



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107529787 A

(43)申请公布日 2018.01.02

(21)申请号 201680021035.0

(22)申请日 2016.04.08

(30)优先权数据

62/145,587 2015.04.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/026656 2016.04.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/164732 EN 2016.10.13

(71)申请人 先正达参股股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 D·威瑟斯庞

T·K·伊拉加瓦拉普

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 傅宇昌

(51)Int.Cl.

A23K 20/189(2016.01)

A23K 10/30(2016.01)

G12N 9/26(2006.01)

权利要求书2页 说明书30页  
序列表7页

(54)发明名称

动物饲料组合物及使用方法

(57)摘要

本发明提供了包含微生物 $\alpha$ -淀粉酶的动物饲料组合物。本发明还提供了增加动物的生长(增重)、平均日增重或饲料利用效率,或减少动物达到所希望重量而需要的天数的方法,所述方法包括向该动物饲喂本发明的动物饲料组合物。

1. 一种包含微生物 $\alpha$ -淀粉酶的动物饲料组合物。
2. 如权利要求1所述的动物饲料组合物,其中该微生物 $\alpha$ -淀粉酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%一致性的多肽或由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少80%一致性的核苷酸序列编码的多肽。
3. 一种包含植物材料的动物饲料组合物,其中该植物材料包含重组 $\alpha$ -淀粉酶。
4. 如权利要求3所述的动物饲料组合物,其中该重组 $\alpha$ -淀粉酶由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少80%一致性的核苷酸序列编码或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约80%同源性的多肽。
5. 一种包含来自转基因植物或植物部分的植物材料的动物饲料组合物,该转基因植物或植物部分包含由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少80%一致性的核苷酸序列编码的重组 $\alpha$ -淀粉酶,或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同源性的多肽。
6. 如权利要求5所述的动物饲料组合物,其中该转基因植物或植物部分包含按重量计约1%至约100%的植物材料。
7. 如权利要求5或权利要求6所述的动物饲料组合物,其中该植物材料构成按重量计从约5%至约100%的动物饲料组合物。
8. 如权利要求3至7中任一项所述的动物饲料组合物,其中该植物材料来自玉米、高粱、小麦、大麦、黑麦、燕麦、水稻和/或粟。
9. 如权利要求8所述的动物饲料组合物,其中该植物材料是玉米。
10. 如权利要求9所述的动物饲料组合物,其中该玉米包含玉米事件3273。
11. 如权利要求3至10中任一项所述的动物饲料组合物,其中来自转基因植物的该植物材料是种子。
12. 一种包含来自转基因玉米植物或植物部分的植物材料的玉米日粮,该转基因玉米植物或植物部分用由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少80%一致性的核苷酸序列编码的重组 $\alpha$ -淀粉酶稳定地转化或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%一致性的多肽。
13. 如权利要求12所述的玉米日粮,其中来自转基因玉米植物或植物部分的该植物材料构成按重量计从约1%至约100%的玉米日粮。
14. 一种包含如权利要求12至13中任一项所述的玉米日粮的动物饲料组合物。
15. 如权利要求14所述的动物饲料组合物,其中该玉米日粮构成按重量计约5%至约100%的动物饲料组合物。
16. 如权利要求1-11或14-15中任一项所述的动物饲料组合物,其中该动物是农场动物、动物园动物和/或伴侣动物。
17. 一种增加动物平均日增重的方法,该方法包括向所述动物饲喂如权利要求1至15中任一项所述的动物饲料组合物,其中该动物的平均日增重增加约0.05磅/天至约10磅/天。
18. 一种增加动物的生长速率(增重)的方法,该方法包括向所述动物饲喂如权利要求1至15中任一项所述的动物饲料组合物,其中该动物的生长速率增加约0.05磅/天至约10磅/天。
19. 一种减少动物达到所希望重量而需要的天数的方法,该方法包括向所述动物饲喂

如权利要求1至15中任一项所述的动物饲料组合物,从而减少达到所希望重量而需要的天数。

20. 如权利要求19所述的方法,其中该动物达到所希望重量而需要的天数减少约1天至约20天。

21. 一种提高动物的饲料利用效率的方法,该方法包括以有效于提高所述动物的饲料利用效率的量向所述动物饲喂如权利要求1至15中任一项所述的动物饲料组合物。

22. 如权利要求21所述的方法,其中该动物的饲料利用效率提高约1%至约25%。

23. 如权利要求17至22中任一项所述的方法,其中每天饲喂该动物约1磅至约30磅的动物饲料组合物。

24. 如权利要求17至23中任一项所述的方法,其中每天饲喂该动物约一次至约三次该动物饲料组合物。

25. 如权利要求17至24中任一项所述的方法,其中该动物是哺乳动物、鸟或鱼。

26. 如权利要求25所述的方法,其中该哺乳动物是牛科动物、绵羊、山羊或猪科动物。

27. 如权利要求25所述的方法,其中该鸟是鸡、火鸡、鹌鹑或鸭。

28. 一种用于增加动物的玉米饲用价值的方法,该方法包括饲喂该动物如权利要求8或15所述的动物饲料组合物,其中与未饲喂所述动物饲料组合物的对照动物相比,该动物的玉米饲用价值增加约1%至约25%。

29. 一种用于提高动物的饲料利用效率的方法,该方法包括饲喂该动物如权利要求8或15所述的动物饲料组合物,其中与未饲喂所述动物饲料组合物的对照动物相比,动物的饲料利用效率提高约0.005至约0.03。

30. 如权利要求5或12所述的动物饲料组合物,其中该重组 $\alpha$ -淀粉酶被靶向远离其底物。

31. 如权利要求30所述的动物饲料组合物,其中该重组 $\alpha$ -淀粉酶被靶向选自下组的细胞器,该组由以下各项组成:叶绿体、液泡、细胞质、质外体以及内质网。

## 动物饲料组合物及使用方法

[0001] 关于序列表的电子提交的声明

[0002] 提供ASCII文本格式的序列列表来代替纸质副本,该序列列表是根据37CFR§1.821提交的,名称为“80783\_ST25.txt”,大小为15,179字节,于2016年4月4日生成并经由EFS-WEB提交。这个序列列表特此通过引用以其披露内容结合到本说明书中。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及动物饲料组合物及其用于增加动物增重的方法。

### 背景技术

[0004] 动物饲料可以分为两类:(1)精饲料或复合饲料,以及(2)粗饲料。精饲料或复合饲料的能量值高,包括脂肪、谷物及其副产品(大麦、玉米、燕麦、黑麦、小麦),高蛋白油粕或油饼(大豆、卡诺拉、棉籽、花生等),以及能以颗粒或碎屑的形式生产的甜菜、甘蔗、动物和鱼的加工副产品。精饲料或复合饲料可以是全面的,因为它们可以提供所有日常需要的食物需求,或者它们可以提供日粮的一部分,补充可能作为食物日粮提供的任何其他物质。粗饲料包括牧草、干草、青贮饲料、根作物、禾秆和秸秆(玉米秆)。

[0005] 对于食物生产来说,饲料构成养殖动物的最大成本。因此,本发明针对用于改进动物饲料利用效率从而降低生产成本的组合物和方法。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个方面提供了包含微生物 $\alpha$ -淀粉酶的动物饲料组合物。在一些方面,微生物 $\alpha$ -淀粉酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约80%一致性的多肽或由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少约80%一致性的核苷酸序列编码的多肽。

[0007] 本发明的另一方面提供了包含植物材料的动物饲料组合物,其中该植物材料包含表达的异源 $\alpha$ -淀粉酶。在一些特定实施例中,表达的异源 $\alpha$ -淀粉酶由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少约80%一致性的核苷酸序列编码或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约80%一致性的多肽。

[0008] 本发明还提供了包含来自转基因植物或植物部分的植物材料的动物饲料组合物,该转基因植物或植物部分包含由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少约80%一致性的核苷酸序列编码的重组 $\alpha$ -淀粉酶或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约80%一致性的多肽。

[0009] 在其他方面,本发明提供了包含来自转基因玉米植物或植物部分的植物材料的玉米日粮,该转基因玉米植物或植物部分用由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少约80%一致性的核苷酸序列编码的重组 $\alpha$ -淀粉酶稳定地转化。本发明的另外的方面提供了包含本发明的玉米日粮的动物饲料组合物。

[0010] 本发明的另外的方面提供了增加动物平均日增重的方法,该方法包括向所述动物

饲喂本发明的动物饲料组合物,其中该动物的平均日增重增加约0.05磅/天至约10磅/天。

[0011] 本发明的另一方面提供了增加动物的生长速率(增重)的方法,该方法包括向所述动物饲喂本发明的动物饲料组合物,其中该动物的生长速率增加约0.05磅/天至约10磅/天。

[0012] 本发明的再另外的方面提供了减少动物达到所希望重量而需要的天数的方法,该方法包括向所述动物饲喂本发明的动物饲料组合物,从而减少达到所希望重量而需要的天数。

[0013] 在其他方面,提供了提高动物的饲料利用效率的方法,该方法包括以有效于提高所述动物的饲料利用效率的量向所述动物饲喂本发明的动物饲料组合物。

[0014] 现在,就在此所述的其他实施例而言,将更详细地描述本发明的上述以及其他方面。应当理解的是,本发明可以体现为不同的形式,并且不应当被解释为对在此所述的实施例的限制。更确切地说,提供这些实施例以使得本披露将是彻底的且完整的,并将向本领域的普通技术人员充分传达本发明的范围。

### 具体实施方式

[0015] 除非上下文另外表明,明确地预期的是在此所述的本发明的不同特征可以按任何组合使用。

[0016] 而且,本发明还考虑到在本发明的一些实施例中,在此所述的任何特征或特征的组合可以被排除或省略。举例说明,如果本说明书陈述组合物包含组分A、B和C,明确地预期A、B或C的任何一种或其组合可单一地或以任何组合被省略和放弃。

[0017] 除非另外定义,在此使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。在此的本发明的说明中使用的术语是仅出于描述具体实施例的目的,且并不旨在限制本发明。

[0018] 如在本发明的说明书和所附的权利要求中所使用的,单数形式“一个/一种(a/an)”和“该(the)”旨在也包括复数形式,除非上下文清楚地另外表明。

[0019] 如在此使用的,“和/或”是指并且涵盖一个或多个相关的列出项的任何及全部可能组合,连同当以可替代性(“或”)解释时组合的缺少。

[0020] 如在此使用的,术语“约”当是指可测量的值如剂量、量或时间段等时意在涵盖±20%、±10%、±5%、±1%、±0.5%、或甚至±0.1%的指定量(例如,所增加的重量或所提供的饲料的量)的变化。

[0021] 如在此使用的,短语如“在X和Y之间”与“在约X和Y之间”应解释为包括X和Y。如在此使用的,短语如“在X和Y之间”意指“在约X和约Y之间”。如在此使用的,短语如“从约X至Y”意指“从约X至约Y”。

[0022] 如在此使用的,术语“包含(comprise、comprises和comprising)”指示所说明的特征、整数、步骤、操作、要素、和/或组分的存在,但并不排除一个或多个其他特征、整数、步骤、操作、要素、组分、和/或其组的存在或添加。

[0023] 如在此使用的,过渡短语“基本上由……组成”意指权利要求的范围将被解释为包括该权利要求中所提到的指定材料或步骤以及不实质上影响要求保护的发明的一个或多个基本特征和新特征的那些材料或步骤。因此,当用于本发明的权利要求中时,术语“基本

上由……组成”并不意在被解释为等同于“包含 (comprising)”。

[0024] 本发明针对用于改进动物饲料利用效率从而降低生产成本的组合物和方法。诸位发明人已经取得了令人惊奇的发现,即饲喂了包含微生物 $\alpha$ -淀粉酶的动物饲料组合物的动物可以具有平均日增重或生长速率的增加,饲料利用效率的增加,或与未饲喂所述饲料组合物的动物相比达到所希望重量而需要的天数减少。

[0025] 因此,在本发明的一个方面,提供了包含微生物 $\alpha$ -淀粉酶的动物饲料组合物。在本发明的另外的方面,微生物 $\alpha$ -淀粉酶包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%一致性的多肽或由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少80%一致性的核苷酸序列编码的多肽。在一些实施例中, $\alpha$ -淀粉酶是液体。因此,在本发明的一些实施例中,本发明的动物饲料组合物可以是可添加到提供给动物的饲料中的补充剂,其包含液体微生物 $\alpha$ -淀粉酶。

[0026] 在另一方面,本发明提供了包含植物材料的动物饲料组合物,其中该植物材料包含表达的重组 $\alpha$ -淀粉酶。在一些特定实施例中,表达的重组 $\alpha$ -淀粉酶由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少约80%一致性的核苷酸序列编码或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约80%一致性的多肽。因此,在另外的实施例中,本发明提供了包含来自转基因植物或植物部分的植物材料的动物饲料组合物,该转基因植物或植物部分包含由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有至少约80%一致性的核苷酸序列编码的重组 $\alpha$ -淀粉酶或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约80%一致性的多肽。

[0027] 在特定实施例中,转基因植物或植物部分可以包含按重量计约1%至约100%的植物材料。因此,例如,转基因植物或植物部分可以包含按重量计约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的植物材料等,或其中的任何范围。因此,在一些实施例中,植物材料可以包含一种或多种不同类型的植物。因此,例如,植物材料可以来自表达重组或异源(例如,微生物) $\alpha$ -淀粉酶的植物。在其他实施例中,植物材料包含来自其中表达有重组或异源(例如,微生物) $\alpha$ -淀粉酶的植物的材料和来自不表达所述重组或异源 $\alpha$ -淀粉酶的植物(例如,商品植物)的材料,基本上由其组成,或由其组成。因此,在一些实施例中,当植物材料包含来自其中表达有重组或异源(例如,微生物) $\alpha$ -淀粉酶的植物的材料和来自不表达所述重组或异源 $\alpha$ -淀粉酶的植物(例如,商品植物)的材料时,来自其中表达有重组或异源(例如,微生物) $\alpha$ -淀粉酶的植物的材料可以构成按重量计从约1%至约99%的植物材料,并且来自不表达所述重组或异源 $\alpha$ -淀粉酶的植物的材料可以构成按重量计从约99%至约1%的植物材料。

[0028] 在另外的实施例中,植物材料可以构成按重量计从约5%至约100%的动物饲料组合物。因此,例如,植物材料可以构成按重量计约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、

13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的动物饲料组合物等,和/或其中的任何范围。

[0029] 本发明的动物饲料可以处于对本发明有用的任何形式。因此,在一些实施例中,动物饲料的形式可以是但不限于颗粒,谷粒(包括混合的一种或多种类型的谷粒(即混合谷粒)),谷粒和颗粒的混合物,青贮饲料,干轧、蒸汽压片的全籽粒,粗裂籽粒(例如,粗裂玉米),高水分玉米和/或其任何组合。在一些实施例中,动物饲料可以包含其他组分,包括但不限于粗裂籽粒、湿酒糟、干酒糟、玉米青贮饲料、补充剂/液体补充剂、玉米谷蛋白饲料和/或碎干草。

[0030] 如在此使用的,术语“植物材料”包括任何植物部分,包括但不限于胚乳、胚(胚芽)、果皮(麸皮)、肉茎(尖端根冠)、花粉、胚珠、种子(谷粒)、叶、花、枝、茎、果实、核、穗、穗轴、壳、茎秆、根、根尖、花药、植物细胞(包括在植物和/或植物的部分中完整的植物细胞)、植物原生质体、植物组织、植物细胞组织培养物、植物愈伤组织、植物团(plant clumps)等。另外,如在此使用的,“植物细胞”是指植物的结构和生理单位,包括细胞壁并且也可以指原生质体。本发明的植物细胞可以处于分离的单细胞形式,或者可以是培养的细胞,或者可以是较高级的组织单位(例如像,植物组织或植物器官)的一部分。“原生质体”是分离的植物细胞,没有细胞壁或仅具有部分细胞壁。因此,在本发明的一些实施例中,包含由本发明的核苷酸序列编码的重组 $\alpha$ -淀粉酶的转基因植物或植物部分包含如下细胞,该细胞包含由本发明的核苷酸序列编码的所述重组 $\alpha$ -淀粉酶,其中该细胞是任何植物或植物部分的细胞,包括但不限于根细胞、叶细胞、组织培养细胞、种子细胞、花细胞、果实细胞、花粉细胞等。在代表性实施例中,植物材料可以是种子或谷粒。

[0031] 植物材料可以来自任何植物。在一些实施例中,植物材料来自其中可以表达有重组或异源(例如,微生物) $\alpha$ -淀粉酶的植物。此外,如在此所讨论的,在其他实施例中,植物材料可以是来自其中表达有重组或异源(例如,微生物) $\alpha$ -淀粉酶的植物和来自不表达所述重组或异源 $\alpha$ -淀粉酶的植物(例如,商品植物)的植物材料的混合物。因此,在代表性实施例中,植物材料可以是正常“商品”植物材料(例如,商品玉米)和来自本发明的表达重组或异源 $\alpha$ -淀粉酶的转基因植物的植物材料的混合物。

[0032] 因此,在一些实施例中,植物材料可以来自玉米植物、高粱植物、小麦植物、大麦植物、黑麦植物、燕麦植物、水稻植物和/或粟植物。在代表性实施例中,植物材料可以来自玉米植物。在其他实施例中,植物材料可以是来自玉米植物的种子或谷粒。在特定实施例中,植物材料可以是包含玉米事件3273(参见美国专利号8,093,453)的玉米植物。

[0033] 在一些实施例中,本发明提供了包含来自转基因玉米植物或植物部分的植物材料的“全混合日粮”,该转基因玉米植物或植物部分用由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有约80%一致性的核苷酸序列编码的重组 $\alpha$ -淀粉酶稳定地转化或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约80%一致性的多肽。如在此

使用的，“全混合日粮”可以意指单个动物的24小时饲料允许量，其包括例如来自转基因玉米植物或植物部分的植物材料（例如，玉米籽粒、粗裂玉米等）、补充剂和添加剂（例如，维生素和矿物质）和/或“粗饲料”（例如，牧草、干草、青贮饲料、根作物、禾秆和秸秆（玉米秆））。

[0034] 在一些实施例中，来自转基因玉米植物或植物部分的植物材料构成按重量计从约1%至约100%的全混合日粮。因此，例如，转基因植物或植物部分可以包含按重量计约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的植物材料等，和/或其中的任何范围。

[0035] 在其他实施例中，提供了包含本发明的全混合日粮的动物饲料组合物。在一些实施例中，全混合日粮可以构成按重量计约5%至约100%的动物饲料组合物。因此，例如，全混合日粮可以构成按重量计约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的动物饲料组合物等，和/或其中的任何范围。在代表性实施例中，全混合日粮构成约50%的动物饲料组合物。

[0036] 在再另外的实施例中，本发明提供了包含来自转基因玉米植物或植物部分的植物材料的玉米日粮，该转基因玉米植物或植物部分用由与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有约80%一致性的核苷酸序列编码的重组 $\alpha$ -淀粉酶稳定地转化或包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少约80%一致性的多肽。如在此使用的，“玉米日粮”是指单个动物的24小时玉米允许量。

[0037] 在一些实施例中，来自转基因玉米植物或植物部分的植物材料构成按重量计从约1%至约100%的玉米日粮。因此，例如，转基因植物或植物部分可以包含按重量计约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的植物材料等，和/或其中的任何范围。

[0038] 在其他实施例中，提供了包含本发明的玉米日粮的动物饲料组合物。在一些实施例中，玉米日粮可以构成按重量计约5%至约100%的动物饲料组合物。因此，例如，玉米日粮可以构成按重量计约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、



17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%的动物饲料组合物等,和/或其中的任何范围。在代表性实施例中,玉米日粮构成约50%的动物饲料组合物。

[0039] 在一些实施例中,全混合日粮可以包含湿玉米谷蛋白饲料,其可以为按重量计约10%至约40%的动物饲料组合物。在另外的实施例中,全混合日粮可以包含湿玉米谷蛋白饲料,其可以为按重量计约10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%的动物饲料组合物。

[0040] 在其他实施例中,全混合日粮可以包含具有可溶物的改性酒糟,其可以为按重量计约5%至约25%的动物饲料组合物。在另外的实施例中,全混合日粮可以包含具有可溶物的改性酒糟,其可以为按重量计约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%的动物饲料组合物。

[0041] 在另外的实施例中,全混合日粮可以包含具有可溶物的湿酒糟,其可以为按重量计约5%至约25%的动物饲料组合物。在另外的实施例中,全混合日粮可以包含具有可溶物的湿酒糟,其可以为按重量计约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%的动物饲料组合物。

[0042] 具有同源性的不同核酸或蛋白质在此被称作“同源物”。术语同源物包括来自相同物种和其他物种的同源序列以及来自相同物种和其他物种的直向同源序列。“同源性”是指就位置一致性(即,序列相似性或一致性)百分比而言,两个或更多个核酸和/或氨基酸序列之间的相似性水平。同源性也是指不同核酸或蛋白质之间相似功能特性的概念。因此,本发明的组合物和方法还包含本发明的核苷酸序列和多肽序列(例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5)的同源物。如在此使用的,“直向同源物”是指在物种形成过程中由共同的祖先基因产生的不同物种中的同源核苷酸序列和/或氨基酸序列。本发明的同源物与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5具有显著序列一致性(例如,70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%)。

[0043] SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的同源物可以与本发明的任何饲料组合物或方法一起使用,单独或彼此组合,和/或与SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5一起。

[0044] 如在此使用的“序列一致性”是指两个最佳比对的多核苷酸或肽序列在组分(例如,核苷酸或氨基酸)的整个比对窗口内不变的程度。可以通过已知方法轻易地计算“一致性”,所述方法包括但不限于在以下文献中描述的那些:Computational Molecular Biology (Lesk,A.M.,ed.) Oxford University Press,New York (1988) [计算分子生物学 (Lesk,A.M.编辑)牛津大学出版社,纽约(1988)];Biocomputing:Informatics and Genome Projects (Smith,D.W.,ed.) Academic Press,New York (1993) [生物运算:信息学和基因组

项目 (Smith, D.W. 编辑) 学术出版社, 纽约 (1993)]; Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994) [序列数据的计算机分析, 第I部分 (Griffin, A.M. 和 Griffin, H.G. 编辑) 胡马纳出版社, 新泽西州 (1994)]; Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987) [分子生物学中的序列分析 (von Heinje, G. 编辑) 学术出版社 (1987)]; 以及 Sequence Analysis Primer (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991) [序列分析引物 (Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编辑) 斯托克顿出版社, 纽约 (1991)]。

[0045] 如在此使用的, 术语“序列一致性百分比”或“一致性百分比”是指在最佳比对两个序列时, 与测试 (“主题”) 多核苷酸分子 (或其互补链) 相比, 参考 (“查询”) 多核苷酸分子 (或其互补链) 的线性多核苷酸序列中的相同核苷酸的百分比。在一些实施例中, “一致性百分比”可以是指氨基酸序列中一致氨基酸的百分比。

[0046] 在两个核酸分子、核苷酸序列或蛋白质序列背景下的短语“实质上一致”是指当比较并比对最大对应性时具有至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约81%、至少约82%、至少约83%、至少约84%、至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、或至少约99%核苷酸或氨基酸残基一致性的两个或更多个序列或子序列, 如使用以下序列比较算法之一 (在此描述的和本领域已知的) 或通过目测检查所测量的。在本发明的一些实施例中, 在长度为至少约50个残基至约200个残基、约50个残基至约150个残基等的序列区域上存在实质一致性。因此, 在本发明的一些实施例中, 在长度为至少约50、约60、约70、约80、约90、约100、约110、约120、约130、约140、约150、约160、约170、约180、约190、约200或更多个残基的序列区域上存在实质一致性。在另外的实施例中, 这些序列在编码区的整个长度上是实质上一致的。此外, 在代表性实施例中, 实质上一致的核苷酸或蛋白质序列执行实质上相同的功能 (例如,  $\alpha$ -淀粉酶活性)。因此, 在一些特定实施例中, 这些序列在至少约150个残基上是实质上一致的并具有 $\alpha$ -淀粉酶活性。

[0047] 对于序列比较, 典型地, 一个序列充当与测试序列进行比较的参考序列。当使用序列比较算法时, 将测试序列和参考序列输入到计算机中 (若有必要, 则指定子序列坐标), 并且指定序列算法程序的参数。然后, 该序列比较算法基于所指定的程序参数来计算这个或这些测试序列相对于参考序列的序列一致性百分比。

[0048] 用于比对比较窗口的最佳序列比对是本领域技术人员所熟知的并且可以由以下工具实施: 如史密斯 (Smith) 和沃特曼 (Waterman) 的局部同源性算法、尼德曼 (Needleman) 和翁施 (Wunsch) 的同源性比对算法、皮尔森 (Pearson) 和利普曼 (Lipman) 的相似性搜索方法, 并且任选地由这些算法的计算机化实现方式来实施, 如作为 **GCG® Wisconsin Package®** (材料科学软件公司 (Accelrys Inc.), 圣地亚哥, 加利福尼亚州) 的部分可获得的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA。测试序列和参考序列的已比对区段的“一致性分数”是由两个已比对序列所共有的相同组分的数目除以参考序列区段 (即, 完整的参考序列或参考序列的更小限定部分) 中组分的总数目。序列一致性百分比被表示为一致性分数乘以100。一个或多个多核苷酸序列的比较可以是相对于全长多核苷酸序列或其一部分, 或相对于较长的多核苷酸序列。出于本发明的目的, 也可以使用针对翻译的核苷酸序列的2.0版BLASTX

和针对多核苷酸序列的2.0版BLASTN测定“一致性百分比”。

[0049] 用于执行BLAST分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开地获得。这种算法涉及首先通过鉴定查询序列中具有长度W的短字码而鉴定得分高的序列对(HSP),这些得分高的序列对当与数据库序列中具有相同长度的字码(word)进行比对时匹配或满足一些正值阈值的得分T。T被称为邻近字码得分阈值(Altschul等人,1990)。这些初始的邻近字码命中充当种子用于起始搜索以发现包含它们的较长的HSP。然后,将这些字码命中在两个方向上沿着每个序列延伸直到累积的比对得分可以增加。对于核苷酸序列,使用参数M(对于一对匹配残基的奖赏得分;总是 $>0$ )和N(对于错配残基的罚分;总是 $<0$ )来计算累积得分。对于氨基酸序列,使用评分矩阵来计算累积得分。当累积的比对得分从它的最大达到值降低了数量X;由于累积一个或多个负得分的残基比对使累积得分趋于零或零以下;或者到达任一序列的末端时,停止这些字码命中在每个方向上的延伸。BLAST算法的参数W、T、以及X决定了比对的灵敏度与速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字长(W)为11、期望值(E)为10、截止值(cutoff)为100、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、以及两条链的比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字长(W)为3、期望值(E)为10、以及BLOSUM62评分矩阵作为默认值(参见Henikoff&Henikoff, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915(1989)[Henikoff和Henikoff,美国国家科学院院刊, 89:10915(1989)] )。

[0050] 除计算序列一致性百分比之外,BLAST算法还执行两个序列之间的相似性统计分析(参见例如,Karlin&Altschul,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 90:5873-5787(1993)[Karlin和Altschul,美国国家科学院院刊,90:5873-5787(1993)] )。由BLAST算法提供的相似性的一种量度是最小概率总和(P(N)),它提供了在两个核苷酸或氨基酸序列之间会偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在测试核苷酸序列与参考核苷酸序列的比较中的最小概率总和小于约0.1至小于约0.001,则该测试核酸序列被认为是与该参考序列相似的。因此,在本发明的一些实施例中,在测试核苷酸序列与参考核苷酸序列的比较中的最小概率总和小于约0.001。

[0051] 当两个核苷酸序列在严格条件下彼此杂交时,这两个核苷酸序列也可以被认为是实质上一致的。在一些代表性实施例中,被认为实质上一致的两个核苷酸序列在高严格条件下彼此杂交。

[0052] 在核酸杂交实验(如DNA杂交和RNA杂交)的背景下,“严格杂交条件”和“严格杂交洗涤条件”是序列依赖性的,并且在不同的环境参数下是不同的。对核酸杂交的广泛指导见于以下文献:Tijssen Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes part I chapter 2“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays” Elsevier,New York(1993)[Tijssen,生物化学和分子生物学实验室技术-使用核酸探针的杂交,第2章第I部分,“杂交原理和核酸探针测定策略综述”,爱思唯尔,纽约(1993)]。通常,高严格杂交和洗涤条件在限定的离子强度和pH下被选定为比特定序列的热熔点( $T_m$ )低约5 $^{\circ}$ C。

[0053]  $T_m$ 是50%的靶序列与完全匹配的探针进行杂交时的温度(在限定的离子强度和pH下)。非常严格条件被选定为等于特定探针的 $T_m$ 。用于互补核苷酸序列(它们在DNA印迹或

RNA印迹中在滤器上具有超过100个互补残基)的杂交的严格杂交条件的实例是在42℃下具有1mg肝素的50%甲酰胺,其中杂交是过夜进行的。高严格洗涤条件的实例是在72℃下以0.15M NaCl持续约15分钟。严格洗涤条件的实例是在65℃下以0.2x SSC洗涤持续15分钟(参见Sambrook,以下针对SSC缓冲液的说明)。通常,高严格洗涤之前会先进行低严格洗涤,以去除背景探针信号。对于例如多于100个核苷酸的双链体的中严格洗涤的实例是在45℃下以1x SSC持续15分钟。对于例如多于100个核苷酸的双链体的低严格洗涤的实例是在40℃下以4-6x SSC持续15分钟。对于短探针(例如,约10至50个核苷酸),严格条件典型地涉及小于约1.0M的Na离子的盐浓度,典型地在pH 7.0至8.3下约0.01至1.0M的Na离子浓度(或其他盐),并且温度典型地是至少约30℃。还可以通过加入去稳定剂(如甲酰胺)来达到严格条件。一般而言,在特定的杂交测定中相比于不相关的探针观察到的高出2倍或更高的信噪比表明检测到特定杂交。如果在严格条件下彼此不杂交的核苷酸序列所编码的蛋白质是实质上一致的,则这些核苷酸序列仍然是实质上一致的。例如,当使用遗传密码所允许的最大密码子简并性来生成核苷酸序列的拷贝时,这种情况可能发生。

[0054] 以下是可以用来克隆同源核苷酸序列的杂交/洗涤条件的设置的实例,这些序列是与参考核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5)实质上一致的。在一个实施例中,参考核苷酸序列在50℃下在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中与“

[0055] 测试”核苷酸序列杂交,同时在50℃下在2X SSC、0.1%SDS中洗涤。在另一个实施例中,参考核苷酸序列在50℃下在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中与“测试”核苷酸序列杂交,同时在50℃下在1X SSC、0.1%SDS中洗涤;或者在50℃下在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中杂交,同时在50℃下在0.5X SSC、0.1%SDS中洗涤。在再另外的实施例中,参考核苷酸序列在50℃下在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中与“测试”核苷酸序列杂交,同时在50℃下在0.1X SSC、0.1%SDS中洗涤;或者在50℃下在7%十二烷基硫酸钠(SDS)、0.5M NaPO<sub>4</sub>、1mM EDTA中杂交,同时在65℃下在0.1X SSC、0.1%SDS中洗涤。

[0056] 在特定实施例中,两个核苷酸序列或两个多肽序列是实质上一致的另一个指示可以是由第一核酸所编码的蛋白质与由第二核酸所编码的蛋白质具有免疫交叉反应性或其特异性结合。因此,在一些实施例中,多肽可以是与第二多肽实质上一致的,例如其中这两种多肽仅区别于保守取代。

[0057] 因此,在本发明的一些实施例中,提供了与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有显著序列一致性的核苷酸序列。“显著序列一致性”或“显著序列相似性”意指与另一个核苷酸序列有至少约70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%一致性或相似性。因此,在另外的实施例中,“显著序列一致性”或“显著序列相似性”意指与另一个核苷酸序列有约70%至约100%、约75%至约100%、约80%至约100%、约81%至约100%、约82%至约100%、约83%至约100%、约84%至约100%、约85%至约100%、约86%至约100%、约87%至约100%、约88%至约100%、约89%至约100%、约90%至约100%、约91%至约100%、约92%至约100%、约93%至约100%、约94%至约100%、约95%至约100%、约96%至约100%、约97%至约100%、约98%至约100%和/

或约99%至约100%一致性或相似性的范围。因此,在一些实施例中,本发明的核苷酸序列是与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有显著序列一致性并编码具有 $\alpha$ -淀粉酶活性的多肽的核苷酸序列。在一些实施例中,本发明的核苷酸序列是与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有80%至100%一致性并编码具有 $\alpha$ -淀粉酶活性的多肽的核苷酸序列。在代表性实施例中,本发明的核苷酸序列是与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有95%一致性并编码具有 $\alpha$ -淀粉酶活性的多肽的核苷酸序列。

[0058] 在一些实施例中,本发明的多肽包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列至少70%一致,例,至少70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%和/或100%一致的氨基酸序列,基本上由其组成,或由其组成,并且具有 $\alpha$ 淀粉酶活性。

[0059] 在一些实施例中,多肽或核苷酸序列可以是保守修饰的变体。如在此使用的,“保守修饰的变体”是指含有单独取代、缺失或添加的多肽或核苷酸序列,这些取代、缺失或添加在该序列中改变、添加或缺失单个氨基酸或核苷酸或小百分比的氨基酸或核苷酸,其中该改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表在本领域是熟知的。

[0060] 如在此使用的,多肽的保守修饰的变体是具有生物活性的,并且因此具有如在此所述的参考多肽的所希望活性(例如, $\alpha$ -淀粉酶活性)。变体可以产生于例如遗传多态性或产生于人工操纵。参考多肽的生物活性变体可以与参考多肽的氨基酸序列具有至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或更大的序列一致性或相似性(例如,约40%至约99%或更大的序列一致性或相似性以及其中的任何范围),如通过在此的其他地方描述的序列比对程序和参数所测定的。活性变体可以与参考多肽序列区别于尽可能少的1-15个氨基酸残基,尽可能少的1-10个(如6-10个),尽可能少的5个,尽可能少的4个、3个、2个、或甚至1个氨基酸残基。

[0061] 天然存在的变体可以存在于群体内。此类变体可以通过使用熟知的分子生物学技术来鉴定,如使用如以下描述的聚合酶链式反应(PCR)以及杂交。合成来源的核苷酸序列,例如通过定点诱变或PCR介导的诱变生成的、编码本发明的多肽的序列,也作为变体包括在内。可以将一个或多个核苷酸或氨基酸取代、添加、或缺失引入在此所披露的核苷酸或氨基酸序列中,以使得将这些取代、添加、或缺失引入所编码的蛋白质中。这些添加(插入)或缺失(截短)可以在天然蛋白的N-末端或C-末端进行,或者在天然蛋白的一个或多个位点处进行。类似地,一个或多个核苷酸或氨基酸的取代可以在天然蛋白的一个或多个位点处进行。

[0062] 例如,保守的氨基酸取代可以在一个或多个预测的、优选是非必需氨基酸残基处进行。“非必需”氨基酸残基是可以与蛋白质的野生型序列不同但不改变生物活性的残基,而“必需”氨基酸是生物活性所要求的。“保守的氨基酸取代”是用具有相似侧链的氨基酸残基替换该氨基酸残基的取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域是已知的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨

酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 $\beta$ -分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、以及具有芳香族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。此类取代不会针对保守的氨基酸残基、或针对位于保守基序中的氨基酸残基进行,在这些地方此类残基对于蛋白质活性是必需的。

[0063] 例如,可以通过使编码酶的核苷酸序列突变来制备参考多肽的氨基酸序列变体。可以在植物中将所得到的突变体进行重组表达,并且使用本领域熟知的方法通过测定 $\alpha$ -淀粉酶活性来筛选保留生物活性的那些。用于诱变与核苷酸序列改变的方法在本领域是已知的。参见例如,Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 [Kunkel (1985) 美国国家科学院院刊,82:488-492]; Kunkel et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 154:367-382 [Kunkel等人(1987) 酶学方法,154:367-382]; 以及 *Techniques in Molecular Biology* (Walker & Gaastra eds., MacMillan Publishing Co. 1983) [分子生物学技术 (Walker和Gaastra编辑, 麦克米兰出版公司, 1983)] 和其中所引用的参考文献; 以及美国专利号4,873,192。清楚的是,在编码变体的DNA内所进行的突变一定不能破坏阅读框并且优选地不会生成互补区,这些互补区会产生二级mRNA结构。参见,欧洲专利申请公开号75,444。关于不影响感兴趣的蛋白质的生物活性的适当氨基酸取代的指导可以见于Dayhoff et al. (1978) *Atlas of Protein Sequence and Structure* (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.) [Dayhoff等人(1978) 蛋白质序列与结构图谱(国家生物医药研究基金会, 华盛顿特区)] 的模型中,将该文献通过引用结合在此。

[0064] 在此描述的多肽中的缺失、插入以及取代不预期在多肽的特征(例如,多肽的活性)中产生根本性改变。然而,当在如此做之前难以预测该取代、缺失或插入的精确效果时,本领域的普通技术人员将理解,该效果可以通过常规筛选测定来进行评估,所述筛选测定可以针对感兴趣的具体多肽活性(例如, $\alpha$ -淀粉酶活性)进行筛选。

[0065] 在一些实施例中,本发明的组合物可以包含多肽的活性片段。如在此使用的,“片段”意指参考多肽的一部分,该部分保留了多肽的 $\alpha$ -淀粉酶活性。片段还意指编码参考多肽的核酸分子的一部分。多肽的活性片段可以例如通过分离表达所编码的多肽片段的编码多肽的核酸分子的一部分(例如,利用体外重组表达)并评估该片段的活性来制备。编码此类片段的核酸分子可以是至少约150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、或2200个连续核苷酸,或其中的任何范围,或高达存在于全长编码多肽的核酸分子中的核苷酸数目。这样,多肽片段可以是至少约50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、525、550、575、600、625、650、675、或700个连续氨基酸残基,或其中的任何范围,或高达存在于全长多肽中的氨基酸残基总数。因此,在一些实施例中,本发明提供了如下多肽,该多肽包含本发明多肽(例如,SEQ ID NO:1)的至少约150个连续氨基酸残基,基本上由其组成,或由其组成,并且具有 $\alpha$ -淀粉酶活性。

[0066] 如在此使用的,关于核酸分子和/或核苷酸序列(例如,RNA或DNA)的术语“表达(express、expresses、expressed或expression)”等指示该核酸分子和/或核苷酸序列被转录并且任选地被翻译。因此,核酸分子和/或核苷酸序列可以表达或产生感兴趣的多肽或功能性的未翻译的RNA。

[0067] “异源”或“重组”核苷酸序列是不与该核苷酸序列所引入的宿主细胞天然地关联

的核苷酸序列,包括天然存在的核苷酸序列的非天然存在的多个拷贝。

[0068] “天然”或“野生型”核酸、核苷酸序列、多肽或氨基酸序列是指天然存在的或内源性的核酸、核苷酸序列、多肽或氨基酸序列。因此,例如,“野生型mRNA”是天然存在于生物体中的或对生物体来说是内源性的mRNA。“同源”核酸序列是与该核酸序列所引入的宿主细胞天然地关联的核苷酸序列。

[0069] 也如在此使用的,术语“核酸”、“核酸分子”、“核苷酸序列”以及“多核苷酸”可以互换使用并且涵盖RNA和DNA二者,包括cDNA、基因组DNA、mRNA、合成的(例如,化学合成的)DNA或RNA、以及RNA和DNA的嵌合体。术语多核苷酸、核苷酸序列、或核酸是指核苷酸链而与链长无关。核酸可以是双链或单链的。在单链时,核酸可以是有义链或反义链。可以使用寡核苷酸类似物或衍生物(例如,肌苷或硫代磷酸酯核苷酸)合成核酸。此类寡核苷酸可以例如用于制备具有改变的碱基配对能力或对核酸酶的增强的抗性的核酸。本发明进一步提供了为本发明的核酸、核苷酸序列、或多核苷酸的互补序列(该互补序列可以是完全互补序列或部分互补序列)的核酸。在此提供的核酸分子和/或核苷酸序列在此以5'至3'方向从左至右呈现,并且使用代表核苷酸字符的标准代码表示,如美国序列规则37CFR§§1.821-1.825和世界知识产权组织(WIPO)标准ST.25中所述。

[0070] 在一些实施例中,本发明的重组核酸分子、核苷酸序列以及多肽是“分离的”。“分离的”核酸分子、“分离的”核苷酸序列或“分离的”多肽是通过人工方式从其天然环境中分开而存在的核酸分子、核苷酸序列或多肽并因此不是自然产物。分离的核酸分子、核苷酸序列或多肽能以纯化形式存在,即与天然存在的生物体或病毒的至少一些其他组分(例如,细胞或病毒结构组分或通常发现与该多核苷酸有关的其他多肽或核酸)至少部分地分开。在代表性实施例中,分离的核酸分子、分离的核苷酸序列和/或分离的多肽是至少约1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更纯的。

[0071] 在其他实施例中,分离的核酸分子、核苷酸序列或多肽可以存在于非天然环境中,例如像重组宿主细胞。因此,例如,就核苷酸序列而言,术语“分离的”意指它从其天然存在于其中的染色体和/或细胞中分离出来。如果将多核苷酸从其天然存在于其中的染色体和/或细胞中分离出并且然后将其插入它并不天然存在于其中的遗传背景、染色体和/或细胞(例如,不同的宿主细胞、不同的调节序列和/或与自然中发现的不同的基因组位置)中,则该多核苷酸也是被分离的。因此,这些重组核酸分子、核苷酸序列以及它们所编码的多肽是“分离的”,因为它们通过人工方式从其天然环境中分开而存在并因此不是自然产物,然而,在一些实施例中,它们可以被引入到重组宿主细胞中并存在于该重组宿主细胞中。

[0072] 在一些实施例中,本发明的核苷酸序列和/或核酸分子可以与多种启动子可操作地关联以用于在宿主细胞(例如,植物细胞)中表达。如在此使用的,“可操作地关联”当指示可操作地连接至第二核酸序列的第一核酸序列时意指在该第一核酸序列与该第二核酸序列处于功能性关系中时的情况。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,则该启动子与该编码序列可操作地关联。

[0073] DNA“启动子”是编码区上游的非翻译的DNA序列,它含有RNA聚合酶结合位点并且启动DNA的转录。“启动子区”也可以包括充当基因表达的调节子的其他元件。启动子可以包括例如用于在重组核酸分子(即,嵌合基因)的制备中使用的组成型、可诱导型、时间调节型、发育调节型、化学调节型、组织优选型、以及组织特异型启动子。在特定方面,适用于本

发明的“启动子”是能够在植物细胞中启动核苷酸序列的转录的启动子。

[0074] “嵌合基因”是如下重组核酸分子,其中启动子或其他调节核苷酸序列与核苷酸序列可操作地关联,该核苷酸序列对mRNA进行编码或者该核苷酸序列被表达为蛋白质,以使得该调节核苷酸序列能够调节所关联的核苷酸序列的转录或表达。嵌合基因的调节核苷酸序列不能如自然界中所发现的那样正常地可操作地连接至所关联的核苷酸序列上。

[0075] 启动子的选择将依赖于表达的时间和空间需要而变化,并且还依赖于有待转化的宿主细胞而变化。因此,例如,核苷酸序列的表达可以处于任何植物和/或植物部分中(例如,处于叶中、处于茎秆或茎中、处于穗中、处于花序(例如,穗状花序、圆锥花序、穗轴等)中、处于根、种子和/或幼苗等中)。尽管已经显示来自双子叶植物的很多启动子在单子叶植物中是可操作的并且反之亦然,但理想的是选择双子叶植物启动子用于在双子叶植物中表达,并且选择单子叶植物启动子用于在单子叶植物中表达。然而,对所选择的启动子的起源并没有限制,足够的是它们在驱动核苷酸序列在所希望的细胞中的表达中是操作性的。

[0076] 适用于本发明的启动子包括但不限于组成性地驱动核苷酸序列的表达的那些启动子、在诱导时驱动表达的那些启动子、以及以组织或发育特异性方式驱动表达的那些启动子。这些不同类型的启动子在本领域是已知的。

[0077] 组成型启动子的实例包括但不限于夜香树属病毒启动子(cmp)(美国专利号7,166,770)、水稻肌动蛋白1启动子(Wang et al. (1992) Mol. Cell. Biol. 12:3399-3406 [Wang等人(1992) 分子细胞生物学, 12:3399-3406]); 以及美国专利号5,641,876)、CaMV 35S启动子(Odell et al. (1985) Nature 313:810-812 [Odell等人(1985) 自然, 313:810-812])、CaMV 19S启动子(Lawton et al. (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-324 [Lawton等人(1987) 植物分子生物学, 9:315-324])、nos启动子(Ebert et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5745-5749 [Ebert等人(1987) 美国国家科学院院刊, 84:5745-5749])、Adh启动子(Walker et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6624-6629 [Walker等人(1987) 美国国家科学院院刊, 84:6624-6629])、蔗糖合酶启动子(Yang & Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4144-4148 [Yang和Russell (1990) 美国国家科学院院刊, 87:4144-4148])、以及泛素启动子。源于泛素的组成型启动子积累在很多细胞类型中。已经从几种植物物种中克隆出泛素启动子以用在转基因植物中使用,例如,向日葵(Binet et al., 1991. Plant Science 79:87-94 [Binet等人, 1991, 植物科学, 79:87-94])、玉蜀黍(Christensen et al., 1989. Plant Molec. Biol. 12:619-632 [Christensen等人, 1989, 植物分子生物学, 12:619-632])和拟南芥(Norris et al. 1993. Plant Molec. Biol. 21:895-906 [Norris等人, 1993, 植物分子生物学, 21:895-906])。玉蜀黍泛素启动子(UbiP)已经在转基因单子叶植物系统中得到发展,并且它的序列以及构建用于单子叶植物转化的载体披露于专利公开EP 0 342 926中。此外,由McElroy等人(Mol. Gen. Genet. 231:150-160 (1991) [分子遗传学与普通遗传学, 231:150-160 (1991)])描述的启动子表达盒可容易被修饰以用于核苷酸序列的表达并且特别适用于在单子叶植物宿主中使用。

[0078] 在一些实施例中,可以使用组织特异性/组织优选的启动子。组织特异性或优选的表达模式包括但不限于绿色组织特异性或优选的、根特异性或优选的、茎特异性或优选的、以及花特异性或优选的。适用于在绿色组织中表达的启动子包括调节涉及光合作用的基因的许多启动子,并且这些中的许多已经从单子叶植物和双子叶植物两者中得以克隆。在一



个实施例中,适用于本发明的启动子是来自磷酸烯醇羧化酶基因的玉蜀黍PEPC启动子(Hudspeth&Grula,Plant Molec.Biol.12:579-589(1989)[Hudspeth和Grula,植物分子生物学,12:579-589(1989)]。组织特异性启动子的非限制性实例包括与编码种子贮藏蛋白(如 $\beta$ -伴大豆球蛋白、十字花科蛋白、油菜籽蛋白和菜豆素)、玉米蛋白(例如, $\gamma$ 玉米蛋白)或油体蛋白(如油质蛋白)、或脂肪酸生物合成中涉及的蛋白质(包括酰基载体蛋白、硬脂酰-ACP去饱和酶和脂肪酸去饱和酶(fad 2-1))的基因关联以及与胚发育过程中表达的其他核酸(如Bce4,参见例如Kridl et al.(1991)Seed Sci.Res.1:209-219[Kridl等人(199)种子科学研究,1:209-219];连同欧洲专利号255378)关联的那些启动子。适用于核苷酸序列在植物(特别是玉蜀黍)中表达的组织特异性或组织优先的启动子包括但不限于直接在根、髓、叶或花粉中表达的那些启动子。此类启动子披露于例如PCT公开W093/07278中,通过引用以其全文结合在此。组织特异性或组织优选的启动子的其他非限制性实例包括披露于美国专利6,040,504中的棉花二磷酸核酮糖羧化酶(rubisco)启动子;披露于美国专利5,604,121中的水稻蔗糖合酶启动子;由de Framond(FEBS 290:103-106(1991);授予汽巴-嘉基(Ciba-Geigy)的EP 0 452 269)描述的根特异性启动子;描述于美国专利5,625,136(授予汽巴-嘉基)并驱动玉蜀黍trpA基因表达的茎特异性启动子;以及披露于PCT公开W0 01/73087中的夜香树属黄叶卷曲病毒启动子,将所有专利文献通过引用结合在此。

[0079] 组织特异性/组织优选的启动子的其他实例包括但不限于根特异性启动子RCc3(Jeong et al.Plant Physiol.153:185-197(2010)[Jeong等人,植物生理学,153:185-197(2010)])和RB7(美国专利号5459252)、凝集素启动子(Lindstrom et al.(1990)Der.Genet.11:160-167[Lindstrom等人(1990)Der.Genet.11:160-167];和Vodkin(1983)Prog.Clin.Biol.Res.138:87-98[Vodkin(1983)临床生物研究进展,138:87-98])、玉米乙醇脱氢酶1启动子(Dennis et al.(1984)Nucleic Acids Res.12:3983-4000[Dennis等人(1984)核酸研究,12:3983-4000])、S-腺苷基-L-甲硫氨酸合成酶(SAMS)(Vander Mijnsbrugge et al.(1996)Plant and Cell Physiology,37(8):1108-1115[Vander Mijnsbrugge等人(1996)植物和细胞生理学,37(8):1108-1115])、玉米集光复合体启动子(Bansal et al.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3654-3658[Bansal等人(1992)美国国家科学院院刊,89:3654-3658])、玉米热激蛋白启动子(O'Dell et al.(1985)EMBO J.5:451-458[O'Dell等人(1985)欧洲分子生物学杂志,5:451-458];和Rochester et al.(1986)EMBO J.5:451-458[Rochester等人(1986)欧洲分子生物学杂志,5:451-458])、豌豆小亚基RuBP羧化酶启动子(Cashmore,“Nuclear genes encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase”pp.29-39In:Genetic Engineering of Plants(Hollaender ed.,Plenum Press 1983[Cashmore,“编码核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶的小亚基的核基因”,第29-39页于植物基因工程中(Hollaender编辑,普莱南出版社,1983)];和Poulsen et al.(1986)Mol.Gen.Genet.205:193-200[Poulsen等人(1986)分子遗传学与普通遗传学,205:193-200])、Ti质粒甘露氨酸合酶启动子(Langridge et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:3219-3223[Langridge等人(1989)美国国家科学院院刊,86:3219-3223])、Ti质粒胭脂碱合酶启动子(Langridge et al.(1989),supra[Langridge等人(1989),同上])、矮牵牛查尔酮异构酶启动子(van Tunen et al.(1988)EMBO J.7:1257-1263[van Tunen等人(1988)欧洲分子生物学杂志,7:1257-1263])、菜豆富

甘氨酸蛋白1启动子(Keller et al. (1989) *Genes Dev.* 3:1639-1646 [Keller等人(1989) 基因与发育, 3:1639-1646])、截短CaMV 35S启动子(O'Dell et al. (1985) *Nature* 313:810-812 [O'Dell等人(1985) 自然, 313:810-812])、马铃薯糖蛋白启动子(Wenzler et al. (1989) *Plant Mol. Biol.* 13:347-354 [Wenzler等人(1989) 植物分子生物学, 13:347-354])、根细胞启动子(Yamamoto et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:7449 [Yamamoto等人(1990) 核酸研究, 18:7449])、玉米醇溶蛋白启动子(Kriz et al. (1987) *Mol. Gen. Genet.* 207:90-98 [Kriz等人(1987) 分子遗传学与普通遗传学, 207:90-98]; Langridge et al. (1983) *Cell* 34:1015-1022 [Langridge等人(1983) 细胞, 34:1015-1022]; Reina et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:6425 [Reina等人(1990) 核酸研究, 18:6425]; Reina et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:7449 [Reina等人(1990) 核酸研究, 18:7449]; 和Wandelt et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:2354 [Wandelt等人(1989) 核酸研究, 17:2354])、球蛋白-1启动子(Belanger et al. (1991) *Genetics* 129:863-872 [Belanger等人(1991) 遗传学, 129:863-872])、 $\alpha$ -微管蛋白cab启动子(Sullivan et al. (1989) *Mol. Gen. Genet.* 215:431-440 [Sullivan等人(1989) 分子遗传学与普通遗传学, 215:431-440])、PEPCase启动子(Hudspeth&Gruha (1989) *Plant Mol. Biol.* 12:579-589 [Hudspeth和Gruha (1989) 植物分子生物学, 12:579-589])、R基因复合物相关启动子(Chandler et al. (1989) *Plant Cell* 1:1175-1183 [Chandler等人(1989) 植物细胞, 1:1175-1183])以及查尔酮合酶启动子(Franken et al. (1991) *EMBO J.* 10:2605-2612 [Franken等人(1991) 欧洲分子生物学杂志, 10:2605-2612])。

[0080] 尤其可用于种子特异性表达的是豌豆球蛋白启动子(Czako et al. (1992) *Mol. Gen. Genet.* 235:33-40 [Czako等人(1992) 分子遗传学与普通遗传学, 235:33-40]); 以及披露在美国专利号5,625,136中的种子特异性启动子。在一些实施例中,启动子可以是胚乳特异性启动子,包括但不限于玉蜀黍 $\gamma$ -玉米蛋白启动子或玉蜀黍ADP-gpp启动子。

[0081] 可用于成熟的叶中表达的启动子是当衰老开始时开启的那些启动子,如来自拟南芥属(*Arabidopsis*)的SAG启动子(Gan et al. (1995) *Science* 270:1986-1988 [Gan等人(1995) 科学, 270:1986-1988])。

[0082] 另外,可以使用在质体中起作用的启动子。此类启动子的非限制性实例包括噬菌体T3基因9'5'UTR以及其他的披露于美国专利号7,579,516中的启动子。适用于本发明的其他启动子包括但不限于S-E9小亚基RuBP羧化酶启动子和Kunitz胰蛋白酶抑制剂基因启动子(Kti3)。

[0083] 在本发明的一些实施例中,可以使用诱导型启动子。因此,例如,可以使用化学调节型启动子以通过应用外源化学调节物来调节植物中的基因表达。核苷酸序列的表达经由化学调节过的启动子进行的调节使得本发明的多肽仅当用诱导的化学品处理作物植物时能被合成。取决于目的,在应用化学品诱导基因表达时启动子可以是化学诱导型启动子,或者在应用化学品阻抑基因表达时启动子可以是化学阻抑型启动子。

[0084] 化学诱导型启动子在本领域是已知的,并且包括但不限于玉蜀黍In2-2启动子(它是由苯磺酰胺除草剂安全剂激活)、玉蜀黍GST启动子(它是由用作发芽前除草剂的疏水亲电子化合物激活)、以及烟草PR-1a启动子(它是由水杨酸激活)(例如,PR1a系统)、类固醇反应性启动子(参见例如,Schena et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88,10421-10425

[Sचना等人(1991)美国国家科学院院刊,88,10421-10425]和McNellis et al.(1998) Plant J.14,247-257 [McNellis等人(1998)植物杂志,14,247-257]中的糖皮质激素诱导型启动子)以及四环素诱导型启动子和四环素-阻抑型启动子(参见例如,Gatz et al.(1991) Mol.Gen.Genet.227,229-237 [Gatz等人(1991)分子遗传学与普通遗传学,227,229-237]和美国专利号5,814,618和5,789,156)、Lac阻遏物系统启动子、铜诱导型系统启动子、水杨酸诱导型系统启动子(例如,PR1a系统)、糖皮质激素诱导型启动子(Aoyama et al.(1997) Plant J.11:605-612 [Aoyama等人(1997)植物杂志,11:605-612])以及蜕皮激素诱导型系统启动子。

[0085] 诱导型启动子的其他非限制性实例包括ABA诱导型和细胞膨胀诱导型启动子、植物生长素结合蛋白基因启动子(Schwob et al.(1993) Plant J.4:423-432 [Schwob等人(1993)植物杂志,4:423-432])、UDP葡萄糖类黄酮糖基转移酶启动子(Ralston et al.(1988) Genetics 119:185-197 [Ralston等人(1988)遗传学,119:185-197])、MPI蛋白酶抑制剂启动子(Cordero et al.(1994) Plant J.6:141-150 [Cordero等人(1994)植物杂志,6:141-150])以及甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子(Kohler et al.(1995) Plant Mol.Biol.29:1293-1298 [Kohler等人(1995)植物分子生物学,29:1293-1298]; Martinez et al.(1989) J.Mol.Biol.208:551-565 [Martinez等人(1989)分子生物学杂志,208:551-565]; 和 Quigley et al.(1989) J.Mol.Evol.29:412-421 [Quigley等人(1989)分子进化杂志,29:412-421])。还包括苯磺酰胺诱导型(美国专利号5,364,780)和乙醇诱导型(国际专利申请公开号W0 97/06269和W0 97/06268)系统和谷胱甘肽S-转移酶启动子。同样地,可以使用描述于以下文献中的诱导型启动子中的任一种:Gatz(1996) Current Opinion Biotechnol.7:168-172 [Gatz(1996)生物技术新见,7:168-172]和Gatz(1997) Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.48:89-108 [Gatz(1997)植物生理学与植物分子生物学年度综述,48:89-108]。适用于指导本发明的核苷酸序列在植物中的表达的其他化学诱导型启动子披露于美国专利5,614,395中,将该专利通过引用以其全文结合在此。基因表达的化学诱导还详述于公开申请EP 0 332 104(授予汽巴-嘉基)和美国专利5,614,395中。在一些实施例中,用于化学诱导的启动子可以是烟草PR-1a启动子。

[0086] 本发明的多肽可以或不通过使用信号序列被靶向植物内的区室。已知多种信号肽影响多核苷酸的表达或将多核苷酸靶向到特定的区室/组织中或特定的区室/组织外。适合的信号序列和靶向启动子在本领域是已知的并且包括但不限于在此提供的那些(参见例如,美国专利号7,919,681)。靶标的实例包括但不限于液泡、内质网(ER)、叶绿体、造粉体、淀粉粒、细胞壁、种子,或不限于特定的组织,例如胚乳。因此,编码本发明多肽(例如,SEQ ID NO:1)的核苷酸序列可以可操作地连接到用于将该多肽靶向和/或保留至植物内的区室的信号序列。在一些实施例中,信号序列可以是来自waxy的N-末端信号序列、来自 $\gamma$ -玉米蛋白的N-末端信号序列、淀粉结合结构域、或C-末端淀粉结合结构域。在另外的实施例中,信号序列可以是ER信号序列、ER保留序列、ER信号序列和另外的ER保留序列。因此,在本发明的一些实施例中, $\alpha$ -淀粉酶多肽可以与一个或多个信号序列融合(和/或编码所述多肽的核苷酸序列可以可操作地连接到编码所述信号序列的核苷酸序列)。

[0087] 如在此使用的,“表达盒”意指包含感兴趣的核苷酸序列(例如,SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列)的核酸分子,其中所述核苷酸序列

与至少一个控制序列(例如,启动子)可操作地关联。因此,本发明的一些实施例提供了设计为表达SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列的表达盒。以这种方式,例如,可以在用以在生物体或其细胞(例如,植物、植物部分和/或植物细胞)中表达的表达盒中提供与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列或与SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和/或SEQ ID NO:5的核苷酸序列具有显著一致性的核苷酸序列可操作地关联的一个或多个植物启动子。

[0088] 包含感兴趣的核苷酸序列的表达盒可以是嵌合的,意味着它的组分中的至少一种相对于它的其他组分中的至少一种是异源的。表达盒还可以是天然存在但已经是适用于异源表达的重组形式获得的表达盒。然而,典型地,表达盒相对于宿主是异源的,即表达盒的特定核酸序列不是天然存在于宿主细胞中的,并且必须已经通过转化事件引入到宿主细胞或宿主细胞的祖先中。

[0089] 除可操作地连接至待表达的核苷酸序列的启动子之外,表达盒还可以包括其他调节序列。如在此使用的,“调节序列”意指位于编码序列的上游(5'非编码序列)、内部和/或下游(3'非编码序列)和/或影响相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性、或翻译的核苷酸序列。调节序列包括但不限于启动子、增强子、内含子、翻译前导序列、终止信号、以及聚腺苷酸化信号序列。在一些实施例中,表达盒还可以包括编码可操作地连接到本发明的多核苷酸序列的信号序列的核苷酸序列。

[0090] 出于本发明的目的,这些调节序列或区域相对于植物、植物部分和/或植物细胞可以是天然的/类似的,和/或这些调节序列相对于其他调节序列可以是天然的/类似的。可替代地,这些调节序列相对于植物(和/或植物部分和/或植物细胞)和/或相对于彼此(即,这些调节序列)可以是异源的。因此,例如,当启动子可操作地连接至来自一个物种的多核苷酸(该物种与多核苷酸所来源的物种不同)时,该启动子可以是异源的。可替代地,如果启动子是来自与多核苷酸所来源的物种相同/类似的物种,则该启动子相对于选定的核苷酸序列也可以是异源的,但是一者或两者(即,启动子和/或多核苷酸)是从其原始形式和/或基因组的基因座进行大致修饰的,和/或该启动子不是可操作地连接的多核苷酸的天然启动子。

[0091] 已知源自病毒的多个非翻译前导序列用来增强基因表达。确切地说,来自烟草花叶病毒(TMV,“ $\omega$ -序列”)、玉蜀黍褪绿斑驳病毒(MCMV)以及苜蓿花叶病毒(AMV)的前导序列已显示有效增强表达(Gallie et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:8693-8711 [Gallie等人(1987)核酸研究,15:8693-8711];和Skuzeski et al. (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:65-79 [Skuzeski等人(1990)植物分子生物,15:65-79])。本领域已知的其他前导序列包括但不限于小核糖核酸病毒前导子,如脑心肌炎(EMCV) 5'非编码区前导子(Elroy-Stein et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6126-6130 [Elroy-Stein等人(1989)美国国家科学院院刊,86:6126-6130]);马铃薯Y病毒组前导子,如烟草蚀纹病毒(TEV)前导子(Allison et al. (1986) *Virology* 154:9-20 [Allison等人(1986)病毒学,154:9-20]);玉蜀黍矮花叶病毒(MDMV)前导子(Allison et al. (1986), *supra* [Allison等人(1986),同上]);人免疫球蛋白重链结合蛋白(BiP)前导子(Macejak&Samow (1991) *Nature* 353:90-94 [Macejak和Samow (1991)自然,353:90-94]);来自AMV的外壳蛋白mRNA的非翻译前导子(AMV RNA 4; Jobling&Gehrke (1987) *Nature* 325:622-625 [Jobling和Gehrke (1987)

自然,325:622-625];烟草花叶病TMV前导子(Gallie et al.(1989)Molecular Biology of RNA 237-256[Gallie等人(1989)RNA分子生物学,237-256]);以及MCMV前导子(Lommel et al.(1991)Virology 81:382-385[Lommel等人(1991)病毒学,81:382-385])。还参见,Della-Cioppa et al.(1987)Plant Physiol.84:965-968[Della-Cioppa等人(1987)植物生理学,84:965-968]。

[0092] 表达盒还可以任选地包括在植物中具有功能性的转录和/或翻译终止区(即,终止区)。多种转录终止子是可供用于在表达盒中使用的并且负责在超出感兴趣的异源核苷酸序列时的转录终止以及正确的mRNA聚腺苷酸化。终止区对于转录起始区可以是天然的,对于可操作地连接的感兴趣的核苷酸序列可以是天然的,对于植物宿主可以是天然的,或者可以是源自另一种来源(即,对于启动子、感兴趣的核苷酸序列、植物宿主、或其任何组合而言是外来的或异源的)。适当的转录终止子包括但不限于CAMV 35S终止子、tml终止子、胭脂碱合酶终止子和/或豌豆rbcS E9终止子。这些终止子可以在单子叶植物和双子叶植物二者中使用。此外,可以使用编码序列的天然转录终止子。

[0093] 本发明的表达盒还可以包括用于选择性标记的核苷酸序列,该选择性标记可以用于选择转化的植物、植物部分和/或植物细胞。如在此使用的,“选择性标记(selectable marker)”意指如下核苷酸序列,当该核苷酸序列表达时向表达该标记的植物、植物部分和/或植物细胞赋予不同的表型,并且因此允许此类转化的植物、植物部分和/或植物细胞与不具有该标记的那些区别开来。这样一个核苷酸序列可以编码可选择的或可筛选的标记,这取决于该标记是否赋予可以通过化学手段而被选择的性状,如通过使用选择剂(例如,抗生素、除草剂等),或者取决于该标记是否仅是人们可以通过观察或测试而鉴别的性状,如通过筛选(例如,R基因座性状)。当然,适合的选择性标记的许多实例在本领域是已知的并且可以用于在此描述的表达盒中。

[0094] 选择性标记的实例包括但不限于编码neo或nptII的核苷酸序列,它赋予对卡那霉素、G418等的抗性(Potrykus et al.(1985)Mol.Gen.Genet.199:183-188[Potrykus等人(1985)分子遗传学与普通遗传学,199:183-188]);编码bar的核苷酸序列,它赋予对草丁膦的抗性;编码改变的5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸(EPSP)合酶的核苷酸序列,它赋予对草甘膦的抗性(Hinchee et al.(1988)Biotech.6:915-922[Hinchee等人(1988)生物技术,6:915-922]);编码腈水解酶(如来自臭鼻克雷白氏杆菌(*Klebsiella ozaenae*)的bxn)的核苷酸序列,它赋予对溴草膦的抗性(Stalker et al.(1988)Science 242:419-423[Stalker等人(1988)科学,242:419-423]);编码改变的乙酰乳酸合酶(ALS)的核苷酸序列,它赋予对咪唑啉酮、磺酰脲或其他ALS-抑制化学品的抗性(欧洲专利申请号154204);编码甲氨蝶呤抗性的二氢叶酸还原酶(DHFR)的核苷酸序列(Thillet et al.(1988)J.Biol.Chem.263:12500-12508[Thillet等人(1988)生物化学杂志,263:12500-12508]);编码茅草枯脱卤素酶的核苷酸序列,它赋予对茅草枯的抗性;编码甘露糖-6-磷酸异构酶(也称为磷酸甘露糖异构酶(PMI))的核苷酸序列,它赋予代谢甘露糖的能力(美国专利号5,767,378和5,994,629);编码改变的邻氨基苯甲酸合酶的核苷酸序列,它赋予对5-甲基色氨酸的抗性;和/或编码hph的核苷酸序列,它赋予对潮霉素的抗性。本领域技术人员能够选择用于在本发明的表达盒中使用的适合的选择性标记。

[0095] 另外的选择性标记包括但不限于编码 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶或uidA(GUS,其编码不同的

显色底物已知的酶)的核苷酸序列;编码调节花青素颜料(红色)在植物组织中的产生的产物的R基因座核苷酸序列(Dellaporta et al.,“Molecular cloning of the maize R-nj allele by transposon-tagging with Ac,”pp.263-282In:Chromosome Structure and Function:Impact of New Concepts,18th Stadler Genetics Symposium(Gustafson& Appels eds.,Plenum Press 1988) [Dellaporta等人,“通过用Ac进行转座子-标记的玉蜀黍R-nj等位基因的分子克隆”,第263-282页,于:染色体结构和功能:新概念的影响,第18次斯塔德勒遗传学研讨会(Gustafson和Appels编辑,普莱纽姆出版社,1988)];编码 $\beta$ -内酰胺酶(不同的显色底物(例如,PADAC,显色的头孢菌素)已知的酶)的核苷酸序列(Sutcliffe (1978)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75:3737-3741[Sutcliffe (1978)美国国家科学院院刊,75:3737-3741]);编码xy1E(其编码邻苯二酚双加氧酶)的核苷酸序列(Zukowsky et al. (1983)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:1101-1105[Zukowsky等人(1983)美国国家科学院院刊,80:1101-1105]);编码酪氨酸酶(能够将酪氨酸氧化成DOPA和多巴醌(它们又缩合形成黑色素)的酶)的核苷酸序列(Katz et al. (1983)J.Gen.Microbiol.129:2703-2714[Katz等人(1983)普通微生物学杂志,129:2703-2714]);编码 $\beta$ -半乳糖苷酶(存在显色底物的酶)的核苷酸序列;编码允许生物体发光检测的荧光素酶(lux)的核苷酸序列(Ow et al. (1986)Science 234:856-859) [Ow等人(1986)科学,234:856-859]);编码可以用于钙敏感性的生物体发光检测中的水母发光蛋白的核苷酸序列(Prasher et al. (1985) Biochem.Biophys.Res.Comm.126:1259-1268[Prasher等人(1985)生物化学与生物物理研究通讯,126:1259-1268]);或者编码绿色荧光蛋白的核苷酸序列(Niedz et al. (1995) Plant Cell Reports 14:403-406[Niedz等人(1995)植物细胞报告,14:403-406])。本领域技术人员能够选择用于在本发明的表达盒中使用的适合的选择性标记。

[0096] 在本发明的其他方面,提供了增加动物的生长速率(增重)或平均日增重的方法,该方法包括向所述动物饲喂本发明的动物饲料组合物,其中该动物的生长速率或该动物的平均日增重与未提供本发明的动物饲料组合物的对照动物的生长速率相比增加约0.05磅/天至约10磅/天。因此,在一些实施例中,生长速率或平均日增重的增加可以为约0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.1、0.125、0.15、0.175、0.2、0.225、0.25、0.275、0.3、0.325、0.35、0.375、0.4、0.425、0.45、0.475、0.5、0.525、0.55、0.575、0.6、0.625、0.65、0.675、0.7、0.725、0.75、0.775、0.8、0.825、0.85、0.875、0.9、0.925、0.95、0.975、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75、3、3.25、3.5、3.75、4、4.1、4.2、4.21、4.22、4.23、4.24、4.25、4.26、4.27、4.28、4.29、4.3、4.31、4.32、4.33、4.34、4.35、4.36、4.37、4.38、4.39、4.4、4.41、4.42、4.43、4.44、4.45、4.46、4.47、4.48、4.49、4.5、4.75、5、5.25、5.5、5.75、6、6.25、6.5、6.75、7、7.25、7.5、7.75、8、8.25、8.5、8.75、9、9.25、9.5、9.75、10磅/天等,和/或其中的任何范围。在一些特定实施例中,生长速率或平均日增重的增加可以从约0.05磅/天到约0.5磅/天。在另外的实施例中,与未提供所述动物饲料组合物的对照动物的生长相比,生长速率或平均日增重的增加可以是0.1磅/天。

[0097] 在本发明的再另外的方面,提供了用于减少动物达到所希望重量而需要的天数的方法,该方法包括向所述动物喂食本发明的动物饲料组合物,从而与未饲喂所述动物饲料组合物的对照动物达到相同所希望重量而需要的天数相比,减少达到所希望重量而需要的天数。

[0098] 如在此使用的，“所希望重量”或“所希望育肥重量(finished weight)”可以指活重或热胴体重。因此，例如，对于牛，所希望的活重可以在约950至约1,600磅之间，并且所希望的热胴体重可以在约700至约1,000磅之间。

[0099] 在进入饲养场之前，牛的大部分时间都会在放牧区或牧场上放牧度过，并且然后被运送到向它们饲喂谷粒和其他精饲料的育肥饲养场。通常，牛以约600至约750磅的重量进入饲养场。取决于安置时的重量、饲喂条件和所希望的育肥重量，饲养场中的时间可以在约90天至约300天的范围内。平均增加可以是从约2.5至约5磅/天。

[0100] 因此，在本发明的另一方面，与未饲喂所述动物饲料组合物的对照动物相比，饲喂本发明的动物饲料组合物的动物达到所希望重量而需要的天数可以减少约1天至约30天。在一些实施例中，与未饲喂所述动物饲料组合物的对照动物相比，饲喂本发明的动物饲料组合物的动物达到所希望重量而需要的天数可以减少约1天至约25天、约1天至约20天、约5天至约20天、约5天至约15天等。因此，在一些实施例中，饲喂本发明的动物饲料组合物的动物达到所希望重量而需要的天数可以减少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30天等，和/或其中的任何范围。

[0101] 在本发明的其他方面，提供了增加动物的饲料利用效率的方法，该方法包括以与未饲喂所述动物饲料组合物的对照动物相比有效于增加所述动物的饲料利用效率的量向所述动物喂养本发明的动物饲料组合物。

[0102] 饲料利用效率可以计算为动物体重的增加/提供的饲料量。在一些实施例中，体重是宰杀之前的育肥体重。在另外的实施例中，提供的饲料是在约90天至约300天的时间内提供的饲料量。因此，在一些实施例中，提供的饲料是在约100天至约275天、约125天至约250天、约150天至约225天、约180天至约200天等的时间内提供的饲料量。

[0103] 因此，在一些实施例中，测量增重的时间段(天数)是90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、297、298、299、300天等，和/或其中的任何范围。

[0104] 在本发明的另外的方面，与未饲喂所述动物饲料组合物的对照动物相比，玉米的动物饲用价值增加约1%至约25%。玉米的饲用价值等于本发明的饲料组合物的饲料效率和未饲喂所述饲料组合物的对照动物的饲料效率的差异，除以未饲喂所述饲料组合物的所述对照动物的饲料效率，所有都除以所述饲料组合物的玉米内含物百分比。因此，在一些实施例中，玉米的饲用价值的增加可以为约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%等，

和/或其中的任何范围。在特定实施例中,与对照相比,玉米饲料价值的增加为约1%至约10%。在代表性实施例中,与对照相比,饲料价值的增加为约5%。

[0105] 在本发明的另外的方面,与未饲喂所述动物饲料组合物的对照动物相比,动物的饲料利用效率增加约0.005至约0.1。因此,在一些实施例中,饲料利用效率的增加可以为约0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.011、0.012、0.013、0.014、0.015、0.016、0.017、0.018、0.019、0.02、0.021、0.022、0.023、0.024、0.025、0.026、0.027、0.028、0.029、0.03等,和/或其中的任何范围。在特定实施例中,与对照相比,饲料利用效率的增加为约0.005至约0.01。在代表性实施例中,与对照相比,饲料利用效率的增加为约0.06。饲料利用效率(也称为“G:F”)是动物的平均日增重除以每天的干物质摄入量。

[0106] 在一些实施例中,饲喂动物约1磅至约30磅/动物/天的本发明的动物饲料组合物。因此,在一些实施例中,饲喂动物约1磅、2磅、3磅、4磅、5磅、6磅、7磅、8磅、9磅、10磅、11磅、12磅、13磅、14磅、15磅、16磅、17磅、18磅、19磅、20磅、21磅、22磅、23磅、24磅、25磅、26磅、27磅、28磅、29磅、30磅/动物/天的本发明的动物饲料组合物等,和/或其中的任何范围。在一些实施例中,饲喂动物约9磅至约21磅/动物/天的本发明的动物饲料组合物。在一些实施例中,可以随意饲喂动物本发明的动物饲料组合物,或约一次至约三次(例如,1、2、3)/天或其任何组合。

[0107] 本发明的动物饲料组合物可以饲喂给任何动物,例如农场动物、动物园动物、实验动物和/或伴侣动物。在一些实施例中,动物可以是但不限于牛科动物(例如,家牛(乳牛,例如乳制品和/或牛肉)、野牛、水牛)、马科动物(例如,马、驴、斑马等)、禽类(例如,鸡、鹌鹑、火鸡、鸭等;例如,家禽)、绵羊、山羊、羚羊、猪科动物(例如,猪)、犬科动物、猫科动物、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、豚鼠)、兔、鱼等。在一些实施例中,动物可以是乳牛。在一些实施例中,动物可以是家禽。在其他实施例中,动物可以是鸡。在另外的实施例中,动物可以是猪。在再另外的实施例中,动物可以是猪科动物。

[0108] 在另外的实施例中,本发明提供了增加乳畜(例如,乳牛、山羊等)产生的乳量的方法,该方法包括向所述乳畜饲喂本发明的动物饲料组合物,其中与由未提供本发明的动物饲料组合物的对照动物产生的乳量相比,由所述动物产生的乳量增加约5%至约200%。在一些实施例中,乳量的增加是在从约1至约72小时的时间段内。在其他实施例中,由所述动物产生的乳量增加约25%至约175%、约50%至约150%等。在另外的实施例中,与未饲喂本发明的动物饲料组合物的对照动物相比,由所述动物产生的乳量增加约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、165%、170%、175%、180%、185%、190%、195%和/或200%。

[0109] 如在此使用的,术语“增加(increase、increasing、increased)”、“增强(enhance、enhanced、enhancing和enhancement)”(及其语法变体)描述了通过向动物饲喂本发明的动物饲料组合物,所述动物的平均日增重或所述动物的生长速率(增重)的增加,其中该动物的平均日增重或生长速率增加约0.05磅/天至约10磅/天,或者通过以有效于增加所述动物的饲料利用效率的量向所述动物饲喂本发明的动物饲料组合物,饲料利用效率的增加。平均日增重、生长速率(增重)或动物饲料利用效率的这种增加可以通过将平均日增重、生长速率(增重)或动物饲料利用效率的增加与未饲喂本发明的动物饲料组合物的动物(即,对



照)相比进行观察。

[0110] 如在此使用的,术语“减少(reduce、reduced、reducing、reduction)”、“减小(diminish)”、“抑制(suppress)”和“降低(decrease)”(及其语法变体)描述了例如与对照(例如,未饲喂动物饲料组合物的对照动物)相比,动物达到所希望重量而需要的天数的减少或降低。

[0111] 本发明在以下的实例中进行更具体地描述,这些实例仅意在是说明性的,因为其众多改变与变体对于本领域内的普通技术人员是明显的。

[0112] 实例

[0113] 实验1

[0114] 在内布拉斯加州米德附近的UNL农业研究开发中心(ARDC)饲养场,在饲养场育肥试验中利用了三百头杂交阉牛(初始BW=658±36磅)。在开始实验之前五天,牛被限制饲喂由32%玉米湿酒糟加可溶物、32%苜蓿干草、32%干轧玉米和4%补充剂(DM基础)组成的2%BW的饮食。在第0天和第1天记录两天的初始重量,取平均值并将其用作初始BW。将阉牛按BW区组化成轻、中和重BW区组(分别为n=3、2和1围栏复制),按BW分层,并随机分配到30个围栏之一中,这些围栏随机分配到五种饮食处理之一中。有10头/围栏和6个复制/处理。在随机化区组设计中,饮食处理包括1)商业玉米来源(CON),2)Enogen测试玉米(SYN),3)CON和SYN的50:50共混物,4)CON与湿玉米谷蛋白饲料(CON-SB)和5)SYN与湿玉米谷蛋白饲料(SYN-SB)(表1)。在21天的时间段内使阉牛适应玉米替代了苜蓿干草的育肥饮食,而在所有饮食中包括玉米青贮饲料、玉米湿酒糟加可溶物(WDGS)和补充剂保持不变。在含有湿玉米谷蛋白饲料(Sweet Bran®(嘉吉公司(Cargill)));SB的饮食中,所有谷粒适应饮食中的浓度保持不同。饮食被配制为满足或超过蛋白质和矿物质的NRC要求。最终育肥饮食提供360mg/阉牛/天的瘤胃素(Rumensin)(30g/吨的DM)和90mg/阉牛/天的泰乐菌素(Tylan)(9g/吨的DM)。在第1天阉牛植入Revalor-XS。

[0115] 在第173天,在商业屠宰场(内布拉斯加州,奥马哈,大奥马哈包装公司(Greater Omaha Pack))收获所有的阉牛。在宰杀的那天收集最终的活BW,并采用4%的铅笔收缩(pencil shrink)计算屠宰率(dressing percentage)。在第173天供应的饲料是前一天DMI的50%,并且在下午4:00称重。然后阉牛被运送并保持直到第二天宰杀。在宰杀的那天记录热胴体重和肝脏得分。在48小时冷冻后记录脂肪厚度、LM面积和USDA大理石纹得分。使用调整到常见63%屠宰率的HCW计算最终BW、ADG和F:G。

[0116] 实验2

[0117] 在内布拉斯加州斯科茨布拉夫附近的UNL潘汉德尔研究与推广中心(Panhandle Research and Extension Center,PHREC)饲养场,在饲养场育肥试验中利用了二百四十头杂交阉牛(初始BW=634±34磅)。牛限制饲喂和初始BW方案与实验1相同。将阉牛按BW区组化成轻、中和重BW区组,按BW分层,并随机分配到24个围栏之一中,这些围栏随机分配到四种饮食处理之一中。有10头/围栏和6个复制/处理。饮食处理包括1)CON,2)SYN,3)BLEND以及4)CON,将酶(Amaize;奥特奇公司(Alltech, Inc.))以5g/阉牛/天的比率加入饮食中(NZ;表2)。限制饲喂、称重、区组化、植入和谷粒适应程序与实验1相同。在第148、169和181天(分别),在商业屠宰场(嘉吉肉制品公司(Cargill Meat Solutions),科罗拉多州摩根堡)收获重、中、和轻BW区组的阉牛。在最后一天,阉牛禁食饲料,并在上午8:00称重,然后运送并在

同一天宰杀。作为随机化区组设计分析数据,初始BW区组作为固定效应,并且围栏作为实验单位。

[0118] 表1.评价有或无Sweet Bran的测试玉米和常规玉米的饮食处理(实验1)。

[0119]

成分, % DM	CON	SYN	BLEND	CON-CGF <sup>1</sup>	SYN-CGF <sup>2</sup>
商业玉米	68.0	-	34.0	58.0	-
测试玉米 <sup>3</sup>	-	68.0	34.0	-	58.0
Sweet Bran	-	-	-	25.0	25.0
MDGS <sup>4</sup>	15.0	15.0	15.0	-	-
玉米青贮饲料	12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
膳食补充剂 <sup>5</sup>	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
细磨玉米	2.174	2.174	2.174	2.435	2.435
石灰岩	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
尿素	0.6	0.6	0.6	0.4	0.4
盐	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
牛脂	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
痕量矿物质预混料	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
氯化钾	0.02	0.02	0.02	--	--
瘤胃素-90	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165
维生素 ADE 预混料	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
泰乐菌素-40	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
所分析的营养组成, %					
淀粉	52.48	52.55	52.52	47.75	47.81
CP	12.84	12.91	12.88	12.58	12.64
脂肪	4.07	4.01	4.04	3.19	3.13
NDF	15.91	15.16	15.54	18.80	18.16
S	0.16	0.15	0.15	0.19	0.18
P	0.40	0.39	0.39	0.46	0.44
[0120]					
K	0.57	0.58	0.57	0.67	0.68
Mg	0.17	0.17	0.17	0.19	0.19

[0121] <sup>1</sup>常规玉米,具有湿玉米谷蛋白饲料,Sweet Bran

[0122] <sup>2</sup>先正达(Syngenta)测试玉米,具有湿玉米谷蛋白饲料,Sweet Bran

[0123] <sup>3</sup>由先正达在身份保留程序下提供的测试玉米。单独储存、加工和饲喂

[0124] <sup>4</sup>MDGS=具有可溶物的改性酒糟

[0125] <sup>5</sup>补充剂包括30g/吨瘤胃素和9g/吨泰乐菌素。

[0126] 表2.评价有或无添加酶的测试玉米和常规玉米的饮食处理(实验2)。

[0127]

成分	CON	SYN	BLEND	CON-NZ
玉米	64.0	-	32.0	64.0
测试玉米	-	64.0	32.0	-
WDGS	15.0	15.0	15.0	15.0
玉米青贮饲料	15.0	15.0	15.0	15.0
液体补充剂 <sup>2,3</sup>	6.0	6.0	6.0	6.0 <sup>4</sup>
所分析的营养组成, %				
淀粉	51.40	52.23	51.82	51.40
CP	12.96	13.41	13.18	12.96
脂肪	3.44	3.89	3.67	3.44
NDF	15.46	15.66	15.56	15.46
S	0.15	0.15	0.15	0.15
P	0.34	0.31	0.32	0.34
K	0.54	0.52	0.53	0.54
Mg	0.15	0.15	0.15	0.15

[0128] <sup>2</sup>液体补充剂包含:0.6%尿素、1.6%Ca、0.3%盐、0.02%氯钾、维生素和

[0129] 痕量矿物质。

[0130] <sup>3</sup>通过微型机械加入瘤胃素(30g/吨)和泰乐菌素(9g/吨)。

[0131] <sup>4</sup>通过微型机械以5g/阉牛/天的比率加入酶

[0132] 表3.在没有Sweet Bran的情况下玉米杂种对育肥阉牛性能和胴体特征的影响(实验1)

[0133]

项目	饮食处理 <sup>1</sup>		
	CON	SYN	BLEND
动物性能			
初始 BW, 磅	672	673	673
DMI, 磅	23.0	22.4	23.0
最终 BW, 磅 <sup>4</sup>	1296	1291	1304
ADG, 磅 <sup>4</sup>	3.61	3.57	3.64

[0134]

G:F, 磅/磅 <sup>4</sup>	0.159	0.161	0.159
F:G, 磅/磅 <sup>4,5</sup>	6.44	6.31	6.34
胴体特征			
HCW, 磅	816	814	821
屠宰率	62.7	62.8	62.9
大理石纹得分 <sup>6</sup>	461	489	511
脂肪深度, 英寸	0.48 <sup>a</sup>	0.55 <sup>b</sup>	0.57 <sup>b</sup>
LM 面积, 英寸 <sup>2</sup>	12.9	12.5	12.3
计算的产量等级 <sup>7</sup>	3.68 <sup>a</sup>	3.99 <sup>b</sup>	4.10 <sup>b</sup>
肝脓肿, %	8.33	5.00	5.37

[0135] <sup>1</sup>CON=对照商业玉米杂种, SYN=先正达测试玉米杂种,

[0136] BLEND=在DM基础上CON和SYN DM的50:50共混物。

[0137] <sup>4</sup>从调整到常见63%屠宰率的HCW计算。[0138] <sup>5</sup>作为G:F分析, F:G的倒数。[0139] <sup>6</sup>大理石纹得分:300=Sligh<sup>00</sup>, 400=Small<sup>00</sup>。[0140] <sup>7</sup>计算为 $2.5 + (2.5 \times \text{第12肋部脂肪}) + (0.2 \times 2.5 [\text{KPH}]) + (0.0038 \times \text{HCW}) - (0.32 \times \text{LM 面积})$ 。[0141] <sup>a,b</sup>具有不同上标的行内均值不同 ( $P < 0.05$ )。

[0142] 表4. 玉米杂种和包括Sweet Bran对育肥阉牛性能和胴体特征的影响 (实验1)

[0143]

	饮食处理 <sup>1</sup>			
	0% SB		25% SB	
	CON	SYN	CON	SYN
动物性能				
初始 BW, 磅	671	673	673	674
DMI, 磅	23.0	22.4	23.3	22.7
最终 BW, 磅 <sup>3</sup>	1295	1290	1278	1317
ADG, 磅 <sup>3</sup>	3.60 <sup>ab</sup>	3.57 <sup>ab</sup>	3.49 <sup>b</sup>	3.72 <sup>a</sup>
G:F <sup>3</sup>	0.159 <sup>bc</sup>	0.160 <sup>ab</sup>	0.151 <sup>c</sup>	0.164 <sup>a</sup>
F:G, 磅/磅 <sup>3,4</sup>	6.44	6.31	6.71	6.13
胴体特征				
HCW, 磅	816	813	805	829
屠宰率	62.7	62.8	62.8	63.1
大理石纹得分 <sup>5</sup>	456	484	443	488
脂肪深度, 英寸	0.48	0.56	0.48	0.53
肋眼面积, 英寸 <sup>2</sup>	12.9	12.5	12.8	13.0
计算的产量等级 <sup>6</sup>	3.67	3.98	3.67	3.83

[0144]

肝脓肿, %	8.96	5.63	11.12	5.63
--------	------	------	-------	------

[0145] <sup>1</sup> 0%SB=不含Sweet Bran的饮食,25%SB=含有25%Sweet Bran的饮食,CON=商业玉米杂种,SYN=先正达测试玉米。

[0146] <sup>3</sup>从调整到常见63%屠宰率的HCW计算。

[0147] <sup>4</sup>作为G:F分析,F:G的倒数。

[0148] <sup>5</sup>大理石纹得分:300=Slight<sup>00</sup>,400=Small<sup>00</sup>。

[0149] <sup>6</sup>计算为 $2.5 + (2.5 \times \text{第12肋部脂肪}) + (0.2 \times 2.5 [\text{KPH}]) + (0.0038 \times \text{HCW}) - (0.32 \times \text{LM面积})$ 。

[0150] <sup>a,b,c</sup>具有不同上标的行内均值不同(P<0.05)。

[0151] 表5.玉米杂种和包括 $\alpha$ 淀粉酶对育肥阉牛性能和胴体特征的影响(实验2)

[0152]

项目	饮食处理 <sup>1</sup>			
	CON	SYN	BLEND	NZ
动物性能				
初始 BW, 磅	646	649	647	647
DMI, 磅	23.6	23.8	23.5	23.4
最终 BW, 磅 <sup>3</sup>	1257 <sup>a</sup>	1301 <sup>b</sup>	1299 <sup>b</sup>	1299 <sup>b</sup>
ADG, 磅 <sup>3</sup>	3.71 <sup>a</sup>	3.94 <sup>b</sup>	3.93 <sup>b</sup>	3.93 <sup>b</sup>
G:F <sup>3</sup>	0.158	0.165	0.166	0.167
F:G, 磅/磅 <sup>3,4</sup>	6.53	6.18	6.07	6.07
胴体特征				
HCW, 磅	792 <sup>a</sup>	820 <sup>b</sup>	818 <sup>b</sup>	818 <sup>b</sup>
屠宰率	62.7	63.2	63.3	63.2
大理石纹得分 <sup>5</sup>	451 <sup>a</sup>	468 <sup>ab</sup>	481 <sup>b</sup>	468 <sup>ab</sup>
脂肪深度, 英寸	0.57 <sup>a</sup>	0.60 <sup>ab</sup>	0.61 <sup>b</sup>	0.60 <sup>ab</sup>
肋眼面积, 英寸 <sup>2</sup>	12.1 <sup>a</sup>	12.1 <sup>a</sup>	12.4 <sup>b</sup>	12.4 <sup>b</sup>
计算的产量等级 <sup>6</sup>	3.47	3.64	3.55	3.55
肝脓肿, %	3.33	5.00	0	5.33

[0153] <sup>1</sup>CON=商业玉米杂种,SYN=先正达测试玉米,BLEND=在DM基础上CON和SYN DM的50:50共混物,NZ=基于CON的饮食中包括可商购的 $\alpha$ 淀粉酶。

[0154] <sup>2,3</sup>从调整到常见63%屠宰率的HCW计算。

[0155] <sup>4</sup>作为G:F分析,F:G的倒数。

[0156] <sup>5</sup>大理石纹得分:300=Slight<sup>00</sup>,400=Small<sup>00</sup>。

[0157] <sup>6</sup>计算为 $2.5 + (2.5 \times \text{第12肋部脂肪}) + (0.2 \times 2.5 [\text{KPH}]) + (0.0038 \times \text{HCW}) - (0.32 \times \text{LM面积})$ 。

[0158] <sup>a,b</sup>具有不同上标的行内均值不同(P<0.05)。

[0159] 实验3

[0160] 在随机化区组设计中,利用多头杂交阉牛(初始BW(体重)=685±46磅)进行173天育肥试验。在实验开始之前五天,阉牛被限制饲喂由47.5%苜蓿干草、47.5%湿玉米谷蛋白饲料和5%补充剂(DM(干物质)基础)组成的2%BW的饮食。在第0天和第1天记录两天的初始重量,并取平均值以确定初始BW。随着在第1天测量初始BW,阉牛植入Revalor-XS。将阉牛按BW区组化成轻和重BW区组,按BW分层,并随机分配到围栏中。然后将围栏以8头/围栏和6个重复/处理随机分配到饮食处理中。

[0161] 基于包括测试玉米或对照(Enogen或非Enogen)和副产品类型(MDGS(具有可溶物的改性酒糟)或Sweet Bran)的因素安排饮食处理(表6)。本试验中利用的副产品作为蛋白源(18%MDGS)或作为酸中毒控制手段(35%SB(Sweet Bran®(嘉吉公司)))提供。在21天的时间段内使阉牛适应玉米替代了苜蓿干草的育肥饮食,而在所有饮食中包括高粱青贮饲料、Sweet Bran或MDGS和补充剂保持不变。饮食被配制为满足或超过蛋白质和矿物质的NRC要求。最终育肥饮食提供330mg/阉牛/天的瘤胃素(30g/吨的DM)和90mg/阉牛/天的泰乐菌素(8.18g/吨的DM)。

[0162] 在第174天,在商业屠宰场(内布拉斯加州,奥马哈,大奥马哈包装公司)收获所有的阉牛。在第173天供应的饲料是前一天DMI的50%,并且在下午4:00称重。然后阉牛被运送到商业屠宰场,并保持直到第二天宰杀。在宰杀的那天记录热胴体重和肝脏得分,在48小时冷冻后记录胴体特征如第12肋部脂肪厚度、LM面积和USDA大理石纹得分。使用USDA YG方程 $[YG = 2.5 + 2.5(\text{脂肪厚度,英寸}) - 0.32(\text{LM面积,英寸}^2) + 0.2(\text{KPH脂肪,}\%) + 0.0038(\text{HCW,磅})]$ 计算产量等级。使用调整到常见63%屠宰率的HCW(热胴体重)计算最终BW、ADG(平均日增重)和G:F(增重与饲料比率)。

[0163] 表6:饲喂给育肥阉牛的在DM基础上的饮食组成

[0164]

成分, % DM	测试玉米				对照			
	MDGS <sup>1</sup>		Sweet Bran		MDGS <sup>1</sup>		Sweet Bran	
测试玉米	69.5	-	52.5	-	-	-	-	-
DRC <sup>2</sup>	-	-	-	-	69.5	-	52.5	-
对照 DRC <sup>2</sup>	-	-	35.0	35.0	-	-	35.0	35.0
Sweet Bran	-	-	-	-	-	-	-	-
改性酒糟加可溶物	18.0	18.0	-	-	18.0	18.0	-	-
高粱青贮饲料	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
膳食补充剂 <sup>4</sup>	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
细磨玉米	2.223	2.223	2.806	2.806	2.223	2.223	2.806	2.806
石灰岩	1.71	1.71	1.68	1.68	1.71	1.71	1.68	1.68
尿素	0.55	0.55	-	-	0.55	0.55	-	-
盐	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
牛脂	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
痕量矿物质预混料	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
瘤胃素-90	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165	0.0165
维生素 ADE 预混料	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015
泰乐菌素-40	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
所分析的营养组成, %								
淀粉	47.56	49.08	39.06	40.21	47.14	48.74	38.74	39.95
CP	12.1	12.0	13.5	13.4	12.2	12.0	13.6	13.4
脂肪	4.35	4.98	3.19	3.66	4.35	5.19	3.19	3.82
NDF	15.5	14.9	20.0	19.5	16.2	15.4	20.5	19.9
S	0.22	0.22	0.21	0.16	0.22	0.21	0.21	0.21
P	0.38	0.39	0.53	0.53	0.34	0.35	0.50	0.51
K	0.47	0.48	0.68	0.68	0.45	0.45	0.66	0.66
Mg	0.17	0.17	0.24	0.24	0.16	0.16	0.23	0.23

[0165] <sup>1</sup>MDGS=改性酒糟加可溶物[0166] <sup>2</sup>DRC=干轧玉米[0167] <sup>4</sup>补充剂包括30g/吨瘤胃素和9g/吨泰乐菌素

[0168] 表7:测试玉米对育肥牛性能的影响

		DRC <sup>1</sup>	
		测试玉米	对照
<u>性能</u>			
[0169]	初始 BW, 磅	700	699
	最终 BW, 磅 <sup>5</sup>	1451 <sup>b</sup>	1433 <sup>a</sup>
	DMI, 磅/天	23.7	23.8
	ADG, 磅 <sup>5</sup>	4.36 <sup>b</sup>	4.25 <sup>ab</sup>
	G:F <sup>5</sup>	0.184	0.178
<u>胴体特征</u>			
	HCW, 磅	912	904
	大理石纹 <sup>6</sup>	505	492
	LM 面积, 英寸 <sup>2</sup>	14.3	14.0
	脂肪深度, 英寸	0.55	0.59
	计算的 YG <sup>7</sup>	3.24	3.41

[0170] 1DRC=干轧玉米;

[0171] 5从调整到常见63%屠宰率的HCW计算

[0172] 6大理石纹得分:400=Small<sup>00</sup>;500=Modest<sup>00</sup>

[0173] 7计算为 $2.5 + (2.5 \times \text{第12肋部脂肪}) + (0.2 \times 2.5 [\text{KPH}]) + (0.0038 \times \text{HCW}) -$

[0174]  $(0.32 \times \text{LM面积})$

[0175] a,b具有不同上标的行内均值不同 (P<0.10)。

[0176] 表8:测试玉米和副产品类型对育肥牛性能的影响



	MDGS <sup>1</sup>		Sweet Bran	
	测试玉米	对照	测试玉米	对照
<u>性能</u>				
[0177] 初始 BW, 磅	700	698	699	700
最终 BW, 磅 <sup>5</sup>	1434	1427	1447	1453
DMI, 磅/天	22.5	22.9	23.3	23.4
ADG, 磅 <sup>5</sup>	4.25	4.21	4.34	4.36
G:F <sup>5</sup>	0.190	0.184	0.186	0.187
<u>胴体特征</u>				
HCW, 磅	903	899	913	916
大理石纹 <sup>6</sup>	488	494	510	506
LM 面积, 英寸 <sup>2</sup>	14.4	14.0	14.1	14.1
脂肪深度, 英寸	0.56	0.59	0.59	0.58
计算的 YG <sup>7</sup>	3.21	3.43	3.42	3.40

[0178] <sup>1</sup>MDGS=改性酒糟加可溶物

[0179] <sup>5</sup>从调整到常见63%屠宰率的HCW计算

[0180] <sup>6</sup>大理石纹得分:400=Small<sup>00</sup>;500=Modest<sup>00</sup>

[0181] <sup>7</sup>计算为 $2.5 + (2.5 \times \text{第12肋部脂肪}) + (0.2 \times 2.5 [\text{KPH}]) + (0.0038 \times \text{HCW}) - (0.32 \times \text{LM 面积})$

[0182] 以上所述情形是用作说明本发明的,并且不应当解释为本发明的限制。本发明是由以下权利要求书限定的,这些权利要求的等效物被包括在其中。

[0183] 在此引用的所有的公开、专利申请、专利以及其他参考文件对于引用中提及的有关句子和/或段落的传授内容通过引用以其全文结合在此。

## 序列表

<110> SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

Iragavarapu, Tammiraj Kumar

Witherspoon, David

<120> 动物饲料组合物及使用方法

<130> 80783-WO-REG-ORG-P-1

<141> 2016-04-08

<150> US 62/145,587

<151> 2015-04-10

<160> 5

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 436

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 1

```

Met Ala Lys Tyr Leu Glu Leu Glu Gly Gly Val Ile Met Gln Ala
1           5           10           15
Phe Tyr Trp Asp Val Pro Ser Gly Gly Ile Trp Trp Asp Thr Ile Arg
           20           25           30
Gln Lys Ile Pro Glu Trp Tyr Asp Ala Gly Ile Ser Ala Ile Trp Ile
           35           40           45
Pro Pro Ala Ser Lys Gly Met Ser Gly Gly Tyr Ser Met Gly Tyr Asp
           50           55           60
Pro Tyr Asp Tyr Phe Asp Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Lys Gly Thr Val
65           70           75           80
Glu Thr Arg Phe Gly Ser Lys Gln Glu Leu Ile Asn Met Ile Asn Thr
           85           90           95
Ala His Ala Tyr Gly Ile Lys Val Ile Ala Asp Ile Val Ile Asn His
           100          105          110
Arg Ala Gly Gly Asp Leu Glu Trp Asn Pro Phe Val Gly Asp Tyr Thr
           115          120          125
Trp Thr Asp Phe Ser Lys Val Ala Ser Gly Lys Tyr Thr Ala Asn Tyr
           130          135          140
Leu Asp Phe His Pro Asn Glu Leu His Ala Gly Asp Ser Gly Thr Phe
145          150          155          160

```

Gly Gly Tyr Pro Asp Ile Cys His Asp Lys Ser Trp Asp Gln Tyr Trp  
 165 170 175  
 Leu Trp Ala Ser Gln Glu Ser Tyr Ala Ala Tyr Leu Arg Ser Ile Gly  
 180 185 190  
 Ile Asp Ala Trp Arg Phe Asp Tyr Val Lys Gly Tyr Gly Ala Trp Val  
 195 200 205  
 Val Lys Asp Trp Leu Asn Trp Trp Gly Gly Trp Ala Val Gly Glu Tyr  
 210 215 220  
 Trp Asp Thr Asn Val Asp Ala Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Ser Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Ala Lys Val Phe Asp Phe Pro Leu Tyr Tyr Lys Met Asp Ala Ala Phe  
 245 250 255  
 Asp Asn Lys Asn Ile Pro Ala Leu Val Glu Ala Leu Lys Asn Gly Gly  
 260 265 270  
 Thr Val Val Ser Arg Asp Pro Phe Lys Ala Val Thr Phe Val Ala Asn  
 275 280 285  
 His Asp Thr Asp Ile Ile Trp Asn Lys Tyr Pro Ala Tyr Ala Phe Ile  
 290 295 300  
 Leu Thr Tyr Glu Gly Gln Pro Thr Ile Phe Tyr Arg Asp Tyr Glu Glu  
 305 310 315 320  
 Trp Leu Asn Lys Asp Lys Leu Lys Asn Leu Ile Trp Ile His Asp Asn  
 325 330 335  
 Leu Ala Gly Gly Ser Thr Ser Ile Val Tyr Tyr Asp Ser Asp Glu Met  
 340 345 350  
 Ile Phe Val Arg Asn Gly Tyr Gly Ser Lys Pro Gly Leu Ile Thr Tyr  
 355 360 365  
 Ile Asn Leu Gly Ser Ser Lys Val Gly Arg Trp Val Tyr Val Pro Lys  
 370 375 380  
 Phe Ala Gly Ala Cys Ile His Glu Tyr Thr Gly Asn Leu Gly Gly Trp  
 385 390 395 400  
 Val Asp Lys Tyr Val Tyr Ser Ser Gly Trp Val Tyr Leu Glu Ala Pro  
 405 410 415  
 Ala Tyr Asp Pro Ala Asn Gly Gln Tyr Gly Tyr Ser Val Trp Ser Tyr  
 420 425 430  
 Cys Gly Val Gly  
 435

<210> 2

<211> 1308

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 2

```

atggccaagt acctggagct ggaggagggc ggcgtgatca tgcaggcggt ctactgggac 60
gtccccgagcg gaggcacatctg gtgggacacc atccgccaga agatccccga gtggtacgac 120
gccggcatct cgcgatctg gataccgcca gttccaagg gcatgtccgg gggctactcg 180
atgggctacg acccgtacga ctacttcgac ctcggcgagt actaccagaa gggcacggtg 240
gagacgcgct tcgggtccaa gcaggagctc atcaacatga tcaacacggc gcacgcctac 300
ggcatcaagg tcacgcgga catcgtgatc aaccacaggg ccggcggcga cctggagtgg 360
aacccttcg tcggcgacta cacctggacg gaattctcca aggtcgctc cggcaagtac 420
accgccaact acctcgactt ccacccaac gagctgcacg cgggcgactc cggcacgttc 480
ggcggctacc cggacatctg ccacgacaag tctgggacc agtactggct ctgggcctcg 540
caggagtctt acgcggccta cctgcctcc atcggcatcg acgcgtggcg cttegactac 600
gtcaagggtt acggggcctg ggtggtcaag gactggetca actggtgggg cggctggggc 660
gtgggagct actgggacac caacgtcgac gcctgctca actgggcta ctctccggc 720
gccaaagggt tcgacttccc cctgtactac aagatggacg cggccttcca caacaagaac 780
atcccggcgc tcgtcgagge cctgaagaac ggcggcacgg tggctctccg cgacccttc 840
aaggccgtga ccttcgtcgc caaccacgac acggacatca tctggaacaa gtaccggcg 900
tacgccttca tctcaccta cgagggccag cccacgatct tctaccgca ctacgaggag 960
tggtgaaca aggacaagct caagaacctg atctggatte acgacaacct cgcggggcgc 1020
tccactagta tcgtgtacta cgactccgac gagatgatct tcgtccgaa cggctacggc 1080
tccaagcccg gcctgatcac gtacatcaac ctgggctctt ccaaggtggg ccgctgggtg 1140
tacgtcccga agttcgccgg cgcgtgcatc cacgagtaca ccggcaacct cggcggctgg 1200
gtggacaagt acgtgtactc ctccggctgg gtctacctgg aggccccggc ctacgacccc 1260
gccaacggcc agtacggcta ctccgtgtgg tctactgcg gcgtcggc 1308

```

<210> 3

<211> 2223

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 3

```

atggccaagt acctggagct ggaggagggc ggcgtgatca tgcaggcggt ctactgggac 60
gtccccgagcg gaggcacatctg gtgggacacc atccgccaga agatccccga gtggtacgac 120
gccggcatct cgcgatctg gataccgcca gttccaagg gcatgtccgg gggctactcg 180
atgggctacg acccgtacga ctacttcgac ctcggcgagt actaccagaa gggcacggtg 240
gagacgcgct tcgggtccaa gcaggagctc atcaacatga tcaacacggc gcacgcctac 300
ggcatcaagg tcacgcgga catcgtgatc aaccacaggg ccggcggcga cctggagtgg 360

```

aaccggttcg tcggcgacta cacctggacg gacttetcca aggtegcctc eggcaagtac 420  
accgccaact acctcgactt ccacccaac gagctgcacg cgggcgactc cggcacgttc 480  
ggcggctacc cggacatctg ccacgacaag tcctgggacc agtactggct ctgggcctcg 540  
caggagtccct acgcggccta cctgcgctcc atcggcatcg acgcgtggcg cttcgactac 600  
gtcaagggct acggggcctg ggtggtcaag gactggctca actggtgggg cggctgggcg 660  
gtgggcgagt actgggacac caacgtcgac gcgctgctca actgggccta ctctccggc 720  
gccaaaggtgt tcgacttccc cctgtactac aagatggacg cggccttca caacaagaac 780  
atccccggcg tcgctgaggc cctgaagaac ggcggcacgg tggctctccc cgacccttc 840  
aagccgtga ccttcgctgc caaccacgac acggacatca tctggaaca gtaccggcg 900  
tacgccttca tctcaccta cgagggccag cccacgatct tctaccgca ctacgaggag 960  
tggctgaaca aggacaagct caagaacctg atctggatc acgacaacct cgcgggcggc 1020  
tccactagta tcgtgtaact cgactccgac gagatgatct tcgtccgca cggctacggc 1080  
tccaagcccg gcctgatcac gtacatcaac ctgggctcct ccaaggtggg ccgctgggtg 1140  
tacgtcccga agttcgccgg cgcgtgcatc cacgagtaca ccggcaacct cggcggctgg 1200  
gtggacaagt acgtgtaact ctccggtgg gtctacctgg aggccccggc ctacgacccc 1260  
gccaacggcc agtacggcta ctccgtgtgg tctactgcg gcgtcggcac atcgattgct 1320  
ggcatcctcg aggccgacag ggtcctcacc gtcagcccct actacgccga ggagctcact 1380  
tccggcatcg ccaggggctg cgagctcgac aacatcatgc gcctcaccgg catcaccggc 1440  
atcgtcaacg gcatggacgt cagcgagtgg gaccccagca gggacaagta catgcctgtg 1500  
aagtacgacg tgcgacggc cgtggaggcc aaggcgtga acaaggaggc gctgcaggcg 1560  
gaggtcgggc tcccgtgga ccggaacatc ccgctggtgg cgttcatcgg caggctgga 1620  
gagcagaagg gccccgacgt catggcggcc gccatcccgc agctcatgga gatggtggag 1680  
gacgtgcaga tcgttctgct gggcacgggc aagaagaagt tcgagcgcac gctcatgagc 1740  
gccgaggaga agttcccagg caaggtgcgc gccgtggtca agttcaacgc ggcgctggcg 1800  
caccacatca tggccggcgc cgactgtctc gccgtacca gccgcttca gccctgcggc 1860  
ctcatccagc tgcaggggat gcgatacga acgccctgcg cctgcgcgct caccggtgga 1920  
ctcgtcgaca ccatcatcga aggcaagacc gggttccaca tgggccgcct cagcgtcgac 1980  
tgcaacgtcg tggagccggc ggacgtcaag aaggtggcca ccaccttga gcgcgccatc 2040  
aaggtggtcg gcacccggc gtacgaggag atggtgagga actgcatgat ccaggatctc 2100  
tcctggaagg gccctgcaa gaactgggag aacgtgctgc tcagcctcgg gtcgcccggc 2160  
ggcgagccag gggttgaagg cgaggagatc gcgccgctcg ccaaggagaa cgtggcccg 2220  
ccc 2223  
<210> 4  
<211> 3285  
<212> DNA  
<213> *Aspergillus shirousami*  
<400> 4  
gccacccgg ccgactggcg ctcccagtc atctacttc tctcaccga ccgcttcgcc 60  
cgcaccgacg gctccaccac cgccacctgc aacaccgcc accagaagta ctgcggcggc 120

acctggcagg gcatcatcga caagctcgac tacatccagg gcatgggett caccgccate 180  
 tggatcacc cggtagaccg ccagctcccg cagaccaccg cctacggcga cgcctaccac 240  
 ggctactggc agcaggacat ctactccctc aacgagaact acggcaccgc cgacgacctc 300  
 aaggccctct cctccgccct ccacgagcgc ggcatgtacc tcatggtgga cgtggtggcc 360  
 aaccacatgg gctacgacgg cgccggctcc tccgtggact actccgtggt caagccgttc 420  
 tcctcccagg actacttcca cccgttctgc ttcatccaga actacgagga ccagaccag 480  
 gtggaggact gctggctcgg cgacaacacc gtgtccctcc cggacctcga caccaccaag 540  
 gacgtggtga agaacgagtg gtacgactgg gtgggctccc tcgtgtccaa ctactccatc 600  
 gacggcctcc gcatcgacac cgtgaagcac gtgcagaagg acttctggcc gggctacaac 660  
 aaggccgccg gcgtgtactg catcggcgag gtgctcgacg tggaccgggc ctacacctgc 720  
 ccgtaccaga acgtgatgga cggcgtgctc aactaccga tctactacc gctcctcaac 780  
 gccttcaagt ccacctccgg ctcgatggac gacctctaca acatgateaa caccgtgaag 840  
 tccgactgcc cggactccac cctcctcggc acctctgtgg agaaccacga caaccgcgc 900  
 ttgcctcct acaccaacga catcgcctc gccaaagac tggccgctt catcatctc 960  
 aacgacggca tccgatcat ctacgccggc caggagcagc actacgccgg cggcaacgac 1020  
 ccggccaacc gcgaggccac ctggetctcc ggtaccgga ccgactccga gctgtacaag 1080  
 ctcatcgct ccgccaacgc catccgcaac tacgccatct ccaaggacac cggcttcgtg 1140  
 acctacaaga actggccgat ctacaaggac gacaccacca tcgccatgcg caagggcacc 1200  
 gacggctccc agatcgtgac catctctcc aacaaggcgc cctccggcga ctctacacc 1260  
 ctctccctct ccggcgccgg ctacaccgcc ggccagcagc tcaccgaggt gatcggtgc 1320  
 accaccgtga ccgtgggctc cgacggcaac gtgccggtgc cgatggccgg cggcctcccg 1380  
 cgcgtgctct acccgaccga gaagctcgcc ggetccaaga tatgctctc ctccaagccg 1440  
 gccaccctcg actcctggct ctccaacgag gccaccgtgg cccgcaccgc catcctcaac 1500  
 aacatcggcg ccgacggcgc ctgggtgtcc ggcgccgact ccggcatcgt ggtggcctcc 1560  
 ccgtccaccg acaaccgga ctacttctac acctggacc cgcactccgg catcgtgctc 1620  
 aagaccctcg tggacctct ccgcaacggc gacaccgacc tcctctccac catcgagcac 1680  
 tacatctcct cccaggccat catccagggc gtgtccaacc cgtccggcga cctctcctcc 1740  
 ggccgctcgc gcgagccgaa gttcaacgtg gacgagaccg cctacgccgg ctctggggc 1800  
 cgcccgcagc gcgacggccc ggccctccgc gccaccgcca tgatcggett cggccagtgg 1860  
 ctctcgaca acggctacac ctccgccgc accgagatcg tgtggccgct cgtgcgcaac 1920  
 gacctctcct acgtggcca gtactggaac cagaccggt acgacctctg ggaggaggtg 1980  
 aacggctcct cttcttcaac catcgccgtg cagcaaccgc cctcgtgga gggctccgc 2040  
 ttgccaccg ccgtgggctc ctctgctcc tgggtcgact cccaggcccc gcagatctc 2100  
 tgctacctcc agtcttctg gaccggtcc tacatctcg ccaacttga ctctcccgc 2160  
 tccggcaagg acaccaacac cctcctcggc tccatccaca ccttcgacc ggaggccggc 2220  
 tgcgacgact ccacctcca gccgtgctcc ccgcgcgcc tcgccaacca caaggaggtg 2280  
 gtggactcct tccgtccat ctacacctc aacgacggcc tctccgactc cgaggccgtg 2340  
 gccgtgggccc gctaccgga ggactcctac tacaacggca acccgtggtt cctctgcacc 2400  
 ctgcgcccg ccgagcagct ctacgacgcc ctctaccagt gggacaagca gggctcctg 2460

gagatcaccg acgtgtccct cgacttcttc aaggeccctet actcegggegc egccaccggc 2520  
 acctactcct cctcctcctc cacctactcc tccatcgtgt ccgccgtgaa gaccttcgcc 2580  
 gacggcttcg tgtccatcgt ggagaccac gccgctcca acggctccct ctccgagcag 2640  
 ttcgacaagt ccgacggcga cgagctgtcc gcccgcgacc tcacctggtc ctacgccgcc 2700  
 ctctcaccg ccaacaaccg ccgcaactcc gtgggtgccgc cgtcctgggg cgagacctcc 2760  
 gcctcctccg tgccgggcac ctgcgccgcc acctccgct ccggcaccta ctctccgtg 2820  
 accgtgacct cctggccgtc catcgtggcc accggcggca ccaccaccac egccaccacc 2880  
 accggctccg gcggcgtgac ctccacctcc aagaccacca ccaccgctc caagacctcc 2940  
 accaccacct cctccacctc ctgcaccacc ccgaccgccg tggccgtgac cttcgacctc 3000  
 accgccacca ccacctacgg cgagaacatc tacctcgtgg gctccatctc ccagctcggc 3060  
 gactggggaga cctccgacgg catcgcctc tccgcccaca agtacacctc ctccaaccgg 3120  
 ccgtggtagc tgaccgtgac cctcccggcc ggcgagtctc tcgagtaca gttcatccgc 3180  
 gtggagtccg acgactccgt ggagtgggag tccgaccga accgcgagta caccgtgccg 3240  
 caggcctgcg gcgagtccac egccaccgtg accgacacct ggcgc 3285

<210> 5

<211> 1320

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 合成

<400> 5

atggcgaagc acttggctgc catgtgctgg tgcagcctcc tagtgcttgt actgctctgc 60  
 ttgggctccc agctggccca atcccaggc ctcttcagg ggttcaactg ggagtcgtgg 120  
 aagaagcaag gtgggtggta caactacctc ctggggcggg tggacgacat cgccgcgacg 180  
 ggggccacgc acgtctggct cccgcagccg tcgactcgg tggcgccgca ggggtacatg 240  
 cccggccggc tctacgacct ggacgcgtcc aagtacggca ccacgcgga gctcaagtgc 300  
 ctaccgcggc cgttccacgc caagggcgtc cagtgcgtgc ccgacgtcgt gatcaaccac 360  
 cgctgcgccc actacaagga cggccgcggc atctactgcg tcttcgaggg cggcacgccc 420  
 gacagcccgc tcgactgggg ccccgacatg atctgcagcg acgacacgca gtactccaac 480  
 gggcgccggc accgcgacac gggggccgac ttcgcccgc cgcccacat cgaccacctc 540  
 aaccgcgccc tgcagcagga gctctcggac tggtcaact ggtcaagtc cgacctcggc 600  
 ttcgacggct ggccctcga cttcgccaag ggctactccg ccgcccgc caaggtgtac 660  
 gtcgacagca ccgccccac cttcgtcgtc gccgagatat ggagctccct ccaactagac 720  
 ggcaacggcg agccgtccag caaccaggac gccgacagge aggagctggc caactgggcg 780  
 caggcggtag gcggccccgc cgcggcgttc gaattacca ccaagggcgt gctgcaggcg 840  
 gccgtccagg gcgagctgtg gcgcatgaag gacggcaacg gcaaggcgcc cgggatgac 900  
 ggctggctgc cggagaagge cgtcacgttc gtcgacaacc acgacaccgg ctccacgcag 960  
 aactcgtggc cattcccctc cgacaaggtc atgcagggt acgcctatat cctcagcac 1020  
 ccaggaactc catgcatctt ctacgaccac gttttcgaact ggaacctgaa gcaggagatc 1080

---

agcgcgctgt ctgcggtgag gtcaagaaac gggatccacc cggggagcga gctgaacatc 1140  
ctcgccgccg acgggatct ctacgtgcc aagattgacg acaaggteat cgtgaagatc 1200  
gggtcacggt acgacgtcgg gaacctgac ccctcagact tccacgccgt tgcccctggc 1260  
aacaactact gcgtttggga gaagcacggt ctgagagttc cagcggggcg gcaccactag 1320