



(45) 授权公告日 2013.03.20

序列表 23 页 附图 2 页

[illegible]

1. 一种植物细胞,在其叶绿体中包括用于转化乙醇酸为苹果酸的酶活性,其中所述植物细胞在其叶绿体中包括具有乙醇酸氧化酶活性的第一多肽、具有苹果酸合酶活性的第二多肽和具有过氧化氢酶活性的第三多肽。

2. 如权利要求 1 所述的植物细胞,其中所述第一多肽由包含选自下组的核酸的第一多核苷酸编码:

- a. 具有 SEQ ID No :1 中所示核苷酸序列的核酸 ;和
- b. 编码具有 SEQ ID No :2 中所示氨基酸序列的多肽的核酸。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的植物细胞,其中所述第二多肽由包含选自下组的核酸的第二多核苷酸编码:

- a. 具有 SEQ ID No :3 中所示核苷酸序列的核酸 ;和
- b. 编码具有 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列的多肽的核酸。

4. 如权利要求 1 至 3 中任一项所述的植物细胞,其中所述第三多肽由包含选自下组的核酸的第三多核苷酸编码:

- a. 具有 SEQ ID No :5 中所示核苷酸序列的核酸 ;和
- b. 编码具有 SEQ ID No :6 中所示氨基酸序列的多肽的核酸。

5. 如权利要求 1-4 中任一项所述的植物细胞,其中所述第一多肽从异源多核苷酸表达。

6. 如权利要求 5 所述的植物细胞,其中所述异源多核苷酸包括如权利要求 2 中定义的核酸。

7. 如权利要求 1-6 中任一项所述的植物细胞,其中所述第二多肽从异源多核苷酸表达。

8. 如权利要求 7 所述的植物细胞,其中所述异源多核苷酸包括如权利要求 3 中定义的核酸。

9. 如权利要求 1-8 中任一项所述的植物细胞,其中所述第三多肽从异源多核苷酸表达。

10. 如权利要求 9 所述的植物细胞,其中所述异源多核苷酸包括如权利要求 4 中定义的核酸。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的植物细胞,其中所述第一、第二和 / 或第三多肽包括叶绿体转运肽。

12. 如权利要求 1-11 中任一项所述的植物细胞,其中所述植物细胞进一步包括 NADP- 苹果酸酶和丙酮酸脱氢酶。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的植物细胞,其中所述植物细胞与缺乏转化乙醇酸为苹果酸的酶活性的植物细胞相比,具有提高的 CO₂ 同化作用效率。

14. 如权利要求 1-13 中任一项所述的植物细胞,其中所述植物细胞是 C₃ 植物的细胞。

15. 一种生产转基因植物或植物细胞的方法,所述转基因植物或植物细胞与相应的非转基因植物或植物细胞相比具有提高的水利用率,所述方法包括在所述转基因植物或植物细胞的叶绿体中引入如权利要求 1-10 中任一项中定义的第一多肽、第二多肽和第三多肽。

16. 一种生产转基因植物或植物细胞的方法,所述转基因植物或植物细胞与相应的非转基因植物或植物细胞相比具有提高的产量,所述方法包括在所述转基因植物或植物细胞

的叶绿体中产生如权利要求 1-10 中任一项中定义的第一多肽、第二多肽和第三多肽。

17. 根据权利要求 15 或 16 所述的方法,其中所述方法包括步骤:

- a. 向该植物的植物细胞中引入至少一个编码所述三种多肽的异源多核苷酸;和
- b. 从所述至少一个多核苷酸表达所述多肽。

18. 一种多核苷酸,包括权利要求 2 中定义的核酸、权利要求 3 中定义的核酸和权利要求 4 中定义的核酸。

19. 一种载体,包括如权利要求 18 所述的多核苷酸。

20. 如权利要求 19 所述的载体,其中所述载体为表达载体。

21. 一种组合物,包括权利要求 2 中定义的第一多核苷酸、权利要求 3 中定义的第二多核苷酸和权利要求 4 中定义的第三多核苷酸。

22. 如权利要求 18 所述的多核苷酸、如权利要求 19 或 20 所述的载体或如权利要求 21 所述的组合物用于赋予植物或植物细胞提高的水利用率的用途。

23. 如权利要求 18 所述的多核苷酸、如权利要求 19 或 20 所述的载体或如权利要求 21 所述的组合物用于赋予植物或植物细胞提高的产量的用途。

通过提供在其叶绿体中包含将乙醇酸转化为苹果酸的酶活性的植物细胞来改善植物的农业生物学特性的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及植物的农业生物学特性的改善。具体来说,本发明涉及在其叶绿体中包含将乙醇酸转化为苹果酸的酶活性的植物细胞。优选所述植物细胞包括:具有乙醇酸氧化酶活性的第一多肽、具有苹果酸合酶活性的第二多肽和具有过氧化氢酶活性的第三多肽;或者具有乙醇酸脱氢酶活性的第一多肽和具有苹果酸合酶活性的第二多肽。本发明还涉及包含上述植物细胞的植物,以及可从该植物获得的种子。本发明进一步涉及制备具有提高的水利用效率或提高的产量的转基因植物或植物细胞的方法。本发明涉及包含编码上述多肽的核酸组合的多核苷酸以及包含该多核苷酸的载体,和它们的应用。

背景技术

[0002] 碳三植物中的光合 CO_2 同化作用被包括温度、 CO_2 和水有效性的环境变量所限制。许多这种限制可归因于核酮糖 1,5-二磷酸盐羧化酶/加氧酶(RubisCO)的催化性质。大气中的 O_2 和光系统 II 产生的 O_2 都与 CO_2 竞争与 RubisCO 的活性位点的结合。核酮糖 1,5-二磷酸(RuBP)的氧合作用仅仅产生一个分子的 3-磷酸甘油酯,其余两个碳形成 2-磷酸乙醇酸酯。2-磷酸乙醇酸酯是导致 CO_2 损失的 C2-氧化光合循环(光呼吸循环)的初始底物 [1]。

[0003] 光呼吸循环的主要功能是再利用 2-磷酸乙醇酸酯(图 1)。在该通路过程中,两分子的 2-磷酸乙醇酸酯被代谢形成一分子的 3-磷酸甘油酯和 CO_2 ,这些碳化合物立即通过卡尔文-本森循环(Calvin-Benson cycle)(C3-还原型光合循环)用于 RuBP 的再生,而无磷酸三糖的纯合成 [2,3]。

[0004] 2-磷酸乙醇酸酯在三个不同的细胞区室中代谢,即叶绿体、过氧化物酶体和线粒体(释放 CO_2 和 NH_4^+ 的位点),涉及许多酶促反应和转运过程(图 1)。光呼吸通路依赖于叶中碳和氮代谢的紧密整合,因为 NH_4^+ 以与 CO_2 相同的速率释放 [4]。由于氮是比碳更有价值的资源,光呼吸的 NH_4^+ 的再同化对于保持碳三植物中氮的状态是必要的 [5]。甘氨酸氧化过程中线粒体基质中释放的氮在叶绿体中通过谷氨酰胺合成酶(GS)催化 ATP 依赖的谷氨酸向谷氨酰胺的转化得到利用。专一地定位于叶肉细胞叶绿体的铁氧还蛋白依赖的谷氨酸合成酶(GOGAT),催化谷氨酰胺和 2-酮戊二酸转化成两分子的谷氨酸(图 1)。

[0005] 改善 RubisCO 羧化活性的一种手段是改变 RubisCO 对于 CO_2 和 O_2 的动力学常数。但是,迄今为止,通过定点突变降低其加氧酶活性的 RubisCO 的遗传工程,或者将其用更加有效的形式置换的方法仅取得有限的成功,例如用那些 CO_2/O_2 特异性因数高于高等植物 RubisCO 的 CO_2/O_2 特异性因数的来自红藻门(rhodophyte)藻类的 RubisCO 形式置换的方法 [6]。另一种改善碳三植物中碳固定的方法是直接通过对该通路中酶的操纵来降低光呼吸。从插入突变的分析可知,阻断 RubisCO 氧合作用下游的光呼吸代谢是致死的 [7-13]。这些结果表明光呼吸不太可能通过直接操纵光呼吸通路中酶的水平得到改善。另一方面,已发展了几种通过在其反应位点增加 CO_2 实际浓度提高 RubisCO 羧化酶活性的模式。例子是蓝

细菌和藻类 [14-15] 的 CO_2 浓缩机制或碳四植物的光合循环 [16]。后者提供了 CO_2 泵,其在 RubisCO 位点导致升高的 CO_2/O_2 比例,并因此导致相对于羧化酶活性降低的加氧酶活性。在碳三植物中,RubisCO 以其 $V_{\max}$ 的约 25% 在体内运行,而在碳四植物中,认为是以其 $V_{\max}$ 或接近 $V_{\max}$ 运行 [16]。并且,RubisCO 在碳四植物中的比活性比碳三植物高,因此在碳四植物中需要较少的 RubisCO 蛋白质来达成高速光合作用。因为此原因,还由于 RubisCO 是高耗氮量的酶 (N-expensive enzyme) 这一事实 (碳三植物中总叶 N 的 20-30%,但是碳四植物中仅为 6%),碳四植物呈现比碳三植物更高的光合氮利用效率 [17]。已尝试通过将碳四循环的酶在碳三植物 (例如拟南芥 (*A. thaliana*))、马铃薯、烟草和稻) 中过表达来转移碳四光合作用的优点,例如高光合容量、快速生长、提高的氮水利用效率 [18-21]。**Häusler** 等 [21] 已经表明碳三植物 (马铃薯和烟草) 中碳四循环基因的过表达导致光呼吸减弱,而且导致内源性酶模式和 UV 防护剂含量的改变。最近证明了通过用来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的乙醛酸聚醛酶和丙醇二酸半醛还原酶完成该通路对光呼吸通量的减弱 [22]。光呼吸循环不仅仅是由于 RubisCO 的动力学性质而不可避免地导致的浪费过程。它还被认为是对暴露于高温和干旱的碳三植物的保护机制。要提及的是代谢物的产生,例如甘氨酸、丝氨酸或一碳单元,这些代谢物能从叶输出,或用于其他代谢途径,例如甘氨酸用于谷胱甘肽的合成 [23, 24] 和预防由于消散光能的电子传递链过度还原,特别是当 C_3 植物暴露于高光强度或干旱胁迫下时 (光防护; [25, 26])。

[0006] 需要改善植物中 CO_2 的同化,特别是 C_3 植物中 CO_2 的同化,以改善农作物的农业生物学特性。而同时还应该避免上述缺点。

[0007] 发明概述

[0008] 因此,本发明要解决的技术问题可以视为提供满足上述需求的手段和方法。权利要求书和下文中描述的本发明实施方式解决了该技术问题。

[0009] 因此,本发明涉及在其叶绿体中包含将乙醇酸转化为苹果酸的酶活性的植物细胞。

[0010] 本文中使用的术语“植物细胞”包括来自所有类型植物组织的细胞,即,来自叶、根、茎、脉管组织、花柄、愈伤组织、子叶、花柄、花药、叶柄、种子或胚性植物组织。本发明的宿主细胞可从任何单子叶或双子叶植物获得。优选地,本发明的宿主细胞可以获得自:模式植物,优选拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*);或作物植物,选自由油菜 (oilseed rape)、月见草 (evening primrose)、大麻、大蓟、花生、芸苔、亚麻、大豆、红花、向日葵、琉璃苣、玉蜀黍、小麦、黑麦、燕麦、稻、大麦、棉花、木薯、胡椒、茄科植物,优选马铃薯、烟草、茄子或西红柿;野豌豆属物种,豌豆、紫花苜蓿;灌木植物 (咖啡、可可、茶);柳属物种,树 (油棕、椰子) 和多年生牧草和饲料作物。从上述植物获得宿主细胞的适宜方法以及培养这些细胞的条件是本领域公知的。优选该植物细胞是碳三植物的细胞。

[0011] 优选地,术语“酶活性”是指通过引入赋予所述活性的一种或多种多肽,即能够将乙醇酸转化为苹果酸、优选以乙醛酸作为中间产物的一种或多种多肽,从而引入叶绿体的酶活性。因此本文中所述的多肽应该是当存在与叶绿体中时呈现上述酶活性的酶。赋予上述转化中必需酶活性的优选多肽在本申请文件的其他部分详细公开。应理解,本文中所指的多肽也可以呈现其他的生物活性。为了保证将上述活性赋予至叶绿体中的上述多肽的定位,优选该多肽包含叶绿体转运肽。适宜的叶绿体转运肽为本领域中已知,记载于 Bruce

2000, Trends in Cell Biology 10, 440-447 或 Kleffmann 2004, Curr. Biol. 14, 354-362 中。

[0012] 本发明的植物细胞包括具有内源性核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (RubisCO) 活性的叶绿体。由于 RubisCO 的酶性质及其对 CO_2/O_2 分压的依赖性,在未修饰的叶绿体中仅仅可以进行有限的 CO_2 固定。但是,本发明的植物细胞中所包含的叶绿体是经过工程化的,这种工程化是通过将能够转化乙醇酸为乙醛酸、随后将乙醛酸转化为苹果酸的酶活性引入叶绿体,以允许将叶绿体中的乙醇酸转化为苹果酸。通过向叶绿体中引入这些酶活性,建立了完整的乙醇酸分解代谢循环。作为此循环的结果,一分子乙醇酸转化为两分子的 CO_2 并还原 NADPH 和 NADH 形式的能量 ($\text{乙醇酸} + \text{O}_2 + \text{NAD} + \text{NADP} \rightarrow 2\text{CO}_2 + \text{NADH} + \text{NADPH} + 2\text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$)。以这种方式, CO_2 直接在叶绿体中释放,从而提高了 CO_2 分压。因此降低了 RubisCO 的加氧酶活性,并由此形成了自调节循环。为此,优选上述植物细胞进一步包括 NADP-苹果酸酶和丙酮酸脱氢酶。因此,优选本发明的植物细胞具有比缺乏转化乙醇酸为苹果酸酶活性的植物细胞增加的 CO_2 同化效率。

[0013] 作为大大提高的 CO_2 同化作用的有利结果,本发明的植物细胞可以产生产量提高、水利用效率改善的植物,特别是农作物植物,其在本申请文件其他部分更详细公开。通过向叶绿体中引入上述酶活性并由此引入完整的乙醇酸分解代谢循环, CO_2 将在叶绿体中直接释放并再固定,从而通过提高 CO_2/O_2 比例降低 RubisCO 的加氧酶活性 (图 1)。

[0014] 在本发明的植物细胞的优选实施方式中,植物细胞的叶绿体包含具有乙醇酸氧化酶活性的第一多肽、具有苹果酸合酶活性的第二多肽和具有过氧化氢酶活性的第三多肽。

[0015] 本文所称乙醇酸氧化酶应能够转化乙醇酸为乙醛酸和水过氧化氢 (E. C. 1.1.3.15)。苹果酸合酶应能够通过从乙酰-CoA 向乙醛酸引入两个 C 单元来合成苹果酸 (E. C. 4.1.3.2)。过氧化氢酶是指能够将水过氧化氢转化为水和氧气的酶 (E. C. 1.11.1.6)。能够实施这些转化和合成的任何酶都可以引入到本发明的叶绿体中。上述酶活性可以用本领域公知的测定方法测定,优选下列实施例中描述的测定方法。

[0016] 然而,优选上述第一多肽由包含选自下组的核酸的第一多核苷酸编码:

[0017] a. 具有 SEQ ID No :1 中所示核苷酸序列的核酸;

[0018] b. 编码具有 SEQ ID No :2 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0019] c. 具有与 SEQ ID No :1 中所示核苷酸序列至少 50% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有乙醇酸氧化酶活性的多肽;和

[0020] d. 编码具有与 SEQ ID No :2 中所示氨基酸序列至少 50% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有乙醇酸氧化酶活性。

[0021] 优选所述第二多肽由包含选自下组的核酸的第二多核苷酸编码:

[0022] a. 具有 SEQ ID No :3 中所示核苷酸序列的核酸;

[0023] b. 编码具有 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0024] c. 具有与 SEQ ID No :3 中所示核苷酸序列至少 40% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有苹果酸合酶活性的多肽;和

[0025] d. 编码具有与 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列至少 40% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有苹果酸合酶活性。

[0026] 优选第三多肽由包含选自下组的核酸的第三多核苷酸编码:

[0027] a. 具有 SEQ ID No :5 中所示核苷酸序列的核酸;

[0028] b. 编码具有 SEQ ID No :6 中所示氨基酸序列的多肽的核酸 ;

[0029] c. 具有与 SEQ ID No :5 中所示核苷酸序列至少 50% 相同的核苷酸序列的核酸, 其中所述核酸编码具有过氧化氢酶活性的多肽 ; 和

[0030] d. 编码具有与 SEQ ID No :6 中所示氨基酸序列有至少 50% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸, 其中所述多肽具有过氧化氢酶活性。

[0031] 此处使用的术语“多核苷酸”是指线性或环状的核酸分子。其包括 DNA 和 RNA 分子。优选本发明的多核苷酸应作为分离的多核苷酸(即从其天然环境中分离)或以遗传修饰的形式提供。该术语包括单链和双链多核苷酸。并且, 还包括化学修饰的多核苷酸, 其包括: 天然产生的修饰多核苷酸, 如糖基化或甲基化的多核苷酸; 或人工修饰的多核苷酸, 例如生物素化的多核苷酸。本发明的多核苷酸特征在于其应编码上述多肽。优选该多肽具有如上所述的特定核苷酸序列。此外, 由于遗传密码的简并性, 还包括编码如上所述的特定氨基酸序列的多核苷酸。

[0032] 此外, 本发明中使用的术语“多核苷酸”进一步包括上述特定多核苷酸的变体。所述变体可包括本发明多核苷酸的直向同源物、旁系同源物或其他同源物。优选该多核苷酸变体包括特征在于其序列能够通过至少一个核苷酸取代、插入和 / 或缺失而从上述特定核苷酸序列衍生得到的核酸序列, 从而该变体核酸序列应仍旧编码具有上述活性的多肽。变体还包括包含能够与上述特定核苷酸序列杂交、优选在严紧杂交条件下杂交的核酸序列之多核苷酸。这些严紧条件为本领域技术人员所公知, 可在 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 中找到。严紧杂交条件的优选实例为: $6\times$ 氯化钠 / 柠檬酸钠 (= SSC), 大约 45°C 杂交, 接着在 $50-65^{\circ}\text{C}$ 下、 $0.2\times$ SSC, 0.1% SDS 条件下进行一步或多步洗涤步骤。本领域技术人员了解关于温度和缓冲液的浓度条件, 这些杂交条件根据核酸的类型而不同, 而且例如, 当有机溶剂存在时。例如, 在“标准杂交条件”下, 在浓度为 $0.1-5\times$ SSC (pH 7.2) 的水性缓冲液中, 根据核酸类型温度在 42°C 和 58°C 之间改变。如果上述缓冲液中存在有机溶剂, 例如 50% 甲酰胺, 则标准条件的温度为约 42°C 。DNA:DNA 杂交的杂交条件优选为例如 $0.1\times$ SSC, $20^{\circ}\text{C}-45^{\circ}\text{C}$, 优选 30°C 至 45°C 之间。DNA:RNA 杂交的杂交条件优选为例如 $0.1\times$ SSC, 30°C 至 55°C , 优选 45°C 至 55°C 之间。上述杂交温度在例如不存在甲酰胺的情况下为长度约 100bp (= 碱基对)、G+C 含量为 50% 的核酸而测定。技术人员了解如何参考如上所述或下列教科书决定所需的杂交条件: Sambrook 等, 《分子克隆》, 冷泉港实验室, 1989; Hames 和 Higgins 编辑, 1985 年, 《核酸杂交: 一种实用方法 (Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach)》, 牛津大学出版社, IRL 出版社, 牛津; Brown 编辑, 1991, 《基础分子生物学: 一种实用方法 (Essential Molecular Biology: A Practical Approach)》, 牛津大学出版社, IRL 出版社, 牛津。或者, 可用 PCR 类技术得到多核苷酸变体, 例如基于混合寡核苷酸引物的 DNA 扩增, 即, 用针对本发明多肽的保守结构域的简并引物进行的扩增。本发明多肽的保守结构域可通过将本发明多核苷酸的核酸序列或本发明多肽的氨基酸序列与本发明所涉及酶家族的其他成员的序列进行序列比对来鉴定。适于作为 PCR 引物的寡核苷酸和适宜的 PCR 条件记载于下列实施例中。可使用来自细菌、真菌、植物或动物的 DNA 或 cDNA 作为模板。并且, 变体包括含有与特定核苷酸序列至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 相同的核酸序列的多核苷酸。并且, 变体还包括含有编码与本文涉及的特

定氨基酸序列至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 相同的氨基酸序列的核酸序列的多核苷酸。同一性百分比值优选对整个氨基酸或核酸序列区域计算。为了比对不同的序列,本领域技术人员可得到基于多种算法的一系列程序。在此背景下,Needleman 和 Wunsch 的算法或 Smith 和 Waterman 的算法能得到特别可靠的结果。为了进行序列比对,使用了美国 53711 威斯康辛州麦迪逊 575 Science Drive 的遗传性计算机集团 1991 版本 (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711, version 1991) 的 GCG 软件包中的一部分,即 PileUp 程序 (Higgins 1989, CABIOS, 5:151-153) 或 Gap 和 BestFit 程序 (Needleman 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453 和 Smith 198, Adv. Appl. Math. 2:482-489)。上文中以百分数 (%) 表示的序列同一性值优选采用 GAP 程序对整个序列区域以下列设置进行测定:间隙权重 (Gap Weight):50, 字长权重 (LengthWeight):3, 平均匹配:10.000 和平均错配:0.000, 除非另外说明,这些设置总是用作序列比对的标准设置。

[0033] 包含任意上述核酸序列片段的多核苷酸也作为本发明的多核苷酸被包括。该片段应编码仍然具有上述活性的多肽。所以,该多肽可包括赋予上述生物活性的本发明多肽的结构域或由这些结构域组成。本文所述片段优选包括上述任一个核酸序列的至少 50、至少 100、至少 250 或至少 500 个连续核苷酸,或编码包括任一个上述氨基酸序列的至少 20、至少 30、至少 50、至少 80、至少 100 或至少 150 个连续氨基酸的氨基酸序列。

[0034] 本发明的多核苷酸或者基本由上述核酸序列组成,或者包括上述核酸序列。所以,它们还可以包含另外的核酸序列。具体而言,本发明的多核苷酸可编码融合蛋白,其中融合蛋白的一部分是上述核酸序列编码的多肽。这样的融合蛋白可包括:用以监测表达(例如绿色、黄色、蓝色或红色荧光蛋白、碱性磷酸酶等)的附加部分肽序列;或用作可检测标记或用作纯化目的的辅助手段的所谓的标签。用于不同目的的标签为本领域所公知,包括 FLAG 标签、6-组氨酸标签、MYC 标签等。

[0035] 更优选上述第一、第二和 / 或第三多肽由异源多核苷酸表达,即,从已经例如用表达载体瞬时引入植物细胞的多核苷酸表达,或从已经例如用 T- 或 P-DNA 插入而稳定引入植物细胞的多核苷酸表达。此处使用的术语“异源的”是指不是在植物细胞中天然发生的多核苷酸。因此该术语包括源自不同有机体的修饰或未修饰的多核苷酸,或者源自本发明植物细胞的修饰的多核苷酸。应理解,该异源多核苷酸应该或者包括允许其在植物细胞中表达的表达控制序列,或者包括允许异源多核苷酸在植物细胞基因组中的基因座整合的序列,从而使该异源多核苷酸的表达可由植物细胞的内源性表达控制序列所掌控。优选该异源多核苷酸包括具有上述第一、第二或第三多核苷酸的核酸序列中的两个或全部三个核苷酸的核酸,即,编码乙醇酸氧化酶的多核苷酸、编码苹果酸合酶的多核苷酸或编码过氧化氢酶的多核苷酸。通过引入上述异源多核苷酸,生成转基因植物细胞。这样的转基因植物细胞可通过转化技术得到,这些技术在引用的下列文献中公开:《植物分子生物学和生物技术 (Plant Molecular Biology and Biotechnology)》(CRC 出版社, Boca Raton, 佛罗里达), 6/7 章, 第 71-119 页 (1993); 学术出版社, Kung 和 R. Wu 编辑, 1993 年《转基因植物》第一卷,《工程和应用》15-38 页, F. F. White 的“高等植物中基因转移用载体” (Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, Ed.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38); 学术出版社, Kung 和 R. Wu 编辑, 1993 年《转

基因植物》第一卷,《工程和应用》中 128-143 页,B. Jenes 等的“基因转移的技术”(B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilization, Ed.: Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-143); Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225。优选转基因植物可以通过 T-DNA 介导或 P-DNA 介导的转化得到。通常这样的载体系统特征在于其至少包含土壤杆菌介导的转化所需的 *vir* 基因和为 T-DNA 或 P-DNA 划界的序列(T-DNA 边界或 P-DNA 边界)。适宜载体详细记载于申请文件的其他部分中。

[0036] 在本发明植物细胞的另一个优选实施方式中,叶绿体包括具有乙醇酸脱氢酶活性的第一多肽和具有苹果酸合酶活性的第二多肽。

[0037] 本文中使用的乙醇酸脱氢酶(EC 1.1.99.14)是指能够转化乙醇酸至乙醛酸但是使用 NAD^+ 而不是 H_2O_2 作为氧化剂的酶。

[0038] 优选所述第一多肽由包含选自下组的核酸的第一多核苷酸编码:

[0039] a. 具有 SEQ ID No:7 中所示核苷酸序列的核酸;

[0040] b. 编码具有 SEQ ID No:8 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0041] c. 具有与 SEQ ID No:7 中所示核苷酸序列至少 50% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有乙醇酸脱氢酶活性的多肽;和

[0042] d. 编码具有与 SEQ ID No:8 中所示氨基酸序列有至少 50% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有乙醇酸脱氢酶活性。

[0043] 优选上述第二多肽由包含选自下组的核酸的第二多核苷酸编码:

[0044] a. 具有 SEQ ID No:3 中所示核苷酸序列的核酸;

[0045] b. 编码具有 SEQ ID No:4 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0046] c. 具有与 SEQ ID No:3 中所示的核苷酸序列具有至少 40% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有苹果酸合酶活性的多肽;和

[0047] d. 编码具有与 SEQ ID No:4 中所示氨基酸序列至少 40% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有苹果酸合酶活性。

[0048] 如上文中所设定,所述第一和/或第二多肽优选从异源多核苷酸表达。在此情况下,优选该异源多核苷酸或者包括具有上述第一或第二多核苷酸的核酸序列(即,编码乙醇酸脱氢酶的多核苷酸或编码苹果酸合酶的多核苷酸)的核酸,或包括这两种核酸。

[0049] 本发明还涉及包含本发明的植物细胞的植物。

[0050] 优选本发明的植物从本发明的植物细胞发育得到。所以,可设想该植物的所有植物细胞都是根据该发明的植物细胞,即,在其叶绿体中包括转化乙醇酸至苹果酸的酶活性。如上所述,本发明的植物细胞,优选本发明的植物,选自下组中:模式植物,优选拟南芥;或作物植物,优选油菜、月见草、大麻、大蓟、花生、芸苔、亚麻、大豆、红花、向日葵、琉璃苣、玉蜀黍、小麦、黑麦、燕麦、稻、大麦、棉花、木薯、胡椒;茄科植物,优选马铃薯、烟草、茄子或西红柿;野豌豆属物种,豌豆、紫花苜蓿;灌木植物(咖啡、可可、茶);柳属物种,树(油棕、椰子)和多年生牧草和饲料作物。优选本发明的植物是 C_3 植物。

[0051] 优选地,与缺乏本发明植物细胞的植物相比,本发明的植物具有提高的 CO_2 同化作用。此处使用的 CO_2 同化作用是指 CO_2 和水在光合作用过程中转化为有机分子。该背景下的化学反应为本领域所公知,并记载在标准生化教科书中。 CO_2 同化作用的提高可以用本

领域公知的测定方法测定,优选由下列实施例中描述的测定方法测定。优选该提高在统计学上有显著意义。提高是否在统计学上有显著意义可以用公知的统计检验测定,包括例如 student 氏 t 检验、曼-怀二氏检验 (Mann-Whitney test) 等。更优选该提高是指同化的 CO₂ 提高至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%或至少 50%。优选地,本文中缺乏本发明植物细胞的植物是指与本发明的植物相同品种的未修饰的对照植物。

[0052] 与缺乏本发明植物细胞的植物相比,还优选本发明的植物具有减弱的光呼吸作用。光呼吸通路活性的减弱可以用公知技术测定。优选适宜的测试方法公开于所附下列实施例中。此处所述“减弱”优选是指统计学上有显著意义的减弱。

[0053] 与缺乏本发明的植物细胞的植物相比,优选本发明的植物具有提高的水利用效率。作为升高的 CO₂ 同化作用的结果,由于叶的气孔可保持关闭,所以提高了水利用率。因此,减少了蒸发造成的水损失。水利用率的提高可以用本领域公知的测定方法测定,优选由下列实施例中描述的测定方法测定。优选该提高在统计学上有显著意义。更优选该提高是指提高至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%或至少 50%。

[0054] 与缺乏本发明的植物细胞的植物相比,优选本发明的植物生产的叶数量增加。叶的数量可以计数得到或基于叶的鲜重或干重来测定。优选叶的数量增加在统计学上有显著意义。更优选该增加是指叶数量增加至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%或至少 50%。

[0055] 此外,与缺乏本发明的植物细胞的植物相比,优选本发明的植物具有提高的产量。本文中使用的术语“产量”包括植物部分或完整植物的生物量(鲜重或干重)的增加,特别是植物的可收获部分的生物量的增加。生物量的增加可以是地上的或地下的。地下生物量的增加可由于诸如块茎、根茎、球茎等植物部分生物量的增加。特别优选任意一种或多种下列增加:增加的根生物量、增加的根体积、增加的根数量、增加的根直径和增加的根长度。术语“增加的产量”还包括种子产量的增加。种子产量的增加包括:(i) 增加的总种子产量,包括种子生物量(种子重量)增加,可以是每棵植物种子重量的增加或者单个种子重量的增加;(ii) 每花序中花(“小花(florets)”)的数量增加;(iii) 饱满种子数量的增加;(iv) 种子大小增加;(v) 种子体积增加;(vi) 单个种子面积增加;(vii) 单个种子长度和/或宽度增加;(viii) 收获指数增加,其表达为收获部分(如种子)产量与总生物量的比例;(ix) 饱满率增加,饱满率是指饱满种子的数量除以种子总数再乘以 100;和(x) 千粒重(TKW)增加,从所计数的饱满种子数量及其总重量推知。提高的 TKW 可得自提高的种子大小和/或种子重量。提高的 TKW 可由提高的胚大小和/或胚乳大小产生。优选该产量增加在统计学上有显著意义。更优选该提高是指产量提高至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%或至少 50%。

[0056] 最后,因为该工程化的路径定位于叶绿体,可直接再固定 CO₂,并释放更少的氨。因此,在本发明的植物中需要较低程度的氨再同化,而且还会发生硝酸盐利用率的改善。

[0057] 本发明进一步包括可从本发明的植物得到的种子。优选本发明的种子应能够产生(即发育为)本发明的植物,尤其是具有上述特征的植物。

[0058] 本发明的植物或植物细胞优选是转基因植物或植物细胞。所以,本发明涉及生产转基因植物或植物细胞的方法,该转基因植物或植物细胞与相应的非转基因植物或植物细胞相比具有升高的水利用率,所述方法包括向该转基因植物或植物细胞叶绿体中引入如上

所述的具有乙醇酸氧化酶活性的第一多肽、具有苹果酸合酶活性的第二多肽和具有过氧化氢酶活性的第三多肽,或引入如上所述的具有乙醇酸脱氢酶活性的第一多肽和具有苹果酸合酶活性的第二多肽。

[0059] 上述多肽的引入优选通过引入编码上述多肽的异源多核苷酸来达成,在本申请文件其他部分将更详细讨论。这包括表达载体的瞬时引入,或通过例如 T-DNA 或 P-DNA 插入来稳定整合到植物细胞基因组中。应理解,可引入包括编码所有上述多肽的核酸的异源多核苷酸。或者,可引入各包括编码上述多肽中的一个多肽的核酸的分离的独立的异源多核苷酸。因此,该方法优选包括如下步骤:

[0060] a. 向该植物的植物细胞中引入至少一个编码所述多肽的异源多核苷酸;和

[0061] b. 从所述至少一个多核苷酸表达所述多肽。

[0062] 本发明还涉及生产转基因植物或植物细胞的方法,该转基因植物或植物细胞与相应的非转基因植物或植物细胞相比具有升高的产量,所述方法包括向该转基因植物或植物细胞叶绿体中引入如上所述的具有乙醇酸氧化酶活性的第一多肽、具有苹果酸合酶活性的第二多肽和具有过氧化氢酶活性的第三多肽,或引入如上所述的具有乙醇酸脱氢酶活性的第一多肽和具有苹果酸合酶活性的第二多肽。该方法优选还包括如下步骤:

[0063] a. 向该植物的植物细胞中引入至少一个编码所述多肽的异源多核苷酸;和

[0064] b. 从所述至少一个多核苷酸表达所述多肽。

[0065] 本发明包括包含下列核酸的组合的多核苷酸:

[0066] 选自下列核酸构成的组的核酸:

[0067] a. 具有 SEQ ID No :1 中所示核苷酸序列的核酸;

[0068] b. 编码具有 SEQ ID No :2 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0069] c. 具有与 SEQ ID No :1 中所示核苷酸序列至少 50% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有乙醇酸氧化酶活性的多肽;和

[0070] d. 编码具有与 SEQ ID No :2 中所示氨基酸序列至少 50% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有乙醇酸氧化酶活性;

[0071] 选自下列核酸构成的组的核酸:

[0072] a. 具有 SEQ ID No :3 中所示核苷酸序列的核酸;

[0073] b. 编码具有 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0074] c. 具有与 SEQ ID No :3 中所示的核苷酸序列具有至少 40% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有苹果酸合酶活性的多肽;和

[0075] d. 编码具有与 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列至少 40% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有苹果酸合酶活性;和

[0076] 选自下列核酸构成的组的核酸:

[0077] a. 具有 SEQ ID No :5 中所示核苷酸序列的核酸;

[0078] b. 编码具有 SEQ ID No :6 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0079] c. 具有与 SEQ ID No :5 中所示核苷酸序列至少 50% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有过氧化氢酶活性的多肽;和

[0080] d. 编码具有与 SEQ ID No :6 中所示氨基酸序列有至少 50% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有过氧化氢酶活性。

[0081] 此外,本发明还涉及包含下列核酸组合的多核苷酸:

[0082] 选自下列核酸构成的组的核酸:

[0083] a. 具有 SEQ ID No :7 中所示核苷酸序列的核酸;

[0084] b. 编码具有 SEQ ID No :8 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0085] c. 具有与 SEQ ID No :7 中所示核苷酸序列有至少 50% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有乙醇酸脱氢酶活性的多肽;和

[0086] d. 编码具有与 SEQ ID No :8 中所示氨基酸序列有至少 50% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有乙醇酸脱氢酶活性;和

[0087] 选自下列核酸构成的组的核酸:

[0088] a. 具有 SEQ ID No :3 中所示核苷酸序列的核酸;

[0089] b. 编码具有 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0090] c. 具有与 SEQ ID No :3 中所示的核苷酸序列具有至少 40% 相同的核苷酸序列的核酸,其中所述核酸编码具有苹果酸合酶活性的多肽;和

[0091] d. 编码具有与 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列至少 40% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸,其中所述多肽具有苹果酸合酶活性。

[0092] 通过向植物细胞或植物中引入作为异源多核苷酸的本发明的任一个上述多核苷酸,本发明涉及的特征将被赋予所述植物或植物细胞。

[0093] 本发明还涉及包含一种本发明的上述多核苷酸的载体。

[0094] 术语“载体”优选包括噬菌体、质粒、病毒载体或逆转录病毒载体以及人工染色体,例如细菌或酵母菌人工染色体。此外,该术语还涉及靶向构建体,允许该靶向构建体向基因组 DNA 中的随机或定点整合。这样的靶向构建体优选包括如下详述的用于同源重组或异源重组的足够长度的 DNA。优选包括本发明多核苷酸的载体进一步包括用于在宿主中扩增和/或选择的选择性标记。该载体可通过本领域公知的多种技术整合入宿主细胞中。如果引入宿主细胞中,该载体可存在于细胞质中或整合入基因组中。在后者情况下,应理解该载体可进一步包括允许同源重组或异源插入的核酸序列。可通过常规转化或转染技术将载体引入到原核或真核细胞中。本文中使用的术语“转化”和“转染”,接合 (conjugation) 和转导,旨在包括引入外来核酸 (例如 DNA) 至宿主细胞中的大量现有技术方法,包括:磷酸钙、氯化铷或氯化钙共沉淀;DEAE-葡聚糖介导的转染;脂转染;天然感受态;碳类簇 (carbon-based clusters);化学修饰的转移;电穿孔或粒子轰击 (例如“基因枪”)。包括植物细胞的宿主细胞的适宜转化或转染方法可在 Sambrook 等 (《分子克隆:实验室手册》第二版,冷泉港实验室,冷泉港出版社,纽约冷泉港,1989) 和其他实验室手册,例如《分子生物学方法》1995,第 44 卷,土壤杆菌实验方案, Gartland 和 Davey 编辑, Humana 出版社,新泽西州 Totowa 中找到。或者,可通过热休克或电穿孔技术引入质粒载体。该载体如果是病毒,则应该在应用到宿主细胞上之前,先用适宜的包装细胞株在体外包装。逆转录病毒载体可以是可复制的或复制缺陷的。在后者情况下,通常仅仅在互补宿主细胞中发生病毒增殖。

[0095] 优选此处涉及的载体适用于作为克隆载体,即在微生物系统中可复制。这样的载体保证了细菌中的有效克隆,优选酵母菌或真菌中的有效克隆,并使植物可以稳定转化。必须提及的特别是那些适用于 T-DNA 介导或 P-DNA 介导的转化的多种双元和共整合载体系统。通常这样的载体系统特征在于其至少包含土壤杆菌介导的转化所需的 vir 基因和为

T-DNA 或 P-DNA 划界的序列 (T-DNA 或 P-DNA 边界)。这些载体系统优选还进一步包括顺式调节区域,例如启动子和终止子和 / 或选择性标记,这些选择性标记适用于鉴别合适转化的宿主细胞或有机体。共整合载体系统在同一载体中排列有 *vir* 基因和 T-DNA 序列时,而二元系统基于至少两个载体,一个携带 *vir* 基因而没有 T-DNA,而另一个携带 T-DNA、没有 *vir* 基因。结果,最后提到的这种载体相对较小,容易操作,而且能够在 *E. coli* 和土壤杆菌中复制。这些二元载体包括源自 pBIB-HYG、pCAMBIA、pPZP、pBecks、pGreen 系列的载体。优选用于本发明的是 pGreen II。二元载体的综述及其应用参见 Hellens 2000, Trends in Plant Science 5, 446-451。此外,利用合适的克隆载体,本发明的多核苷酸可引入宿主细胞或有机体内,例如植物或动物中,并由此可用于植物的转化,例如下列文献中公开和引用的: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), 6/7 章, 第 71-119 页 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, 卷 1, Engineering and Utilization, Kung 和 R. Wu 编著, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes 等人, Techniques for Gene Transfer, 出自 Transgenic Plants, 卷 1, Engineering and Utilization, Kung 和 R. Wu 编著, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225。

[0096] 更优选本发明的载体是表达载体。在这样的表达载体中,该多核苷酸包括如上所述的允许在真核细胞中表达的表达框或其分离的片段。除了本发明的多核苷酸,表达载体还可进一步包括调节元件,包括转录和翻译增强子。优选,该表达载体还是基因转移或靶向载体。源于病毒的表达载体如逆转录病毒载体、痘苗病毒、腺相关病毒、疱疹病毒或牛乳头瘤病毒,可用于将本发明的多核苷酸或载体传递入靶向的细胞群中。可采用本领域技术人员公知的方法构建重组病毒载体,参见,例如 Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. 和 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1994) 中记载的技术。

[0097] 适用的表达载体骨架优选源自本领域已知的表达载体,例如 Okayama-Berg cDNA 表达载体 pcDV1 (Pharmacia)、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen) 或 pSPORT1 (GIBCO BRL)。典型融合表达载体的其他实例有 pGEX (Pharmacia Biotech Inc.; Smith, D. B., 和 Johnson, K. S. (1988) Gene 67 :31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) 和 pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), 其中分别与编码要表达的蛋白质的目的核酸融合了谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)、麦芽糖 E- 结合蛋白和蛋白质 A。pTrc 载体的靶基因表达基于宿主 RNA 聚合酶从杂合子 *trp-lac* 融合启动子开始的转录。pET 11d 载体的靶基因表达基于由共表达的病毒 RNA 聚合酶 (T7gn1) 介导的 T7-gn10-lac 融合启动子的转录。该病毒聚合酶由宿主菌株 BL21 (DE3) 或 HMS174 (DE3) 从固有的 λ -噬菌体提供,该噬菌体携带 *lacUV 5* 启动子转录控制下的 T7gn1 基因。在酿酒酵母中表达的载体实例包括: pYeDesaturasecl (Baldari 等人 (1987) Embo J. 6 :229-234)、pMFa (Kurjan 和 Herskowitz (1982) Cell 30 :933-943)、pJRY88 (Schultz 等人 (1987) Gene 54 :113-123) 和 pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)。适用于例如丝状真菌的其他真菌的载体及其构建方法包括详细记载于下列文献中的方法: van den Hondel, C. A. M. J. J., & Punt, P. J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi,

出自 Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy 等编辑, 第 1-28 页, 剑桥大学出版社; 剑桥, 或出自 More Gene Manipulations in Fungi (J. W. Bennett & L. L. Lasure 编著, 第 396-428 页; 学术出版社 (Academic Press): 圣地亚哥)。其他适用的酵母载体例如 pAG-1、YEp6、YEp13 或 pEMBLye23。作为备选, 本发明的多核苷酸还可以用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达。可用于在培养的昆虫细胞 (例如 Sf9 细胞) 中表达蛋白的杆状病毒表达载体包括 pAc 系列 (Smith 等人 (1983) Mol. Cell Biol. 3 :2156-2165) 和 pVL 系列 (Lucklow 和 Summers (1989) Virology 170 :31-39)。

[0098] 允许在植物细胞中表达的表达载体包括详细记载于下列文献中的载体: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., 和 Masterson, R. (1992) "New plantbinary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20 :1195-1197 和 Bevan, M. W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12 :8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; 出自 Transgenic Plants, 卷 1, Engineering and Utilization, Kung 和 R. Wu 编著, Academic Press, 1993, 第 15-38 页中。植物表达框优选包括: 能够控制植物细胞中基因表达和功能性连接以使得各个序列能够实现其功能的调节序列, 例如转录终止序列, 例如多腺苷酸化信号。优选的多腺苷酸化信号源自根瘤土壤杆菌 T-DNA 的, 例如 Ti 质粒 pTiACH5 的基因 3, 已知其是章鱼碱合酶 (Gielen 等人, EMBO J. 3 (1984) 835 以及下列等等), 或其功能等同物, 但是所有在植物中具有功能活性的其他终止序列也适用。由于植物基因表达经常不限于转录水平, 植物表达框优选包括其他功能性连接的序列, 例如翻译增强子, 如过驱动序列 (overdrive sequence), 包括 5' 未翻译烟草花叶病毒前导序列, 其提高蛋白质 /RNA 比例 (Gallie 等人, 1987, Nucl. Acids Research 15 :8693-8711)。用于植物基因表达框中功能性连接的其他优选序列是将基因产物靶向至其相关的细胞区域所需要的靶向序列。在当前情况下, 具体而言, 所相关的细胞区域是叶绿体。

[0099] 本发明还涉及一种组合物, 该组合物包括:

[0100] 包括选自下列核酸的第一多核苷酸:

[0101] a. 具有 SEQ ID No :1 中所示核苷酸序列的核酸;

[0102] b. 编码具有 SEQ ID No :2 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0103] c. 具有与 SEQ ID No :1 中所示核苷酸序列至少 50% 相同的核苷酸序列的核酸, 其中所述核酸编码具有乙醇酸氧化酶活性的多肽; 和

[0104] d. 编码具有与 SEQ ID No :2 中所示氨基酸序列至少 50% 相同的氨基酸序列的多肽的核酸, 其中所述多肽具有乙醇酸氧化酶活性;

[0105] 包括选自下列核酸构成的组的核酸的第二多核苷酸:

[0106] a. 具有 SEQ ID No :3 中所示核苷酸序列的核酸;

[0107] b. 编码具有 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列的多肽的核酸;

[0108] c. 具有与 SEQ ID No :3 中所示的核苷酸序列具有至少 40% 相同的核苷酸序列的核酸, 其中所述核酸编码具有苹果酸合酶活性的多肽; 和

[0109] d. 编码具有与 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列至少 40% 相同的氨基酸序列多肽的核酸, 其中所述多肽具有苹果酸合酶活性; 和

[0110] 包括选自下列核酸构成的组的核酸的第三多核苷酸:

- [0111] a. 具有 SEQ ID No :5 中所示核苷酸序列的核酸 ;
- [0112] b. 编码具有 SEQ ID No :6 中所示氨基酸序列的多肽的核酸 ;
- [0113] c. 具有与 SEQ ID No :5 中所示核苷酸序列至少 50 % 相同的核苷酸序列的核酸, 其中所述核酸编码具有过氧化氢酶活性的多肽 ; 和
- [0114] d. 编码具有与 SEQ ID No :6 中所示氨基酸序列有至少 50 % 相同氨基酸序列的多肽的核酸, 其中所述多肽具有过氧化氢酶活性。
- [0115] 此外, 本发明涉及一种组合物, 该组合物包括 :
- [0116] 包括选自下列核酸构成的组的核酸的第一多核苷酸 :
- [0117] a. 具有 SEQ ID No :7 中所示核苷酸序列的核酸 ;
- [0118] b. 编码具有 SEQ ID No :8 中所示氨基酸序列的多肽的核酸 ;
- [0119] c. 具有与 SEQ ID No :7 中所示核苷酸序列至少 50 % 相同的核苷酸序列的核酸, 其中所述核酸编码具有乙醇酸脱氢酶活性的多肽 ; 和
- [0120] d. 编码具有与 SEQ ID No :8 中所示氨基酸序列有至少 50 % 相同氨基酸序列的多肽的核酸, 其中所述多肽具有乙醇酸脱氢酶活性 ; 和
- [0121] 包括选自下列核酸构成的组的核酸的第二多核苷酸 :
- [0122] a. 具有 SEQ ID No :3 中所示核苷酸序列的核酸 ;
- [0123] b. 编码具有 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列的多肽的核酸 ;
- [0124] c. 具有与 SEQ ID No :3 中所示的核苷酸序列具有至少 40 % 相同的核苷酸序列的核酸, 其中所述核酸编码具有苹果酸合酶活性的多肽 ; 和
- [0125] d. 编码具有与 SEQ ID No :4 中所示氨基酸序列至少 40 % 相同的氨基酸序列的多肽的核酸, 其中所述多肽具有苹果酸合酶活性。
- [0126] 如本申请文件其他部分所述, 这样的组合物包括用于赋予需要改善本文所述特征的植物或植物细胞所述酶活性的异源多核苷酸。
- [0127] 应理解上述本发明的多核苷酸、载体或组合物, 优选用于赋予植物或植物细胞提高的水利用率或赋予植物或植物细胞提高的产量。
- [0128] 附图概述
- [0129] 图 1 : C3 植物的光呼吸碳氮循环 (黑色) 被新型乙醇酸分解代谢通路 (红色) 短路。引入拟南芥叶绿体中的转基因酶为绿色高亮表示。Kat : 过氧化氢酶 ; GDC : 甘氨酸脱羧酶 ; GGAT : 谷氨酸 - 乙醛酸氨基转移酶 ; GK : 甘油酸激酶 ; GO : 乙醇酸氧化酶 ; GOGAT : 谷氨酸 - 酮戊二酸氨基转移酶 ; GS : 谷氨酰胺合成酶 ; HPR : 羟基丙酮酸还原酶 ; MDH : NAD⁺ - 苹果酸脱氢酶 ; ME : NADP⁺ - 苹果酸酶 ; MS : 苹果酸合酶 ; PDH : 丙酮酸脱氢酶 ; PGP : 磷酸乙醇酸磷酸酶 ; SGAT : 丝氨酸 - 谷氨酸氨基转移酶 ; SHMT : 丝氨酸羟甲基转移酶。与参考文献 [3] 对应。
- [0130] 图 2 : 转基因植物和野生型植物的叶提取物中的酶活性。A) 乙醇酸氧化酶活性。B) 苹果酸合酶活性。C) 过氧化氢酶活性。误差棒表示三次不同测定值的标准误。
- [0131] 图 3 : 6 周龄植物在短日照条件下在环境 CO₂ 浓度 (380ppm) 和高 CO₂ 浓度 (2,000ppm) 下生长的生长特性。
- [0132] 图 4 : 淀粉在 6 周龄转基因植物和野生型植物叶子中积聚的差异, 这些植物在短日照下在下列 (A-C) 条件下生长 : A) 380ppm ; B) 2000ppm ; C) 在光照期将植物转移至 600 μ mol 量子 m⁻²s⁻¹ 六天。D) 如 C) 中处理的植物的表型。

[0133] 发明详述

[0134] 下列实施例仅仅用来说明本发明。但是不应将其理解为对本发明保护范围的限制。

实施例**[0135] 实施例 1 :转基因的 PCR 扩增**

[0136] 用 Platinum Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen, Karlsruhe, 德国) 扩增对应于拟南芥叶的乙醇酸氧化酶 2 (GO, At3g14420) 和南瓜子叶的苹果酸合酶 (MS, X56948) 的 cDNA 和 E. coli 过氧化氢酶 (KatE ;M55161) 的基因组序列, 并克隆到 pGEMT-Easy (Promega, Mannheim, 德国) 或 pCR-Blunt II-TOP0 (Invitrogen) 中。对于 GO 和 MS 的情况, 省略编码最后的氨基酸 (A/SRL) 的核苷酸, 估计这些氨基酸代表过氧化物酶体导向信号 (31, 32)。使用下列引物组合: GO 正向引物: (5' -TACAATTGGAGATCACTAACGTTACCGAGT-3' SEQ ID NO: 9) 和 GO 反向引物: (5' -TGGGACACTCCACGTCCTTAGTCTAGACTAGTA-3' SEQ ID NO: 10); MS 正向引物: (5' -ACACCGGTCGCTGGGAATGTATTCTGAATCGGCA-3' SEQ ID NO: 11) 和 MS 反向引物: (5' -CACATAGGCATACATCATCCAGGTGAGTCGACGTT-3' SEQ ID NO: 12); KatE 正向引物: (5' -ACACCGGTCGCAACATAACGAAAAGAACCCA-3' SEQ ID NO: 13) 和 KatE 反向引物: (5' -ACGTCGACTCAGGCAGGAATTTGTCAATCT-3' SEQ ID NO: 14)。为了进行所述克隆策略, 将引物设定为在 GO 的 5' 和 3' 端引入唯一的 MunI 和 SpeI 位点, 在 MS 和 KatE 的 5' 和 3' 端引入 AgeI 和 SalI 位点。为了将 GO 靶向引入叶绿体中, 使用下列引物用 PCR 扩增拟南芥葡萄糖磷酸变位酶的间质靶向导肽 (PGM; 225bp)。PGM 正向引物: (5' -TAGGTACCCAATCAACAATGACGTCGACCTAC-3' SEQ ID NO: 15) 和 PGM 反向引物: (5' -GAGATTAAATCGTTGCCGACGAAGCAATTGTA-3' SEQ ID NO: 16)。该寡核苷酸设计为在 5' 和 3' 端引入唯一的 KpnI 和 MunI 位点。得到的片段克隆到 GOcDNA 的上游。为了将 MS 和 KatE 靶向至叶绿体, 含西红柿 -RubisCO- 小亚基 (rbcS3C; X66072) 启动子 (715bp) 和转运肽 (172bp) 的片段用基因组 DNA 和下列引物 PCR 扩增: rbcS3C 正向引物: (5' -ACGAGCTCATCCAGAATTGGCGTTGGATTA-3' SEQ ID NO: 17) 和 rbcS3C 反向引物: (5' -AGCAACGGTGGAAGAGTCAGTTGCAACCGGTAT-3' SEQ ID NO: 18)。该引物设计为在 5' 和 3' 端引入唯一的 SacI 和 AgeI 位点。得到的片段插入到 MS 和 KatE 编码区的上游。用 PRISM 荧光染料-终止系统 (Applied Biosystems, Darmstadt, 德国) 对所有的质粒构建体测序, 以排除聚合酶反应中形成的任何可能的突变。

[0137] 实施例 2 :二元载体的构建

[0138] 为了指导在拟南芥中的表达, 将编码这些酶的质体前体的 DNA 克隆到修饰形式的二元载体 pGreenII 中 [33, 34]。用不同的策略将编码这些酶的 DNA 克隆到二元载体中。对于 MS 和 KatE, 从载体中切除 CaMV35S 启动子, 并用西红柿 -rbcS3C 启动子指导表达。选择性标记基因 nosKan (卡那霉素抗性)、nosHyg (潮霉素抗性) 和 nosBAR 18 (BASTA 抗性) 被克隆到基本 pGreenII 载体中的 StuI- 位点。将 GO 克隆到 pGreenII 35S-nosKan 载体中, MS 克隆到 pGreenII rbcS3C-nosHyg 载体中, KatE 克隆到 pGreenII rbcS3C-nosBAR 载体中, 得到的质粒称为 35S:GO、rbcS3C:MS 和 rbcS3C:KatE。

[0139] 实施例 3 :拟南芥的转化和转化体的选择

[0140] 将二元载体 35S:GO、rbcS3C:MS 和 rbcS3C:KatE 电穿孔入携带辅助质粒 pSoup 的

根瘤土壤杆菌 GV3101 中,用于通过真空侵入转化拟南芥植物(哥伦比亚生态型,Col-0) [35]。利用对卡那霉素、潮霉素或 BASTA 的抗性选择转化的种子。从选出的植物中收集叶材料,抽提 DNA 用于 PCR 分析。含有转基因的植物能够自花传粉。转基因系再进行两轮筛选和表征,利用 PCR 和酶活性检测。

[0141] 一般植物生长在 8 小时光照/16 小时黑暗的条件下,光合活性光子通量密度(PPFD) 为 100 或 600 μmol 量子 $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (分别是正常和提高的光强度),并把温度调节到白天 22°C/晚上 18°C。对于非光呼吸条件下的生长,将在正常条件下生长的三周龄植物转移入 CO_2 浓度 $2,000 \pm 200\text{ppm}$ 的室中。

[0142] 实施例 4:GO-MS 和 GMK 转化物的生产

[0143] 用载体 rbcS3C:MS 转化 G0(5 系,G05) 生产 GO-MS 系。含有三个基因的细胞系 GMK 系通过用载体 rbcS3C:KatE 再转化 G0-MS(系 6,G0-MS6) 来制备。在所有情况下,利用转基因的不同抗性选择细胞系,并用 PCR、Southern 印迹和酶活性测定来确认。

[0144] 实施例 5:叶绿体分离、抽提物制备和酶活性测定

[0145] 如 Kebeish 等 [22] 所述分离完整的叶绿体。将沉淀的叶绿体重悬在相应的抽提缓冲液(见下文)中,直接用于酶活性测定。乙醇酸氧化酶:在 N_2 存在下匀浆叶材料,并重悬在抽提缓冲液中,抽提缓冲液中含有 100mM Hepes, pH7.2, 1mM EDTA 和 10mM 的 2-巯基乙醇。离心匀浆物使其澄清,取 10 μl 等份小样用于酶活性测定。酶活性测定按照 Yamaguchi 和 Nishimura [36] 的方法进行,并进行下列改变:反应介质含有 100mM 三乙醇胺, pH7.8, 3mM EDTA, 0.75mM 氧化型谷胱甘肽和 4mM 苯肼。加入 2.3mM 乙醇酸钠开始反应,然后在 320nm 进行分光光度测定。一个酶单位定义为每分钟催化产生 1 μmol 乙醛酸-苯腙的酶量,以 324nm 处 $16.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的苯腙的消光系数计算。苹果酸合酶:在 N_2 存在下匀浆叶材料,并重悬在抽提缓冲液中,抽提缓冲液中含有 50mM Tris-HCl, pH8.0, 和 1mM MgCl_2 。离心 20 匀浆物使其澄清,取 10 μl 等份小样用于酶活性测定。按照 Smith 等 [37] 记载的方法测定 MS 活性。反应介质中含有 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM MgCl_2 , 3mM 乙酰-CoA, 1.6mM 5,5'-二硫代双 2-硝基苯甲酸(DTNB)。加入 4mM 乙醛酸开始反应,然后在 410nm、25°C 进行分光光度测定。一个酶单位定义为每分钟催化产生 1 μmol 4-硝基硫醇的酶量,以 410nm 处 $13.7\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的 4-硝基硫醇的消光系数计算。过氧化氢酶:在 N_2 存在下匀浆叶材料,并重悬在抽提缓冲液中,抽提缓冲液中含有 50mM KH_2PO_4 , pH7.0, 1% (v/v) 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)-40 和 0.1% (v/v) Triton X-100。如 Havir 和 McHale [38] 所述在 50mM KH_2PO_4 、pH 7.0 中测定过氧化氢酶活性。加入 10mM H_2O_2 开始反应,然后在 240nm、25°C 进行分光光度测定。一个酶单位定义为每分钟催化分解 1 μmol H_2O_2 的酶量,以 240nm 处 $43.6\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的 H_2O_2 的消光系数计算。

[0146] 实施例 6: H_2O_2 和乙醛酸含量的测定

[0147] 过氧化氢:用 Okuda 等 [39] 记载的实验方案的修改版测定 H_2O_2 含量。在 N_2 和 500 μl 的 0.2M HClO_4 存在下匀浆叶(50-100mg),并在 4°C、20,000g 离心 5 分钟。用 4N KOH 中和 300 μl 上清液至 pH7.5 以去除 HClO_4 ,将溶液在 4°C、1,000g 离心 1 分钟。取 200 μl 上清上样到 1.2ml AG-1 柱上(0.8cm×4cm;BioRad, Hercules, USA),用 800 μl 双蒸水洗涤柱两次。含有 H_2O_2 的第二次洗脱液用于检测。反应混合物在 750 μl 总体积中含有 500 μl 洗脱液、200 μl 对二甲基氨基苯甲醛(dimethylaminobenzaldehyde, DMAB, 12.5mM, 溶于 0.375M、pH6.5 的磷酸盐缓冲液中)、40 μl 3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒

(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, MBTH, 0.05 % w/v) 和 10 μ l 过氧化物酶 (12.5U/ml)。加入过氧化物酶起始反应, 25 $^{\circ}$ C、8 分钟孵育之后, 监测 590nm 的吸光度升高。

乙醛酸: 乙醛酸的测定用 Häusler 等 [40] 记载的实验方案的修改版进行。在 N_2 和 500 μ l 100mM HCl 以及 0.1% 苯胍存在下匀浆叶材料 (30–100mg), 并将其在 80 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟。冰上冷却之后, 将样品在 10,000g 离心 2 分钟, 200 μ l 上清与 750 μ l 的 18.5% HCl 和 50 μ l 的 4% (w/v) $K_3Fe(CN)_6$ 混合。10,000g 离心混合物 2 分钟, 在加入 $K_3Fe(CN)_6$ 后 8 分钟的精确时间点, 测定上清在 520nm 处的吸光度。不加 $K_3Fe(CN)_6$ 的样品作为对照。

[0148] 实施例 7: 代谢产物含量

[0149] 按照 Fahnenstich 等 [33] 记载的方法进行 GC-MS 分析、碳水化合物和叶绿素含量测定。

[0150] 实施例 8: 叶绿素荧光参数

[0151] 用 PAM-2000 脉冲调幅叶绿素荧光计 (Walz GmbH, Effeltrich, 德国) 进行叶绿素荧光测定。每次测量起始时, 将植物暗适应 10 分钟。用调制弱红光测量基态荧光 (F_0), 用饱和白光脉冲 ($5000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{sec}^{-1}$; 持续 0.8s), 诱导最大荧光 (F_m)。

[0152] 实施例 9: CO_2 同化率和碳同位素分析

[0153] 按照 Awada 等的方法 (41) 对植物进行光合率测量, 这些植物在如下条件下生长: 8 小时光照/16 小时黑暗, 光合活性光子通量密度 (PPFD) 为 100 和 300 $\mu\text{mol 量子 m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (分别为正常和升高的光强度), 环境相对湿度水平, 24 $^{\circ}$ C。简言之, 用安装有 LED 光源和为拟南芥叶订制的叶室的便携光合系统 (LI 6400-2B, LICOR Inc., Lincoln, NE, 美国) 在光饱和下进行最大净光合 (A , $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)。按照 Madhavan 等的方法 [42] 进行碳同位素比例测定。在 60 $^{\circ}$ C 干燥整个莲座丛 (rosette) 48 小时, 并研磨成精细粉末, 以测定碳同位素比例。用连接了自动捕获盒系统和 Finnigan Delta-S 同位素比率质谱仪的元素分析仪 (Heraeus, CHN-0 Rapid) 分析该叶粉末的子样本 (2–3mg) 的碳同位素比例。通过与之前用已知 $\delta^{13}C$ 值相对于 PDB (Pee Dee Belemnite 国际标准) 标定的工作标准比较, 确定各个样本的同位素比例。

[0154] 实施例 10: 乙醇酸氧化酶、苹果酸合酶和过氧化氢酶在拟南芥叶绿体中的共表达

[0155] 用编码乙醇酸氧化酶 (GO) 的质粒转化拟南芥。对 GO 活性高于野生型 (19–53%) 而且仅仅含有一个 GO 转基因插入的卡那霉素抗性转基因系再进行两轮筛选, 得到非分离 T3 转基因系。用编码苹果酸合酶 (MS) 的质粒转化 GO 活性比野生型高 30% 的 GO 代表系 (图 2)。选择潮霉素抗性的 GO-MS 转化物, 并分析其 MS 活性。得到的所有转基因系都显示出相似的 MS 活性 (9.8 ± 2.2 至 $17.9 \pm 0.5 \mu\text{U/mg 蛋白}$), 把用 Southern 印迹证明仅仅携带一个 MS 转基因插入的代表系 (图 2) 再进行两轮筛选, 得到非分离 T3 群。用编码 E. coli 过氧化氢酶 (KatE) 的质粒转化该双纯合子过表达系, 用 BASTA 抗性选出 11 个独立的系 (GMK 系)。含有高于野生型的过氧化氢酶活性的 GMK 系再进行两轮筛选, 得到非分离 T3 系。选择 GMK3 和 GMK9 作为得到的两个不同群的代表进行进一步的分析 (参见下文; 图 2)。Southern 印迹分析表明 GMK3 系仅仅含有一个 KatE 转基因插入, 而 GMK9 含有三个插入 (未示出)。GMK 植物呈现类似于亲本系 GO 和 GO-MS 的 GO 和 MS 活性 (图 2), 表明在 9 代之后没有转基因表达的损失。为了排除单转基因表达引起的任何表型改变, 还在野生型背景中表达了 MS 和 KatE。在两种情况下, 得到了具有与 GMK 系相似的 MS 或过氧化氢酶活性的系 (代表系包括

在图 2 中)。用五周龄 GMK3 植物和野生型植物的叶中分离的叶绿体进行的酶活性测量表明,转基因酶正确定位到质体中(未示出)。

[0156] 实施例 11:转基因 GMK 植物积聚更多的生物量

[0157] 纯合子 G0 植物具有在第一个 7 周的生长中莲座丛直径和鲜重降低、以及叶子微黄的特征(图 3)。有趣的是,从第 7 周开始,与野生型的生长差异变得不那么显著了(未示出)。乙醛酸和过氧化氢含量的测定表明二者在 G0 植物中都有提高(图 S1)。G0-MS 系与 G0 相似但大小介于 G0 和野生型植物之间(图 3)。由于当暴露于胁迫条件(见下文)时 G0-MS 植物呈现 G0 表型,在 G0-MS 植物的质体中表达 KatE 基因,以促进对 G0 活性产生的过量 H_2O_2 的解毒作用。呈现所有三种转基因活性的独立系表现出生物量的统计学显著的增加(例如 GMK3),而其他则大于亲本 G0-MS 植物但仍然小于野生型(例如 GMK9)。如表 1 所示,与野生型比较,GMK3 植物表现出增大的莲座丛直径和更多叶子数量,以及增加了 35-40% 的干重。当所有的系生长在非光呼吸条件(CO_2 浓度为 2000ppm)下时,观察到可忽略的表型差异(图 3 和表 1)。很明显,对 RubisCO 的加氧酶反应的抑制导致叶绿体内乙醇酸产量降低,并因此导致乙醛酸和 H_2O_2 水平降低。值得注意的是,单独 MS 和 KatE 过表达的系在所有测试条件下的表现都与野生型类似(未示出)。然后我们评价了转化体在光照阶段末段积聚光合终产物的能力。用 GC-MS 测定蔗糖和单糖葡萄糖和果糖。在环境 CO_2 且没有胁迫的情况下, G0-MS 植物积聚较少的蔗糖,而 GMK 系表现出与野生型相当的水平。虽然 G0-MS 植物中葡萄糖和果糖的积聚与野生型相比没有差异,但是 GMK 系的葡萄糖和果糖水平高于野生型的水平。在暴露于高度光照六小时后, G0-MS 植物的所有这些代谢物都降低,而 GMK 系积聚了这些光同化产物(表 2)。同样,在正常光照条件下, G0-MS 转化体积聚了更少的过渡淀粉(也见于其亲本 G0 系中),而 GMK 植物恢复了与野生型一样的积聚淀粉的能力(图 4A)。当在高 CO_2 浓度下生长时,在所有系中观察到相似的高水平淀粉积聚。(图 4B)。有趣的是,当这些系在正常条件下生长,然后转移到高度光照条件下 7 天时, GMK3 植物象野生型一样积聚淀粉,而 G0、G0-MS 和 GMK9 转基因系则丧失了这种能力(图 4D)。与这些结果一致, G0、G0-MS 和 GMK9 系对高度光照处理表现出强烈的变黄和氧化损伤(图 4D)。

[0158] 实施例 12:GMK 植物增强的 CO_2 同化作用和降低的光呼吸

[0159] 为了评价转基因植物的光合性能,在不同的基因型中测定了叶绿素荧光、气体交换和对 ^{13}C 的辨别力(碳同位素比例, $\delta^{13}C$)。与野生型相比, G0 植物的电子传递率(ETR)减少了约 25%,而 G0-MS 和 GMK9 植物的电子传递率则与野生型类似(表 3)。在 GMK3 植物中,其 ETR 比野生型增强了 26%(表 3)。 F_v/F_m 比例表明,在正常条件下生长的 7 周龄 G0-MS 和 GMK 植物的光系统 II 的最大量子效率没有受到影响,而 G0 植物表现出轻微的不良影响(表 3)。值得一提的是,较幼龄的 G0 植物总是呈现比其他系更低的 F_v/F_m 比例,这一事实与第一周生长过程中这些植物的更显见表型的相关性良好(未示出)。另一方面,当植物暴露于高度光照六小时时,没有观察到 GMK 系与野生型 F_v/F_m 比例的差异,而在 G0 和 G0-MS 植物中观察到强烈的光抑制(未示出)。用 LICOR 便携光合作用仪对对照和表达整个通路的转化体进行瞬时光合率测定($A, \mu mol m^{-2} s^{-1}$)。表 3 表明, GMK3 系的光合率相对高于野生型,而 GMK9 的光合率与野生型相当。为了测定是否 GMK3 植物比其亲本系具有更高的光合效率,进行了碳同位素分离研究。碳同位素比例测定提供了对植物在其整个生存期进行光合功能的整体观察。如表 3 所示,当植物在正常条件下生长时, $\delta^{13}C$ 对 GMK3 系的负面影响小于其

对野生型的负面影响 (GMK1 系也得到了相似的结果), 这表明在这些植物中提高了羧基化效率和水利用率。不出所料, 当植物在非光呼吸条件 (2,000ppm CO_2 , 表 3) 下生长时, 所有系的 $\delta^{13}\text{C}$ 表现出无差异的趋势。用 GC-MS 测定甘氨酸和丝氨酸水平, 计算 Gly/Ser 比例作为整个光呼吸通路的通量的指标。在环境 CO_2 浓度下, 以及在正常或高度光照条件下, GMK 系表现出比野生型低的甘氨酸含量 (表 3)。GO-MS 植物在正常光照条件下的甘氨酸含量不变, 但是在高度光照条件下表现出降低的甘氨酸水平 (表 3)。对于丝氨酸, 在两种测试光强度下, GMK 植物都表现出比野生型低的水平, 而 GO-MS 植物在正常光照下呈现野生型水平, 在高度光照下呈现提高的丝氨酸水平 (表 3)。在正常光照条件下, 所有系的 Gly/Ser 比例都相当, 但是在高度光照六小时以后, 转基因系测得比野生型显著更低的比例 (表 3)。在此光呼吸条件下孵育植物之后, 由于甘氨酸的高度积聚, 与正常光照条件相比, 野生型的 Gly/Ser 比例提高了约 150 倍 (表 3)。对于 GO-MS、GMK3 和 GMK9, 仅仅分别提高了 33、13 和 63 倍 (表 3)。在这些植物中, GMK3 植物由于其甘氨酸积聚很低, 所以表现出最低的 Gly/Ser 比例。当在高 CO_2 浓度下生长时, 在这些系中没有观察到 Gly/Ser 比例的差别 (表 3)。

[0160] 表 1 :8 周龄转基因和野生型系的生长参数在短日照条件下, 环境 CO_2 浓度 (A, 380ppm) 或高 CO_2 浓度 (E, 2,000ppm) 中生长的植物的莲座丛直径 (RD)、叶子数量 (NL) 和干重 (DW)。表中列出的值为每次至少 8 个植株, 重复两次的平均值 $\pm$ 标准误。粗体字表示的值是指 Student 氏检验计算的与野生型的值有显著性差异 ($P < 0.05$)。

[0161]

		野生型	GO-MS	GMK3	GMK9
RD (cm)	A	10.5 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 0.3	12.1 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 0.3
NL	A	33.3 $\pm$ 0.8	33.4 $\pm$ 0.5	39.5 $\pm$ 0.7	32.2 $\pm$ 0.9
	E	31.0 $\pm$ 0.4	32.0 $\pm$ 0.6	31.1 $\pm$ 0.6	32.1 $\pm$ 0.5
DW (mg)	A	106.9 $\pm$ 5.6	106.7 $\pm$ 6.0	146.6 $\pm$ 3.9	104.3 $\pm$ 8.3
	E	184.7 $\pm$ 16.1	185.4 $\pm$ 7.9	199.7 $\pm$ 8.4	199.6 $\pm$ 5.9

[0162]

表 2: 用 GC-MS 测量在不同光强度 (L: 低度光照 ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); H: 高度光照 ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)) 下光照 6 小时后收获的整个莲座叶的光合产物水平。表中列出的值为每次至少 8 个植株, 重复两次的平均值 $\pm$ 标准误。粗体字表示的值是指 Student 氏检验计算表明与野生型的值有显著性差异($P<0.05$)。

	野生型		GO-MS		GMK3		GMK9	
	L	H	L	H	L	H	L	H
葡萄糖	8.43 $\pm$ 1.48	122.5 $\pm$ 4.6	11.49 $\pm$ 2.36	35.80$\pm$ 0.50	12.13$\pm$ 0.65	86.8 $\pm$ 8,6	10.87 $\pm$ 0.64	103.5 $\pm$ 2.5
果糖	1.65 $\pm$ 0.25	10.30 $\pm$ 0.51	1.63 $\pm$ 0.18	3.27 $\pm$ 0.05	3.11 $\pm$ 0.03	8.83 $\pm$ 0.64	2.28 $\pm$ 0.18	16.27$\pm$ 0.90
蔗糖	34.90 $\pm$ 1.90	338.7 $\pm$ 16.7	24.50$\pm$ 2.30	160.9 $\pm$ 6.1	36.30 $\pm$ 2.70	173.5$\pm$.10	33.80 $\pm$ 0.70	236.2 $\pm$ 8.2
甘氨酸	0.67 $\pm$ 0.03	59.62 $\pm$ 7.20	0.68 $\pm$ 0.04	18.50 $\pm$ 0.90	0.51 $\pm$ 0.08	9.50 $\pm$ 1.90	0.35 $\pm$ 0.14	28.10 $\pm$ 5.10
丝氨酸	16.80 $\pm$ 1.20	9.70 $\pm$ 1.40	18.80 $\pm$ 1.20	15.50 $\pm$ 0.40	6.70 $\pm$ 1.80	5.90 $\pm$ 0.50	9.00 $\pm$ 2.80	7.6 $\pm$ 1.50

[0163]

表 3: 野生型和转基因系的光合性能。A, 在 380 ppm CO₂ 下的 CO₂ 同化作用率; ETR, 在 600 μmol m⁻² s⁻¹ 下测定的电子传递率; F_v/F_M, 600 μmol m⁻² s⁻¹ 六小时后测定的光系统 II 的最大量子效率; Δδ¹³C, 转化体的整叶 δ¹³C 值与野生型比较的差; Gly/Ser, 甘氨酸与丝氨酸的比例。这些值表示为每次至少 8 株植物、重复两次结果的平均值 ± 标准误, 粗体字表示经 Student 氏检验与野生型值有显著性差异(P<0.05)。如无另外说明, 用生长在正常光强度下的植物进行测量。n.d.: 未测量。

	野生型					GMK9	
	GO		GO-MS		GMK3		
A (μmol m ⁻² s ⁻¹)	8.23 ± 0.21	n.d.	n.d.	n.d.	9.16 ± 0.17	8.72 ± 0.18	
ETR (μmol m ⁻² s ⁻¹)	70.5 ± 2.7	52.9 ± 9.8	74.6 ± 4.1		89.1 ± 3.4	75.8 ± 2.6	
F _v /F _M	0.68 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.55 ± 0.01		0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.05	
Δδ ¹³ C							
380 ppm		n.d.	n.d.		0.87 ± 0.01	-0.11 ± 0.07	
2,000 ppm		n.d.	n.d.		-0.04 ± 0.02	-0.19 ± 0.08	
Gly/Ser							
380 ppm (30 μmol m ⁻² s ⁻¹)	0.040 ± 0.001	0.051 ± 0.015	0.037 ± 0.001		0.050 ± 0.011	0.032 ± 0.009	
380 ppm (600 μmol m ⁻² s ⁻¹)	6.238 ± 0.206	1.235 ± 0.049	1.189 ± 0.039		1.574 ± 0.235	3.807 ± 0.382	
2,000 ppm	0.035 ± 0.001	0.032 ± 0.001	0.039 ± 0.003		0.043 ± 0.004	0.040 ± 0.004	

30

[0164] 说明书中未明确指出的参考文献参见下列参考文献列表；
[0165] 参考文献

- [0166] 1. Tolbert NE(1997) The C₂ oxidative photosynthetic carbon cycle. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48 :1-25。
- [0167] 2. Douce R and Neuburger M(1999) Biochemical dissection of photorespiration. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2 :214-222。
- [0168] 3. Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC(2000) Photorespiration : metabolic pathways and their role in stress protection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B* 255 : 1517-1529。
- [0169] 4. Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ(1978) Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275 :741-743。
- [0170] 5. Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD, **Häusler** RE(1995) The regulation and control of photorespiration. *J. Exp. Bot.* 46 :1397-1414。
- [0171] 6. Parry M, Andralojc PC, Mitchell RAC, Madgwick P, Keys A(2003) Manipulation of RubisCO : the amount, activity, function and regulation. *J. Exp. Bot.* 54 :132-1333。
- [0172] 7. Somerville CR, Ogren WL(1980) Photorespiration mutants of *Arabidopsis thaliana* deficient in serine-glycolate aminotransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 :2684-2687。
- [0173] 8. Somerville CR, Ogren WL(1980) Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. *Nature* 286 : 257-259。
- [0174] 9. Somerville CR, Ogren WL(1981) Photorespiration-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* lacking mitochondrial serine transhydroxymethylase activity. *Plant Physiol.* 67 :666-671。
- [0175] 10. Somerville CR, Ogren WL(1982) Mutants of the cruciferous plant *Arabidopsis thaliana* lacking glycine decarboxylase activity. *Biochem. J.* 202 :373-380. 25。
- [0176] 11. Somerville S, Somerville CR(1985) Mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in chloroplast dicarboxylate transport is missing an envelope protein. *Plant Sci. Lett.* 37 :217-220。
- [0177] 12. Bauwe H. and Kolukisaoglu U. (2003) Genetic manipulation of glycine decarboxylation. *J. Exp. Bot.* 54 :1523-1535。
- [0178] 13. Bold R, Edher C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, et al. (2005) DGlycerate 3-kinase the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell* 17 :2413-2420。
- [0179] 14. Bagder MR, Price GD(2003) CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria : molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* 54 :609-622. 15. Giordano M, Beardall J, Raven JA(2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae : mechanisms, environmental modulation and evolution. *Ann. Rev. Plant Biol.* 56, 99-131。

- [0180] 16. Hatch MD (1987) C4 photosynthesis: A unique bend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895: 8-16.
- [0181] 17. Sage RF, Pearcy RW, Seemann JR (1987) The nitrogen use efficiency of C3 and C4 plants. *Plant Physiol.* 85: 355-359.
- [0182] 18. Ishimaru K, Ichikawa H, Matsuoka M, Oshugi R (1997) Analysis of a C4 pyruvate, orthophosphate dikinase expressed in C3 transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Sci.* 129: 57-64.
- [0183] 19. Ishimaru K, Ohkawa Y, Ishige T, Tobias DJ, Oshugi R (1998) Elevated pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) activity alters carbon metabolism in C3-transgenic potatoes with a C4 maize PPDK gene. *Physiol. Plant.* 103: 340-346.
- [0184] 20. Matsuoka M, Furbank RT, Fukayama H, Miyao M (2001) Molecular engineering of C4 photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 297-314.
- [0185] 21. **Häusler** RE, Rademacher T, Li J, Lipka V, Fischer KL, et al. (2001) Single and double overexpression of C4-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *J. Exp. Bot.* 52: 1785-1803.
- [0186] 22. Kebeish R, Niessen N, Thiruveedhi K, Bari R, Hirsch J-H, et al. (2007) Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotech.* 25: 593-599.
- [0187] 23. Keys AJ (1999) Biochemistry of photorespiration and the consequences for plant performance. In *Plant Carbohydrate Biochemistry* (eds. JA Bryant, MM Burrell, NJ Kruger), pp. 147-162. Oxford: BIOS Scientific Publishers.
- [0188] 24. Noctor G, Arisi A-CM, Jouanin L, Foyer CH (1999) Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both the chloroplastic and cytosolic compartments. *J. Exp. Bot.* 50: 1157-1167.
- [0189] 25. Heber U, Bligny R, Streb P, Douce R (1996) Photorespiration is essential for protection of the photosynthetic apparatus of C3-plants against photoinactivation under sunlight. *Bot. Acta.* 109: 307-315.
- [0190] 26. Kozaki A, Takeba G (1996) Photorespiration protects C3-plants from photooxidation. *Nature* 384, 557-560.
- [0191] 27. Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 40: 503-537.
- [0192] 28. Gillon JS, Griffiths H (1997) The influence of (photo)respiration on carbon isotope discrimination in plants. *Plant Cell Environ.* 20: 1217-1230.
- [0193] 29. Igamberdiev AU, Mikkelsen T, Ambus P, Bauwe H, Lea P, et al. (2004) Photorespiration contributes to stomatal regulation and carbon isotope fractionation: a study with barley, potato and *Arabidopsis* plant deficient in glycine decarboxylase. *Photos Res.* 81: 139-152.

- [0194] 30. von Cammerer S(2003) C4 photosynthesis in a single cell is theoretically inefficient but may ameliorate internal CO₂ diffusion limitations of C3 leaves. *Plant Cell Environm.* 26 :1191-1197.
- [0195] 31. Horng J-T, Behari R, Burke C-A, Baker A(1995) Investigation of the Energy Requirement and Targeting Signal for the Import of Glycolate Oxidase into Glyoxysomes. *Eur. J. Biochem.* 230 :157-163.
- [0196] 32. Mori H, Takeda-Yoshikawa Y, Hara-Nishimura I, Nishimura M(1991) Pnmpkin malate synthase Cloning and sequencing of the cDNA and Northern blot analysis. *Eur. J. Biochem.* 197 :331-336.
- [0197] 33. Fahnenstich H, Saigo M, Niessen M, Zanol MI, et al. (2007) Alteration of organic acid metabolism in *Arabidopsis thaliana* overexpressing the maize C4-NADP-malic enzyme causes accelerated senescence during extended darkness. *Plant Physiol.* 145 :640-652.
- [0198] 34. Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM(2000) pGreen : a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42 :819-832.
- [0199] 35. Bechtold, N, Ellis J and Pelletier, G(1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris, Life Sci.* 316 :1194-1199.
- [0200] 36. Yamaguchi K and Nishimura M(2000) reduction to below threshold levels of glycolate oxidase activities in transgenic tobacco enhances photoinhibition during irradiation. *Plant Cell Physiol.* 41 :1397-1406.
- [0201] 37. Smith CV, Huang C-C, Miczak A, Russell DG, Sacchettini JC, et al. (2003) Biochemical and Structural Studies of Malate Synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 278 :1735-1743.
- [0202] 38. Havir E, McHale N(1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol.* 84 :450-455.
- [0203] 39. Okuda T, Matsuda Y, Yamanaka A, Sagisaka S(1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97 :1265-1267.
- [0204] 40. **Häusler** RE, Bailey KJ, Lea PJ, Leegood RC(1996) Control of photosynthesis in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase and glutamate synthase. *Planta* 200 :388-396.
- [0205] 41. Awada T, Dunigan DD, Dickman MB(2004) Animal anti-apoptotic genes enhance recovery from drought stress in tobacco. *Int. J. Agri & Biol.* 6 :943-949.
- [0206] 42. Madhavan S, Treichel I, O' Leary MH(1991) Effects of relative humidity on carbon isotope fractionation in plants. *Bot. Acta* 104 :292-294.

[0001]

序列表

<110> 科隆大学

<120> 通过提供在其叶绿体中包含将乙醇酸转化为苹果酸的酶活性的植物细胞来改善植物的农业生物学特性的方法

<130> BPS65361PC

<150> EP 08 151 759.1

<151> 2008-02-21

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1104

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 1

atggagatca ctaacgttac cgagtatgat gcaatcgcaa agcagaagct gcctaagatg	60
gtgtacgact actatgcata tgggtgcagaa gaccaatgga ctcttcaaga gaacagaaac	120
gcttttgcaa ggatcctctt tcggcctcgg attctgattg atgtgagcaa gattgacatg	180
acaaccaccg tcttgggggt caagatctcg atgcccata tggttgctcc aactgccatg	240
caaaagatgg ctacacctga tggggaatat gctactgcta gagctgcata tgcagctgga	300
actatcatga cactatcttc atgggctact tccagcgttg aagaagttgc gtctacaggg	360
ccagggatcc gattcttcca gctctatgta tacaagaaca ggaatgtggt tgagcagctc	420
gtgagaagag ctgagagggc tgggttcaaa gccattgctc tcactgtaga caccccaagg	480
ctaggccgca gagagtctga tatcaagaac agattcactt tgcctccaaa cctgacattg	540
aagaactttg aaggacttga cctcggaag atggacgagg ccaatgactc tggcttggt	600
tcatatgttg ctggtcaaata tgaccgtacc ttaagctgga aggatgtcca gtggctccag	660

[0002]

acaatcacca agttgcccat tcttgtcaaa ggtgttctta caggagagga tgcaaggata	720
gcgattcaag ctggtgcagc cggaatcatt gtatcaaacc atggagctcg ccagcttgac	780
tatgtcccag caaccatctc ggcccttgaa gaggttgtca aagcgacaca aggacgaatt	840
cctgtcttct tggatgggtgg tgttcgacgt ggcactgatg tcttcaaagc acttgcactt	900
ggagcctccg ggatatttat tggaagacca gtggtattct cattggcagc tgaaggagag	960
gttggagtta gaaagggtgct tcaaattgcta cgtgatgagt tcgagctgac catggcactg	1020
agtgggtgtc ggtccctaaa ggaaatctcc cgtaaccaca ttaccaccga atgggacact	1080
ccacgtcctt cagccagggtt atag	1104

- | | |
|-------|-----|
| <210> | 2 |
| <211> | 367 |
| <212> | PRT |
| <213> | 拟南芥 |

<400> 2

Met Glu Ile Thr Asn Val Thr Glu Tyr Asp Ala Ile Ala Lys Gln Lys
1 5 10 15

Leu Pro Lys Met Val Tyr Asp Tyr Tyr Ala Ser Gly Ala Glu Asp Gln
20 25 30

Trp Thr Leu Gln Glu Asn Arg Asn Ala Phe Ala Arg Ile Leu Phe Arg
35 40 45

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

Leu Gly Phe Lys Ile Ser Met Pro Ile Met Val Ala Pro Thr Ala Met
65 70 75 80

[0003]

Gln Lys Met Ala His Pro Asp Gly Glu Tyr Ala Thr Ala Arg Ala Ala
85 90 95

Ser Ala Ala Gly Thr Ile Met Thr Leu Ser Ser Trp Ala Thr Ser Ser
100 105 110

Val Glu Glu Val Ala Ser Thr Gly Pro Gly Ile Arg Phe Phe Gln Leu
115 120 125

Tyr Val Tyr Lys Asn Arg Asn Val Val Glu Gln Leu Val Arg Arg Ala
130 135 140

Glu Arg Ala Gly Phe Lys Ala Ile Ala Leu Thr Val Asp Thr Pro Arg
145 150 155 160

Leu Gly Arg Arg Glu Ser Asp Ile Lys Asn Arg Phe Thr Leu Pro Pro
165 170 175

Asn Leu Thr Leu Lys Asn Phe Glu Gly Leu Asp Leu Gly Lys Met Asp
180 185 190

Glu Ala Asn Asp Ser Gly Leu Ala Ser Tyr Val Ala Gly Gln Ile Asp
195 200 205

Arg Thr Leu Ser Trp Lys Asp Val Gln Trp Leu Gln Thr Ile Thr Lys
210 215 220

Leu Pro Ile Leu Val Lys Gly Val Leu Thr Gly Glu Asp Ala Arg Ile
225 230 235 240

Ala Ile Gln Ala Gly Ala Ala Gly Ile Ile Val Ser Asn His Gly Ala
245 250 255

[0004]

Arg Gln Leu Asp Tyr Val Pro Ala Thr Ile Ser Ala Leu Glu Glu Val
260 265 270

Val Lys Ala Thr Gln Gly Arg Ile Pro Val Phe Leu Asp Gly Gly Val
275 280 285

Arg Arg Gly Thr Asp Val Phe Lys Ala Leu Ala Leu Gly Ala Ser Gly
290 295 300

Ile Phe Ile Gly Arg Pro Val Val Phe Ser Leu Ala Ala Glu Gly Glu
305 310 315 320

Ala Gly Val Arg Lys Val Leu Gln Met Leu Arg Asp Glu Phe Glu Leu
325 330 335

Thr Met Ala Leu Ser Gly Cys Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Arg Asn
340 345 350

His Ile Thr Thr Glu Trp Asp Thr Pro Arg Pro Ser Ala Arg Leu
355 360 365

<210> 3

<211> 1947

<212> DNA

<213> 西葫芦 (cucurbita pepo)

<400> 3

atgggatcgc tgggaatgta ttctgaatcg gcagtaagga agaaaagtag ccgaggctac 60

gatgttccag agggagtgga cattcgggga cgttatgatg aagaatttgc caggattctc 120

aacaaggaag ctttctgttt tgtggctgat ttacagagga ctttcagaaa ccacataagg 180

tattcgatgg aatgccgcag agaagccaaa aggaggtaca atgaaggggc ggtgccgggg 240

tttgcacgg cgaccaagta tataaggga tctgagtgga catgtgcac agtccccccg 300

[0005]

gcagttgctg atcggagagt ggagatcacc ggacctgtgg agcggaagat gatcatcaac	360
gcactcaatt ctggagctaa agttttcatg gcggactttg aagatgcact atcaccaaac	420
tgggagaatt tgatgagggg gcaaattaat ctgaaggatg cagttgatgg gactataagc	480
ttccatgaca aagctagaaa caaggtttat aaactgaacg atcagacagc caagctcttt	540
gttcgccctc gaggttggca cttcgtgag gctcatatct tcatcgacgg cgagcctgcc	600
accggctgtc ttgtggactt cgggctctac ttttttcaca accatgcaa tttccggcgc	660
ttcaaggtc aaggttctgg ccttttcttt taccttccca aaatggagca ctccagggaa	720
gcaaaaatat ggaacagtgt atttgagaga gcagagaaga tggcagggat agagaggggc	780
agcatcaggg ccactgtgct gattgaaaca cttccagcag tgtttcaaat ggatgaaata	840
ctctatgagc lgagggatca ttctgtggga ttgaactgtg gtagatggga ttacatattc	900
agctatgtca agaccttcca ggctcaccta gatcgctgt taccgaccg agtccaagtc	960
ggtatggcac aacatttcat gaggagtat tctgatctcc ttatcaggac ttgtcacacg	1020
gtggtgtgcc acgtgggagg catggctgct caaattccaa ttagagacga cccgaaggca	1080
aatgagatgg cacttgagct agtgaggaag gacaaattga gagaggcaaa ggcaggacat	1140
gatggaacat gggcagcaca tccaggatta atcccagcat gtatggaagt cttaccaaac	1200
agcatgggaa atgcccccaa tcagatccga tctgcaagac gagacgatgc tgcaaacct	1260
actgaagacg acctcttgca gcaaccgagg ggtgttcgta cattggaagg gctccggttg	1320
aacacccgag tcggaattca gtacctagca gcatggctaa ccgggacagg ctctgtgcct	1380
ctctacaacc ttatggaaga tgcagccaca gctgaaatca gcagggttca aaactggcaa	1440
tggctgaagt atggagtgga attggatgga gatgggcttg gagtgagagt gaacaaggaa	1500
ctgttcgcaa gagtgggtgga agaagaaatg gaaaggattg aaagagaagt ggggaaggag	1560
aaattcagga agggaatgta caaagaggct tgcaagatgt tcacaaggca atgcacagcg	1620

[0006]

ccaaccttgg atgattttct gaccttggat gcgtacaacc acatagtcac acatcatccc 1680
agggagctgt ccaggctctg aaaaccgcac caaattggcc ttctttcgac aggtaagagt 1740
tcttttgctt cccttctctt ctcttttctt ctcttccttg ttgctgagaa taacgtattt 1800
gtattgtaat ttaagactct gtttgtttgt ccgtttcttt tttaagctg tttgtgtcgg 1860
ttatgtcaag aaattcagca attgcaagca aattggaact ctctccatga acctaaaaaa 1920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1947

<210> 4

<211> 566

<212> PRT

<213> 西葫芦

<400> 4

Met Gly Ser Leu Gly Met Tyr Ser Glu Ser Ala Val Arg Lys Lys Ser
1 5 10 15

Ser Arg Gly Tyr Asp Val Pro Glu Gly Val Asp Ile Arg Gly Arg Tyr
20 25 30

Asp Glu Glu Phe Ala Arg Ile Leu Asn Lys Glu Ala Leu Leu Phe Val
35 40 45

Ala Asp Leu Gln Arg Thr Phe Arg Asn His Ile Arg Tyr Ser Met Glu
50 55 60

Cys Arg Arg Glu Ala Lys Arg Arg Tyr Asn Glu Gly Ala Val Pro Gly
65 70 75 80

Phe Asp Pro Ala Thr Lys Tyr Ile Arg Glu Ser Glu Trp Thr Cys Ala
85 90 95

[0007]

Ser Val Pro Pro Ala Val Ala Asp Arg Arg Val Glu Ile Thr Gly Pro
100 105 110

Val Glu Arg Lys Met Ile Ile Asn Ala Leu Asn Ser Gly Ala Lys Val
115 120 125

Phe Met Ala Asp Phe Glu Asp Ala Leu Ser Pro Asn Trp Glu Asn Leu
130 135 140

Met Arg Gly Gln Ile Asn Leu Lys Asp Ala Val Asp Gly Thr Ile Ser
145 150 155 160

Phe His Asp Lys Ala Arg Asn Lys Val Tyr Lys Leu Asn Asp Gln Thr
165 170 175

Ala Lys Leu Phe Val Arg Pro Arg Gly Trp His Phe Ala Glu Ala His
180 185 190

Ile Phe Ile Asp Gly Glu Pro Ala Thr Gly Cys Leu Val Asp Phe Gly
195 200 205

Leu Tyr Phe Phe His Asn His Ala Asn Phe Arg Arg Ser Gln Gly Gln
210 215 220

Gly Ser Gly Pro Phe Phe Tyr Leu Pro Lys Met Glu His Ser Arg Glu
225 230 235 240

Ala Lys Ile Trp Asn Ser Val Phe Glu Arg Ala Glu Lys Met Ala Gly
245 250 255

Ile Glu Arg Gly Ser Ile Arg Ala Thr Val Leu Ile Glu Thr Leu Pro
260 265 270

[0008]

Ala Val Phe Gln Met Asp Glu Ile Leu Tyr Glu Leu Arg Asp His Ser
275 280 285

Val Gly Leu Asn Cys Gly Arg Trp Asp Tyr Ile Phe Ser Tyr Val Lys
290 295 300

Thr Phe Gln Ala His Leu Asp Arg Leu Leu Pro Asp Arg Val Gln Val
305 310 315 320

Gly Met Ala Gln His Phe Met Arg Ser Tyr Ser Asp Leu Leu Ile Arg
325 330 335

Thr Cys His Thr Val Val Cys His Val Gly Gly Met Ala Ala Gln Ile
340 345 350

Pro Ile Arg Asp Asp Pro Lys Ala Asn Glu Met Ala Leu Glu Leu Val
355 360 365

Arg Lys Asp Lys Leu Arg Glu Ala Lys Ala Gly His Asp Gly Thr Trp
370 375 380

Ala Ala His Pro Gly Leu Ile Pro Ala Cys Met Glu Val Phe Thr Asn
385 390 395 400

Ser Met Gly Asn Ala Pro Asn Gln Ile Arg Ser Ala Arg Arg Asp Asp
405 410 415

Ala Ala Asn Leu Thr Glu Asp Asp Leu Leu Gln Gln Pro Arg Gly Val
420 425 430

Arg Thr Leu Glu Gly Leu Arg Leu Asn Thr Arg Val Gly Ile Gln Tyr
435 440 445

[0009]

Leu Ala Ala Trp Leu Thr Gly Thr Gly Ser Val Pro Leu Tyr Asn Leu
450 455 460

Met Glu Asp Ala Ala Thr Ala Glu Ile Ser Arg Val Gln Asn Trp Gln
465 470 475 480

Trp Leu Lys Tyr Gly Val Glu Leu Asp Gly Asp Gly Leu Gly Val Arg
485 490 495

Val Asn Lys Glu Leu Phe Ala Arg Val Val Glu Glu Glu Met Glu Arg
500 505 510

Ile Glu Arg Glu Val Gly Lys Glu Lys Phe Arg Lys Gly Met Tyr Lys
515 520 525

Glu Ala Cys Lys Met Phe Thr Arg Gln Cys Thr Ala Pro Thr Leu Asp
530 535 540

Asp Phe Leu Thr Leu Asp Ala Tyr Asn His Ile Val Ile His His Pro
545 550 555 560

Arg Glu Leu Ser Arg Leu
565

<210> 5

<211> 2262

<212> DNA

<213> 大肠杆菌

<400> 5

atgtcgcaac ataacgaaaa gaaccacat cagcaccagt caccactaca cgattccagc 60

gaagcgaaac cggggatgga ctactggca cctgaggacg gctctcatcg tccagcggct 120

gaaccaaacac cgccaggtgc acaacctacc gcccaggga gcctgaaagc ccctgatacg 180

[0010]

cgtaacgaaa aacttaattc tctggaagac gtacgcaaag gcagtgaaaa ttatgcgctg	240
accactaatc agggcgtgcg catcgccgac gatcaaaact cactgcgtgc cggtagccgt	300
ggtccaacgc tgctggaaga ttttattctg cgcgagaaaa tcaccactt tgaccatgag	360
cgcattccgg aacgtattgt tcatgcacgc ggatcagccg ctcacggtta tttccagcca	420
tataaaagct taagcgatat taccaaagcg gatttcctct cagatccgaa caaaatcacc	480
ccagtatttg tacgtttctc taccgttcag ggtggtgctg gctctgctga taccgtgcgt	540
gatatccgtg gctttgccac caagttctat accgaagagg gtatitttga cttcgttggc	600
aataacacgc caatcttctt tatccaggat gcgcataaat tccccgattt tgttcatgcg	660
gtaaaaccag aaccgcactg ggcaattcca caagggcaaa gtgcccacga tactttctgg	720
gattatgttt ctctgcaacc tgaaactctg cacaacgtga tgtgggcgat gtcggatcgc	780
ggcatcccc gcagttaccg caccatggaa ggcttcggta ttcacacctt ccgcctgatt	840
aatgccgaag ggaaggcaac gtttgtacgt ttccactgga aaccactggc aggtaaagcc	900
tcactcgttt gggatgaagc aaaaaactc accggacgtg acccggactt ccaccgccgc	960
gagtgtgtgg aagccattga agcaggcgat tttccggaat acgaactggg cttccagttg	1020
attccigaag aagatgaatt caagttcgac ttcgatcttc tcgatccaac caaacttacc	1080
ccggaagaac tgggtcccgt tcagcgtgtc ggcaaaatgg tgctcaatcg caaccggat	1140
aacttccttg ctgaaaacga acaggcggtt ttccatcctg ggcatatcgt gccgggactg	1200
gacttcacca acgatccgct gttgcaggga cgtttgttct cctataccga tacacaaatc	1260
agtcgtcttg gtgggccgaa ttccatgag attccgatta accgtccgac ctgcccttac	1320
cataatttcc agcgtgacgg catgcatcgc atggggatcg acactaacc ggcaattac	1380
gaaccgaact cgattaacga taactggccg cgcgaaacac cgccggggcc gaaacgcggc	1440
ggttttgaat cataccagga gcgcgtggaa ggcaataaag ttcgcgagcg cagcccatcg	1500

[0011]

```

tttggcgaat attattccca tccgcgtctg ttctggctaa gtcagacgcc atttgagcag      1560
cgccatattg tcgatggttt cagttttgag ttaagcaaag tcgttcgtcc gtatattcgt      1620
gagcgcgttg ttgaccagct ggcgcatatt gatctcactc tggcccaggc ggtggcgaaa      1680
aatctcggta tcgaactgac tgacgaccag ctgaataica cccacacctc ggacgtcaac      1740
ggtctgaaaa aggatccatc cttaagtttg tacgccattc ctgacggtga tgtgaaaggt      1800
cgcgtggtag cgattttact taatgatgaa gtgagatcgg cagaccttct ggccattctc      1860
aaggcgctga aggccaaagg cgttcatgcc aaactgctct actcccgaat gggatgaagt      1920
actgcggatg acgggtacgg gttgcctata gccgctacct ttgccggtgc accttcgctg      1980
acggtcgatg cggtcattgt cccttgcggc aatatcgcgg atatcgctga caacggcgat      2040
gccaactact acctgatgga agcctacaaa caccttaaac cgattgcgct ggcggggtgac      2100
gcgcgcaagt ttaaagcaac aatcaagatc gctgaccagg gtgaagaagg gattgtggaa      2160
gctgacagcg ctgacggtag ttttatggat gaactgctaa cgctgatggc agcacaccgc      2220
gtgtggtcac gcattcctaa gattgacaaa attcctgcct ga                          2262

```

<210> 6

<211> 753

<212> PRT

<213> 大肠杆菌

<400> 6

```

Met Ser Gln His Asn Glu Lys Asn Pro His Gln His Gln Ser Pro Leu
1              5              10              15

```

```

His Asp Ser Ser Glu Ala Lys Pro Gly Met Asp Ser Leu Ala Pro Glu
              20              25              30

```

```

Asp Gly Ser His Arg Pro Ala Ala Glu Pro Thr Pro Pro Gly Ala Gln
              35              40              45

```

[0012]

Pro Thr Ala Pro Gly Ser Leu Lys Ala Pro Asp Thr Arg Asn Glu Lys
50 55 60

Leu Asn Ser Leu Glu Asp Val Arg Lys Gly Ser Glu Asn Tyr Ala Leu
65 70 75 80

Thr Thr Asn Gln Gly Val Arg Ile Ala Asp Asp Gln Asn Ser Leu Arg
85 90 95

Ala Gly Ser Arg Gly Pro Thr Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Arg Glu
100 105 110

Lys Ile Thr His Phe Asp His Glu Arg Ile Pro Glu Arg Ile Val His
115 120 125

Ala Arg Gly Ser Ala Ala His Gly Tyr Phe Gln Pro Tyr Lys Ser Leu
130 135 140

Ser Asp Ile Thr Lys Ala Asp Phe Leu Ser Asp Pro Asn Lys Ile Thr
145 150 155 160

Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala
165 170 175

Asp Thr Val Arg Asp Ile Arg Gly Phe Ala Thr Lys Phe Tyr Thr Glu
180 185 190

Glu Gly Ile Phe Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe Phe Ile
195 200 205

Gln Asp Ala His Lys Phe Pro Asp Phe Val His Ala Val Lys Pro Glu
210 215 220

[0013]

Pro His Trp Ala Ile	Pro Gln Gly Gln Ser	Ala His Asp Thr Phe Trp
225	230	235 240

Asp Tyr Val Ser Leu Gln	Pro Glu Thr Leu His	Asn Val Met Trp Ala
245	250	255

Met Ser Asp Arg Gly Ile	Pro Arg Ser Tyr Arg	Thr Met Glu Gly Phe
260	265	270

Gly Ile His Thr Phe Arg	Leu Ile Asn Ala Glu	Gly Lys Ala Thr Phe
275	280	285

Val Arg Phe His Trp Lys	Pro Leu Ala Gly Lys	Ala Ser Leu Val Trp
290	295	300

Asp Glu Ala Gln Lys Leu	Thr Gly Arg Asp Pro	Asp Phe His Arg Arg
305	310	315 320

Glu Leu Trp Glu Ala Ile	Glu Ala Gly Asp Phe	Pro Glu Tyr Glu Leu
325	330	335

Gly Phe Gln Leu Ile Pro	Glu Glu Asp Glu Phe	Lys Phe Asp Phe Asp
340	345	350

Leu Leu Asp Pro Thr Lys	Leu Ile Pro Glu Glu	Leu Val Pro Val Gln
355	360	365

Arg Val Gly Lys Met Val	Leu Asn Arg Asn Pro	Asp Asn Phe Phe Ala
370	375	380

Glu Asn Glu Gln Ala Ala	Phe His Pro Gly His	Ile Val Pro Gly Leu
385	390	395 400

[0014]

Asp Phe Thr Asn Asp Pro Leu Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr Thr
 405 410 415

Asp Thr Gln Ile Ser Arg Leu Gly Gly Pro Asn Phe His Glu Ile Pro
 420 425 430

Ile Asn Arg Pro Thr Cys Pro Tyr His Asn Phe Gln Arg Asp Gly Met
 435 440 445

His Arg Met Gly Ile Asp Thr Asn Pro Ala Asn Tyr Glu Pro Asn Ser
 450 455 460

Ile Asn Asp Asn Trp Pro Arg Glu Thr Pro Pro Gly Pro Lys Arg Gly
 465 470 475 480

Gly Phe Glu Ser Tyr Gln Glu Arg Val Glu Gly Asn Lys Val Arg Glu
 485 490 495

Arg Ser Pro Ser Phe Gly Glu Tyr Tyr Ser His Pro Arg Leu Phe Trp
 500 505 510

Leu Ser Gln Thr Pro Phe Glu Gln Arg His Ile Val Asp Gly Phe Ser
 515 520 525

Phe Glu Leu Ser Lys Val Val Arg Pro Tyr Ile Arg Glu Arg Val Val
 530 535 540

Asp Gln Leu Ala His Ile Asp Leu Thr Leu Ala Gln Ala Val Ala Lys
 545 550 555 560

Asn Leu Gly Ile Glu Leu Thr Asp Asp Gln Leu Asn Ile Thr Pro Pro
 565 570 575

[0015]

Pro Asp Val Asn Gly Leu Lys Lys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Tyr Ala
580 585 590

Ile Pro Asp Gly Asp Val Lys Gly Arg Val Val Ala Ile Leu Leu Asn
595 600 605

Asp Glu Val Arg Ser Ala Asp Leu Leu Ala Ile Leu Lys Ala Leu Lys
610 615 620

Ala Lys Gly Val His Ala Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Met Gly Glu Val
625 630 635 640

Thr Ala Asp Asp Gly Thr Val Leu Pro Ile Ala Ala Thr Phe Ala Gly
645 650 655

Ala Pro Ser Leu Thr Val Asp Ala Val Ile Val Pro Cys Gly Asn Ile
660 665 670

Ala Asp Ile Ala Asp Asn Gly Asp Ala Asn Tyr Tyr Leu Met Glu Ala
675 680 685

Tyr Lys His Leu Lys Pro Ile Ala Leu Ala Gly Asp Ala Arg Lys Phe
690 695 700

Lys Ala Thr Ile Lys Ile Ala Asp Gln Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu
705 710 715 720

Ala Asp Ser Ala Asp Gly Ser Phe Met Asp Glu Leu Leu Thr Leu Met
725 730 735

Ala Ala His Arg Val Trp Ser Arg Ile Pro Lys Ile Asp Lys Ile Pro
740 745 750

[0016]

Ala

<210> 7

<211> 1704

<212> DNA

<213> 拟南芥

<400> 7

atggccttcg cttcaaaatt cgctcggttct aaaactattc tctcttttct ccggccttgt	60
cgtcagctcc actcgacgcc caagtcaacc ggtgacgtga ccgtacttcc tccgggtgaag	120
ggacgccgga gacttccaac ttgctgggtcg agctctctgt tcccattggc gatagctgcc	180
tccgccactt ctttcgctta cctgaatctg tcgaatcctt ctatcagtga atcatcatcg	240
gctttggatt caagagatat aactgttggg gaaaagata gcactgaagc tgttggttaa	300
ggagaataca aacaagtccc taaggagctt atttctcaat tgaaaactat cctcgaggat	360
aacttgacaa ctgactacga tgagaggtac ttccatggga agccccagaa cagttttcac	420
aaggcagtc aatttctga tgcgttggg ttccctaggt ccgaagaaga agtctccaag	480
attcttaaatt cctgcaatga atataagggt cctattgtac catatgggtg ggcaacatcg	540
atcgagggtc atacccttgc tccaaaagga ggtgtgtgca ttgacatgtc attaatgaag	600
agggtgaaag cattacatgt ggaggatatg gatgttattg ttgagcctgg aattggttgg	660
ctggagctta atgaatattt ggaagagtat ggtctattct ttcctcttga tccaggacct	720
ggtgcctcca taggaggcat gtgtgctacg cgttgctctg gctcttttagc tgtaaggtat	780
ggaactatgc gtgacaatgt tataagcctc aagggtgttc ttcctaattg agatgttgtg	840
aagacagctt cacgtgccag aaagagtgtc gctggatacg atttgactcg cttgataatt	900
gggagtgagg gtactttagg agtcattact gagattactc tccgacttca gaaaatccca	960

[0017]

cagcattcag tggtaggcagt ttgcaatttc cctacagtta aggatgctgc agacgtggcc	1020
attgccacta tgatgtctgg aatacagggtg tcaagagtgg aactccttga cgaggttcaa	1080
atcagagcta ttaatatggc aaacgggaaa aatttgactg aagctccaac tctgatgttc	1140
gagtttatag gaacagaggc atatacacgt gagcagacgc aaattgttca gcaaattgct	1200
tccaaacaca atggatcaga ctttatgttc gcagaagaac ctgaagcaaa aaaagaactc	1260
tggaagataa gaaaagaggc gctgtgggct tgctatgcta tggcgccagg tcatgaagca	1320
atgattacag atgtctgtgt ccccttatct caccttgacg aactcatatc aagatccaaa	1380
aaagagcttg atgcatcatc gttgttgtgt accgttattg ctcatgccgg agatggaaac	1440
ttcacacat gtattatgtt tgatccaagc agtgaagagc agagaagaga agcagaaaga	1500
ctgaaccact ttatgggtca cagtgcactg tccatggatg gaacatgtac tggagaacac	1560
ggtgttgga caggaaaaat gaagtatctg gagaaggaac tgggaataga agcactgcaa	1620
actatgaaga gaatcaagaa aacgttggac ccaaacgata tcatgaaccc gggaaagtta	1680
attcctcctc atgtatgttt ctaa	1704

<210> 8

<211> 567

<212> PRT

<213> 拟南芥

<400> 8

Met	Ala	Phe	Ala	Ser	Lys	Phe	Ala	Arg	Ser	Lys	Thr	Ile	Leu	Ser	Phe
1				5					10					15	

Leu	Arg	Pro	Cys	Arg	Gln	Leu	His	Ser	Thr	Pro	Lys	Ser	Thr	Gly	Asp
			20					25						30	

Val	Thr	Val	Leu	Ser	Pro	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg	Leu	Pro	Thr	Cys
			35					40					45		

[0018]

Trp Ser Ser Ser Leu Phe Pro Leu Ala Ile Ala Ala Ser Ala Thr Ser
50 55 60

Phe Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Asn Pro Ser Ile Ser Glu Ser Ser Ser
65 70 75 80

Ala Leu Asp Ser Arg Asp Ile Thr Val Gly Gly Lys Asp Ser Thr Glu
85 90 95

Ala Val Val Lys Gly Glu Tyr Lys Gln Val Pro Lys Glu Leu Ile Ser
100 105 110

Gln Leu Lys Thr Ile Leu Glu Asp Asn Leu Thr Thr Asp Tyr Asp Glu
115 120 125

Arg Tyr Phe His Gly Lys Pro Gln Asn Ser Phe His Lys Ala Val Asn
130 135 140

Ile Pro Asp Val Val Val Phe Pro Arg Ser Glu Glu Glu Val Ser Lys
145 150 155 160

Ile Leu Lys Ser Cys Asn Glu Tyr Lys Val Pro Ile Val Pro Tyr Gly
165 170 175

Gly Ala Thr Ser Ile Glu Gly His Thr Leu Ala Pro Lys Gly Gly Val
180 185 190

Cys Ile Asp Met Ser Leu Met Lys Arg Val Lys Ala Leu His Val Glu
195 200 205

Asp Met Asp Val Ile Val Glu Pro Gly Ile Gly Trp Leu Glu Leu Asn
210 215 220

[0019]

Ser Lys His Asn Gly Ser Asp Phe Met Phe Ala Glu Glu Pro Glu Ala
405 410 415

Lys Lys Glu Leu Trp Lys Ile Arg Lys Glu Ala Leu Trp Ala Cys Tyr
420 425 430

Ala Met Ala Pro Gly His Glu Ala Met Ile Thr Asp Val Cys Val Pro
435 440 445

Leu Ser His Leu Ala Glu Leu Ile Ser Arg Ser Lys Lys Glu Leu Asp
450 455 460

Ala Ser Ser Leu Leu Cys Thr Val Ile Ala His Ala Gly Asp Gly Asn
465 470 475 480

Phe His Thr Cys Ile Met Phe Asp Pro Ser Ser Glu Glu Gln Arg Arg
485 490 495

Glu Ala Glu Arg Leu Asn His Phe Met Val His Ser Ala Leu Ser Met
500 505 510

Asp Gly Thr Cys Thr Gly Glu His Gly Val Gly Thr Gly Lys Met Lys
515 520 525

Tyr Leu Glu Lys Glu Leu Gly Ile Glu Ala Leu Gln Thr Met Lys Arg
530 535 540

Ile Lys Lys Thr Leu Asp Pro Asn Asp Ile Met Asn Pro Gly Lys Leu
545 550 555 560

Ile Pro Pro His Val Cys Phe
565

[0021]

<210>	9	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<220>		
<223>	G0 正义引物	
<400>	9	
	tacaattgga gatcactaac gttaccgagt	30
<210>	10	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<220>		
<223>	G0 反义引物 1	
<400>	10	
	tgggacactc cacgtcctta gtctagacta gta	33
<210>	11	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<220>		
<223>	MS 正义引物	
<400>	11	
	acaccggtcg ctgggaatgt attctgaatc ggca	34
<210>	12	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<220>		

[0022]

<223> MS 反义引物 1

<400> 12

cacataggca tacatcatcc caggtgagtc gacgtt

36

<210> 13

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> KatE 正义引物 1

<400> 13

acaccggtcg caacataacg aaaagaaccc a

31

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> KatE 反义引物 1

<400> 14

acgtcgactc aggcaggaat tttgtcaatc t

31

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工合成

<220>

<223> PGM 正义引物

<400> 15

taggtaccca atcaacaatg acgtcgacct ac

32

<210> 16

<211> 32

[0023]

<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> PGM 反义引物	
<400> 16	
gagattaaat cgttgccgac gaagcaattg ta	32
<210> 17	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> rbcS3C 正义引物	
<400> 17	
acgagctcat ccagaattgg cgttgatta	30
<210> 18	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工合成	
<220>	
<223> rbcS3C 反义引物	
<400> 18	
agcaacggtg gaagagtcag ttgcaaccgg tat	33

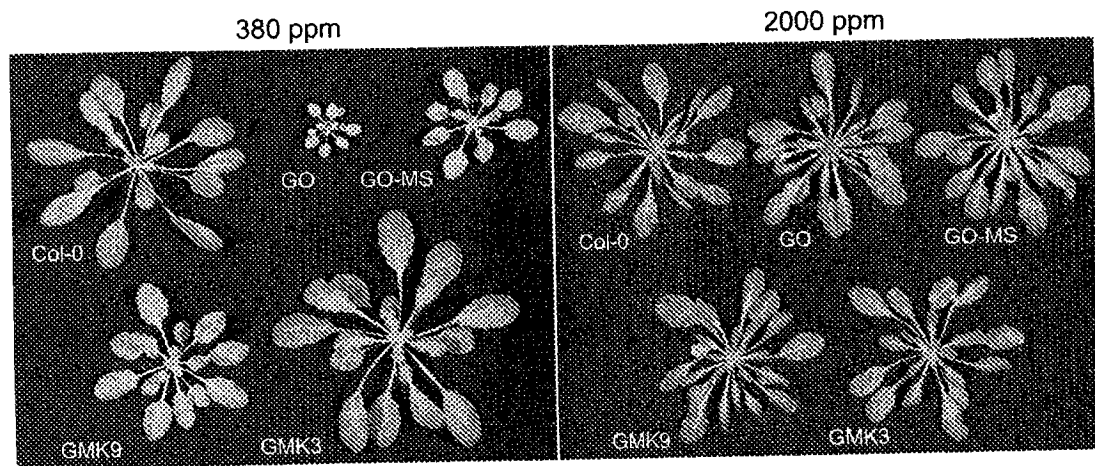


图 3

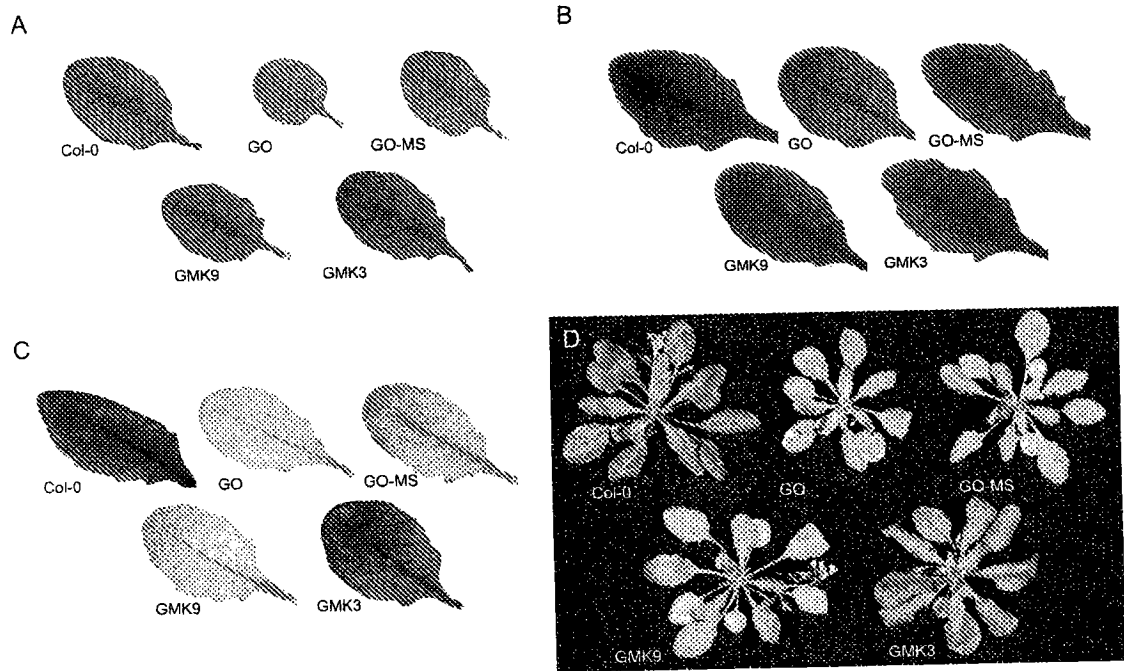


图 4