



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201708244 A

(43)公開日：中華民國 106 (2017) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：105126644

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 19 日

(51)Int. Cl.：

C07H21/04 (2006.01)

C07K14/415 (2006.01)

C12N15/29 (2006.01)

C12N15/64 (2006.01)

(30)優先權：2015/08/20

美國

62/207,685

(71)申請人：陶氏農業科學公司(美國) DOW AGROSCIENCES LLC (US)

美國

(72)發明人：里拉 賈斯汀 M LIRA, JUSTIN M. (US)；希奇洛 羅伯特 CICCHILLO, ROBERT (US)；耶基斯 卡拉 N YERKES, CARLA N. (US)；羅賓森 安德列 E ROBINSON, ANDREW E. (US)

(74)代理人：惲軼群；劉法正

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：27 共 125 頁

(54)名稱

葉綠體輸送胜肽

CHLOROPLAST TRANSIT PEPTIDES

(57)摘要

本發明係關於使胜肽、多胜肽及蛋白質靶向至含色素體細胞之質體上的組成物及方法。在一些實施例中，本發明係關於可導引多胜肽至色素體上之葉綠體輸送胜肽，及編碼該等葉綠體輸送胜肽之核酸分子。在一些實施例中，本發明係關於用於製造包含葉綠體輸送胜肽之基因轉殖植物材料(例如，基因轉殖植物)的方法，以及由該等方法製造之植物材料，及由其製造之植物商品型產品。

This disclosure concerns compositions and methods for targeting peptides, polypeptides, and proteins to plastids of plastid-containing cells. In some embodiments, the disclosure concerns chloroplast transit peptides that may direct a polypeptide to a plastid, and nucleic acid molecules encoding the same. In some embodiments, the disclosure concerns methods for producing a transgenic plant material (e.g., a transgenic plant) comprising a chloroplast transit peptide, as well as plant materials produced by such methods, and plant commodity products produced therefrom.

【發明摘要】

【中文發明名稱】

葉綠體輸送胜肽

【英文發明名稱】

CHLOROPLAST TRANSIT PEPTIDES

【中文】

本發明係關於使胜肽、多胜肽及蛋白質靶向至含色素體細胞之質體上的組成物及方法。在一些實施例中，本發明係關於可導引多胜肽至色素體上之葉綠體輸送胜肽，及編碼該等葉綠體輸送胜肽之核酸分子。在一些實施例中，本發明係關於用於製造包含葉綠體輸送胜肽之基因轉殖植物材料(例如，基因轉殖植物)的方法，以及由該等方法製造之植物材料，及由其製造之植物商品型產品。

【英文】

This disclosure concerns compositions and methods for targeting peptides, polypeptides, and proteins to plastids of plastid-containing cells. In some embodiments, the disclosure concerns chloroplast transit peptides that may direct a polypeptide to a plastid, and nucleic acid molecules encoding the same. In some embodiments, the disclosure concerns methods for producing a transgenic plant material (*e.g.*, a transgenic plant) comprising a chloroplast transit peptide, as well as plant materials produced by such methods, and plant commodity products produced therefrom.

【指定代表圖】 無

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

葉綠體輸送胜肽

【英文發明名稱】

CHLOROPLAST TRANSIT PEPTIDES

【技術領域】

根據37 C.F.R. § 1.821(c)或(e)的聲明 - 以ASCII正文檔案形式提交之序列表

【0001】依據37 C.F.R. § 1.821(c)或(e)，已伴隨本申請案一起提交含有ASCII本文版本之序列表的檔案，其內容以引用的方式併入本文中。

【0002】本發明係關於基因編碼及表現靶向至高等植物之葉綠體上之多胜肽的組成物及方法。在某些實施例中，本發明係關於使嵌合多胜肽靶向至葉綠體上之胺基酸序列及/或編碼該等胺基酸序列之核酸分子。在某些實施例中，本發明係關於嵌合多胜肽，其含有控制嵌合多胜肽至葉綠體之輸送的胺基酸序列，及/或編碼該胺基酸序列之核酸分子。

【先前技術】

【0003】植物細胞含有不同亞細胞器，通常稱為「色素體」，其由特徵性膜系統區隔，且於細胞內執行特定功能。特定色素體負責光合作用，以及某些化合物之合成與儲存。所有色素體皆源自原色素體(proplastid)，其存在於植物之分生區域(meristematic region)。原色素體可發展成

例如：葉綠體、黃化體(etioplast)、色質體(chromoplast)、老質體(gerontoplast)、白色體(leucoplast)、澱粉體(amyloplast)、造油體(elaioplastsm)及蛋白質體(proteinoplast)。色素體以半自主(semi-autonomous)方式存於細胞內，含有其自身之遺傳系統及蛋白質合成機制，但在其發展與生合成活動中需仰賴與核質系統(nucleo-cytoplasmic system)之緊密合作。

【0004】在高等植物之光合葉細胞中，最醒目之色素體為葉綠體。葉綠體之最重要功能為進行光合作用之光驅動反應。但是，葉綠體亦進行諸多其他對於植物細胞而言重要之生合成過程。舉例而言，細胞中之所有脂肪酸係藉由位於葉綠體基質之酶，使用該處現成的ATP、NADPH及碳水化合物產生。此外，光活化電子之還原能力可於葉綠體內驅動亞硝酸根(NO_2^-)還原為氨(NH_3)；該氨可提供植物合成胺基酸與核苷酸所需之氮。

【0005】葉綠體於農藥工業亦具有特殊重要性。舉例而言，已知諸多除草劑之作用為阻斷葉綠體內執行之功能。近來之研究已鑑別若干種除草劑之特定目標。舉例而言，三嗪(triazine)衍生之除草劑藉由將質體醌(plastoquinone)分子自其於光系統II之32 kD多胜肽中之結合位置移走來抑制光合作用。該32 kD多胜肽係於葉綠體基因組內編碼，且由胞器機器合成。目前已可獲得對於三嗪除草劑具有抗性之突變植物。此等植物含有32 kD多胜肽突變體，三嗪除草劑無法再自其移走質體醌。磺醯尿

素(sulfonylurea)可抑制葉綠體中之乙醯乳酸合成酶(acetolactate synthase)。乙醯乳酸合成酶涉及異白胺酸與纈胺酸之合成。草甘膦(glyphosate)可抑制5烯醇丙酮醯-3-磷酸莽草酸合成酶(5-enol pyruvyl-3-phosphoshikimate synthase；EPSPS)之功能，該合成酶為涉及芳族胺基酸合成的酶。所有此等酶皆由核基因組所編碼，但其可易位至葉綠體，該處為實際胺基酸合成發生處。

【0006】大多數葉綠體蛋白質係於植物細胞核內編碼、於胞溶質中合成為較大前驅蛋白，且於轉譯後導入葉綠體中。跨越外包膜與內包膜導入基質為蛋白質進入基質、類囊體膜(thylakoid membrane)與類囊體腔(thylakoid lumen)之主要方式。經導入之前驅蛋白於類囊體膜及類囊體腔之定位係由四種不同機制所達成，包括與細菌之蛋白質轉運系統同源的兩種機制。因此，蛋白質在葉綠體中之定位機制係部分源自原核內共生體(prokaryotic endosymbiont)。Cline 及 Henry (1996), *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12:1-26。

【0007】預定用於葉綠體表現之前驅蛋白含有N端延伸區，稱為葉綠體輸送胜肽(CTP)。輸送胜肽有助於葉綠體表面之特異性識別及介導先驅蛋白轉譯後易位跨越葉綠體包膜，且隨後進入葉綠體內之各小隔間(例如，基質、類囊體及類囊體膜)內。此等N端輸送胜肽序列含有將葉綠體蛋白質導入色素體之所有必要資訊；輸送胜肽序列為色素體導入所必須且足夠的。

【0008】經報導在N端具有天然編碼之輸送胜肽序列之植物基因包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶(RuBisCo)之葉綠體小型次單元(de Castro Silva-Filho等人 (1996), *Plant Mol. Biol.* 30:769-80; Schnell等人 (1991), *J. Biol. Chem.* 266:3335-42) ; EPSPS (參見例如 Archer等人 (1990), *J. Bioenerg. and Biomemb.* 22:789-810以及美國專利6,867,293、7,045,684及Re. 36,449) ; 色胺酸合成酶(Zhao等人 (1995), *J. Biol. Chem.* 270:6081-7) ; 質體藍素(plastocyanin) (Lawrence等人 (1997), *J. Biol. Chem.* 272:20357-63) ; 分支酸合成酶(chorismate synthase) (Schmidt等人 (1993), *J. Biol. Chem.* 268:27447-57) ; 捕光葉綠素 a/b 結合蛋白(LHBP) (Lamppa 等人 (1988), *J. Biol. Chem.* 263:14996-14999) ; 及阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)之葉綠體蛋白(Lee等人 (2008), *Plant Cell* 20:1603-22)。美國專利公開案第US 2010/0071090號提供單胞藻屬(*Chlamydomonas* sp)之某些葉綠體靶向胜肽。

【0009】然而，葉綠體靶向胜肽所編碼資訊之結構要求仍不清楚，此係因為其高度序列多樣性且缺少共同或一致序列模體(motif)，但其可能為不同亞型之葉綠體靶向胜肽，且具有獨立的結構模體。Lee等人(2008), 同上文獻。此外，並非所有此等序列皆適用於高等植物葉綠體靶向蛋白質之異源表現。

【發明內容】

【0010】本文中描述關於在一植物中之多胜肽之葉綠體靶向的組成物及方法。在一些實施例中，組成物包含一核酸分子，其含有至少一個編碼葉綠體輸送胜肽(例如，TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽)且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在特定實施例中，該等核酸分子可用於單子葉或雙子葉植物中由感興趣之核苷酸序列所編碼之多胜肽的表現與靶向。進一步描述載體，其包含一核酸分子，該核酸分子包含至少一個編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。

【0011】在一些實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為原核核苷酸序列或其功能變異體。在一些實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為自低等光合真核生物分離的核苷酸序列(例如，自綠色植物(如單胞藻屬及杜氏藻屬(*Dunaliella*)分離之序列)或其功能變異體。在一些實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為自高等光合真核生物分離的核苷酸序列(例如，自雙子葉植物(諸如西洋油菜(*Brassica napus*)、莧屬

(*Amaranthus*)、濱旋花屬(*Calystegia*)及大豆(*Glycine max*))或單子葉植物(諸如水稻(*Oryza sativa*))分離之序列)或其功能變異體。在特定實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為自西洋油菜、大豆、水稻、莧屬、濱旋花屬及鹽生杜氏藻(*Dunaliella salina*)及萊茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)分離的核苷酸序列。在其他實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為包含部分原核TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽核苷酸序列之嵌合核苷酸序列或其功能變異體。在其他實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為包含超過一個真核葉綠體輸送胜肽核苷酸序列(諸如超過一個(例如，兩個)來自不同植物物種之葉綠體輸送胜肽核苷酸序列)之嵌合核苷酸序列或其功能變異體。在其他實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為合成核苷酸序列，其可至少部分地參考原核TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽核苷酸序列來設計。在其他實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、

TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為合成核苷酸序列，其可至少部分地參考真核TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽核苷酸序列來設計。在其他實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列可為合成核苷酸序列，其可至少部分地參考來自EPSPS基因序列或任何其他含有葉綠體輸送胜肽之基因序列的真核葉綠體輸送胜肽核苷酸序列來設計。

【0012】 在一些實施例中，組成物包含一核酸分子，其含有至少一個用以將多胜肽靶向至葉綠體上且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列之工具(means)。在特定實施例中，該等核酸分子可適用於在單子葉或雙子葉植物中表現及靶向由感興趣之核苷酸序列所編碼之多胜肽。本文進一步描述載體，其包含一核酸分子，其含有至少一個用以將多胜肽靶向至葉綠體上且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列之工具。其他實施例描述一種用於經由TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28核苷酸序列及其功能等效物將多胜肽靶向至葉綠體上之工具。

【0013】 本文進一步描述植物、植物組織及植物細胞，其包含一核酸分子，該核酸分子含有至少一個編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興

趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在一些實施例中，植物、植物組織或植物細胞可將此一核酸分子穩定整合至其基因組中。在一些實施例中，植物、植物組織或植物細胞可短暫表現此一核酸分子。

【0014】亦描述用於在植物或植物細胞之葉綠體中表現核苷酸序列的方法。在特定實施例中，可使用包含至少一個編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列之核苷酸序列的核酸分子轉型植物細胞，從而在植物細胞之細胞溶質中產生前驅融合多胜肽，其包含與感興趣之核苷酸序列之表現產物融合的TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽，且該融合多胜肽隨後活體內傳輸至植物細胞之葉綠體。

【0015】本文進一步描述用於製造基因轉殖植物之方法，該基因轉殖植物包含一核酸分子，其含有至少一個編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。亦描述了由該等基因轉殖植物產生的植物產物(例如，種子)。

【0016】根據若干實施例之以下詳細描述且繼續參考附圖，上述特徵及其他特徵將更臻清楚。

【圖式簡單說明】

【0017】圖1提供一mRNA分子，其代表可操作地連接

於感興趣之核苷酸序列的編碼CTP之合成核苷酸序列(例如TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽)的特定實例。在一些實施例中，mRNA分子(如圖中所示)可由包含開放閱讀框架(open reading frame)之DNA分子轉錄，該DNA分子包括合成之CTP編碼序列，其可操作地連接於感興趣之核苷酸序列。在一些實施例中，感興趣之核苷酸序列可為感興趣之胜肽(例如(但不限於)標記基因產物或可靶向至色素體之胜肽)之編碼序列。

【0018】圖2提供來自西洋油菜、鹽生杜氏藻、水稻、莧屬、萊茵衣藻、濱旋花屬及大豆的所預測之葉綠體輸送胜肽的比對。星號表示序列拆分且重組形成各種嵌合TraP序列之處。應注意，莧屬用於兩種不同嵌合葉綠體輸送胜肽(TraP18及TraP19)中，且在序列內的兩個不同位置處剪接，如藉由存在兩個不同星號所示。

【0019】圖3提供質體譜圖pDAB101979。

【0020】圖4提供質體譜圖pDAB101980。

【0021】圖5提供質體譜圖pDAB107634。

【0022】圖6提供質體譜圖pDAB107635。

【0023】圖7提供質體譜圖pDAB107636。

【0024】圖8提供質體譜圖pDAB109847。

【0025】圖9提供質體譜圖pDAB109848。

【0026】圖10提供質體譜圖pDAB109849。

【0027】圖11提供質體譜圖pDAB101908。

【0028】圖12提供浸潤至菸草葉組織中且易位至菸草葉組織之葉綠體中之TraP10-YFP的顯微鏡影像。

【0029】圖13提供浸潤至菸草葉組織中且易位至菸草葉組織之葉綠體中之TraP11-YFP的顯微鏡影像。

【0030】圖14提供浸潤至菸草葉組織中，但不易位至菸草葉組織之葉綠體中之TraP17-GFP的顯微鏡影像。

【0031】圖15提供浸潤至菸草葉組織中且易位至菸草葉組織之葉綠體中之TraP18-GFP的顯微鏡影像。

【0032】圖16提供浸潤至菸草葉組織中且易位至菸草葉組織之葉綠體中之TraP19-GFP的顯微鏡影像。

【0033】圖17提供浸潤至菸草葉組織中且易位至菸草葉組織之葉綠體中之TraP26-GFP的顯微鏡影像。

【0034】圖18提供浸潤至菸草葉組織中且易位至菸草葉組織之葉綠體中之TraP27-GFP的顯微鏡影像。

【0035】圖19提供浸潤至菸草葉組織中且易位至菸草葉組織之葉綠體中之TraP28-GFP的顯微鏡影像。

【0036】圖20提供浸潤至菸草葉組織中但不併入菸草葉組織之葉綠體中之非靶向YFP對照的顯微鏡影像。

【0037】圖21提供轉型至玉米原生質體中且易位至玉米原生質體之葉綠體中之TraP17-GFP的顯微鏡影像。

【0038】圖22提供轉型至玉米原生質體中且易位至玉米原生質體之葉綠體中之TraP18-GFP的顯微鏡影像。

【0039】圖23提供轉型至玉米原生質體中且易位至玉米原生質體之葉綠體中之TraP19-GFP的顯微鏡影像。

【0040】圖24提供pDAB107538之質體譜圖。

【0041】圖25提供pDAB107617之質體譜圖。

【0042】圖26提供pDAB114286之質體譜圖。

【0043】圖27提供pDAB114287之質體譜圖。

序列表

【0044】隨附序列表中所列之核酸序列係使用如在37 C.F.R. § 1.822中所定義的核苷酸鹼基之標準字母縮寫示出。在隨附序列表中各核酸序列僅提供一股，但互補股應理解為藉由對所呈現之股的任何參考而包括在內。在隨附序列表中：

【0045】SEQ ID NO: 1顯示TraP10之胺基酸序列。

【0046】SEQ ID NO: 2顯示TraP11之胺基酸序列。

【0047】SEQ ID NO: 3顯示TraP17之胺基酸序列。

【0048】SEQ ID NO: 4顯示TraP18之胺基酸序列。

【0049】SEQ ID NO: 5顯示TraP19之胺基酸序列。

【0050】SEQ ID NO: 6顯示TraP26之胺基酸序列。

【0051】SEQ ID NO: 7顯示TraP27之胺基酸序列。

【0052】SEQ ID NO: 8顯示TraP28之胺基酸序列。

【0053】SEQ ID NO: 9顯示TraP10之聚核苷酸序列。

【0054】SEQ ID NO: 10顯示TraP11之聚核苷酸序列。

【0055】SEQ ID NO: 11顯示TraP17之聚核苷酸序列。

【0056】SEQ ID NO: 12顯示TraP18之聚核苷酸序列。

【0057】SEQ ID NO: 13顯示TraP19之聚核苷酸序列。

【0058】SEQ ID NO: 14顯示TraP26之聚核苷酸序列。

【0059】 SEQ ID NO: 15顯示TraP27之聚核苷酸序列。

【0060】 SEQ ID NO: 16顯示TraP28之聚核苷酸序列。

【實施方式】

I. 若干實施例之概述

【0061】葉綠體輸送胜肽(CTP) (或色素體輸送胜肽) 共轉譯或轉譯後起作用，將包含CTP之多胜肽導引至色素體(例如，葉綠體)上。在本發明之一些實施例中，內源性葉綠體蛋白質或異源性蛋白質均可藉由以較大的包含CTP之前驅多胜肽表現此類蛋白質而導引至葉綠體上。

【0062】在一例示性實施例中，編碼CTP之核酸序列係自以下分離：自西洋油菜獲得之EPSPS基因序列(NCBI資料庫寄存編號P17688)、自大豆獲得之EPSPS基因序列(NCBI資料庫寄存編號XP_003517039)、自濱旋花屬獲得之EPSPS基因序列(NCBI資料庫寄存編號ACB37380)、自萊茵衣藻獲得之EPSPS基因序列(NCBI資料庫寄存編號XP_001702942)、自水稻獲得之EPSPS基因序列(NCBI資料庫寄存編號AF413082_1)、自莧屬獲得之EPSPS基因序列(NCBI資料庫寄存編號ACV53022)及自鹽生杜氏藻獲得之EPSPS基因序列(NCBI寄存編號：AMBM68632)。藉由用ChloroP預測伺服器分析基因序列，自全長蛋白質鑑別且分離CTP。Emanuelsson等人 (1999), *Protein Science* 8:978-84 (可在cbs.dtu.dk/services/ChloroP獲得)。使用經分離之CTP編碼序列的所預測蛋白質產物產生本發明之編碼CTP之嵌合核酸序列：TraP10、TraP11、

TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28。

【0063】在另一例示性實施例中，獨立地合成TraP10胜肽且將其融合至黃色螢光蛋白(YFP)，產生TraP10-YFP嵌合多胜肽。將編碼TraP10-YFP嵌合多胜肽之核酸分子引入雙運載體(binary vector)中，使得編碼TraP10-YFP之核酸序列可操作地連接於AtUbi 10啟動子。

【0064】在另一例示性實施例中，包含編碼TraP10-YFP且可操作地連接於AtUbi 10啟動子之核酸序列的雙運載體經由農桿菌(*Agrobacterium*)短暫轉型至菸草(tobacco)(菸草(*Nicotiana tabacum*))中。共焦顯微鏡及西方墨點分析證實，TraP10成功地將YFP靶向至菸草葉綠體。

【0065】在另一例示性實施例中，獨立地合成TraP11胜肽且將其融合至黃色螢光蛋白(YFP)，產生TraP11-YFP嵌合多胜肽。將編碼TraP11-YFP嵌合多胜肽之核酸分子引入雙運載體中，使得編碼TraP11-YFP之核酸序列可操作地連接於AtUbi 10啟動子。

【0066】在另一例示性實施例中，包含編碼TraP11-YFP且可操作地連接於AtUbi 10啟動子之核酸序列的雙運載體經由農桿菌短暫轉型至菸草(菸草)中。共焦顯微鏡及西方墨點分析證實，TraP11成功地將YFP靶向至菸草葉綠體。

【0067】在另一例示性實施例中，獨立地合成TraP17胜肽且將其融合至綠色螢光蛋白(GFP)，產生TraP17-GFP

嵌合多胜肽。將編碼TraP17-GFP嵌合多胜肽之核酸分子引入雙運載體中，使得編碼TraP17-GFP之核酸序列可操作地連接於AtUbi 10啟動子。

【0068】在另一例示性實施例中，包含編碼TraP17-GFP且可操作地連接於AtUbi 10啟動子之核酸序列的雙運載體經由農桿菌短暫轉型至玉米(玉蜀黍(*Zea mays*))中。共焦顯微鏡及西方墨點分析證實，TraP17成功地將GFP靶向至玉米葉綠體。

【0069】在另一例示性實施例中，獨立地合成TraP18胜肽且將其融合至綠色螢光蛋白(GFP)，產生TraP18-GFP嵌合多胜肽。將編碼TraP18-GFP嵌合多胜肽之核酸分子引入雙運載體中，使得編碼TraP18-GFP之核酸序列可操作地連接於AtUbi 10啟動子。

【0070】在另一例示性實施例中，包含編碼TraP18-GFP且可操作地連接於AtUbi 10啟動子之核酸序列的雙運載體經由農桿菌短暫轉型至玉米(玉蜀黍)及菸草(菸草)中。共焦顯微鏡及西方墨點分析證實，TraP18成功地將GFP靶向至玉米及菸草葉綠體。

【0071】在另一例示性實施例中，獨立地合成TraP19胜肽且將其融合至綠色螢光蛋白(GFP)，產生TraP19-GFP嵌合多胜肽。將編碼TraP19-GFP嵌合多胜肽之核酸分子引入雙運載體中，使得編碼TraP19-GFP之核酸序列可操作地連接於AtUbi 10啟動子。

【0072】在另一例示性實施例中，包含編碼

TraP19-GFP且可操作地連接於AtUbi 10啟動子之核酸序列的雙運載體經由農桿菌短暫轉型至玉米(玉蜀黍)及菸草(菸草)中。共焦顯微鏡及西方墨點分析證實，TraP19成功地將GFP靶向至玉米及菸草葉綠體。

【0073】在另一例示性實施例中，獨立地合成TraP26胜肽且將其融合至綠色螢光蛋白(GFP)，產生TraP26-GFP嵌合多胜肽。將編碼TraP26-GFP嵌合多胜肽之核酸分子引入雙運載體中，使得編碼TraP26-GFP之核酸序列可操作地連接於AtUbi 10啟動子。

【0074】在另一例示性實施例中，包含編碼TraP26-GFP且可操作地連接於AtUbi 10啟動子之核酸序列的雙運載體經由農桿菌短暫轉型至菸草(菸草)中。共焦顯微鏡及西方墨點分析證實，TraP26成功地將GFP靶向至菸草葉綠體。

【0075】在另一例示性實施例中，獨立地合成TraP27胜肽且將其融合至黃色螢光蛋白(GFP)，產生TraP27-GFP嵌合多胜肽。將編碼TraP27-GFP嵌合多胜肽之核酸分子引入雙運載體中，使得編碼TraP27-GFP之核酸序列可操作地連接於AtUbi 10啟動子。

【0076】在另一例示性實施例中，包含編碼TraP27-GFP且可操作地連接於AtUbi 10啟動子之核酸序列的雙運載體經由農桿菌短暫轉型至菸草(菸草)中。共焦顯微鏡及西方墨點分析證實，TraP27成功地將GFP靶向至菸草葉綠體。

【0077】在另一例示性實施例中，獨立地合成TraP28胜肽且將其融合至黃色螢光蛋白(GFP)，產生TraP28-GFP嵌合多胜肽。將編碼TraP28-GFP嵌合多胜肽之核酸分子引入雙運載體中，使得編碼TraP28-GFP之核酸序列可操作地連接於AtUbi 10啟動子。

【0078】在另一例示性實施例中，包含編碼TraP28-GFP且可操作地連接於AtUbi 10啟動子之核酸序列的雙運載體經由農桿菌短暫轉型至菸草(菸草)中。共焦顯微鏡及西方墨點分析證實，TraP28成功地將GFP靶向至菸草葉綠體。

【0079】在另一例示性實施例中，獨立地合成各自編碼本發明之合成TraP胜肽之核酸序列且將其可操作地連接於編碼農業上重要之基因序列的核酸序列。TraP序列可融合至除草劑耐受性特徵(例如，*dgt-28*、*dgt-14*、*dgt-32*及*dgt-33*)以產生合成核酸分子，其各自編碼嵌合的TraP10:DGT-28、TraP11:DGT-28、TraP17:DGT-28、TraP18:DGT-28、TraP19:DGT-28、TraP26:DGT-28、TraP27:DGT-28或TraP28:DGT-28融合多胜肽。該等核酸分子各自編碼嵌合的TraP10:DGT-28、TraP11:DGT-28、TraP17:DGT-28、TraP18:DGT-28、TraP19:DGT-28、TraP26:DGT-28、TraP27:DGT-28或TraP28:DGT-28多胜肽，可各自引入雙運載體中，使得各自編碼 *TraP10:DGT-28*、*TraP11:DGT-28*、*TraP17:DGT-28*、*TraP18:DGT-28*、*TraP19:DGT-28*、*TraP26:DGT-28*、*TraP27:DGT-28*或*TraP28:DGT-28*之

核酸序列可操作地連接於啟動子及其他基因調控元件。使用含有編碼 *TraP10:DGT-28*、*TraP11:DGT-28*、*TraP17:DGT-28*、*TraP18:DGT-28*、*TraP19:DGT-28*、*TraP26:DGT-28*、*TraP27:DGT-28*或*TraP28:DGT-28*之核酸序列的雙運載體轉型各種植物物種。分析該等基因轉殖植物因為DGT-28酶表現且易位至葉綠體而獲得之草甘膦耐受性。

【0080】鑒於上述詳述實施例，本發明之TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28序列可用於在廣泛範圍之植物物種中將任何多胜肽導引至色素體上。舉例而言，藉由本發明提供給熟習此項技術者之方法，可將包含融合至任何第二胜肽序列之N端的TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽序列之嵌合多胜肽引入宿主細胞中，進行第二胜肽序列之色素體靶向。因此，在特定實施例中，TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽可提高色素體表現所需之胜肽的導入與處理效率。

II. 縮寫

【0081】 CTP 葉綠體輸送胜肽

【0082】 EPSPS 3-烯醇丙酮醢莽草酸-5-磷酸合成酶

【0083】 YFP 黃色螢光蛋白

【0084】 T_i 腫瘤引入(源自根癌農桿菌(*A. tumefaciens*)之質體)

【0085】 T-DNA 轉移DNA

III. 術語

【0086】 為幫助瞭解本發明之各實施例，提供特定術語之以下說明：

【0087】 葉綠體輸送胜肽：如本文所用之術語「葉綠體輸送胜肽」(CTP) (或「色素體輸送胜肽」)可指當出現於多胜肽之N端時，導引該多胜肽進入植物細胞之色素體(例如葉綠體)中的胺基酸序列。CTP一般為導引蛋白質進入宿主細胞之色素體(例如一級、二級或三級色素體，諸如葉綠體)中所必須且足夠的。假定之葉綠體輸送胜肽可藉由數種可用演算法(例如，PSORT與ChloroP (可在www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP獲得))中之一者鑑別。ChloroP可提供特別好的葉綠體輸送胜肽預測。Emanuelsson等人 (1999), *Protein Science* 8:978-84。然而，藉由任何現有演算法預測功能性葉綠體輸送胜肽無法達到100%準確。因此，在活體外或活體內方法中證實所鑑別之假定葉綠體輸送胜肽的確如所預期般起作用是相當重要的。

【0088】 葉綠體輸送胜肽可位於導入色素體中之多胜肽的N端，且在一些實例中，可位於多胜肽之C端。輸送胜肽可幫助含有CTP之多胜肽共轉譯或轉譯後運輸至色素體。葉綠體輸送胜肽典型地包含約40至約100個胺基酸，且已觀察到該等CTP含有某些共通特性，例如：CTP含有極少(若存在)帶負電之胺基酸(諸如天冬胺酸、麩胺酸、天冬醯胺或麩醯胺酸)；CTP之N端區缺乏帶電荷之胺基酸甘

胺酸與脯胺酸；CTP之中心區域亦可能含有極高比例之鹼性或羥基化胺基酸(諸如絲胺酸與蘇胺酸)；且CTP之C端可能富含精胺酸，且具有包含兩性 β 褶板結構之能力。在多胜肽進入色素體後，色素體蛋白酶可切斷CTP與含CTP之多胜肽之其他部分。

【0089】 接觸：如本文關於核酸分子所用之術語「與」細胞、組織或生物體(例如，植物細胞、植物組織及植物)「接觸」或「由」細胞、組織或生物體(例如，植物細胞、植物組織及植物)「吸收」包括核酸分子內化至生物體中，例如且不限於：生物體與包含核酸分子之組成物接觸；及用包含核酸分子之溶液浸泡生物體。

【0090】 內源性：如本文所用之術語「內源性」係指源自特定生物體、組織或細胞中之物質(例如，核酸分子及多胜肽)。舉例而言，於植物細胞中表現之「內源性」多胜肽可指通常在來自同一物種之非基因改造植物之相同類型細胞中表現的多胜肽。

【0091】 表現：如本文所用，編碼序列(例如基因或轉殖基因)之「表現」係指將核酸轉錄單元(包括例如基因組DNA或cDNA)之經編碼資訊轉換成細胞之操作性、非操作性或結構部分的過程，通常包括蛋白質之合成。基因表現會受到外部信號之作用；舉例而言，將細胞、組織或生物體暴露於可增加或降低基因表現之試劑中。亦可在DNA-RNA-蛋白質路徑中之任何地方調控基因表現。基因表現之調控例如係經由以下達成：控制對轉錄、轉譯、RNA

運輸與加工、中間分子(諸如mRNA)之降解的影響；或經由特定蛋白質分子在製成後之活化、失活、分室作用(compartmentalization)或降解；或其組合。基因表現可用此項技術中已知之任何方法以RNA量或蛋白質量進行量測，該等方法例如(但不限於)：北方墨點法；RT-PCR；西方墨點法；或活體外、原位或活體內蛋白質活性分析。

【0092】 遺傳物質：如本文所用之術語「遺傳物質」包括所有基因及核酸分子，諸如DNA及RNA。

【0093】 異源性：如本文所用之術語「異源性」係指並非源自特定生物體、組織或細胞中之物質(例如，核酸分子及多胜肽)。舉例而言，於植物細胞中表現之「異源性」多胜肽可指一般不在來自同一物種之非基因改造植物之相同類型細胞中表現的多胜肽(例如，於同一生物體之不同細胞或不同生物體之細胞中表現的多胜肽)。

【0094】 分離：如本文所用之術語「分離」係指分子(例如核酸分子與多胜肽)與同一類型之其他分子(例如，其他核酸分子與其他多胜肽)實質上分離或自其純化，其中在天然產生此分子之生物體細胞中，該分子正常地與該等其他分子結合在一起。舉例而言，經分離之核酸分子可與天然產生此核酸分子之生物體細胞中的染色體DNA或染色體外DNA實質上分離或自其純化。因此，此術語包括經生物化學純化，使得其他核酸分子、多胜肽及細胞組分得以移除的重組核酸分子與多胜肽。此術語亦包括重組核酸分子、經化學合成之核酸分子及重組性製備之多胜肽。

【0095】 如本文所用之術語「實質上經純化」係指分子與在天然狀態下通常與其結合之其他分子分離。實質上經純化之分子可為組成物中存在之主要物質。實質上經純化之分子可為例如至少60%不含、至少75%不含或至少90%不含除天然混合物中存在之溶劑以外的其他分子。術語「實質上經純化」並非指以天然狀態存在之分子。

【0096】 核酸分子：如本文所用之術語「核酸分子」係指聚合物形式之核苷酸，其可包括RNA、cDNA、基因組DNA之有義股與反義股及以上各者之合成形式及混合聚合物。核苷酸可指核糖核苷酸、去氧核糖核苷酸或任一類型核苷酸之修飾形式。如本文所用之「核酸分子」與「核酸」及「聚核苷酸」同義。除非另外指出，否則核酸分子之長度通常為至少10個鹼基。此術語包括單股及雙股形式之DNA。核酸分子包括二聚(所謂的串聯)形式，及核酸分子之轉錄產物。核酸分子可包括天然產生之核苷酸與經修飾之核苷酸中之任一者或這兩者，其經由天然產生及/或非天然產生之核苷酸鍵而鍵聯在一起。

【0097】 如熟習此項技術者將容易瞭解，核酸分子可經化學或生物化學修飾，或可含有非天然或衍生的核苷酸鹼基。該等修飾包括例如標籤、甲基化、用類似物取代天然產生之核苷酸中之一或多者、核苷酸間修飾(舉例而言，不帶電鍵聯：例如膦酸甲酯、磷酸三酯、胺基磷酸酯、胺基甲酸酯等；帶電鍵聯：例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等；側接部分：例如胜肽；插入劑：例如吡啶、補骨脂素

等；螯合劑；烷基化劑；及經修飾之鍵聯：例如 α 變旋異構核酸等)。術語「核酸分子」亦包括任何拓樸構形(topological conformation)，包括單股、雙股、部分雙螺旋、三螺旋、髮夾狀、圓形及掛鎖構形。

【0098】 如本文關於DNA所用之術語「編碼序列」、「結構性核苷酸序列」或「結構性核酸分子」係指當置於適當調控序列之控制下時，經由轉錄及mRNA，最終轉譯為多胜肽的核苷酸序列。關於RNA，術語「編碼序列」係指可轉譯為胜肽、多胜肽或蛋白質之核苷酸序列。編碼序列之邊界可由5'端之轉譯起始密碼子及3'端之轉譯終止密碼子決定。編碼序列包括(但不限於)：基因組DNA、cDNA、EST及重組核苷酸序列。

【0099】 在一些實施例中，本發明包括可經分離、純化或部分純化之核苷酸序列，舉例而言，使用以下分離方法：諸如離子交換層析法；藉由基於分子大小之排阻純化或藉由親和純化；藉由基於在不同溶劑中之溶解度的分餾技術；或基因工程改造法，諸如倍增、選殖及次選殖。

【0100】 序列一致性：如本文在兩個核酸或多胜肽序列之情形下所用之術語「序列一致性」或「一致性」可指兩個序列中當在指定比較窗口比對最大對應性時相同的殘基。

【0101】 如本文所用之術語「序列一致性百分比」可指藉由在比較窗口中比較兩個經最佳對準之序列(例如，核酸序列及胺基酸序列)測定的值，其中當與參考序列(其不

含添加或缺失)比較時，爲使兩個序列最佳對準，比較窗口中之序列部分可包含添加或缺失(亦即空隙)。百分比計算如下：測定兩個序列中出現相同核苷酸或胺基酸殘基之位置的數目，產生匹配位置之數目，用匹配位置之數目除以比較窗口中位置之總數，且將該結果乘以100，得到序列一致性百分比。

【0102】 比對序列以進行比較之方法爲此項技術中所熟知的。以下各者中描述了各種程式及比對演算法，例如：Smith及Waterman (1981), *Adv. Appl. Math.* 2:482；Needleman及Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.* 48:443；Pearson及Lipman (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444；Higgins及Sharp (1988), *Gene* 73:237-44；Higgins及Sharp (1989), *CABIOS* 5:151-3；Corpet等人 (1988), *Nucleic Acids Res.* 16:10881-90；Huang等人 (1992), *Comp. Appl. Biosci.* 8:155-65；Pearson等人 (1994), *Methods Mol. Biol.* 24:307-31；Tatiana等人 (1999), *FEMS Microbiol. Lett.* 174:247-50。序列比對方法及同源性計算之詳細考量可見於例如Altschul等人 (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-10中。

【0103】 國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)鹼基局部比對檢索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST™；Altschul等人 (1990))可購自若干來源，包括國家生物技術資訊中心(Bethesda, MD)及網際網路上，與

若干序列分析程式結合使用。關於如何使用此程式測定序列一致性之說明可在網際網路上在BLAST™之「幫助(help)」部分下獲得。為比較核酸序列，可採用BLAST™(Blastn)程式之「Blast 2序列」功能，設定成預設參數。當使用此方法評估時，與參考序列具有相當大的類似度之核酸序列將顯示一致性百分比增加。

【0104】 可特異性雜交/特異性互補:如本文所用之術語「可特異性雜交」及「特異性互補」為表示互補程度足以使得在核酸分子與目標核酸分子之間發生穩定的特異性結合的術語。兩個核酸分子之間的雜交涉及在兩個核酸分子之核酸序列之間的反向平行比對。兩個分子隨後能夠與相對股上之對應鹼基形成氫鍵，從而形成雙螺旋分子，若其足夠穩定，則可使用此項技術中熟知之方法偵測。核酸分子不需要與其目標序列呈100%互補才稱之為可特異性雜交。然而，達到雜交特異性必須存在之序列互補量為所用雜交條件之函數。

【0105】 根據特定嚴苛度，雜交條件將視以下改變：所選用之雜交方法之性質，以及雜交核酸序列之組成及長度。一般而言，雜交溫度及雜交緩衝液之離子強度(尤其 Na^+ 及/或 Mg^{++} 濃度)將決定雜交之嚴苛度，但洗滌時間亦會影響嚴苛度。關於獲得特定嚴苛度所需之雜交條件的計算為一般技術者所已知，且例如在Sambrook等人(編)*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版, 第1-3卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

Spring Harbor, NY, 1989, 第9章及第11章；及Hames及Higgins (編) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, 1985中有所論述。關於核酸雜交之進一步詳細說明及指導可見於例如Tijssen, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays」, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology- Hybridization with Nucleic Acid Probes*, 第I部分, 第2章, Elsevier, NY, 1993；及Ausubel等人編, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第2章, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995中。

【0106】 如本文所用之「嚴苛條件」涵蓋：若在雜交分子與目標核酸分子中之同源序列之間存在小於20%之錯配，則將僅在此條件下雜交的條件。「嚴苛條件」包括其他特定之嚴苛度。因此，如本文所用之「中等嚴苛」條件為序列錯配超過20%之分子將無法雜交的條件；「高度嚴苛」條件為錯配超過10%之序列將無法雜交的條件；且「極高嚴苛」條件為錯配超過5%之序列將無法雜交的條件。

【0107】 以下為代表性、非限制性雜交條件。

【0108】 高嚴苛條件(偵測共享至少90%序列一致性之序列)：在65℃下在5×SSC、0.1% SDS緩衝液中雜交16小時；在室溫下在2×SSC、0.1% SDS緩衝液中洗滌兩次，每次15分鐘；且在65℃下在0.5×SSC、0.1% SDS緩衝液中洗滌兩次，每次20分鐘。

【0109】 中等嚴苛條件(偵測共享至少80%序列一致性之序列)：在65-70℃下在5×-6× SSC、0.1% SDS緩衝液中雜交16-20小時；在室溫下在2× SSC、0.1% SDS緩衝液中洗滌兩次，每次5-20分鐘；且在55-70℃下在1× SSC、0.1% SDS緩衝液中洗滌兩次，每次30分鐘。

【0110】 非嚴苛對照條件(共享至少50%序列一致性之序列將雜交)：在室溫至55℃下在6× SSC、0.1% SDS緩衝液中雜交16-20小時；在室溫至55℃下在2×-3× SSC、0.1% SDS緩衝液中洗滌至少兩次，每次20-30分鐘。

【0111】 如本文關於連續核酸序列所用之術語「實質上同源」或「實質上同源性」係指在嚴苛條件下與參考核酸序列雜交的連續核苷酸序列。舉例而言，與SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 16之參考核酸序列實質上同源的核酸序列為在嚴苛條件(例如，上文所闡述之中等嚴苛條件)下，與SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 16之參考核酸序列雜交的彼等核酸序列。實質上同源序列可具有至少80%序列一致性。舉例而言，實質上同源序列可具有約80%至100%序列一致性，諸如約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約98.5%、約

99%、約99.5%及約100%。實質上同源特性與特異性雜交密切相關。舉例而言，當互補程度足以避免核酸與非目標序列在期望特異性結合之條件下(例如在嚴苛雜交條件下)非特異性結合時，核酸分子便可特異性雜交。

【0112】 如本文所用之術語「直系同源物(ortholog)」係指兩個或多於兩個物種中自共同祖先核苷酸序列演化且可在該兩個或多於兩個物種中保留相同功能的基因。

【0113】 如本文所述，當一序列中沿5'至3'方向讀取之每一個核苷酸皆與另一序列中沿3'至5'方向讀取之每一個核苷酸互補時，該兩個核酸序列分子稱為展現「完全互補性」。與參考核苷酸序列完全互補之核苷酸序列將展現具有與該參考核苷酸序列之反向互補序列相同的序列。此等術語及說明在此項技術中有良好定義，且容易為一般技術者理解。

【0114】 在測定胺基酸序列間之序列一致性百分比時，熟習此項技術者熟知，由比對提供之在指定位置之胺基酸一致性可不同，但不影響包含該比對序列之多胜肽的所要性質。在此等情況下，可調整序列一致性百分比以獲得經保守取代之胺基酸間之類似性。此等調整為熟習此項技術者所熟知且經常使用。參見例如Myers及Miller (1988), *Computer Applications in Biosciences* 4:11-7。

【0115】 因此，本發明之實施例包括例示性色素體輸送胜肽胺基酸序列之功能變異體，及編碼該等功能變異體之核酸序列。例示性輸送胜肽序列之功能變異體可為例如

例示性輸送胜肽胺基酸序列之片段(諸如N端或C端片段)，或全長例示性輸送胜肽胺基酸序列之經修飾序列，或例示性輸送胜肽胺基酸序列之片段的經修飾序列。在某些實施例中，例示性輸送胜肽胺基酸序列可藉由引入一或多個保守性胺基酸取代進行修飾。「保守性(conservative)」胺基酸取代為胺基酸殘基經具有類似功能性側鏈、類似大小及/或類似疏水性之胺基酸殘基置換的情況。在此項技術中已知可使用胺基酸家族置換同一家族中之另一胺基酸以便引入保守性取代。舉例而言，此等胺基酸家族包括：鹼性胺基酸(例如，離胺酸、精胺酸及組胺酸)；酸性胺基酸(例如，天冬胺酸及麩胺酸)；不帶電(在生理pH下)極性胺基酸(例如，甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸及胞嘧啶)；非極性胺基酸(例如，丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸及色胺酸)； β -支鏈胺基酸(例如，蘇胺酸、纈胺酸及異白胺酸)；及芳族胺基酸(例如，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及組胺酸)。參見例如Sambrook等人(編)，同上文獻；及Innis等人，*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1990, Academic Press, NY, USA。

【0116】 可操作地連接：當第一核苷酸序列與第二核苷酸序列具有功能關係時，第一核苷酸序列與第二核苷酸序列「可操作地連接」。舉例而言，若啓動子影響編碼序列之轉錄或表現，則該啓動子可操作地連接於該編碼序列。當重組產生時，可操作地連接之核苷酸序列一般為連

續的，且必要時在同一閱讀框架中連接兩個蛋白質編碼區。然而，核苷酸序列不需要連續才能可操作地連接。

【0117】 術語「可操作地連接」當關於調控序列及編碼序列使用時，意謂該調控序列影響所連接之編碼序列之表現。「調控序列」或「控制元件」係指影響轉錄時序與程度/量、RNA加工或穩定性、或相關編碼序列之轉譯的核苷酸序列。調控序列可包括啓動子、轉譯前導序列、內含子、強化子、莖-環結構、抑制因子結合序列、終止序列、聚腺苷酸化識別序列等。特定調控序列可位於與其可操作地連接之編碼序列的上游及/或下游。此外，可操作地連接於編碼序列之特定調控序列可位於雙股核酸分子之結合互補股上。

【0118】 啓動子：如本文所用之術語「啓動子」係指可能位於轉錄起始處之上游且可能涉及RNA聚合酶及其他蛋白質之識別與結合以起始轉錄的DNA區域。啓動子可操作地連接於編碼序列上以在細胞中表現，或啓動子可操作地連接於編碼信號序列之核苷酸序列上，該信號序列可操作地連接於編碼序列上以在細胞中表現。「植物啓動子」可為能夠在植物細胞中起始轉錄之啓動子。發展受到控制之啓動子的實例包括優先在某些組織中起始轉錄的啓動子，該等組織諸如葉、根、種子、纖維、木質部導管、管胞或厚壁組織。此類啓動子稱為「組織優選(tissue-preferred)」。僅在某些組織中起始轉錄之啓動子稱為「組織特異性」。「細胞類型特異性」啓動子主要驅

動一或多個器官中之某些細胞類型中之表現，例如根或葉之維管細胞。「誘導性」啟動子可為可處於環境控制下之啟動子。可藉由誘導性啟動子起始轉錄之環境條件的實例包括厭氧條件及存在光。組織特異性、組織優選、細胞類型特異性以及誘導性啟動子構成「非組成性」啟動子之類別。「組成性」啟動子為可在大部分環境條件下具有活性之啟動子。

【0119】 任一誘導性啟動子皆可用於本發明之一些實施例中。參見Ward等人 (1993), *Plant Mol. Biol.* 22:361-366。藉由誘導性啟動子，轉錄速率響應於誘導劑增加。例示性誘導性啟動子包括(但不限於)：響應於銅之ACEI系統啟動子；響應於苯磺醯胺除草劑安全劑之玉米*In2*基因；來自Tn10之Tet抑制因子；及來自類固醇激素基因之誘導性啟動子，其轉錄活性可藉由糖皮類固醇激素誘導(Schena等人(1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:0421)。

【0120】 例示性組成性啟動子包括(但不限於)：來自植物病毒之啟動子，諸如來自CaMV之35S啟動子；來自水水稻肌動蛋白基因之啟動子；泛素啟動子；pEMU；MAS；玉米H3組蛋白啟動子；及ALS啟動子，即西洋油菜*ALS3*結構基因5'端之Xba1/NcoI片段(或與該Xba1/NcoI片段類似之核苷酸序列)(國際PCT公開案第WO 96/30530號)。

【0121】 此外，任何組織特異性或組織優選性啟動子

皆可用於本發明之一些實施例中。經包含可操作地連接於組織特異性啟動子之編碼序列的核酸分子轉型之植物可互斥性地或優先地在某特定組織中產生編碼序列之產物。例示性組織特異性或組織優選性啟動子包括(但不限於)：優選根之啟動子，諸如來自菜豆蛋白基因(*phaseolin gene*)之啟動子；葉特異性且光誘導型啟動子，諸如來自*cab*或*rubisco*之啟動子；花藥特異性啟動子，諸如來自*LAT52*之啟動子；花粉特異性啟動子，諸如來自*Zm13*之啟動子；及優選小孢子之啟動子，諸如來自*apg*之啟動子。

【0122】 轉型：如本文所用之術語「轉型」或「轉導」係指將一或多個核酸分子轉移至細胞中。當細胞藉由將核酸分子併入細胞基因組中或藉由游離型複製(*episomal replication*)穩定複製核酸分子時，細胞經轉導至細胞中之核酸分子「轉型」。如本文所用之術語「轉型」涵蓋所有可藉以將核酸分子引入此類細胞中之技術。實例包括(但不限於)：用病毒載體轉染；用質體載體轉型；電穿孔(Fromm等人 (1986), *Nature* 319:791-3)；脂質體轉染(Felgner等人 (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7)；微注射(Mueller等人 (1978), *Cell* 15:579-85)；農桿菌介導之轉移(Fraley等人 (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7)；直接DNA攝入；及微彈轟擊(*microprojectile bombardment*) (Klein等人 (1987), *Nature* 327:70)。

【0123】 轉殖基因：一種外源性核酸序列。在一些實例中，轉殖基因可為編碼包含至少一個TraP10、TraP11、

TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的序列。在特定實例中，轉殖基因可編碼一多胜肽，其包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽，及至少一個為色素體表現所需的額外胜肽序列(例如，賦予除草劑抗性之胜肽序列)。在此等及其他實例中，轉殖基因可含有可操作地連接於轉殖基因之編碼序列的調控序列(例如，啓動子)。就本發明之目的而言，術語「轉殖基因」當用於指生物體(例如，植物)時，係指包含外源性核酸序列之生物體。在一些實例中，包含外源性核酸序列之生物體可為經由分子轉型技術引入核酸序列之生物體。在其他實例中，包含外源性核酸序列之生物體可為藉由例如植物漸滲雜交(introgression)或異花授粉(cross-pollination)引入核酸序列之生物體。

【0124】 傳輸：如本文所用之術語「傳輸」、「靶向」及「轉移」係指本發明某些胺基酸序列幫助含有該胺基酸序列之多胜肽自宿主細胞核內移動至宿主細胞之色素體中的特性。在特定實施例中，此類胺基酸序列(亦即，CTP)能夠將約100%、至少約95%、至少約90%、至少約85%、至少約80%、至少約70%、至少約60%及/或至少約50%之含有該胺基酸序列之多胜肽傳輸至宿主細胞之色素體中。

【0125】 載體：引入細胞中以例如產生經轉型細胞之核酸分子。載體可包括允許在宿主細胞中複製之核酸序列，諸如複製起點。載體之實例包括(但不限於)：質體、

黏質體、噬菌體或將外源性DNA攜帶至細胞中之病毒。載體亦可包括一或多個基因、反義分子及/或可選擇標記基因以及此項技術中已知之其他遺傳元件。載體可轉導、轉型或感染一細胞，從而使該細胞表現由載體編碼之核酸分子及/或蛋白質。載體視情況包括用於幫助核酸分子進入細胞之物質(例如，微脂體、蛋白質外衣等)。

【0126】 除非另外指出或說明，否則如本文所用之術語「一(a/an)」及「該」表示「至少一個」。

【0127】 除非另外具體解釋，否則所有如本文所用之技術與科學術語皆具有與本發明所屬領域之一般技術者通常所理解的相同的含義。分子生物學中之常見術語的定義可見於以下各者中，例如：Lewin B., *Genes V*, Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9)；Kendrew 等人(編), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9)；及 Meyers R.A. (編), *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)。除非另外指出，否則所有百分比皆為重量百分比，且所有溶劑混合物之比例皆以體積計。所有溫度皆以攝氏度計。

IV. 包含 *TraP10*、*TraP11*、*TraP17*、*TraP18*、*TraP19*、*TraP26*、*TraP27* 或 *TraP28* 編碼序列之核酸分子

【0128】 在一些實施例中，本發明提供一種核酸分

子，其包含至少一個編碼TraP10葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在其他實施例中，本發明提供一種核酸分子，其包含至少一個編碼TraP11葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在其他實施例中，本發明提供一種核酸分子，其包含至少一個編碼TraP17葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在其他實施例中，本發明提供一種核酸分子，其包含至少一個編碼TraP18葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在其他實施例中，本發明提供一種核酸分子，其包含至少一個編碼TraP19葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在其他實施例中，本發明提供一種核酸分子，其包含至少一個編碼TraP26葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在其他實施例中，本發明提供一種核酸分子，其包含至少一個編碼TraP27葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。在其他實施例中，本發明提供一種核酸分子，其包含至少一個編碼TraP28葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列。

【0129】 在特定實施例中，該感興趣之核苷酸序列可為編碼感興趣之多胜肽之核苷酸序列。在特定實施例中，提供編碼多胜肽之單一核酸分子，其中TraP10胜肽序列係融合至感興趣多胜肽之N端。在特定實施例中，提供編碼

多胜肽之單一核酸分子，其中TraP11胜肽序列係融合至感興趣多胜肽之N端。在特定實施例中，提供編碼多胜肽之單一核酸分子，其中TraP17胜肽序列係融合至感興趣多胜肽之N端。在特定實施例中，提供編碼多胜肽之單一核酸分子，其中TraP18胜肽序列係融合至感興趣多胜肽之N端。在特定實施例中，提供編碼多胜肽之單一核酸分子，其中TraP19胜肽序列係融合至感興趣多胜肽之N端。在特定實施例中，提供編碼多胜肽之單一核酸分子，其中TraP26胜肽序列係融合至感興趣多胜肽之N端。在特定實施例中，提供編碼多胜肽之單一核酸分子，其中TraP27胜肽序列係融合至感興趣多胜肽之N端。在特定實施例中，提供編碼多胜肽之單一核酸分子，其中TraP28胜肽序列係融合至感興趣多胜肽之N端。

【0130】 在本發明某些實施例中提供之核酸分子中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列之最後一個密碼子與感興趣核苷酸序列之第一個密碼子可以任何數目之核苷酸三聯體隔開，例如不含「終止」密碼子之編碼。在一些實例中，在天然前驅多胜肽中，正常與輸送胜肽結合之成熟蛋白質之第一個胺基酸之編碼序列可存在於編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列之最後一個密碼子與感興趣核苷酸序列之第一個密碼子之間。用於隔開編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、

TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列與感興趣核苷酸序列之第一個密碼子的序列例如可由任一序列組成，使得所編碼之胺基酸序列不會明顯改變嵌合多胜肽之轉譯及其於色素體中之易位。在此等及其他實施例中，編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列之最後一個密碼子可於相位寄存器(phase-register)中與感興趣核苷酸序列之第一個密碼子直接連續融合，或由不超過一個短胜肽序列(諸如由合成核苷酸連接子(例如，可用於達成融合之核苷酸連接子)編碼之序列)隔開。

【0131】 在一些實施例中，期望修飾感興趣之核苷酸序列及/或以單一編碼序列與其融合之TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28編碼序列的核苷酸，例如以加強該編碼序列於特定宿主中之表現。遺傳密碼為豐餘的，具有64個可能密碼子，但大部分生物體優先使用此等密碼子之子群組。在某一物種中最常利用之密碼子稱之為最佳密碼子，而不常使用者則歸類為罕用或低使用率密碼子。Zhang等人(1991), *Gene* 105:61-72。密碼子可經取代以反映特定宿主之較佳密碼子使用率，此過程有時稱之為「密碼子最佳化」。含有特定原核或真核宿主偏好之密碼子之最佳化編碼序列可經製備以例如增加轉譯率或產生具有理想特性(例如，與由非最佳化序列產生之轉錄物相比較，半衰期延長)之重組性

RNA轉錄物。

【0132】 一些實施例包括TraP10功能變異體。TraP10功能變異體包括例如且不限於：如SEQ ID NO: 1所闡述之TraP10之同源物及直系同源物；包含SEQ ID NO: 1內之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；截短TraP10胜肽；包含SEQ ID NO: 1內之連續胺基酸序列的較長葉綠體輸送胜肽；包含SEQ ID NO: 1內具有一或多個保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；及包含SEQ ID NO: 1內具有一或多個非保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽，該等非保守胺基酸取代經證明可將可操作地連接之胜肽導引至含色素體細胞中之色素體。

【0133】 一些實施例包括TraP11功能變異體。TraP11功能變異體包括例如且不限於：如SEQ ID NO: 2所闡述之TraP11之同源物及直系同源物；包含SEQ ID NO: 2內之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；截短TraP11胜肽；包含SEQ ID NO: 2內之連續胺基酸序列的較長葉綠體輸送胜肽；包含SEQ ID NO: 2內具有一或多個保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；及包含SEQ ID NO: 2內具有一或多個非保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽，該等非保守胺基酸取代經證明可將可操作地連接之胜肽導引至含色素體細胞中之色素體。

【0134】 一些實施例包括TraP17功能變異體。

TraP17功能變異體包括例如且不限於：如SEQ ID NO: 3所闡述之TraP17之同源物及直系同源物；包含SEQ ID NO: 3內之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；截短TraP17胜肽；包含SEQ ID NO: 3內之連續胺基酸序列的較長葉綠體輸送胜肽；包含SEQ ID NO: 3內具有一或多個保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；及包含SEQ ID NO: 3內具有一或多個非保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽，該等非保守胺基酸取代經證明可將可操作地連接之胜肽導引至含色素體細胞中之色素體。

【0135】 一些實施例包括TraP18功能變異體。TraP18功能變異體包括例如且不限於：如SEQ ID NO: 4所闡述之TraP18之同源物及直系同源物；包含SEQ ID NO: 4內之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；截短TraP18胜肽；包含SEQ ID NO: 4內之連續胺基酸序列的較長葉綠體輸送胜肽；包含SEQ ID NO: 4內具有一或多個保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；及包含SEQ ID NO: 4內具有一或多個非保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽，該等非保守胺基酸取代經證明可將可操作地連接之胜肽導引至含色素體細胞中之色素體。

【0136】 一些實施例包括TraP19功能變異體。TraP19功能變異體包括例如且不限於：如SEQ ID NO: 5所闡述之TraP19之同源物及直系同源物；包含SEQ ID

NO: 5內之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；截短TraP19胜肽；包含SEQ ID NO: 5內之連續胺基酸序列的較長葉綠體輸送胜肽；包含SEQ ID NO: 5內具有一或多個保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；及包含SEQ ID NO: 5內具有一或多個非保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽，該等非保守胺基酸取代經證明可將可操作地連接之胜肽導引至含色素體細胞中之色素體。

【0137】 一些實施例包括TraP26功能變異體。TraP26功能變異體包括例如且不限於：如SEQ ID NO: 6所闡述之TraP26之同源物及直系同源物；包含SEQ ID NO: 6內之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；截短TraP26胜肽；包含SEQ ID NO: 6內之連續胺基酸序列的較長葉綠體輸送胜肽；包含SEQ ID NO: 6內具有一或多個保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；及包含SEQ ID NO: 6內具有一或多個非保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽，該等非保守胺基酸取代經證明可將可操作地連接之胜肽導引至含色素體細胞中之色素體。

【0138】 一些實施例包括TraP27功能變異體。TraP27功能變異體包括例如且不限於：如SEQ ID NO: 7所闡述之TraP27之同源物及直系同源物；包含SEQ ID NO: 7內之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；截短TraP27胜肽；包含SEQ ID NO: 7內之連續胺基酸序列的

較長葉綠體輸送胜肽；包含SEQ ID NO: 7內具有一或多個保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；及包含SEQ ID NO: 7內具有一或多個非保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽，該等非保守胺基酸取代經證明可將可操作地連接之胜肽導引至含色素體細胞中之色素體。

【0139】 一些實施例包括TraP28功能變異體。TraP28功能變異體包括例如且不限於：如SEQ ID NO: 8所闡述之TraP28之同源物及直系同源物；包含SEQ ID NO: 8內之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；截短TraP28胜肽；包含SEQ ID NO: 8內之連續胺基酸序列的較長葉綠體輸送胜肽；包含SEQ ID NO: 8內具有一或多個保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽；及包含SEQ ID NO: 8內具有一或多個非保守胺基酸取代之連續胺基酸序列的葉綠體輸送胜肽，該等非保守胺基酸取代經證明可將可操作地連接之胜肽導引至含色素體細胞中之色素體。

【0140】 本發明之一些實施例亦包括一種核酸分子，其包含編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽之核苷酸序列。該等核酸分子可適用於例如在分子生物學技術中幫助操控TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28編碼序列。舉例而言，在一些實施例中，TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、

TraP27或TraP28編碼序列可引入適合將該序列次選殖至表現載體中的載體中，或者TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28編碼序列可引入核酸分子中，該核酸分子有助於產生另一個包含TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28編碼序列的核酸分子，該編碼序列可操作地連接於感興趣之核苷酸序列。

【0141】 在特定實例中，TraP10胜肽之長度等於或小於72個胺基酸。舉例而言，TraP10胜肽之長度可為72、71、70、69、68、67、66、65、64、63、62或小於62個胺基酸。在某些實例中，TraP10胜肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列或其功能變異體。因此，TraP10胜肽可包含含有SEQ ID NO: 1之胺基酸序列或其功能變異體，其中TraP10胜肽或其功能變異體之長度為等於或小於72個胺基酸的長度。在某些實例中，TraP10胜肽或其功能變異體可包含例如與SEQ ID NO: 1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%一致的胺基酸序列。

【0142】 熟習此項技術者將立即識別出所有編碼例如SEQ ID NO: 1之TraP10胜肽或其包含小於SEQ ID NO: 1之整個序列之功能變異體的核苷酸序列。遺傳密碼之簡併為特定胺基酸序列提供有限數目之編碼序列。用於編碼TraP10胜肽之特定序列之選擇在從業者之考慮範圍內。在不同應用中，不同編碼序列可為合乎需要的。舉例而言，

為增加TraP10胜肽於特定宿主中之表現，可選擇反映宿主之密碼子使用偏好的編碼序列。舉例而言，TraP10胜肽可由如SEQ ID NO: 9所闡述之核苷酸序列編碼。

【0143】 在特定實例中，TraP11胜肽之長度等於或小於68個胺基酸。舉例而言，TraP11胜肽之長度可為68、67、66、65、64、63、62、61、60、59或小於59個胺基酸。在某些實例中，TraP11胜肽包含SEQ ID NO: 2中所闡述之胺基酸序列或其功能變異體。因此，TraP11胜肽可包含含有SEQ ID NO: 2之胺基酸序列或其功能變異體，其中TraP11胜肽或其功能變異體之長度為等於或小於68個胺基酸之長度。在某些實例中，TraP11胜肽或其功能變異體可包含例如與SEQ ID NO: 2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%一致的胺基酸序列。

【0144】 熟習此項技術者將立即識別出所有編碼例如SEQ ID NO: 2之TraP11胜肽或其包含小於SEQ ID NO: 2之整個序列的功能變異體的核苷酸序列。遺傳密碼之簡併為特定胺基酸序列提供有限數目之編碼序列。用於編碼TraP11胜肽之特定序列之選擇在從業者之考慮範圍內。在不同應用中，不同編碼序列可為合乎需要的。舉例而言，為增加TraP11胜肽於特定宿主中之表現，可選擇反映宿主之密碼子使用偏好的編碼序列。舉例而言，TraP11胜肽可由如SEQ ID NO: 10所闡述之核苷酸序列編碼。

【0145】 在特定實例中，TraP17胜肽之長度等於或小

於66個胺基酸。舉例而言，TraP17胜肽之長度可為66、65、64、63、62、61、60、59、58或小於58個胺基酸。在某些實例中，TraP17胜肽包含SEQ ID NO: 3中所闡述之胺基酸序列或其功能變異體。因此，TraP17胜肽可包含含有SEQ ID NO: 3之胺基酸序列或其功能變異體，其中TraP17胜肽或其功能變異體之長度為等於或小於66個胺基酸之長度。在某些實例中，TraP17胜肽或其功能變異體可包含例如與SEQ ID NO: 3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%一致的胺基酸序列。

【0146】 熟習此項技術者將立即識別出所有編碼例如SEQ ID NO: 3之TraP17胜肽或其包含小於SEQ ID NO: 3之整個序列的功能變異體的核苷酸序列。遺傳密碼之簡併為特定胺基酸序列提供有限數目之編碼序列。用於編碼TraP17胜肽之特定序列之選擇在從業者之考慮範圍內。在不同應用中，不同編碼序列可為合乎需要的。舉例而言，為增加TraP17胜肽於特定宿主中之表現，可選擇反映宿主之密碼子使用偏好的編碼序列。舉例而言，TraP17胜肽可由如SEQ ID NO: 11所闡述之核苷酸序列編碼。

【0147】 在特定實例中，TraP18胜肽之長度等於或小於67個胺基酸。舉例而言，TraP18胜肽之長度可為67、66、65、64、63、62、61、60、59或小於59個胺基酸。在某些實例中，TraP18胜肽包含SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列或其功能變異體。因此，TraP18胜肽可包含

含有SEQ ID NO: 4之胺基酸序列或其功能變異體，其中TraP18胜肽或其功能變異體之長度為等於或小於67個胺基酸之長度。在某些實例中，TraP18胜肽或其功能變異體可包含例如與SEQ ID NO: 4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%一致的胺基酸序列。

【0148】 熟習此項技術者將立即識別出所有編碼例如SEQ ID NO: 4之TraP18胜肽或其包含小於SEQ ID NO: 4之整個序列的功能變異體的核苷酸序列。遺傳密碼之簡併為特定胺基酸序列提供有限數目之編碼序列。用於編碼TraP18胜肽之特定序列之選擇在從業者之考慮範圍內。在不同應用中，不同編碼序列可為合乎需要的。舉例而言，為增加TraP18胜肽於特定宿主中之表現，可選擇反映宿主之密碼子使用偏好的編碼序列。舉例而言，TraP18胜肽可由如SEQ ID NO: 12所闡述之核苷酸序列編碼。

【0149】 在特定實例中，TraP19胜肽之長度等於或小於67個胺基酸。舉例而言，TraP19胜肽之長度可為67、66、65、64、63、62、61、60、59或小於59個胺基酸。在某些實例中，TraP19胜肽包含SEQ ID NO: 5中所闡述之胺基酸序列或其功能變異體。因此，TraP19胜肽可包含含有SEQ ID NO: 5之胺基酸序列或其功能變異體，其中TraP19胜肽或其功能變異體之長度等於或小於67個胺基酸之長度。在某些實例中，TraP19胜肽或其功能變異體可包含例如與SEQ ID NO: 5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%一致的胺基酸序列。

【0150】 熟習此項技術者將立即識別出所有編碼例如SEQ ID NO: 5之TraP19胜肽或其包含小於SEQ ID NO: 5之整個序列的功能變異體的核苷酸序列。遺傳密碼之簡併為特定胺基酸序列提供有限數目之編碼序列。用於編碼TraP19胜肽之特定序列之選擇在從業者之考慮範圍內。在不同應用中，不同編碼序列可為合乎需要的。舉例而言，為增加TraP19胜肽於特定宿主中之表現，可選擇反映宿主之密碼子使用偏好的編碼序列。舉例而言，TraP19胜肽可由如SEQ ID NO: 13所闡述之核苷酸序列編碼。

【0151】 在特定實例中，TraP26胜肽之長度等於或小於60個胺基酸。舉例而言，TraP26胜肽之長度可為60、59、58、57、56、55、54、53、52、51或小於51個胺基酸。在某些實例中，TraP26胜肽包含SEQ ID NO: 6中所闡述之胺基酸序列或其功能變異體。因此，TraP26胜肽可包含含有SEQ ID NO: 6之胺基酸序列或其功能變異體，其中TraP26胜肽或其功能變異體之長度為等於或小於60個胺基酸之長度。在某些實例中，TraP26胜肽或其功能變異體可包含例如與SEQ ID NO: 6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%一致的胺基酸序列。

【0152】 熟習此項技術者將立即識別出所有編碼例如SEQ ID NO: 6之TraP26胜肽或其包含小於SEQ ID NO:

6之整個序列的功能變異體的核苷酸序列。遺傳密碼之簡併為特定胺基酸序列提供有限數目之編碼序列。用於編碼TraP26胜肽之特定序列之選擇在從業者之考慮範圍內。在不同應用中，不同編碼序列可為合乎需要的。舉例而言，為增加TraP26胜肽於特定宿主中之表現，可選擇反映宿主之密碼子使用偏好的編碼序列。舉例而言，TraP26胜肽可由如SEQ ID NO: 14所闡述之核苷酸序列編碼。

【0153】 在特定實例中，TraP27胜肽之長度等於或小於61個胺基酸。舉例而言，TraP27胜肽之長度可為61、60、59、58、57、56、55、54或小於54個胺基酸。在某些實例中，TraP27胜肽包含SEQ ID NO: 7中所闡述之胺基酸序列或其功能變異體。因此，TraP27胜肽可包含含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列或其功能變異體，其中TraP27胜肽或其功能變異體之長度為等於或小於61個胺基酸之長度。在某些實例中，TraP27胜肽或其功能變異體可包含例如與SEQ ID NO: 7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%一致的胺基酸序列。

【0154】 熟習此項技術者將立即識別出所有編碼例如SEQ ID NO: 7之TraP27胜肽或其包含小於SEQ ID NO: 7之整個序列的功能變異體的核苷酸序列。遺傳密碼之簡併為特定胺基酸序列提供有限數目之編碼序列。用於編碼TraP27胜肽之特定序列之選擇在從業者之考慮範圍內。在不同應用中，不同編碼序列可為合乎需要的。舉例而言，

為增加TraP27胜肽於特定宿主中之表現，可選擇反映宿主之密碼子使用偏好的編碼序列。舉例而言，TraP27胜肽可由如SEQ ID NO: 15所闡述之核苷酸序列編碼。

【0155】 在特定實例中，TraP28胜肽之長度等於或小於60個胺基酸。舉例而言，TraP28胜肽之長度可為60、59、58、57、56、55、54、53、52、51或小於51個胺基酸。在某些實例中，TraP28胜肽包含SEQ ID NO: 8中所闡述之胺基酸序列或其功能變異體。因此，TraP28胜肽可包含含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列或其功能變異體，其中TraP28胜肽或其功能變異體之長度等於或小於60個胺基酸之長度。在某些實例中，TraP28胜肽或其功能變異體可包含例如與SEQ ID NO: 8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%一致的胺基酸序列。

【0156】 熟習此項技術者將立即識別出所有編碼例如SEQ ID NO: 8之TraP28胜肽或其包含小於SEQ ID NO: 8之整個序列的功能變異體的核苷酸序列。遺傳密碼之簡併為特定胺基酸序列提供有限數目之編碼序列。用於編碼TraP28胜肽之特定序列之選擇在從業者之考慮範圍內。在不同應用中，不同編碼序列可為合乎需要的。舉例而言，為增加TraP28胜肽於特定宿主中之表現，可選擇反映宿主之密碼子使用偏好的編碼序列。舉例而言，TraP28胜肽可由如SEQ ID NO: 16所闡述之核苷酸序列編碼。

【0157】 任何多胜肽皆可藉由併入TraP10、

TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽序列而靶向至含色素體細胞之色素體。舉例而言，在一些實施例中，多胜肽可與TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽序列連接，從而將多胜肽導引至細胞中之色素體，其中經連接之多胜肽-TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28分子得以表現。在特定實施例中，藉由併入TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28序列而靶向至色素體之多胜肽可為例如一般於細胞之色素體中表現之多胜肽，其中該多胜肽天然表現。例如(但不限於)，藉由併入TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28序列而靶向至色素體之多胜肽可為涉及除草劑抗性、病毒抗性、細菌性病原體抗性、昆蟲抗性、線蟲抗性或真菌抗性之多胜肽。參見例如美國專利 5,569,823；5,304,730；5,495,071；6,329,504及6,337,431。藉由併入TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28序列而靶向至色素體之多胜肽亦可為例如(但不限於)涉及植物生命力或產率之多胜肽(包括涉及極端溫度、土壤條件、光量、水量、氮量及化學環境之耐受性的多胜肽)，或可用作用於鑑別包含感興趣特徵之植物的標記物的多胜肽(例如，可選擇標記基因產物、涉及種子顏色之多胜肽等)。

【0158】 在本發明之一些實施例中，涉及除草劑抗性

且可與TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽序列連接之多胜肽的非限制性實例包括：乙醯乳酸合成酶(ALS)、突變ALS及ALS之前驅體(參見例如美國專利5,013,659)；EPSPS(參見例如美國專利4,971,908及6,225,114)，在一些實施例中，諸如DGT-28或第IV類EPSPS，或在其他實施例中CP4 EPSPS或第III類EPSPS；調節色素體中發生之生理過程的酶，該生理過程包括光合作用，及脂肪酸、胺基酸、油、類胡蘿蔔素、萜類、澱粉等之合成。在特定實施例中，可與TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽連接之多胜肽的其他非限制性實例包括：玉米黃素環氧酶、膽鹼單加氧酶、亞鐵螯合酶、 ω -3脂肪酸去飽和酶、麩醯胺酸合成酶、澱粉修飾酶、涉及必需胺基酸之合成的多胜肽、原維生素A、激素、Bt毒素蛋白等。編碼上述胜肽之核苷酸序列可在此項技術中獲得，且該等核苷酸序列可操作地連接於編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽之核苷酸序列，表現為包含感興趣多胜肽與TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽連接之多胜肽。另外，編碼上述多胜肽中之任一者的額外核苷酸序列可由熟習此項技術者鑑別(例如，藉由選殖與其他編碼特定多胜肽之基因具有高同源性的基因)。一旦鑑別出此類核苷酸序列，即可設計包含TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、

TraP27或TraP28編碼序列且可操作地連接於所鑑別之核苷酸序列的第二核苷酸序列或編碼等效多胜肽之序列。

V. 包含TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的表現

【0159】 在一些實施例中，可將至少一個包含編碼某一多胜肽之核苷酸序列的核酸分子引入細胞、組織或生物體中，使該多胜肽在其中表現，該多胜肽包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽。在特定實施例中，核酸分子可包含可操作地連接於編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之核苷酸序列的感興趣之核苷酸序列。舉例而言，核酸分子可包含：編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的編碼序列，及至少一個由感興趣之核苷酸序列編碼之額外胜肽序列。在一些實施例中，本發明之核酸分子可引入含色素體之宿主細胞、組織或生物體(例如，植物細胞、植物組織及植物)中，使得可在含色素體之宿主細胞、組織或生物體中由該核酸分子表現多胜肽，其中經表現之多胜肽包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽，以及至少一個由感興趣之核苷酸序列編碼之額外胜肽序列。在某些實施例中，此

類經表現之多胜肽之TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽可幫助含有該至少一個額外胜肽序列之多胜肽之一部分靶向至宿主細胞、組織或生物體之色素體上。

【0160】 在一些實施例中，本發明核酸分子可藉由熟習此項技術者所知之方法學中之任一者引入含色素體之細胞中。在特定實施例中，宿主細胞、組織或生物體可與本發明核酸分子接觸，以將核酸分子引入細胞、組織或生物體中。在特定實施例中，細胞可經本發明核酸分子轉型，使得該核酸分子引入細胞中，且該核酸分子可穩定整合至細胞之基因組中。在一些實施例中，包含至少一個編碼TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽且可操作地連接於感興趣之核苷酸序列的核苷酸序列之核酸分子可用於轉型細胞，例如含色素體之細胞(例如，植物細胞)。為起始或增強表現，核酸分子可包含一或多個調控序列，該等調控序列可操作地連接於編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的核苷酸序列。

【0161】 核酸分子可為例如載體系統，包括例如直線或閉環質體。在特定實施例中，載體可為表現載體。本發明之核酸序列可例如插入至載體中，使得核酸序列可操作地連接於一或多個調控序列。諸多載體可用於此目的，且特定載體之選擇可視例如待插入載體中之核酸的大小及待

用載體轉型之特定宿主細胞而定。載體通常含有各種組分，其一致性視載體之功能(例如，擴增DNA及表現DNA)及與該載體相容之特定宿主細胞而定。

【0162】 一些實施例可包括植物轉型載體，其包含含有至少一個上述調控序列之核苷酸序列，該等調控序列可操作地連接於一或多個核苷酸序列，其編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽。該一或多個核苷酸序列可於調控序列之控制下，於植物細胞、組織或生物體中表現，產生包含TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽，其可使該多胜肽之至少一部分靶向至植物細胞、組織或生物體之色素體。

【0163】 在一些實施例中，可操作地連接於編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的核苷酸序列的調控序列可為啓動子序列，其可於宿主細胞中起作用，諸如細菌細胞，其中該核酸分子發生擴增；或植物細胞，其中該核酸分子得以表現。適用於本發明核酸分子中之啓動子包括誘導性、病毒性、合成或組成性啓動子，其皆為此項技術中熟知的。可適用於本發明實施例中之啓動子的非限制性實例由以下各者提供：美國專利第6,437,217號(玉米RS81啓動子)；第5,641,876號(水水稻肌動蛋白啓動子)；第6,426,446號(玉米RS324啓動子)；

第6,429,362號(玉米PR-1啓動子)；第6,232,526號(玉米A3啓動子)；第6,177,611號(組成性玉米啓動子)；第5,322,938號；第5,352,605號；第5,359,142號及第5,530,196號(35S啓動子)；第6,433,252號(玉米L3油質蛋白啓動子)；第6,429,357號(水水稻肌動蛋白2啓動子及水水稻肌動蛋白2內含子)；第6,294,714號(光誘導性啓動子)；第6,140,078號(鹽誘導性啓動子)；第6,252,138號(病原體誘導性啓動子)；第6,175,060號(缺磷症誘導性啓動子)；第6,388,170號(雙向啓動子)；第6,635,806號(γ -薏苡辛(*gamma-coixin*)啓動子)；及美國專利申請案第09/757,089號(玉米葉綠體醛縮酶啓動子)。

【0164】 其他例示性啓動子包括脬脂鹼合成酶(*nopaline synthase*；NOS)啓動子(Ebert等人 (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(16):5745-9)；章魚鹼合成酶(*octopine synthase*；OCS)啓動子(其由根癌農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)之腫瘤誘導質體攜帶)；花椰菜花葉病毒組啓動子，諸如花椰菜嵌紋病毒(*cauliflower mosaic virus*；CaMV)19S啓動子(Lawton等人 (1987), *Plant Mol. Biol.* 9:315-24)；CaMV 35S啓動子(Odell等人 (1985), *Nature* 313:810-2；玄參嵌紋病毒(*figwort mosaic virus*) 35S啓動子(Walker等人 (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(19):6624-8)；蔗糖合成酶啓動子(Yang及Russell (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4144-8)；R基因複合啓動子(Chandler

等人 (1989), *Plant Cell* 1:1175-83) ; 葉綠素a/b結合蛋白基因啓動子 ; CaMV35S (美國專利第5,322,938號、第5,352,605號、第5,359,142號及第5,530,196號); FMV35S (美國專利第6,051,753號及第5,378,619號); PC1SV啓動子(美國專利第5,850,019號); SCP1啓動子(美國專利第6,677,503號); 及AGRtu.nos啓動子(GenBank寄存編號V00087; Depicker等人 (1982), *J. Mol. Appl. Genet.* 1:561-73; Bevan等人 (1983), *Nature* 304:184-7)。

【0165】 在特定實施例中，本發明之核酸分子可包含組織特異性啓動子。組織特異性啓動子爲相對於生物體之其他組織而言，在啓動子特異性組織中指導可操作地連接之核苷酸序列的較高水準之轉錄的核苷酸序列。組織特異性啓動子之實例包括(但不限於)：絨氈層特異性啓動子(tapetum-specific promoter); 花藥特異性啓動子; 花粉特異性啓動子(參見例如美國專利第7,141,424號及國際PCT公開案第WO 99/042587號); 胚珠特異性啓動子(參見例如美國專利申請案第2001/047525 A1號); 果實特異性啓動子(參見例如美國專利第4,943,674號及第5,753,475號); 及種子特異性啓動子(參見例如美國專利第5,420,034號及第5,608,152號)。在一些實施例中，發育階段特異性啓動子(例如，在發育後期有效之啓動子)可用於本發明之組成物或方法中。

【0166】 可在一些實施例中可操作地連接於核酸分子之額外調控序列包括位於啓動子序列與充當轉譯前導序

列之編碼序列之間的5' UTR。轉譯前導序列存在於經完全加工之mRNA中，且其會影響初級轉錄物之加工及/或RNA穩定性。轉譯前導序列之實例包括玉米及矮牽牛熱休克蛋白前導序列(美國專利第5,362,865號)、植物病毒外殼蛋白前導序列、植物rubisco前導序列及其他前導序列。參見例如 Turner 及 Foster (1995), *Molecular Biotech.* 3(3):225-36。5' UTR之非限制性實例由以下各者提供：GmHsp (美國專利第5,659,122號)；PhDnaK (美國專利第5,362,865號)；AtAnt1；TEV (Carrington及Freed (1990), *J. Virol.* 64:1590-7)；及AGRtunos (Genbank寄存編號V00087；及Bevan等人 (1983), *Nature* 304:184-7)。

【0167】 可在一些實施例中可操作地連接於核酸分子之額外調控序列亦包括3'非轉譯序列、3'轉錄終止區或聚腺苷酸化區(poly-adenylation region)。此等調控序列為位於核苷酸序列下游之遺傳元件，且包括可提供聚腺苷酸化信號及/或其他能夠影響轉錄或mRNA加工之調控信號的聚核苷酸。在植物中，聚腺苷酸化信號之作用會使聚腺苷酸化核苷酸加至mRNA前驅體之3'端。聚腺苷酸化序列可源自各種植物基因或T-DNA基因。3'轉錄終止區之非限制性實例為胭脂鹼合成酶3'區(nos 3'；Fraley等人 (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803-7)。不同3'非轉譯區之用途的實例提供於Ingelbrecht等人, (1989), *Plant Cell* 1:671-80中。聚腺苷酸化信號之非限制性實例包括來自豌豆 (*Pisum sativum*) RbcS2 基因

(Ps.RbcS2-E9 ; Coruzzi等人 (1984), *EMBO J.* 3:1671-9) 及AGRtu.nos (Genbank寄存編號E01312)之聚腺苷酸化信號。

【0168】 本發明之重組核酸分子或載體可包含賦予經轉型細胞(諸如植物細胞)可選擇表型的可選擇標記物。亦可使用可選擇標記物選擇包含本發明之重組核酸分子的植物或植物細胞。標記物可編碼殺生物劑抗性、抗生素抗性(例如，卡那黴素(kanamycin)、遺傳黴素(Geneticin)(G418)、博萊黴素(bleomycin)、潮黴素(hygromycin)等)，或除草劑抗性(例如，草甘膦等)。可選擇標記物之實例包括(但不限於)：編碼卡那黴素抗性且可選擇用於使用卡那黴素、G418等之*neo*基因；編碼雙丙胺膦(bialaphos)抗性之*bar*基因；編碼草甘膦抗性之突變EPSP合成酶基因；賦予溴草腈(bromoxynil)抗性之腈水解酶(nitrilase)基因；賦予咪唑啉酮或磺酰脲抗性之突變乙醯乳酸合成酶基因(*ALS*)；及抗甲胺喋呤(methotrexate)之DHFR基因。可獲得多個可選擇標記物，其賦予針對胺苄青黴素(ampicillin)、博萊黴素、氯黴素(chloramphenicol)、健大黴素(gentamycin)、潮黴素、卡那黴素、林可黴素(lincomycin)、甲胺喋呤、草銨膦(phosphinothricin)、嘌呤黴素(puromycin)、觀黴素(spectinomycin)、利福平(rifampicin)、鏈黴素(streptomycin)及四環素(tetracycline)之抗性。該等可選擇標記物之實例在例如美國專利5,550,318、5,633,435、5,780,708及6,118,047中

有所說明。

【0169】 本發明之重組核酸分子或載體亦可包括或另包括可篩選標記物。可篩選標記物可用於監控表現。例示性可篩選標記物包括： β -葡糖醛酸酶或 *uidA* 基因 (GUS)，其編碼各種顯色基質已知的酶 (Jefferson 等人 (1987), *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405)；R 基因座基因，其編碼調控植物組織中花青素色素(紅色)之產生的產物 (Dellaporta 等人 (1988) 「Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*」, 18th *Stadler Genetics Symposium*, P. Gustafson 及 R. Appels 編 (New York: Plenum), 第263-82頁)； β -內醯胺酶基因 (Sutcliffe 等人 (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:3737-41)；編碼各種顯色基質已知之酶的基因(例如，PADAC，一種顯色頭孢菌素)；螢光素酶基因 (Ow 等人 (1986), *Science* 234:856-9)；編碼可轉化顯色兒茶酚之兒茶酚雙加氧酶的 *xylE* 基因 (Zukowski 等人 (1983), *Gene* 46(2-3):247-55)；澱粉酶基因 (Ikata 等人 (1990), *Bio/Technol.* 8:241-2)；酪胺酸酶基因，其編碼能夠將酪胺酸氧化為多巴(DOPA)及多巴醌(dopaquinone)，其又縮合為黑色素的酶 (Katz 等人 (1983), *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-14)；及 α -半乳糖苷酶。

【0170】 適合轉型宿主細胞之方法包括可藉以將 DNA 引入細胞中的任何方法，例如且不限於：藉由原生質體之轉型(參見例如美國專利5,508,184)；藉由乾燥/抑制

介導之DNA攝入(參見例如Potrykus等人 (1985), *Mol. Gen. Genet.* 199:183-8)；藉由電穿孔(參見例如美國專利 5,384,253)；藉由用碳化矽纖維攪動(參見例如美國專利 5,302,523及5,464,765)；藉由農桿菌介導之轉型(參見例如美國專利 5,563,055、5,591,616、5,693,512、5,824,877、5,981,840及6,384,301)；及藉由經DNA塗佈之粒子的促進(參見例如美國專利5,015,580、5,550,318、5,538,880、6,160,208、6,399,861及6,403,865)；等。經由諸如此等技術之技術的應用，幾乎任何物種之細胞皆可穩定轉型。在一些實施例中，將轉型DNA整合至宿主細胞之基因組中。在多細胞物種之情況下，基因轉殖細胞可再生成基因轉殖生物體。此等技術中之任一者可用於產生基因轉殖植物，例如在基因轉殖植物之基因組中包含一或多個本發明之核酸序列。

【0171】 用於將表現載體引入植物中的最廣泛利用的方法係基於農桿菌之自然轉型系統。根癌農桿菌及發根農桿菌(*A. rhizogenes*)為基因轉型植物細胞的植物病原土壤細菌。根癌農桿菌及發根農桿菌之Ti及Ri質體分別攜帶負責植物之基因轉型的基因。Ti (腫瘤誘發)質體含有大區段，已知為T-DNA，其可轉移至經轉型之植物中。Ti質體之另一區段vir區負責T-DNA轉移。T-DNA區由末端重複序列界定邊界。在一些經修飾之雙運載體中，腫瘤誘發基因已刪除，且vir區之功能便可用於轉移由T-DNA邊界序列界定邊界之外來DNA。T區亦可含有例如用於有效地回

收基因轉殖植物及細胞之可選擇標記物及用於插入序列以轉移編碼諸如TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28之核酸的多重選殖位點。

【0172】 因此，在一些實施例中，植物轉型載體係源自根癌農桿菌之Ti質體(參見例如美國專利第4,536,475號、第4,693,977號、第4,886,937號及第5,501,967號；及歐洲專利EP 0 122 791)，或發根農桿菌之Ri質體。其他植物轉型載體包括例如且不限於由Herrera-Estrella等人 (1983), *Nature* 303:209-13；Bevan等人 (1983), *Nature* 304:184-7；Klee等人 (1985), *Bio/Technol.* 3:637-42；及歐洲專利EP 0 120 516中所述之彼等植物轉型載體，及源自前述任一者之彼等植物轉型載體。與植物自然作用之其他細菌(諸如中華根瘤菌(*Sinorhizobium*)、根瘤菌(*Rhizobium*)及中慢生根瘤菌(*Mesorhizobium*))可經修飾以介導基因轉移至多個多樣化植物中。此等植物相關之共生細菌可藉由獲取去攻擊性的(disarmed) Ti質體及適合雙運載體而使其勝任基因轉移。

【0173】 在向受體細胞提供外源性DNA之後，通常鑑別轉型細胞以進行進一步培養與植物再生。為增強鑑別轉型細胞之能力，希望使用如前所述之可選擇或可篩選標記基因，且用載體產生轉型物。在使用可選擇標記物之情況下，藉由將細胞暴露於可選擇試劑下，在可能的轉型細胞群體中鑑別轉型細胞。在使用可篩選標記物之情況下，可

針對所要標記基因特徵篩選細胞。

【0174】 暴露於可選擇試劑時存活之細胞或在篩選分析中評估為陽性之細胞可於支持植物再生之培養基中培養。在一些實施例中，任何適合植物組織培養基(例如，MS及N6培養基)皆可藉由包括其他物質(諸如生長調節劑)來進行修飾。組織可維持於具有生長調節劑之基礎培養基中，直到獲得足夠的可開始嘗試植物再生之組織，或重複數回人工選擇，直到組織型態適合再生(例如至少2週)，之後轉移至有利於形成芽之培養基中。定期轉移培養物，直到形成足夠多的芽。一旦形成芽，便將其轉移至有利於形成根之培養基中。一旦形成足夠多的根，便可將植物轉移至土壤中進行進一步生長與成熟。

【0175】 為確認再生植物中感興趣之核酸分子(舉例而言，編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽之核苷酸序列)的存在情況，可進行各種分析。該等分析包括例如：分子生物分析，諸如南方墨點法(Southern blotting)及北方墨點法(Northern blotting)、PCR及核酸定序；生物化學分析，諸如偵測蛋白質產物之存在情況，例如藉由免疫手段(ELISA及/或西方墨點法(Western blot))或藉由酶功能；植物部分分析，諸如葉或根分析；及整個再生植物之表型的分析。

【0176】 可例如藉由PCR擴增，使用例如對感興趣之核苷酸序列具有特異性的寡核苷酸引子分析整合事件。應

瞭解，PCR基因分型包括(但不限於)：源自經分離宿主植物組織且經預測含有感興趣之核酸分子整合至基因組中之基因組DNA的聚合酶鏈反應(PCR)擴增，繼之以PCR擴增產物之標準選殖及序列分析。PCR基因分型方法已有充分描述(參見例如Rios, G.等人 (2002), *Plant J.* 32:243-53)且可應用於源自任何植物物種(例如，玉蜀黍或大豆)或組織類型之基因組DNA，包括細胞培養物。

【0177】 使用農桿菌依賴性轉型方法形成之基因轉殖植物通常含有單一重組DNA序列插入至一條染色體中。該單一重組DNA序列稱為「基因轉殖事件」或「整合事件」。該等基因轉殖植物最可能為所插入DNA序列之異型合子。在一些實施例中，關於轉殖基因之基因轉殖植物同型合子可藉由含有相對於自身而言之單一外源性基因序列的獨立分離體基因轉殖植物(例如T₀植物)之性交配(自交)產生T₁種子來獲得。所產生的T₁種子有四分之一與該轉殖基因為同型合子。T₁種子發芽產生植物，可測試該等植物之異型接合度，通常使用可區分異型合子與同型合子的SNP分析或基於PCR之擴增分析(亦即，接合子型式分析)來測試。

【0178】 在特定實施例中，於含色素體之細胞中產生包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之至少一個多胜肽的複本，在該細胞中已引入至少一個核酸分子，其包含編碼至少一個包含至少一個TraP10、TraP11、

TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的核苷酸序列。包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之各多胜肽可自引入不同轉型事件中之多個核酸序列表現，或自引入單一轉型事件中之單一核酸序列表現。在一些實施例中，複數個此類多胜肽係於單一啓動子控制下表現。在其他實施例中，複數個此類多胜肽係於多個啓動子之控制下表現。單一多胜肽可表述為包含多個胜肽序列，該等胜肽序列中之每一者皆靶向至色素體。

【0179】 除用重組核酸分子直接轉型植物之外，基因轉殖植物亦可藉由使具有至少一個基因轉殖事件之第一植物與缺乏此類事件之第二植物雜交來製備。舉例而言，可將包含編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽之核苷酸序列的重組核酸分子引入可進行轉型之第一植物株中，產生基因轉殖植物，該基因轉殖植物可與第二植物株雜交，以使編碼該多胜肽之核苷酸序列漸滲雜交至該第二植物株中。

VI. 包含靶向於TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的植物材料

【0180】 在一些實施例中，提供一種植物，其中該植物包含含有某一核苷酸序列之植物細胞，該核苷酸序列編

碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽。在特定實施例中，此類植物可經由植物組織或植物細胞之轉型，及整株植物之再生而產生。在其他實施例中，此類植物可由商業來源獲得，或經由包含某一核苷酸序列之核酸漸滲雜交至種源而獲得，該核苷酸序列編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽。亦提供植物材料，其包含含有某一核苷酸序列之植物細胞，該核苷酸序列編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽。此類植物材料可由包含該植物細胞之植物獲得。在其他實施例中，植物材料為不能再生產生植物之植物細胞。

【0181】 在一些實施例中，包含編碼含有至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽之核苷酸序列的基因轉殖植物或植物材料可展現以下特徵中之一或多者：多胜肽於植物細胞中之表現；多胜肽之一部分於植物細胞之色素體中之表現；多胜肽自植物細胞之胞溶質至細胞色素體中之導入；多胜肽於植物細胞中之色素體特異性表現；及/或多胜肽於植物細胞中之位置。此類植物可額外具有一或多個除所編碼多胜肽之表現以外的所要特徵。該等特徵可包括例如：針對昆蟲、其他害蟲及致病試劑之抗

性；除草劑耐受性；增強之穩定性、產率或存放期；環境耐受性；藥物製造；工業產物製造；及營養強化。

【0182】 根據本發明之基因轉殖植物可為任何能夠經由本發明核酸分子轉型之植物。因此，該植物可為雙子葉或單子葉植物。可用於本發明方法中之雙子葉植物之非限制性實例包括芥菜屬(*Arabidopsis*)、苜蓿、豆類、椰菜、甘藍菜、胡蘿蔔、花椰菜、芹菜、大白菜、棉花、黃瓜、茄子、萵苣、甜瓜、豌豆、胡椒、花生、馬鈴薯、南瓜、蘿蔔、油菜、菠菜、大豆、南瓜(squash)、甜菜、向日葵、菸草、番茄及西瓜。可用於本發明方法中之單子葉植物之非限制性實例包括玉米、蕓薹屬(*Brassica*)、洋蔥、水水稻、高粱、小麥、黑麥、粟、甘蔗、燕麥、黑小麥、柳枝稷及草坪草(turfgrass)。根據本發明之基因轉殖植物可以任何方式使用或培養。

【0183】 一些實施例亦提供商品型產品，該等商品型產品含有一或多個核苷酸序列，其編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽，舉例而言，由含有一或多個此類核苷酸序列之重組性植物或種子產生之商品型產品。含有一或多個編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的核苷酸序列的商品型產品包括例如且不限於：包含一或多個編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、

TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的核苷酸序列的植物的食品產品、粗磨粉、油、或壓碎或完整的穀物或種子。在一或多個商品或商品型產品中偵測到一或多個編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽的核苷酸序列為以下之事實性證據 (*de facto evidence*): 該商品或商品型產品至少部分係由包含一或多個核苷酸序列之植物產生，該一或多個核苷酸序列編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽。在特定實施例中，本發明之商品型產品包含可偵測量之核酸序列，該核酸序列編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽。在一些實施例中，此類商品型產品可例如藉由獲得基因轉殖植物且自其製備食物或飼料而產生。

【0184】 在一些實施例中，包含轉殖基因之基因轉殖植物或種子亦可在其基因組中包含至少一種其他基因轉殖事件，該轉殖基因包含一核苷酸序列，其編碼包含至少一個TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28葉綠體輸送胜肽之多胜肽，該至少一種其他基因轉殖事件包括(但不限於): 轉錄得到RNAi分子之基因轉殖事件；編碼殺昆蟲蛋白(例如，蘇雲金芽孢桿菌 (*Bacillus thuringiensis*)殺昆蟲蛋白)之基因；耐除草劑基

因(例如，提供針對草甘膦之耐受性的基因)；及有利於基因轉殖植物中之所要表型(例如，產率增加、脂肪酸代謝改變或細胞質雄性不育恢復)的基因。

VII. TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28介導基因產物於質體之定位

【0185】 本發明之一些實施例提供一種用於表現基因產物及/或使基因產物定位至色素體(例如，葉綠體)的方法。在特定實施例中，基因產物可為標記基因產物，例如螢光分子。基因產物作為亦包含TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽之多胜肽的一部分，其表現可提供一種用於評估特定TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽序列之色素體定位能力之系統。在一些實施例中，標記基因產物作為含有TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28之多胜肽的一部分，其表現係用於將標記基因產物之表現靶向至細胞之色素體，其中該多胜肽於該處表現。在某些實施例中，此類標記基因產物係定位至宿主細胞之色素體中。舉例而言，該標記基因產物於宿主細胞色素體中之表現量高於胞溶質或其他胞器；該標記基因產物可於色素體中以相當高的量表現；該標記基因產物可基本上僅於色素體中表現；或該標記基因產物可完全於色素體中表現，使得無法偵測到於細胞溶質或非色素體胞器中之表現。

【0186】 在一些實施例中，使用包含功能性TraP10、

TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28變異胜肽且與標記基因產物連接之多胜肽來評估功能性TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28變異胜肽之特徵。舉例而言，TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽之序列可例如藉由引入至少一個保守性突變至TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽中而產生變異，且所得TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28變異胜肽可與標記基因產物連接。於適當宿主細胞(舉例而言，其中表現構築體上之一或多個調控元件具可操作性之細胞)中表現後，可測定標記基因產物之表現。比較參考TraP胜肽-標記構築體與變異TraP胜肽-標記構築體之間標記基因產物之次細胞定位(sub-cellular localization)，可判定變異TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽係提供例如較大的色素體定位、實質上相同的色素體定位或較少的色素體定位。藉由鑑別提供較大的色素體定位之TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28變異體，可將該等TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28變異體中之突變進一步併入TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28變異體中。執行多輪此評估方法，且隨後在TraP10、TraP11、

TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28序列中併入所鑑別之有利突變，可產生用於最佳化TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28序列之迭代方法。該等經最佳化之TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽序列及編碼該等胜肽之核苷酸序列視為本發明之一部分，無論該等經最佳化之TraP10、TraP11、TraP17、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27或TraP28胜肽序列是否可藉由額外突變進一步最佳化。

【0187】 本文中引用之所有參考文獻(包括公開案、專利及專利申請案)皆以引用的方式併入本文中，其併入程度不會與本發明之明確細節不一致，且併入程度如同各參考文獻個別地且具體地指出以引用的方式併入且全文闡述於本文中一般。本文中論述之參考文獻僅僅提供在本申請案之申請日之前的揭示內容。不應將本文中之任何內容解釋為承認本發明人無權憑藉先前之發明揭示本發明。

【0188】 提供以下實例以說明某些特定特徵及/或態樣。此等實例不應解釋為將本發明限於所描述之特定特徵或態樣。

實例

【0189】 **實例1：設計及製造嵌合葉綠體輸送胜肽(*TraP*)序列**

【0190】 色素體為高等植物物種中所存在之胞質微器，且存在於所有植物組織中。葉綠體為綠色光合組織中

所存在之特定類型的色素體，其負責重要生理功能。舉例而言，一種此類重要生理功能為合成植物所需之芳族胺基酸。此生合成途徑需要細胞核所編碼之酶，且由細胞質傳輸至葉綠體內部。此等細胞核編碼之酶通常具有N端輸送胜肽，其與葉綠體膜相互作用以加速胜肽傳輸至葉綠體基質。Bruce B, (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function, and evolution. *Trends Cell Bio.*, 10:440-447。在導入時，基質胜肽酶切割該輸送胜肽，剩下成熟功能蛋白導入葉綠體。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。葉綠體輸送胜肽為可變序列，其在長度、組成及組織方面具有高度多樣性(Bruce, 2000)。不同植物物種之同源蛋白質間的葉綠體輸送胜肽之序列類似性存在明顯分歧。鑒於當比較經加工之成熟功能蛋白時，自不同植物物種獲得之同源蛋白質通常共享相對較高程度之序列類似性，所以葉綠體輸送胜肽之間的分歧度無法預測。

【0191】 在植物中設計、產生且測試新穎嵌合葉綠體輸送胜肽序列。該等新穎嵌合葉綠體輸送胜肽顯示具有有效之易位與加工特性，以將農業上重要蛋白質導入葉綠體中。首先，經由ChloroP™電腦程式分析來自不同植物及細菌物種之蛋白質序列以鑑別假定葉綠體輸送胜肽序列(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, 可在 <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>獲得)。在鑑別天然葉綠體輸送胜肽之後，將葉綠體輸送胜肽序列彼此比對(圖2)。

【0192】 利用葉綠體輸送胜肽序列比對，藉由以大致 1:1 之比率組合來自第一生物體之第一半葉綠體輸送胜肽序列與來自第二生物體之第二半葉綠體輸送胜肽序列，設計出新穎嵌合葉綠體輸送胜肽。新設計之嵌合葉綠體輸送胜肽的例示性蛋白質序列為TraP10 (SEQ ID NO: 1)、TraP11 (SEQ ID NO: 2)、TraP17 (SEQ ID NO: 3)、TraP18 (SEQ ID NO: 4)及TraP19 (SEQ ID NO: 5)。此等新穎嵌合葉綠體輸送胜肽序列源自西洋油菜、大豆、水稻、莧屬、濱旋花屬及鹽生杜氏藻及萊茵衣藻的EPSPS蛋白質。TraP10 (SEQ ID NO: 1)嵌合葉綠體輸送胜肽序列包含源自西洋油菜之N端，且葉綠體輸送胜肽之C端源自大豆。TraP11 (SEQ ID NO: 2)葉綠體輸送胜肽序列包含源自大豆之N端，且葉綠體輸送胜肽之C端源自西洋油菜。TraP17 (SEQ ID NO: 3)葉綠體輸送胜肽序列包含源自濱旋花屬之N端，且葉綠體輸送胜肽之C端源自萊茵衣藻。TraP18 (SEQ ID NO: 4)葉綠體輸送胜肽序列包含源自水稻之N端，且葉綠體輸送胜肽之C端源自莧屬。TraP19 (SEQ ID NO: 5)葉綠體輸送胜肽序列包含源自莧屬之N

端，且葉綠體輸送胜肽之C端源自鹽生杜氏藻。

【0193】 類似地，經由ChloroP™ (Emanuelsson, 1999)電腦程式分析來自不同植物物種之多個蛋白質序列以鑑別假定葉綠體輸送胜肽序列，可在<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>獲得。利用葉綠體輸送胜肽序列之比對，藉由隨機選擇胺基酸來設計新穎合成葉綠體輸送胜肽，從而產生新穎合成之假定葉綠體輸送胜肽序列。新設計之合成葉綠體輸送胜肽之例示性序列為TraP26 (SEQ ID NO: 6)、TraP27 (SEQ ID NO: 7) 及TraP28 (SEQ ID NO: 8)。

【0194】 經由多個分析測試嵌合葉綠體輸送胜肽，該等分析包括短暫性植物中表現系統(transient *in planta* expression system)，且基因轉殖為含有基因調控表現元件的穩定轉型事件，該基因調控表現元件融合至農事上重要的轉殖基因序列。

【0195】 **實例2：短暫性植物中測試嵌合葉綠體輸送胜肽(TraP)序列**

【0196】 菸草短暫分析：

【0197】 首先經由短暫性植物中分析測試以上所述之嵌合葉綠體輸送胜肽序列。合成編碼TraP10 (SEQ ID NO: 9)、TraP11 (SEQ ID NO: 10)、TraP17 (SEQ ID NO: 11)、TraP18 (SEQ ID NO: 12)、TraP19 (SEQ ID NO: 13)、TraP26 (SEQ ID NO: 14)、TraP27 (SEQ ID NO: 15)及TraP28 (SEQ ID NO: 16)之聚核苷酸序列，

亦即嵌合葉綠體輸送胜肽序列。在TraP10及TraP11之TraP序列與*yfp*編碼序列之間併入連接子序列(SEQ ID NO: 17)。所得構築體含有兩個植物轉錄單元(PTU)。第一PTU由阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)泛素10啓動子(AtUbi10啓動子；Callis等人, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493)、TraP-黃色螢光蛋白融合基因(TraP-YFP；美國專利申請案2007/0298412)或TraP-綠色螢光蛋白融合基因(TraP-GFP；Sheen等人, (1995) *Plant J.*, 8(5): 777-84)及根癌農桿菌ORF 23 3'非轉譯區(AtuORF23 3'UTR；美國專利第5,428,147號)構成。第二PTU由木薯脈嵌紋病毒(Cassava Vein Mosaic Virus)啓動子(CsVMV啓動子；Verdaguer等人, (1996) *Plant Molecular Biology*, 31: 1129-1139)、草胺磷乙醯轉移酶(*phosphinothricin acetyl transferase*, PAT；Wohleben等人, (1988) *Gene*, 70: 25-37)或DSM-II (國際專利申請案 2008070845)及根癌農桿菌ORF 1 3'非轉譯區(AtuORF1 3'UTR；Huang等人, (1990) *J. Bacteriol.*, 172: 1814-1822)構成。構築體pDAB101979含有TraP10嵌合葉綠體輸送胜肽(圖3)。構築體pDAB101980含有TraP11嵌合葉綠體輸送胜肽(圖4)。構築體pDAB107634含有TraP17嵌合葉綠體輸送胜肽(圖5)。構築體pDAB107635含有TraP18嵌合葉綠體輸送胜肽(圖6)。構築體pDAB107636含有TraP19嵌合葉綠體輸送胜肽(圖7)。構築體pDAB109847含有TraP26嵌合葉綠體輸送胜肽

(圖8)。構築體pDAB109848含有TraP27嵌合葉綠體輸送胜肽(圖9)。構築體pDAB109849含有TraP28嵌合葉綠體輸送胜肽(圖10)。在該等研究中構建且包括對照質體pDAB101908，其不含yfp基因上游之葉綠體輸送胜肽序列(圖11)。經由限制酶切割與定序確認構築體。最後，將構築體轉型至根癌農桿菌中，且以甘油儲備液儲存。

【0198】 自農桿菌甘油儲備液中，將一充滿冷凍培養液之圈環接種於含有2 ml酵母提取物蛋白腴葡萄糖(100 µg/ml觀黴素)之14 ml無菌管內。經接種培養基係於28℃下，在200 rpm下震盪培育隔夜。翌日使用約100 µl培養液接種於含25 ml YPD (100 µg/ml觀黴素)之125 ml無菌三角震盪培養瓶(tri-baffled flask)中，且在28℃下在200 rpm下震盪培育隔夜。翌日將培養液於無菌ddH₂O (pH 8.0)中稀釋至OD₆₀₀值0.5。以1:1之比率將經稀釋之農桿菌屬菌株與含有P19輔助蛋白之第二農桿菌屬菌株混合。經由Voinnet方法，將培養液用於菸草葉浸潤。Voinnet O, Rivas S, Mestre P及Baulcombe D, (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, 33: 949-956。將經浸潤之菸草植物置於Convion™套組中，於24℃下光照16小時，持續至少三天，直到進行分析為止。

【0199】 顯微鏡結果：

【0200】 自植物切下經農桿菌浸潤之菸草葉，且將其

置放於含有水之皮氏培養皿(petri-dish)中以防止脫水。使用Dark Reader Hand Lamp™ (Clare Chemical Research Co.; Dolores, CO)，在藍光激發下，用保持在適當位置的長波通濾光玻璃觀察經浸潤之菸草葉，從而鑑別出葉中成功地表現YFP或GFP報導蛋白之未受損區域。自葉中切出經特定鑑別之葉面區域且將其浸入水中，藉由共焦顯微鏡(Leica TCS-SP5 AOBS™; Buffalo Grove, IL)成像。YFP係藉由514 nm雷射譜線，使用多譜線氬離子雷射激發。GFP係藉由488 nm雷射譜線，使用多譜線氬離子雷射激發。使用非表現(暗色)對照葉樣品調節偵測狹縫之寬度，以排除葉子之自體螢光背景。同時在第二通道中收集葉綠素之自體螢光，與螢光報導蛋白信號進行直接比較，從而確定葉綠體中之位置。

【0201】顯微鏡成像結果指出，相比於未易位至菸草細胞之細胞質之葉綠體中的對照YFP螢光蛋白，包含TraP葉綠體輸送胜肽(TraP10、TraP11、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27及TraP28)之YFP或GFP螢光蛋白在定位於菸草細胞之細胞質中之葉綠體內累積(圖12至圖19)。應注意，TraP17輸送胜肽不會將YFP螢光蛋白易位至菸草之葉綠體中，但TraP17輸送胜肽會將YFP螢光蛋白易位至玉米之葉綠體中。此等顯微鏡成像結果表明，YFP蛋白質易位至葉綠體中為TraP葉綠體輸送胜肽之結果。如顯微鏡圖中所示，YFP螢光信號定位於葉綠體中，其因為在顯微鏡成像條件下有自體螢光，所以亦發紅色螢光。比較而言，

圖 20 提供經不含葉綠體輸送胜肽之對照構築體 pDAB101908 浸潤的菸草葉組織之顯微鏡影像。在此影像中，在顯微鏡成像條件下，葉綠體僅因為自體螢光而發紅色螢光，且無任何經 TraP 浸潤之菸草細胞所展現的 YFP 螢光信號。實際上，對照菸草植物細胞之 YFP 螢光信號在菸草植物細胞之整個細胞質中廣泛表現。

【0202】 玉米原生質體短暫分析：

【0203】 藉由在含有 2-3 滴 Tween® 20 之 50% Clorox™ (3% 次氯酸鈉) 中劇烈震盪約 20 分鐘，對玉蜀黍 c.v. B104 之種子進行表面滅菌。用無菌蒸餾水澈底沖洗種子。將無菌種子塗鋪至 Phytatrays 或類似類型盒子中之 ½ MS 培養基上，且使其在暗處 (28°C) 生長 12 至 20 天。使用玉米原生質體短暫分析，自玉蜀黍 c.v. B104 之葉子獲得玉米原生質體且對其進行轉染。此玉米原生質體分析為由 Yoo, S.-D., Cho, Y.-H. 及 Sheen, J., (2007), *Arabidopsis* Mesophyll Protoplasts: A Versatile Cell System for Transient Gene Expression Analysis, *Nature Protocols*, 2: 1565-1572 所述之系統的修改版。如 Yoo 等人, (2007) 所述製備溶液，但在以下實驗中所用之甘露糖醇濃度改為 0.6 M。

【0204】 在室溫下，將 100 至 500 µl 原生質體 ($1-5 \times 10^5$ 個細胞) 添加至含有約 40 µg 質體 DNA 之 2 ml 微離心管內，完成該等原生質體之轉染。DNA 之體積較佳維持在原生質體體積之約 10%。在 5 分鐘培育階段期間，間

歇性地混合原生質體及DNA。向原生質體及DNA中緩慢地添加相等體積之PEG溶液，一次2滴，且在各滴PEG溶液之添加之間進行混合。使管子在間歇性平緩混合下培育約10分鐘。隨後，添加1 ml W5+溶液且藉由將管子倒轉若干次進行混合。使管子在75×g下在4℃之溫度下離心5分鐘。最後，移除上清液且使集結粒再懸浮於1 ml WI溶液中且將原生質體置放於小型皮氏培養盤(35×10 mm)中或6孔多孔培養盤中且在暗處在室溫下培育隔夜。在培育12小時之後，藉由顯微鏡查看GFP之螢光。使用類似於先前所述之顯微鏡條件的顯微鏡條件進行成像。

【0205】 顯微鏡成像結果指出，相比於未易位至玉米細胞之細胞質之葉綠體中的對照GFP螢光蛋白，包含TraP17、TraP18或Trap19之嵌合葉綠體輸送胜肽的GFP螢光蛋白在定位於玉米細胞之細胞質中之葉綠體內累積(圖21至圖23)。此等顯微鏡成像結果表明，GFP蛋白質易位至葉綠體中為TraP嵌合葉綠體輸送胜肽之結果。

【0206】 西方墨點法結果：

【0207】 經由西方墨點法分析經浸潤之菸草植物的樣品。收集葉片碎屑且進行滾珠研磨。在Kleco™珠粒研磨機中，將約100-200 mg之葉片材料與2 BBs (Daisy；Rogers, AR)及500 ml PBST混合3分鐘。隨後在離心機中在14,000×g下在4℃下，對樣品進行短暫離心(spun down)。移出上清液且經由西方墨點法或免疫沈澱法直接分析。免疫沈澱法係使用Pierce Direct IP kit™ (Thermo

Scientific; Rockford, IL), 遵循製造商之方案執行。約 50 μ g 抗YFP或抗GFP結合至樹脂。將樣品與樹脂一起在4 $^{\circ}$ C下培育隔夜。隨後, 於次日早晨洗滌且溶離樣品, 且藉由組合相等體積之2 $\times$ 8M脲樣品緩衝液, 且隨後將樣品煮沸5分鐘, 以備分析。經煮沸樣品於MOPS緩衝液中之4-12% SDS-Bis Tris凝膠上跑膠40分鐘。隨後使用 Invitrogen iBlot™ (Life Technologies; Carlsbad, CA), 遵循製造商之方案, 對凝膠進行墨染。使用含5%脫脂奶粉之PBS-Tween®溶液阻斷經墨染之膜10分鐘。藉由以1:1000稀釋率使用之初級抗體(兔之單株抗GFP或抗YFP), 在含5%脫脂奶粉之PBS-Tween®溶液中, 對膜探測1小時。隨後, 用PBS-Tween®沖洗膜三次, 持續五分鐘, 從而移除所有未結合之初級抗體。藉由以1:1000稀釋率使用之二級單株山羊抗兔抗體(Life Technologies)探測膜, 持續60分鐘。如先前所述洗滌膜且藉由添加Thermo BCIP/NBT™受質進行顯影。使比色受質顯影5-10分鐘, 且隨後用水沖洗墨點, 隨後乾燥。

【0208】 西方墨點法之結果指出, 就所有測試之構築體而言, YFP或GFP蛋白係於經浸潤之菸草細胞中表現。如藉由存在以下蛋白質條帶所指示, 所有經浸潤之菸草植物葉組織表現YFP或GFP蛋白, 該蛋白質條帶與YFP或GFP抗體反應且大小與自用YFP或GFP對照構築體浸潤之菸草植物葉組織獲得之YFP或GFP蛋白質條帶相等。此外, 此等結果指出, TraP嵌合葉綠體輸送胜肽(TraP10、

TraP11、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27及TraP28)經加工且自YFP或GFP蛋白裂解。TraP-YFP或GFP構築體表現經預處理之蛋白質條帶，其分子量大於對照YFP或GFP蛋白。在西方墨點圖上存在大小等於對照YFP或GFP之條帶表明，TraP葉綠體輸送胜肽序列(TraP10、TraP11、TraP18、TraP19、TraP26、TraP27及TraP28)經過處理，從而將YFP或GFP之大小減小至等於YFP或GFP對照之分子量大小。

【0209】 實例3：用於在芥菜屬中表現耐昆蟲轉殖基因之嵌合葉綠體輸送胜肽(TraP)序列

【0210】 Cry2Aa：

【0211】 評定阿拉伯芥中TraP11嵌合葉綠體輸送胜肽對Cry2Aa蛋白表現之有效性。分析含有融合至Cry2Aa蛋白之TraP11嵌合葉綠體輸送胜肽的基因轉殖芥菜屬植物對大豆夜蛾(soybean looper；SBL)及菸夜蛾(tobacco budworm；TBW)的昆蟲耐受性。

【0212】 將TraP11嵌合葉綠體輸送胜肽序列選殖至植物表現構築體pDAB107538 (圖24)中且在芥菜屬中進行測試。合成編碼Trap11 (**SEQ ID NO: 18**)嵌合葉綠體輸送胜肽序列之新版本聚核苷酸序列且將其併入質體構築體中。所得構築體含有兩個植物轉錄單元(PTU)。第一PTU由阿拉伯芥泛素10啓動子(AtUbi10啓動子；Callis等人, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493) 、TraP11-cry2Aa融合基因(Cry2Aa；**SEQ ID NO: 19**)及

根癌農桿菌ORF 23 3'非轉譯區(AtuORF23 3'UTR；美國專利第5,428,147號)構成。第二PTU由木薯脈嵌紋病毒啟動子(CsVMV 啟動子；Verdaguer 等人，(1996) *Plant Molecular Biology*, 31:1129-1139)、*dsm-2* 基因(DSM2；美國專利申請案第2011/0107455號)及根癌農桿菌ORF 1 3'非轉譯區(AtuORF1 3'UTR；Huang 等人，(1990) *J. Bacteriol.*, 172:1814-1822)構成。構築體pDAB107538含有TraP11嵌合葉綠體輸送胜肽。在該等研究中構建且包括對照質體107617，其不含*cry2Aa*基因上游之葉綠體輸送胜肽序列(圖25)。經由限制酶切割與定序確認構築體。最後，將構築體轉型至根癌農桿菌中，且以甘油儲備液儲存。

【0213】經由根癌農桿菌介導之植物轉型，將pDAB107538構築體轉型至阿拉伯芥中。簡言之，使12至15種阿拉伯芥植物(Columbia生態型，Col-0)在溫室中在250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ 之光強度、25°C、18/6小時之光照/黑暗下，在4"盆中生長。在轉型之前一週修剪主要的花枝。藉由在100 ml LB培養液(100 mg/L觀黴素、50 mg/L卡那黴素)中在28°C下以225 rpm震盪下培育10 μl 重組性農桿菌甘油儲備液72小時來製備農桿菌接種物。用光譜儀量測農桿菌培養物之數量且當細胞達到OD 600值0.8時，藉由離心收集細胞。接著，使細胞再懸浮於3-4體積之5%蔗糖及0.04% Silwet-L77™及10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 苯并胺基嘌呤(BA)浸潤培養基中。在平緩攪動下，將植物之地上部分浸漬於農桿菌

溶液中，持續5-10分鐘。隨後將植物轉移至溫室，伴隨常規供水及施肥，進行正常生長，直至結籽為止。

【0214】 將約200 mg膨脹的T₁種子均勻種植在選擇盤(10.5" × 21" × 1"發芽盤T.O.Plastics Inc., Clearwater, MN)中。播種後5天，以10 ml/盤(703 L/ha)之噴霧體積，向幼苗噴灑0.20%固殺草(glufosinate)除草劑(Liberty™)溶液(20 µl/10 mL dH₂O)，且在播種後10天，使用DeVilbiss壓縮空氣噴嘴再次噴灑。在第二次施用固殺草之後4至7天，鑑別耐除草劑植物且將其移植以產生T₂種子。所得T₂種子用於下文所述之研究中。

【0215】 針對各事件，將小份量之T₂種子(約100-200顆種子)懸浮於40 ml 0.1%瓊脂糖溶液中且在4℃下冷分層24小時。隨後藉由用移液管移取10 ml種子至繁殖淺盤中之四個淺盤的表面上來播種經分層之種子。用Sunshine #5 soil media™ (Sun Gro; Bellevue, WA)填充淺盤且用細蛭石輕輕地覆蓋。在播種之前且視需要在此之後，用荷阿格蘭肥料(Hoagland's fertilizer)使盤飽和。在播種之後，用保濕蓋(humidity dome)遮蓋盤子且隨後將其置放於Convion™生長箱組中，處於24℃與16小時光週期下。白熾燈及螢光燈提供200 PAR之照明度。5天後，種子發芽且移去蓋子。在第6天選擇轉型體之第一除草劑且在第10天選擇第二除草劑。使用DeVilbiss霧化手動噴霧器，以200 g ai/ha之比例施用Liberty™除草劑(a.i.固殺草-鉍)以去除空值。正如所料，大致25%之植物為空值。亦在該

選擇操作中包括一系列野生型檢查且其在兩次除草劑施用之後具有100%死亡率。在第14天，植物已準備好移植。自各事件獲取十二株植物進行生物分析且將其移植至填充有Sunshine 5號土壤且用細蛭石遮光之3"盆中。在移植之前且視需要在此之後，用荷阿格蘭肥料預浸泡淺盤。移植植物在未經空氣調節之溫室中在25°C下在14小時之補充光下繁殖。藉由用剪刀修剪，抑制長出長角果，且由此產生更多植物組織進行測試。植物在第16-18天準備好進行DNA採樣且在約第23天準備好進行生物分析。使用分子確認分析篩選假定的基因轉殖植物且經鑑別之事件繼續以得到蛋白質分析及生物分析結果。

【0216】 經轉型植物一般顯示健康表型，但當與野生型植物進行目測比較時，一些植物的大小較小。各芥菜屬構築體之基因複本數之分析顯示，所有構築體之插入結果類似，其中約50%之植物具有 ≥ 3 個感興趣之*cry2Aa*基因複本且約50%具有1-2個基因複本。

【0217】 T₁芥菜屬事件之Cry2Aa蛋白質表現量範圍廣泛。使用ELISA分析完成蛋白質偵測，以對Cry2Aa蛋白質表現進行定量。一般而言，各事件之蛋白質表現量與T股插入之複本數相關。針對兩組芥菜屬轉型事件(例如，在無TraP之情況下表現Cry2Aa之pDAB107617事件及在TraP 11嵌合葉綠體輸送胜肽之情況下表現Cry2Aa之pDAB107538事件)，高T股複本數事件(例如， >3 個插入事件)一般產生高於低T股複本數事件之平均蛋白質表現

量。

【0218】 T_2 代芥菜屬植物之Cry2Aa蛋白表現值相比於 T_1 芥菜屬植物之表現值有所降低。此等結果指出，蛋白質表現在各組事件中不同。針對所有測試之植物事件(例如，不含TraP之事件[pDAB107617]及含TraP11之事件[pDAB107538])，自同型合子事件獲得之平均蛋白質表現量大於自半合子事件獲得之平均蛋白質表現量。含有兩個以上T股插入複本之芥菜屬事件的表現量高於僅含單一複本之芥菜屬事件。儘管自 T_1 至 T_2 子代，蛋白質表現量降低，但將TraP11嵌合葉綠體輸送胜肽併入構築體內產生表現Cry2Aa蛋白之基因轉殖芥菜屬事件。

【0219】 在昆蟲生物分析實驗中測試兩組 T_1 芥菜屬事件。一般而言，Cry2Aa蛋白之表現量較大的高複本數事件對葉片產生的傷害量小於低複本數事件。關於在無TraP之情況下表現Cry2Aa之芥菜屬事件($r^2=0.49$ [SBL], 0.23 [TBW])，及關於在含TraP11情況下表現Cry2Aa之芥菜屬事件($r^2=0.75$ [SBL], 0.17 [TBW])，在蛋白質表現與針對SBL及TBW之葉片保護之間存在相關性。因而，蛋白質表現增加引起對葉片傷害之實質性保護($Pr < 0.05$)。

【0220】 在TraP11及非TraP芥菜屬事件中，芥菜屬植物均受到保護，免於SBL傷害。在存在及不存在TraP11之情況下，Cry2Aa之表現均產生低於30%之葉片傷害，其中針對TraP11:Cry2Aa事件，最小蛋白質表現為約1.0 ng/cm²；且針對無TraP之Cry2Aa事件，最小蛋白質表現

為約1.5 ng/cm²。Cry2Aa在存在及不存在TraP11之情況下的芥菜屬事件表現之評定得到低於20%之葉片傷害，其中針對TraP11芥菜屬事件，最小蛋白質表現為約1.1 ng/cm²；且針對非TraP芥菜屬事件，最小蛋白質表現為約2.0-2.5 ng/cm²。

【0221】 TraP11及非TraP芥菜屬事件均可保護芥菜屬植物不受TBW傷害。當喂以自芥菜屬事件獲得之植物材料時，TBW昆蟲對Cry2Aa蛋白比SBL昆蟲敏感。當Cry2Aa蛋白分別與TraP11組合且在無TraP之情況下表現時，蛋白質濃度低至約1.0及1.5 ng/cm²之Cry2Aa產生小於30%之葉片傷害。在20%葉片傷害截止點，TraP11芥菜屬事件之葉片保護係由含量約1.1 ng/cm²之Cry2Aa蛋白所致，而不具有TraP之芥菜屬事件需要表現2.0-2.5 ng/cm²之Cry2Aa蛋白。

【0222】 TraP11嵌合葉綠體輸送胜肽不會降低Cry2Aa蛋白在阿拉伯芥中之表現有效性。含有融合至Cry2Aa蛋白之TraP11嵌合葉綠體輸送胜肽的基因轉殖芥菜屬植物的Cry2Aa蛋白表現量高，其提供針對大豆夜蛾(SBL)及菸夜蛾(TBW)之昆蟲耐受性。

【0223】 **實例4：用於在芥菜屬中表現耐除草劑轉殖基因之嵌合葉綠體輸送胜肽(TraP)序列**

【0224】 DGT28：

【0225】 評定TraP26及TraP27嵌合葉綠體輸送胜肽在阿拉伯芥中對DGT28 (PCT/US2013/024488)蛋白質表

現之有效性。針對草甘膦應用，分析含有融合至DGT28蛋白之TraP26或TraP27嵌合葉綠體輸送胜肽的基因轉殖芥菜屬植物的除草劑耐受性。

【0226】 將TraP26嵌合葉綠體輸送胜肽序列選殖至植物表現構築體pDAB114286 (圖26)中且在芥菜屬中進行測試。所得構築體含有兩個植物轉錄單元(PTU)。第一PTU由阿拉伯芥泛素10啓動子(AtUbi10啓動子；Callis等人，(1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493)、TraP26-*dgt28*融合基因(TraP26-DGT28；SEQ ID NO: 27)及根癌農桿菌 ORF 23 3' 非轉譯區 (AtuORF23 3'UTR；美國專利第5,428,147號)構成。第二PTU由木薯脈嵌紋病毒啓動子(CsVMV啓動子；Verdaguer等人，(1996) *Plant Molecular Biology*, 31:1129-1139)、*dsm-2* 基因(DSM2；美國專利申請案第2011/0107455號)及根癌農桿菌ORF 1 3'非轉譯區(AtuORF1 3'UTR；Huang等人，(1990) *J. Bacteriol.*, 172:1814-1822)構成。構築體pDAB114286含有TraP26嵌合葉綠體輸送胜肽。

【0227】 將TraP27嵌合葉綠體輸送胜肽序列選殖至植物表現構築體pDAB114287 (圖27)中且在芥菜屬中進行測試。所得構築體含有兩個植物轉錄單元(PTU)。第一PTU由阿拉伯芥泛素10啓動子(AtUbi10啓動子；Callis等人，(1990) *J. Biol. Chem.*, 265: 12486-12493)、TraP27-*dgt28*融合基因(TraP27-DGT28；SEQ ID NO: 28)及根癌農桿菌 ORF 23 3' 非轉譯區 (AtuORF23

3'UTR；美國專利第5,428,147號)構成。第二PTU由木薯脈嵌紋病毒啟動子(CsVMV啟動子；Verdaguer等人，(1996) *Plant Molecular Biology*, 31:1129-1139)、*dsm-2*基因(DSM2；美國專利申請案第2011/0107455號)及根癌農桿菌ORF 1 3'非轉譯區(AtuORF1 3'UTR；Huang等人，(1990) *J. Bacteriol.*, 172:1814-1822)構成。構築體pDAB114287含有TraP27嵌合葉綠體輸送肽。

【0228】 經由限制酶切割與定序確認兩種構築體。將構築體轉型至根癌農桿菌中且以甘油儲備液儲存。最後，經由上文所述之農桿菌屬轉型方法，將構築體轉型至阿拉伯芥中。

【0229】 植物轉型：

【0230】 使新收集的含有*dgt-28*及*DSM-2*表現卡匣之基因轉殖T₁種子在室溫下乾燥7天。將T₁種子播種在26.5 × 51 cm發芽盤上，每盤分裝200 mg份量之分層T₁種子(約10,000顆種子)，其預先懸浮於40 ml 0.1%瓊脂糖溶液中，且於4℃下儲存2天，以達到休眠需求且確保種子同步發芽。

【0231】 Sunshine Mix Lp5 soil™以細蛭石覆蓋，且以荷阿格蘭溶液(Hoagland's solution)澆灌直到濕潤，隨後使其因重力而流出。各40 ml份量之分層種子係以移液管均勻地播種在蛭石上，且蓋上保濕蓋，持續4-5天。在使用固殺草進行出苗後噴灑進行初步轉型體挑選(挑選經共轉型之*dsm-2*基因)的前一日，移去蓋子。

【0232】 種植七天後(DAP)及再次11 DAP，使用 DeVilbiss 壓縮空氣噴嘴，以10 ml/盤(703 L/ha)之噴灑體積向 T₁ 植物(分別於子葉及 2-4-1f 階段)噴灑 0.2% Liberty™ 除草劑溶液(200 g ai/L 固殺草，Bayer Crop Sciences, Kansas City, MO)，以達到有效施加率為280 g ai/ha 固殺草。在最後一次噴灑之後4-7天，鑑別存活植物(積極生長之植物)，且將其個別地移植至準備有盆栽培養基(Metro Mix 360™)之3吋盆中。給移植植物蓋上保濕蓋，持續3-4天，且像先前一樣置放在22℃生長箱中或直接移至溫室中。隨後移去蓋子且在溫室(22±5℃，50±30% RH，14 h光照:10 h黑暗，最小500 μE/m²s¹自然光+補充光)中培養植物。對存活的T₁植物進行分子確認分析，以確認草甘膦耐受性基因已穩定整合至植物之基因組中。

【0233】 分子確認：

【0234】 確認經 pDAB114286 及 pDAB114287 轉型之芥菜屬植物的基因組內 *dgt-28* 及 *dsm-2* 轉殖基因之存在情況。此等聚核苷酸序列之存在情況係經由水解探針、基因表現卡匣 PCR (亦描述為植物轉錄單元 PCR；PTU PCR)、西方墨點法及 ELISA 分析進行確認。

【0235】 首先篩選 T₁ 芥菜屬植物以確認 *dgt-28* 及 *dsm-2* 轉殖基因及 AtUbi10 啟動子之存在情況。經由基因表現卡匣 PCR 篩選各事件，以判定 *dgt* 表現卡匣是否完全整合至植物基因組中，且不重排。隨後，經由類似於 TAQMAN™ 之水解探針分析篩選 T₁ 芥菜屬植物。使用自

此等研究產生之資料確定轉殖基因複本數且鑑別選擇芥菜屬事件進行自花授粉以產生T₂子代。使用下文所述之水解探針分析測定T₁芥菜屬植物之複本數。鑑別具有不同轉殖基因數目之植物且進行後續草甘膦耐受性研究。

【0236】 收集96孔盤中之組織樣品且凍乾2天。利用KLECO™組織磨碎器及鎢珠(Environ Metal INC., Sweet Home, Oregon)進行新鮮組織浸解。在組織浸解後，使用Biosprint 96 Plant kit™ (Qiagen, Germantown, MD)，根據製造商之建議方案，以高產量形式分離基因組DNA。在分離之後，以標準1:3稀釋率稀釋gDNA。使用LIGHTCYCLER®480系統(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)之即時PCR進行水解探針分析，測定轉殖基因複本數。該等分析係針對*dsm-2*、AtUbi10及內部參考基因*TAFII15* (Genbank ID: NC 003075; Duarte等人, *BMC Evol. Biol.*, 10:61)設計的。

【0237】 關於擴增，以1×最終濃度在10 µL體積多重反應中製備LIGHTCYCLER®480探針主混合物(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)，其含有0.1 µM各自用於*dsm-2*及AtUbi10之引子、0.4 µM各自用於*TAFII15*之引子及0.2 µM各探針(表1)。執行兩步擴增反應，其中在60℃下延伸40秒，獲取螢光。對所有樣品進行操作且使用平均循環臨限(Ct)值分析各樣品。使用LightCycler軟體1.5™版，使用相對定量模組且基於 $\Delta\Delta Ct$ 方法，執行即時PCR資料之分析。關於此分析，在各輪操作中包括來自單

一複本校準劑之基因組DNA樣品及已知2個複本檢查。確定T₁基因轉殖芥菜屬植物之水解探針篩選的複本數結果。

【0238】 表1. 關於*dsm-2*、AtUbi10及內部參考基因(*TAFII15*)之水解探針分析的引子及探針資訊.

引子名稱	序列
DSM2A (SEQ ID NO: 29)	5' AGCCACATCCCAGTAACGA 3'
DSM2S (SEQ ID NO: 30)	5' CCTCCCTCTTTGACGCC 3'
DSM2 Cy5 探針 (SEQ ID NO: 31)	5' CAGCCCAATGAGGCATCAGC 3'
AtUbi10v2Set5-F (SEQ ID NO: 32)	5' CTTCACCGCCTTAGCTTTCT 3'
AtUbi10v2Set5-R (SEQ ID NO: 33)	5' GTGAAGAAGAAGCTTTGGGTATTG 3'
AtUbi10v2Set5-FAM (SEQ ID NO: 34)	5' CGTGACCTAGTCGTCCTCGTCTTT 3'
TAFFY-HEX 探針 (SEQ ID NO: 35)	5' AGAGAAGTTTCGACGGATTTCGGG C 3'
TAFII15-F (SEQ ID NO: 36)	5' GAGGATTAGGGTTTCAACGGAG 3'
TAFII15-R (SEQ ID NO: 37)	5' GAGAATTGAGCTGAGACGAGG 3'

【0239】 進行西方墨點法以偵測自基因轉殖阿拉伯芥植物獲得之葉片樣品中表現的DGT-28蛋白質。採用Invitrogen™裝置及基本試劑，使用習知電泳及墨點法。Gallagher S, Winston S, Fuller S, Hurrell J, 「Immunoblotting and Immunodetection」 Current Protocols in Immunology 8.10.1 - 8.10.28, 2008年11月。表現DGT-28蛋白質之陽性基因轉殖事件使用兔抗DGT-28抗體作為初級抗體，用抗兔螢光(Cy3)偵測系統偵測。經由西方墨點法，完整DGT-28蛋白質之產生表明，所分析之基因轉殖植物以適當的分子量表現DGT-28蛋白

質。觀察到西方墨點圖含有兩個不同分子量之蛋白質條帶。假設兩個條帶由第一較低分子量經加工DGT-28蛋白質及第二較大全長TraP::DGT-28蛋白質組成，第一蛋白質由葉綠體輸送胜肽自*dgt-28*轉殖基因裂解產生，第二蛋白質未經加工且不會導致葉綠體輸送胜肽序列裂解。

【0240】 使用ELISA分析確認使用西方墨點法鑑別之基因轉殖事件，且qPCR分析表現轉殖基因。收集直徑6 mm之兩個葉片樣品且將其置放於96孔簇管架中。隨後，向各管中添加兩個Daisy™鋼BB及200 µl提取緩衝液(50 mM HEPES、5.97 g/500 ml，緩衝液pH 7.5，含1% Brij™ 0.5 g/500 ml、蛋白酶抑制劑5 µl/ml)。在Klecko™組織磨碎器中在最大設置下研磨樣品3分鐘。使樣品在3,000×g下離心5分鐘且將100 µl上清液轉移至空試樣管中。向植物樣品中添加另100 µl提取緩衝液且再珠磨3分鐘，離心且將100 µl此提取液與第一個100 µl溶液合併。在收集當天混合且分析經合併之上清液。

【0241】 產生單株抗體進行ELISA分析。將捕捉抗體純系SW4-8F11於PBS中以2 µg/ml塗於maxisorp盤上，且在4℃下培育隔夜。隨後用四孔體積之緩衝液PBS (10×儲備液)、Tween®-20洗滌培養盤。在室溫下，用200 µl/孔PBS (10×儲備液)、Tween®-20及2%魚膠阻斷ELISA盤兩小時。用四孔體積之緩衝液PBS (10×儲備液)及Tween®-20洗滌培養盤。如上所述製備樣品且在以下緩衝液中，稀釋2倍至0.94 ng/ml，以60 ng/ml標準曲線施用：

50 mM HEPES，5.97 g/500 ml，緩衝液pH 7.5，含1% Brij™、0.5 g/500 ml、蛋白酶抑制劑5 µl/ml。在室溫下在震盪下，以100 µl/孔添加樣品及標準品，持續兩小時。隨後用四孔體積之緩衝液PBS (10×儲備液)及Tween®-20洗滌培養盤。以100 µl/孔以1 µg/ml之濃度向各孔添加結合至過氧化酶之偵測抗體純系SW4-18F5且在室溫下培育一小時。用四孔體積之緩衝液PBS (10×儲備液)及Tween®-20洗滌培養盤。以100 µl/孔添加TMB™ (Pierce)受質且培育約10分鐘或直至產生適當顏色。用100 µl/孔之0.4 M H₂SO₄終止顯色。使用Softmax™軟體，在450 nm下讀取培養盤。自單一複本T₁事件獲得之所得ELISA資料展現77 ng/cm²之平均DGT-28蛋白表現，且標準差為±33 ng/cm²。

【0242】 草甘膦耐受性：

【0243】 使用固殺草挑選方案，首先自未轉型種子背景中挑選出芥菜屬T₁轉型體(源自以pDAB114286或pDAB114287轉型)。各T₁構築體分析三個淺盤或50,000顆種子。對所選T₁植物進行分子表徵(如上所述)且用市售草甘膦以各種比例噴灑具有一系列複本數之事件。

【0244】 用草甘膦以不同比例噴灑含有*dgt-28*轉殖基因之基因轉殖T₁芥菜屬植物。在此研究中應用升高之比例以測定相對抗性程度(420、840、1,680或3,360 g ae/ha)。草甘膦之典型的1×田地使用率為1120 g ae/ha。此等植物之反應按照處理後2週(2 WAT)之視覺上損傷百

分比表示。此研究中所用之T₁芥菜屬植物的*dgt-28*轉殖基因之複本數不同。低複本數*dgt-28* T₁芥菜屬植物進行自花授粉且用於產生T₂植物。表2顯示*dgt-28*基因轉殖植物與野生型(非基因轉殖)對照之對比。

【0245】 所呈現之資料顯示個別植物展現微或無損傷(<20%)、中度損傷(20-40%)或嚴重損傷(>40%)。呈現用於芥菜屬轉型之各構築體的算術平均值及標準差。亦在最後一行中指出針對各比例及轉型的個體反應範圍。野生型、非轉型阿拉伯芥c.v. Columbia充當對草甘膦敏感之對照。

【0246】 植物對草甘膦施用之反應程度不同。此差異可歸因於以下事實：各植物代表一獨立轉型事件，且因此感興趣基因之複本數因植物而不同。然而，資料表明，與TraP26及TraP27之葉綠體輸送肽序列連接之*dgt-28*提供抗草甘膦保護。

【0247】 表2. *dgt-28*轉型T₁芥菜屬對出苗後以一系列比例施用草甘膦之反應，與非轉型對照進行比較。在施用草甘膦之後14天記錄視覺上損傷百分比。

TraP26:: <i>dgt-28</i> (pDAB114286)	損傷範圍%(無複製)			損傷分析%		
	<20 %	20-40 %	>40 %	平均值	標準差	範圍 (%)
施用量						
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	10.0	0.0	10
3360 g ae/ha草甘膦	3	1	0	16.3	2.5	15-20
TraP27:: <i>dgt-28</i> (pDAB114287)	損傷範圍%(無複製)			損傷分析%		
	<20 %	20-40 %	>40 %	平均值	標準差	範圍 (%)

施用量	<20 %	20-40 %	>40 %	平均值	標準差	範圍 (%)
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	19.0	8.2	10-30
840 g ae/ha草甘膦	3	1	0	15.8	4.3	10-20
1680 g ae/ha草甘膦	1	3	0	18.8	2.5	15-20
3360 g ae/ha草甘膦	0	4	0	25.0	0.0	25
WT (非轉型對照)	損傷範圍%(無複製)			損傷分析%		
施用量	<20 %	20-40 %	>40 %	平均值	標準差	範圍 (%)
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

【序列表】

<110> 陶氏農業科學公司

<120> 葉綠體輸送胜肽

<130> 69716-US-PSP

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 72

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TraP10

<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 Arg Pro Arg Leu Trp Gly Ala Ser Lys Ser Arg Ile Pro
35 40 45
Met His Lys Asn Gly Ser Phe Met Gly Asn Phe Asn Val Gly Lys Gly
50 55 60
Asn Ser Gly Val Phe Lys Val Ser
65 70

<210> 2

<211> 68

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TraP11

<400> 2

Met Ala Gln Val Ser Arg Val His Asn Leu Ala Gln Ser Thr Gln Ile
1 5 10 15
Phe Gly His Ser Ser Asn Ser Asn Lys Leu Lys Ser Val Asn Ser Val
20 25 30
Ser Leu Lys Thr His Gln Pro Arg Ala Ser Ser Trp Gly Leu Lys Lys
35 40 45

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

Ala Ser Val Ser
65

<210> 3
<211> 66
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP17

<400> 3

Met Ala Gln Val Asn Asn Met Met Gln Gly Leu Arg Leu Ser Pro Ser
1 5 10 15

Asn Leu Ser Lys Pro Gln Thr Pro Leu Pro Ser His Ser Leu Leu Leu
20 25 30

Gly Ser Asn Ser Leu Lys Asn Ser Val Ser Ala Ser Ser Val Ala Pro
35 40 45

Ala Pro Ala Cys Ser Ala Pro Ala Gly Ala Gly Arg Arg Ala Val Val
50 55 60

Val Arg
65

<210> 4
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP18

<400> 4

Met Ala Ala Thr Met Ala Ser Asn Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser
1 5 10 15

Leu Asp Gln Ala Val Ala Ala Ser Ala Ala Phe Ser Ser Lys Thr Leu
20 25 30

Asn Phe Gly Ser Asn Leu Arg Ile Ser Pro Lys Phe Met Ser Leu Thr
35 40 45

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

Ser Val Ala
65

<210> 5
<211> 67
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TraP19

<400> 5

Met Ala Gln Ala Thr Thr Ile Asn Asn Gly Val His Thr Gly Gln Leu
1 5 10 15
His His Thr Leu Pro Lys Thr Gln Leu Pro Lys Ser Ser Lys Val Asn
20 25 30
Asp Val Val Pro His Val Tyr Ser Ala Pro Leu Ser Val Ala Arg Arg
35 40 45
Ser Cys Ser Lys Ser Ser Ile Arg Ser Thr Arg Arg Leu Gln Thr Thr
50 55 60
Val Cys Ser
65

<210> 6

<211> 60

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TraP26

<400> 6

Met Ala Gln Val Ser Met Ile Pro Asn Ala Ile Gln Ala Pro Cys Ser
1 5 10 15
Ile Ser Leu Ser Lys Ser Gln Ala Gly Lys Ser Val Arg Lys Val Ser
20 25 30
Leu Lys Pro Asn Gln His Ala Ala Trp Gly Leu Arg Arg Ser Gly Met
35 40 45
Arg Val Gly Asn Pro Glu Val Val Val Ser Ala Ser
50 55 60

<210> 7

<211> 61

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TraP27

<400> 7

Met Ala Thr Phe Thr Arg Val Cys His Thr Ala Arg Lys Ser Phe Val
1 5 10 15
Ser Leu Ser Asn Ser Gln Ala Asn Ser Pro Val Ser Val Arg Phe Leu
20 25 30

Ser Leu Pro Met Pro Ala Ala Arg Pro Ala Val Lys Ser Gly Val Arg
35 40 45

Leu Trp Gly Cys Arg Leu Ser Phe Lys Val Ser Ala Ser
50 55 60

<210> 8
<211> 60
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP28

<400> 8

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

Val Ser Pro Asn Leu Ser Lys Thr Arg Ala Ser Lys Ser Val Tyr Ser
20 25 30

Val Leu Gly Thr Arg Leu Asn Ser Ser Ala Arg Gly Lys Lys Ser Ala
35 40 45

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

<210> 9
<211> 217
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP10 聚核苷酸

<400> 9
atggctcaat cttctaggat ttgccacggt gticaaaacc ctigcgtgat catctctaac 60
ctttccaagt ccaaccagaa caagtctcct ttcagcgttt ctcttagacc tagactttgg 120
ggagcttcta agtctaggat ccctatgcat aagaacggat ccttcattggg aaacttcaat 180
gtgggaaagg gaaactctgg tgttttcaag gtttccg 217

<210> 10
<211> 204
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP11 聚核苷酸

<400> 10
atggctcaag tttctagggt tcacaacctt gctcagtcta ctgagatttt cggacactct 60

tccaactcta acaagctcaa gtctgttaac tctgtgtctc ttaagactca tcaacctagg 120
gcttcattctt ggggacttaa gaaatccgga accatgctta acggatctgt tatcaggcct 180
gttaaggtta ccgcttctgt gtct 204

<210> 11
<211> 198
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP17 聚核苷酸

<400> 11
atggctcaag ttaacaacat gatgcaaggg ttgagacttt caccctctaa ctgttccaaa 60
ccgcagactc cgctcccttc tcactctctg ctgcttgga gcaatagcct caagaactct 120
gtctccgcat catccgttgc tccagctcct gccgttagcg caccagctgg tgccggaagg 180
agggctgtgg tcgtgaga 198

<210> 12
<211> 201
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP18 聚核苷酸

<400> 12
atggctgcca ctatggcctc aaacgcagca gcagctgctg ctgtgagctt ggaccaagct 60
gttgccgcat ctgctgcctt cagctccaaa acacttaact ttggctccaa tctccgtatc 120
agcccaaagt ttatgagcct gactaacaag agagtgggtg gacagtcatc tatagttcct 180
aagattcaag cctcagtcgc a 201

<210> 13
<211> 201
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP19 聚核苷酸

<400> 13
atggcacaag ctacaacgat caacaatggt gtccacaccg gacaactgca tcatacactt 60
ccaaagacgc agctcccgaa atcttctaag gtgaacgacg ttgtgcctca cgtctactcc 120
gctcccctta gcgttgcaag gaggtcatgc agcaaatcca gcataagatc cactagacgt 180
ctccagacca ctgtttgttc a 201

<210> 14
<211> 180
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP26 聚核苷酸

<400> 14
atggcacaag tctccatgat acctaattgct attcaagcac cgtgctcaat ctccctgagc 60
aagtcccaag ctggaaagtc tgttcgcaag gtgtctctca aacctaatca gcacgcagct 120
tggggtttgc gtaggtctgg catgagggtg gggaacccag aggtggtcgt ttcagccagc 180

<210> 15
<211> 183
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP27 聚核苷酸

<400> 15
atggctacgt ttaccagagt gtgccacaca gcaaggaaat ccttcgtttc actttcaaac 60
tctcaagcca attctctctgt gagcgttagg tttctgtcct tgcccatgcc agcagccaga 120
ccagctgtca agagcggagt gcgtctcttg ggttgtcgt tgtccttcaa ggtctcagct 180
tct 183

<210> 16
<211> 180
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP28 聚核苷酸

<400> 16
atggcagtc agtctaacat gatctgcgt ggtgtggcta acccgttcgt gtccccaac 60
cttagcaaaa caagggttc aaagtccgtc tacagcgttc tcgggactag actcaattca 120
tccgcaagag gcaagaagtc tgccatgcct ctgattggaa atcgtgttcc cgtctctgcc 180

<210> 17
<211> 9
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 17
gcttcttct

9

<210> 18
<211> 204
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> TraP11 聚核苷酸

<400> 18
atggctcaag tttctaggg ttcacaacctt gctcagtcta ctcagatttt cggacactct 60
tccaactcta acaagctcaa gtctgttaac tctgtgagtc ttaagactca tcaaccgagg 120
gcttcactctt ggggacttaa gaaatccgga accatgctta acggatcagt tatcagacct 180
gtgaaagtta ccgcttctgt gtct 204

<210> 19
<211> 1902
<212> DNA
<213> 蘇雲金芽孢桿菌

<400> 19
atgaacaacg ttctcaactc tgggagaacc accatctgcg acgcgtacaa tgtggtggca 60
cacgacccat tctcatttga gcacaagagc ctggatacga tccagaaaga gtggatggaa 120
tggaaaagga cggaccattc cttgtacgtt gctccagtgg tgggcactgt gtccctcgttc 180
ctcctcaaga aagtggggtc gctgatcggg aagcggatac tctccgaact ctggggaatc 240
atctttccgt ctggctcaac aaacttgatg caagacatac tgagagagac tgagcagttc 300
ttgaatcaga ggctgaatac ggacacgctg gcgagggtga acgctgaact cattggcctc 360
caagcgaaca ttagagagtt caatcagcaa gttgataact ttctgaaccc cacacagaat 420
ccagtgcctc tgtccatcac atcatctgtg aacacaatgc agcagctgtt ctigaatagg 480
ctgccacagt tttagattca aggctatcaa ctgcttcttc tgcctctgtt tgctcaagct 540
gcgaacatgc acctcagctt catcagagac gtgattctga acgcagatga gtggggaatc 600
agcgctgcc ctttgaggac ctacagagat tacttgagga actatacacg cgattactca 660
aactactgca tcaacacctt tcaaacagcg tttaggggac ttaacaccag actgcaogac 720
atgcttgagt tccggactta catgttctc aacgtctttg agtatgtctc gatttgggtc 780
ctcttcaagt atcagagcct tatggctctc tctggtgcta acctctacgc ctcggttcc 840
ggaccgcagc agaccagtc attcactgcc cagaactggc cattcctcta cagccttttc 900
caagtgaaca gcaactacat cttgtctggc atctctggca caaggctctc tatcacattt 960

ccgaacattg gtggcctgcc tggctccacg acgacacaca gcctcaattc cgcacgcgtc 1020
aactactcgg gtgggggtctc ctccggactc attggtgcc aactattgaa ccataacttc 1080
aactgttcaa cgggtgctgcc acccctttca actccgtttg tcagatcgtg gcttgattct 1140
ggcactgaca gagagggagt tgccacgagc accaactggc agaccgagtc ctccagacc 1200
acactttcgc tgcgctgcgg tgcctttctca gcgaggggaa actcgaacta ctcccagac 1260
tacttcatac gcaacattag cggagtcccg ttggtgatcc ggaatgagga cctcaccaga 1320
cctcttcact acaatcagat acgcaacatc gaaagcccat ctgggacacc tggaggtgca 1380
agggcatact tggttagcgt tcacaaccgg aagaacaaca tctatgctgc taatgagaat 1440
gggaccatga ttcattttgc accggaagat tacactggct tcacgatctc acccatccat 1500
gccaccaag tgaacaacca gactcgcacg ttcattctcag agaagttcgg caaccaaggt 1560
gacagcctcc gcttcgaaca gagcaacacc acagccagat acacccttag aggcaatggc 1620
aacagctaca atctctatct gaggggtgtct agcattggca attcgaccat tcgggtgacg 1680
atcaatggtc gcgtttacac ggtctccaac gtcaatacga ccactaacia tgatggggtc 1740
aatgacaatg gtgctcgctt ctccgacatc aacatcggca acatcgctgc ttccgacaac 1800
accaatgtta cgctggacat caatgtcacc ttgaactctg gcacaccttt cgatctgatg 1860
aacatcatgt ttgtccccac caatcttctt cccctctact ga 1902

<210> 20
<211> 69
<212> PRT
<213> 西洋油菜

<400> 20

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
Thr Ala Ser Val Ser
65

<210> 21

<211> 71
<212> PRT
<213> 大豆

<400> 21

Met Ala Gln Val Ser Arg Val His Asn Leu Ala Gln Ser Thr Gln Ile
1 5 10 15
Phe Gly His Ser Ser Asn Ser Asn Lys Leu Lys Ser Val Asn Ser Val
20 25 30
Ser Leu Arg Pro Arg Leu Trp Gly Ala Ser Lys Ser Arg Ile Pro Met
35 40 45
His Lys Asn Gly Ser Phe Met Gly Asn Phe Asn Val Gly Lys Gly Asn
50 55 60
Ser Gly Val Phe Lys Val Ser
65 70

<210> 22
<211> 65
<212> PRT
<213> 濱旋花屬

<400> 22

Met Ala Gln Val Asn Asn Met Met Gln Gly Leu Arg Leu Ser Pro Ser
1 5 10 15
Asn Leu Ser Lys Pro Gln Thr Pro Leu Pro Ser His Ser Leu Leu Leu
20 25 30
Gly Ser Asn Ser Leu Lys Asn Ser Ser Val Ser Val Lys Phe Phe Lys
35 40 45
Thr Gly Lys Asp Ser Ile Phe Thr Ala Ala Arg Ser Pro Leu Lys Val
50 55 60
Arg
65

<210> 23
<211> 61
<212> PRT
<213> 萊茵衣藻

<400> 23

Met Gln Leu Leu Asn Gln Arg Gln Ala Leu Arg Leu Gly Arg Ser Ser
1 5 10 15
Ala Ser Lys Asn Gln Gln Val Ala Pro Leu Ala Ser Arg Pro Ala Ser
20 25 30
Ser Leu Ser Val Ser Ala Ser Ser Val Ala Pro Ala Pro Ala Cys Ser
35 40 45

Ala Pro Ala Gly Ala Gly Arg Arg Ala Val Val Val Arg
50 55 60

<210> 24
<211> 58
<212> PRT
<213> 水稻

<400> 24

Met Ala Ala Thr Met Ala Ser Asn Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser
1 5 10 15
Leu Asp Gln Ala Val Ala Ala Ser Ala Ala Phe Ser Ser Arg Lys Gln
20 25 30
Leu Arg Leu Pro Ala Ala Ala Arg Gly Gly Met Arg Val Arg Val Arg
35 40 45
Ala Arg Gly Arg Arg Glu Ala Val Val Val
50 55

<210> 25
<211> 67
<212> PRT
<213> 莧屬

<400> 25

Met Ala Gln Ala Thr Thr Ile Asn Asn Gly Val His Thr Gly Gln Leu
1 5 10 15
His His Thr Leu Pro Lys Thr Gln Leu Pro Lys Ser Ser Lys Thr Leu
20 25 30
Asn Phe Gly Ser Asn Leu Arg Ile Ser Pro Lys Phe Met Ser Leu Thr
35 40 45
Asn Lys Arg Val Gly Gly Gln Ser Ser Ile Val Pro Lys Ile Gln Ala
50 55 60
Ser Val Ala
65

<210> 26
<211> 71
<212> PRT
<213> 鹽生杜氏藻

<400> 26

Met Leu Ala Arg Gln Gly Gly Ser Leu Arg Ala Ser Gln Cys Asn Ala
1 5 10 15
Gly Leu Ala Arg Arg Val Glu Val Gly Ala Leu Val Val Pro Arg Pro
20 25 30

Ile Ser Val Asn Asp Val Val Pro His Val Tyr Ser Ala Pro Leu Ser
35 40 45
Val Ala Arg Arg Ser Cys Ser Lys Ser Ser Ile Arg Ser Thr Arg Arg
50 55 60
Leu Gln Thr Thr Val Cys Ser
65 70

<210> 27
<211> 1428
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Trap26 DGT28 融合編碼序列

<400> 27
atggcacaag tctccatgat acctaattgct attcaagcac cgtgctcaat ctccctgagc 60
aagtcccaag ctggaaagtc tgttcgcaag gtgtctctca aacctaatca gcacgcagct 120
tggggtttgc gtaggtctgg catgaggggtg gggaaccag aggtggctgt ttcagccagc 180
gcaagaggga tgccagcctt gtcctttacct ggatcaaaga gtatcacagc tagggcactc 240
tttcttgctg ctgctgctga tggggttact acttttggtga ggccattgag aagtgacgac 300
acagaaggat tcgctgaggg gttagtctgt ttaggctatc gtgtaggag gacacccgat 360
acttggcaag tcgatggcag accacaagga ccagcagtgg ctgaggctga cgtctactgt 420
agagacggag caaccaccgc tagattcttg ccaaccttag cagctgctgg tcacggaaca 480
tacagatttg atgcttcacc acagatgagg agacgtcctc ttttgccctt aagcagagcc 540
ttgagggatt tgggtgtcga tcttagacac gaagaagctg aaggtcatca ccctctgact 600
gtccgtgctg ctggggttga aggaggagag gttactttgg atgctgggtc gtcaagtcag 660
tatctcactg ccttgttgct ccttgggtccc cttacaagac aaggactgag gataagggtt 720
actgatttgg tgtcagcacc atacgtggag attacgcttg caatgatgag ggctttcgga 780
gttgaagtgg caagggaggg agatgtgttc gttgttccac ctggtggata tcgtgcaact 840
acgtatgcta tagaaccgga cgcaagtact gcttcttact tcttcgcagc tgctgctttg 900
actcctggag ctgaagtgac tgtacctggg ttaggcacgg gagcacttca aggagatttg 960
ggatttgtag atgtcttaag gagaatggga gccgaggtgt ccgtaggagc tgatgcaacc 1020
actgttagag gaactggtga attgcgtggc cttacagcca acatgagaga cataagtgat 1080
acgatgccga ccctcgctgc aatagcacc tttgctagtg ctccagttag aatcgaggat 1140
gttgccaaca ctcggtgtcaa agaattgtgac agacttgagg cttgtgcaga gaaccttagg 1200

aggttgggag taagggttgc aacgggtccg gactggattg agatacaccc tgggtccagct 1260
actggtgctc aagtcacaag ctatggtgat cacagaattg tgatgtcatt tgcagtgact 1320
ggacttcgtg tgcctgggat cagcttcgac gaccctggct gtgttcgtaa gacttttcct 1380
gggtttcacg aggctttcgc agaattgagg cgtggcattg ggagctga 1428

<210> 28
<211> 1431
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Trap27 DGT28 融合編碼序列

<400> 28
atggctacgt ttaccagagt gtgccacaca gcaaggaaat ccttcgtttc actttcaaac 60
tctcaagcca attctcctgt gagcgtagg tttctgtcct tgcccatgcc agcagccaga 120
ccagctgtca agagcggagt gcgtctctgg ggttgtcgt tgtccttcaa ggtctcagct 180
tctgcaagag ggatgccagc cttgtcttta cctggatcaa agagtatcac agctagggca 240
ctctttcttg ctgctgctgc tgatgggggt actactttgg tgaggccatt gagaagtgac 300
gacacagaag gattcgtcga ggggttagtt cgtttaggct atcgtgtagg gaggacaccc 360
gatacttggc aagtcgatgg cagaccacaa ggaccagcag tggctgaggc tgacgtctac 420
tgtagagacg gagcaaccac cgctagattc ttgccaacct tagcagctgc tggtcacgga 480
acatacagat ttgatgcttc accacagatg aggagacgtc ctcttttgcc ctttaagcaga 540
gccttgaggg atttgggtgt cgatcttaga cacgaagaag ctgaaggtea tcaccctctg 600
actgtccgtg ctgctgggggt tgaaggagga gaggttactt tggatgctgg tcagtcaagt 660
cagtatctca ctgccttggt gctccttggc ccccttacia gacaaggact gaggataagg 720
gttactgatt tgggtgtcagc accatacgtg gagattacgc ttgcaatgat gagggctttc 780
ggagtgaag tggcaaggga gggagatgtg ttcgttggtc cacctgggtg atatcgtgca 840
actacgtatg ctatagaacc cgacgcaagt actgcttctt acttcttcgc agctgctgct 900
ttgactcctg gagctgaagt gactgtacct gggttaggca cgggagcact tcaaggagat 960
ttgggatttg tagatgtctt aaggagaatg ggagccgagg tgtccgtagg agctgatgca 1020
accactgtta gaggaactgg tgaattgcgt ggcccttacag ccaacatgag agacataagt 1080
gatacgtatg cgaccctcgc tgcaatagca ccccttgcta gtgctccagt tagaatcgag 1140
gatgttgcca acactcgtgt caaagaatgt gacagacttg aggcctgtgc agagaacctt 1200
aggaggttgg gagtaagggt tgcaacgggt ccggactgga ttgagatata ccctgggtcca 1260

gctactggtg ctcaagtcac aagctatggt gatcacagaa ttgtgatgtc atttgcagtg 1320
actggacttc gtgtgcctgg gatcagcttc gacgaccctg gctgtgttcg taagactttt 1380
cctgggtttc acgaggcttt cgcagaattg aggcgtggca ttgggagctg a 1431

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 29
agccacatcc cagtaacga 19

<210> 30
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 30
cctccctctt tgacgcc 17

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 31
cagcccaatg aggcatcagc 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 32
cttcaccgcc ttagctttct 20

<210> 33
<211> 24
<212> DNA

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	33	
	gtgaagaaga agctttgggt attg	24
<210>	34	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	34	
	cgtgacctag tcgtcctcgt cttt	24
<210>	35	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	35	
	agagaagttt cgacggattt cgggc	25
<210>	36	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	36	
	gaggattagg gtttcaacgg ag	22
<210>	37	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引子	
<400>	37	
	gagaattgag ctgagacgag g	21

【發明申請專利範圍】

- 【第1項】 一種嵌合核酸分子，其包含：
- 編碼長度小於73個胺基酸之一胜肽的一核苷酸序列，其中該胜肽與SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2及SEQ ID NO: 6中之一者至少80%一致，可操作地同框(in frame)連接於感興趣之一核苷酸編碼序列。
- 【第2項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中該胜肽與SEQ ID NO: 1至少95%一致。
- 【第3項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中該胜肽與SEQ ID NO: 2至少95%一致。
- 【第4項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中該胜肽與SEQ ID NO: 6至少95%一致。
- 【第5項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中該胜肽為SEQ ID NO: 1。
- 【第6項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中該胜肽為SEQ ID NO: 2。
- 【第7項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中該胜肽為SEQ ID NO: 6。
- 【第8項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中該感興趣之核苷酸編碼序列為一*dsm-2*編碼序列、一*dgt-28*編碼序列、一Bt毒素基因編碼序列、一*yfp*編碼序列或一*gfp*編碼序列。
- 【第9項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中編碼該胜肽之該核苷酸序列可與SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10及SEQ ID NO: 14中之一者特異性雜交。
- 【第10項】 如請求項1之嵌合核酸分子，其中該核苷酸序列可操作地連接於一或多個調控序列。
- 【第11項】 一種由如請求項1之核酸分子所編碼的多胜肽。
- 【第12項】 如請求項11之多胜肽，其中該多胜肽係被靶向至在一含有色素體的細胞中之一色素體。
- 【第13項】 如請求項12之多胜肽，其中該多胜肽包含一葉綠體輸送胜

肽，當該多胜肽被靶向至該色素體時，該葉綠體輸送胜肽被移除。

【第14項】如請求項13之多胜肽，其中該多胜肽包含一葉綠體靶向胜肽，當該葉綠體輸送胜肽被移除時，該葉綠體靶向胜肽仍存留，其中該葉綠體靶向胜肽係由該感興趣之核苷酸編碼序列所編碼。

【第15項】如請求項11之多胜肽，其中該感興趣之核苷酸編碼序列編碼一生物學活性胜肽。

【第16項】如請求項11之多胜肽，其中該感興趣之核苷酸編碼序列編碼一螢光胜肽。

【第17項】如請求項15之多胜肽，其中該生物學活性胜肽為一酶。

【第18項】如請求項15之多胜肽，其中該生物學活性胜肽通常在一細胞之一色素體中表現，其中該胜肽係天然地表現。

【第19項】如請求項15之多胜肽，其中該生物學活性胜肽涉及選自於由下列所組成之群組的一過程：除草劑抗性、病毒抗性、細菌性病原體抗性、昆蟲抗性、線蟲抗性、真菌抗性、植物生命力、植物產率、溫度耐受性、土壤條件耐受性、低光量耐受性、低水量耐受性、高水量耐受性、化學環境耐受性、種子顏色、澱粉修飾、胺基酸合成、光合作用、脂肪酸合成、油合成、類胡蘿蔔素合成、萜類合成、澱粉合成及除草劑抗性。

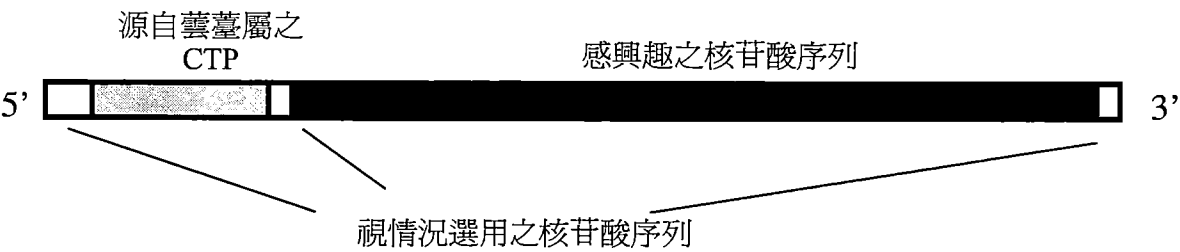
【第20項】如請求項15之多胜肽，其中該生物學活性胜肽係選自於由下列所組成之群組：玉米黃素環氧酶、膽鹼單加氧酶、亞鐵螯合酶、 ω -3脂肪酸去飽和酶、麩醯胺酸合成酶、原維生素A、激素、Bt毒素蛋白及適用於鑑別包含一感興趣特徵的植物的標記物。

【第21項】如請求項19之多胜肽，其中該生物學活性胜肽涉及除草劑抗性。

- 【第22項】如請求項21之多胜肽，其中該生物學活性胜肽係選自於由下列所組成之群組：乙醯乳酸合成酶(ALS)、突變ALS、ALS之前驅體、3-烯醇丙酮醯莽草酸-5-磷酸合成酶(EPSPS)、DGT-28 EPSPS、CP4 EPSPS、第IV類EPSPS及第III類EPSPS。
- 【第23項】如請求項19之多胜肽，其中該生物學活性胜肽涉及昆蟲抗性。
- 【第24項】一種植物表現載體，其包含如請求項10之核酸分子。
- 【第25項】一種用於製造一基因轉殖植物材料之方法，該方法包含：
獲得如請求項1之嵌合核酸分子；及
以該核酸分子轉型一植物材料。
- 【第26項】如請求項25之方法，其中該植物材料係選自於由下列所組成之群組：一植物細胞、一植物組織、一植物組織培養物、一愈傷組織培養物、一植物部分及一整株植物。
- 【第27項】如請求項26之方法，其中該植物材料非為一整株植物。
- 【第28項】如請求項26之方法，其中該植物材料為一植物細胞，其不能再生以產生一植物。
- 【第29項】一種基因轉殖植物種子之用途，該基因轉殖植物種子包含可操作地同框連接於一感興趣之核苷酸編碼序列的SEQ ID NO: 9，其特徵在於該基因轉殖植物種子係用以種植出一片抗昆蟲植物。
- 【第30項】一種基因轉殖植物種子之用途，該基因轉殖植物種子包含可操作地同框連接於一感興趣之核苷酸編碼序列的SEQ ID NO: 9，其特徵在於該基因轉殖植物種子係用以種植出一片抗除草劑植物。
- 【第31項】如請求項29或30之用途，其特徵在於該基因轉殖植物種子係來自一選自於由玉米、大豆及棉花所組成之群組的植物。

- 【第32項】一種基因轉殖植物種子之用途，該基因轉殖植物種子包含可操作地同框連接於一感興趣之核苷酸編碼序列的SEQ ID NO: 10，其特徵在於該基因轉殖植物種子係用以種植出一片抗昆蟲植物。
- 【第33項】一種基因轉殖植物種子之用途，該基因轉殖植物種子包含可操作地同框連接於一感興趣之核苷酸編碼序列的SEQ ID NO: 10，其特徵在於該基因轉殖植物種子係用以種植出一片抗除草劑植物。
- 【第34項】如請求項32或33之用途，其特徵在於該基因轉殖植物種子係來自一選自於由玉米、大豆及棉花所組成之群組的植物。
- 【第35項】一種基因轉殖植物種子之用途，該基因轉殖植物種子包含可操作地同框連接於一感興趣之核苷酸編碼序列的SEQ ID NO: 14，其特徵在於該基因轉殖植物種子係用以種植出一片抗昆蟲植物。
- 【第36項】一種基因轉殖植物種子之用途，該基因轉殖植物種子包含可操作地同框連接於一感興趣之核苷酸編碼序列的SEQ ID NO: 14，其特徵在於該基因轉殖植物種子係用以種植出一片抗除草劑植物。
- 【第37項】如請求項35或36之用途，其特徵在於該基因轉殖植物種子係來自一選自於由玉米、大豆及棉花所組成之群組的植物。

【發明圖式】



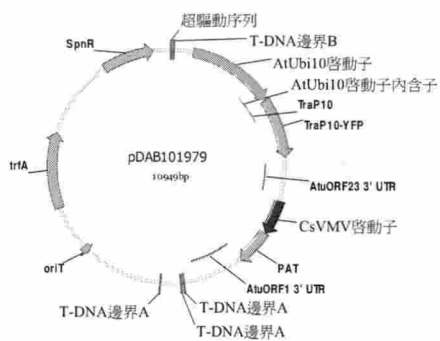
【圖1】

鹽生杜氏藻	SEQ ID NO:26	(1)	M	L	A	R	Q	G	S	L	R	A	S	C	N	A	G	L	A	R	R	V	E	G	A	L	V	V	P			
水稻	SEQ ID NO:24	(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
莧屬	SEQ IDNO:25	(1)	-	M	A	C	A	T	T	T	N	N	G	V	H	T	G	Q	L	H	H	I	L	P	K	T	Q	L	P	K	S	
萊茵衣藻	SEQ ID NO:23	(1)	-	-	M	O	L	L	N	Q	R	O	A	L	R	L	G	R	S	S	A	S	K	N	Q	Q	V	A	P	L	A	S
濱旋花屬	SEQ ID NO:22	(1)	-	M	A	C	V	N	N	M	O	G	I	R	L	S	P	S	N	L	S	K	P	Q	T	P	L	P	S	H	S	
大豆	SEQ ID NO:21	(1)	-	M	A	C	V	S	R	V	H	N	L	A	O	S	T	Q	I	F	G	H	S	-	S	N	S	N	K	L	K	S
西洋油菜	SEQ ID NO:20	(1)	-	M	A	C	S	S	R	T	C	H	G	V	O	N	P	C	V	I	I	S	N	L	S	K	S	N	Q	N	K	S

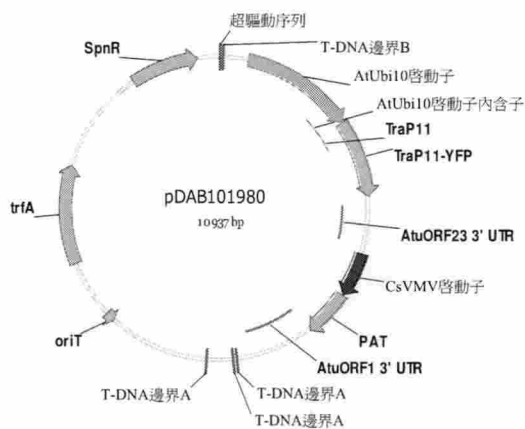
鹽生杜氏藻	SEQ ID NO:26	(31)	R	P	I	S	*	V	N	D	V	P	H	V	Y	S	A	P	L	S	V	A	R	R	S	C	S	K	S	S	I	R	
水稻	SEQ ID NO:24	(26)	A	F	S	S	*	R	K	Q	L	R	L	P	A	A	A	R	G	G	M	R	V	R	V	R	A	R	G	R	R	E	A
莧屬	SEQ IDNO:25	(30)	*	K	*	T	L	N	F	G	-	-	S	N	L	R	I	S	P	K	F	M	S	L	T	N	K	R	V	G	G	O	S
萊茵衣藻	SEQ ID NO:23	(29)	R	P	A	S	S	L	*	S	V	S	A	S	S	V	A	P	A	P	A	C	S	-	-	-	A	P	A	G	A	G	R
濱旋花屬	SEQ ID NO:22	(30)	L	L	L	G	S	N	S	I	K	N	*	S	S	V	S	V	K	F	F	K	T	G	K	D	S	I	F	T	A	R	
大豆	SEQ ID NO:21	(29)	V	N	S	V	S	L	*	R	P	R	L	W	G	A	S	K	S	R	I	P	M	H	K	N	G	S	F	M	G	N	F
西洋油菜	SEQ ID NO:20	(30)	P	F	S	V	S	L	*	K	T	H	Q	P	R	A	S	S	W	G	L	K	K	S	G	T	M	L	N	G	S	V	I

鹽生杜氏藻	SEQ ID NO:26	(61)	S	T	R	L	Q	T	T	V	C	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
水稻	SEQ ID NO:24	(56)	V	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
莧屬	SEQ IDNO:25	(58)	I	V	P	K	T	Q	A	S	M	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
萊茵衣藻	SEQ ID NO:23	(56)	R	A	V	V	M	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
濱旋花屬	SEQ ID NO:22	(60)	S	P	L	K	M	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
大豆	SEQ ID NO:21	(59)	N	V	G	K	G	N	S	G	M	F	K	V	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
西洋油菜	SEQ ID NO:20	(60)	R	P	V	K	V	I	A	S	M	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

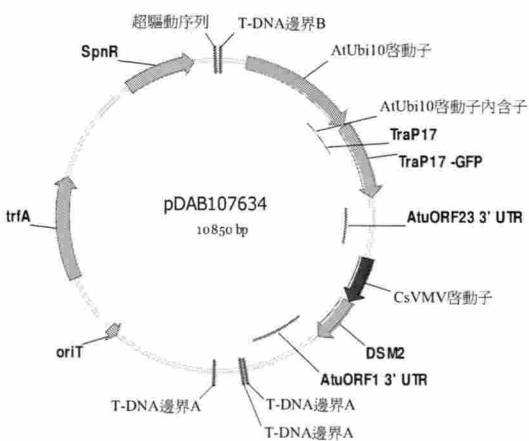
【圖2】



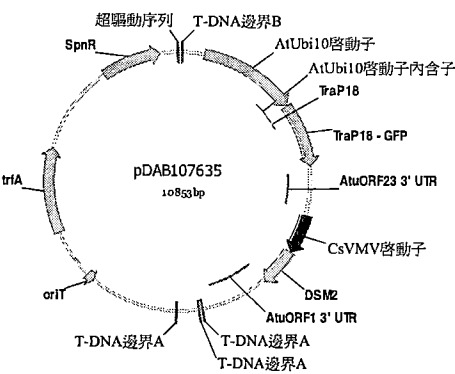
【圖3】



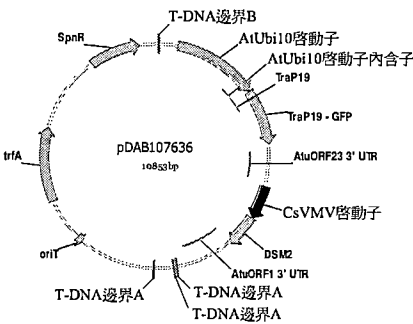
【圖4】



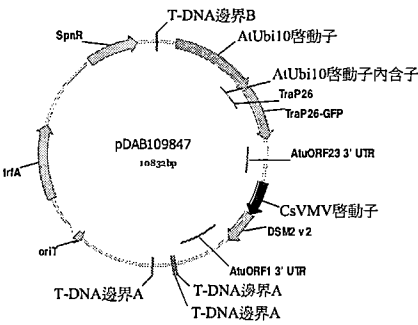
【圖5】



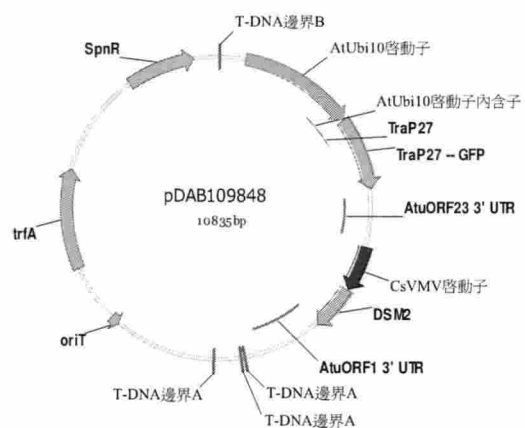
【圖6】



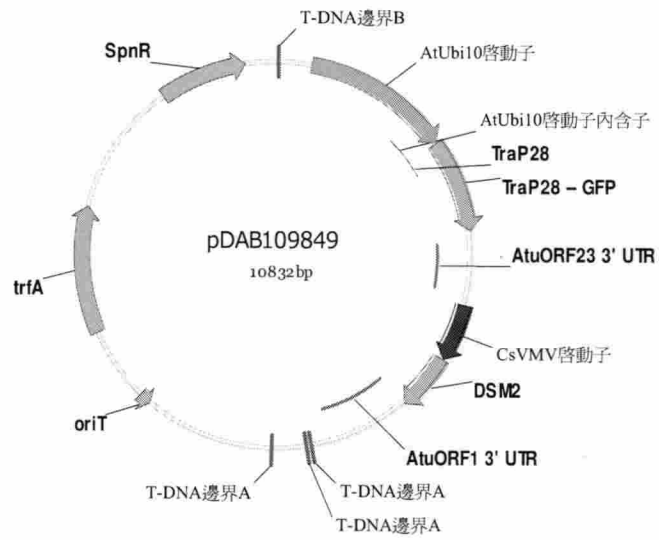
【圖7】



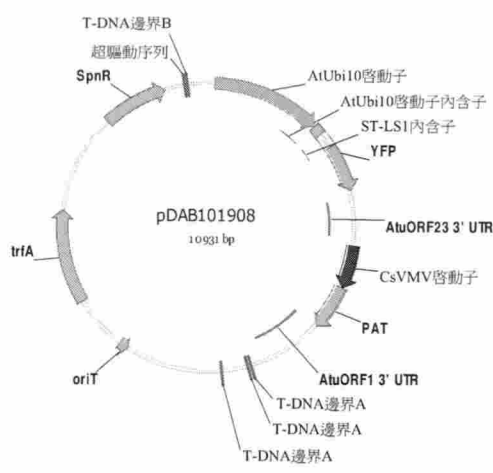
【圖8】



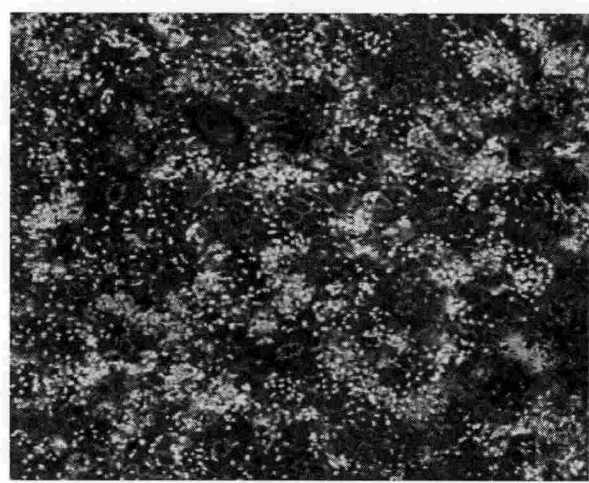
【圖9】



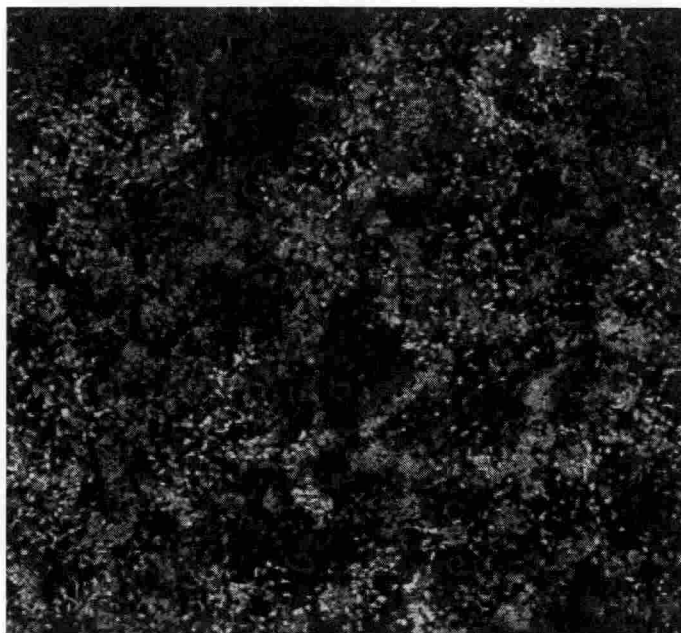
【圖10】



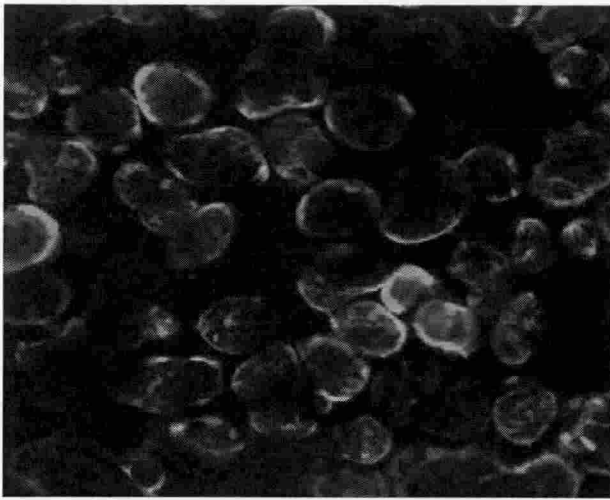
【圖11】



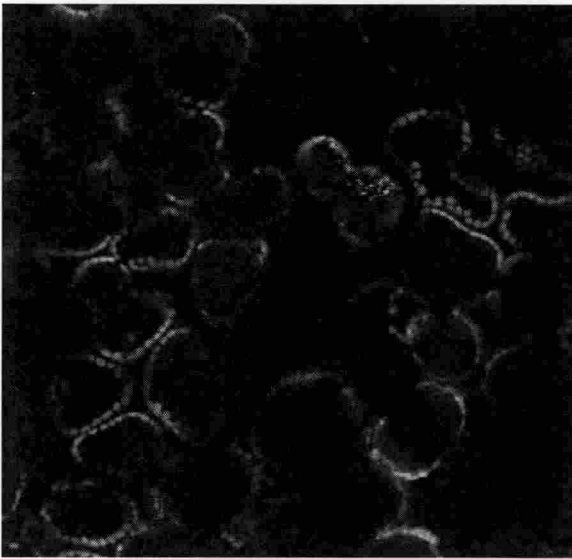
【圖12】



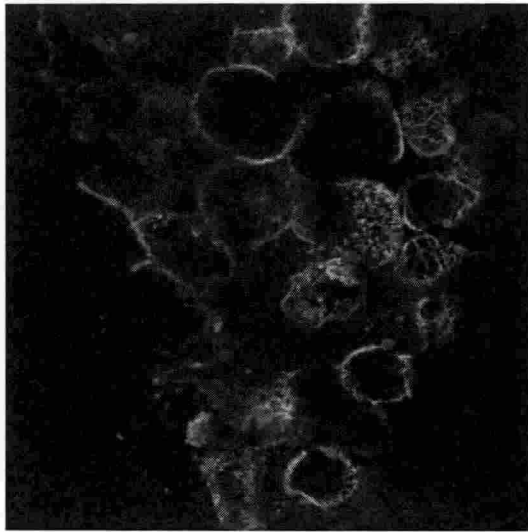
【圖13】



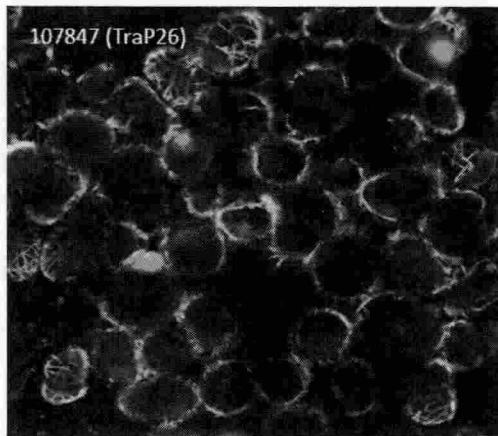
【圖14】



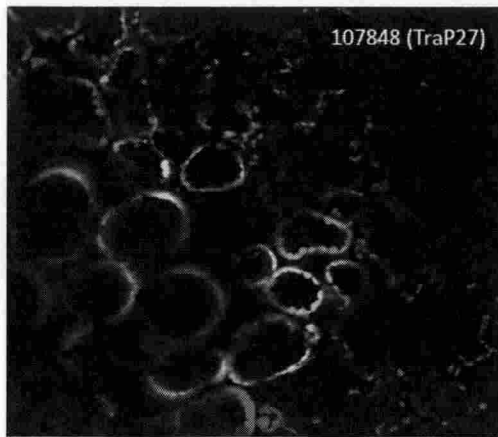
【圖15】



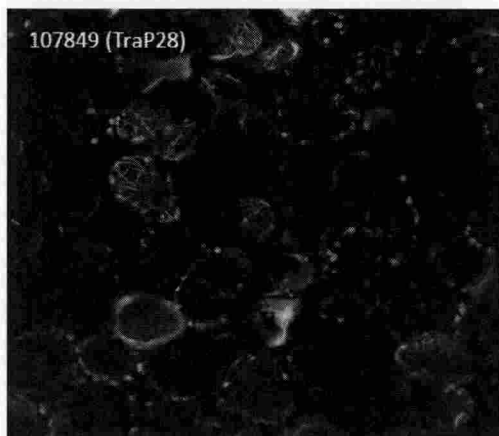
【圖16】



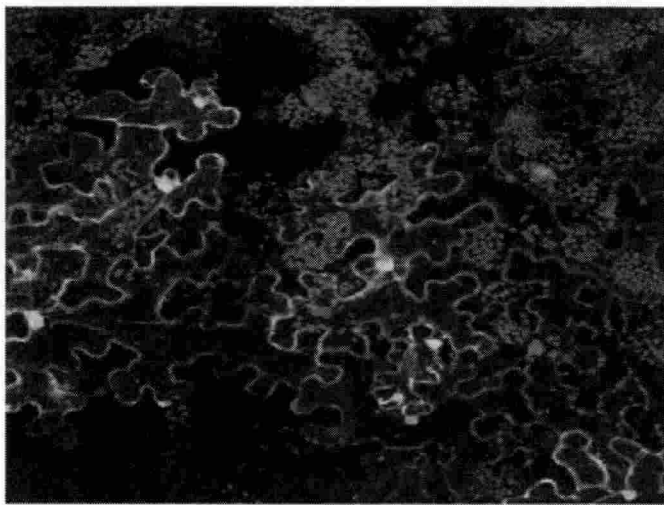
【圖17】



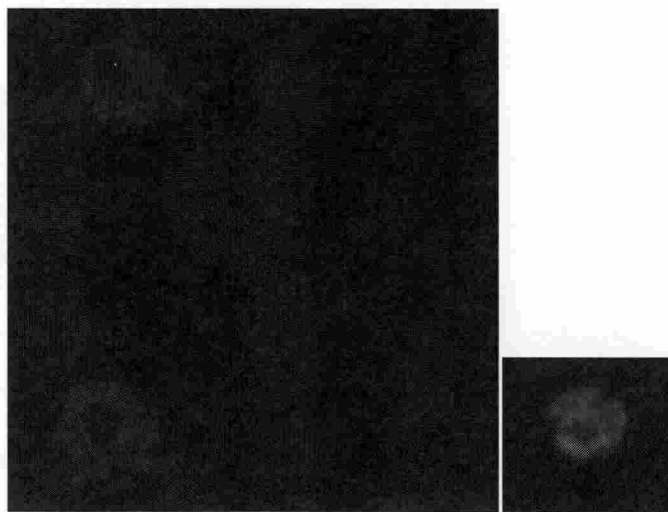
【圖18】



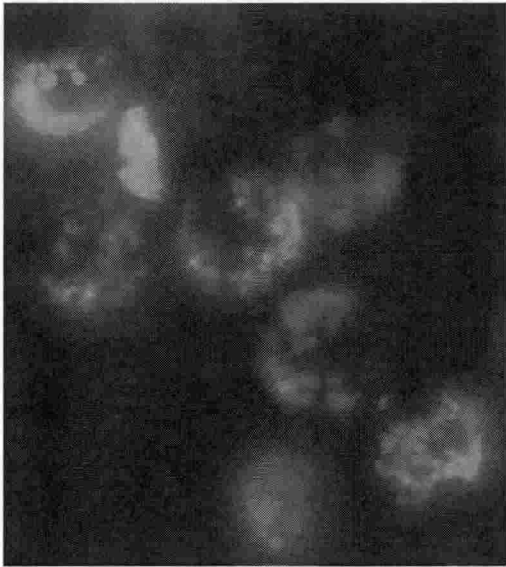
【圖19】



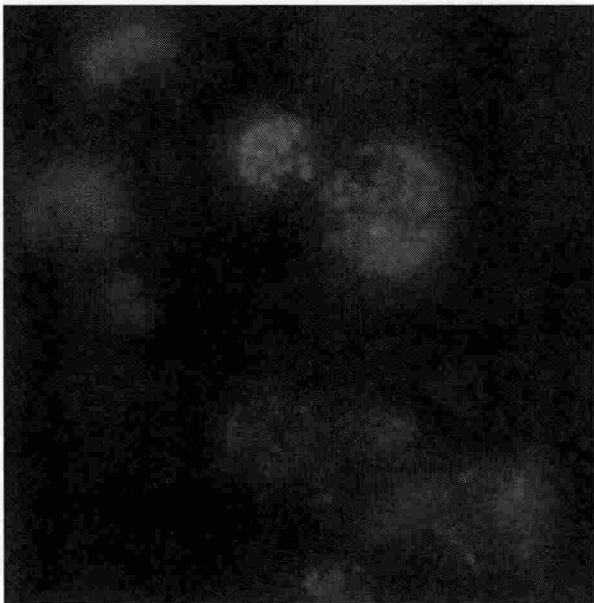
【圖20】



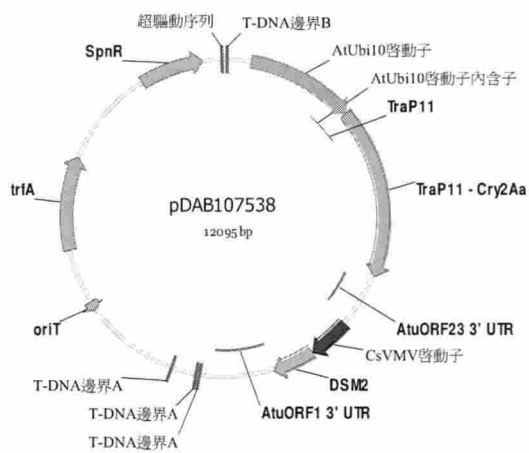
【圖21】



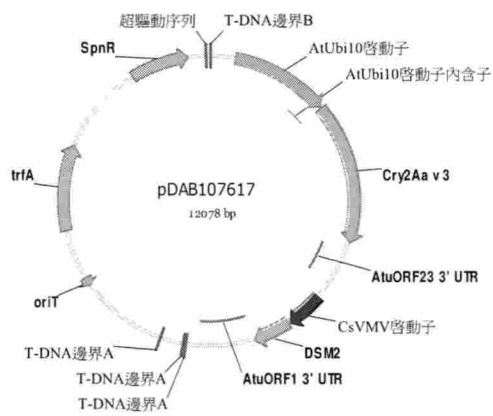
【圖22】



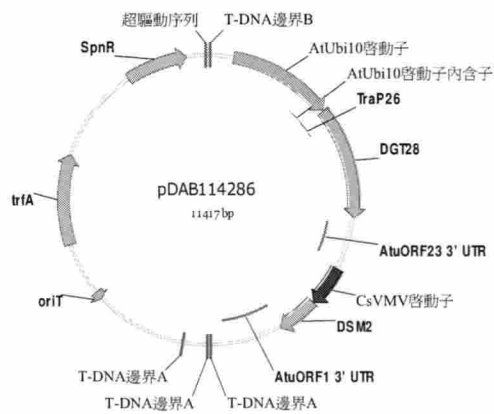
【圖23】



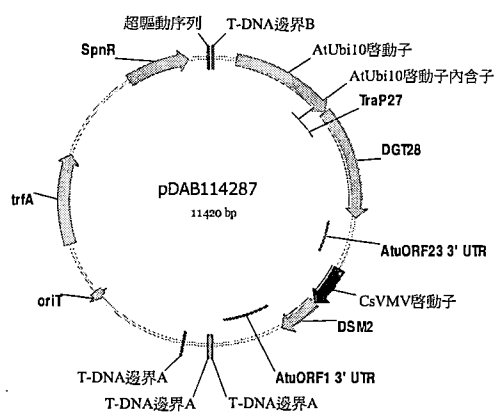
【圖24】



【圖25】



【圖26】



【圖27】