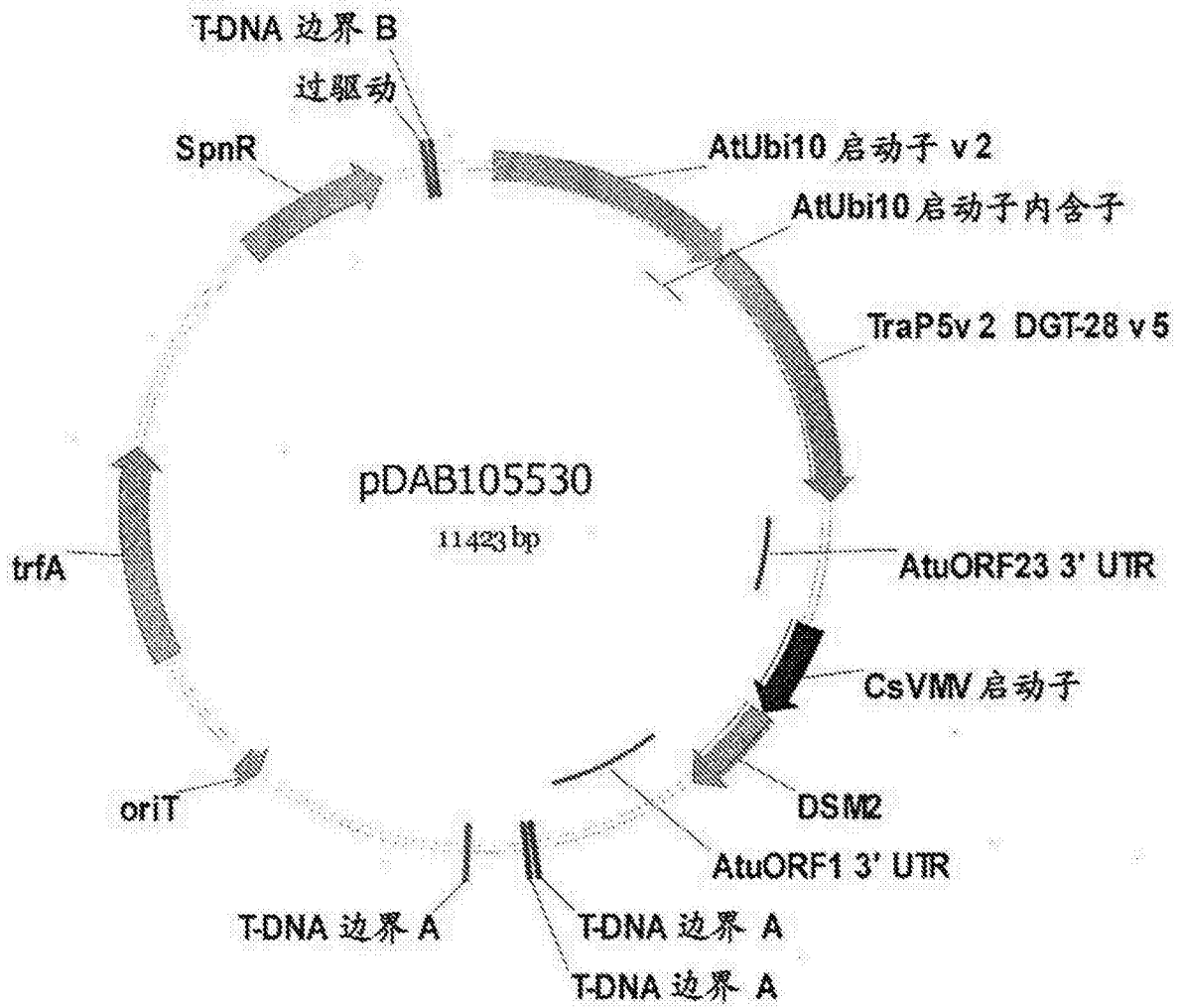


图19

pDAB105531的质粒图

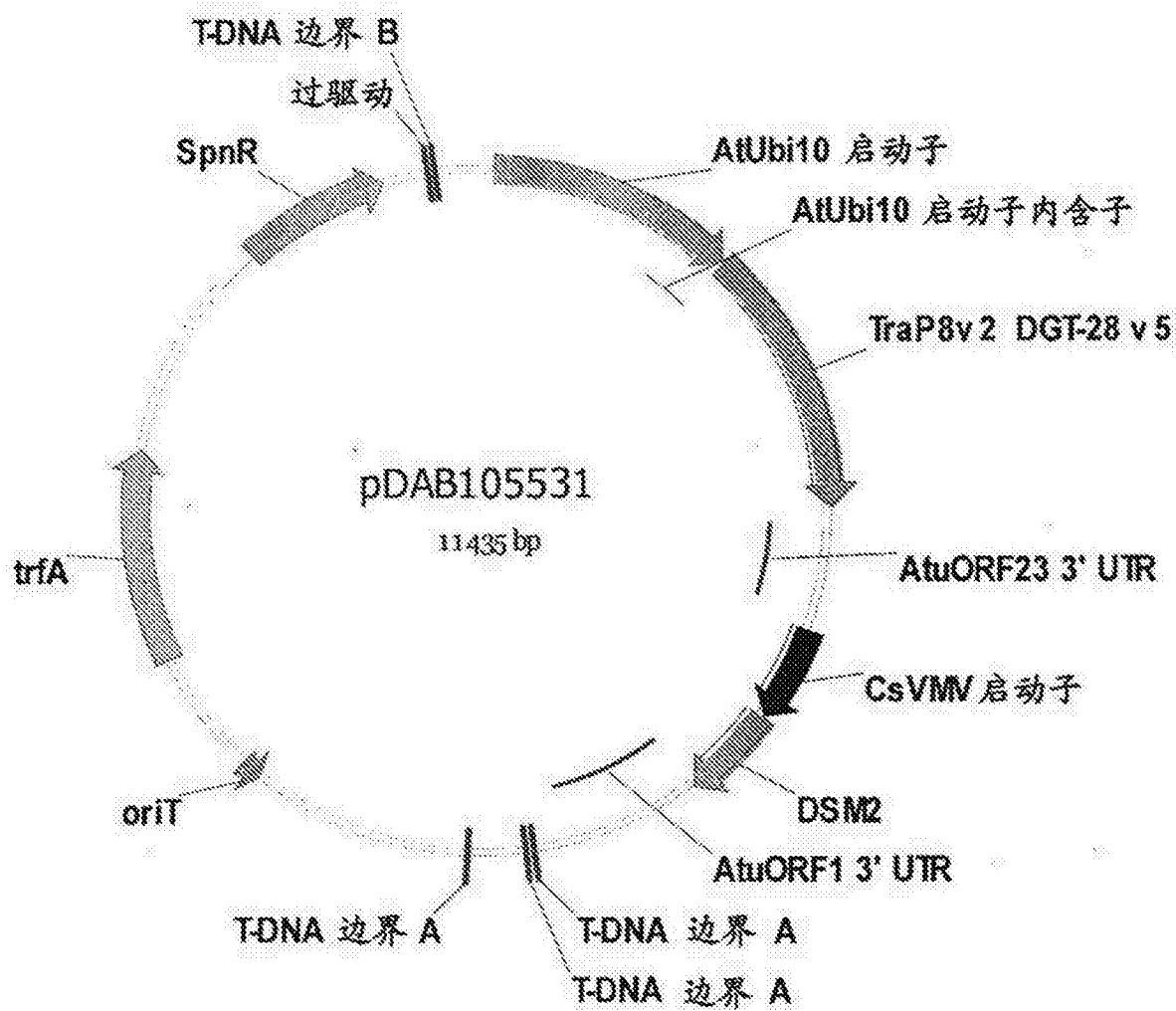


图20

pDAB105532的质粒图

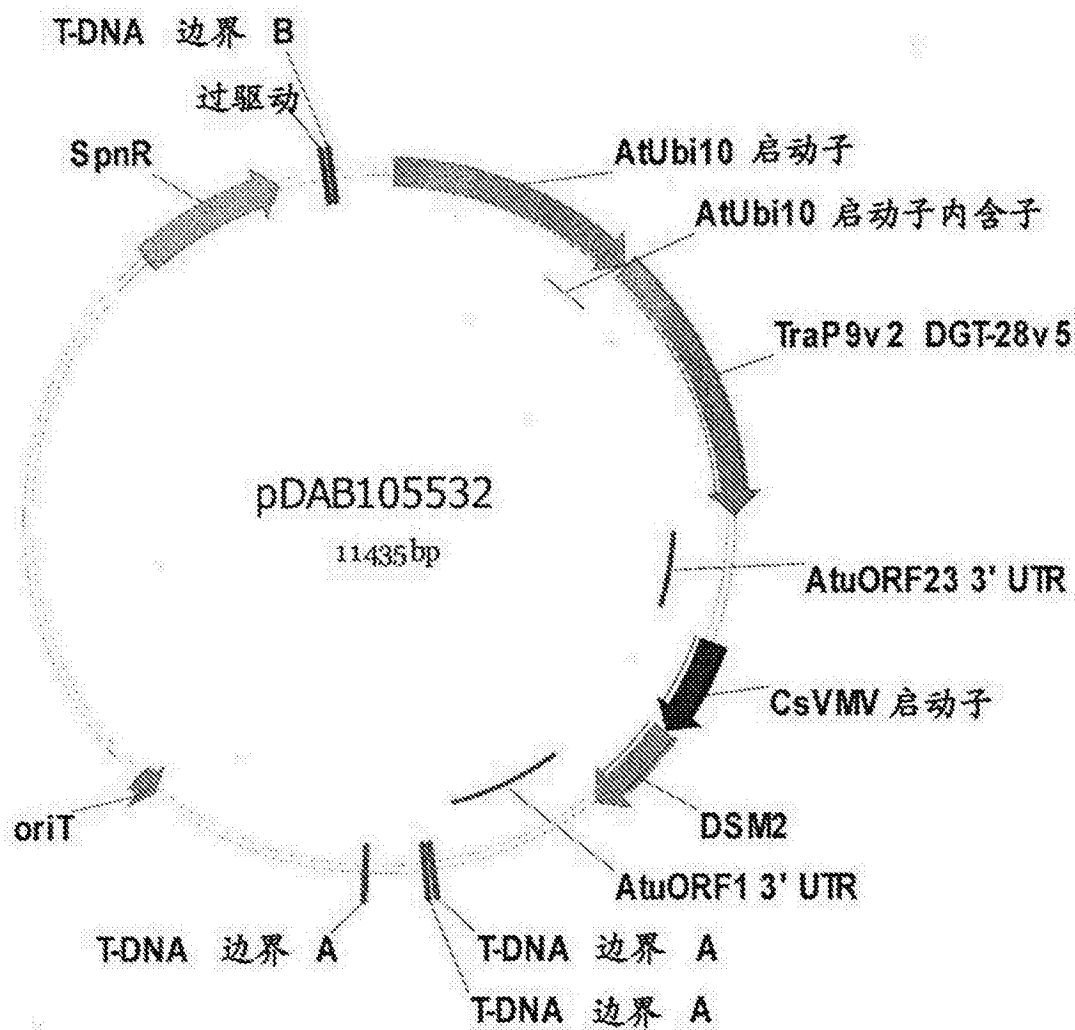


图21

pDAB105533的质粒图

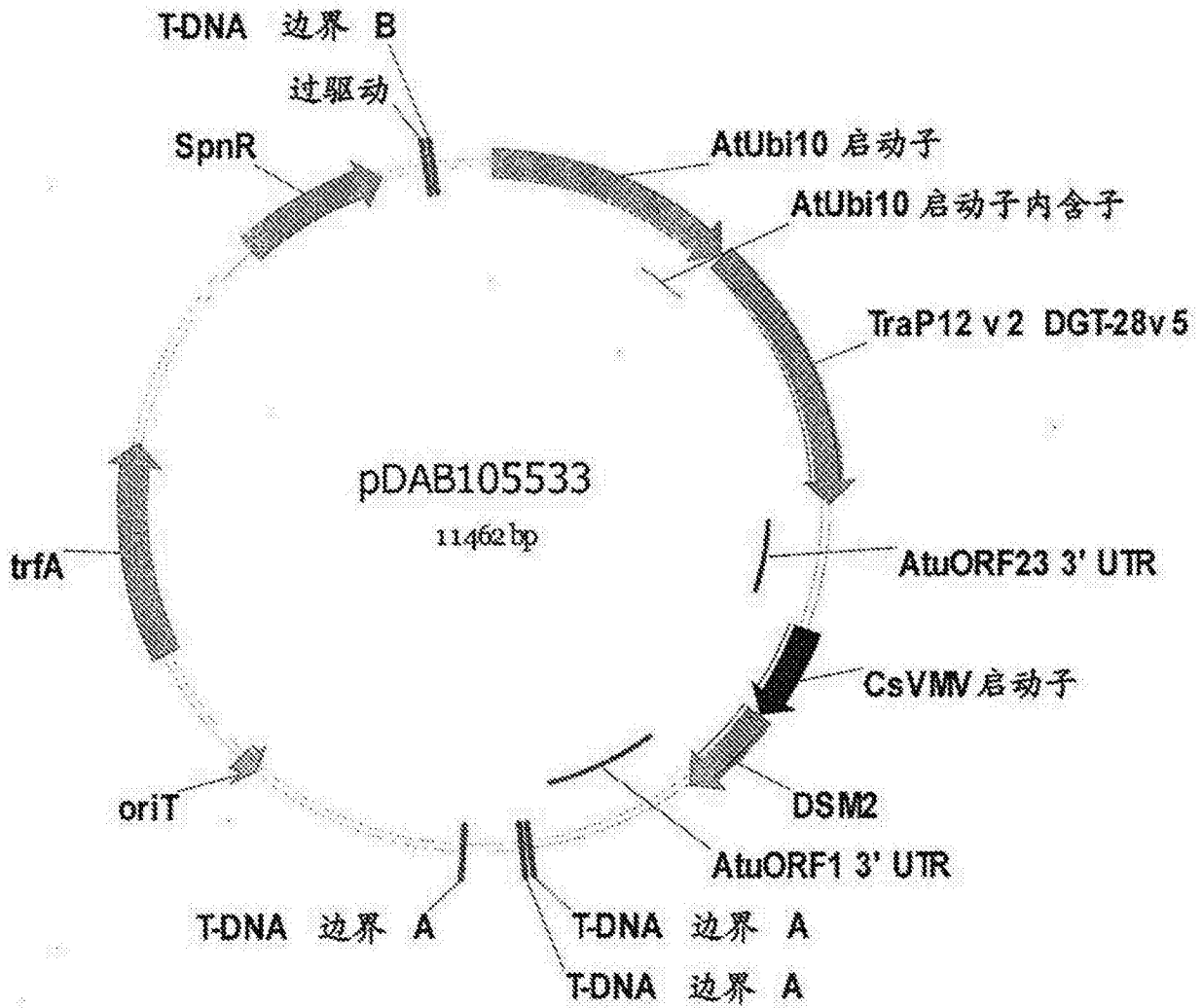


图22

pDAB105534的质粒图

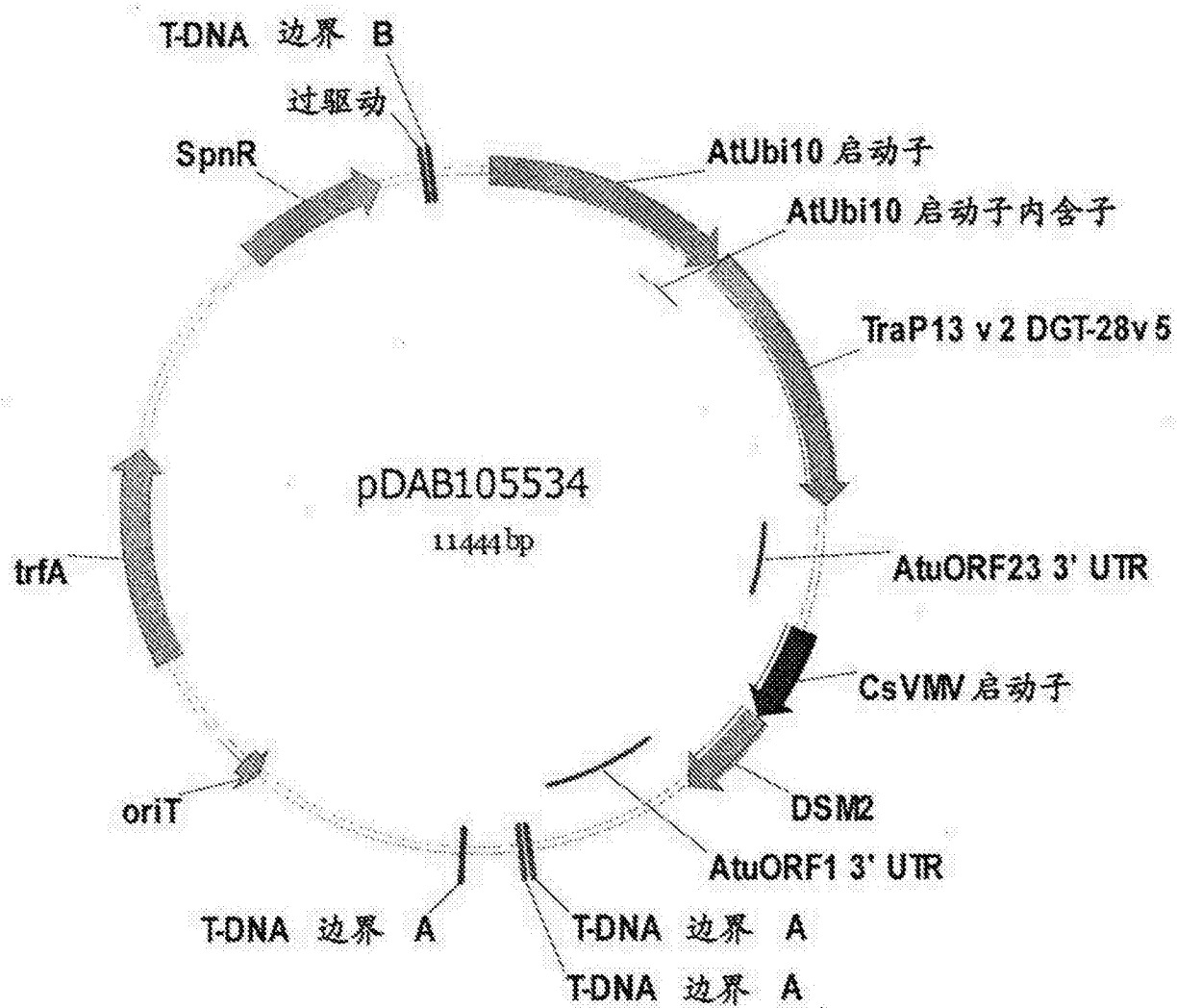


图23

pDAB107532的质粒图

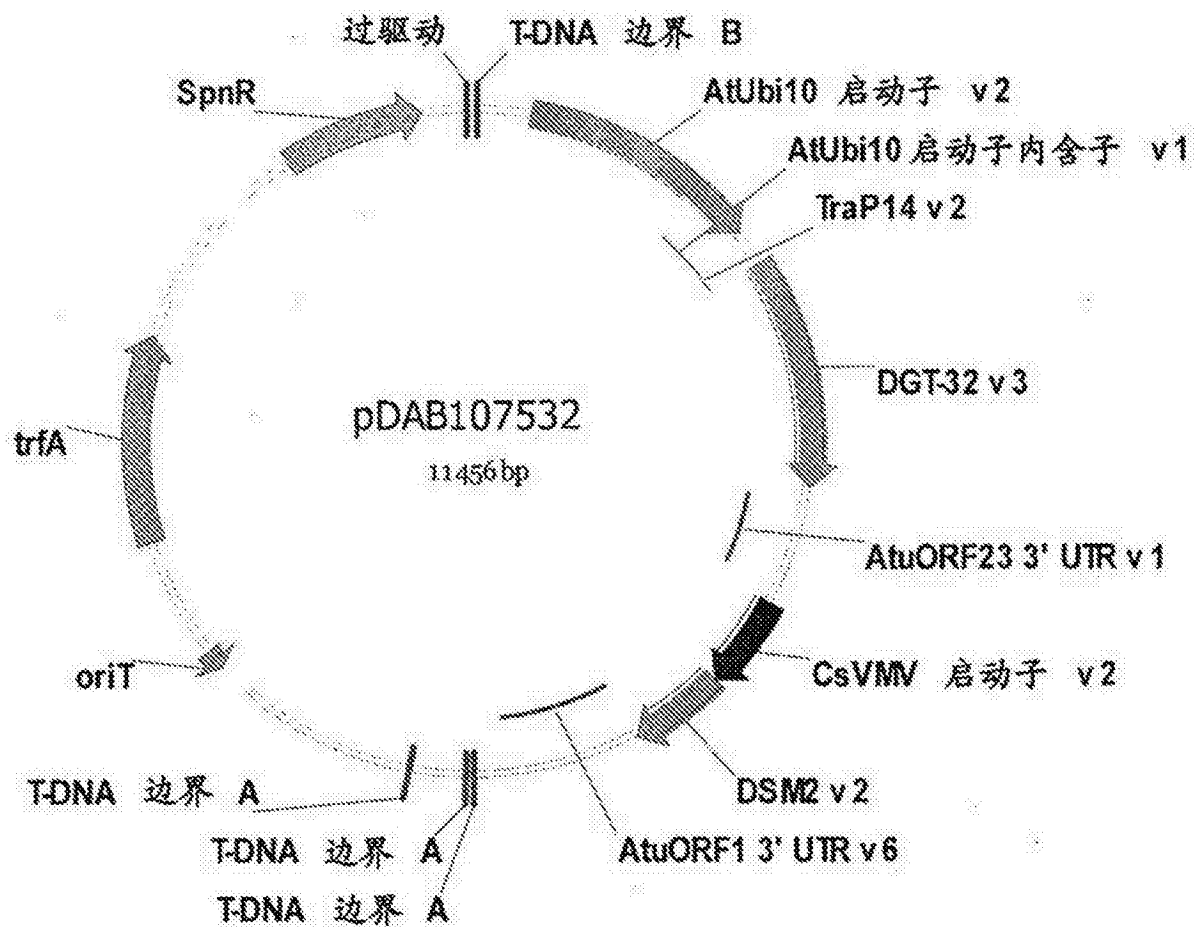


图24

pDAB107534的质粒图

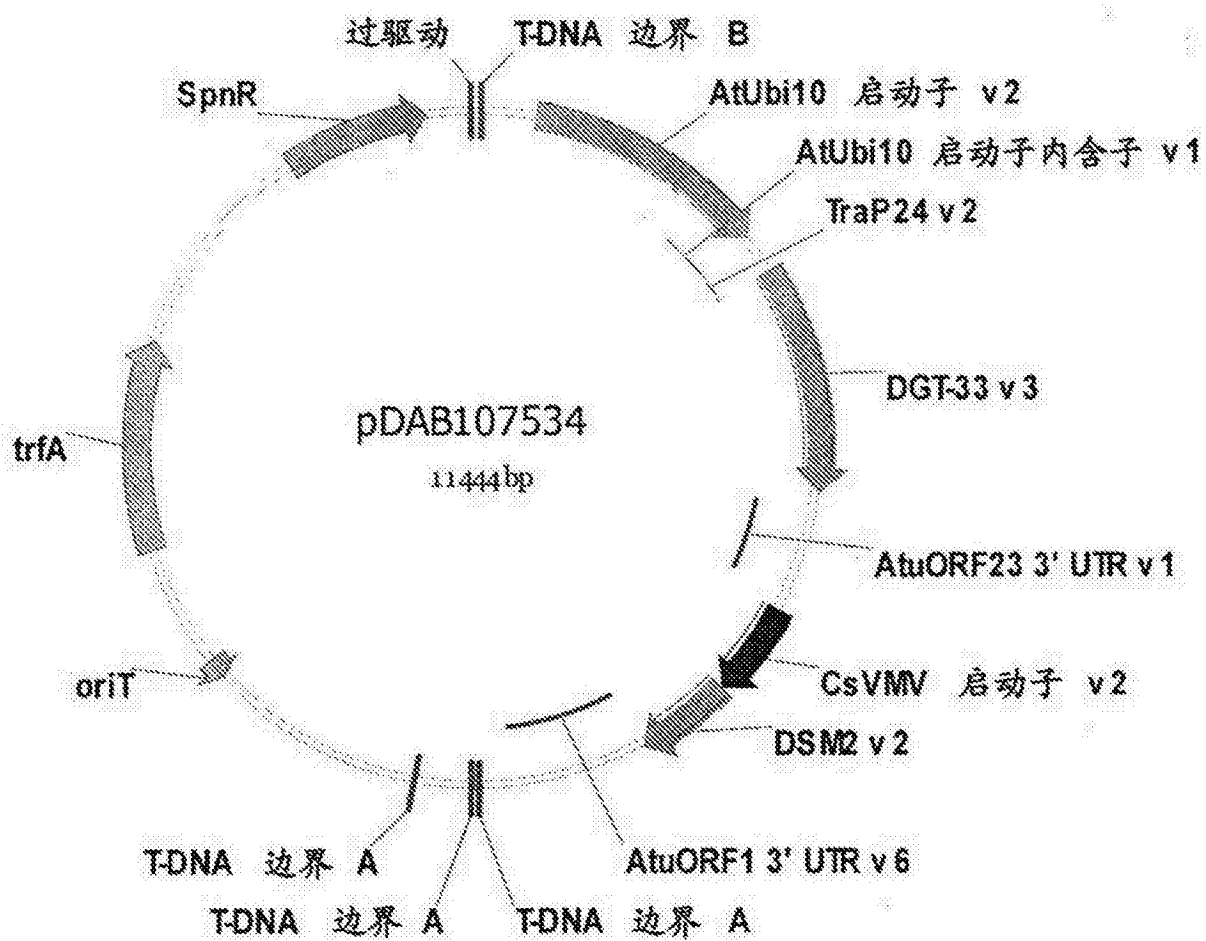


图25

pDAB107533的质粒图

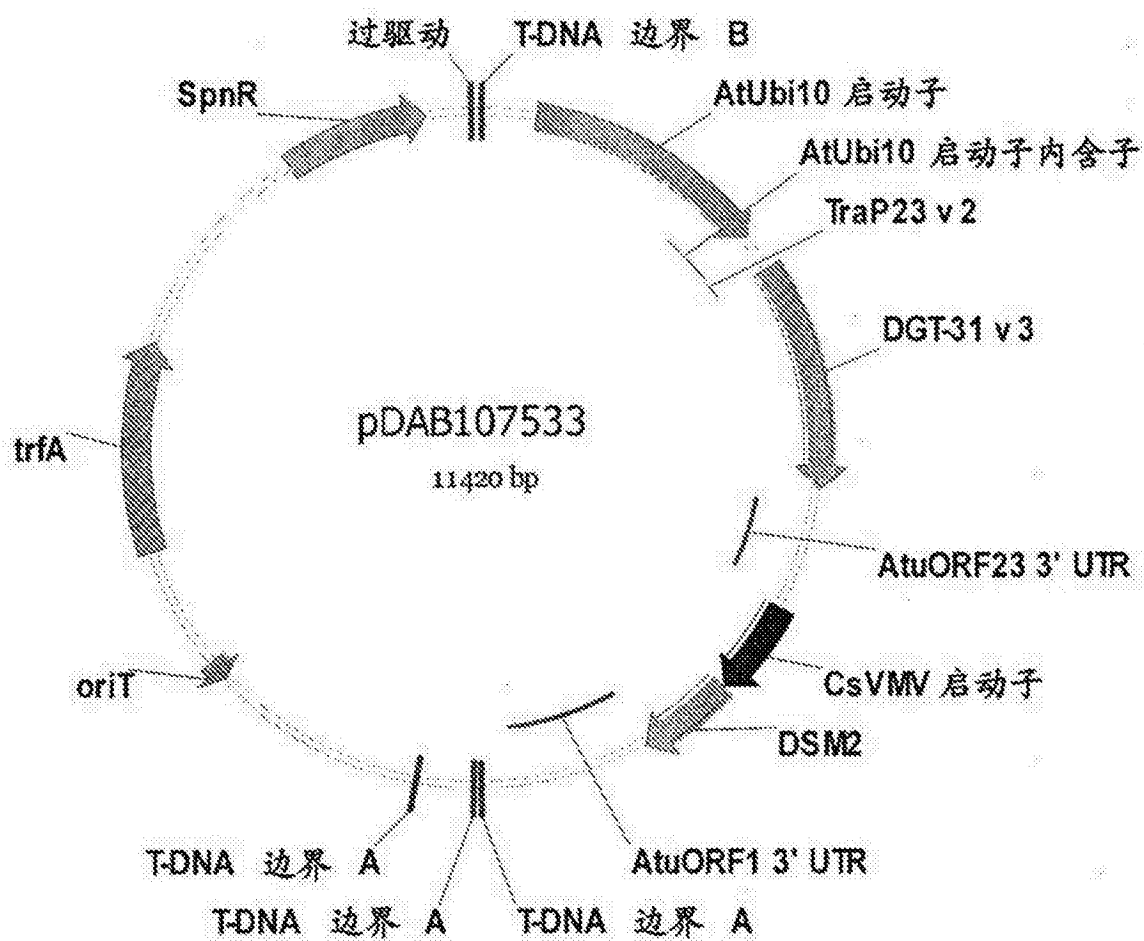


图26

pDAB4104的质粒图

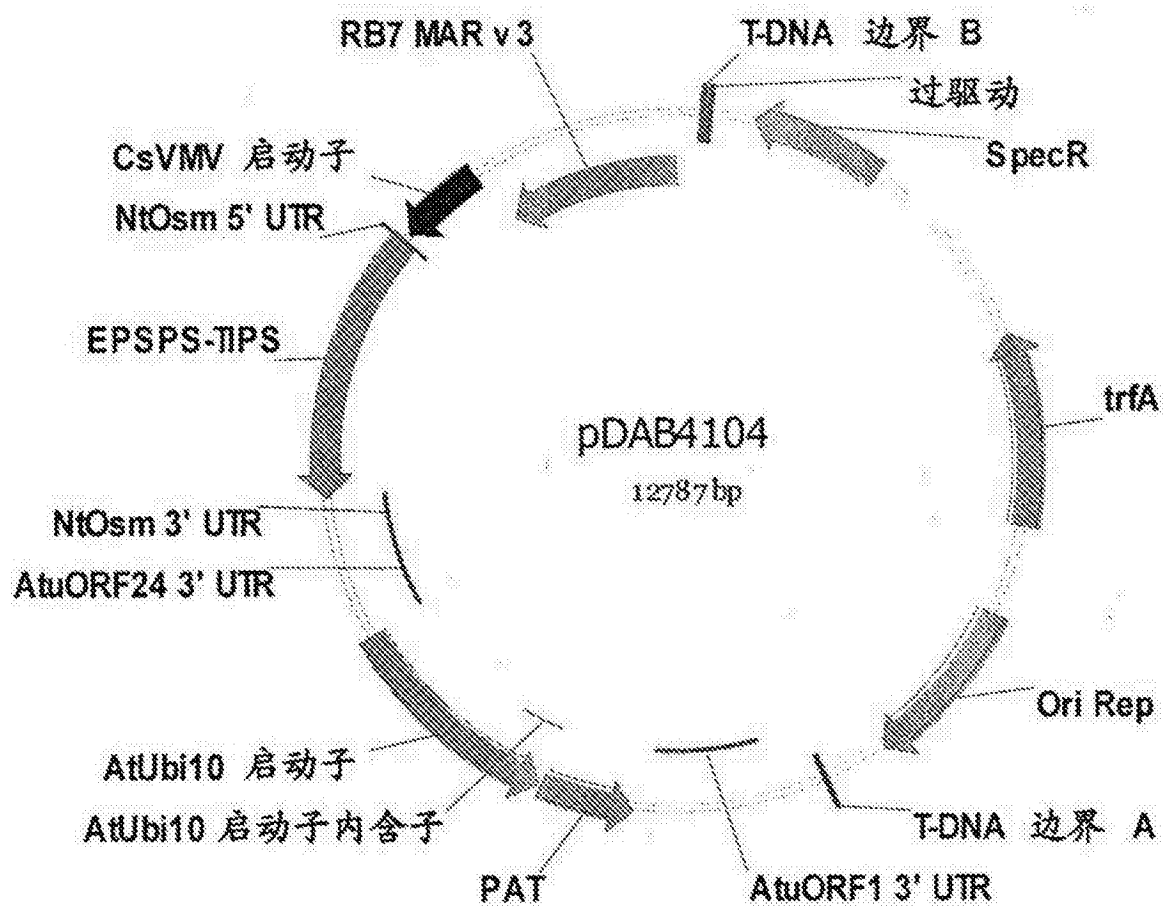


图27

pDAB102715的质粒图

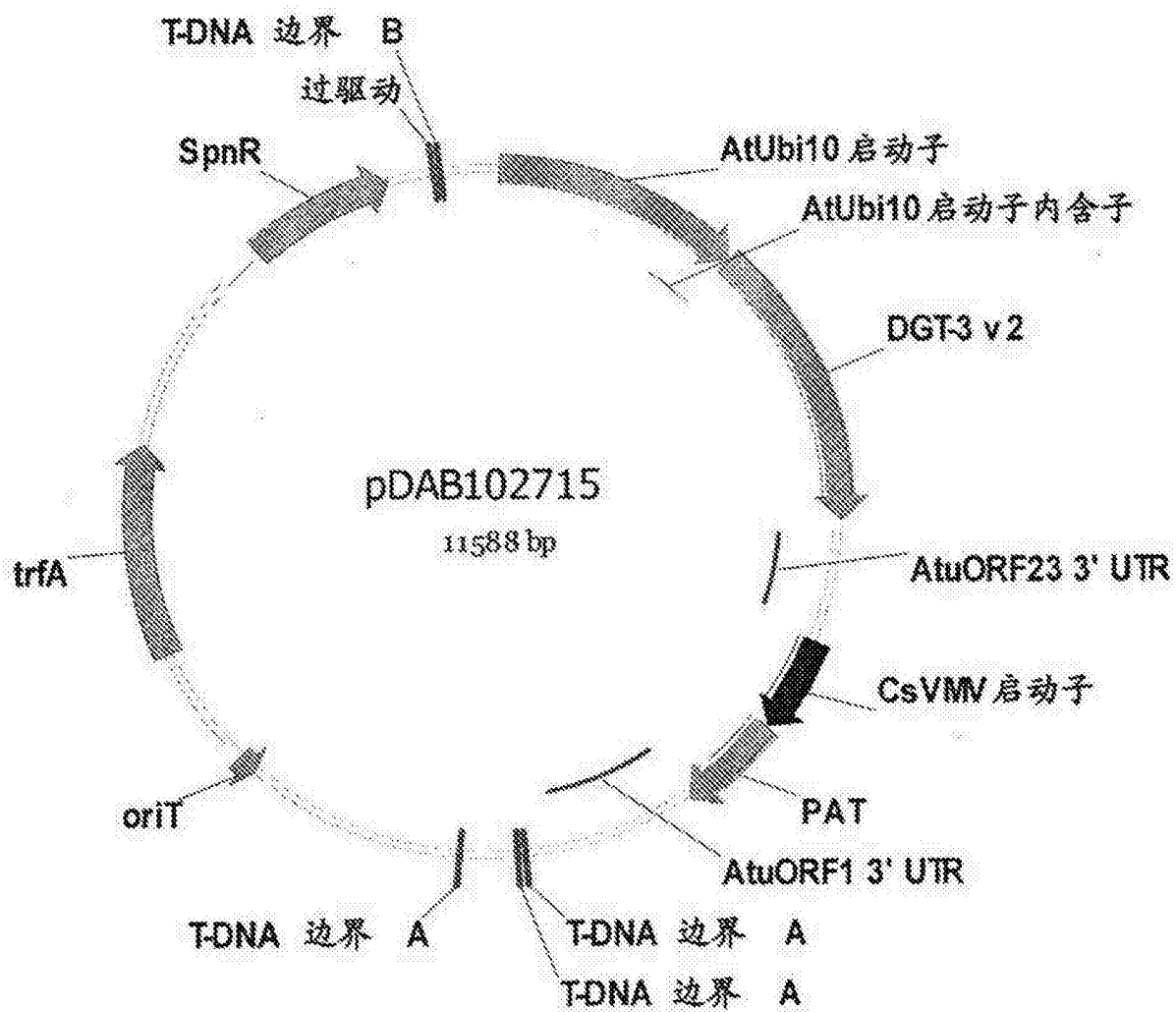


图28

pDAB102716的质粒图

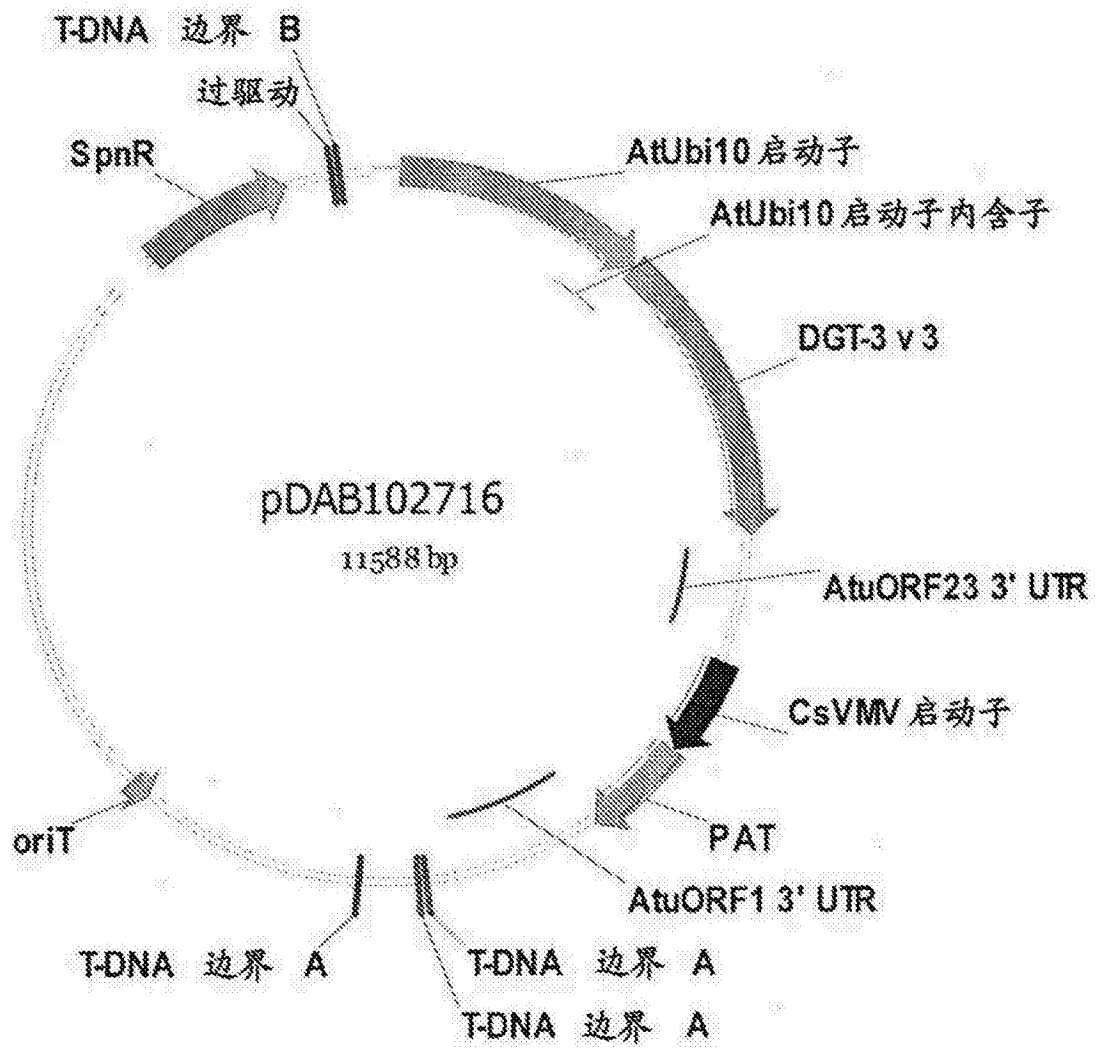


图29

pDAB102717的质粒图

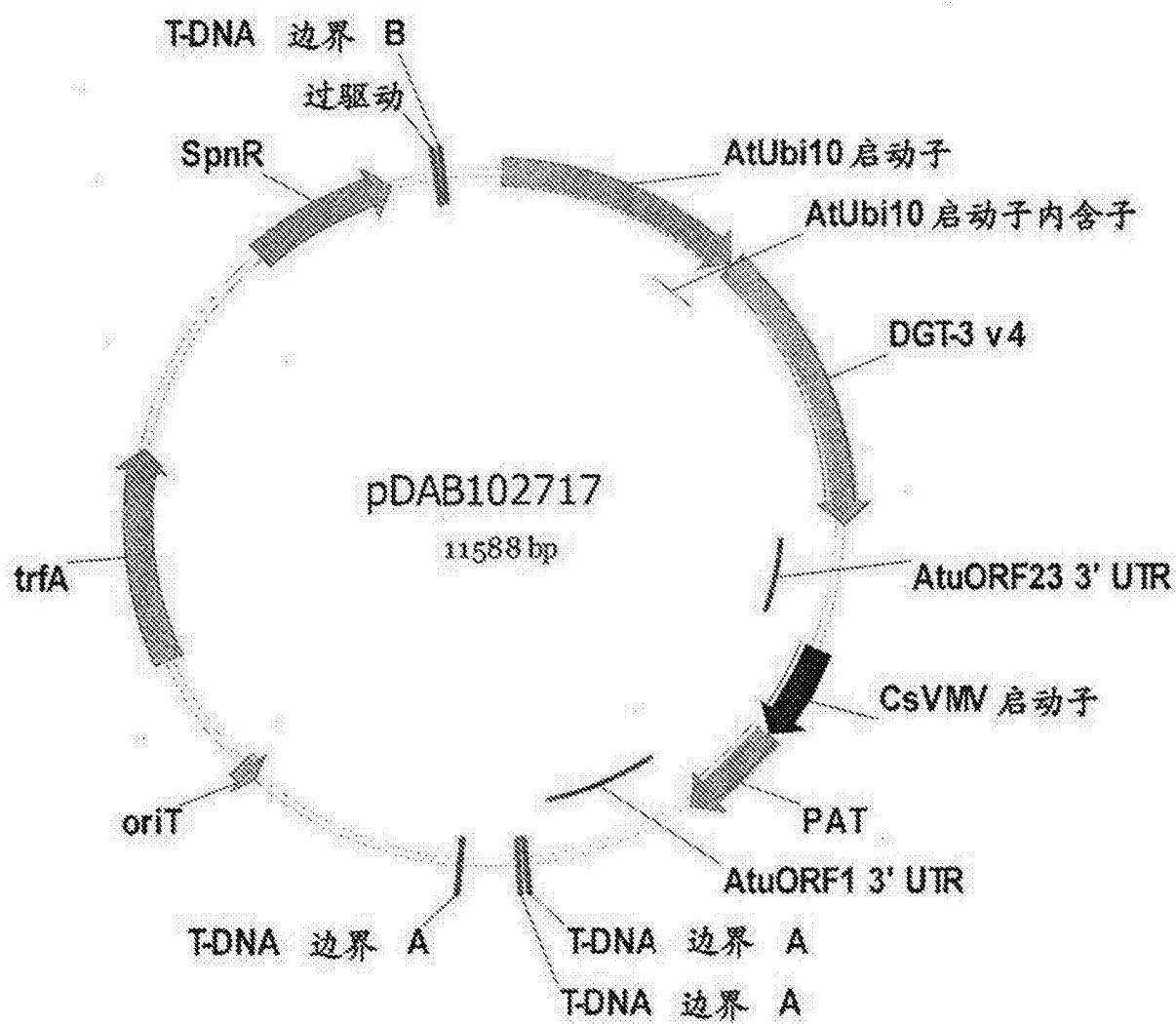


图30

pDAB102785的质粒图

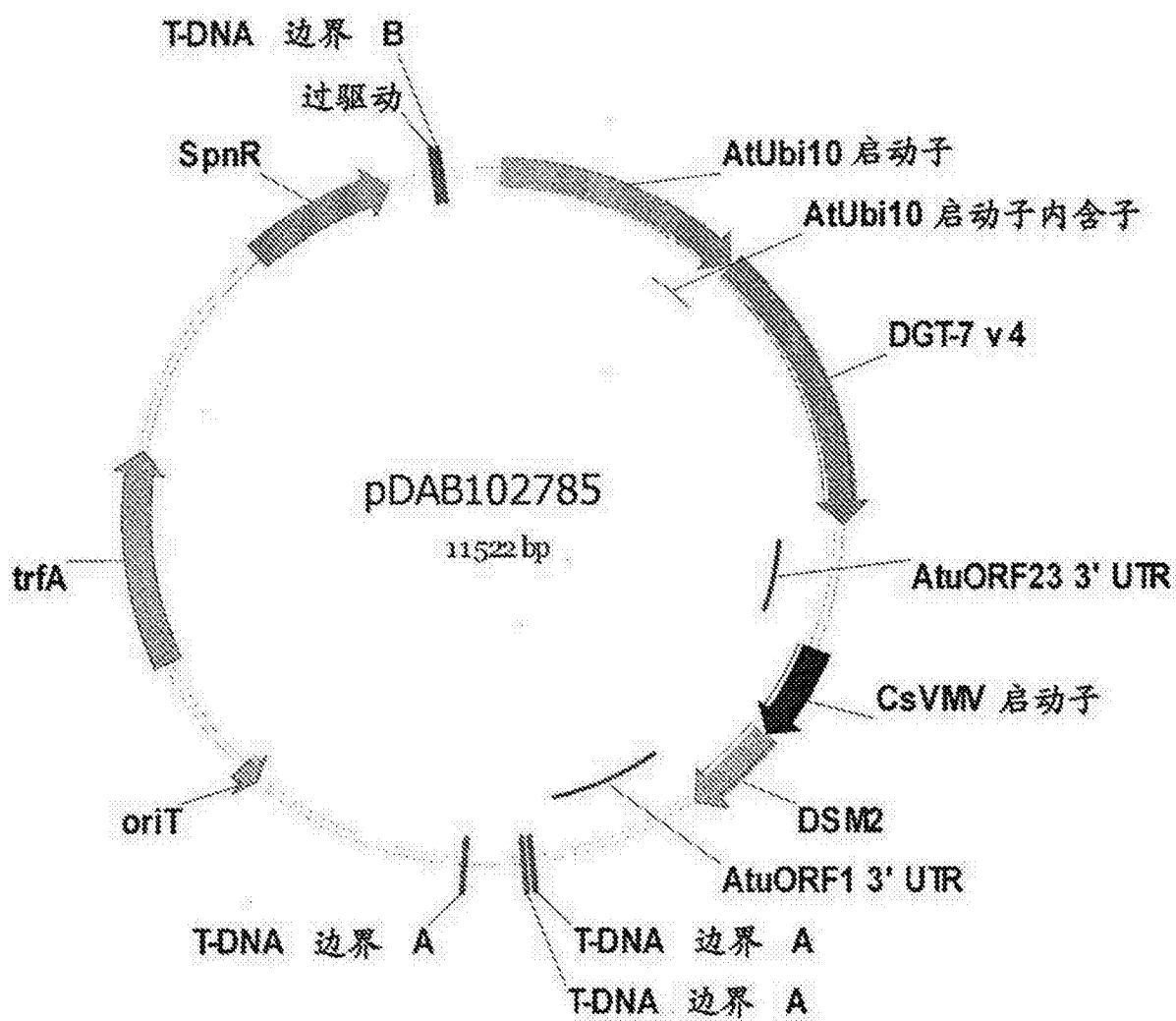


图31

pDAB102719的质粒图

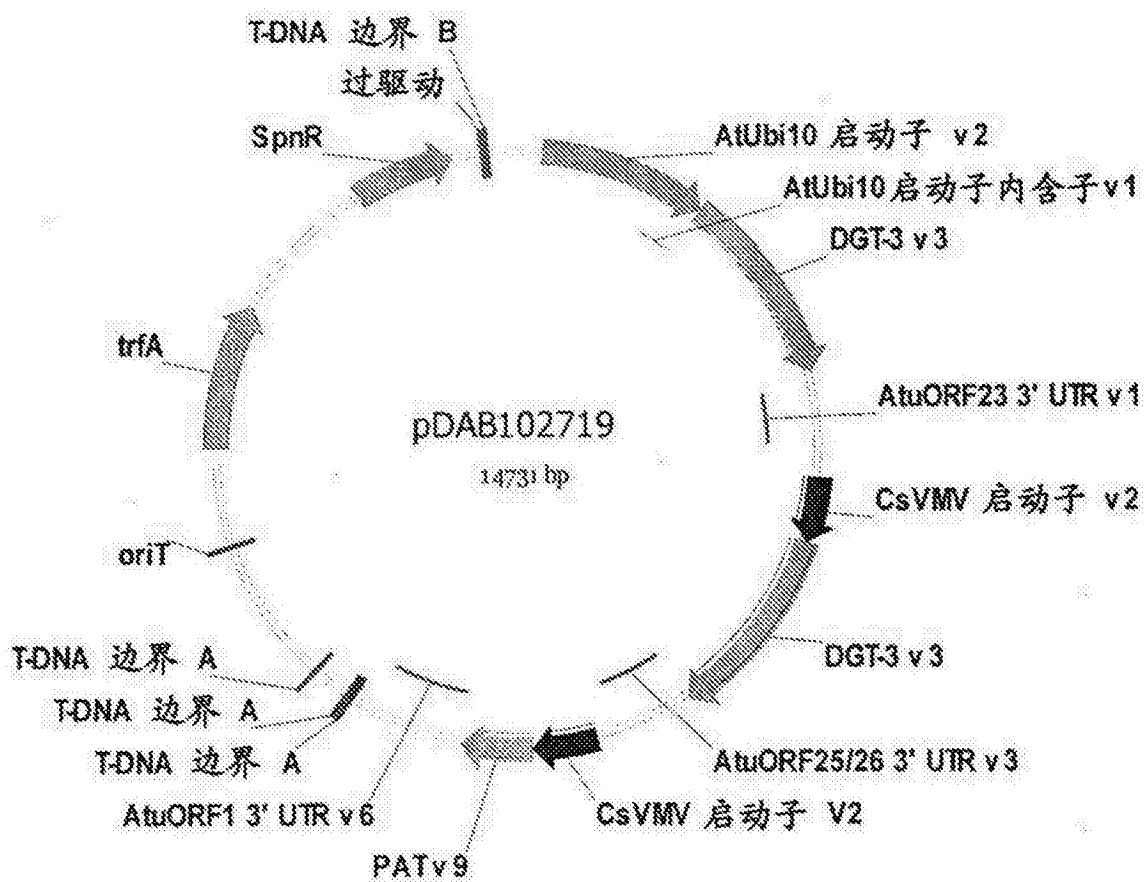


图32

pDAB102718的质粒图

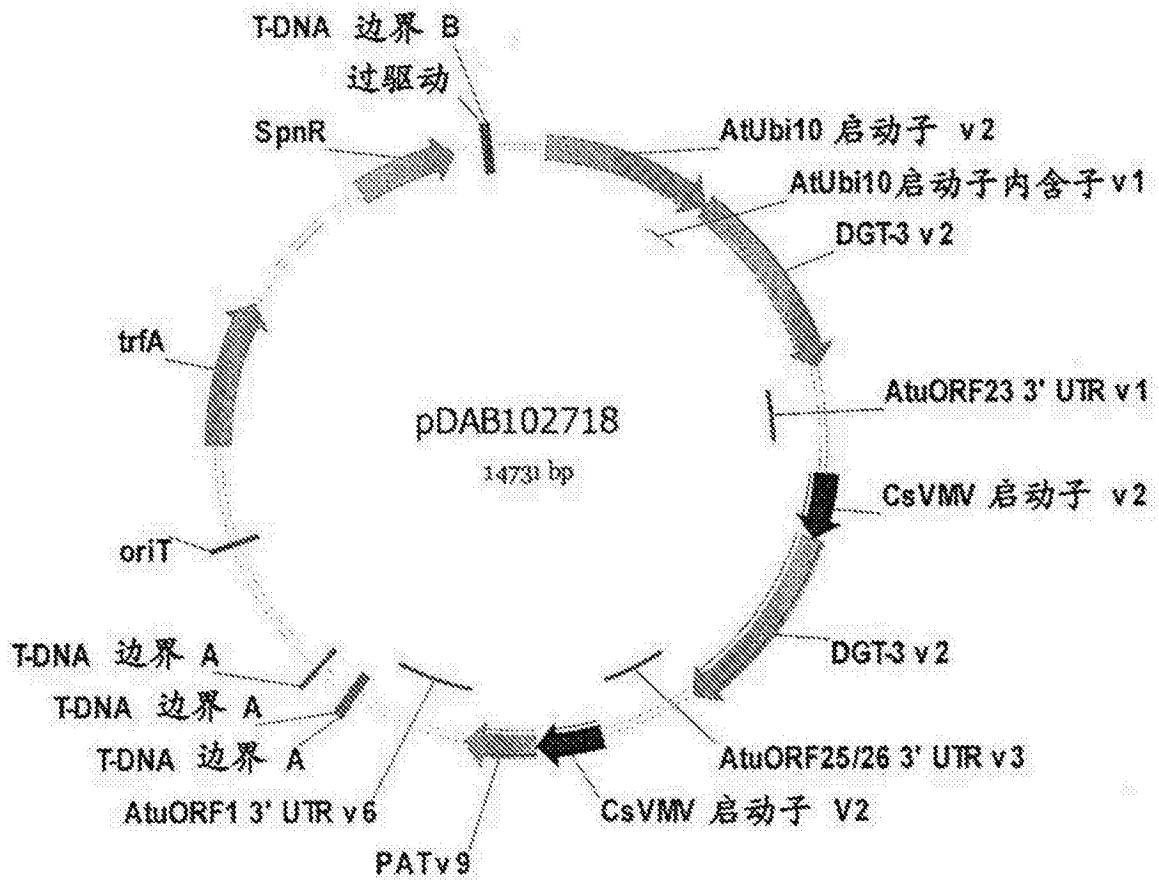


图33

pDAB107663的质粒图

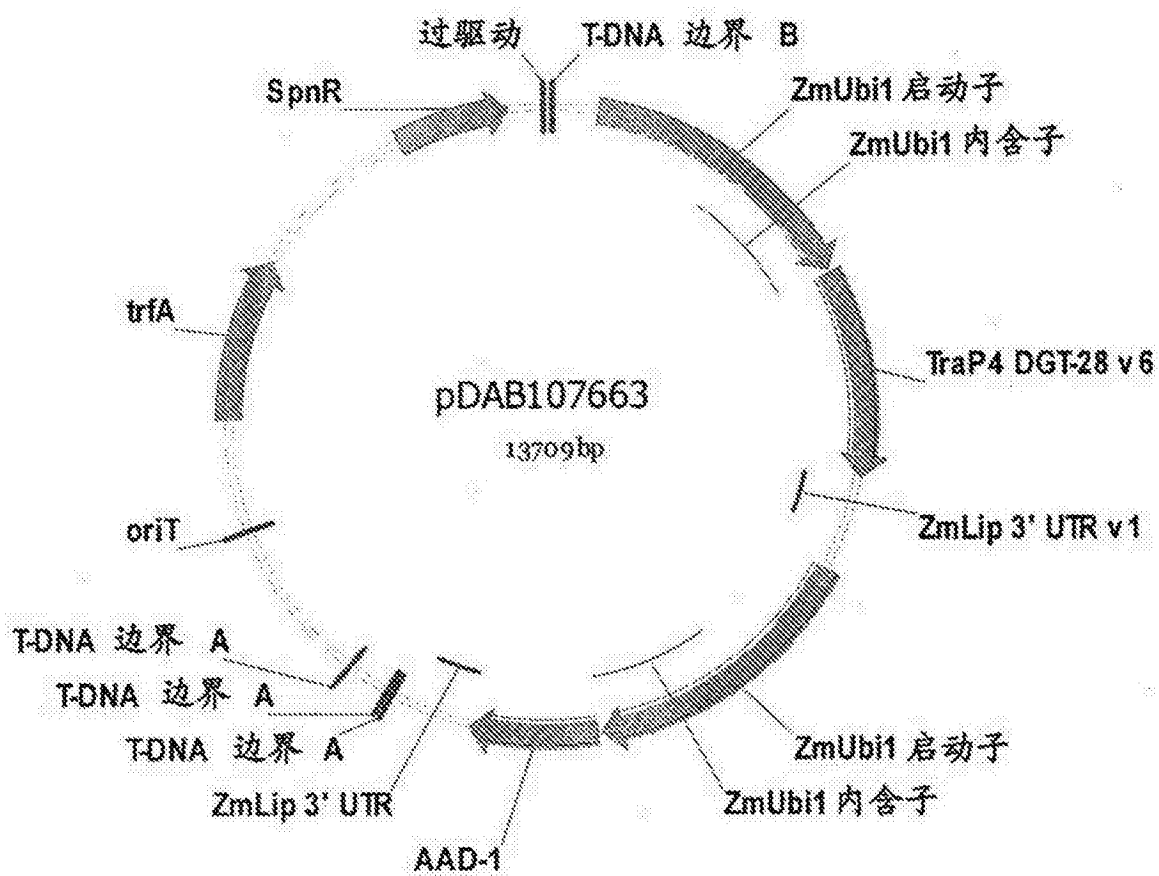


图34

pDAB107664的质粒图

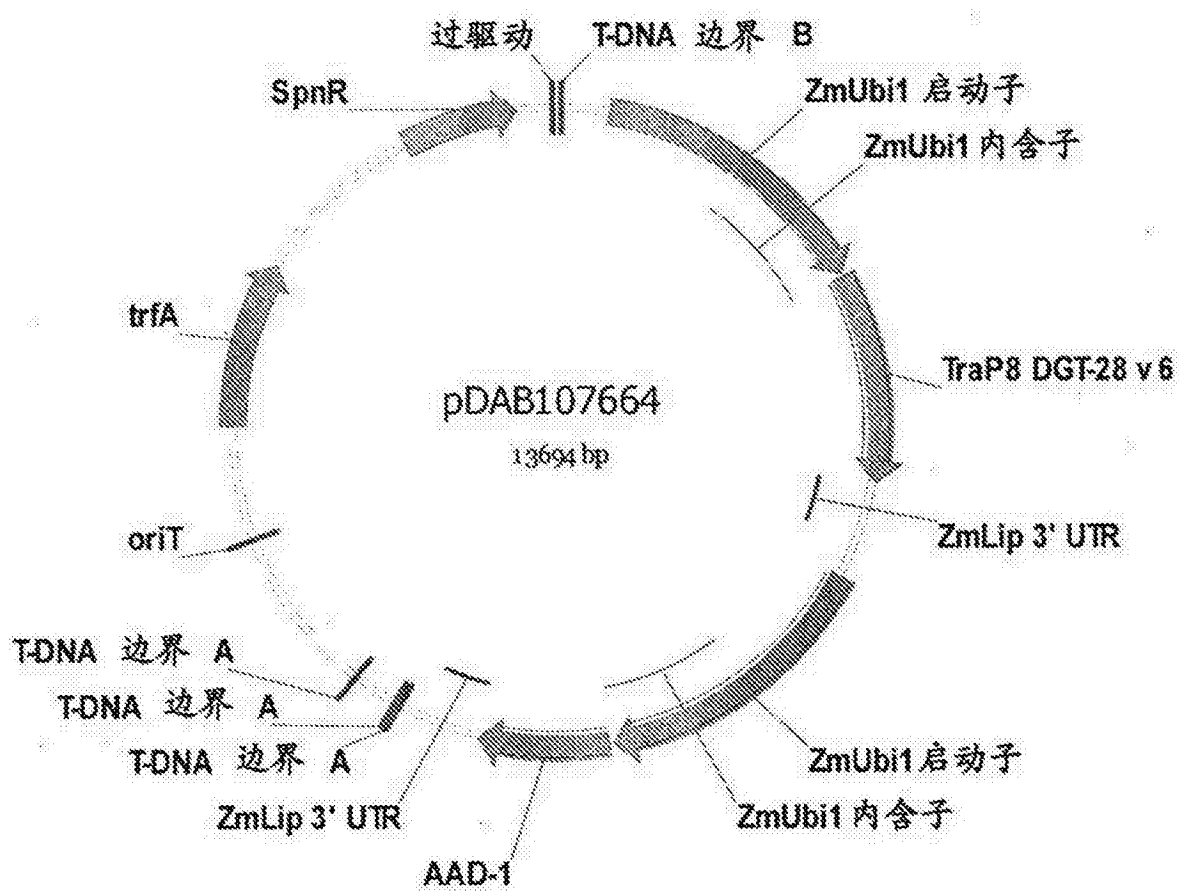


图35

pDAB107665的质粒图

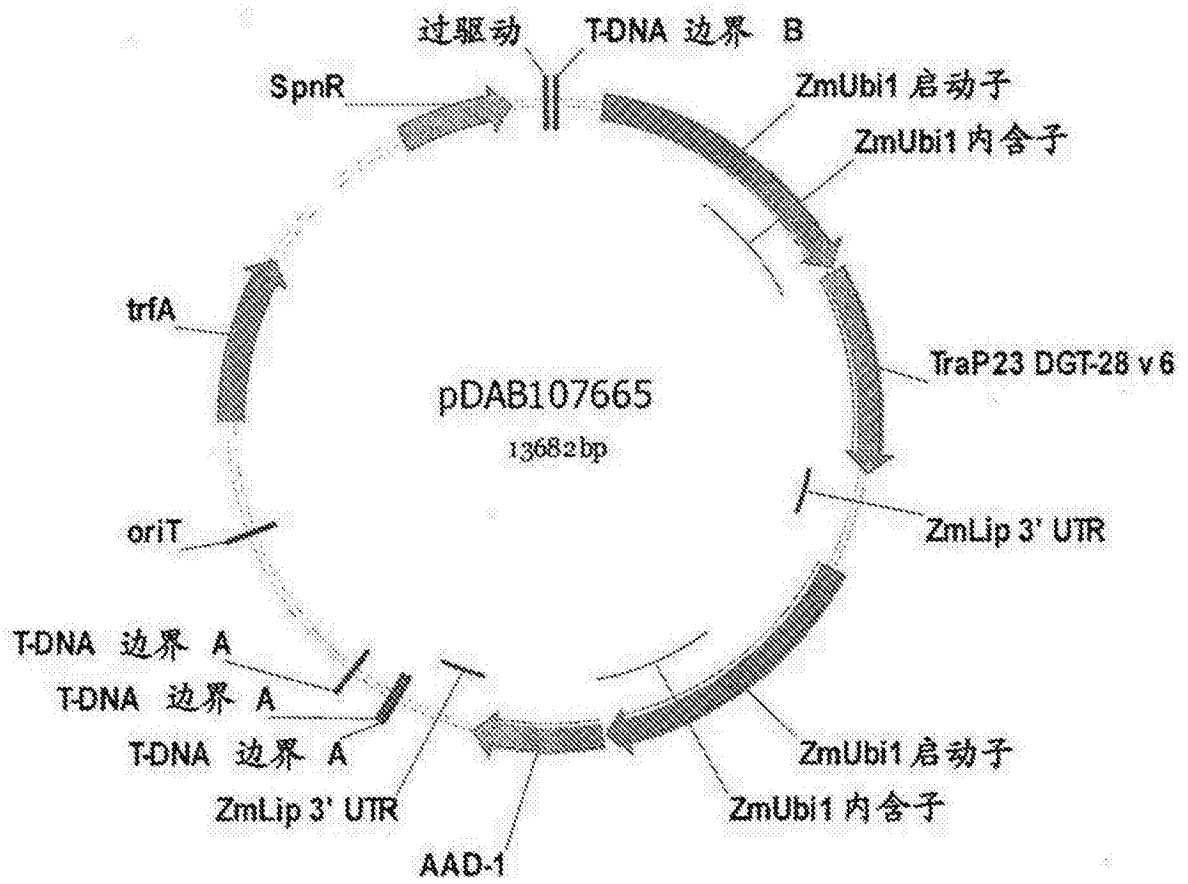


图36

pDAB107666的质粒图

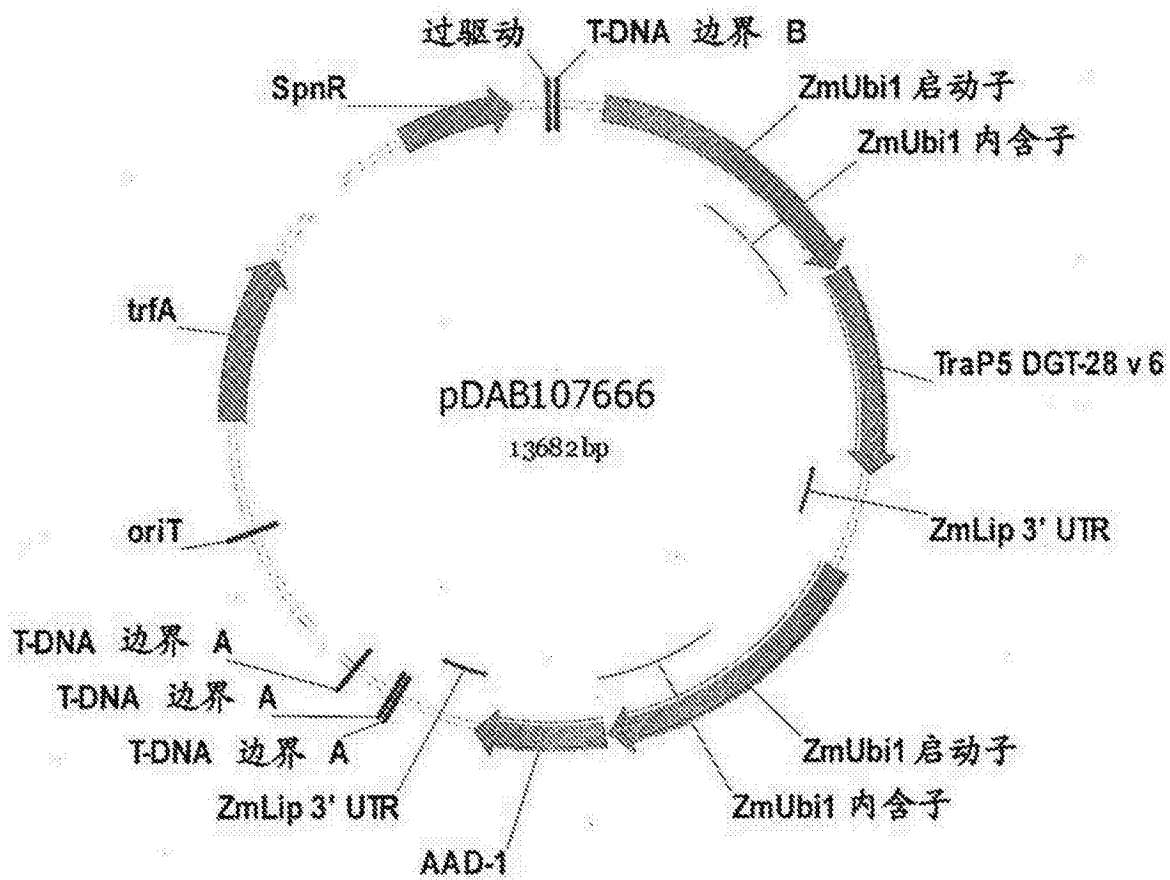


图37

pDAB109812的质粒图

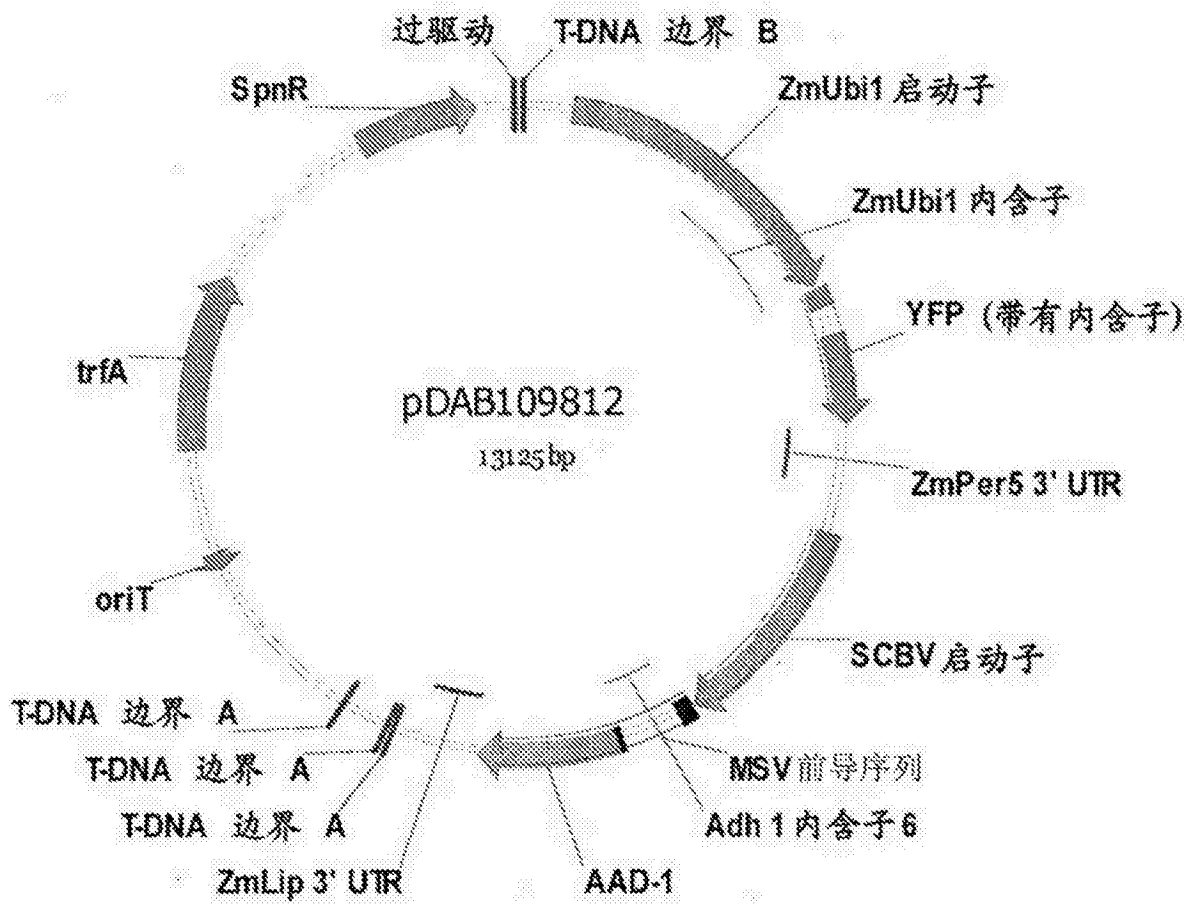


图38

pDAB101556的质粒图

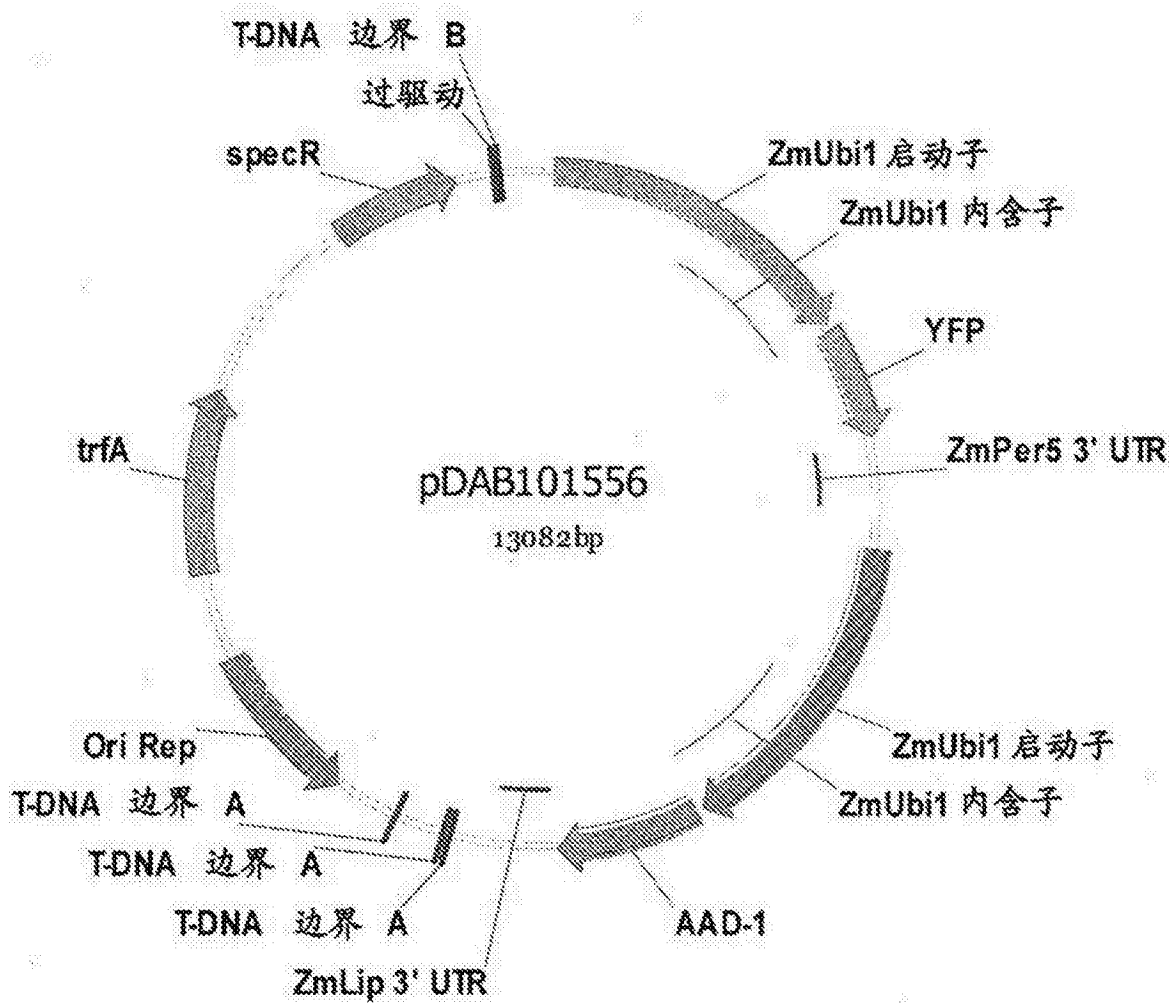


图39

pDAB107698的质粒图

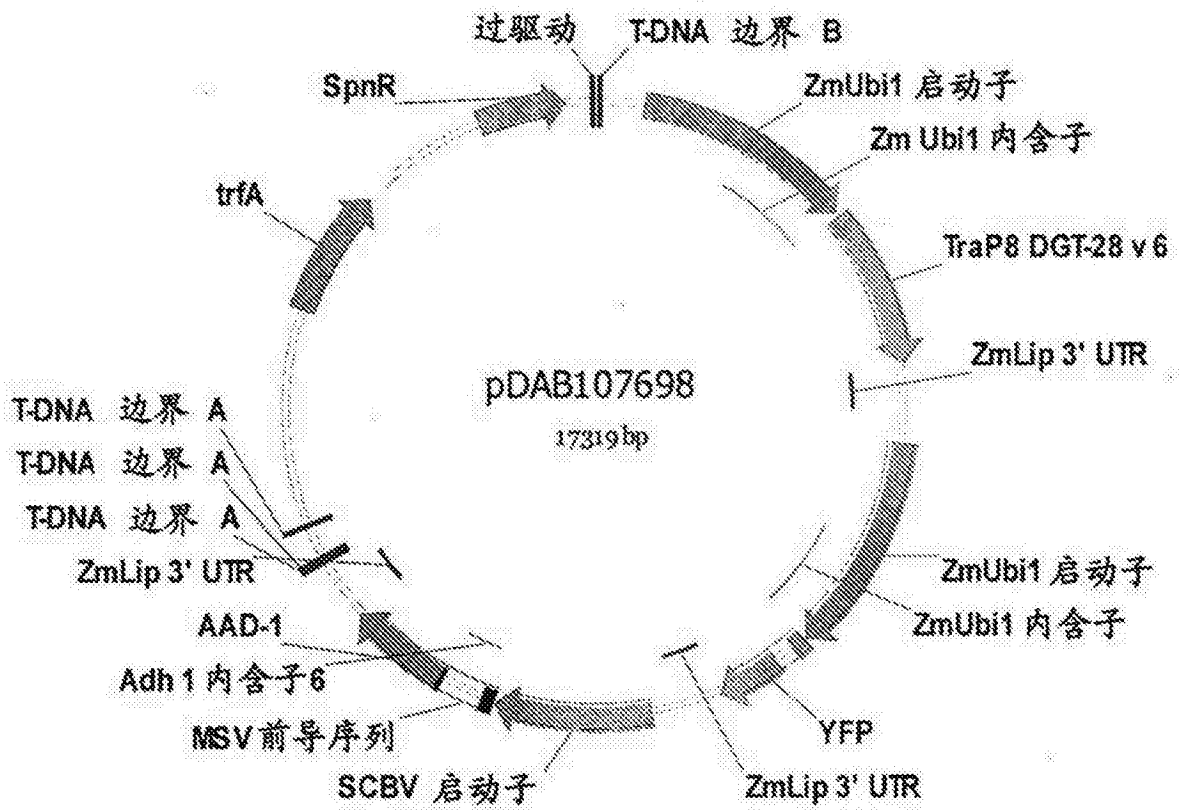


图40

pDAB108384的质粒图

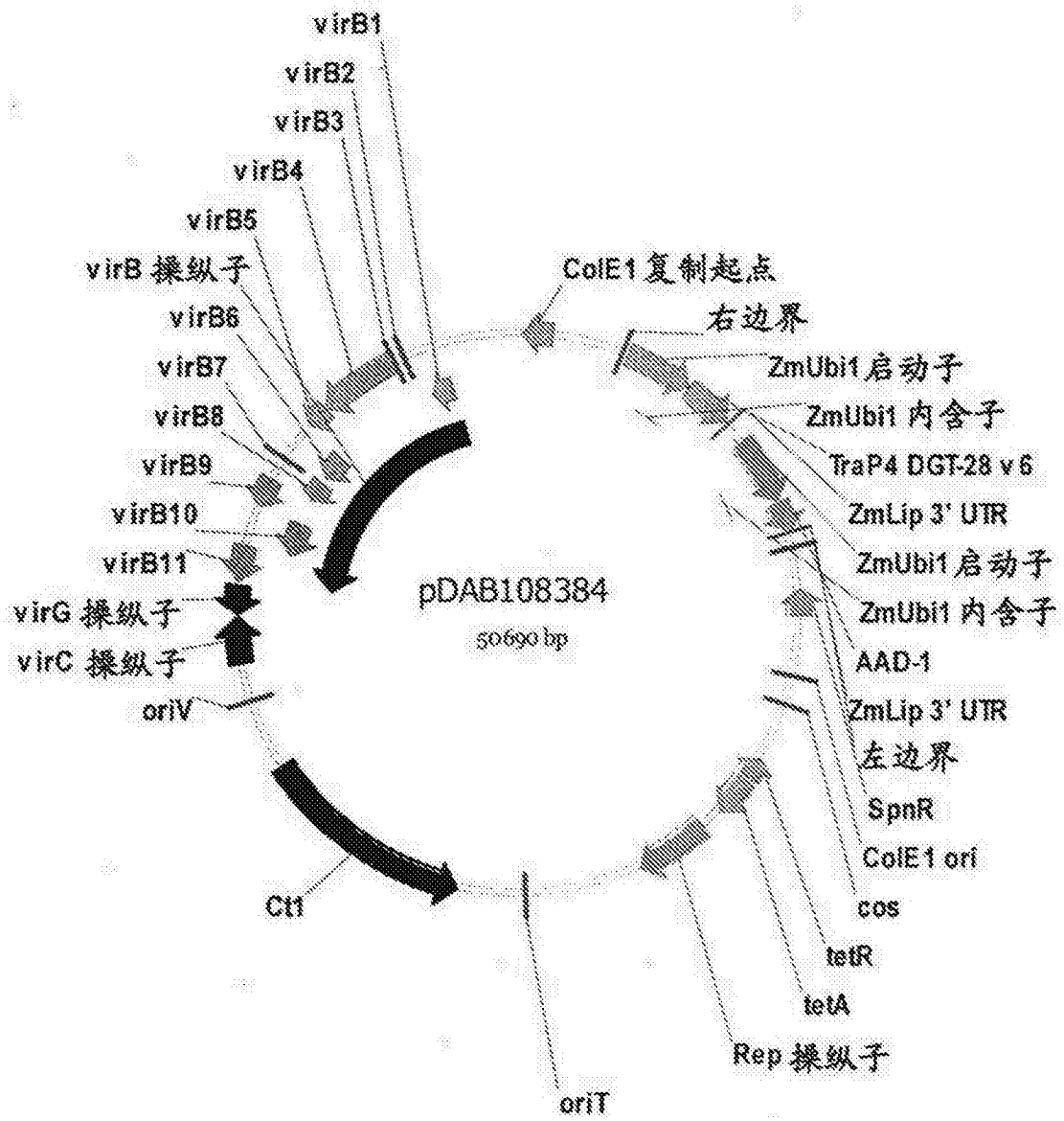


图41

pDAB108385的质粒图

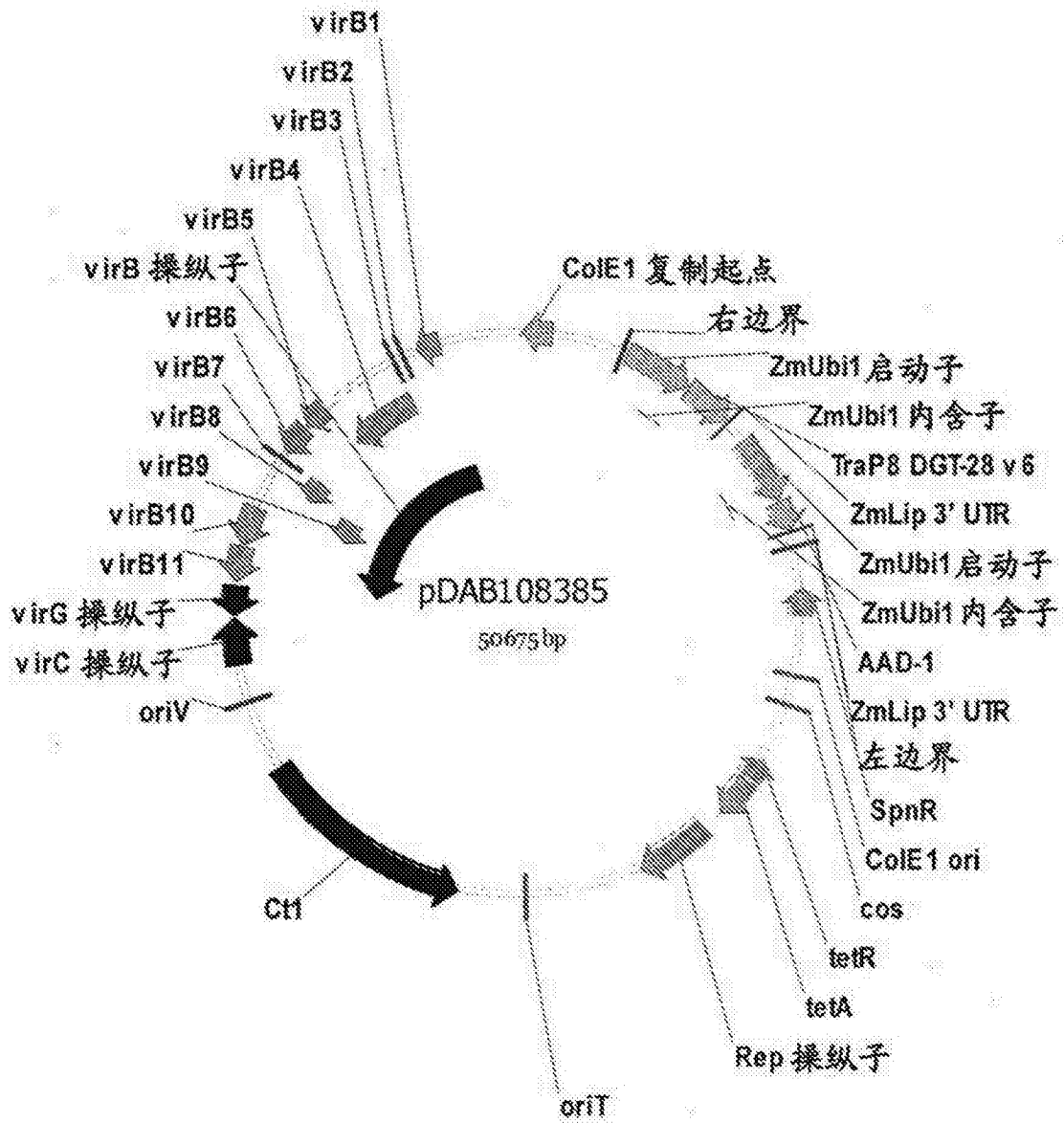


图42

pDAB108386的质粒图

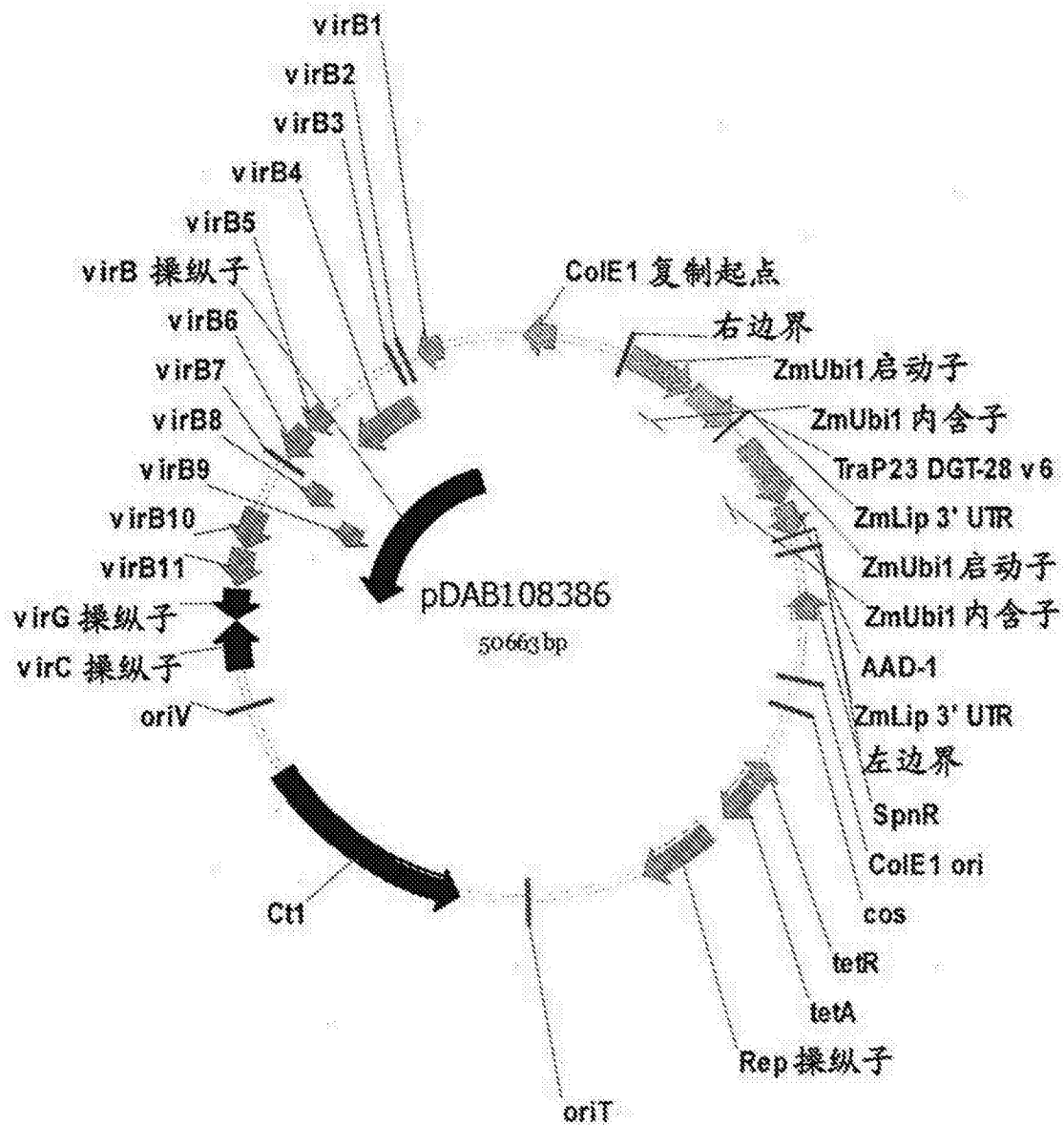


图43

pDAB108387的质粒图

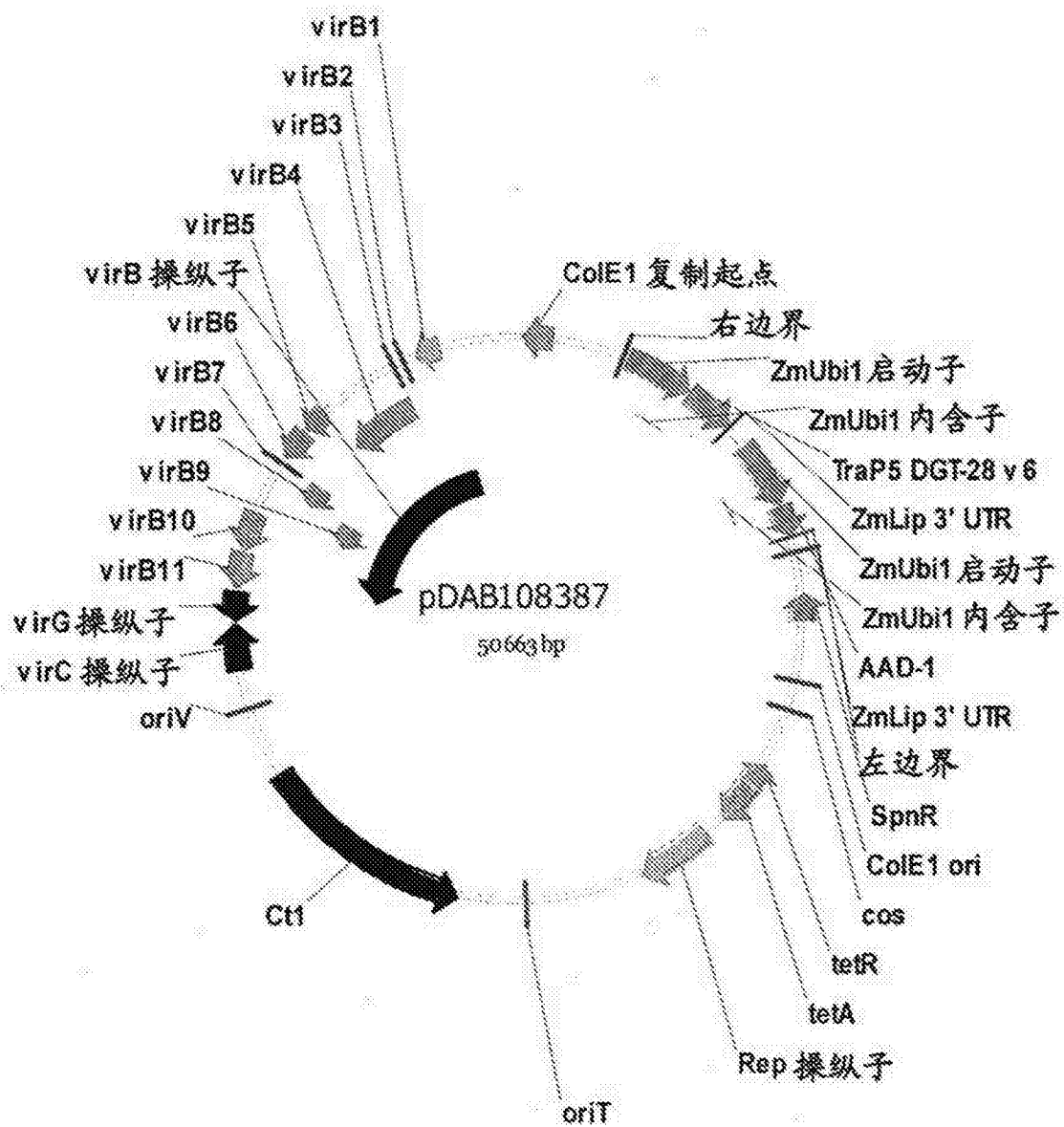


图44