



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103966279 B

(45)授权公告日 2018.07.13

(21)申请号 201410108640.4

(22)申请日 2010.11.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103966279 A

(43)申请公布日 2014.08.06

(30)优先权数据
61/280,635 2009.11.06 US
12/590,444 2009.11.06 US
61/398,589 2010.06.28 US

(62)分案原申请数据
201080060542.8 2010.11.05

(73)专利权人 谷万达公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R·M·莱布 O·布格瑞
V·萨莫伊洛夫 N·埃克堡

(74)专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司 11283

代理人 李婉婉 张苗

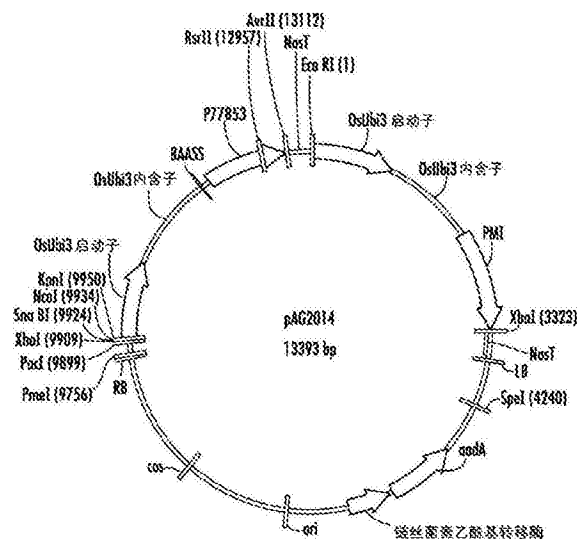
(51)Int.Cl.
C12P 19/14(2006.01)
C12P 19/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 101200734 A,2008.06.18,
US 20020138878 A1,2002.09.26,
审查员 徐丹

权利要求书2页 说明书47页
序列表(电子公布) 附图41页

(54)发明名称
一种处理植物生物量的方法

(57)摘要
本发明公开了一种处理植物生物量的方法,该方法包括:通过将植物或其部分与液体混合,形成液固比小于或等于15的混合物,并提供条件使所述混合物的温度保持在小于或等于100℃,从而对植物或其部分进行预处理;以及提供一种或多种酶,以进行木质纤维素材料的酶促水解;其中,所述植物为转基因植物,选自:通过使用质粒由农杆菌介导的转化制得的转基因植物,所述质粒含有与SEQ ID NOS:206、207、209-230和232-279之一的序列具有至少90%的同一性的核苷酸序列;含有细胞壁降解酶的转基因植物;和含有核酸的转基因植物。本发明的方法能够有效地提高植物生物量。



1. 一种处理植物生物量的方法,该方法包括:

通过将植物或其部分与液体混合,形成液固比为8-10的混合物,并使所述混合物的温度保持在40-90℃,从而对植物或其部分进行预处理;其中,所述液体含有水、亚硫酸氢铵和碳酸铵,按照wt./wt.计算,以所述植物或其部分为基准,所述亚硫酸氢铵的浓度是8%-38%,所述碳酸铵的浓度是4%-19%;以及

添加两种或多种至少包括内切葡聚糖酶和β-葡糖苷酶的酶,以进行木质纤维素材料的酶促水解;

其中,所述植物为转基因植物,含有木聚糖酶,所述木聚糖酶的氨基酸序列选自SEQ ID NO: 44-59、85、87、89、91、106或111。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述预处理的步骤包括保持温度在40-90℃至少4小时。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述液体的pH为7.6-8.5。

4. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,所述添加两种或多种酶的步骤包括添加内切葡聚糖酶、β-葡糖苷酶和纤维二糖水解酶。

5. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,所述添加两种或多种酶的步骤还包括添加木聚糖酶。

6. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,所述转基因植物是玉米、柳枝稷、芒草、甘蔗和高粱中的一种。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述转基因植物是玉米。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述转基因植物是柳枝稷。

9. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO: 45和57-59中的一种。

10. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,所述氨基酸序列为SEQ ID NO: 111。

11. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,所述氨基酸序列选自SEQ ID NO: 47、87和91中的一种。

12. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,所述氨基酸序列为SEQ ID NO: 47。

13. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,所述预处理的步骤中保持混合物的温度为40℃。

14. 根据权利要求1-3中任意一项所述的方法,其中,在转基因植物中木聚糖酶在水稻泛素3启动子的控制下表达。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述氨基酸序列为SEQ ID NO: 44、46-58、85、89、91和111中的一种。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中,在转基因植物中木聚糖酶在水稻泛素3启动子的控制下表达。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中,所述氨基酸序列为SEQ ID NO: 44、48-53、57和58中的一种,且在转基因植物中木聚糖酶在水稻泛素3启动子的控制下表达。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述氨基酸序列为SEQ ID NO: 87、89和91中的

一种。

19. 根据权利要求5所述的方法, 其中, 所述添加两种或多种酶的步骤还包括添加纤维二糖水解酶。

一种处理植物生物量的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请为申请日为2010年11月5日、申请号为201080060542.8、名称为“表达细胞壁降解酶的植物以及表达载体”的中国发明专利申请的分案申请。

[0003] 本申请要求以2009年11月6日提交的美国临时申请No.61/280,635和2010年6月28日提交的美国临时申请No.61/398,589作为优先权基础,这两个临时申请的全部内容通过援引的方式纳入本文。本申请还是2009年11月6日提交的美国申请No.12/590,444的部分继续申请,该申请的全部内容通过援引的方式纳入本文。

[0004] 本申请的序列表与本申请一起以电子方式提交,名称为“序列表”,创建于2010年11月5日,其大小为2,215,456字节,序列表的全部内容通过援引的方式纳入本文。

技术领域

[0005] 本发明公开内容涉及表达细胞壁降解酶的植物、载体、核酸、蛋白质、相关方法及其应用。

背景技术

[0006] 水解酶具有重要的工业和农业应用,但是它们依赖于表达宿主的表达和生产可能会产生不良的表型效应。具体而言,当在植物中表达时,细胞壁降解酶,例如纤维素酶、木聚糖酶、木质酶、酯酶、过氧化物酶以及其它水解酶,的表达常常对生长、生理以及农艺性质产生不利影响。由于其中的一些酶的水解活性,它们在微生物宿主中的表达可能较弱。

发明内容

[0007] 一方面,本发明涉及转基因植物,所述转基因植物包括一种核酸,所述核酸编码与选自SEQ ID NOS:44-115的序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[0008] 一方面,本发明涉及转基因植物,所述转基因植物包括在中严格度条件下能够与第二核酸杂交的第一核酸,所述第二核酸由选自SEQ ID NOS:116-187的核苷酸序列或其互补序列构成。

[0009] 一方面,本发明涉及包括第一核酸的载体,所述第一核酸在低、中或高严格度之一的条件下能够与由SEQ ID NOS:116-187的一个序列组成的第二核酸杂交。

[0010] 一方面,本发明涉及包括核酸的载体,所述核酸具有与选自SEQ ID NOS:188-283的参照序列具有至少90%同一性的序列。

[0011] 一方面,本发明涉及处理植物生物量的方法。所述方法包括通过将植物或其部分与液体混合形成液固比小于或等于15的混合物,从而对植物或其部分进行预处理。所述预处理还包括提供条件以在小于或等于100°C的温度下保持混合物。所述方法还包括提供一种或多种酶用来修饰植物或其部分的至少一种组分。

[0012] 一方面,本发明涉及处理植物生物量的方法,该方法包括:通过将植物或其部分与液体混合,形成液固比小于或等于15的混合物,并提供条件使所述混合物的温度保持在小

于或等于100℃,从而对植物或其部分进行预处理;以及提供一种或多种酶,以进行木质纤维素材料的酶促水解;其中,所述植物为转基因植物,所述转基因植物选自以下组成的组:通过使用质粒由农杆菌介导的转化制得的转基因植物,所述质粒含有与SEQ ID NOS:206、207、209-230和232-279之一的序列具有至少90%的同一性的核苷酸序列由权利要求15-19和22-29中任意一项所述的方法制备得到的转基因植物;含有细胞壁降解酶的转基因植物,所述细胞壁降解酶具有与选自SEQ ID NOS:44-115的序列具有至少90%的同一性的氨基酸序列;和,含有核酸的转基因植物,所述核酸具有与选自SEQ ID NOS:116-187的序列具有至少90%的同一性的序列。

附图说明

[0013] 本专利或申请文件包括至少一个彩色附图。根据要求和支付必要的费用,官方将会提供本专利的副本或带有彩色附图的专利申请出版物。

[0014] 结合附图将会更好地理解下述对本发明的优选实施方式的具体说明。为了阐明本发明,在附图中显示了目前优选的实施方式。然而,应该理解的是本发明并不局限于所显示的精确的设置和手段。附图如下所示:

[0015] 图1为pSB11的载体图谱。

[0016] 图2A为AG1000的载体图谱。

[0017] 图2B为pAG1001的载体图谱。

[0018] 图2C为pAG1002的载体图谱。

[0019] 图3A为pAG1003的载体图谱。

[0020] 图3B为pAG2000的载体图谱。

[0021] 图3C为pAG2004的载体图谱。

[0022] 图4为pAG2014的载体图谱。

[0023] 图5为pBSK:0sUbi3P:XmaI:AvrII:NosT的载体图谱。

[0024] 图6为pBSK:0sUbi3P:XmaI:AvrII:NosT:L1的载体图谱。

[0025] 图7显示登录号为P40942、P77853以及030700的三种木聚糖酶的比活性。

[0026] 图8显示不同转基因植物样品表达木聚糖酶P77853的活性。

[0027] 图9显示030700、P77853以及P40942的热稳定性试验。

[0028] 图10为宏观尺度过程的工艺流程图。

[0029] 图11为微观尺度过程的工艺流程图。

[0030] 图12显示来自预处理的玉米秸秆(2015.05和2004.8.4)的酶促水解的葡萄糖和木糖的产率(生物量重量百分比)。

[0031] 图13显示来自预处理的玉米秸秆(2004.8.4、2063.13和2063.17)的酶促水解的葡萄糖和木糖的产率(生物量重量百分比)。

[0032] 图14显示来自预处理的玉米秸秆(2015.05和2004.8.4)的酶促水解的葡萄糖和木糖的产率(生物量重量百分比)。

[0033] 图15显示来自预处理的玉米秸秆(2064.17和2004.8.4)的酶促水解的葡萄糖和木糖的产率(生物量重量百分比)。

[0034] 图16显示来自预处理的玉米秸秆(2042.02、2042.03、2042.06和2004.8.4)的酶促

水解的葡萄糖的产率(生物量重量百分比)。

- [0035] 图17A显示用pAG3000制备的转基因植物。
- [0036] 图17B显示用pAG3001制备的转基因植物。
- [0037] 图18A显示用pAG2004制备的转基因植物。
- [0038] 图18B显示来自pAG2004制备的转基因植物的穗轴。
- [0039] 图18C显示来自pAG2004制备的转基因植物的穗轴。
- [0040] 图19A显示用pAG2005制备的转基因植物。
- [0041] 图19B显示用pAG2005制备的转基因植物。
- [0042] 图20显示用pAG2004转化的转基因植物事件#15的还原糖的测量。
- [0043] 图21A显示用pAG2016制备的转基因植物。
- [0044] 图21B显示来自pAG2016制备的转基因植物的穗轴。
- [0045] 图22显示转基因植物的还原糖的测量。
- [0046] 图23显示来自干的、衰老的玉米秸秆样品的酶活性的测量。
- [0047] 图24显示用pAG2015pAG2014或pAG2004制备的转基因植物的叶组织样品的酶活性的测量。
- [0048] 图25A显示用pAG2014制备的转基因植物。
- [0049] 图25B显示用pAG2014制备的转基因植物。
- [0050] 图25C显示来自pAG2014制备的转基因植物的穗轴。
- [0051] 图26A显示用pAG2015制备的转基因植物。
- [0052] 图26B显示用pAG2015制备的转基因植物。
- [0053] 图26C显示来自pAG2015制备的转基因植物的穗轴。
- [0054] 图26D显示来自pAG2015制备的转基因植物的穗轴。
- [0055] 图27A显示用pAG2020制备的转基因植物。
- [0056] 图27B显示用pAG2020制备的转基因植物。
- [0057] 图27C显示来自pAG2020制备的转基因植物的穗轴。
- [0058] 图28A显示用pAG2025制备的转基因植物。
- [0059] 图28B显示用pAG2025制备的转基因植物。
- [0060] 图28C显示用pAG2025制备的转基因植物。
- [0061] 图29A显示用pAG2017制备的转基因植物。
- [0062] 图29B显示用pAG2017制备的转基因植物。
- [0063] 图29C显示来自pAG2017制备的转基因植物的穗轴。
- [0064] 图29D显示来自pAG2017制备的转基因植物的穗轴。
- [0065] 图30A显示用pAG2019制备的转基因植物。
- [0066] 图30B显示用pAG2019制备的转基因植物与野生型植物的比较。
- [0067] 图31显示用pAG2019或pAG2027制备的转基因植物与野生型植物的比较。左边的三株植物是用pAG2019制备的。右边的三株植物是用pAG2027制备的。
- [0068] 图32A显示左边的用pAG2018制备的两株转基因植物以及右边的两株表达非水解酶的植物。
- [0069] 图32B显示用pAG2018制备的转基因植物。

- [0070] 图32C显示用pAG2018制备的转基因植物。
- [0071] 图33A显示用pAG2026制备的转基因植物。
- [0072] 图33B显示用pAG2026制备的转基因植物。
- [0073] 图33C显示用pAG2026制备的转基因植物。
- [0074] 图34A显示用pAG2021制备的转基因植物。
- [0075] 图34B显示用pAG2021制备的转基因植物。
- [0076] 图34C显示来自pAG2021制备的转基因植物的穗轴。
- [0077] 图34D显示来自pAG2021制备的转基因植物的穗轴。
- [0078] 图35A显示用pAG2022制备的转基因植物。
- [0079] 图35B显示用pAG2022制备的转基因植物。
- [0080] 图35C显示来自pAG2022制备的转基因植物的穗轴。
- [0081] 图36A显示用pAG2023制备的转基因植物。
- [0082] 图36B显示用pAG2023制备的转基因植物。
- [0083] 图36C显示用pAG2023制备的转基因植物。
- [0084] 图37A显示用pAG2024制备的转基因植物。
- [0085] 图37B显示用pAG2024制备的转基因植物。
- [0086] 图37C显示用pAG2024制备的转基因植物。
- [0087] 图38显示来自一些pAG2021事件的活性数据,以及来自pAG2004事件(木聚糖酶活性的阴性对照)和pAG20014事件(木聚糖酶活性的阳性对照)的测量。

具体实施方式

[0088] 下述说明书中使用了特定的术语,但这仅是为了方便而并非为了限制。词语“右”、“左”、“顶部”以及“底部”指定了附图中的或所引用的具体实施例中的方向。

[0089] 除非特别说明,否则权利要求书和说明书的相应部分中使用的词语“一”和“一个”被定义为包括一个或多个所引用的项目。短语“至少一个”后面的一系列两个或多个项目,如“A、B或C”,指的是A、B、或C中的任何单独的个体,以及它们任意的组合。

[0090] 尽管酶类对于表达宿主具有潜在的不良效应,但是在植物、微生物以及其它生物体中生产酶类在制备燃料、纤维、化学品、糖类、纺织品、纸浆、纸以及动物饲料中能够产生巨大的经济效益。不管是农艺效应或是表型效应,有时候在植物中生产酶类具有经济效益。而且,可使用保护植物免受酶活性影响的各种策略来克服一些表型效应。本文所述的具体实施方式包括但不限于这些策略。

[0091] 植物表达酶的策略可能会依赖于作物的种类。一种特定的酶在一种作物中表达时可能具有很小的或没有价值或效益,但在另一种作物中表达时却具有显著的价值或效益。也就是说,工程植物的性质可能不仅取决于特定的酶,还取决于表达该酶的植物。例如,植物中木聚糖酶的表达能够促进植物细胞壁半纤维素和植物纤维水解为可发酵的糖类(用于生产燃料和化学品)或可消化的糖类(用于生产动物饲料和肉类)。然而,当在玉米中表达时,特异性木聚糖酶也会降低谷物产量并可能导致不育,从而阻止了玉米作为酶表达的宿主的用途。尽管在玉米中木聚糖酶对谷物产量和繁殖会有负面影响,这可能降低工程植物与非工程植物相比的净经济价值,但是同一种木聚糖酶在别的作物如柳枝稷、芒草、甘

蔗或高粱中的表达实际上可能是有益的,这是因为这些作物的不育会阻止木聚糖酶基因的异型杂交,而可以用组织培养或无性繁殖来产生商业用量的植物繁殖体。虽然在玉米中繁殖、谷物产量或干物质生物量的降低可能阻止或降低特定的木聚糖酶的表达的价值,否则特定的木聚糖酶的表达在化学加工和动物饲料工业中将是有价值的,但是同样的酶在柳枝稷、芒草、高粱或甘蔗中的表达可能不仅提供由酶本身产生的经济价值,而且从监管和安全角度来说也可以具有益处。

[0092] 同样地,当在不同组织中表达,或在不同作物的同一组织中表达时,作物组织中表达的酶的价值可能不同。取决于作物的种类和酶表达所赋予的新性质,特定的作物组织(如谷物、种子、树叶、茎秆、根、花、花粉等)可能具有不同的价值,从而产生了不同的效益。当在玉米中组成型表达时,特异性木聚糖酶和纤维素酶具有显著的农艺效应和表型效应。这些酶单独或结合地组成型表达经常导致矮化植物、不育植物或低产量和农艺性能的植物。然而,特异性木聚糖酶和纤维素酶的种子特异性表达可能降低或消除任何不良农艺效应或产量的降低,却仍然能够提供高水平的酶。这在玉米中是有益的。在柳枝稷、芒草、饲料或甜高粱或甘蔗中生产相同的酶可能导致木聚糖酶或纤维素酶的种子特异性表达具有不同的属性,其中,与玉米相比较时,基于每英亩的谷物产量可能相当低。具体实施方式包括在任何种类转基因植物中的CWDE种子特异性地表达。根据应用,如生产动物饲料、生产肉或乳制品、生产禽肉、生产纸或生产发酵性糖,其中,含有酶的谷物可以与其它收获原料(经预处理的或未经预处理的)混合,这是在玉米或其它谷物和种子中提供有效剂量的酶的非常有效的方式。

[0093] 植物表达酶的净经济价值可能不同,这取决于酶被设计为定位和积累在哪里,以及酶的靶标位置在哪。例如,当特异性木聚糖酶和纤维素酶被靶向至植物细胞壁时,它们可能具有显著的表型效应和农艺效应,但当将它们保持在细胞内或靶向至液泡时,效应就很小或没有效应。将细胞内包含的酶的来源应用到需要把酶和底物混合的情况,可能会创造经济效益。相反,相同的酶可能在混合应用中,如在动物饲料或处理经预处理的生物量中提供价值,这些酶在自处理应用中可能提供很小的价值或不提供价值,其中,对于植物细胞壁的靶向性优选地形成可发酵的糖类或易消化的糖类,但由于表型或农艺效应会产生问题。

[0094] 如上所述,外源酶能够在特定的植物、植物器官、植物组织、植物细胞或植物亚细胞区域或区室中表达。本发明的实施方式包括在植物、植物区域、植物器官、植物组织或植物亚细胞区域或区室中表达外源酶。实施方式还包括具有外源酶的植物,其中,所述外源酶存在于整个植物中或定位于植物区域、植物器官、植物组织或植物亚细胞区域或区室中。可以提供适于或具有外源CWDE在细胞质中积累的转基因植物。可以设计外源酶在植物的什么位置表达以及在何种植物中表达,设计要考虑的因素包括但并不局限于以上所述的表型、安全、经济或监管问题。

[0095] 本发明的实施方式中提供了植物中表达蛋白质的载体。所述蛋白质可以是酶,所述酶可以是但不局限于细胞壁降解酶。提供了一些被设计为表达特异性细胞壁降解酶的植物。所述植物可能具有工业和/或农业应用。提供了制备表达载体和植物的方法和材料。还提供了在工业和农业应用中使用植物的工艺。

[0096] 提供了载体,该载体在植物中(in planta)用于表达细胞壁降解酶(或CWDE)或是内含子修饰的CWDE变体。在一个实施方式中,所述载体适用于双子叶植物的转化。在一个实

施方式中,所述载体适用于单子叶植物的转化。CWDEs可以选自但不限于木聚糖酶、纤维素酶、纤维二糖水解酶、葡糖苷酶、木糖苷酶、阿拉伯糖苷酶(arabinofuranosidase)以及阿魏酸酯酶,其中,载体或植物中的CWDE来自所述CWDEs。在一个实施方式中,CWDE编码序列被嵌入的内含子序列中断。嵌入的内含子序列可能使相应的CWDE的功能失活。在一个实施方式中,载体设计允许嵌入至少三至四个基因表达盒和/或基因沉默盒。每个所述盒可以包括CWDE或内含子修饰的CWDE。

[0097] 在一个实施方式中,在本发明的载体或其构建过程中所使用的遗传元件能够提供至少一种下述特性:植物转化后筛选转基因事件的能力,在细胞中影响基因表达的最佳水平的能力或影响所需亚细胞酶靶向的能力。载体可以包括筛选标记,所述筛选标记可以是但不限于大肠杆菌磷酸甘露糖异构酶(PMI)基因。除了或代替PMI标记的其它可被包括的筛选标记(如但不限于EPSPS、BAR、npt-II、GUS等)是本领域所熟知的。所述载体还可以包括一个或多个启动子。所述启动子可以是组成型的或是整体型的、组织特异性的、种子特异性的、叶子特异性的、器官特异性的、亚细胞区域或区室特异性的或发育阶段特异性的启动子。优选的启动子包括带有第一内含子(登录号为AY954394,SEQ ID NO:1)的水稻泛素3基因启动子(OsUbi3P)或水稻肌动蛋白1基因启动子(登录号为S44221,SEQ ID NO:2)。也可以使用其它组成型启动子,例如但不限于玉米泛素启动子(SEQ ID NO:3),并且用于代替OsUbi3P或水稻肌动蛋白1启动子。泛素3基因启动子和水稻肌动蛋白1基因启动子是组成型和整体型启动子,能够用于在转基因植物中提供基因表达。在载体中还可以提供来自带有自身信号序列的水稻GluB-4基因(登录号为AY427571,SEQ ID NO:4)的谷蛋白启动子。所述谷蛋白启动子是种子特异性启动子。在载体中可以提供其它种子特异性启动子(例如但不限于玉米醇溶蛋白Zc2启动子,SEQ ID NO:5)。为了将酶递送到它们相应的底物或位置为了实现高水平的酶积累(如液泡),在载体中可提供各种靶向信号序列。可在CWDE或编码CWDE的载体中提供的靶向信号序列包括但不限于:PR1a(SEQ ID NO:6,由SEQ ID NO:7的核酸序列编码),BAASS(SEQ ID NO:8,由SEQ ID NO:9的核酸序列编码),以及大麦半胱氨酸蛋白酶(aleurain)(SEQ ID NO:10,由SEQ ID NO:11的核酸编码)。其它可以被包括的靶向序列包括但不限于:内质网(ER)滞留序列SEKDEL(SEQ ID NO:12,由SEQ ID NO:13的核酸编码),以及消减(abridged)序列KDEL(SEQ ID NO:10,由SEQ ID NO:16的核酸编码)。也可以提供不带有靶向序列的酶。可以提供酶以使得它们在细胞质内积累。可以提供转录终止子。本发明的基因表达盒实施例中使用了来自农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)胭脂碱合成酶基因的有效转录终止子序列。

[0098] 在一个实施方式中,提供一种转基因植物,所述转基因植物包括编码CWDE的核酸或编码被至少一个信号序列或内含子修饰的CWDE的核酸。所述编码CWDE的核酸序列可以编码任何CWDE氨基酸序列。编码被至少一个信号序列或内含子修饰的CWDE的核酸序列可以编码任何CWDE氨基酸序列以及至少任何一个信号序列或任何一个内含子。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:44-115的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:44-45、49-54、57-59、85-86、94-96、104-109和113-115的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:47和55的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编

码与选自SEQ ID NOS:46、48和56的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:60-67、70和75的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:68-69、71-74、76-77和112的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:78-84的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:97-103的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:87-93和110-111的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:44、45、49和54的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:45、87、104-106和113的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:50-53、57-59、94-96、104-109和113-115的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:54-56和60-65的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。编码与所引用的参照序列具有小于100%同一性的蛋白质的上述任何核酸可以编码这样一种蛋白质,所述蛋白质和与所引用的参照序列具有100%同一性的蛋白质具有相同或基本相同的活性。可用本领域熟知的测定方法对任何特定的蛋白质的活性进行评估。可以使用在本发明的实施例或实施例的一部分中所述的方法对活性进行评估。所谓基本相同的活性也是本领域所熟知的。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和与所引用的参照序列具有100%同一性的蛋白质相比,其活性差异在20%以内。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和与所引用的参照序列具有100%同一性的蛋白质相比,其活性差异在15%以内。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和与所引用的参照序列具有100%同一性的蛋白质相比,其活性差异在10%以内。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和与所引用的参照序列具有100%同一性的蛋白质相比,其活性差异在5%以内。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和与所引用的参照序列具有100%同一性的蛋白质相比,其活性差异在1%以内。本发明的实施方式中可以单独,或作为其他核酸的一部分,或作为载体的一部分或如上所述作为转基因植物的一部分提供上述核酸。可以用史密斯-沃特曼算法(Smith-Waterman algorithm)测量同一性(Smith TF, Waterman MS(1981), "Identification of Common Molecular Subsequences," *Journal of Molecular Biology* 147:195-197, 该文献的全部内容通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样)。在一个实施方式中,转基因植物可以源自玉米、柳枝稷、芒草、甘蔗或高粱的其中一种。转基因植物可以通过农杆菌介导的转化使用具有如上所述的核酸序列的质粒来制备。所述质粒具有与选自SEQ ID NOS:188-283的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的序列。所述质粒基本上由与选自SEQ ID NOS:188-283的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的序列组成。所述质粒由与选自SEQ ID NOS:188-283的序列具有至少70、72、75、80、85、90、

91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的序列组成。

[0099] 在一个实施方式中,提供一种转基因植物,所述转基因植物包括与编码CWDE或编码被至少一个信号序列或内含子修饰的CWDE的参照核酸相杂交的核酸。编码CWDE的参照核酸序列可以编码任何CWDE氨基酸序列。编码被至少一个信号序列或内含子修饰的CWDE的参照核酸序列可以编码任何CWDE氨基酸序列以及至少任何一个信号序列或任何一个内含子。包括在转基因植物内的核酸可以被称为第一核酸。所述第一核酸能够在低严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:116-187的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。所述第一核酸能够在中严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:116-187的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。所述第一核酸能够在高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:116-187的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。所述第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:116-117、121-126、129-131、157-158、166-168、176-181和185-187的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:119和127的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:118、120和128的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:132-139、142和147的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:140-141、143-146、148-149和184的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:150-156的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:169-175的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:159-165和182-183的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:116、117、121和126的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:117、159、176-178和185的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:122-125、129-131、166-168、176-181和185-187的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。第一核酸能够在低、中或高严格度条件下与由选自SEQ ID NOS:126-128和132-137的核苷酸序列或其互补序列所组成的第二核酸杂交。用于最佳杂交试验的杂交试验和方法的实例在下列书中有记载:由冷泉港实验室的T.Maniatis,E.F.Fritsch,和J.Sambrook撰写的《分子克隆》,1982出版;由F.M.Ausubel,R.Brent,R.E.Kingston,D.D.Moore,J.G.Seidman,J.A.Smith,K.Struhl撰写的《分子生物学中的当前协议(Current Protocols in Molecular Biology)》,卷1,John Wiley&Sons,2000,所述文献通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样。通过示例而不是限制的方式,中严格度条件下的杂交程序如下:在含有6X SSC(Amersco,Inc.,Solon,OH)、0.5% SDS(Amersco,Inc.,Solon,OH)、5X Denhardt溶液(Amersco,Inc.,Solon,OH)、以及100 μ g/mL变性的鲑鱼精DNA(Invitrogen Life Technologies,Inc.,Carlsbad,CA)的溶液中,于68 $^{\circ}$ C预处理含有DNA的过滤器(filters)2-4小时。使用的每平方厘米的膜使用大约0.2mL的预处理的溶液。在相同的溶液中进行杂交并具有以下修饰:使用0.01M EDTA(Amersco,Inc.,Solon,OH)、100 μ g/mL鲑鱼精DNA、以及5-

20 X 10⁶cpm ³²P-标记或荧光标记探针。在杂交混合物中于68°C培养过滤器16-20小时,然后在含有2X SSC和0.1%SDS的溶液中在室温下(25°C±5°C)轻微搅拌清洗过滤器15分钟。用含有0.1X SSC和0.5%SDS的溶液代替清洗液,轻微搅拌下于68°C再培养2小时。涂抹干燥过滤器,暴露于成像器中或通过放射自显影成像(development)。如果需要的话,可以第三次清洗过滤器并再次暴露成像。通过示例而不是限制的方式,低严格度涉及使用低温进行杂交的杂交条件,例如在37°C-60°C之间的温度。通过示例而不是限制的方式,高严格度涉及如上所述的杂交条件,但是不同的是使用高温,例如杂交温度高于68°C。与所引用的参照序列具有小于100%同一性的如上所述的任何核酸可以编码这样一种蛋白质,所述蛋白质和由与所引用的参照序列具有100%同一性的核酸序列编码的蛋白质具有相同或基本相同的活性。可用本领域熟知的测定方法对任何特定的蛋白质的活性进行评估。可以使用在本发明的实施例或实施例的一部分中所述的方法对活性进行评估。所谓基本相同的活性也是本领域所熟知的。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和由与所引用的参照序列具有100%同一性的核酸序列编码的蛋白质相比,其活性差异在20%以内。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和由与所引用的参照序列具有100%同一性的核酸序列编码的蛋白质相比,其活性差异在15%以内。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和由与所引用的参照序列具有100%同一性的核酸序列编码的蛋白质相比,其活性差异在10%以内。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和由与所引用的参照序列具有100%同一性的核酸序列编码的蛋白质相比,其活性差异在5%以内。在一个实施方式中,基本相同的活性是指所述蛋白质的活性和由与所引用的参照序列具有100%同一性的核酸序列编码的蛋白质相比,其活性差异在1%以内。转基因植物可以源自玉米、柳枝稷、芒草、甘蔗或高粱的其中一种。转基因植物可以通过农杆菌介导的转化使用包括任何上述的核酸的质粒制备。

[0100] 在一个实施方式中,提供了一种载体,所述载体包括编码CWDE或编码被至少一个信号序列或内含子修饰的CWDE的核酸。编码CWDE的核酸序列可以编码任何CWDE氨基酸序列。编码被至少一个信号序列或内含子修饰的CWDE的核酸序列可以编码任何CWDE氨基酸序列以及至少任何一个信号序列或任何一个内含子。核酸可以编码与选自SEQ ID NOS:44-115的序列具有至少70、72、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的蛋白质。核酸序列可以在低严格度条件下与由SEQ ID NOS:116-187或其互补序列之一的序列组成的参照核酸杂交。核酸序列可以在中严格度条件下与由SEQ ID NOS:116-187或其互补序列之一的序列组成的参照核酸杂交。核酸序列可以在高严格度条件下与由SEQ ID NOS:116-187或其互补序列之一的序列组成的参照核酸杂交。载体可以包括与选自SEQ ID NOS:188-283的序列具有70、72、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的序列。载体基本上可以由与选自SEQ ID NOS:188-283的序列具有70、72、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的序列组成。载体可以由与选自SEQ ID NOS:188-283的序列具有70、72、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的序列组成。

[0101] 在一个实施方式中,可以将编码SEQ ID NOS:44-115的任何氨基酸序列的至少一部分的分离的核酸、多核苷酸或寡核苷酸用作杂交探针或引物。在一个实施方式中,可以将所述分离的核酸、多核苷酸或寡核苷酸的互补序列用作杂交探针或引物。在一个实施方式

中,可以将包括一个序列的分离的核酸用作杂交探针或引物,所述序列能够在低、中或高严格度条件下与具有SEQ ID NOS:116-187和188-283的或其互补的任何一个序列的核酸的至少一部分杂交。这些分离的核酸、多核苷酸或寡核苷酸具有但不限于10-100、10-90、10-80、10-70、10-60、10-50、10-40、10-35、10-30、10-25、10-20或10-15个核苷酸的长度,或20-30个核苷酸的长度,或25个核苷酸的长度。本文所述的核苷酸序列的长度范围包括在所述范围内的核苷酸序列的每个长度,也包括所述范围的终点。所述核苷酸的长度可以从参照序列内的任何单一位置开始,只要该位置之后的核苷酸长度还能够满足所述长度。在一个实施方式中,在编码选自SEQ ID NOS:44-115其中之一的蛋白质的核酸或其互补序列中,杂交探针或引物与一种核酸具有85-100%、90-100%、91-100%、92-100%、93-100%、94-100%、95-100%、96-100%、97-100%、98-100%、99-100%或100%的互补性,所述核酸具有与所述探针或引物相同的长度并具有选自与所述探针或引物的长度相应的核苷酸的长度的序列。在一个实施方式中,在具有SEQ ID NOS:116-283的其中之一的序列的核酸中,杂交探针或引物与一种核酸具有85-100%、90-100%、91-100%、92-100%、93-100%、94-100%、95-100%、96-100%、97-100%、98-100%、99-100%或100%的互补性,所述核酸具有与所述探针或引物相同的长度并具有选自与所述探针或引物的长度相应的核苷酸的长度的序列。在一个实施方式中,杂交探针或引物沿着它的长度与相应长度的编码SEQ ID NOS:44-115的之一的序列的核酸或所述核酸的互补序列杂交。在一个实施方式中,杂交探针或引物沿着它的长度与相应长度的具有SEQ ID NOS:116-187的之一的序列的核酸或其互补序列杂交。在一个实施方式中,杂交可能在低严格度条件下发生。在一个实施方式中,杂交可能在中严格度条件下发生。在一个实施方式中,杂交可能在高严格度条件下发生。

[0102] 本发明实施方式中的分离的核酸、多核苷酸或寡核苷酸可以包括天然核苷酸、天然核苷酸类似物或合成的核苷酸类似物。本发明实施方式中的核酸、多核苷酸或寡核苷酸可以是包括脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或肽核酸(PNA)的任何种类的核酸。本发明列举的核酸序列被列为DNA序列,但本发明的实施方式还考虑到了其它核酸,包括其中以U替代T的RNA序列。

[0103] 尽管在本发明的实施方式中可以使用未标记的杂交探针或引物,但是杂交探针或引物也可以带有可检测的标记,并能够用于检测、测序或合成核酸。示例性标记包括但不限于:放射性核素、光吸收性化学基团、染料以及荧光基团。标记可以是荧光基团,如6-羧基荧光素(FAM)、6-羧基-4,7,2',7'-四氯荧光素(TET)、罗丹明、JOE(2,7-二甲氧基-4,5-二氯-6-羧基荧光素)、HEX(六氯-6-羧基荧光素)或VIC。

[0104] 在一个实施方式中,提供了处理植物生物量的方法。所述方法可以包括通过将植物或其部分与液体混合形成液固比小于或等于15的混合物,来预处理植物或其部分。所述预处理可以包括提供条件以保持混合物在小于或等于100°C的温度下。所述方法可以包括提供一种或多种酶的步骤。植物生物量可以是或源自任何植物或其部分。植物生物量可以是或源自本发明所描述、说明或要求保护的任意转基因植物或其部分。所述方法可以包括不是本发明所描述、说明或要求保护的任意转基因植物或其部分,并且与本发明所描述、说明或要求保护的任意转基因植物或其部分相结合。混合物中的液固比的比值可以小于或等于25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1。液固比可以是8或更小。液固比可以是8。预处理的步骤可以包括保持温度小于或等于100°C至少4小

时。预处理的步骤可以包括保持温度40℃-90℃。制备混合物所使用的液体可以是任何液体。在一个实施方式中,所述液体是水。在一个实施方式中,所述液体包括水、亚硫酸氢铵以及碳酸铵。亚硫酸氢铵可以是任何适合的浓度。在一个实施方式中,亚硫酸氢铵的浓度值为植物或其部分的8%-38%重量百分比(包括端点的浓度值)。碳酸铵可以是任何适合的pH。在一个实施方式中,碳酸铵的pH在7.6-8.5范围内,包括端点的pH值。碳酸铵的浓度可以是任何适合的浓度。在一个实施方式中,碳酸铵的浓度值为植物或其部分的4%-19%重量百分比(包括端点的浓度值)。所述提供一种或多种酶的步骤可以包括提供任何适合处理植物生物量的酶。在一个实施方式中,所述一种或多种酶包括至少一种能够水解木质素纤维物质的酶。在一个实施方式中,一种或多种酶包括内切葡聚糖酶、 β -葡糖苷酶、纤维二糖水解酶或木聚糖酶中的至少一种。在一个实施方式中,一种或多种酶包括木聚糖酶、纤维素酶、纤维二糖水解酶、葡糖苷酶、木糖苷酶、阿拉伯糖苷酶(arabinofuronosidase)或阿魏酸酯酶中的至少一种。在一个实施方式中,所述方法包括提供一种或多种酶的步骤,其中所述一种或多种酶不是木聚糖酶,然后将添加木聚糖酶作为另外的步骤。

[0105] 本发明的任何单一的实施方式可以用本发明任何一个或多个其它实施方式中的一个或多个要素进行补充。

[0106] 实施例——提供下述非限制性的实施例以说明具体的实施方式。整个实施方式都可以用下面任何一个或多个实施例中的一个或多个细节进行补充。

[0107] 实施例1-pSB11

[0108] 参见图1,本发明的一个实施方式中的载体可以以pSB11中间质粒(pBR322的一种衍生物)为基础。pSB11从日本烟草公司(Japan Tobacco)获得。pSB11质粒适合克隆并容易在大肠杆菌中维持。通过使用pSB11与pSB1“超二元”受体载体(非致瘤Ti质粒)中都存在的cos和ori位点进行的同源重组,从而将两个载体相偶联,能够维持在LB4404农杆菌菌株内。集成产品代表了能够用于随后的植物转化的杂交载体。pSB1包括毒力基因如virB、virC和virG,这些基因对于T-DNA的处理和送递至植物细胞是必需的。pSB11具有多重克隆位点,所述克隆位点包括用于克隆带有目标基因序列的表达盒的独特的限制性酶识别位点。

[0109] 实施例2-pAG1000

[0110] 参见图2A,通过对pSB11进行修饰以便使其能够接受几个基因表达盒,从而形成pAG1000。首先,从pNOV2819质粒(Syngenta Biotechnology)中克隆出原始表达盒,并以HindIII-KpnI片段的形式克隆至pSB11中以形成pAG1000,所述原始表达盒包括阳性筛选标记基因manA,所述基因编码由夜香木黄曲叶病毒启动子(CMPS)驱动的磷酸甘露糖异构酶(PMI)。

[0111] 实施例3-pAG1001,pAG1002和pAG1003

[0112] 通过将pAG1000进一步修饰,移除EcoRI位点(核苷酸位置#7)从而形成pAG1001(图2B),然后移除KpnI位点(核苷酸位置#1)从而形成pAG1002(图2C)。这些修饰使得EcoRI和KpnI位点可以用于后续克隆带有所关注基因(GOI)的表达盒。参见图3A,下述的新多重克隆位点(MCS)序列,包括PacI、XhoI、SnaBI、NcoI、KpnI、XmaI、AvrII、EcoRI位点,是通过PCR合成为249bp的PmeI-HindIII片段,并被克隆至pAG1002的PmeI-HindIII位点中,从而提供pAG1003载体。

[0113]

>MCS

GTTTAAACTGAAGGCGGGAAAACGACAACCTGATCATGAGCGGAGAATTAAGGGAGTCACG
 TEATGACCCCGCCGATGACGCGGGACAAGCCGTTTACGTTTGGAACTGACAGAACCGC
 AACGTTGAAGGAGCCACTCAGCTTAATTAAGTCTAACCTCGAGTTACTGGTACGTACCAAAT
 CCATGGAATCAAGGTACCATCAATCCCGGGTATTCATCCTAGGTATCCAAGAATTCATACT
 AAAGCTT (SEQ ID NO: 17)

[0114] 实施例4-pAG2000

[0115] 参见图3B,可以通过用水稻泛素3启动子(SEQ ID NO:1)代替pAG1003中的病毒CMPS启动子来提供高表达水平,水稻泛素3启动子(SEQ ID NO:1)是一个被广泛研究并被证明在单子叶植物中对基因表达有效的启动子。OsUbi3P已经从pRESQ101质粒中被克隆。pRESQ101记载于E.Sivamani、J.D.Starmer和R.Qu的“用于改进的转基因表达的水稻泛素3启动子基因表达盒的序列分析”,植物科学,177(6):549-556,2009,该文献通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样。为了进行克隆,对OsUbi3P进行了如下的修饰:1)通过PCR方法将EcoRI位点引入5'端;2)移除XmaI位点,将BamHI位点加入到3'端。OsUbi3P的部分序列被组装为pBluescript中的ApaI-BamHI片段,然后克隆为HindIII-BamHI的整个启动子区域,所述区域包括与pAG1003经HindIII-SpeI消化后产生的PMI相融合的第一泛素内含子。这后一次克隆产生了pAG2000载体。

[0116] 实施例5-pAG2004和pAG2005

[0117] 将pAG2000载体进行进一步修饰,以便形成克隆载体,所述克隆载体适于接受GOI表达盒,而且能提供用于植物转化的PMI筛选标记的增强表达。PMI表达的优化过程包括用新的9nt序列替代pAG2000中连接OsUbi3内含子与起始PMI基因密码子的原始连接序列(如下SEQ ID NO:18所示)。下述SEQ ID NO:18中,用下划线标注的是原始连接序列,用粗体标注的是起始密码子。下述SEQ ID NO:19中,用方框标注的是新的9nt序列。据E.Sivamani和R.Qu(2006)报道,用方框标注的序列作为有效序列能够有效地在pRESQ48中提供高水平的瞬间GUS表达,该文献通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样。这个9nt序列代表了水稻泛素3基因的三个起始密码子,其中起始密码子ATG已经被修饰为ATC以便消除附加的翻译起始位点。为了实现这一修饰,pAG2000中的BgIII-XcmI片段(核苷酸位置9726-105)被PCR合成的片段代替,所述PCR合成的片段包括所需的9nt连接序列,并在连续反应中使用引物P64/P68、P64/P66和P64/P67形成。

[0118] pAG2000的BgIII-XcmI片段(核苷酸位置9726-105)

[0119]

Agatctggtgcctgtagttacttatgtcagitttgttattatctgaagatattttggttggtggttggatgtgatgtggtgtgagctgtgagcag
 cgettattgatataatgatgtgtccaattgtagttagtatgatgtgatgatgttcactctattttgagctgacagtaccgatategta
 ggatctggtgcaacttattctcagctgcttttttaectatgtaattccaatcctttcttgcctcttcag**GGATCCCGATCA**
TGCAAAAACTCATTAACTCAGTGCAAAA**ACTATGCCTGGGGCAGCAAAA**ACGGCGTTGACTG
 AACTTTATGCTATGGAAAATCCGTCAGCCAGCCGATGG (SEQ ID NO: 18)

[0120] 用于pAG2004构建的PCR合成的BgIII-XcmI片段

[0121]

Agatctgttgctctgtagttactttagtgcagttttgttattatctgaagatatttttggttgttcttgttgatgtggtgtgagctgtgagcag
 cgtcttatgattaatgatgetgtccaattgttagttagtaigatgtgattgatatgttccatetattitgagetgacagtaaccgatacgtgta
 ggatctgggtgccaaacttattctecagctgcttttttttacctatgttaattccnatectttcttgcctcttccag[ATCCAGATA]ATGC
 AGAAACTCATTA ACTCAGTGC AAAACTATGCCTGGGGCAGCAAAACCGCGTTGACTGAAC
 TTTATGGTATGGAAAATCCGTCCAGCCAGCCGATGG (SEQ ID NO: 19)

[0122]

引物	序列
P64	AGATCTGTTGTCTCTGTAGTTACTTATGTCA (SEQ ID NO: 20)
P66	CCATCGGCTGGCTGGACGGATTTTCCATACCATAAAGTTCAGTCAACGCCG TTTTCCTGCCCCAGGCATA (SEQ ID NO: 21)
P67	CCATCGGCTGGCTGGACGGATTTTC (SEQ ID NO: 22)
P68	CGTTTTGCTGCCCCAGGCATAGTPTTGCCTGAGTTAATGAGTTTCTGCAT TATCTGGATCTGGAAGAGGCCAAGAAAGGATTGGA (SEQ ID NO: 23)

[0123] 参见图3C,以上修饰生成pAG2004载体,它是本发明的一个实施方式。pAG2004载体随后被用来结合LBA4404的农杆菌菌株中的pSB1,并通过使用日本烟草转化程序(质粒pSB1的日本烟草操作手册,3.1版,2006年6月5日;Komari,T.等人编写的“二元载体和超二元载体”,分子生物学方法,第343卷:农杆菌手册,第15-41页,胡马纳出版社,所述文献通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样)来转化未成熟的玉米胚。pAG2004和它的衍生物pAG2005的玉米转化效率在20-60%的范围内,pAG2004和它的衍生物pAG2005含有克隆为pAG2004MCS中的KpnI-XmaI的0sUbi3启动子,然而带有来自pNOV2819的原始PMI表达盒的pAG1003可以提供的转化效率最多也只有15%,pAG1003中manA表达由CMPS病毒启动子驱动。

[0124] pAG2005序列在SEQ ID NO:24中给出。

[0125] 实施例5-在载体开发中使用的遗传元件

[0126] 启动子

[0127] 使得载体包括带有第一内含子(0sUbi3P,登录号#AY954394,SEQ ID NO:1,如下所示)的水稻泛素3基因启动子的2014bp序列,以用于组成型或“整体型”基因表达。0sUbi3P的第一内含子序列用小写字母表示于下面的SEQ ID NO:1中。本发明的载体可包括不同的或附加的启动子。使得载体包括带有第一基因内含子(0sAct1P,登录号S44221,SEQ ID NO:2)的水稻肌动蛋白1基因启动子,该启动子是一个组成型启动子。水稻肌动蛋白1基因启动子可用于本发明载体中的PMI基因表达。例如,载体pAG3000-pAG3003包括带有第一基因内含子的水稻肌动蛋白1基因启动子。使得一些载体包括1474bp的水稻谷蛋白B-4基因启动子(0sGluB4P,登录号#AY427571,SEQ ID NO:4),该启动子可以用于种子特异性基因表达,并且已经用于表达酶和内含子修饰的酶。


```

>OsUhi3P
CCAACCAACCCCATATCGACAGAGGATUTGAAGAACAGGTAAATCACGCAGAAGAACCCA
TCCTCGATAGCAGCTATCGATTAGAACAAACGAATCCATATTTGGGTCCGTTGGGAAATACTTA
CTGCACAGGAAGGGGGCGATCTGACGAGGCCCGCCACCGGCCTCGACCCGAGGCCGAG
GCCGACGAAGCGCCGGCGAGTACGGCGCCGCGGGCCCTCTGCCCGTGCCTCTGCGCG
TGGGAGGGAGAGGCCGCGGTGGTGGGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCAGCTGGTGGG
CGGCGCGGGGGTCCAGCCGCGAGCCGCGCGGCGACCGGAGGAGCAGGGCGGGCGTGGACGC
GAACFTCCGATCGGTGGTTCAGAGTGGCGGAGTTGGGCTTAGCCAATTAGGTCTCAACAA
TCFATTTGGGCCGTAAAATTCATGGGCCCTGGTFTTGTCTAGGCCCAATATCCCGTTCATTTT
AGCCCAAAATATTTCCCCAGAGGATTATTAAGGCCACACCCAGCTTATAGCAGATCAA
GTACGATGTTTCCTGATCGTTGGATCGGAAACGTCACGGTCTTGATCAGGCATGCCGACTT
CGTCAAAGAGAGGGCGGCATGACCTGACGCGGAGTFTGGTTCCGGGCACCCGCTCGGATGGT
CGTACCGGGACCGGACAGGTGTCCGCGCTCCAACCTACATGGACACGTGTGGTGTGCGCAT
TGGGCCGTACCGGTGGCGGTGACCGCACCGGATGCTGCCCTCGCACCCGCTTGGCCACGC
TTTATATAGAGAGGTTTTCTCTCCATTAATCGCATAGCGAGTCGAATCGACCGAAGGGGA
GGGGGAGCGAAGCTTTGCGTCTCTAATCGCCTCGTCAAGgtaactaateatescctegteetaateete
gaatctctegtggtgccgctfaatectegcattttgatgctcgtggggaagcgtaggaggateccgtgcgagtagtctcaatefca
gggtttcgtgcgallttagggtgatccaccccttaatepaggllaccgdltegtggattttagggttaatectcttaatelecatlgnattagg
gtttcgtgagaaatcgaggtagggatctgtgttattatategatctaatagatggattgggtttgagattgntctgtcagaagggtattgtt
tcgafatattaccctaatgatgtgfcagatggggattgittcgafatattaccctaatgatgtgfcagaagggtattgttcgafatattac
cctaatgatggataaiaugagtagttcacagttatgitttgatctgccacatagtttaggttttgrgacagatttagtttacttattgt
getttagtctggatgggtattgttctgatattgliccaatagatgaatagctcgttaggttaaaatctttaggttgngttagggacacatag
tttattctctcggatttgpattggnaattgttctctagtttttccctggattggattggnaattgttgggeiagggttaguanaattaca
ctgtatctgtgacacactactgnaactglagagcttgggttctaaaggtaatttaategtatigtateigcctctttgectagttgnaactgta
gigetgatgttgaactgtgttttttaaccgttttattgctttactcgtgeasafcaaatctgfcagatgetagaactaggttggctttatlef
gtgttctacatagatctgttgtctctgtagtlaectatgicagttttgtttatctgaagatattttgggttgttcttcttggatgttgggtga
getgtgagcagcgetttatgallaatgatgetgccaattgtagtgtagtatgalgtgattgalatgttcaictattttgagcgcacagta
ccgatactctgaggatctggtgccaaecttattctccagctgcttttttaacctatgtaattcaatcttcttgcctcttcag

```

[0128]

[0129] (SEQ ID NO:1),用大写字母表示启动子序列(SEQ ID NO:25),用小写字母表示第一内含子(SEQ ID NO:26)

[0130]

```

>OsAct1P
TAGCTAGCATATTCGAGGTCATTCATATGCTTGAGAAGAGAGTCGGGATAGTCCAAAATA
AAACAAAGGTAAGATTACCTGGTCAAAAAGTGAAAACATCAGTTAAAAGGTGGTATAAGTA
AAATATCGGTAATAFAAAAGCTGGCCCAAAGTGAAATTTACTCTTTCTACTATTATAAAAAT
TGAGGATGTTTTGTCGGTACTTTGATACGTCATTTTTGATGAATTGGTTTTTAAGTTTATT
CGCGATTTGGAAATGCATATCTGTATTTGAGTCGGTTTTTAAGTTCGTTGCTTTTGTAAAT
ACAGAGGGGATTTGTATAAGAAATATCTTTAAAAAACCCATATGCTAATTTGACATAATTTT
TGAGAAAAATATAFATTCAGGCCAATTCACAAATGAACAATAAFAAGATTAATAATAGCTTG
CCCCCGTTGCAGCGATGGGTATTTTTTCTAGTAAAAATAAAAAGATAAACTTAGACTCAAAAC
ATTTACAAAAACAACCCCTAAAAGTCTTAAAGCCCAAAGTGCTATGCACGATCCATAGCAA
GCCAGCCCAACCCCAACCCCAACCCCAACCCCAAGTGCAGCCAACTGGCAAATAGTCTC
CACCCCGGCCTATCACCGTGAGTTGTCCGCACCACCGCACGTCTCCGAGCCAAAAAAA
AAAAAAGAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG
GGAAAAGCGAGGAGGATCGCGAGCAGCGACGAGGCCCGGCCCTCCCTCCGCTTCCAAAG
AAACGCCCCCCCATCGCCACTATATACATACCCCCCTCTCTCCATCCCCCAACCCCTA
CCACCACCACCACCACCACCCTCCTCCCCCTCGCTGCGGGACGACGAGCTCCTCCCCCT
CCCCCTCCGCGCGCGCGGTAACCAACCCCGCCCTCTCCTCTTTCTTCCGTTTTTTTTT
TTCTGTCGCGTCTCGATCTTTGGCCTTGGTAGTTTGGGTGGGCGAGAGGGCTTCGTCGC
CCAGATCGGTGCGCGGGAGGGGCGGGATCTCGCGGTGGEGTCTCCGGGCGTGGAGTCGG

```

```

CCCGCATCCTCGCGGGGAATGGGGCTCTCGGATGTAGATCTTCTTTCTTCTCTTTTTGT
GGTAGAATTTGAATCCCTCAGCATTTGTTTCATCGGTAGTTTTCTTTTCATGATTTGTGACA
AATGCAGCCTCGTGCGGAGCTTTTTTGTAG (SEQ ID NO: 2)

```

```

>OsGluB4P
TACAGGGTTCCTTGCGTGAAGAAGGGTGGCCCTGCGGTTCCACCATTAACGGTCCAGACTAC
TTCCAGCTAGTACTGTTGACCAACGTCGCGGCGGCAGGGTCAATCAAGTCCATGGAGGTT
ATGGGTTCCAACACAGCGGATTTGGATGCCGATGGCACGTAACCTGGGGCGCCCAATGGCA
CTCACTGGCCCTACCTCACCGGTCAAGGTCTATCCTTTAGGGTCAACCAACACAGATGACCA
AACGCTCGTCTTCCACCAACGTCGTCGCCACCAGGATGGAAGTTTGGCCAGACATTTGCAAG
CAAGCTGCAGTTCAAGTGAAGAGGAGAAGCGTGAATTTGATAACGGAGCGTTTTCTTTGGGA
GTAAACATCTCTGTTGCTTAGCAAACATATGATTTGTATAFAAGTTTCTGTTGCGTTTATT
CTTTCGGTGTGTAAAAATAACATACATGCTTTCCCTGATATTTCTTTGTATATATGTACACAC
ACACGACAAATCCTTCCATTTCTATFATTTGAACAATTTAATTTGCGAGGGCGAGTACTT
GTCTGTTTACCTTTTTTTTTTTCAGATGGCATTTTATAGTTTAAACCTTTTCATGGACCGGCAGT
AGTTCTAACCATGAATGAAAAGAAATCATAGTCCACACCACGCAGGGACATTTGTGGTCAT
TTAGACAAGACGATTTGATTAATGTCCTTGTATGATATGGTTCGACAGTGAAGACTAACAAA
CATATGGCATATTTTATFACCGGGCGAGTTAAATAAAATTTATGTCACAGTAATAAACTGCCT
AATAAATGCACGCCAGAAAATATAATGATAAAAAAAGAAAAAGATAACATAAGTCCATTGCT
TCTACTTTTTTAAAAATTAATCCAACATTTCTATTTTTTGGTATAAACTTTGGAAGTACTA
GTTGGATATGCAAAATCATCTAACCTCCATATATTTTCATCAATTTGTTTACTTTACATATGG
GAGAGGATAGTATGTCAAAAGAAAATGACAACAAGCTTACAAGTTTCTTATTTTAAAAGTTC
CGCTAACCTTATCAAGCATAGTGTGCCACGCCAAAACCTGACAACAACCAACAAATTTAAGG
AGCGCCTAACTTATCATCTATGACATACCGCACAAAATGATAACATACTAGAGAACTTTA
TTGCACAAAAGGAAATTTATCCATAAGGCAAGGAACATCTTAAAGGCTTTGGATATAACAT
TACCAACAAGCATTTGTTGTATTACCCCTAAAGCGCAAGACATGTCATCCATGAGTCATAG
TGTGTATATCTCAACATTTGCAAAAGCTACCTTTTTCTATTATACTTTTCGCATTATFAGGCTA
GATATTATCTATACATGTCACAAAACCTATCCCTACGTCATATCTGAAGATTTCTTTCTTC
ACTATATAAGTTGGCTTCCCTGTCTATTGAACCTCACATCAACCAGCCCAAGTTTCCAATAAC
ATCCTCAATAGCT (SEQ ID NO: 4)

```

[0131] 如上所述,水稻泛素3基因启动子从pRESQ101中被克隆,而水稻Act 1和GluB-4基因启动子是合成的。使用与PMI筛选标记融合的水稻Act 1基因启动子,在植物组织培养过程中,使用甘露糖筛选培养基在稳定的玉米转化中检测到最高达23%的转化效率。

[0132] 信号序列

[0133] 信号序列可以包括在CWDE序列中(有或没有进一步的修饰;例如用内含子修饰)或在载体中,以指导酶类在植物中在细胞内部或外部的特定位置表达。在一些如下所述的实施例中,本发明的CWDEs或载体中包括烟草PR1a(靶向淀粉体)和大麦 α -淀粉酶BAASS(靶向细胞壁)信号序列。这些信号序列能够指导酶到达它们各自的靶向位置。在一些如下所述的实例中,包括大麦液泡巯基蛋白酶(aleurain)HvA1eSP(靶向液泡),水稻GluB4(种子表达)以及ER驻留(SEKDEL)信号序列,这些信号序列能够将蛋白质定位于各自的细胞区室或特定的组织。这样的靶向目的可以实现蛋白质的高水平积累,并避免对植物生长和发育的潜在不良影响。下面描述了本发明实施例中使用的信号序列和它们相应的编码核苷酸序列:

[0134] PR1a蛋白质序列

[0135]

MGFVLFSQLPSFLLVSTLLLFLVISHSCRA (SEQ ID NO: 6)

[0136] PR1a核苷酸序列

[0137]

**ATGGGCTTCGTGCTCTTCCTCCAGCTGCCTTCCTTCCTTCCTGTCCTCCACCCTGCTCTTGT
TCCTCGTGATCTCCACTCCTGCCGCGCC (SEQ ID NO: 7)**

[0138] BAASS蛋白质序列

[0139]

MANKHLSLSLFLVLLGLSASLASGQV (SEQ ID NO: 8)

[0140] BAASS核苷酸序列

[0141]

**ATGGCGAACAACATTTGTCCCTCTCCCTCTTCCTCGTCCTCCTTGGCCTGTCCGCCAGCT
TGGCCTCCGGCAAGTC (SEQ ID NO: 9)**

[0142] HvA1e蛋白质序列

[0143]

**MAHARVLLLLALAVLATAAVAVASSSSFADSNPIRPVTDRAAST
(SEQ ID NO: 10)**

[0144] HvA1e核苷酸序列

[0145]

**ATGGCCCAAGCCCGCGTCTCTCTCTGGCGCTCGCCGTCCTGGCCACCGCCGCGCTCGCC
GTCCGCTCTCTCTCTCTCTCTCGCCGACTCCAACCCGATCCGCCCGGTGACCGACCGCGCC
GCCTCCACC (SEQ ID NO: 11)**

[0146] **SEKDEL (SEQ ID NO: 12)**

[0147] **AGCGAGAAGGACGAGCTG (SEQ ID NO: 13)**

[0148] **KDEL (SEQ ID NO: 14)**

[0149] **AAGGACGAGCTG (SEQ ID NO: 15)**

[0150] GluB4SP蛋白质序列

[0151]

MATIAFSRLSIYFCVLLLCHGSMA (SEQ ID NO: 27)

[0152] GluB4SP核苷酸序列

[0153]

ATGGCCACCATCGCTTTCCTCCCGCTTGTCCATCTACTTCTGCGTGCCTTCTCCTGTGCCACG
GCTCCATGCC (SEQ ID NO: 28)

[0154] 可以修饰原始的靶向序列,以反映单子叶植物中用于最佳基因表达的密码子使用频率。在一个实施方式中,宿主密码子的使用频率来自玉米。每个信号序列能够通过使用特定的引物由PCR合成,并被连接至序列的3'端;例如,使用融合PCR的方法将其连接到OsUbi3或OsGluB4启动子的3'端。

[0155] 转录终止子

[0156] 本发明的载体可包括转录终止子。在一个实施方式中,在植物转化载体中被克隆的基因表达盒中使用来自农杆菌的胭脂碱合成酶基因的有效的转录终止子序列(NosT)。所述序列如下所示:

[0157]

NosT
TCCCCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATIGAATCCTG
TTGCCGGTCTTTCGCGATGATTATCATATAAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAAT
TAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAATTA
TACATTTAATAACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCGCAAACCTAGGATAAATTTATCGCGC
GGGGTGCATCTATGTTACTAGATCGGGAATTG (SEQ ID NO: 29)

[0158] 这一序列在pAG2005 (SEQ ID NO: 24) 中出现两次。第二次出现在12034-12288的位置,处于第二OsUbi3启动子下游,附加内含子序列和XmaI位点,然后是EcoRI限制性位点(GAATTC, SEQ ID NO: 24的12310-5的位置)。Nos终止子序列可以通过PCR从pNOV2819中以276bp的片段形式被扩增出来。本领域已知的其它转录终止子能够被代替和用来代替Nos终止子。另一个可以用来代替Nos终止子的终止子是35S终止子。

[0159] 实施例6-用于野生型P77853木聚糖酶过表达的载体开发

[0160] 参见图4,载体pAG2014的构建提供了克隆基因的典型方法的实例,被克隆的基因编码CWDEs,如木聚糖酶、纤维素酶的基因,以及任何其它对转基因单子叶植物的发育特别相关的基因,所述单子叶植物包括但不限于玉米、柳枝稷、高粱、芒草和甘蔗。

[0161] 将信号序列连接到成熟酶的编码区域

[0162] 信号序列-蛋白质的有兴趣的连接可以通过实验或模型确定。例如,可以使用丹麦技术大学生物序列分析中心(<http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>)的公众可得的SignalP3.0服务器来预测信号肽和野生型P77853木聚糖酶之间的最佳连接。以一些人工神经网络和隐藏型马尔可夫模型的组合为基础,SignalP3.0服务器中使用的方法包括预测切割位点和预测信号肽/非信号肽。程序输出提供用于从成熟蛋白质切割信号肽的信赖分数。评估了三种连接变体;第一种是在BAASS和P77853 (...GQV QTS...)之间具有直接连接,第二种是从BAASS (...GQ QTS...)的羧基末端去掉一个氨基酸,第三种是从BAASS的羧基末端去掉一个氨基酸以及从P77853 (...GQ TS...)的氨基末端去掉一个氨基酸。将分数最高的变体进行分子克隆。下面显示BAASS、P77853序列,以及第一、第二和第三种连接,所述连接用下划线标注:来自大麦 α -淀粉酶(登录号#X15226)的78bp的BAASS

[0163]

MANKHLSLSLFLVLLGLSASLASGQV (SEQ ID NO: 8)
ATGGCGAACAAACATTTGTCCCTCTCCCTCTTCCTCGTCCTCCTTGGCCTGTCCGGCCAGCT
TGGCCTCCGGGCAAGTC// (SEQ ID NO: 9)

[0164]

P77853
QTSITLTSNASGTFDGYYYELWKDTGNTTMTVYTTQGRFSCQWSNINNALFRITGKKYNQNW
QSLGTIRITYSATYNPNNGNSYL CIYGWSTNPLVEFYIVESWGNWRPPGATSLGQVTIDGGTY
DIYRTTRVNQPSIVGTATFDQYWSVRTSKRTSGTVVTDHFRAWANRGLNLGTIDQITLCVE
GYQSSGSANITQNTFSQGSSSGSSGSSGSTTTTRIECENMSLSGPYVSRITNPFNGIALYAN
GDTARATVNFPPASRNYNFRLRGCGNNNNLARVDLRIDGRTVGTFYYQGTYPWEAPIDNVY
VSAGSHTVEITVTADNGTWDVYADYLVIIQ (SEQ ID NO: 30)

[0165] BAASS:P77853第一连接变体

[0166]

MANKHLSLSLFLVLLGLSASLASGQVQTSITLTSNASGTFDGYYYELWKDTGNTTMTVYTTQ
GRFSCQWSNINNALFRITGKKYNQNWQSLGTIRITYSATYNPNNGNSYL CIYGWSTNPLVEFY
IVESWGNWRPPGATSLGQVTIDGGTYDIYRTTRVNQPSIVGTATFDQYWSVRTSKRTSGTVT
VTDHFRAWANRGLNLGTIDQITLCVEGYQSSGSANITQNTFSQGSSSGSSGSSGSTTTTRI
ECENMSLSGPYVSRITNPFNGIALYANGDTARATVNFPPASRNYNFRLRGCGNNNNLARVD
LRIDGRTVGTFYYQGTYPWEAPIDNVYVSAGSHTVEITVTADNGTWDVYADYLVIIQ (SEQ
ID NO: 31)

[0167] SignalP3.0服务器预测:信号肽

[0168] 最有可能的切割位点在位置24和25之间:ASG-QV

[0169] 信号肽的可能性:1.000

[0170] 最大切割位点可能性:在位置24和25之间,为0.740

[0171] BAASS:P77853第二连接变体

[0172]

MANKHLSLSLFLVLLGLSASLASGQQTSITLTSNASGTFDGYYYELWKDTGNTTMTVYTTQ
RFSCQWSNINNALFRITGKKYNQNWQSLGTIRITYSATYNPNNGNSYL CIYGWSTNPLVEFYI
VESWGNWRPPGATSLGQVTIDGGTYDIYRTTRVNQPSIVGTATFDQYWSVRTSKRTSGTVT
VTDHFRAWANRGLNLGTIDQITLCVEGYQSSGSANITQNTFSQGSSSGSSGSSGSTTTTRI
ECENMSLSGPYVSRITNPFNGIALYANGDTARATVNFPPASRNYNFRLRGCGNNNNLARVD
LRIDGRTVGTFYYQGTYPWEAPIDNVYVSAGSHTVEITVTADNGTWDVYADYLVIIQ (SEQ
ID NO: 32)

[0173] SignalP3.0服务器预测:信号肽

[0174] 最有可能的切割位点在位置24和25之间:ASG-QQ

[0175] 信号肽的可能性:1.000

[0176] 最大切割位点的可能性:在位置24和25之间,为0.768

[0177] BAASS:P77853第三连接变体

[0178]

MANKHLSLSLFLVLLGLSASLASGQTSITLFSNASGTFDCYYYELWKDTGNTTMTVYFQGR
FSCQWSNINNALFRITGKKYNQNWQSLGTIRITYSATYNPNGNSYL CIYGWSTNPLVEFYIV
ESWGNWRFPGATSLGQVTIDGGTYDIYRTTRVNQPSIVGTATFDQYWSVRTSKRTSGTIVTV
TDHFRAWANRGLNLGTIDQITLQVEGYQSSGSANITQNTFSQGSSSGSSGGSSGSTTTTRIE
CENMSLSGPFYVSRTITNPFNGIALYANGDTARATVNFPSRNYNFRLRGCGNNNNLARVDL
RIDGRIVGTFYFQQTYTPWEAFIDNVYVSAGSHTVEITVTADNCTWDVYADYLVIQ (SEQ
ID NO: 33)

[0179] SignalP3.0服务器预测:信号肽

[0180] 最有可能的切割位点在位置24和25之间:ASG-QT

[0181] 信号肽的可能性:1.000

[0182] 最大切割位点的可能性:在位置24和25之间,为0.582

[0183] 在本实施例中,基于从服务器P3.0得出的最大切割位点的可能性,选择在BAASS和P77853之间的第二连接变体 (...GQ QTS...) 进行pAG2014载体的开发。

[0184] 将用于pAG2014构建的各个遗传元件组合在如下所述的初始PCR反应中。使用第一次PCR反应 (PCR-1) 来扩增水稻泛素3基因的第一内含子的3'端的372bp (用小写字母标注), 扩增从其本身带有的Bg111位点 (用下划线标注) 开始。将片段连接到9nt序列 (用斜体字母标注), 所述9nt序列代表了水稻泛素3基因 (如上文所详述) 的经修饰的三个起始密码子, 连接到BAASS (用大写字母标注) 和P77853成熟蛋白质的编码区域的5'端的27nt序列 (用方框标注)。进行第二次PCR反应 (PCR-2) 用来扩增P77853成熟蛋白质的整个编码区域, 所述整个编码区域与TAG终止密码子相融合, 随后是AvrII限制位点 (用下划线标注)。

[0185] 1. PCR-1用于扩增水稻泛素3基因的第一内含子的3'端的372bp、9bp连接序列、BAASS和P77853的5'端:

[0186] PCR-1产物

[0187]

Agatcigtgtgctctgtagttacttatgtcagttttgttattatctgaagatattttgggtgttgcctggtgatggtgtgaget
gtgagcagcgetcttatgattaatgatgetgtccaattgtagttagttagatgatgtgatgatagttcacatctattttgagetgac
agtaccgatategtaggactcgggtccaacttatctccagctgcttttttaacctatgttaattccaatcctttcttgectctcc
agATCCAGATAATGGCGAACAACATTTGTC CCTCTCCCTCTTCCTCGTCCTCCTT
GGCCTGTCCGCCAGCTTGGCCCTCCGGGCAA CAAACAAGCATTACTCTGACATCCA
AC (SEQ ID NO: 34)

[0188] 引物

[0189]

ovb79: *agatctgtgtgctctgtagttacttatgtc* (SEQ ID NO: 35)
ovb86: *CCGACAGGCCAAGGAGGACGAGGAAGAGGGAGAGGGACAAATGTTTGTTC*
GCCATTATCTGGATctgggaagaggcaagaaaggattggaa (SEQ ID NO: 36)
ovb101:
GTTGGATGTCAGAGTAATGCTTGTGTTGTTGCCCGGAGGCCAAGCTGGCCGACAGG
CCAAGGAGGAC (SEQ ID NO: 37)

[0190] 2. PCR-2用于扩增成熟P77853蛋白质的1017bp的编码区域:

[0191] PCR-2产物

[0192]

CAAACAAGCATTACTCTGACATCCAACGCATCCGGTACGTTFFGACGGTFACTATTA
 CGAACTCTGGAAGGATACTGGCAATACAACAATGACGGTCTACACTCAAGGTCCG
 TTTTCCTGCCAGTGGTCGAAACATCAATAACGCGTTGTTFAGGACCGGGAAGAAAT
 ACAACCAGAATTGGCAGTCTCTTGGCACAATCCGGATCACGTACTCTGCCACTTA
 CAACCCAAACGGGAACCTCTACTTGTGTATCTATGGCTGGTCTACCAACCCATTG
 GTCGAGTTCTACATCGTTGAGTCCCTGGGGAACTGGAGACCGCCTGGTGGCACGT
 CCCTGGGGCCAAGTGACAATCGATGGCGGGACCTACGACATCTATAGGACGACACG
 CGTCAACCAGCCTTCCATTGTGGGGACAGCCACGTTTCGATCAGTACTGGAGCGTG
 CGCACCTCTAAGCGGACTTCAGGAACAGTGACCGTGACCGATCACTTCCGCGCCT
 GGGCGAACC CGGGCCTGAACCTCGGCACAATFAGACCAAATTACATTTGTGCGTGGA
 GGGTTACCAAAGCTCTGGATCAGCCAACATCACCCAGAACACCTTCTCTCAGGGC
 TCTTCTTCCGGCAGTTCGGGTGGCTCATCCGGCTCCACAACGACTACTCGCATCG
 AGTGTGAGAACATGTCCTTGTCCGGACCCCTACGTTAGCAGGATCACCAATCCCTT
 TAATGGTATTGCGCTGTACGCCAACGGAGACACAGCCCGCGCTACCGTTAACTTC
 CCGCAAGTCGCAACTACAATTTCCGCCTGCGGGGTTCGGCAACAACAATAATC
 TTGCCCGTGTGGACCTGAGGATCGACGGACGGACCGTCCGGACCTTTTATTACCA
 GGGCACAATACCCCTGGGAGGCCCAATTGACAATGTTTATGTCAGTGCGGGGAGT
 CATAAGTCCGAAATCACTGTTACTGCGGATAACGGCACATGGGACCGTGTATGCCG
 ACTACCTGGGTGATACAGTGACCTAGG (SEQ ID NO: 38)

[0193] 引物

[0194]

ovb93: CAAACAAGCATTACTCTGACATCCAAC (SEQ ID NO: 39)

ovb95: CCTAGGTCACTGTATCACCAGGTAGTCCGGCAT (SEQ ID NO: 40)

[0195] 随后使用“融合PCR”方法 (Yon和Fried,1989) 将PCR-1和PCR-2中制备的遗传元件“缝合”在一起。该方法产生了预期的1362bp的Bg1II-AvrII序列,该序列由以下元件构成:带有天然3'端Bg1II位点的水稻泛素3基因的第一内含子的3'端的261bp、在内含子和75bp BAASS信号序列的ATG密码子之间的9nt连接序列、以及终止于TGA终止密码子的1011bp的成熟P77853木聚糖酶编码区域,所述TGA终止密码子与是AvrII限制位点相连接。

[0196] Bg1II-AvrII片段形式的3'OsUbi3Pint:BAASS:P77853

[0197]

agatctgttgcctctgtagtfaacttatgtcagtttggttattatctgaagatatttttggttggttgettggtgatgtgggtgagctg
 tggagcagcctctttagtattaatgatgctgtcccaattgtagtgtagtatgatgtgattgatatgttcatctattttgagctgaca
 gtaccgatatcgttaggatctgggtgcacaacttatttccagctgctttttttacctatgtaattccnaactcttcttgcctctcca
 gATCCAGATAATGGCGAACAACAATTTGTCCCTCTCCCTCTTCCTCGTCCTCCTTG
 GCCTGTCCGGCCAGCTTGGCCCTCCGGGCAA[CAAACAAGCATTACTCTGACATCCAA]
 CGCATCCGGTACGTTTGAACGTTACTATTACGAACTCTGGAAGGATACTGGCAAT
 ACAACAATGACGGTCTACACTCAAGGTGCGTTFCTCCGCGCAGTGGTCGAACATCA
 ATAACCGCTTGTFTTAGGACCGGGAAGAAAATACAACCAGAATTGGCAGTCTCTTGG
 CACAATCCGGATCACGTACTCTGCGACTTACAACCCAAACGGGAACCTCTACTTG
 TGTATCTATGGCTGGTCTACCAACCCATTGGTTCGAGTTCFACATCGTTGAGTCCTG
 GGGGAACCTGGAGACCGCCTGGTGCACAGTCCCTGGGCCAAGTGACAATCGATGG
 CGGGACCTACGACATCTATAGGACGACACGCGTCAACCAGCCTTCCATTGTGGGG
 ACAGCCACGTTCCGATCAGTACTGGAGCGTGGCGCACCTCTAAGCGGACTTCAGGAA
 CAGTGACCGTGACCGATCACTTCCCGCGCTGGGGCAACCGGGGCGCTGAACCTCG
 GCACAATAGACCAAAATTACATTTGTGCGTGGAGGGTTACCAAAGCTCTGGATCAGC
 CAACATCACCCAGAACACCTTCTCTCAGGGCTCTTCTTCCGGCAGTTCGGGTGGC
 TCATCCGGCTCCACAACGACTACTCGCATCGAGTGTGAGAACATGTCCTTGTCCG
 GACCCTACCTTAGCAGGATCACCAATCCCTTTAATGGTATTGCGCTGTACGCCAA
 CGGAGACACAGCCCGCGCTACCGTTAACTTCCCGCAAGTCGCAACTACAATTC
 CGCCTGCGGGGTTGCGGCAACAACAATAATCTTGCCCGTGTGGACCTGAGGATCG
 ACGGACGGACCGTCCGGGACCTTTTATTACCAGGGCACATAACCCCTGGGAGGCCCC
 AATTGACAATGTTTATGTCAGTGGGGGAGTCATACAGTCGAAATCACGTGTTACT
 GCGGATAACGGCACATGGGACGTGTATGCGGACTACCTGCTGATACAGTGACCTA
 GG (SEQ ID NO: 41)

[0198] 随后从凝胶上切下融合PCR的产物,使用QIAquick凝胶提取试剂盒(Cat.#28706)纯化凝胶,然后连接到pPCR-Blunt II TOPO载体上。使用载体特异性和基因特异性的引物对融合PCR产物进行完全测序。将经过测序证实的融合PCR片段通过BglIII-AvrII消化从pPCR-Blunt II TOPO载体上切除,并克隆至pBluescript中,所述pBluescript通过下述操作制备:

[0199] 1. 参见图5,首先,将2362bp的pAG2005的KpnI-EcoRI片段克隆至pBluescript中,获得pBSK:OsUbi3P:XmaI:AvrII:NosT载体,所述2362bp的片段包括OsUbi3启动子,所述启动子与带有XmaI(用下划线标注)和AvrII(用方框标注)位点的序列 CCCGGGTATTCAT**CCTAGG**(SEQ ID NO: 42)和Nos终止子相融合。

[0200] 2. 参见图6,将L1连接子GAATTCTTACATTAGCACTAGAGCTC(SEQ ID NO: 43)克隆至pBSK:OsUbi3P:XmaI:AvrII:NosT的EcoRI-SacI位点中,从而除去额外的XmaI位点并产生“穿梭”载体pBSK:OsUbi3P:XmaI:AvrII:NosT:L1:

[0201] pBSK:OsUbi3P:XmaI:AvrII:NosT:L1容易接受经BglIII-AvrII消化的DNA片段。以这种方式,克隆与上述实施例描述类似的融合PCR产物,将能够重新构建用于所关注基因的完整表达盒。例如,可将上文描述P77853时提及的1362bp的经BglIII-AvrII消化的融合PCR产物插入到经BglIII-AvrII消化的pBSK:OsUbi3P:XmaI:AvrII:NosT:L1中,从而生成OsUbi3P:BAASS:P77853:NosT表达盒。

[0202] 使用限制性酶,将整个表达盒OsUbi3P:BAASS:P77853:NosT以KpnI-EcoRI片段被进一步切除下来,并被克隆至pAG2005中,从而生成pAG2014。pAG2014载体由于具有水稻泛素3基因启动子,因此可用于在转基因植物中表达野生型P77853木聚糖酶,并且由于具有大

麦 α -淀粉酶信号序列(BAASS),因此可以使所表达的酶靶向至植物细胞壁。使用相同的过程生成了下面列出的载体。下文列表还包括pAG1000、1002、1003、1004、1005、2000、2004。下列载体可以用于植物转化和转基因的表达。

[0203] 1.pAG1000-pAG1002(分别为SEQ ID NOS:188-190)衍生自pSB11,其中含有CMPSP:PMI,并移除了不同的限制性位点。

[0204] 2.pAG1003(SEQ ID NO:191)衍生自pAG1002,其中含有MCS。

[0205] 3.pAG1004衍生自pAG1003,其中在MCS中带有GUS-int。

[0206] 4.pAG1005(SEQ ID NO:192)衍生自pAG1003,其中含有CPMSP:PMI,其中PMI针对玉米进行了密码子优化和表达优化。

[0207] 5.pAG2000(SEQ ID NO:193)衍生自pAG1003,其中在HindIII-SpeI之间含有代替CMPSP:PMI的水稻Ubi3启动子和PMI的第一连接。

[0208] 6.pAG2001(SEQ ID NO:194)衍生自pAG2000,其中在MCS中含有水稻Ubi3启动子。

[0209] 7.pAG2002(SEQ ID NO:195)衍生自pAG2001,其中在MCS中含有水稻Ubi3启动子和Nos终止子。

[0210] 8.pAG2003(SEQ ID NO:196)衍生自pAG2000,其中含有所述水稻Ubi3启动子和PMI之间的第二连接。

[0211] 9.pAG2004(SEQ ID NO:197)衍生自pAG2000,其中含有所述水稻Ubi3启动子和PMI之间的第三连接。

[0212] 10.pAG2005(SEQ ID NO:198)衍生自pAG2004,其中含有在MCS中插入的来自pAG2002的水稻Ubi3启动子和Nos终止子。

[0213] 11.pAG2006(SEQ ID NO:199)衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有GUS,并且使用所述OsUbi3P和GUS之间的第一连接。

[0214] 12.pAG2007(SEQ ID NO:200)衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有GUS,并且使用所述OsUbi3P和GUS之间的第二连接。

[0215] 13.pAG2009(SEQ ID NO:201)衍生自pAG2005,其中在所述水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间(使用第一连接)连接有与PR1a细胞内空间定位信号序列相融合的GUS。

[0216] 14.pAG2010(SEQ ID NO:202)衍生自pAG2005,其中在所述水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间(使用第二连接)连接有与PR1a细胞内空间定位信号序列相融合的GUS。

[0217] 15.pAG2011(SEQ ID NO:203)衍生自pAG2005,其中在所述水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间连接有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的GUS。

[0218] 16.pAG2012(SEQ ID NO:204)衍生自pAG2007,其中在水稻谷蛋白GluB-4启动子和Nos终止子之间带有GUS。

[0219] 17.pAG2013(SEQ ID NO:205)衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvExoI细胞壁靶向信号序列相融合的GUS。

[0220] 18.pAG2014(SEQ ID NO:206)衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT P77853。

[0221] 19.pAG2015(SEQ ID NO:207)衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有WT P77853。

[0222] 20.pAG2016(SEQ ID NO:208)衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子序列和Nos

终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号相融合的GUS。

[0223] 21.pAG2017 (SEQ ID NO:209) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子序列和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号相融合的WT P40942。

[0224] 22.pAG2018 (SEQ ID NO:210) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT 030700。

[0225] 23.pAG2019 (SEQ ID NO:211) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT P40942。

[0226] 24.pAG2020 (SEQ ID NO:212) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子序列和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号相融合的WT P77853。

[0227] 25.pAG2021 (SEQ ID NO:213) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子序列和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号相融合的P77853m3。

[0228] 26.pAG2022 (SEQ ID NO:214) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号序列相融合的P77853m3:SEKDEL。

[0229] 27.pAG2023 (SEQ ID NO:215) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853m3。

[0230] 28.pAG2024 (SEQ ID NO:216) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853m3:SEKDEL。

[0231] 29.pAG2025 (SEQ ID NO:217) 衍生自pAG2012,其中在水稻谷蛋白GluB-4启动子和Nos终止子之间带有与GluB-4信号序列相融合的WT P77853。

[0232] 30.pAG2026 (SEQ ID NO:218) 衍生自pAG2012,其中在水稻谷蛋白GluB-4启动子和Nos终止子之间带有与GluB-4信号序列相融合的WT 030700。

[0233] 31.pAG2027 (SEQ ID NO:219) 衍生自pAG2012,其中在水稻谷蛋白GluB-4启动子和Nos终止子之间带有与GluB-4信号序列相融合的WT P40942。

[0234] 32.pAG2028 (SEQ ID NO:220) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号序列相融合的P77853T134-195。

[0235] 33.pAG2029 (SEQ ID NO:221) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853T134-195。

[0236] 34.pAG2030 (SEQ ID NO:222) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有P77853m3。

[0237] 35.pAG2031 (SEQ ID NO:223) 衍生自pAG2012,其中在水稻谷蛋白GluB-4启动子和Nos终止子之间带有与GluB-4信号序列相融合的WT P54583。

[0238] 36.pAG2032 (SEQ ID NO:224) 衍生自pAG2012,其中在水稻谷蛋白GluB-4启动子和Nos终止子之间带有与GluB-4信号序列相融合的WT P54583:SEKDEL。

[0239] 37.pAG2033 (SEQ ID NO:225) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有WT P54583。

[0240] 38.pAG2034 (SEQ ID NO:226) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有WT P54583:SEKDEL。

[0241] 39.pAG2035 (SEQ ID NO:227) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子序列和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号相融合的WT P54583。

- [0242] 40.pAG2036 (SEQ ID NO:228) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号序列相融合的WT P54583:SEKDEL。
- [0243] 41.pAG2037 (SEQ ID NO:229) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT P54583。
- [0244] 42.pAG2038 (SEQ ID NO:230) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT P54583:SEKDEL。
- [0245] 43.pAG2039 (SEQ ID NO:231) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP相融合的GUS。
- [0246] 44.pAG2040 (SEQ ID NO:232) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT NtEGm。
- [0247] 45.pAG2042 (SEQ ID NO:234) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT P54583。
- [0248] 46.pAG2043 (SEQ ID NO:235) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有WT NtEGm。
- [0249] 47.pAG2044 (SEQ ID NO:236) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号序列相融合的WT NtEGm。
- [0250] 48.pAG2045 (SEQ ID NO:237) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号序列相融合的WT NtEGm:SEKDEL。
- [0251] 49.pAG2046 (SEQ ID NO:238) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT NtEGm:SEKDEL。
- [0252] 50.pAG2047 (SEQ ID NO:239) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT P54583:SEKDEL。
- [0253] 51.pAG2048 (SEQ ID NO:240) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT NtEGm。
- [0254] 52.pAG2049 (SEQ ID NO:241) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT NtEGm:SEKDEL。
- [0255] 53.pAG2050 (SEQ ID NO:242) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有WT P26222。
- [0256] 54.pAG2051 (SEQ ID NO:243) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号序列相融合的WT P26222。
- [0257] 55.pAG2052 (SEQ ID NO:244) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a(玉米表达优化)细胞内空间定位信号序列相融合的WT P26222:SEKDEL。
- [0258] 56.pAG2053 (SEQ ID NO:245) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT P26222。
- [0259] 57.pAG2054 (SEQ ID NO:246) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT P26222:SEKDEL。
- [0260] 58.pAG2055 (SEQ ID NO:247) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT P26222。
- [0261] 59.pAG2056 (SEQ ID NO:248) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止

子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT P26222:SEKDEL。

[0262] 60.pAG2057 (SEQ ID NO:249) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT P77853:SEKDEL。

[0263] 61.pAG2058 (SEQ ID NO:250) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a (玉米表达优化) 细胞内空间定位信号序列相融合的WT P77853:SEKDEL。

[0264] 62.pAG2059 (SEQ ID NO:251) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有WT 043097。

[0265] 63.pAG2060 (SEQ ID NO:252) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a (玉米表达优化) 细胞内空间定位信号序列相融合的WT 043097。

[0266] 64.pAG2061 (SEQ ID NO:253) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a (玉米表达优化) 细胞内空间定位信号序列相融合的WT 043097:SEKDEL。

[0267] 65.pAG2062 (SEQ ID NO:254) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT 043097。

[0268] 66.pAG2063 (SEQ ID NO:255) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT 043097:SEKDEL。

[0269] 67.pAG2064 (SEQ ID NO:256) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT 043097。

[0270] 68.pAG2065 (SEQ ID NO:257) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT 043097:SEKDEL。

[0271] 69.pAG2066 (SEQ ID NO:258) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853-S158-2内含子(intein) 修饰的木聚糖酶。

[0272] 70.pAG2067 (SEQ ID NO:259) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853-S158-19内含子修饰的木聚糖酶。

[0273] 71.pAG2068 (SEQ ID NO:260) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853-T134-1内含子修饰的木聚糖酶。

[0274] 72.pAG2069 (SEQ ID NO:261) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有WT 068438。

[0275] 73.pAG2070 (SEQ ID NO:262) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子序列和Nos终止子之间带有与PR1a (玉米表达优化) 细胞内空间定位信号相融合的WT 068438。

[0276] 74.pAG2071 (SEQ ID NO:263) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与PR1a (玉米表达优化) 细胞内空间定位信号序列相融合的WT 068438:SEKDEL。

[0277] 75.pAG2072 (SEQ ID NO:264) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT 068438。

[0278] 76.pAG2073 (SEQ ID NO:265) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的WT 068438:SEKDEL。

[0279] 77.pAG2074 (SEQ ID NO:266) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT 068438。

- [0280] 78.pAG2075 (SEQ ID NO:267) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与HvA1eSP液泡靶向信号序列相融合的WT 068438:SEKDEL。
- [0281] 79.pAG2076 (SEQ ID NO:268) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有P77853-S158-2内含子修饰的木聚糖酶。
- [0282] 80.pAG2077 (SEQ ID NO:269) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有P77853-S158-19内含子修饰的木聚糖酶。
- [0283] 81.pAG2078 (SEQ ID NO:270) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有P77853-T134-1内含子修饰的木聚糖酶。
- [0284] 82.pAG2079 (SEQ ID NO:271) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853-S158-2:SEKDEL内含子修饰的木聚糖酶。
- [0285] 83.pAG2080 (SEQ ID NO:272) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853-S158-19:SEKDEL内含子修饰的木聚糖酶。
- [0286] 84.pAG2081 (SEQ ID NO:273) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853-T134-1:SEKDEL内含子修饰的木聚糖酶。
- [0287] 85.pAG 3000 (SEQ ID NO:280) 衍生自pAG1003,其中带有水稻Act 1启动子驱动的PMI代替CMPSP:PMI,并且使用在OsAct1P和PMI之间的第一连接(部分的真核翻译起始位点共有序列)。
- [0288] 86.pAG 3001 (SEQ ID NO:281) 衍生自pAG1003,其中带有水稻Act 1启动子驱动的PMI代替CMPSP:PMI,并且使用在OsAct1P和PMI之间的第二连接(完整的真核翻译起始位点共有序列)。
- [0289] 87.pAG3002 (SEQ ID NO:282) 衍生自pAG3000,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的GUS。
- [0290] 88.pAG3003 (SEQ ID NO:283) 衍生自pAG3001,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的GUS。
- [0291] 89.pAG2041 (SEQ ID NO:233) 衍生自pAG2004,带有被克隆至AvrII-EcoRI位点中的NosT。
- [0292] 90.pAG2082 (SEQ ID NO:274) 衍生自pAG2005,其中在水稻谷蛋白B-4启动子和Nos终止子之间带有与谷蛋白B-4信号肽相融合的WT 043097。
- [0293] 91.pAG2083 (SEQ ID NO:275) 衍生自pAG2005,其中在水稻谷蛋白B-4启动子和Nos终止子之间带有与谷蛋白B-4信号肽相融合的WT 043097:SEKDEL。
- [0294] 92.pAG2084 (SEQ ID NO:276) 衍生自pAG2005,其中在水稻谷蛋白B-4启动子和Nos终止子之间带有与谷蛋白B-4信号肽相融合的WT NtEGm。
- [0295] 93.pAG2085 (SEQ ID NO:275) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有P77853-T145-307内含子修饰的木聚糖酶。
- [0296] 94.pAG2086 (SEQ ID NO:278) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853-T145-307内含子修饰的木聚糖

酶。

[0297] 95.pAG2087 (SEQ ID NO:279) 衍生自pAG2005,其中在水稻Ubi3启动子和Nos终止子之间带有与BAASS细胞壁靶向信号序列相融合的P77853-T145-307:SEKDEL内含子修饰的木聚糖酶。

[0298] 下述表A1提供了在上述列出的每个载体18-19、21-84和89-95中编码的蛋白质的氨基酸序列,以及编码蛋白质的核酸。

[0299] 本发明的实施方式包括但不限于:下面表A1中标题为“核苷酸序列”的基因序列,表A1中标题为“蛋白质序列”的氨基酸序列,含有表A1所列基因序列的植物,含有表A1所示基因序列的载体,表A1中标题为“pAG载体”的载体,含有表A1所列载体的植物,含有由表A1所列核苷酸序列编码的蛋白质的植物,以及含有表A1所列蛋白质序列的植物。对于表A1中的载体,每个标题为“pAG载体”的条目包括一个编号。“pAG”加上编号就是载体的完整名称。例如,列出的“2014”指的就是载体pAG2014。

[0300] 表A1

[0301]

PAG 载体	蛋白质序列	核苷酸序列
2014、2015、2017-2038、 2040-2087	SEQ ID NO: 44-115	SEQ ID NO: 116-187

[0302] 实施例6-植物转化

[0303] 玉米转化

[0304] 未成熟玉米胚的农杆菌介导的转化按下述文献记载的进行,Negrotto et al., (2000) 植物细胞报告19:798-803,该文献通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样。将用于转化的转化质粒和可筛选的标记基因克隆至上述的适于单子叶植物转化的pAG-系列载体中。用于本实施例的载体含有磷酸甘露糖异构酶(PMI)基因(Negrotto et al., (2000) 植物细胞报告19:798-803)作为可筛选标记,但是也可以使用其它具有相同能力的标记。

[0305] 转化载体和农杆菌菌株

[0306] 使用上述的本领域已知的标准分子技术构建农杆菌转化载体。将质粒引入到农杆菌菌株LBA4404+pSB1中(Ishida et al. (1996) 自然生物技术14:745-750,该文献通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样)。

[0307] 将含有质粒的农杆菌菌株培养过夜,然后在含有100mg/L壮观霉素和10mg/L四环素的固体YP培养基的培养皿中于28℃培养2天培养2-4天。

[0308] 将农杆菌重悬于添加有100mM乙酰丁香酮(As)的LS-inf培养基(LSAs培养基)中(Negrotto et al., (2000) 植物细胞报告19:798-803,该文献通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样),直到农杆菌细胞在悬浮液中分散均匀。然后将农杆菌悬浮液稀释到OD₆₆₀值为0.5-0.8,并振荡约15秒。

[0309] 玉米未成熟胚的感染和共培养

[0310] 玉米(玉米品种HiII,A188或B73)亲本植物在温室中在16小时日照和28℃的条件下生长。收集授粉后7-15天的幼穗,然后将其浸入20%的氯漂白剂中(市售可得,注册商标为CHLOROX[®])15-20分钟进行灭菌。然后用无菌水彻底清洗经灭菌的穗。

[0311] 从籽粒中分离未成熟的合子胚,并将其收集到盛有液体LS-inf+100p1M As (LSAs)培养基的无菌离心管中。将胚振荡5秒并用新鲜的感染培养基再次清洗。去除感染培养基,加入农杆菌溶液,将胚振荡30秒,然后使其与细菌接触约5分钟。

[0312] 接种后,将未成熟的胚转移至LSAs培养基中,将其盾片(scutellum)向上放置,并在黑暗处于22℃培养2-3天。

[0313] 转化的玉米胚组织的回收,筛选和植物再生

[0314] 共培养后,将未成熟的胚转移至添加有200mg/L的泰门汀(timentine)和1.6mg/L的硝酸银(Negrotto et al,2000)的LSDc培养基中。在黑暗处于28℃在培养皿中培养5-15天。

[0315] 将产生胚性愈伤组织的胚转移至LSD1M0.5S培养基(含有5mg/L的麦草畏,10g/L的甘露糖,5g/L的蔗糖的LSDc)中。在该培养基中筛选培养物6周,每3周传代一次。将存活的培养物转移至LSD1M0.5S培养基中以便长大或转移至Reg1培养基中(如Negrotto et al,2000所述)。然后在光照条件下培养(按照16小时光照/8小时黑暗的周期),然后将绿色组织转移至未添加生长调节剂的Reg2培养基中(如Negrotto et al,2000所述)并培养1-2周。将发育良好的幼苗连同叶子和根转移至Reg3培养基(如Negrotto et al,2000所述)并在光照条件下生长。

[0316] 根据Negrotto et al,2000所述,取叶子作为试样用于PCR分析来识别含有可筛选的标记基因和所关注基因的转基因植物。用水洗涤PCR阳性的生根植物来洗掉琼脂培养基,将其移植到土壤中,在温室生长用于产生种子。

[0317] 柳枝稷转化

[0318] 使用本领域普通技术人员熟知的标准方法制备培养基,所述培养基用于农杆菌介导的转化方法中以用于转化的柳枝稷植物的发育。本发明所述的实施例中使用下述培养基。

[0319] 体细胞胚诱导培养基(SEI) SEI培养基由下述材料制备:4.3g MS基底盐混合物,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),30g蔗糖,5mg 2,4-D和10mg BAP,1.2g/LGelrite(Sigma,St.Louis,MO,USA)。将上述试剂混合后用无菌水定容至一升。将pH调为5.8后进行高压灭菌。

[0320] 再生培养基

[0321] 再生培养基是由下述材料制备:4.3g MS基底盐混合物,MS维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),30g蔗糖,和1.2g Gelrite(Sigma,St.Louis,MO,USA)。将上述试剂混合后用无菌水定容至一升。将pH调为5.8后进行高压灭菌。

[0322] 接种培养基(SW-1)

[0323] SW-1培养基由下述材料制备:4.3g MS盐,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),68.5g蔗糖,36g葡萄糖,和1g酪蛋白氨基酸。将上述试剂混合后用无菌水定容至一升。将pH调为5.8后进行高压灭菌。

[0324] 共培养培养基(SW-2)

[0325] SW-2培养基由下述材料制备:4.3g MS盐,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),0.7g L-脯氨酸,10mg BAP,5mg 2,4-D,0.5g MES,20g蔗糖,10g葡萄糖和1.2g Gelrite。将上述试剂混合后用无菌水定容至一升。将pH调为5.8后进行高压

灭菌。。

[0326] 静息培养基 (SW-3)

[0327] SW-3培养基由下述材料制备:4.3g MS盐,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),10mg BAP,5mg 2,4-D,30g蔗糖和1.2g Gelrite。将上述试剂混合后用无菌水定容至一升。将pH调为5.8后进行高压灭菌。

[0328] 筛选培养基1 (S1)

[0329] S1培养基由下述材料制备:4.3g MS盐,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),10mg BAP,5mg 2,4-D,5g蔗糖,10g甘露糖和1.2g Gelrite。将上述试剂混合后用无菌水定容至一升。将pH调为5.8后进行高压灭菌。

[0330] 再生培养基 (R1)

[0331] R1培养基由下述材料制备:4.3g MS盐,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),30g蔗糖和1.2g Gelrite。将上述试剂混合后用无菌水定容至一升。将pH调为5.8后进行高压灭菌。

[0332] 胚愈伤组织的启动培养制备用于转化的成熟的柳枝稷 (*Panicum virgatum*, cv. Alamo) 种子,用砂纸去除它们的种皮。种皮去除后,选择个体种子进行灭菌。将柳枝稷种子浸入20%氯漂白剂(市售可得,注册商标为CHLOROX[®])5-10分钟进行灭菌。然后用无菌水彻底清洗灭菌后的种子。将灭菌后的种子置于体细胞胚诱导培养基(SEI),并在黑暗处于28℃培养3-4周。将所得的胚愈伤组织群簇转移到新鲜的SEI培养基中,在黑暗处于28℃继续培养6周,每3周进行一次传代培养。

[0333] 转化载体和农杆菌菌株使用本领域已知的标准分子技术如上文所述地构建农杆菌转化载体。将质粒导入到农杆菌菌株LBA4404+pSB1中(Ishida et al.(1996)自然生物技术14:745-750)。

[0334] 将包含质粒的农杆菌菌株培养过夜,然后在含有100mg/L壮观霉素和10mg/L四环素的YP培养基的培养皿中生长两天。

[0335] 用于转化的农杆菌的制备每周将来自储存于-80℃的甘油中的农杆菌进行启动培养,所述启动培养在含有合适抗生素的YP半固体培养基中进行,在培养箱中于28℃生长。

[0336] 在接种的前一天,将农杆菌在含有合适抗生素的新鲜YP培养基上划线培养,在培养箱中于28℃生长。对于植物转化的用途,用一次性塑料接种环从培养皿中收集农杆菌,并悬浮在15mL无菌一次性聚丙烯离心管中的液体接种培养基(如SW1)中。振荡约3-5分钟使管中的农杆菌再次悬浮,直到农杆菌细胞在悬浮液中分散均匀。然后将农杆菌悬浮液稀释到OD₆₆₀值为0.5-0.8,并振荡约15秒。

[0337] 柳枝稷胚愈伤组织培养物的感染和共培养

[0338] 通过将外植体和上述制备的细菌悬浮液混合,并振荡30秒,使直径为2mm-3mm的柳枝稷 II 型重复体细胞胚愈伤组织群簇感染上农杆菌。将混合物和所制备的外植体于室温培养约3-15分钟。

[0339] 感染后,将农杆菌悬浮外植体置于共培养培养基(SW-2)的100×15mm的Petri培养皿中,在黑暗处于22℃培养2-3天。

[0340] 转基因植物的再生和筛选在共培养后,将外植体转移至带有抗生素的回收培养基中来杀死农杆菌或抑制农杆菌的生长,所述回收培养基中不含筛选试剂,例如添加有

200mg/L泰门汀(timentin)的回收培养基(SW3)。将培养皿置于黑暗处于28℃培养5-15天。然后将外植体转移至添加有抗生素的S1固体培养基(10g/L甘露糖和5g/L蔗糖)中培养约14-21天。然后将外植体转移至新鲜的S1培养基(10g/L甘露糖和5g/L蔗糖)中培养约14-21天。将抗性克隆转移至胚分化培养基R1(5g/L甘露糖和10g/L蔗糖)中,并置于黑暗处于28℃培养约2-3周。

[0341] 将分化的植物组织转移至新鲜的胚分化培养基R1(5g/L甘露糖和10g/L蔗糖)中并置于光照条件下于26℃培养约2-3周。

[0342] 将发育良好的幼苗连同叶子和根转移至生根培养基中。根据Negrotto et al.(2000),取叶子作为试样用于PCR分析来识别含有可筛选的标记基因和所关注基因的转基因植物。用水洗涤PCR阳性的生根植物来洗掉琼脂培养基,将其移植到土壤中,在温室生长用于产生种子。

[0343] 高粱体细胞胚培养转化

[0344] 材料和方法

[0345] 使用本领域普通技术人员熟知的标准方法制备培养基,所述培养基用于农杆菌介导的转化方法中以用于转化的高粱植物的发育。本发明所述的实施例中使用下述培养基。

[0346] 体细胞胚诱导培养基(SGWT-SEI)

[0347] 将4.3g MS基底盐混合物,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),1.2g KH_2PO_4 ,2.0g L-脯氨酸,0.9g L-天冬酰胺,30g蔗糖,1.5mg 2,4-D和8g琼脂(Sigma,St.Louis,MO,USA)在无菌水中混合。用无菌水将混合物的终体积定容至一升。将pH调为5.8后进行高压灭菌。

[0348] 再生培养基(SGWT-R)

[0349] 将4.3g MS基底盐混合物,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),1.2g KH_2PO_4 ,2.0g L-脯氨酸,0.9g L-天冬酰胺,30g蔗糖,1.0mg IAA,0.5mg激动素和2.4g Gelrite(Sigma,St.Louis,MO,USA)在无菌水中混合。用无菌水将混合物的终体积定容至一升。将pH调为5.8后进行高压灭菌。

[0350] 接种培养基(SGI-1)

[0351] 将4.3g MS盐,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),68.5g蔗糖,36g葡萄糖,1.0g酪蛋白氨基酸和1.5mg 2,4-D在无菌水中混合。用无菌水将混合物的终体积定容至一升。将pH调为5.2后进行高压灭菌。

[0352] 共培养培养基(SGC-2)

[0353] 将4.3g MS基底盐混合物,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),1.2g KH_2PO_4 ,2.0g L-脯氨酸,0.9g L-天冬酰胺,20g蔗糖,10g葡萄糖,0.5g MES,1.5mg 2,4-D,40mg乙酰丁香酮和8g琼脂在无菌水中混合。用无菌水将混合物的终体积定容至一升。将pH调为5.8。

[0354] 体细胞胚诱导培养基(SGCI-3)

[0355] 将4.3g MS基底盐混合物,B5维生素(100mg肌醇,1mg烟酸,1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素),1.2g KH_2PO_4 ,2.0g L-脯氨酸,0.9g L-天冬酰胺,30g蔗糖,1.5mg 2,4-D和8g琼脂(Sigma,St.Louis,MO,USA)在无菌水中混合。用无菌水将混合物的终体积定容至一升。将pH调为5.8。高压灭菌后添加泰门汀至终浓度为200mg/L。

[0356] 筛选培养基1 (SGS1-4)

[0357] 将4.3g MS基底盐混合物, B5维生素 (100mg肌醇, 1mg烟酸, 1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素), 1.2g KH₂PO₄, 2.0g L-脯氨酸, 0.9g L-天冬酰胺, 5g蔗糖, 10g甘露糖, 1.5mg 2,4-D和8g琼脂 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 在无菌水中混合。用无菌水将混合物的终体积定容至一升。将pH调为5.8。高压灭菌后添加泰门汀至终浓度为200mg/L。

[0358] 筛选培养基2 (SGS2-5)

[0359] 将4.3g MS基底盐混合物, B5维生素 (100mg肌醇, 1mg烟酸, 1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素), 1.2g KH₂PO₄, 2.0g L-脯氨酸, 0.9g L-天冬酰胺, 5g蔗糖, 9.0g甘露糖, 1.5mg 2,4-D和8g琼脂 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 在无菌水中混合。用无菌水将混合物的终体积定容至一升。将pH调为5.8。高压灭菌后添加泰门汀至终浓度为200mg/L。

[0360] 再生培养基 (SGR1-6)

[0361] 将4.3g MS基底盐混合物, B5维生素 (100mg肌醇, 1mg烟酸, 1mg盐酸吡哆醇和10mg盐酸硫胺素), 1.2g KH₂PO₄, 2.0g L-脯氨酸, 0.9g L-天冬酰胺, 20g蔗糖, 5.0g甘露糖, 1.0mg IAA, 0.5mg激动素和2.4g Gelrite (Sigma, St. Louis, MO, USA) 在无菌水中混合。用无菌水将混合物的终体积定容至一升。高压灭菌后添加泰门汀至终浓度为200mg/L。

[0362] 来自不成熟合子胚的体细胞胚的启动培养

[0363] 将高粱 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) 的未成熟颖果浸入20%氯漂白剂 (CHLOROX®) 20分钟进行杀菌。然后用无菌水彻底清洗经灭菌的颖果。

[0364] 从颖果中分离不成熟的胚, 并置于体细胞胚诱导培养基 (SGWT-SEI) 上。将培养皿在黑暗处于26℃至28℃培养约2-4周。所得的体细胞胚群簇用于转化试验或被转移到新鲜的SEI培养基, 在用于进行转化试验之前, 在黑暗处于28℃继续培养3-6周, 每3周进行一次传代培养。

[0365] 转化载体和农杆菌菌株

[0366] 使用本领域已知的标准分子技术如上文所述地构建农杆菌转化载体。将质粒导入到农杆菌菌株LBA4404+pSB1 (Ishida et al. (1996) 自然生物技术14:745-750) 中。

[0367] 将包含质粒的农杆菌菌株培养过夜, 然后在含有100mg/L壮观霉素和10mg/L四环素的YP培养基的培养皿中生长两天。

[0368] 用于转化的农杆菌的制备

[0369] 每周将来自储存于-80℃的甘油中的农杆菌进行启动培养, 所述启动培养在含有合适抗生素的YP半固体培养基中进行, 在培养箱中于28℃生长。

[0370] 在接种的前一天, 将农杆菌在含有合适抗生素的新鲜YP培养基上划线培养, 在培养箱中于28℃生长。对于植物转化的用途, 用一次性塑料接种环从培养皿中收集农杆菌, 并悬浮在15mL无菌一次性聚丙烯离心管中的液体接种培养基 (如SW1) 中。振荡约3-5分钟使管中的农杆菌再次悬浮, 直到农杆菌细胞在悬浮液中分散均匀。然后将农杆菌悬浮液稀释到OD₆₆₀值为0.5-0.8, 并振荡约15秒。

[0371] 高粱体细胞胚培养物的感染和共培养

[0372] 通过将外植体和上述所制备的细菌悬浮液混合, 并振荡30秒, 将高粱体细胞胚群簇感染上农杆菌。将混合物和所制备的外植体于室温培养约3-15分钟。

[0373] 感染后, 将农杆菌悬浮外植体置于共培养培养基 (SGC-2) 的100×15mm的Petri培

养皿中,在黑暗处于22℃培养2-3天。

[0374] 转基因植物的再生和筛选

[0375] 在共培养后,将外植体转移至带有抗生素的回收培养基中来杀死农杆菌或抑制农杆菌的生长,所述回收培养基中不含植物筛选试剂,例如添加有200mg/L泰门汀的回收培养基(SGCI-3)。将培养皿置于黑暗处于28℃培养5-15天。

[0376] 然后将外植体转移至添加有抗生素的SGS1-4固体培养基(10g/L甘露糖和5g/L蔗糖)中培养约14-21天。

[0377] 然后将外植体转移至新鲜的SGS2-5培养基(10g/L甘露糖和5g/L蔗糖)中培养约14-21天。

[0378] 将抗性克隆转移至胚分化培养基SGR1-6中(5g/L甘露糖和10g/L蔗糖)中,并置于黑暗处于28℃培养约2-3周。

[0379] 将分化的植物组织转移至新鲜的胚分化培养基R1(5g/L甘露糖和10g/L蔗糖)中并置于光照条件下于26℃培养约2-3周。

[0380] 将发育良好的幼苗连同叶子和根转移至生根培养基中。

[0381] 根据Negrotto et al. (2000),取叶子作为试样用于PCR分析来识别含有可筛选的标记基因和所关注基因的转基因植物。用水洗涤PCR阳性的生根植物来洗掉琼脂培养基,将其移植到土壤中,在温室生长用于产生种子。

[0382] 实施例7-转基因植物的分析

[0383] 酶类的微生物生产

[0384] 作为转基因植物的分析的一部分,可用微生物生产法产生酶标准品。尽管与植物中表达的蛋白质相比,微生物生产的酶具有不同的糖基化模式或其它翻译后修饰,但微生物蛋白质对生产抗体、试验测量以及蛋白质印迹而言都是可接受的标准品。

[0385] 实施例8-用巴斯德毕赤酵母(*P.pastoris*)生产木聚糖酶

[0386] 将编码所关注的酶的基因克隆至表达载体中并转化入适合的表达宿主中。巴斯德毕赤酵母(*Pichai pastoris*)表达在YPD培养基中于30℃以300rpm进行。在表达进行3-5天后,也就是在每毫升澄清上清液中具有最高酶活性的时间点,收集培养上清液。通过使用10kDa MWC0膜的切向流过滤来浓缩所述上清液,并与适合的反应缓冲液交换进行彻底的缓冲。

[0387] 根据生产厂商的说明书,用PNGaseF (NEB) 处理10μL样品来测定存在于浓缩的培养上清液中酶的量,从而将N-连接的聚糖从目标蛋白质上去除。根据生产厂商的说明书,将样品连续稀释,每种稀释度取10μL样品通过SDS-PAGE进行分级并用Simply Blue Safe染色试剂盒(Invitrogen)进行染色。按照染色后可检测到目标蛋白质的最高稀释倍数来确定样品浓度。

[0388] 兔抗血清的生产

[0389] 与特异性蛋白交叉反应的抗体由New England Peptide生产。所关注的蛋白质在巴斯德毕赤酵母中表达。通过使用10kDa MWC0过滤器(Millipore)的切向流过滤来浓缩所得的培养上清液,在某些情况下通过柱色谱法进行进一步纯化。用带有10kDa MWC0 (Millipore)的centricon过滤设备进一步抛光(polish)样品浓缩物,然后通过SDS-PAGE分级。用剃须刀片将与目标蛋白质的预测分子量相应的蛋白质条带从凝胶中切下,并发送给

New England Peptide用以生产抗血清。在收到抗血清后,通过蛋白质印迹鉴定每种抗血清的特异性,等分并储存于4℃或-20℃。用本领域已知的标准条件进行蛋白质印迹分析。

[0390] 实施例9-通过还原糖的测量测定木聚糖酶的活性

[0391] 用桦木木聚糖作为底物来测定木聚糖酶的活性,用纳尔逊-索莫吉(Nelson-Somogyi)还原糖微量分析法测量还原糖末端的生成(Green et al.1989,使用微量滴定板的适应于微量分析的纳尔逊-索莫吉还原糖分析法,分析生物化学.1989Nov 1;182(2):197-9,该文献通过援引的方式纳入本文,如同将其全文抄录在此一样)。在沸水中溶解桦木木聚糖(Sigma)来制备2%(w/v)底物溶液。添加0.02%的叠氮化物(最终浓度)作为防腐剂。如前所述地制备用于纳尔逊-索莫吉还原糖分析的试剂(Green et al.1989)。使用BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo Scientific)测定蛋白质的浓度或如上所述地以稀释倍数表示。

[0392] 一毫升的总反应体积中的试验由250μL的2%桦木木聚糖、250μL缓冲液以及不同体积的木聚糖酶制剂(或用来生成标准曲线的木聚糖酶标准品)组成。试验于60℃进行20分钟,然后置于冰上使反应停止。对每一个反应,取50μL反应物并使用如上所述的纳尔逊-索莫吉还原糖分析来测定还原糖的存在。从与线性范围分析相应的结果测定木聚糖酶的活性单位。用下述公式计算酶制剂的比活性:比活性=(产生的mM还原糖)/(稀释倍数)。参见图7,鉴定了登录号分别为P40942、P77853和O30700的三种木聚糖酶的比活性。如图所示,当使用桦木木聚糖作为底物时,O30700的比活性是P40942和P77853的比活性的5倍。

[0393] 实施例10-转基因植物材料的分析

[0394] 对转基因植物进行试验以测定累积的活性酶水平。对于这些试验,在研钵内用研棒研磨液态氮冷冻叶组织样品,并收集研磨物。在微量滴定板的每孔中加入将10mg冷冻叶研磨物。每孔中加入200μL的100mM缓冲液,利用移液管混合反应物。将板密封并置于摇床上于55℃以200rpm培养16小时。培养后,将每个反应加入到带有1.2μm玻璃纤维过滤器(Millipore,Billerica MA)的多屏HTS滤板中,并通过500x g离心3分钟进行过滤。使用如上所述的纳尔逊-索莫吉还原糖分析通过对50μL所得的滤液进行测定来评估酶的活性。使用BCA蛋白质测定试剂盒(Thermo)测定提取的蛋白质。活性水平表示为每mg提取蛋白质所生成的mM还原糖端基。

[0395] 参见图8,显示了不同转基因植物样品表达木聚糖酶P77853的活性。标签为AG2014和AG2015的样品是分别用质粒pAG2014和pAG2015进行转化所得的样品,AG2004是对照样品。转基因植物样本生成的还原糖与野生型样本的比较表明了转基因植物组织中活性木聚糖酶的累积。

[0396] 实施例11-针对pNP-缀合糖苷的活性的测定

[0397] 为了描述特定木聚糖酶的酶活性的范围特征,使用p-硝基酚(pNP)-缀合糖苷进行了一些试验。在二甲亚砜中制备一摩尔的底物储液。反应体系为50μL,其中含有5mM(最终浓度)底物、100mM缓冲剂和1-10μL的酶制剂。制备反应物,然后于60℃培养1小时。停止反应后添加pH为10.5的100μL的0.1M碳酸盐缓冲液进行培养。检测通过pNP的形成表明的底物水解,检测结果表明400nm处的吸光度增加。

[0398] 按照生产厂商的说明书,使用AZCL缀合底物试剂盒(Megazyme)测定多糖内切水解底物。简而言之,将250μL特异性缓冲液与100μL酶制剂和150μL水混合。将反应于所要求的温度下(通常在37℃-70℃之间)置于水浴培养箱中五分钟,然后添加一片木聚糖酶检测底

物 (xylazyme) AX或纤维素内切酶检测底物 (cellazyme) C。培养反应10分钟,然后将其从培养箱中移出,并用10mL的2% (w/v) 三羟甲基氨基甲烷 (Tris Base) (Sigma[®]) 停止反应。多糖底物的内切水解由可溶蓝色染料的释放指示。通过在590nm处测量反应上清液的吸光度来量化释放的染料的数量。这些反应的对照组包括从巴斯德毕赤酵母 (*P. pastoris*) 或大肠杆菌 (*E. coli*) 的野生型菌株和产生重组酶的菌株中提取的蛋白质提取物。

[0399] 下述表1显示所检测的一些木聚糖酶的活性。如表所示,用P77853、O30700和P40942样品检测了内切木聚糖酶的活性。用包括P40942的样品检测纤维二糖水解酶和 β -葡萄糖苷酶的活性,表明该酶能够内切水解木聚糖,外切水解纤维素和纤维二糖。

[0400] 表1

[0401]

样品	木聚糖酶	β -木糖苷酶	纤维素酶	纤维二糖水解酶	β -葡萄糖苷酶
P77853	+	-	-	-	-
O30700	+	-	-	-	-
P40942	+	-	-	+	+
<i>P. pastoris</i>	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-

[0402] 实施例12-热稳定性的测定

[0403] 通过升温培养后的酶活性的恢复来评估酶的热稳定性。简而言之,将木聚糖酶P77、O30或O40制剂于4 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、70 $^{\circ}$ C或80 $^{\circ}$ C培养一个小时后,然后用如上所述的木聚糖酶检测底物AX进行分析。参见图9,在温度最高达60 $^{\circ}$ C培养1小时后的木聚糖酶O30700和P77853保持几乎100%的活性,但当暴露在70 $^{\circ}$ C和80 $^{\circ}$ C温度处理时活性降低。在温度最高达70 $^{\circ}$ C培养1小时后的木聚糖酶P40942保持几乎100%的活性,但当暴露在80 $^{\circ}$ C时其活性比处于较低温度条件下时有所降低。

[0404] 酶的热稳定性是影响它在不同应用中的使用的特征。例如,在处理如来自玉米(秸秆)、柳枝稷、芒草、高粱或蔗糖的木质纤维素生物量时,如果将转基因生物量材料在70 $^{\circ}$ C处理1小时,P40942可能比O30700或P77853更能够发挥木聚糖酶活性,因为P40942在该温度下的稳定性更强;相反,如果例如来自转基因玉米或高粱的转基因谷物被用来配制动物饲料口粮,其中研磨饲料并在50 $^{\circ}$ C混合,那么上述酶的任一种都能够具有足够的热稳定性。然而,具体的酶的上述用途不排除相同的具体的酶具有其它的用途。

[0405] 实施例13-用于评估转基因植物和它们的预处理和酶促水解过程的材料和方法

[0406] 在处理生物量和某些植物组织的过程中可能使用不同处理过程的组合。一种工艺的组合被称为宏观尺度过程,它可以放大规模,并在下文直接描述。另一种处理过程组合被称为微观尺度过程,它可以用于植物的评估,并在描述宏观尺度过程后进行描述。

[0407] 实施例13a-宏观尺度过程-宏观尺度连续低温化学机械预处理 (CMPT) 和一步法酶促水解:

[0408] 参见图10,使用一些原料通过宏观尺度过程方法将生物量转化为可发酵的糖。图10显示了宏观尺度过程的工艺流程图。

[0409] 生物量底物的制备:

[0410] 用标注的含有 β -葡糖苷酶、内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、FAE或木聚糖酶或上述酶的组合的质粒转化玉米秸秆。所使用的载体可以是编码CWDE或其衍生物的任何载体,包括本发明公开的任何一种或多种载体。在本实施例中,所述载体是pAG2015、pAG2042和pAG2063。所述载体在空气循环器中于37℃烘干大约两周。将烘干的玉米秸秆1010切割成1.0-1.5英寸长的小段。

[0411] 预处理:

[0412] 在步骤1020中,使用纯净水或8%-38%的(以玉米秸秆为基准,wt./wt.)亚硫酸氢铵和4%-19%(以玉米秸秆为基准,wt./wt.)碳酸铵(pH 7.6-8.5)的混合溶液,对切割的干玉米秸秆1010进行预处理。将生物量添加到装有预处理溶液的烧瓶内,使其液固比(L/S)为8。将混合物于40℃-90℃振荡19小时。用VWR级415滤纸过滤经过预处理的材料,并收集材料1025用于进一步的分析。

[0413] 提炼:

[0414] 在步骤1030中,用DI水于40℃-90℃与经过预处理的生物量相混合以进行提炼。混合后,用VWR级415滤纸过滤生物量。用40℃-90℃的DI水清洗不能通过滤纸的提炼的生物量(浆液)。将浆液1035储存于4℃以保持水分平衡并用于进一步的酶促水解。

[0415] 酶:

[0416] 使用Accellerase™1000酶(Genencor International,Rochester,NY)。内切葡聚糖酶的活性是2500CMC U/g(最小)。 β -葡糖苷酶的活性是400pNPG U/g(最小)。其外观是棕色液体。pH值为4.8-5.2。

[0417] 或者,可以使用鸡尾酒酶混合物,包括:购自Sigma(St.Louis,MO)公司的内切葡聚糖酶(C8546), β -葡糖苷酶(49291)和木聚糖酶(X2753),和购自Megazyme(Wicklow,Ireland)公司的纤维二糖水解酶(E-CBHI)。

[0418] 酶促水解:

[0419] 按照NREL标准试验手册(LAP-009)进行实验。在步骤1040,将经过预处理的和提炼的秸秆在0.1M柠檬酸钠(pH 5.0),生物量固体含量为6.0%,酶载量为0.2-0.4mL/g的玉米秸秆的反应体系中进行水解,以释放糖1045。反应于45℃-55℃在250mL锥形烧瓶中以250rpm反应0-48小时。根据酶混合物和植物中的酶表达,pH可能在5-9之间变化。对于所述酶混合物,优选的pH通常是5。

[0420] 任选地,可将四环素或等效的抗生素添加到水解体系中以预防任何潜在的微生物污染的生长。

[0421] 可发酵糖的分析:

[0422] 将水解样品于95℃加热20分钟,然后以9000x g离心,然后通过0.20 μ m PVDF过滤器(Cat.#:09-910-13,Fisher Scientific,Pittsburg,PA)滤清上清液。使用带有LC溶液软件的Shimadzu LC-20AD二元泵(Shimadzu,Kyoto,Japan),通过高效液相色谱(HPLC)来测定单糖和二糖的浓度。使用Aminex HPX-87P糖柱(Bio-Rad Laboratories,Hercules,CA),以脱气水作为流动相,以0.6mL/min和85℃的条件测定糖浓度。用RI检测器(RID 10AD)分析所

有样品的峰面积,对峰面积进行积分后将峰面积值与标准曲线对比以进行量化。

[0423] 宏观尺度过程的结果

[0424] 1-来自野生型AxB植物的玉米秸秆。对于玉米秸秆,糖的理论产率为33.5% (wt/wt)的葡萄糖和16.3% (wt/wt)的木糖。

[0425] 预处理:如上所述,在8%硫酸氢铵和4%碳酸铵或38%硫酸氢铵和19%碳酸铵溶液中,于70℃预处理4小时。

[0426] 酶促水解:如上所述进行24或48小时。

[0427] 结果示于下表2。一天或两天的来自稀释的化学预处理的酶促水解能够得到54.5% (24小时)和62.3% (48小时)的葡萄糖回收率,以及20% (24小时)和27.5% (48小时)的木糖回收率。结果证实了低温CMPT对酶促水解的效率。

[0428] 表2

[0429]

预处理的玉米秸秆(AxB)经酶促水解后得到的葡萄糖和木糖产率				
预处理	8%亚硫酸氢盐, 4%碳酸盐		38%亚硫酸氢盐, 19%碳酸盐	
酶促水解时间(小时)	24	48	24	48
葡萄糖(g/100g 秸秆)	18.292	21.056	23.995	24.300
木糖(g/100g 秸秆)	3.285	4.483	5.637	5.836

[0430] 2-秸秆。测试了烘干的野生型AxB玉米秸秆,并与来自九个pAG2015转基因玉米植物的秸秆混合物(在本实施例中称作“2015M”)作比较。

[0431] 预处理:如上所述,在16%硫酸氢铵和8%碳酸铵(pH7.6)的溶液中于70℃预处理4小时。

[0432] 酶促水解:如上所述进行0或24小时。

[0433] 结果示于下表3。在糖产率方面,检测到pAG2015转基因玉米植物与野生型AxB植物相比具有较好的水解性能。

[0434] 表3

[0435]

预处理的玉米秸秆(AxB 和 2015M)经酶促水解后得到的葡萄糖和木糖产率				
植物来源	2015M		野生型 AxB	
酶促水解时间(小时)	0	24	0	24
葡萄糖(g/100g 秸秆)	2.171	18.332	2.232	14.771
木糖(g/100g 秸秆)	0.390	3.797	0.380	3.303

[0436] 实施例13b-微观尺度过程:简化的低温化学机械预处理 (CMPT) 和酶促水解

[0437] 参见图11,通过一步或两步法酶促水解,使用微观尺度糖化方法来筛选一些生物量原料用于可发酵糖的转化。

[0438] 生物量底物的制备:

[0439] 用含有 β -葡糖苷酶、内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、FAE或木聚糖酶或上述酶的组合的所需载体转化来自玉米的玉米秸秆1110。将秸秆在空气循环器下于37℃烘干大约2周。烘干后,将玉米秸秆切割成1.0-1.5英寸长的小段。在步骤1120中,用带有0.5mm的筛的UDY磨粉机 (Model 014,UDY Corporation, Fort Collins, Co) 将秸秆磨碎。

[0440] 预处理:

[0441] 在步骤1130中,使用纯净水或化学试剂预处理磨碎的玉米秸秆。将生物量添加到装有预处理溶液的2mL试管内,使其液固比为10。可以使用20mg的生物量。将混合物在40℃-90℃下振荡15-19小时。经过预处理的材料无需进行步骤间清洗而直接进行酶促水解。

[0442] 酶:

[0443] 内切葡聚糖酶 (C8546)、 β -葡糖苷酶 (49291)、以及木聚糖酶 (X2753) 均购自Sigma[®] (St.Louis, MO) 公司。纤维二糖水解酶 (E-CBHI) 购自Megazyme[®] (Wicklow, Ireland) 公司。

[0444] 酶促水解:

[0445] 过程以NREL标准试验手册 (LAP-009) 为基础。

[0446] 一步法水解:

[0447] 将磨碎的经过预处理的秸秆悬浮在pH值范围为3.5-5.0的2% (w/v) 葡聚糖载量的多重缓冲液中 (50mM柠檬酸钠、20mM磷酸氢二钾、17mM精氨酸、40mM甘氨酸、25mM EPPS、20mM HEPES以及0.02%叠氮化钠)。使用的pH以悬浮的经过预处理秸秆的最终pH为基础。鸡尾酒酶混合物的载量以使用的10mg秸秆的实验为基础,其用量如下表4所示。通过水解过程分析了各组生物量,各组生物量分别为没有添加任何酶 (不含鸡尾酒酶混合物),以及鸡尾酒酶混合物中除去木聚糖酶、内切葡聚糖酶或其它在植物中表达的酶 (根据植物中表达的酶,分别为鸡尾酒酶混合物-木聚糖酶或鸡尾酒酶混合物-内切葡聚糖酶)。基于水解在植物表达酶中完成了效果评估。样品在40℃-50℃以200rpm水解48-96小时 (1mL反应体积)。

[0448] 任选地,可以将四环素或等效的抗生素添加到水解体系中以预防任何潜在的微生物污染的生长。

[0449] 表4

[0450]

完全鸡尾酒酶混合物的酶载量	
酶	酶载量/10mg 秸秆
内切葡聚糖酶	0.5 μ M
纤维二糖水解酶	0.1 μ M
β -糖苷酶	0.01 μ M
内切木聚糖酶	0.3 μ M

[0451] 两步法水解:

[0452] 以植物中表达的酶来命名第一步酶促水解(例如“木聚糖酶水解”或“葡聚糖酶水解”)。随后的第二步酶促水解命名为“鸡尾酒酶水解”。

[0453] 对于第一步,将磨碎的经过预处理的秸秆悬浮在pH值范围为5.0-8.4的3% (w/v) 葡聚糖载量的多重缓冲液中。使用的pH以植物表达的酶的最佳pH为基础。水解于55 $^{\circ}$ C以300rpm进行24-48小时。

[0454] 对于鸡尾酒酶水解,根据需要用浓盐酸调节pH为5.0。如在一步法酶促水解过程中所述将鸡尾酒酶添加到样品中,使得样品中分别为不含鸡尾酒酶混合物、含完全鸡尾酒酶混合物和含有鸡尾酒酶混合物-木聚糖酶或鸡尾酒酶混合物-内切葡聚糖酶。添加pH 5.0的多缓冲液得到的最终固含量浓度为2%。样品在50 $^{\circ}$ C以200rpm水解48-96小时。

[0455] 任选地,可以将四环素或等效的抗生素添加到水解体系中以预防任何潜在的微生物污染的生长。

[0456] 可发酵糖的分析:

[0457] 将水解样品于95 $^{\circ}$ C培养20分钟,然后以9000x g离心分离,然后通过0.20 μ m PVDF过滤器滤清上清液。使用带有LC溶液软件的Shimadzu LC-20AD二元泵(Shimadzu, Kyoto, Japan),通过高效液相色谱(HPLC)来测定单糖和二糖的浓度。使用Aminex HPX-87P糖柱(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA),以脱气水作为流动相,以0.6mL/min和85 $^{\circ}$ C的条件测定糖浓度。用RI检测器(RID 10AD)分析所有样品的峰面积,对峰面积进行积分后将峰面积值与标准曲线对比以进行量化。

[0458] 微观尺度过程的结果

[0459] 1-一步法酶促水解, pAG2015。被分析的植物秸秆:使用命名为2015.05的转基因玉米植物(用pAG2015转化玉米制得,表达木聚糖酶)来提供秸秆。对照植物:使用命名为2004.8.4的转基因玉米植物(来自同一亲本的T1代植物,用不编码木聚糖酶的pAG2004转化玉米制得)来提供对照秸秆。理论糖产率:2015.05:33.35%葡萄糖、18.69%木糖;2004.8.4:2015.05:34.68%葡萄糖、20.6%木糖。

[0460] 预处理:如上所述,在1:19 (v/v)的15%NH₄OH、20%NH₄Cl于40 $^{\circ}$ C或60 $^{\circ}$ C以300rpm预处理15小时。

[0461] 一步法酶促水解:如上所述,在0.02%叠氮化钠中于50 $^{\circ}$ C以250rpm水解48小时。

[0462] 图12表明了经过预处理的玉米秸秆(2015.05和2004.8.4)的酶促水解的葡萄糖和木糖的产率(生物量重量百分比)。如图12所示,从整个水解率和植物表达木聚糖酶(如“鸡尾酒-Xy1”处理组所示)对水解的效果来看,2015.05均显示出更好的水解性能。在图12中,使用下述附图标记:40C PT:在40℃完成预处理;60C PT:在60℃完成预处理。“鸡尾酒-Xy1”表示在进行一步法酶促水解过程中外部添加的鸡尾酒酶混合物中不含木聚糖酶。图12中的每个标记的样品从左到右显示了“不含鸡尾酒酶混合物”、“完全鸡尾酒酶混合物”和“鸡尾酒酶混合物-Xy1”的结果。

[0463] 2-一步法酶促水解,pAG2063。被分析的植物秸秆:使用命名为2063.13和2063.17的转基因植物(用pAG2063转化玉米制得,表达木聚糖酶)来提供秸秆。使用命名为2004.8.4的对照植物(用pAG2004转化玉米制得的转基因植物;不表达木聚糖酶)来提供对照秸秆。

[0464] 预处理:如上所述,在1:19(v/v)的15%NH₄OH、20%NH₄Cl于40℃或60℃以300rpm预处理15小时。

[0465] 一步法酶促水解:如上所述,用1.0mg/mL四环素于50℃以250rpm水解48小时。

[0466] 图13表明了经过预处理的玉米秸秆(2004.8.4、2063.13和2063.17)的酶促水解的葡萄糖和木糖的产率(生物量重量百分比)。如图13所示,从整个水解率和植物表达木聚糖酶(如“鸡尾酒-Xy1”处理组所示)对水解的效果来看,转基因植物2063.17比参照植物和2063.13显示出更好的水解性能。在图13中,使用下述附图标记:40C PT:在40℃完成预处理;60C PT:在60℃完成预处理。“鸡尾酒-Xy1”表示在进行一步法酶促水解过程中外部添加的鸡尾酒酶混合物中不含木聚糖酶。图13中的每个标记的样品从右到左显示了“鸡尾酒酶混合物-Xy1”和“完全鸡尾酒酶混合物”的结果。在三个柱的图中,在“完全鸡尾酒酶混合物”结果的左边显示的是“不含鸡尾酒酶混合物”的结果。

[0467] 3-两步法酶促水解,pAG2014。被分析的植物秸秆:使用转基因植物2015.05提供秸秆;使用对照植物2004.8.4提供对照秸秆。本文中所使用的术语中,T0植物是指第一代;T1植物是指由T0植物种子产生的第二代。

[0468] 预处理:如上所述,用DI水于55℃以300rpm预处理16小时。

[0469] 第一步酶促水解(木聚糖酶水解):如前所述,在0.02%叠氮化钠中于55℃以250rpm水解24小时。

[0470] 第二步水解(鸡尾酒酶水解):如上所述,于50℃使用鸡尾酒酶混合物水解48小时。

[0471] 图14表明了预处理的玉米秸秆(2015.05和2004.8.4)的酶促水解的葡萄糖和木糖的产率(生物量重量百分比)。从整个水解率和植物表达木聚糖酶(见图14,如“Ct-Xy1”处理组所示)对水解的效果来看,T0和T1代2015.05显示出较好的水解性能。在图14中,使用下述标签:“N Ct”:不含鸡尾酒酶混合物,“F Ct”:完全鸡尾酒酶混合物,“Ct-xy1”:鸡尾酒酶混合物-木聚糖酶。图14中的每个标记的样品从左到右显示了“不含鸡尾酒酶混合物”、“完全鸡尾酒酶混合物”和“鸡尾酒酶混合物-Xy1”的结果。

[0472] 4-两步法酶促水解,pAG2063。被分析的植物秸秆:使用命名为2063.17的转基因植物(用pAG2063转化玉米制得)来提供秸秆。使用命名为2004.8.4的对照植物(用pAG2004转化玉米制得)来提供对照秸秆。

[0473] 预处理:如上所述,用DI水于55℃以300rpm预处理16小时。

[0474] 第一步酶促水解(木聚糖酶水解):如前所述,在0.02%叠氮化钠中于55℃以

250rpm水解24小时。

[0475] 第二步水解(鸡尾酒酶水解):如上所述,于50℃使用鸡尾酒酶混合物水解96小时。

[0476] 图15表明了预处理的玉米秸秆(2064.17和2004.8.4)的酶促水解的葡萄糖和木糖的产率(生物量重量百分比)。如图15所示,通过预处理过程,第一步木聚糖酶水解和第二步鸡尾酒酶水解,2063.17的葡萄糖和木糖的产率都比2004.8.4的产率高。通过所述过程2063.17的木糖产率增加,表明植物表达木聚糖酶对木聚糖水解有积极的效果。

[0477] 在图15中,使用下述附图标记:PT:预处理后的水平;PT-XH:木聚糖酶水解后的水平;48hrs:48小时的第二步之后的水平;96hrs:96小时的第二步之后的水平。“鸡尾酒-Xy1”表示在进行一步法酶促水解过程中外部鸡尾酒酶混合物中不含木聚糖酶。2004.8.4、PT2004.8.4PT-XH、2063.17和PT2063.17PT-XH样品仅显示了不含鸡尾酒酶混合物的结果。剩余样品从左到右显示了“不含鸡尾酒酶混合物”、“完全鸡尾酒酶混合物”和“鸡尾酒酶混合物-木聚糖酶”的结果。

[0478] 5-一步法酶促水解,pAG2042。被分析的植物秸秆:使用命名为2042.2、2042.3和2042.6的转基因植物(用pAG2042转化玉米制得)来提供秸秆。使用对照玉米植物2004.8.4来提供对照秸秆。

[0479] 预处理:如上所述,用0.3M亚硫酸氢铵/0.34M碳酸铵溶液于40℃或60℃以300rpm预处理19小时。

[0480] 第一步酶促水解:如上所述,在1.0mg/mL四环素中于50℃以250rpm水解48小时。

[0481] 图16表明了预处理的玉米秸秆(2042.02、2042.03、2042.06和2004.8.4)的酶促水解的葡萄糖的产率(生物量重量百分比)。如图16所示,2042.3的葡萄糖的产率比其它两个转基因植物(2042.2和2042.6)以及对照植物(2004.8.4)的葡萄糖的产率高很多。在图16中,使用下述附图标记:40C PT:在40℃完成预处理;60C PT:在60℃完成预处理。图16中的每个标记的样品从左到右显示了“不含鸡尾酒酶混合物”、“完全鸡尾酒酶混合物”和“鸡尾酒酶混合物-内切葡聚糖酶”的结果。

[0482] 实施例14-转基因植物材料的还原糖释放的测定

[0483] 参见图18,测试转基因植物以测定累积的活性酶的水平。对于所述测试,在研钵内用研棒研磨液氮冷冻叶组织样品,并收集所得的研磨样品。称取10mg冷冻叶研磨物并分配到微量滴定板的孔。向每孔中添加200μL的100mM磷酸钠缓冲液(pH6.5),用移液管混合反应物。用箔将板密封并置于温控摇床中于55℃以200rpm振荡16小时。培养后,将每个反应体系加入到带有1.2μm玻璃纤维过滤器(Millipore,Billerica MA)的多屏HTS滤板中,并通过500x g离心3分钟进行过滤。使用如上所述的纳尔逊-索莫吉还原糖分析通过测试50μL所得的滤液来评估酶的活性。使用BCA蛋白质测试试剂盒(Thermo Scientific)测定提取的蛋白质。活性水平表示由每mg提取蛋白质所生成的mM还原糖端基。与无木聚糖酶表达的转基因对照植物样品(AG2004)相比,转基因植物样品(AG2014和AG2015)产生的还原糖表明了转基因植物组织中活性木聚糖酶的累积。

[0484] 实施例15-检测转基因玉米秸秆的自溶解活性

[0485] 将10mg(±1mg)经研磨的样品置于1.5mL的微量离心管内。将磨碎样品于用1mL的100mM磷酸钠缓冲溶液(包括40μg四环素和30μg环己酰亚胺)中重悬。以18rpm的翻滚式混合于60℃培养反应物64小时。收集反应上清液,使用纳尔逊-索莫吉还原糖分析来测定所述上

清液中存在的还原糖。与木糖标准曲线对比后,分析结果以等价于mM木糖的所生成还原端基/mg秸秆来表示。

[0486] 实施例16-转基因植物和表达细胞壁降解酶的转基因植物

[0487] 通常,对于每个转化载体,至少制备20个转化事件。一些情况下,要制备更多(多达90个)转基因事件,并且所有事件都被用来评估转化过程和基因表达的效果。

[0488] 使用pAG3000和pAG3001构建的转基因植物

[0489] 参见图17A和17B,使用pAG3000和pAG3001,按如上所述的转化步骤再生T0植物。植物转化载体pAG3000和pAG3001如上所述。所述载体具有驱动大肠杆菌基因表达磷酸甘露糖异构酶(PMI)的水稻肌动蛋白1启动子,可被用于筛选转基因植物或用于其它目的。pAG3000和pAG3001的区别在于水稻肌动蛋白1启动子和PMI基因之间的连接。在pAG3000中,使用了部分真核翻译起始位点共有序列,而在pAG3001中,使用了完整的真核翻译起始位点。如上所述地用pAG3000和pAG3001转化玉米胚。

[0490] 如上所述地再生表达pAG3000和pAG3001的转基因植物。按照上述实验流程,基于实验结果,所选择的含有pAG3000和pAG3001的转基因植物在玉米中产生的平均转化效率分别为22.6%和12.3%。在其它种属中,很难计算转化效率(定义为:转基因植物的数量除以转化目标的数量,其中每一个转化目标中的转基因事件不超过一个),这是因为愈伤组织目标作为离散目标不容易计数。在单一试验中观察到的最大效率分别为28%(pAG3000)和14%(pAG3001)。以这些数据为基础,使用部分真核翻译起始位点共有序列可以提供比使用完整的真核翻译起始序列更高的转化效率。尽管认为水稻肌动蛋白1启动子是相对强的组成型启动子,但通过将其与PMI连接所得到的转化效率是未知的,并且相对于最初获得的CMPS:PMI构建体而言,不能确定水稻肌动蛋白1启动子能使转化效率提高多少。基于这些结果,使用CMPS:PMI的平均转化筛选效率为1.5%,最大值为14%,但在个体实验中得到的效率为0%、2%、3%、6%、7%、13%和14%的。转化目标材料的质量可能影响转化效率的范围,但是上述平均值和范围可以帮助确定使用上述构建体进行转化的预期收获。基于这些结果,使用如上所述的实验流程,将PMI与水稻肌动蛋白1启动子相连接提高了PMI的转化效率。而且,pAG3000中所使用的水稻肌动蛋白1启动子和PMI之间的连接与pAG3001中使用的连接相比,所得的平均转化率更高。

[0491] 如图17A和17B所示,含有pAG3000(图17A)和pAG3001(图17B)的转基因植物在该发育阶段是表型正常的转基因植物。用PCR已证实了所述植物的转基因本质。

[0492] 实施例17-使用pAG2004和pAG2005构建的转基因植物

[0493] 参见图18A、18B、18C、19A和19B,用植物转化载体pAG2004(图18A、18B和18C)和pAG2005(图19A和19B)转化玉米。所述载体具有能够驱动大肠杆菌基因表达磷酸甘露糖异构酶(PMI)的水稻肌动蛋白1启动子,可被用于筛选转基因植物或用于其它目的。pAG2004和pAG2005之间的区别是pAG2005包括附加的空表达盒,可以用于将其它关注的基因克隆进去。对于筛选转基因事件而言,pAG2004和pAG2005具有相同的水稻泛素3启动子和PMI筛选表达盒。这两个载体总体而言得到20%的平均转化效率。在个体实验中,所述载体提供的转化效率为0%、4%、7%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、17%、18%、24%、28%、29%、30%、31%、32%、40%、50%、53%和64%。转化目标材料的质量可能影响转化效率的范围,但是上述平均值和范围可以帮助确定使用上述构建体进行转化的预期收获。

[0494] 使用上述方法观察到,与PMI融合的水稻泛素3启动子相对于CMPS:PMI显著增加了转化效率。而且,平均转化效率比使用pAG3001获得的更高,而与使用pAG3000获得的转化效率相似。如上所述,因为使用pAG2004和pAG2005所得到的最大转化效率比使用pAG3000所得到的最大转化率更高,所以pAG2004和pAG2005筛选表达盒被用于进一步的转基因植物的开发。

[0495] 图18A、18B、18C、19A和19B显示按照如上所述的转化流程再生的T0植物。图18A表明接近衰老的pAG2004转基因植物是表型正常的。图18B和18C显示了来自pAG2004转基因植物的穗轴也是表型正常的。图19A和19B显示了pAG2005转基因植物是表型正常的。用PCR已证实了所述植物的转基因本质。

[0496] 图20显示来自用pAG2004转化的转基因植物事件#15的还原糖的测量。在图20中,缓冲液样品代表了测试背景,其中测量时使用了1mg缓冲液。因为pAG2004不表达细胞壁降解酶,所以,与别的植物相比它的还原糖测量代表阴性对照,也代表野生型的非转基因植物。

[0497] 实施例18-使用pAG2016构建的转基因植物

[0498] 在转化中使用转化载体pAG2016来再生转基因植物。该转化载体衍生自pAG2005并包括用于产生 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)的表达盒。在所述表达盒中,GUS与玉米密码子优化的PR1a信号肽相融合,这指导GUS到质外体细胞间隙。所述载体的转化效率平均值为16%,在所使用的PMI筛选表达盒的预期范围内。

[0499] 参见图21A和21B,T0pAG2016转基因植物和穗轴是表型正常的。按照从上述的转化流程再生植物。用PCR已证实了所述植物的转基因本质。所述植物证明了pAG2005内含有的表达盒能够有效地表达转基因。转基因植物还证明了PR1a信号肽(与pAG2016中的GUS融合)没有显著影响转化效率或转基因植物的表型。

[0500] 实施例19-使用pAG2014、pAG2015、pAG2020和pAG2025构建的转基因植物

[0501] 使用转化载体pAG2014、pAG2015、pAG2020和pAG2025进行转化以再生转基因植物。转化载体pAG2014、pAG2015和pAG2020衍生自pAG2005,且每个载体包括用于产生木聚糖酶(登录号P77853)的表达盒。在pAG2014中,P77853基因与用于靶向细胞壁的大麦 α -淀粉酶信号肽序列(BAASS)融合。在pAG2015中,P77853基因不和任何信号肽融合,因此应在细胞质内积聚。在pAG2020中,P77853与将酶靶向至质外体的PR1a信号肽融合。与之不同,pAG2025衍生自pAG2012,使用水稻谷蛋白GluB-4启动子和GluB-4信号序列来指导P77853在种子组织中特异性表达。pAG2014的平均转化效率是30%,pAG2015的平均转化效率是34%,pAG2020的平均转化效率是24%,pAG2025的平均转化效率是10%。当使用水稻泛素3启动子和PMI筛选表达盒时,所有这些转化效率在转化效率的预期范围内。

[0502] 使用前述方法对生成的转基因事件进行活性测量。下列附图显示了活性测量的结果。

[0503] 参见图22,对转基因植物进行了还原糖测量。图22显示了包括pAG2014(左边的样品)或pAG2004(中间的样品)的转基因植物的还原糖的产生,以及缓冲液对照(右边的样品)。当于60°C培养时,用pAG2014制得的转基因植物事件#5(左边的样品)(表达了P77853木聚糖酶)生成的还原糖远远多于用pAG2004制得的植物生成的还原糖。

[0504] 参见图23,用干的、衰老的玉米秸秆样品进行酶活性测量。图23中从左边数前六个

样品是含有pAG2014的不同的转基因植物。第七个样品是来自含有pAG2004的转基因植物的阴性对照样品。使由pAG2014制得的转基因植物衰老,然后在培养箱中烘干达到极其干燥的水平。干燥的水平可为含水量小于1%。将秸秆样品磨碎并如上所述进行试验。如图所示,即使经历衰老、干燥以及研磨过程,酶活性仍是稳定的。从这份数据得到的活性范围,从低水平(接近无木聚糖酶表达的对照(2004.15))到超过8 μ g RBB等同物/mg秸秆的水平。

[0505] 参见图24,用pAG2015、pAG2014或pAG2004制得的转基因植物叶子组织样品进行酶活性测量。从右边数第七个是pAG2014样品。最后一个是pAG2004样品。所有其它的样品是pAG2015植物的不同转基因事件。从图中可以看出,因为插入到植物染色体组的基因是高度可变的并且显著影响表达性质,所以得到活性水平的范围。通常,对于给定载体可以得到最大的活性水平,而且也有可能获得低于最大活性水平的任何活性。

[0506] 如图24所示,pAG2015(细胞质P77853)和pAG2014(BAASS:P77853)提供了显著的活性水平。当在植物中表达并从绿色组织的和衰老的玉米秸秆中取样时,pAG2015的活性是显著的,然而,试验表明,当pAG2014在来自衰老的玉米秸秆的样品中产生较高水平的还原糖。与之不同,在所测试的绿色组织中,pAG2025没有提供活性(图24中未显示数据),这符合预期,因为pAG2025转基因表达盒具有种子特异性表达的性质。

[0507] 图25A和25B显示用pAG2014制得的转基因植物。图25C显示来自用pAG2014制得的转基因植物的穗轴。图26A和26B显示用pAG2015制得的转基因植物,图26C和26D显示来自用pAG2015制得的转基因植物的穗轴。图27A和27B显示用pAG2020制得的转基因植物,图27C显示来自用pAG2020制得的转基因植物的穗轴。参见图28A、28B和28C,显示用pAG2025制得的转基因植物。所述植物证明了P77853木聚糖酶在含有pAG2005的表达盒中能够有效地表达。转基因植物还证明了BAASS和PR1a信号肽(分别在pAG2014和pAG2020中与P77853融合)没有影响转化效率,但相对于细胞质累积而言却影响了表型。所述植物的表型是非常令人关注的和意料之外的。没有已知的工作显示木聚糖酶在玉米、柳枝稷、高粱或蔗糖中的表达。基于本发明的结果,木聚糖酶能够赋予植物特殊的表型,但是它们高度依赖于所使用的具体的酶、信号肽和启动子,以及是否存在ER驻留信号SEKDEL。

[0508] P77853木聚糖酶是令人关注的,这是因为用pAG2014、pAG2015、pAG2020和pAG2025制得的转基因玉米植物都具有正常的生长表型,但一些具有不同的种子表型。由于木聚糖酶使在植物细胞壁的半纤维素组分中的木聚糖水解,因此发育正常的植物多少有些出乎意料。

[0509] 参见图25A、25B和25C,对于pAG2014(BAASS:P77853),在许多转基因事件中检测到严重枯萎的籽粒。所述植物有正常的生长和发育,但在多株植物中检测到的分散的枯萎种子表型。见图25C中的枯萎的种子2510。随机选择枯萎的种子和正常的种子,用来测试木聚糖酶的活性的增加(表明了P77853酶的存在)。对于种子的测试,所有枯萎的种子的木聚糖酶的活性有显著的增加,然而,和野生型植物的种子一样,正常的种子中检测不到木聚糖酶活性。另外,从穗轴中随机选择12个枯萎的种子,并将其和12个外观正常的种子一起种植。对于种植的种子,12个枯萎的种子中仅有1个发芽(经PCR测试显示具有P77853基因),然而12个正常的种子中有9个发芽。对于发芽的9个正常的种子,8个没有P77853基因,而1个具有P77853(由PCR测定)。这表明当表达与BAASS信号序列融合的基因时,P77853会作用于种子,使得所述种子相对于非转基因种子的生育率降低,并且不育的水平依赖于P77853的表达水

平。然而,玉米中种子的枯萎和不育将是一个巨大的商业损害,它在柳枝稷、高粱、芒草、以及蔗糖中可能是有利的,因为这几种植物的不育性从注册审批的角度来看可能是有益的。而且,像柳枝稷和蔗糖这样的多年生作物可以使用本领域已知的方法通过组织培育进行无性繁殖和营养性生长。因此在这些作物中生育力降低并不是严重的问题,而且可能有利于基因限制。因此,虽然在玉米或其它谷物作物中P77853的不良种子表型是有害的,但在饲料、糖类以及用作动物饲料或发酵原料的非谷物作物中,在纤维消化、水解以及降低生育力方面,P77853可以提供显著的利益。用pAG2014制得的转基因柳枝稷事件是表型正常的。

[0510] 参见图26A、26B、26C和26D,对于pAG2015,因为它不含有信号肽,因此在累积的P77853存在于植物细胞质中,并没有检测到不利的表型。这些植物的一些玉米种子与WT种子相比颜色略有变化,但是到现在为止还未检测到其它异常表型(见图26D)。这些植物中确实累积了显著的木聚糖酶活性水平,其平均水平至少与在pAG2014事件中检测到的木聚糖酶活性持平,在大多数事件中还要稍高一些。这两种植物不具有相同种子表型的事实值得关注,并且表明细胞壁靶向的BAASS信号序列(pAG2014载体中所用)与在pAG2014事件中所检测到的种子表型有关。由于这些植物积聚了高水平的木聚糖酶活性,它们可能对作为木聚糖酶的来源、作为原料(能够自动水解用于工业过程如发酵的半纤维素组分)、作为动物饲料或动物饲料添加剂是有用的。和使用pAG2014制得的转基因事件不同,由pAG2015制得的转基因事件没有异常的种子表型,而且可能对谷物作物如玉米、(谷物)高粱、小麦、大麦以及其它的作物是有用的。

[0511] 参见图27A、27B和27C,对于pAG2020(PR1a:P77853)事件,植物和穗轴看起来都是正常的,并且没有显著的可检测到的表型。这尤其令人惊讶,因为PR1a将融合的P77853木聚糖酶定位在质外体,按照预期应该和pAG2014事件具有相似的效果。现在还不知道PR1a信号肽是否会引起低表达、低的酶累积或在P77853蛋白质的靶向性方面中是否不太有效,但从pAG2014得到的结果来看,这些转基因植物中种子表型的缺失是令人惊讶的。由于这些植物累积了木聚糖酶活性,它们可能对作为木聚糖酶的来源、作为原料(能够自动水解用于工业过程如发酵的半纤维素组分)、作为动物饲料或动物饲料添加剂、以及作为谷物动物饲料或饲料添加剂是有用的。和使用pAG2014制得的转基因事件不同,由pAG2020制得的转基因事件没有异常的种子表型,而且可能对谷物作物如玉米、(谷物)高粱、小麦、大麦以及其它的作物是有用的。

[0512] 参见图28A、28B和28C,对于pAG2025(GluB4:P77853)事件,所有的植物看起来是表型正常的。

[0513] 实施例20-使用pAG2017、pAG2019和pAG2027构建的转基因植物

[0514] 在转化中使用转化载体pAG2017、pAG2019和pAG2027来再生转基因植物。转化载体pAG2017和pAG2019衍生自pAG2005,且每个载体包括用于产生木聚糖酶(登录号P40942)的表达盒。载体pAG2027衍生自pAG2012并且被GluB-4启动子驱动而主要在种子中表达P40942木聚糖酶。在pAG2017中,P40942木聚糖酶与将酶靶向至质外体的PR1a信号肽相融合。在pAG2019中,P40942基因与用于靶向细胞壁的大麦 α -淀粉酶信号肽序列(BAASS)相融合。pAG2017的平均转化效率为16%,pAG2019的平均转化效率为13%,pAG2027的平均转化效率为29%。

[0515] 表达P77853的转基因植物除了如上所述的种子异常之外都是表型正常的,而表达

P40942木聚糖酶的植物除了那些由pAG2027制得的之外都是严重发育不良的。参见图29A、29B、29C和29D,被pAG2017 (PR1a:P40942) 转化的植物是严重发育不良的,不能生长到与野生型植物或被pAG2020 (PR1a:P77853) 转化的植物相同的高度。图29A显示了发育不良的pAG2017转基因植物。图29B显示了发育不良的pAG2017转基因植物以及右边的野生型植物。图29C和29D显示了来自pAG2017转基因植物(具有部分枯萎的种子和异常的颜色)的穗轴。由pAG2017得到的结果是出人意料的,因为在体外测量时,P77853和P40942对桦木木聚糖具有大约相同的比活性(如上所述)。P40942还具有一些纤维二糖水解酶(CBH)活性,因此这一活性可能与所检测到的表型相关,但是其他试验小组也在玉米中表达了CBH酶,似乎并没有检测到生长表型。由pAG2017和pAG2020制得的转基因植物之间的显著的生长表型差异是相当令人惊讶的,并且非常出人意料。

[0516] 除了pAG2017植物中的生长表型以外,来自所述植物的种子或所述植物的异型杂交(与AxB非转基因植物杂交)结果也表现出与由pAG2014制得的转基因植物的种子所观察到的相似的枯萎表型,以及表现出一些种子的变色。从pAG2017植物中大约收集了20个枯萎的种子,用前述方法进行测定,发现它们均呈现阳性的木聚糖酶活性,然而饱满的种子则检测不到木聚糖酶活性的增加。

[0517] 参见图30A和30B,与用pAG2017制得的转基因植物相似,用pAG2019 (BASS:P40942) 制得的转基因植物也具有发育不良的生长表型。这是令人惊讶的,因为用pAG2014 (BASS:P77853) 制得的转基因植物没有生长表型,而针对桦木木聚糖测量时,P40942和P77853木聚糖酶具有基本相同的比活性。图30A显示了用pAG2019制得的发育不良的转基因植物,图30B显示了用pAG2019制得的发育不良的转基因植物和左边的野生型植物。

[0518] 参见图31,用pAG2027制得的转基因植物(表达由水稻GlutB启动子驱动的P40942)在生长方面的表型正常的。图31中的左边的3个植物是用pAG2019制得的。右边的3个植物是用pAG2027制得的。pAG2027的结果与用pAG2017和pAG2019制得的转基因植物明显不同,这一结果是令人惊讶的,因为由水稻泛素启动子驱动的P40942表达(使用PR1a或BAASS信号序列)导致了生长发育不良。然而,pAG2027的结果与用pAG2025制得的植物(水稻泛素3启动子驱动的P77853)的检测结果相同,都是发育良好和正常生长的。由于在表达P77853和P40942的载体所检测到的表型有差异,因此不能预测pAG2027的结果会是什么。因为GlutB启动子主要在种子中表达酶,可能是GlutB启动子所驱动表达的酶中没有一种能够产生生长表型或与绿色组织相关的表型,仅能够产生种子表型,这与用pAG2014和pAG2017制得的植物中检测到的表型相似。

[0519] 实施例21-使用pAG2018和pAG2026构建的转基因植物

[0520] 在转化中使用转化载体pAG2018和pAG2026来再生转基因植物。载体pAG2018衍生自pAG2005,并包括用于产生木聚糖酶(登录号030700)的表达盒,且与BAASS信号序列相融合。载体pAG2026衍生自pAG2012,并表达受GlutB-4启动子驱动的主要在种子中表达的030700木聚糖酶。pAG2018的平均转化效率为13%,pAG2026的平均转化效率为18%。

[0521] 如上所述,除了上述的种子异常以外,表达P77853的转基因植物都是表型正常的。相反,参见图32A、32B和32C,由pAG2018制得并表达030700木聚糖酶的转基因植物是严重发育不良的,不能生长到与野生型植物或被pAG2014转化的植物相同的高度。图32A显示了两株由pAG2018制得的转基因植物(左边)和两个无水解酶表达的植物(右边)。图32B和32C显

示了由pAG2018制得的转基因植物。所述结果是出人意料的,因为P77853和O30700都是内切木聚糖酶,而且与P40942不同的是O30700并没有任何CBH活性。由O30700所观察到的生长表型与在pAG2017和pAG2019植物中观察到的矮化生长的表型非常相似。

[0522] 与用pAG2018制得的转基因植物不同,用pAG2026制得的转基因植物(表达由水稻GlutB启动子驱动的O30700)在生长方面的表型是正常的。见图33A、33B和33C,显示了用pAG2026制得的3株不同的转基因植物。这一结果是令人惊讶的,因为受水稻泛素启动子驱动并与BAASS信号序列的融合的O30700的表达导致了矮化生长。相反,pAG2026的结果与用pAG2025制得的植物(水稻泛素3启动子驱动P77853)的检测结果相同,都是发育良好和正常生长的。然而,由于表达P77853和O30700的载体所检测到的表型有差异,因此不能预测结果将会是什么。因为GlutB启动子主要在种子中表达酶,可能是GlutB启动子所驱动表达的酶中没有一种能够产生生长表型或与绿色组织相关的表型,仅能够产生种子表型,这与用pAG2014和pAG2017制得的植物中检测到的表型相似。

[0523] 实施例22-使用pAG2021、pAG2023 (P77853m3)、pAG2022和pAG2024构建的转基因植物

[0524] 在转化中使用转化载体pAG2021、pAG2023、pAG2022和pAG2024来再生转基因植物。上述载体都衍生自pAG2005,并包括用于产生内含子修饰的木聚糖酶(被称为P77853m3)的表达盒。在转化载体pAG2021和pAG2022中,内含子修饰的P77853m3蛋白质与PR1a信号肽融合,而在pAG2023和pAG2024中,P77853m3与BAASS信号肽融合。载体pAG2022和pAG2024还有附加于P77853m3的SEKDEL内质网驻留序列,其中pAG2021和pAG2023中没有SEKDEL序列。pAG2021的平均转化效率是19%,pAG2022的平均转化效率是21%,pAG2023的平均转化效率是24%,pAG2024的平均转化效率是38%。

[0525] 用pAG2021、pAG2022、pAG2023和pAG2024制得的转基因植物中没有一个是具有异常表型。pAG2021的结果参见图34A、34B、34C和34D。用pAG2021制得的转基因植物生长正常,能够达到正常的高度,并有正常的种子集合。pAG2022的结果参见图35A、35B和35C。用pAG2022制得的转基因植物也是生长正常,能够达到正常的高度,并有正常的种子集合。pAG2023的结果参见图36A、36B和36C。这些图表明用pAG2023制得的转基因植物生长正常,能够达到正常的高度。pAG2024的结果参见图37A、37B和37C。这些图表明用pAG2024制得的转基因植物也生长正常,能够达到正常的高度。本实施例证明内含子修饰的细胞壁降解酶能够保护植物免受任何表型(可能是不含内含子修饰的酶给予的)的影响。本实施例中使用了具有对温度敏感的剪接活性的顺式剪切内含子(mini-Psp-pol M1L4m3)。因为所述植物是在非剪接温度下生长,因此没有检测到剪接活性以及没有引起生长或种子表型。在一些温度下,内含子可以发生一定程度的剪接并释放活性酶。由于植物具有正常的表型,内含子修饰的蛋白质的表达是在植物中提供一种包埋式细胞壁降解酶活性的一种方法,这种包埋式活性能够在后续处理中恢复,但对植物表型没有影响。

[0526] 参见图38,测试了选定的转基因事件的酶活性。该图主要显示了一些pAG2021事件的活性数据,同时还显示了pAG2004事件(木聚糖酶活性的阴性对照)的以及pAG2014(木聚糖酶活性的阳性对照)事件的测量结果。在上述测试中,用前述方法测试了衰老植物的烘干的玉米秸秆样品。根据制备植物所使用的载体编号来标记植物样品。2014.5(用pAG2014制得的转基因玉米事件,标记为2014.5)的测量结果代表木聚糖酶活性的阳性对照,而2004.#

(用pAG2004制得的转基因玉米事件)的测量结果代表木聚糖酶的阴性参照秸秆。用pAG2021制得的两株转基因植物显示了显著量的酶活性,但是所述植物是表型正常的,这和显示种子表型的pAG2014事件不同。

[0527] 本发明的实施方式包括但不限于上述植物和/或附图中描述的植物或其部分,编码本文所述任一氨基酸序列的载体,包括本文所述任一核酸序列的载体,本文所述的任一氨基酸序列,本文所述的任一核酸序列,包括本文所述任一载体的植物,包括本文所述任一核酸的植物,包括本文所述任一氨基酸序列的植物,以及本文所述的使用任一植物,植物部分,载体,氨基酸序列或蛋白质序列的任一方法。

[0528] pAG2015序列如SEQ ID NO:207所示。

[0529] 本申请通篇所引用的参考文献基于本文和参考文献本身中能够显而易见的目的而被援引加入,就如将其全文抄录在此一样。为了便于陈述,一些特别的参考文献在本文的一处或多处特定位置被引用。在特定的位置引用的参考文献表明了引入的参考文献所教导的方法。然而,在特定的地方引用的参考文献并不限于其中所使用的方法,而是包括所引用的参考文献的用于全部意图的全部教导。

[0530] 因此,能够理解的是本发明并不局限于所公开的具体实施方式,而是意图覆盖本发明精神和范围内的全部变化方案,本发明的精神和范围由随附的权利要求书和上述说明书所限定和/或由附图显示。

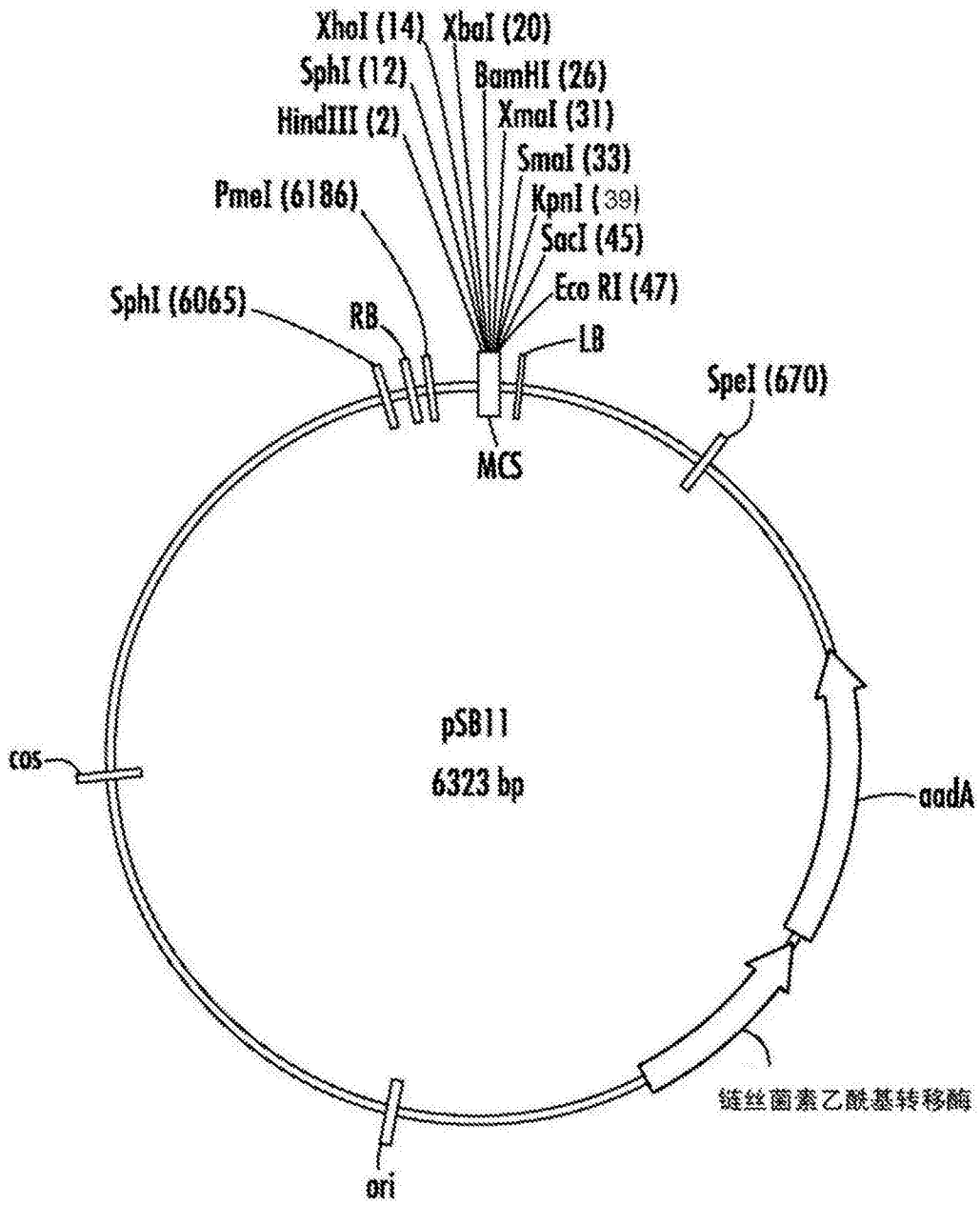


图1

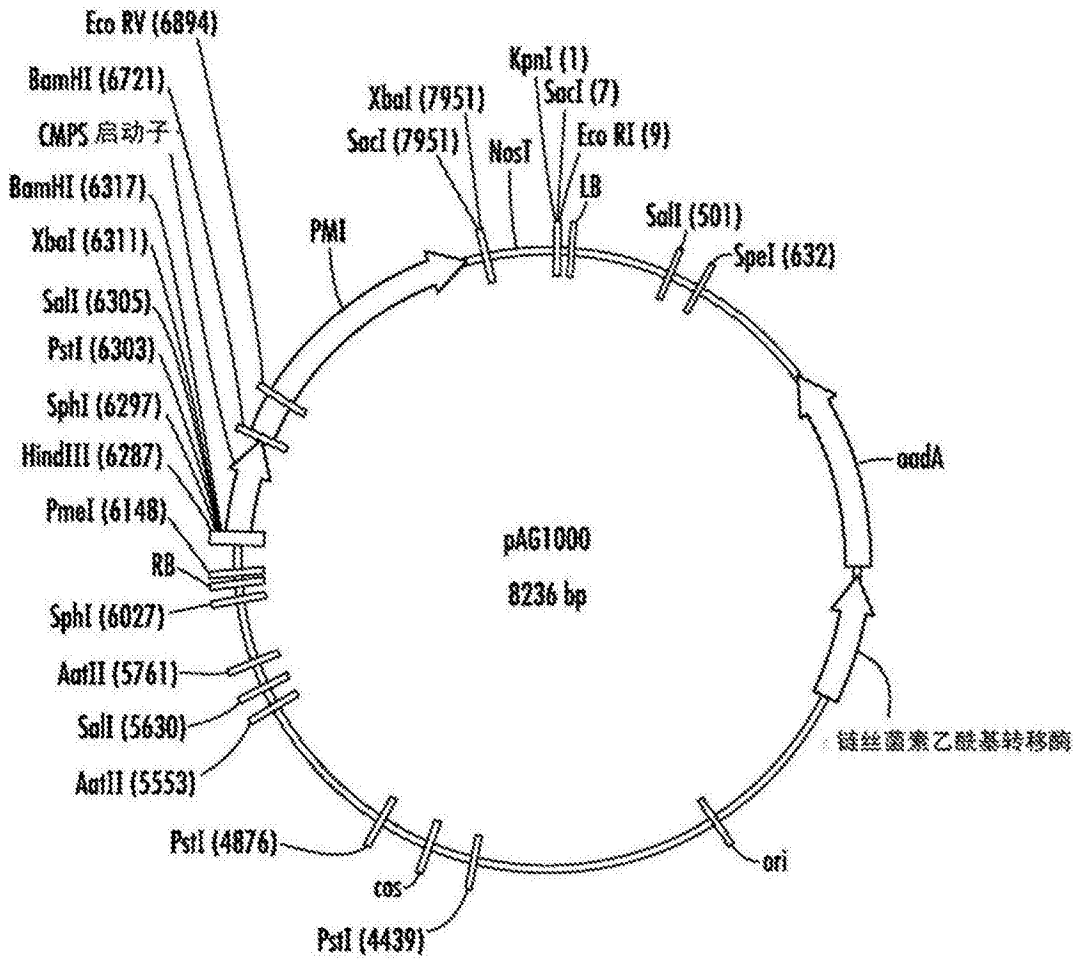


图2A

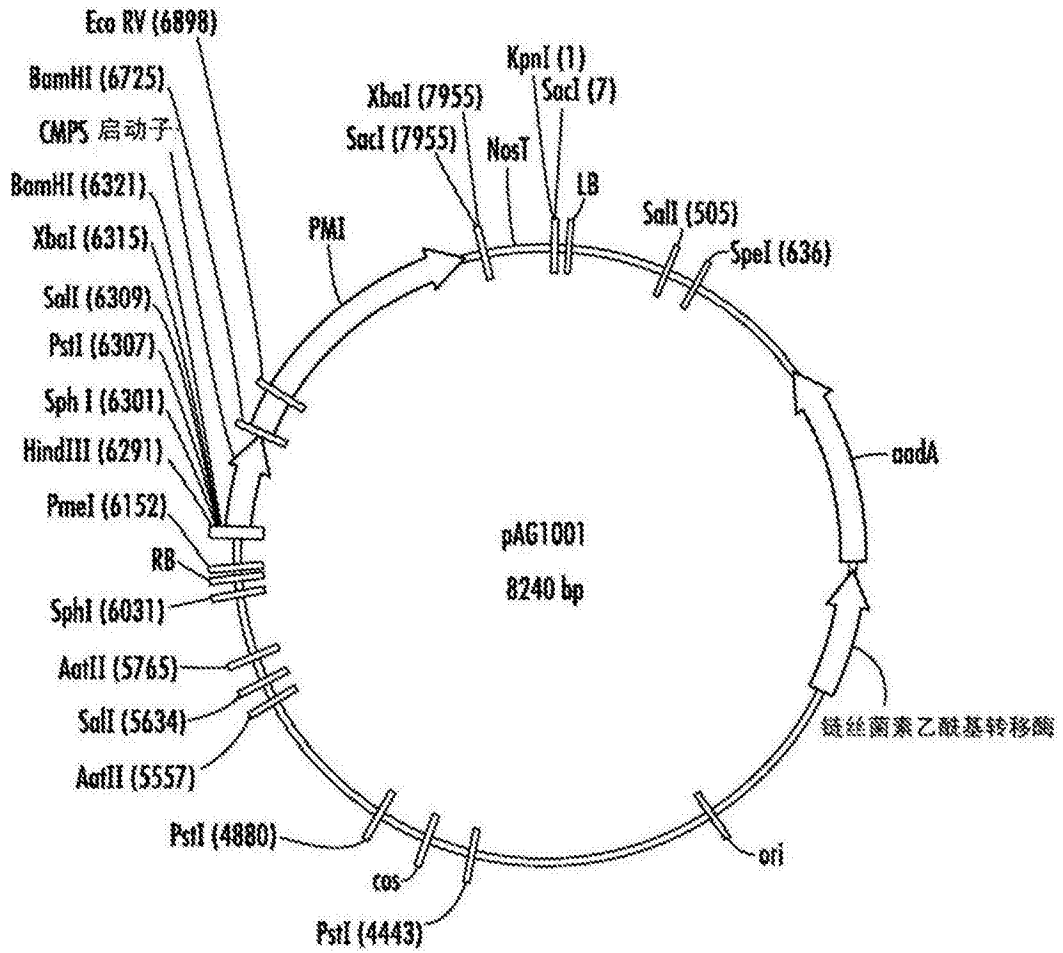


图2B

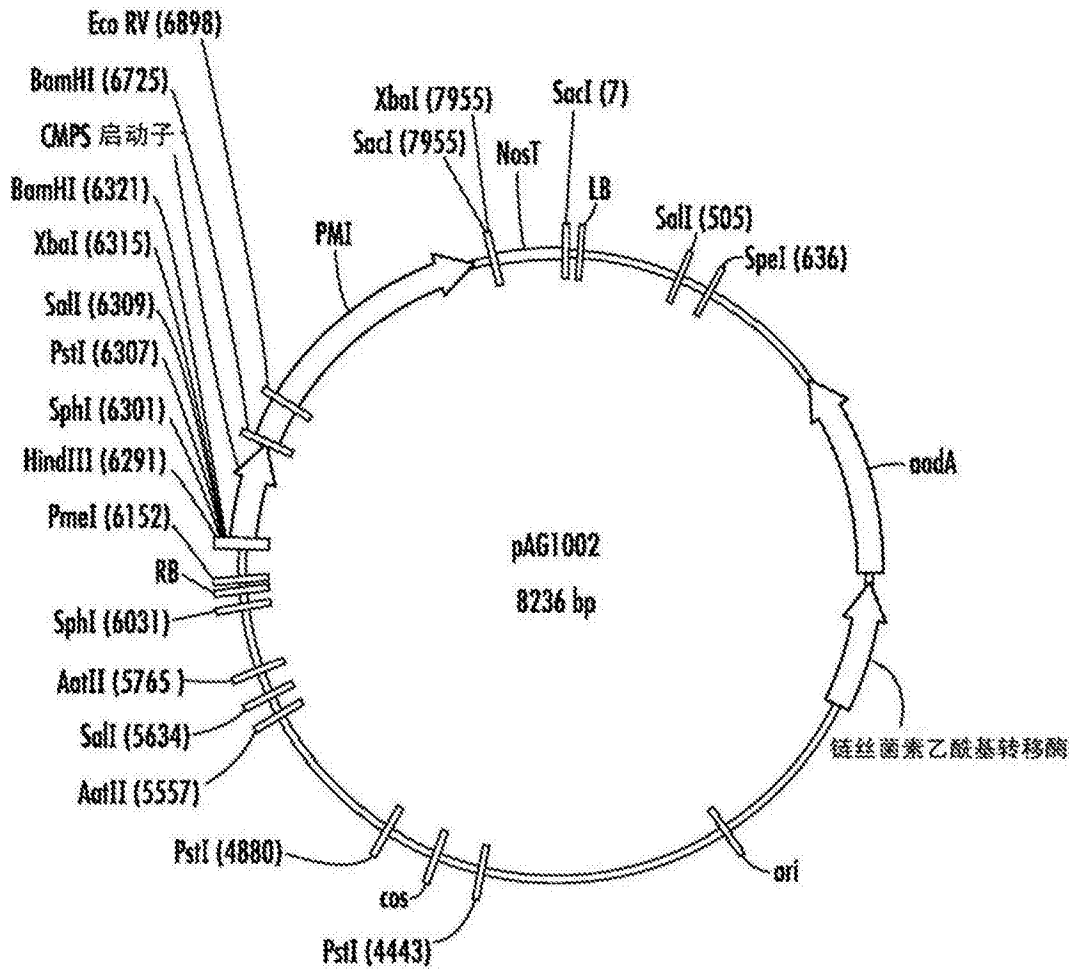


图2C

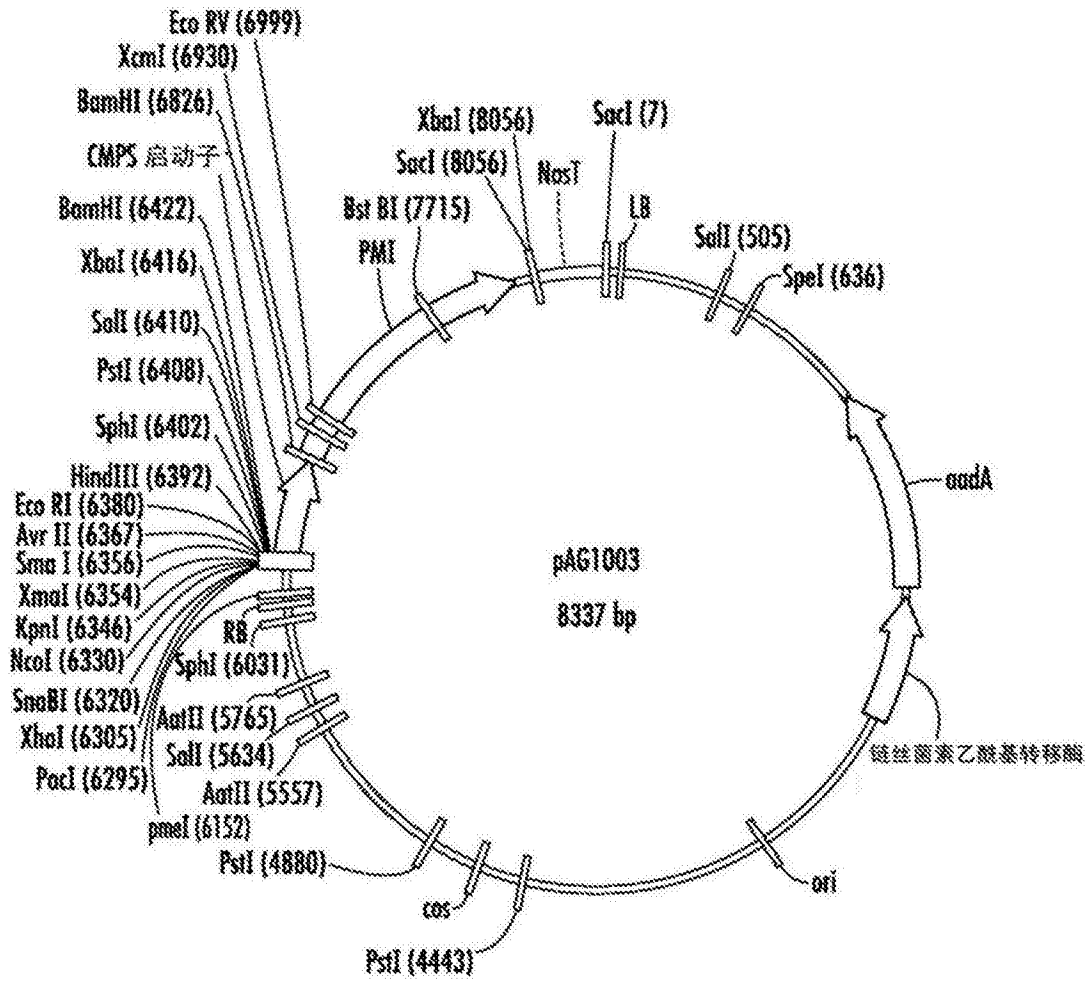


图3A

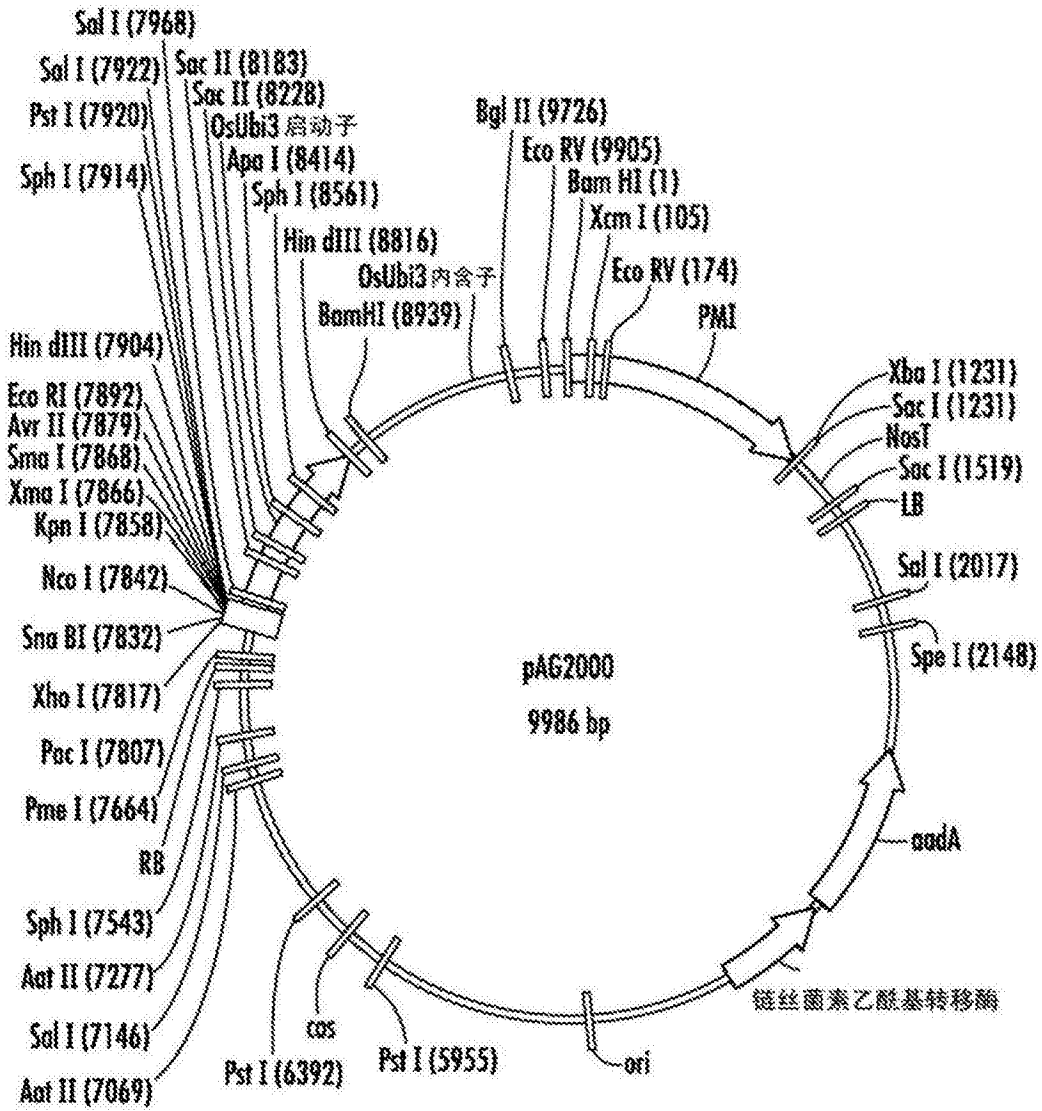


图3B

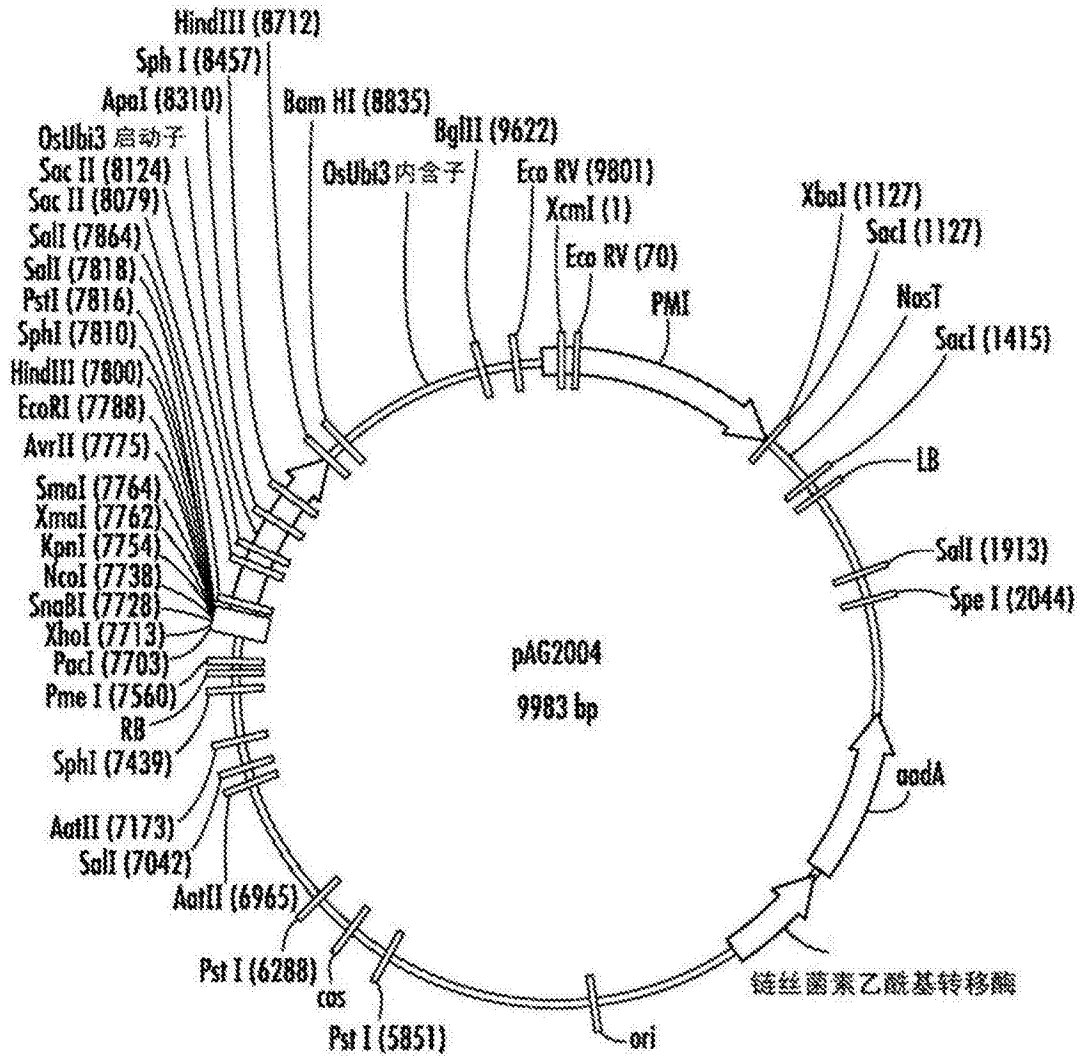


图3C

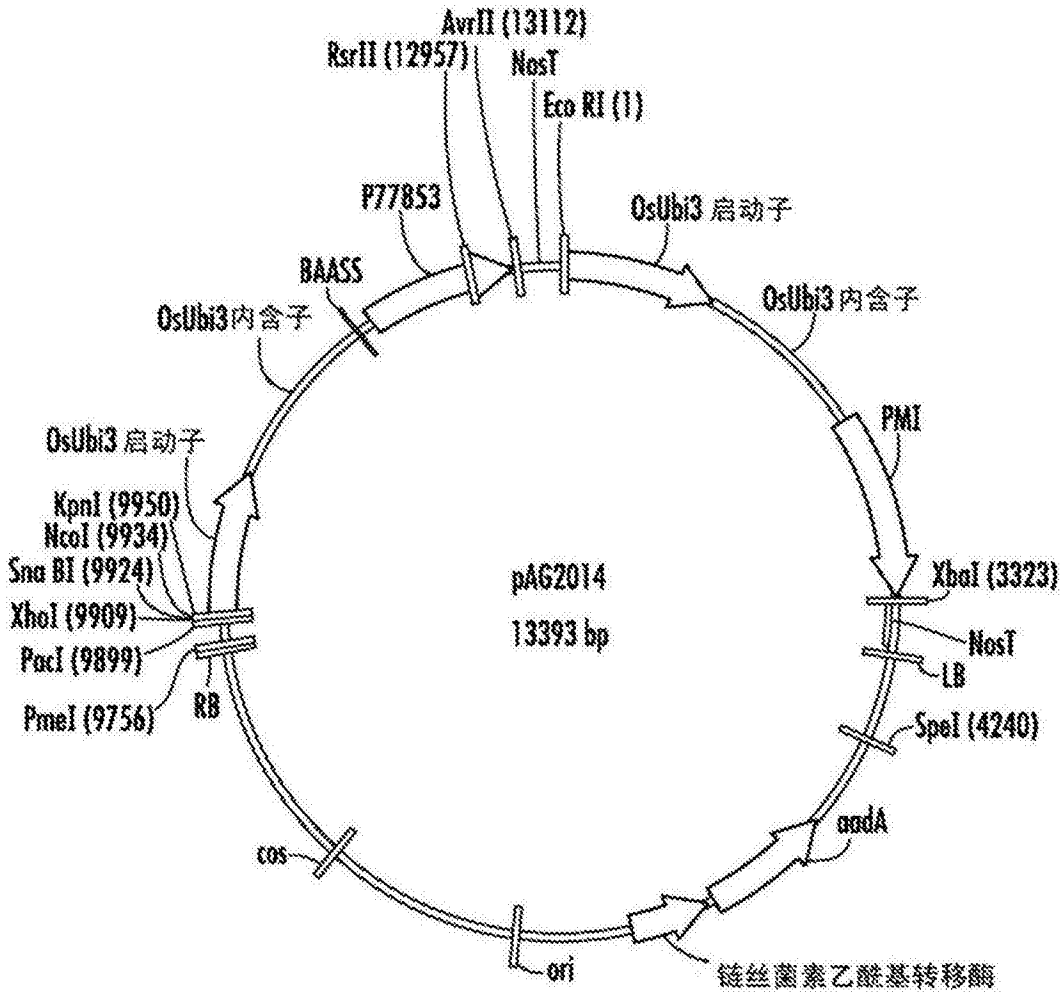


图4

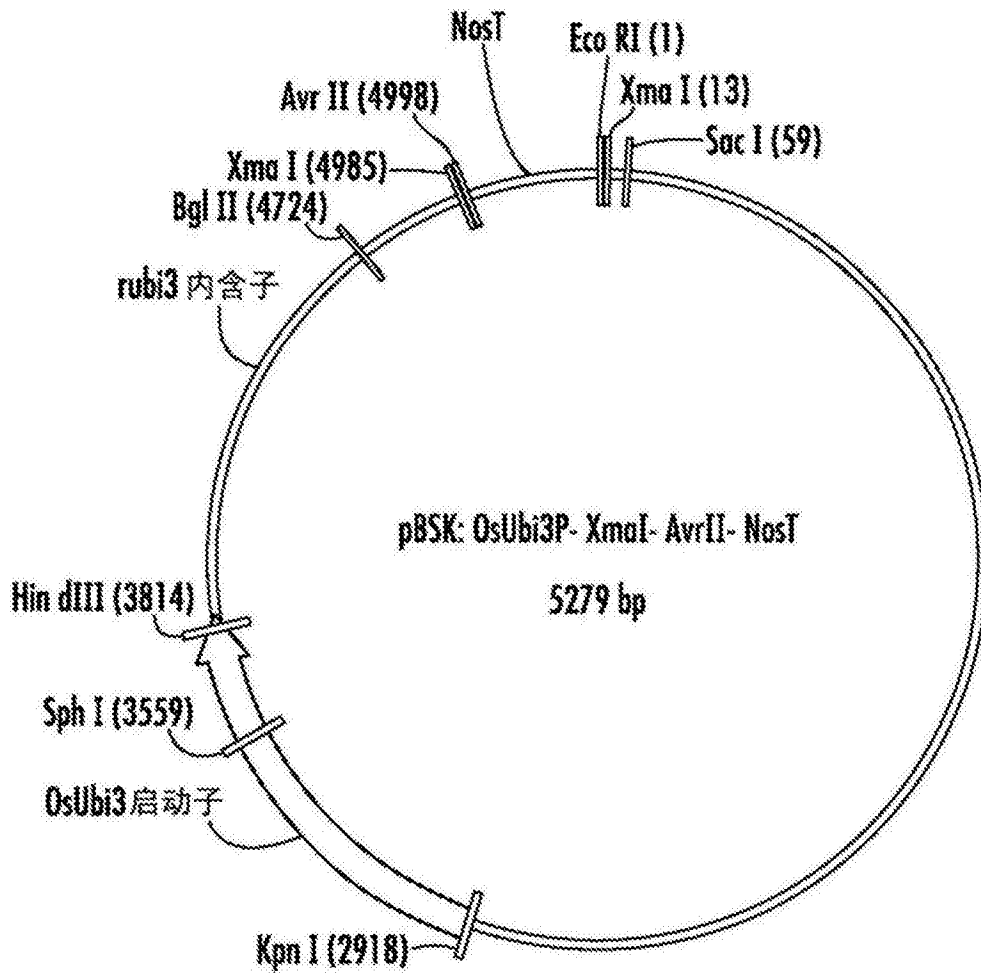


图5

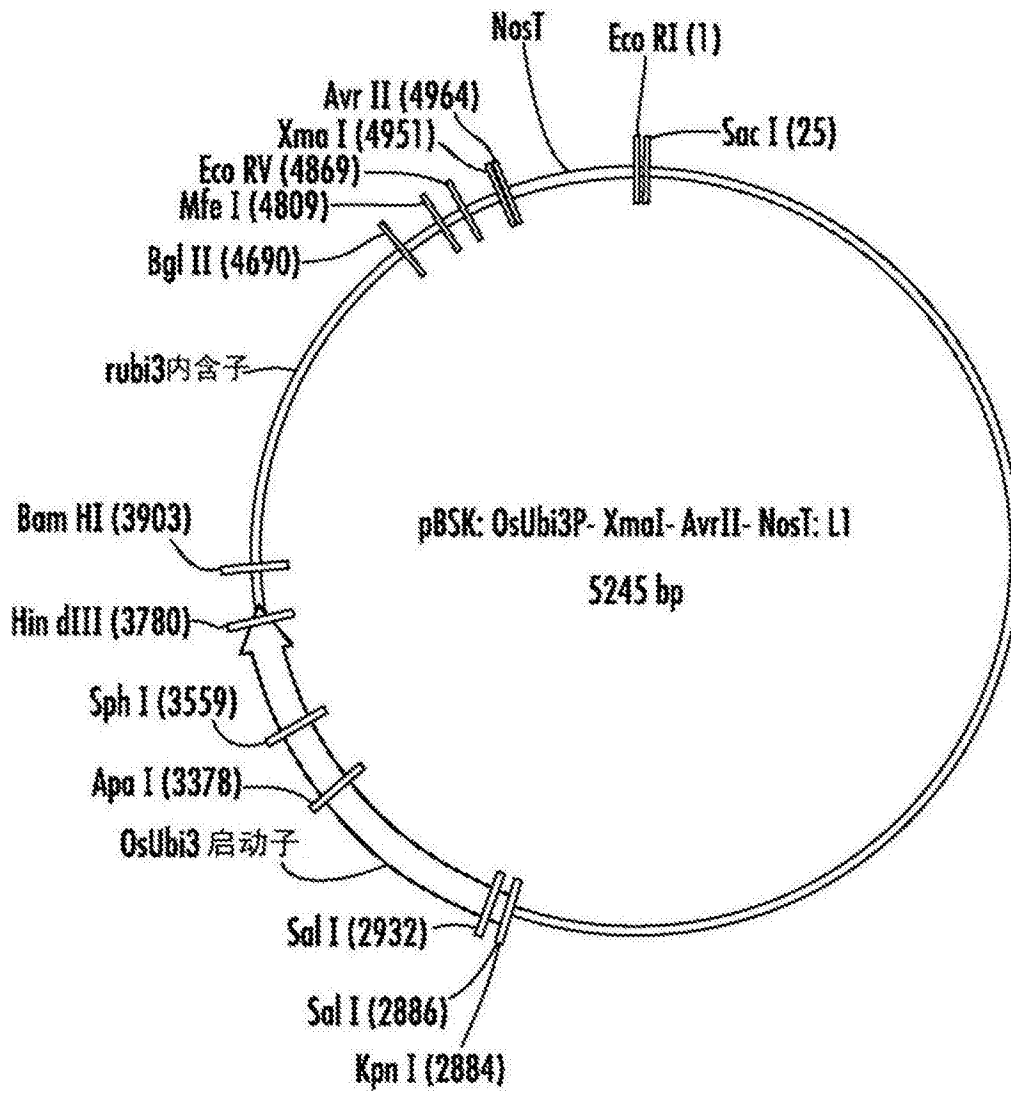


图6

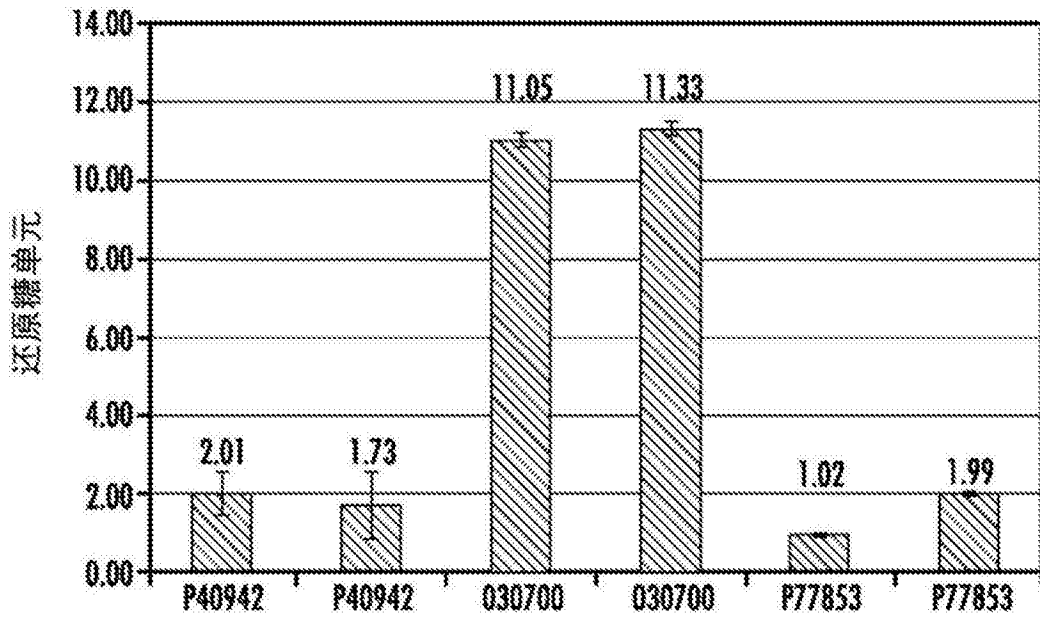


图7

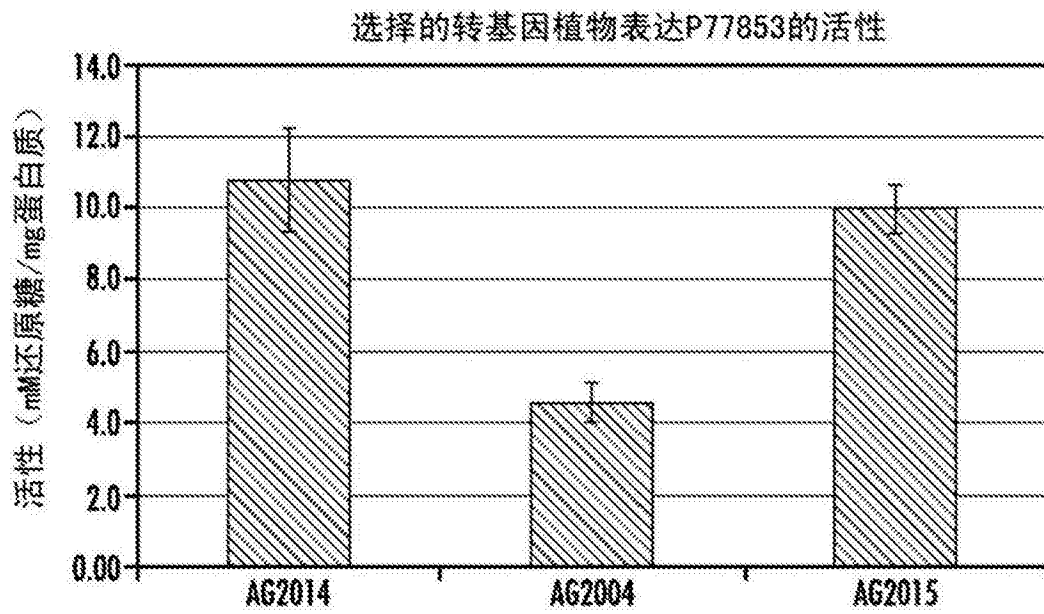


图8

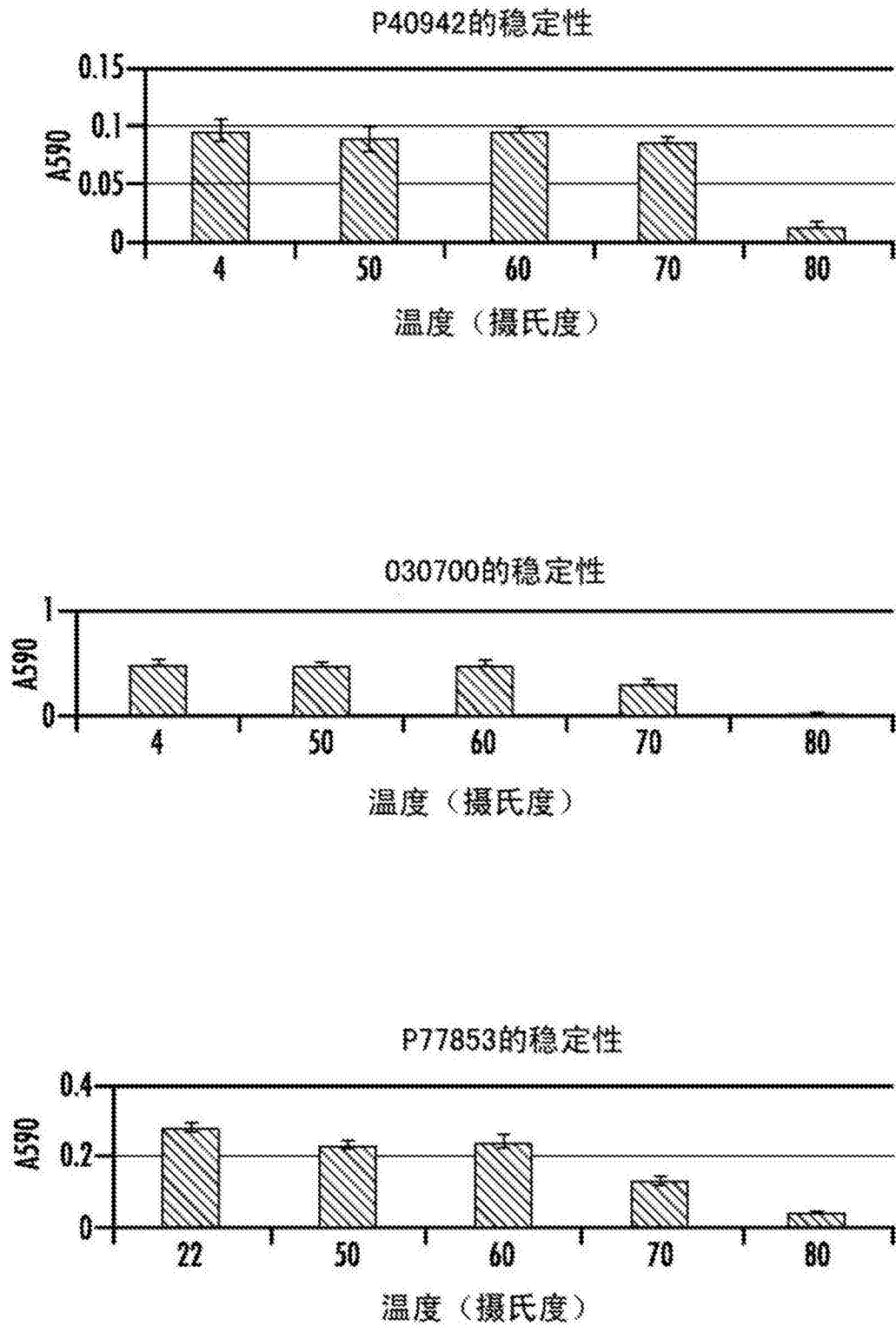


图9

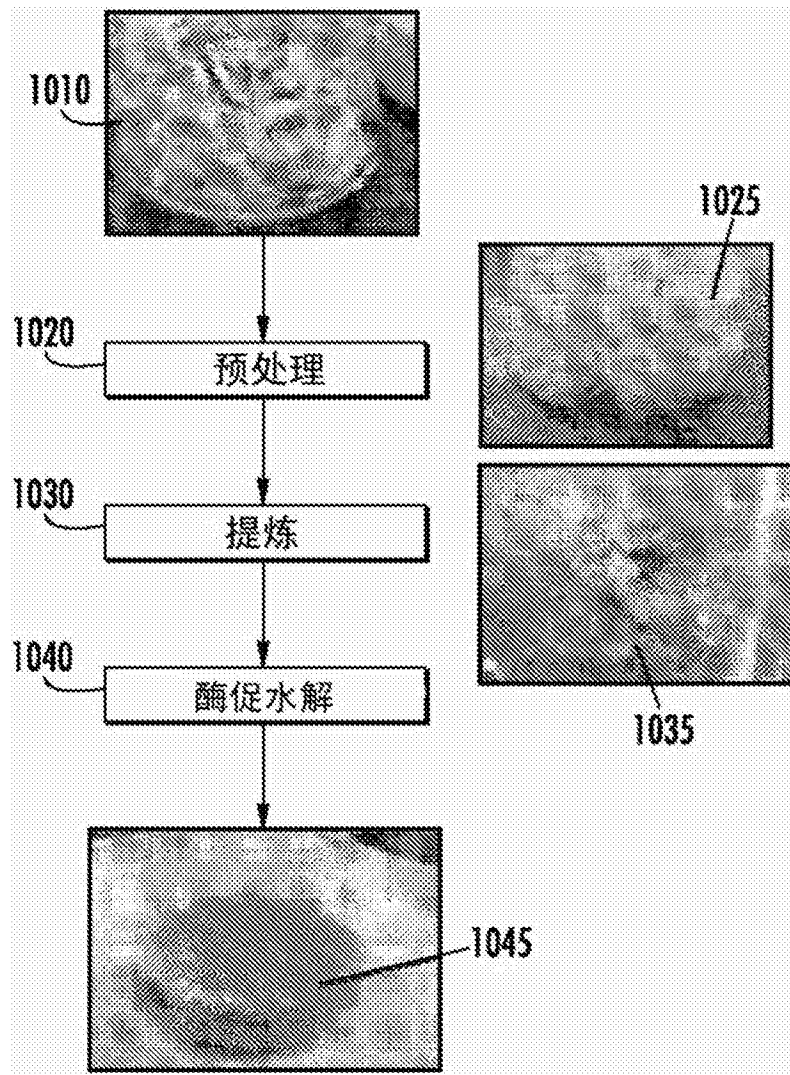


图10

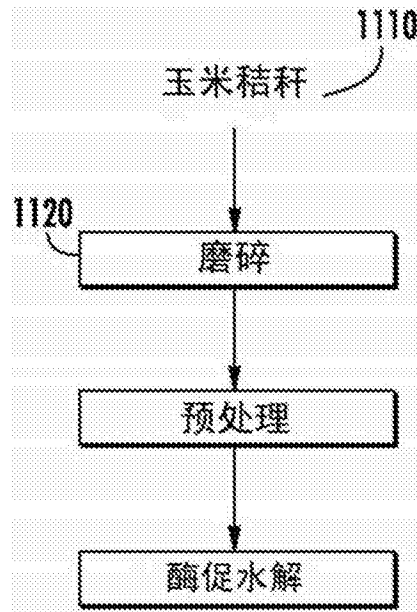


图11

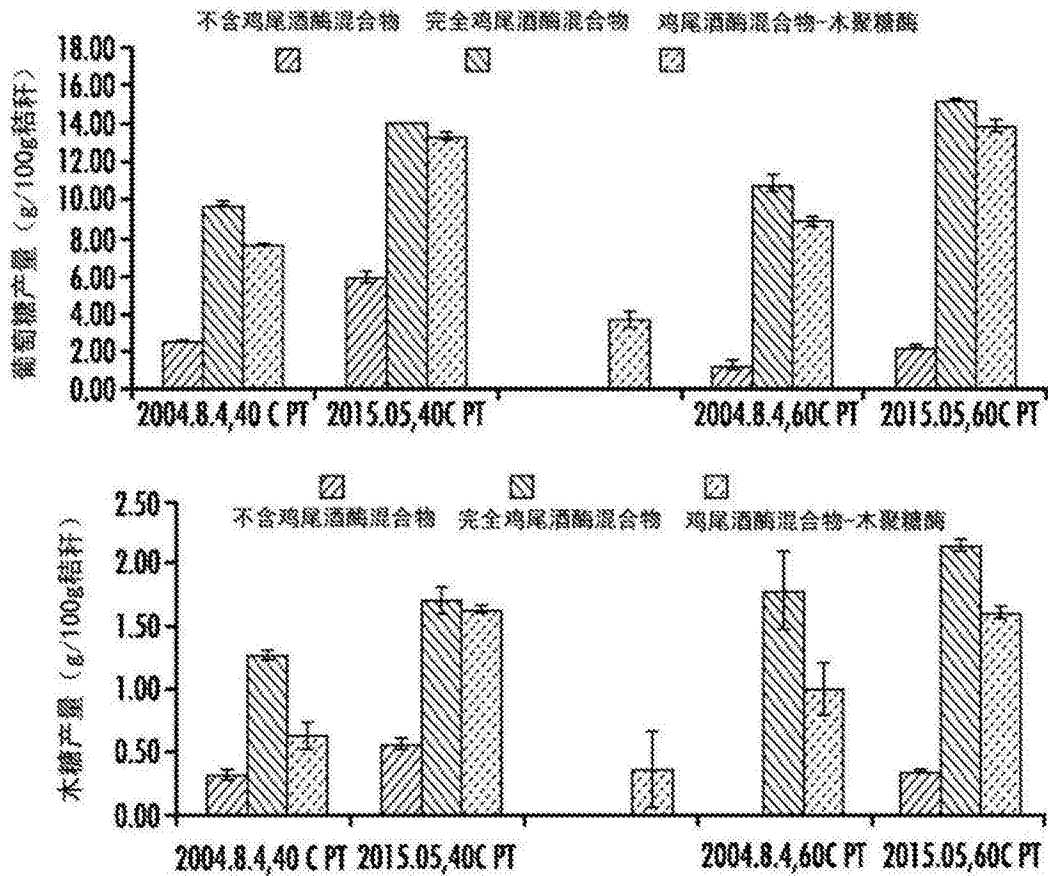


图12

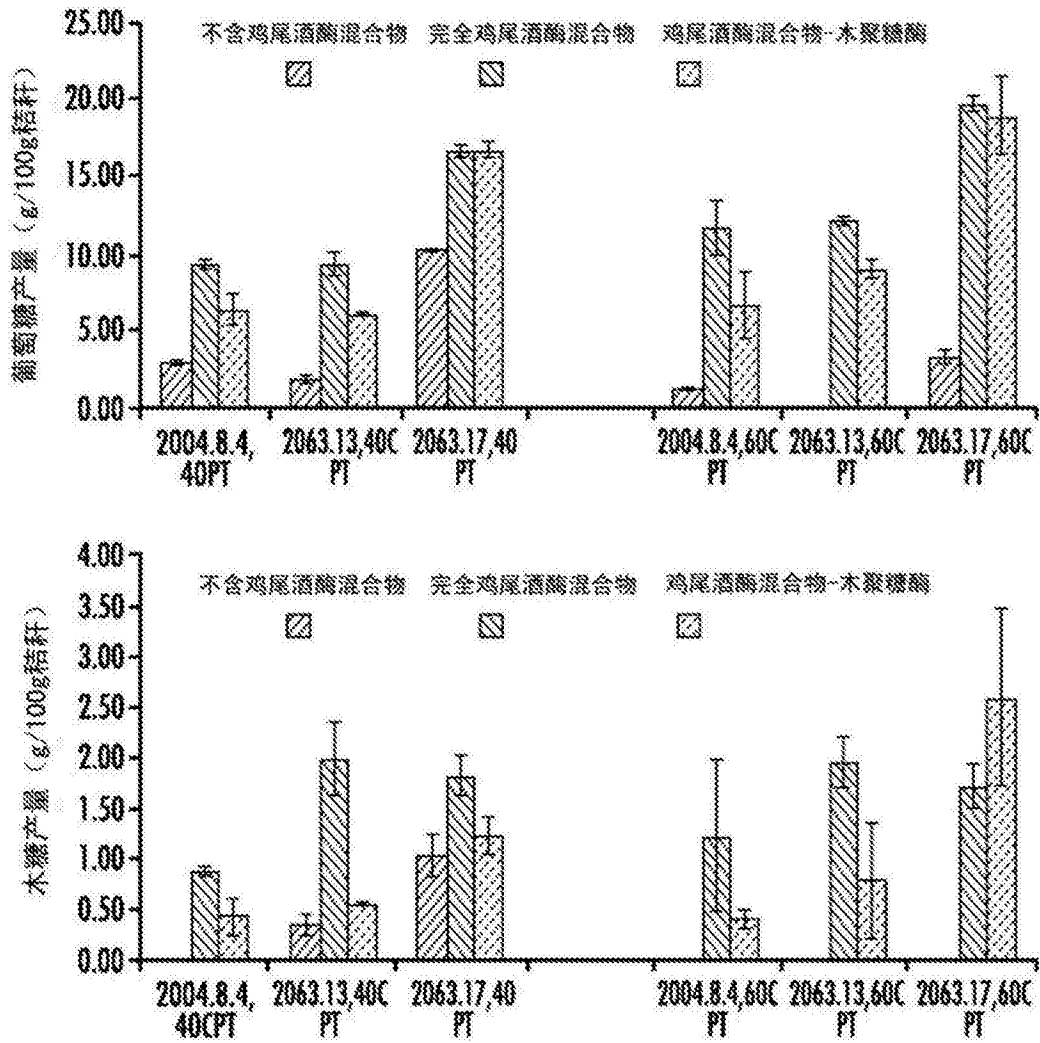


图13

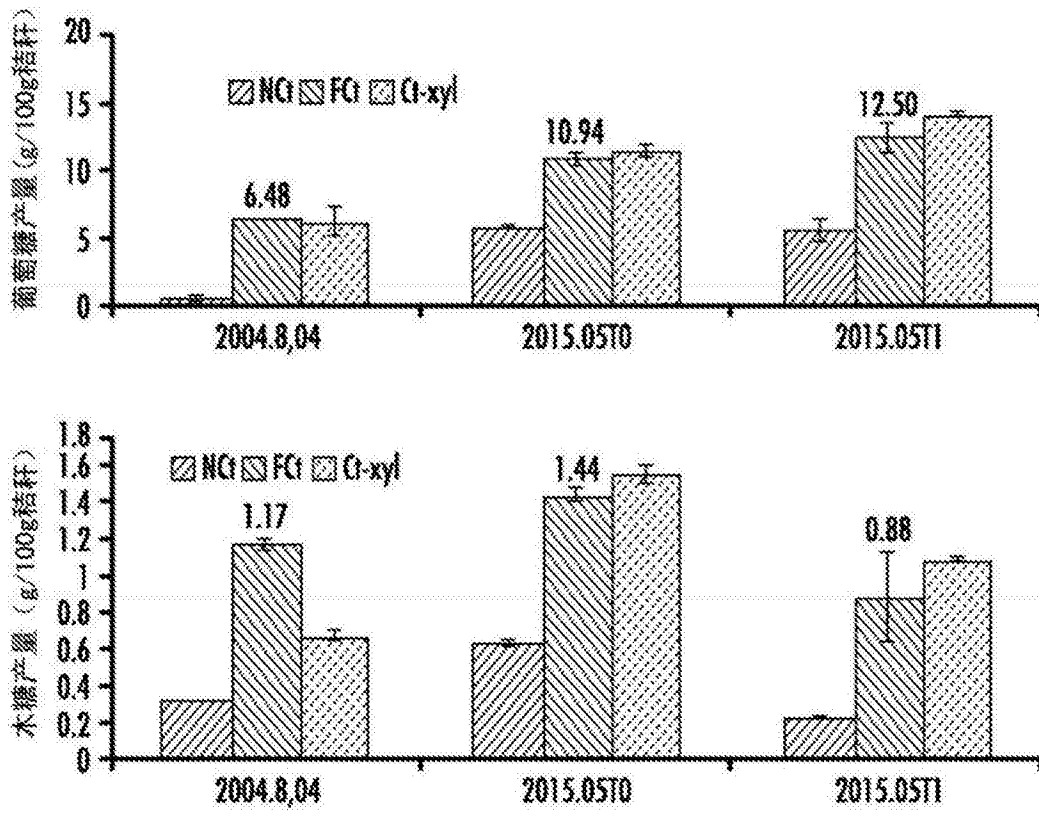


图14

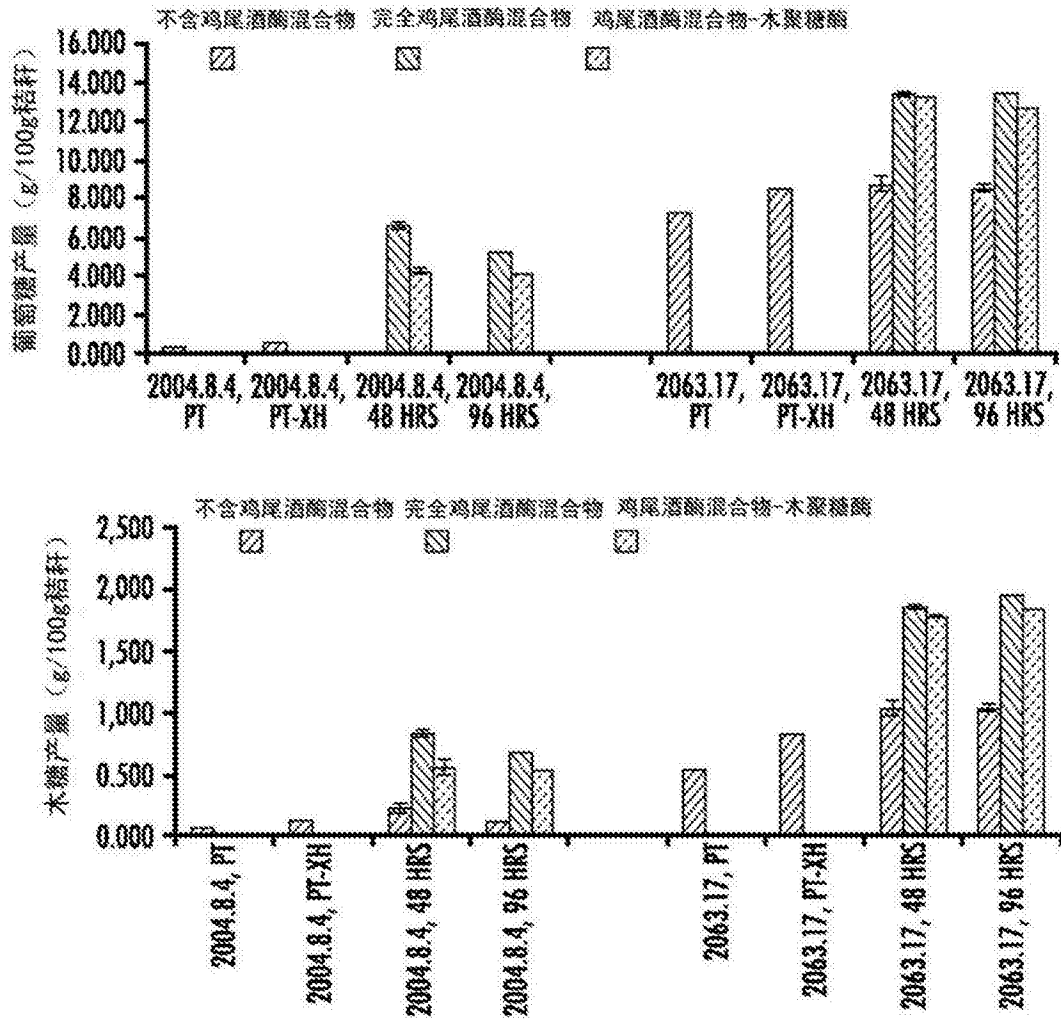


图15

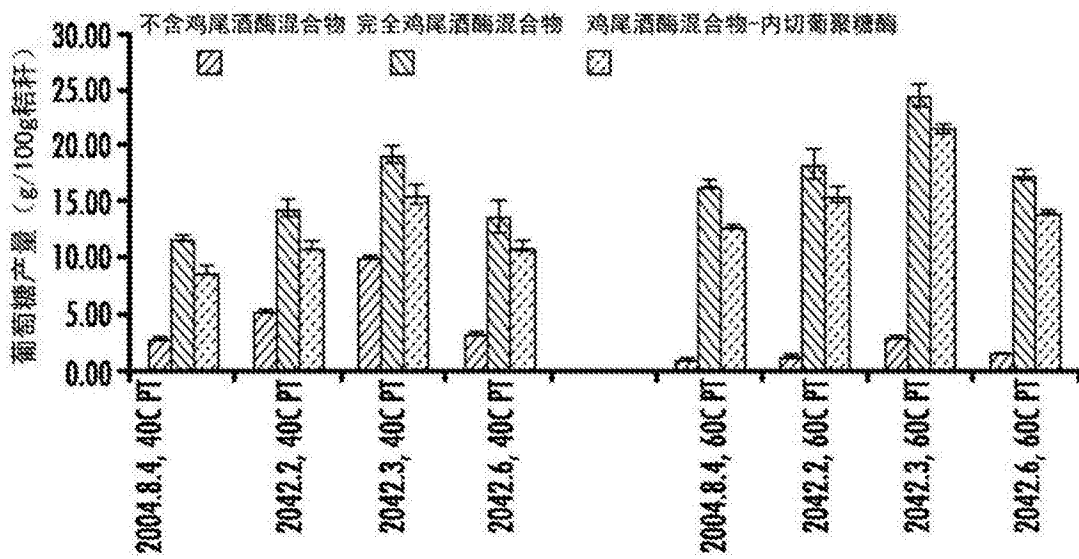


图16

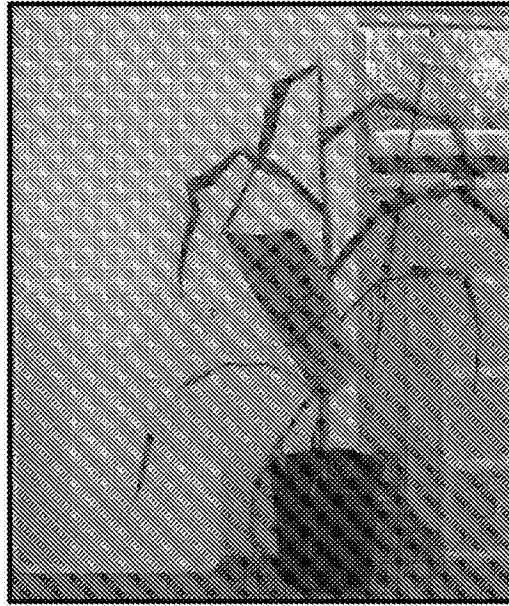


图17A

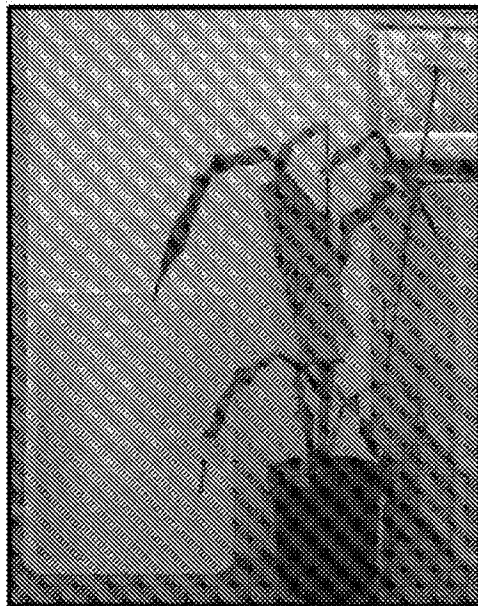


图17B



图18A

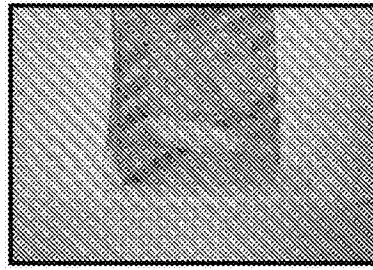


图18B

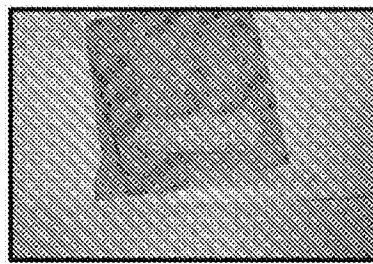


图18C

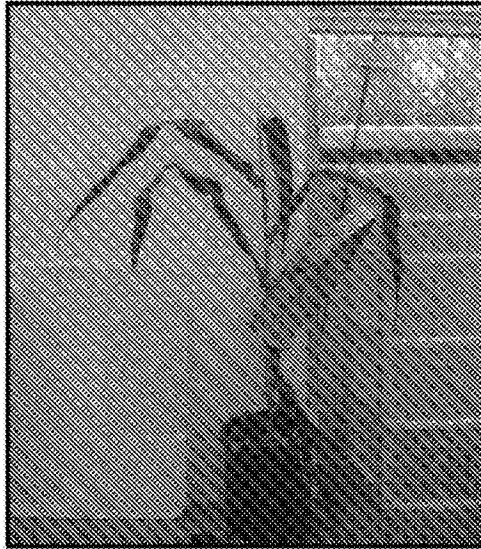


图19A

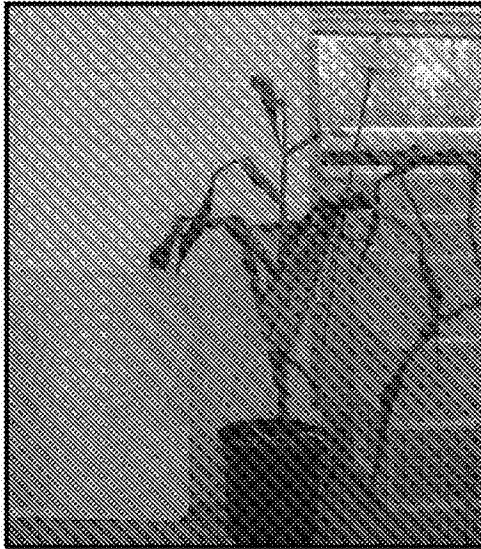


图19B

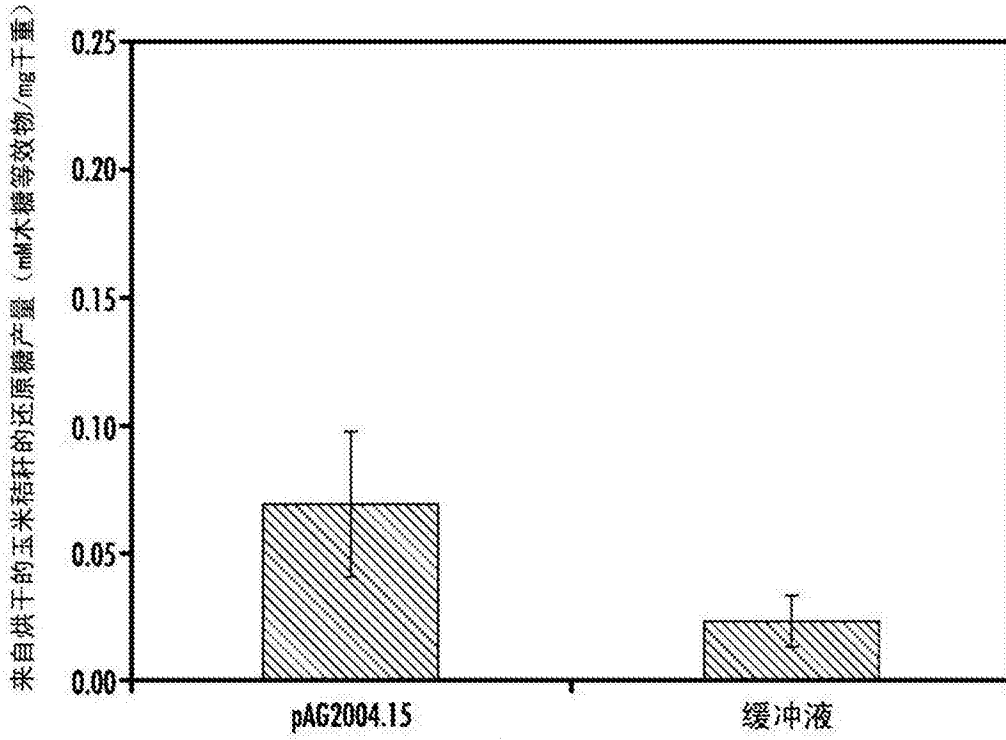


图20



图21A

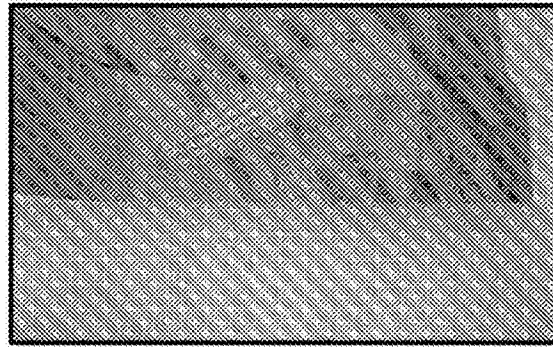


图21B

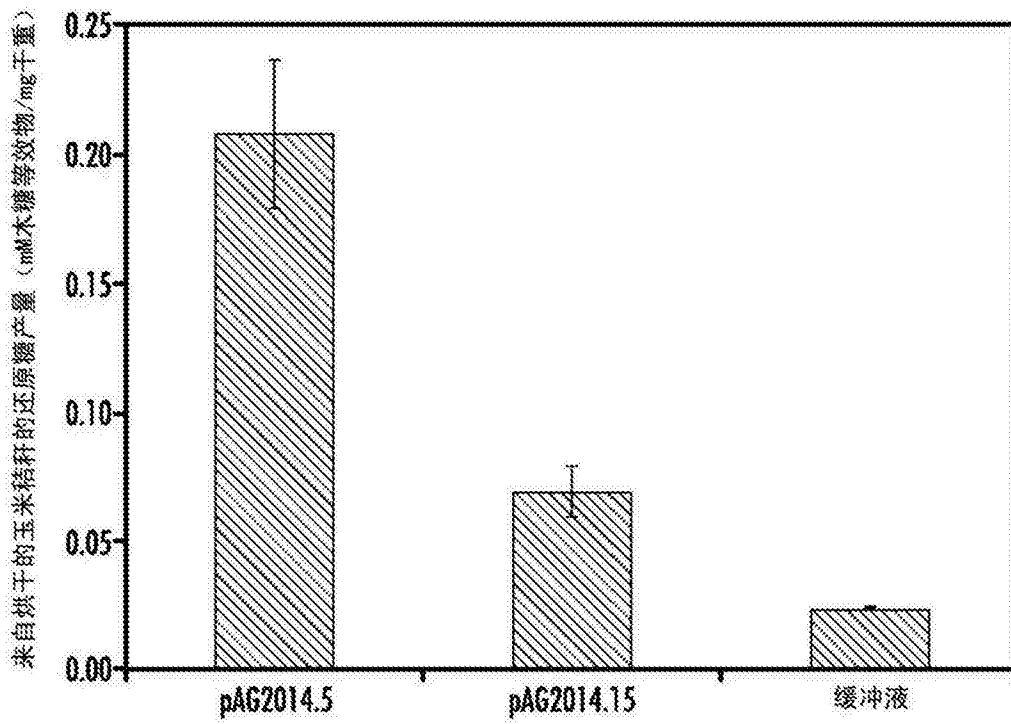


图22

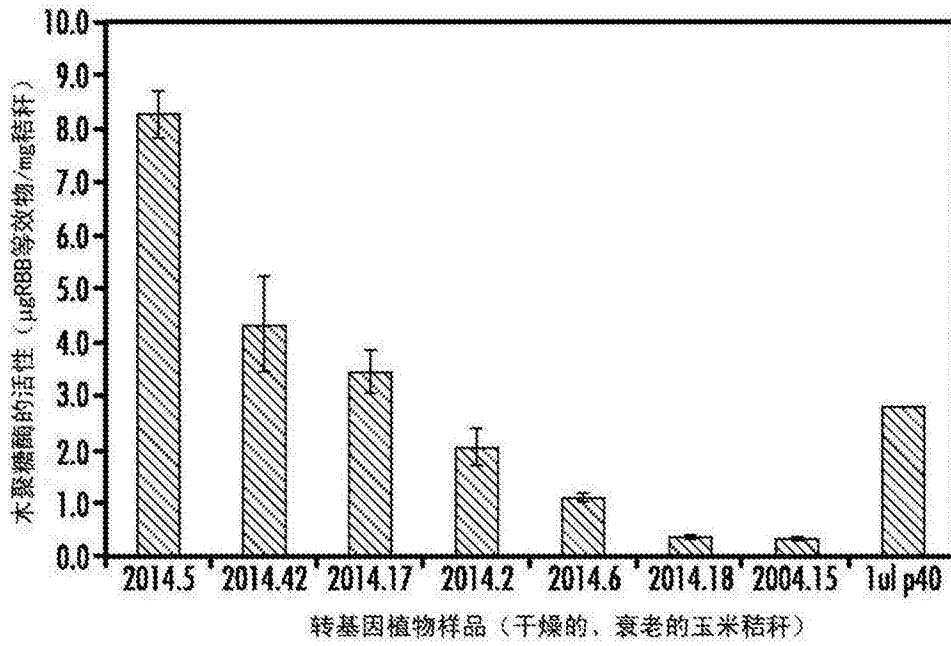


图23

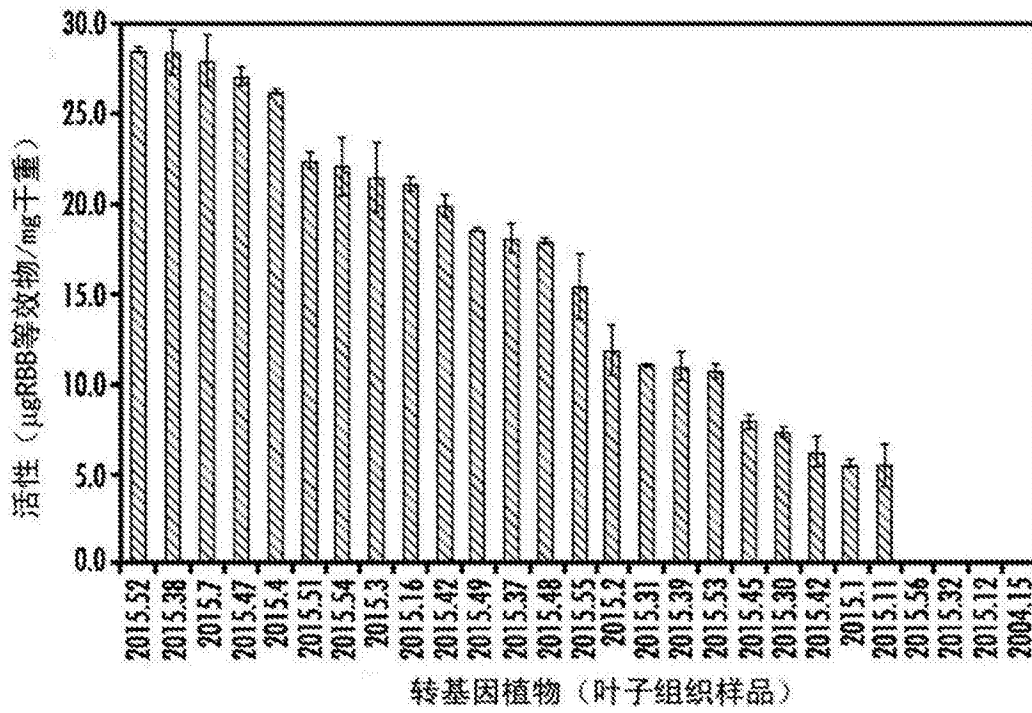


图24



图25A

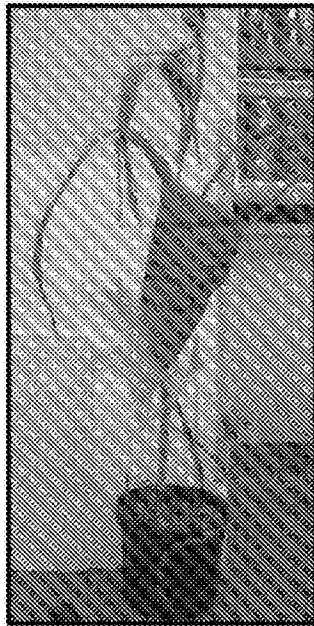
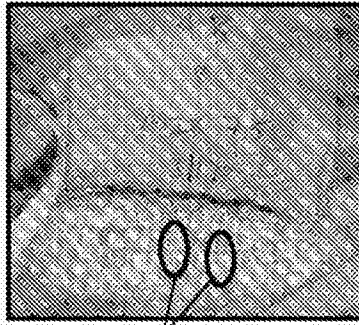


图25B



2510

图25C



图26A

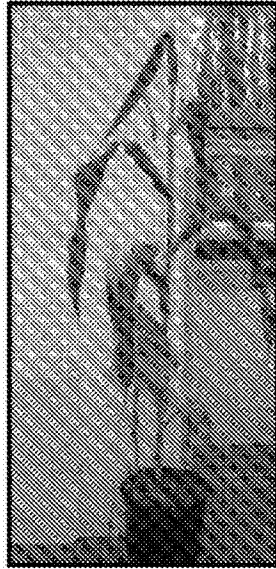


图26B

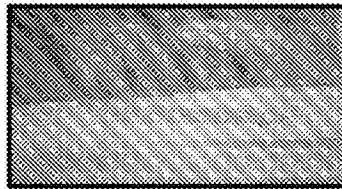


图26C

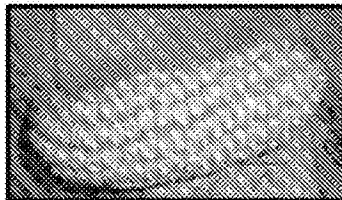


图26D

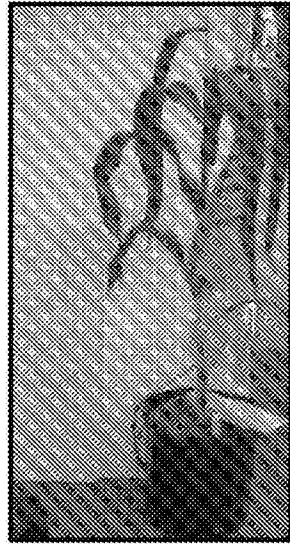


图27A



图27B

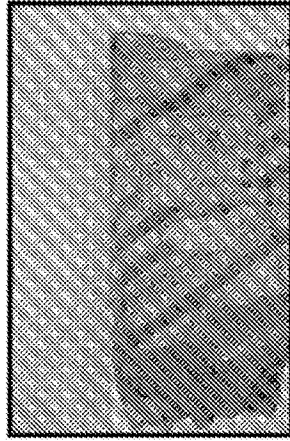


图27C



图28A



图28B

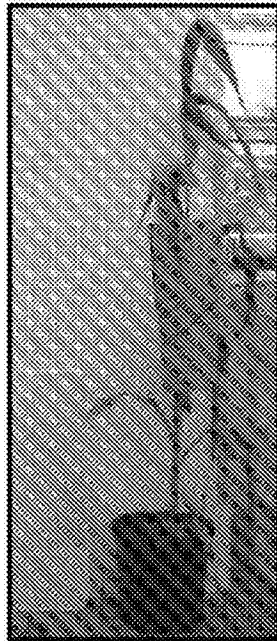


图28C



图29A

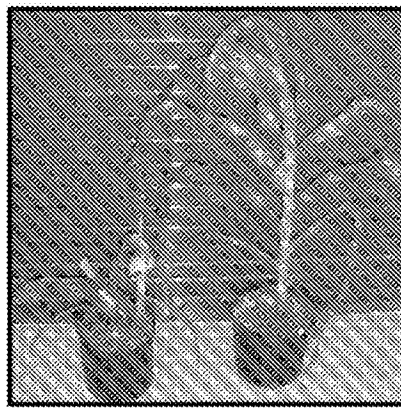


图29B

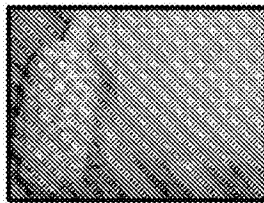


图29C

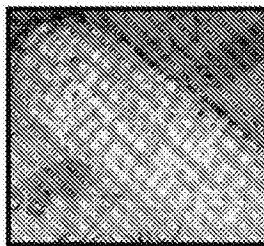


图29D



图30A

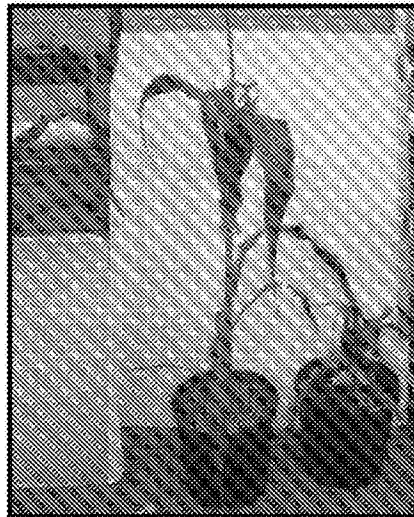


图30B

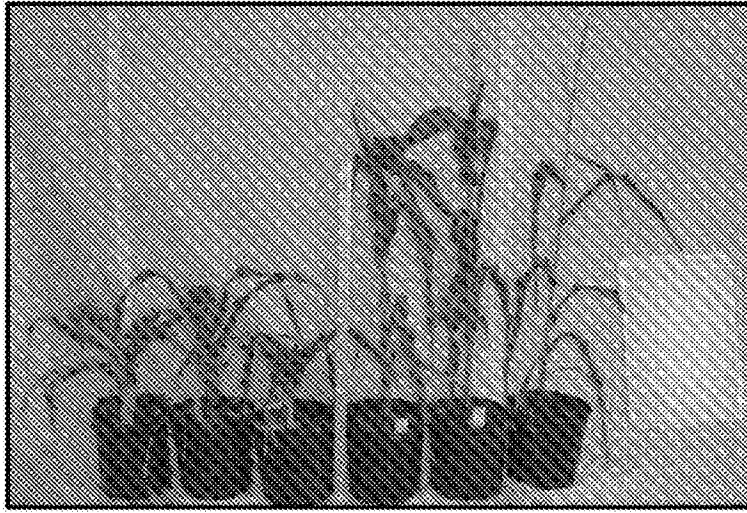


图31



图32A

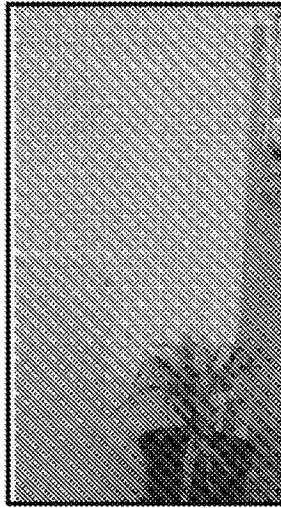


图32B

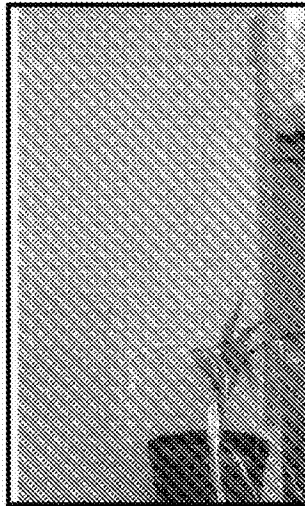


图32C

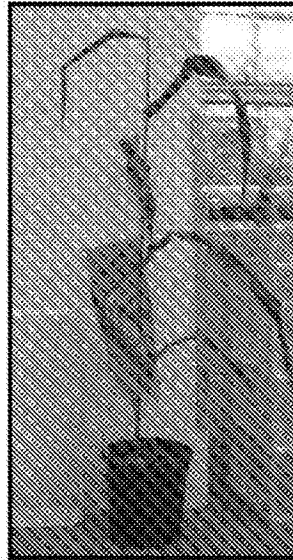


图33A



图33B

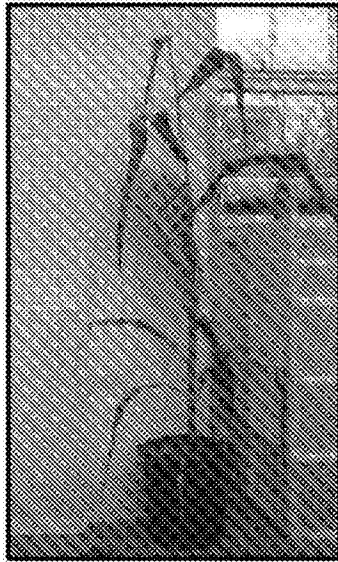


图33C

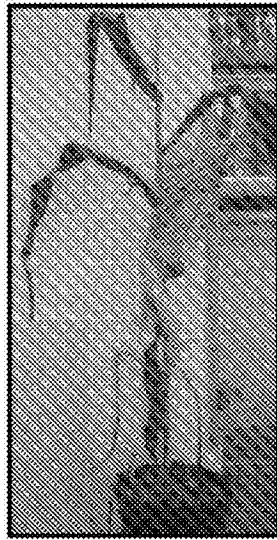


图34A

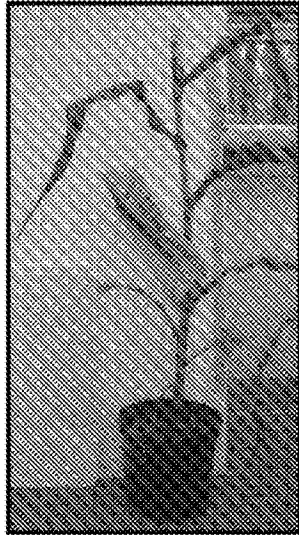


图34B

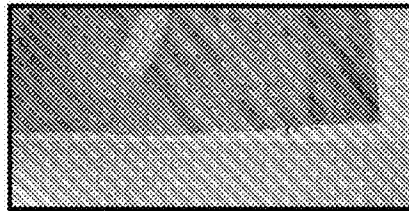


图34C



图34D

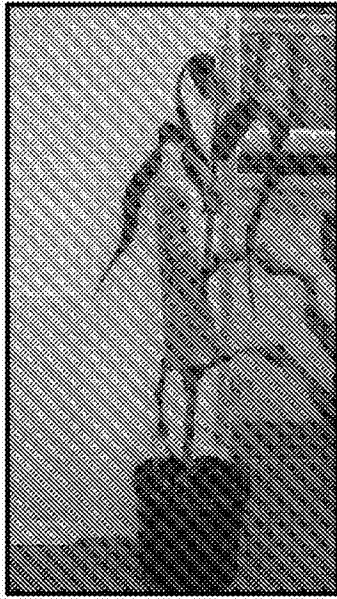


图35A



图35B

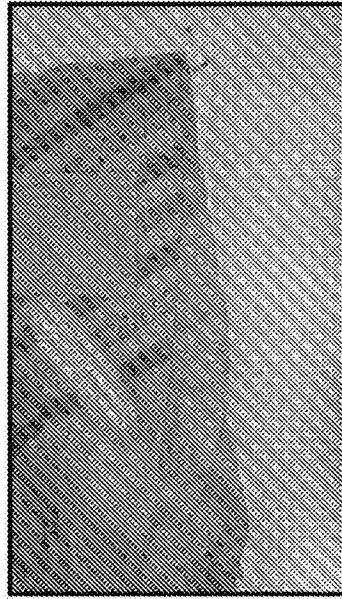


图35C



图36A



图36B



图36C



图37A

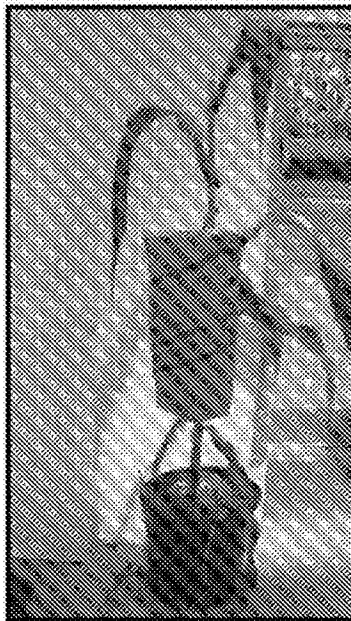


图37B



图37C

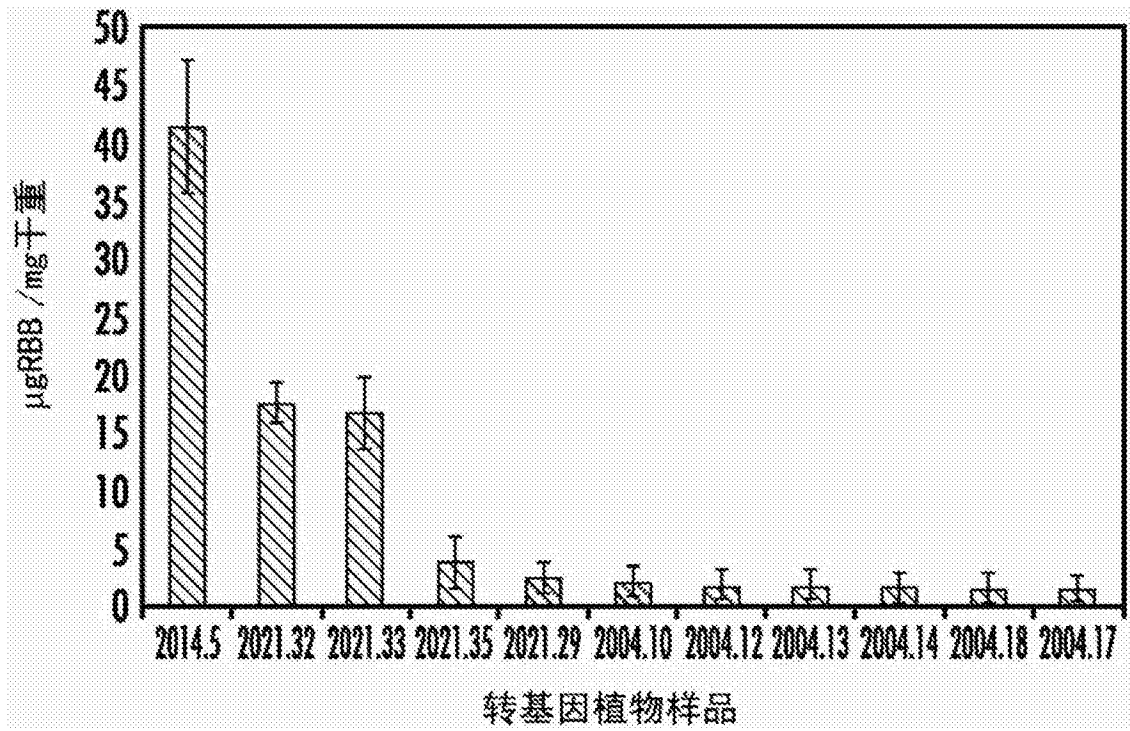


图38